



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTA' DI SCIENZE MM. FF. NN.

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE
CORSO DI LAUREA IN CHIMICA INDUSTRIALE

TESI DI LAUREA

**DETERMINAZIONE DEL 2,5-ESANDIONE LIBERO URINARIO
PER LA VALUTAZIONE DELL'ESPOSIZIONE A n-ESANO**

RELATORE: CH.MO PROF. ANDREA TREVISAN

CORRELATORE: DOTT.SSA MARIELLA CARRIERI

CONTRORELATORE: CH.MO PROF. ANDREA TAPPARO

LAUREANDO: GIULIANO DAL MAGRO

ANNO ACCADEMICO 2009 - 2010

INDICE

1 - IL n-ESANO	5
1.1 - Caratteristiche e proprietà	5
1.2 - Sorgenti di emissione	6
1.2.1 - Sorgenti naturali	6
1.2.2 - Sorgenti antropogeniche	6
1.3 - Produzione e usi del n-esano	7
1.3.1 - Produzione del n-esano	7
1.3.2 - Usi del n-esano	8
2 - IL n-ESANO E L'ORGANISMO UMANO	9
2.1 - Assorbimento dei solventi	9
2.1.1 - Assorbimento polmonare dei solventi	9
2.1.2 - Biotrasformazione dei solventi	10
2.1.3 - Escrezione urinaria dei metaboliti	11
2.2 - Assorbimento del n-esano	12
2.2.1 - Assorbimento polmonare, cutaneo e gastro-enterico	12
2.2.2 - Biotrasformazione	13
2.2.3 - Eliminazione	15
2.3 - Tossicità del n-esano	16
2.3.1 - Tossicità acuta	16
2.3.2 - Tossicità cronica	17
3 - ESPOSIZIONE A n-ESANO E MONITORAGGIO	19
3.1 - Evoluzione storica dell'esposizione al n-esano	19
3.2 - Il monitoraggio dell'esposizione	20
3.2.1 - Monitoraggio ambientale	20
3.2.2 - Monitoraggio biologico	22
3.3 - Il 2,5-esandione urinario	24
3.4 - Limiti di esposizione	25
3.4.1 - Lista dei TLV dell'ACGIH	26

3.4.2 - Limiti biologici di esposizione	27
3.4.3 - Valori di riferimento	29
4 - SCOPO DELLA TESI	31
5 - MATERIALI E METODI	33
5.1 - Determinazione analitica del 2,5-esandione libero	33
5.2 - Controllo interlaboratoriale	37
5.3 - Determinazione analitica del 2,5-esandione libero in soggetti non professionalmente esposti	38
6 - RISULTATI E DISCUSSIONE	39
6.1 - Determinazione del 2,5-esandione libero urinario	39
6.1.1 - Raccolta, conservazione e preparazione dei campioni biologici	39
6.1.2 - Validazione del metodo	39
6.2 - Controllo interlaboratoriale	42
6.3 - Determinazione analitica del 2,5-esandione libero in soggetti non professionalmente esposti	43
6.4 - Determinazione analitica del 2,5-esandione totale in soggetti non professionalmente esposti	48
7 - CONCLUSIONI	51
BIBLIOGRAFIA	53
Allegato	61

IL n-ESANO

1.1 CARATTERISTICHE E PROPRIETÀ

Il n-esano è un idrocarburo alifatico a catena lineare di formula bruta C_6H_{14} , presente in natura come componente del petrolio greggio e del gas naturale. A temperatura e pressione ambiente si presenta come un liquido incolore dall'odore di benzina, di cui è un costituente; è praticamente insolubile in acqua (0,076 g/l), ma miscibile con molti solventi organici, ad esempio con acetone, cloroformio, etere e soprattutto con alcoli. È un composto molto volatile, infiammabile e i suoi vapori possono essere esplosivi; è irritante, nocivo, pericoloso per l'ambiente e tossico per l'uomo. Ha una temperatura di ebollizione di $68,7^{\circ}C$ ed un punto di fusione di $-95,3^{\circ}C$, una densità di 0,660 kg/l (a $20^{\circ}C$) e una tensione di vapore di 150 mm Hg (a $25^{\circ}C$). Il suo peso molecolare è di 86,17 g/mol.

È un solvente molto importante, unico a causa della sua bassissima costante dielettrica. È utilizzato nelle reazioni che coinvolgono basi molto forti, ad esempio nella preparazione di un reattivo di Grignard, poiché non è possibile deprotonare l'esano e quindi non interviene nella reazione.

Il suo utilizzo principale è quello di costituente nelle colle e nei carburanti; in miscela con i suoi isomeri costituzionali e con quelli di eptano e ottano forma la comune benzina per autotrazione. Per le spiccate proprietà di solvente viene utilizzato anche per l'estrazione di oli vegetali.

1.2 SORGENTI DI EMISSIONE

1.2.1 SORGENTI NATURALI

Il n-esano è un componente minore del petrolio greggio e del gas naturale. Le fonti naturali di emissione di n-esano nell'ambiente rappresentano un'esigua percentuale della quantità totale immessa in atmosfera, che è prevalentemente dovuta alle attività antropogeniche, e sono dovute essenzialmente agli incendi boschivi, alle emissioni vulcaniche e ad alcune piante.

1.2.2 SORGENTI ANTROPOGENICHE

La presenza del n-esano in atmosfera è da ricondurre per la quasi totalità ad attività umane, in particolare quelle legate alla lavorazione del petrolio quali: raffinazione, trasporto, stoccaggio, fenomeni evaporativi e processi di combustione. L'inquinamento atmosferico di origine industriale riguarda aree ristrette dal momento che le industrie chimiche e petrolchimiche rappresentano delle fonti localizzate di immissione di n-esano in atmosfera. Gli studi sull'inquinamento ambientale da n-esano sono relativamente pochi, ma la sua presenza in molti tipi di benzina per autoveicoli induce a pensare che sia un microinquinante ubiquitario. Secondo McDermott e Killiany (1978), il contenuto medio di isomeri dell'esano nelle benzine rappresenta il 5,9% del totale, di cui l'1,5%, ovvero circa un quarto, come n-esano. Dagli anni ottanta l'uso crescente di benzine senza piombo ad alto numero di ottani ha portato ad una percentuale sempre crescente di n-esano, la quale si attesta oggi intorno al 3%. Lo studio di Minoia e coll. (1996) sull'aria urbana di tre città del centro-nord Italia ha confermato la costante presenza di questo solvente con concentrazione media (indoor + outdoor) di esposizioni in tre città (Treviglio, Poggibonsi e Valenza) rispettivamente pari a 8,4, 8,8 e 15,2 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Così pure lo studio di De Bortoli e coll. (1985) in 15 abitazioni del nord Italia ha confermato la costante presenza di n-esano con una concentrazione media outdoor pari a 14 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (intervallo 2 – 42 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) e indoor di 71 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (intervallo 3 – 590 $\mu\text{g}/\text{m}^3$). Un terzo

studio condotto da Phillips e coll. (1997) ha segnalato in varie città Europee una concentrazione media di n-esano pari a $4,4 \mu\text{g}/\text{m}^3$ all'esterno e $4,5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ all'interno delle abitazioni. Le fonti di emissione indoor sono dovute, ad esempio, all'uso di solventi, collanti, pitture, agenti sgrassanti e detergenti contenenti n-esano.

L'inquinamento del suolo e delle acque operato dal n-esano è di modesta entità. La pioggia può trasportare il n-esano dall'aria al suolo e alle acque superficiali, ma la scarsa solubilità e l'elevata volatilità ne comportano il rapido ritorno in atmosfera. Nel suolo e nelle acque il n-esano è comunque una sostanza biodegradabile: in condizioni aerobiche i batteri lo trasformano rapidamente prima in alcoli (1-esanolo e 2-esanolo) e poi in acido adipico ed acido esanoico il quale, dopo ulteriore degradazione per β -ossidazione, giunge a formare acetati e butirrati (Heringa et al., 1961).

Il principale meccanismo di degradazione del n-esano nell'atmosfera, invece, è la reazione con il radicale -OH nell'alta troposfera, con un'emivita di 2-3 giorni (Lyman et al., 1982).

1.3 PRODUZIONE E USI DEL n-ESANO

1.3.1 PRODUZIONE DEL n-ESANO

Il n-esano, come già riportato, è un componente del petrolio greggio e del gas naturale. La sua inclusione in una varietà di prodotti petroliferi è la conseguenza di operazioni di raffinazione che separano gli idrocarburi entro intervalli specifici di punti di ebollizione per usi quali combustibili da riscaldamento o carburanti per autotrazione; ulteriori processi portano a diversi gradi di purezza del n-esano a seconda dell'impiego che ne consegue. Sebbene il n-esano possa anche essere sintetizzato a partire dagli scarti della canna da zucchero, usando speciali catalizzatori, le quantità prodotte in questo modo sono ancora molto limitate, essendo questa tecnica relativamente nuova. In pratica tutto il n-esano viene ottenuto da miscele di petrolio per distillazione frazionata controllata e da altri processi basati sulla raffineria (DHHS, 1999).

1.3.2 USI DEL n-ESANO

L'esano commerciale è una miscela di isomeri dell'esano con delle piccole percentuali di ciclopentano, cicloesano, pentano ed eptano; può contenere meno del 20% o più dell'80% di n-esano. Trova largo impiego industriale come costituente di colle, vernici ed inchiostri. È utilizzato nel settore calzaturiero e della pelletteria per l'incollaggio di fodere, rivestimenti e tappezzerie, per la produzione di nastri adesivi e di laminati in polietilene e polipropilene, nonché per la ricostruzione di pneumatici. È inoltre usato come solvente nell'estrazione di oli vegetali che vengono poi ulteriormente trattati per il consumo alimentare (è stato stimato che negli Stati Uniti, negli anni settanta, circa il 30% di tutto il n-esano fosse usato per l'estrazione dell'olio di soia (HSDB, 1996)), come diluente nella produzione di materiali plastici e gomme, come agente denaturante per etanolo. Trova anche impiego nell'industria farmaceutica e cosmetica, nella produzione di tessuti, detergenti e sgrassanti. Nei laboratori chimici viene utilizzato, con una purezza del 99%, per l'estrazione di una vasta gamma di idrocarburi e composti organici non polari (DHHS, 1999).

In uno studio della Fundacentro-SP (Silva et al., 1991) è stato calcolato che il 60% del n-esano veniva utilizzato come solvente nell'industria, il 16% come ingrediente nei collanti e il 14% nella produzione di poliolefine.

Attualmente l'uso del n-esano nei paesi occidentali industrializzati è stato ridotto a causa della sua neurotossicità a favore dell'utilizzo di solventi con proprietà analoghe ma meno nocivi per la salute.

IL n-ESANO E L'ORGANISMO UMANO

2.1 ASSORBIMENTO DEI SOLVENTI

2.1.1 ASSORBIMENTO POLMONARE DEI SOLVENTI

L'assorbimento polmonare è la principale via attraverso la quale i solventi penetrano nell'organismo umano. La loro presenza nell'aria inalata, le piccole dimensioni delle molecole che raggiungono più facilmente le parti più profonde del polmone e l'ampia superficie di scambio alveolo-capillare rappresentano i principali fattori che favoriscono un facile assorbimento.

L'assorbimento polmonare è direttamente proporzionale alla concentrazione ambientale (inalatoria) del solvente, alla sua ritenzione polmonare (cioè alla percentuale di solvente che dopo aver raggiunto le regioni alveolari viene trattenuta nel sangue), alla ventilazione alveolare e al tempo di esposizione.

Dopo essere state inalate, le molecole di solvente entrano in contatto con la membrana alveolo-capillare. I solventi che hanno un elevato coefficiente di ripartizione sangue/aria tendono ad entrare nel circolo ematico; al contrario, quelli con un ridotto coefficiente di ripartizione sangue/aria tendono a rimanere in elevate concentrazioni nell'aria alveolare.

Appena un solvente raggiunge il circolo ematico, inizia la sua rapida distribuzione nei vari compartimenti del corpo. Le modalità con cui ciò avviene dipendono fondamentalmente dalle caratteristiche chimico-fisiche del solvente, dalla composizione biochimica dei tessuti e dal flusso ematico ai singoli tessuti. Un solvente molto lipofilo e scarsamente idrofilo tenderà a localizzarsi nei tessuti ricchi di lipidi, mentre in quelli a basso contenuto di grassi sarà presente in quantità ridotte. Diversamente, i solventi solubili in ambienti acquosi, ma che presentano anche una buona affinità per componenti lipidiche, tenderanno a distribuirsi in modo piuttosto omogeneo.

Una volta assorbiti, i solventi organici sono sottoposti a molteplici processi di biotrasformazione che in molti casi originano molecole reattive a cui si possono attribuire numerosi effetti biologici e/o tossici.

2.1.2 BIOTRASFORMAZIONE DEI SOLVENTI

La farmacologia e di conseguenza la tossicologia generali classificano le possibili biotrasformazioni che avvengono nell'organismo umano in due fasi.

La prima comprende i processi di idrolisi, di riduzione e di ossidazione che portano all'inserimento di radicali chimici (quali -OH, -SH, -NH₂, ecc.) negli xenobiotici rendendoli più elettrofili.

La seconda comprende la formazione di legami covalenti tra lo xenobiotico, o tra i metaboliti prodotti nella prima fase, e le molecole endogene quali, ad esempio, acido glucuronico, acido solforico e glutazione. Il composto derivato è molto idrosolubile, facilmente mobilitato dai sistemi di trasporto delle membrane biologiche e generalmente reso inattivo nel suo potenziale tossico.

Anche se la maggior parte dei processi metabolici avviene nel fegato, dove hanno luogo molte ed efficienti attività enzimatiche, è comunque da ricordare che cellule presenti nei polmoni, nell'intestino, nel midollo osseo, nei tubuli renali, nelle strutture placentari e nella cute possiedono vari tipi di sistemi enzimatici che possono partecipare ai processi di biotrasformazione.

Questi processi metabolici possono assumere importanza per quanto riguarda la tossicologia industriale, la quale studia la presenza e gli effetti delle sostanze tossiche usate in ambienti e luoghi di lavoro. Talora vengono sintetizzati metaboliti con effetti biologici meno rilevanti di quelli ascrivibili ai prodotti di partenza (inattivazione metabolica), ma in molti altri casi vengono sintetizzate molecole che sono più dannose di quelle da cui derivano (attivazione metabolica). Il n-esano, ad esempio, ha effetti neurotossici provocati da un suo metabolita e non dagli altri, né dal solvente stesso. Molto spesso i prodotti metabolici hanno una breve emivita, poiché vengono sottoposti ad ulteriori processi di biotrasformazione. Però la loro elevata reattività si associa a possibili effetti cancerogeni o tossici.

2.1.3 ESCREZIONE URINARIA DEI METABOLITI

La funzione renale favorisce una rapida ed intensa escrezione di un numero molto elevato di molecole. Spesso i metaboliti sono coniugati con acido glucuronico, acido solforico, amminoacidi o glutazione e filtrano attraverso i glomeruli renali. Una volta filtrati, a livello dei tubuli renali avviene un intenso riassorbimento di molecole d'acqua: questo meccanismo fisiologico comporta che i metaboliti, come molti altri prodotti presenti nel filtrato glomerulare, aumentino progressivamente in concentrazione lungo il percorso e raggiungano il valore massimo una volta giunti nella vescica.

L'urina è costituita per il 90-98% da acqua, il resto è rappresentato da centinaia di tipi di piccole molecole organiche e inorganiche presenti in quantità diverse, inclusi i metaboliti dei solventi. È comprensibile che l'intensità dell'assorbimento dell'acqua lungo i tubuli renali sarà determinante per definire la concentrazione finale nell'urina. Il volume giornaliero di urina può variare da 600 a 2500 ml e la sua componente solida è compresa tra 30 e 70 g: ne consegue che il valore del peso specifico di campioni di urina diversi sia molto variabile e generalmente compreso tra 1,003 e 1,035. Quindi, in soggetti con diverso carico corporeo d'acqua ma sottoposti all'assorbimento della stessa dose di solvente, nonché in presenza di analoghe velocità di biotrasformazione ed escrezione, i livelli urinari possano risultare diversi. Per questo si ricorre spesso all'aggiustamento dei risultati per concentrazione-diluizione del campione in esame. In genere la correzione avviene per la concentrazione della creatinina. La creatinina escreta con le urine deriva dai processi metabolici che interessano i tessuti muscolari striati ed è relativamente costante nella quantità giornalmente escreta (1,7 g), indipendentemente dal volume delle stesse.

Una variabile di notevole interesse per il monitoraggio biologico di soggetti esposti a solventi è l'emivita dei metaboliti. I prodotti metabolici con emivita urinaria inferiore a 2-4 ore sono sintetizzati ed escreti molto rapidamente e quindi la raccolta dei campioni biologici deve essere effettuata rigorosamente al termine dell'esposizione. Un discreto numero di metaboliti presenta, invece, un'emivita compresa tra 5 e 15 ore. Tenendo presente che è necessario il tempo corrispondente a 5 emivite per eliminare quasi completamente uno xenobiotico dall'organismo, per questi metaboliti si avrà un modesto accumulo nel corso della settimana lavorativa e la raccolta dei

campioni urinari verrà effettuata alla fine di quest'ultima. I metaboliti con emivita urinaria superiore a 15 ore sono poco numerosi: per essi la tendenza ad un accumulo è più marcata, con concentrazioni nelle urine crescenti nel corso della settimana lavorativa, ed è possibile misurarne la presenza anche ad inizio settimana, prima dell'inizio del turno di lavoro (Bartolucci et al., 2003; Minoia et al., 2001).

2.2 ASSORBIMENTO DEL n-ESANO

2.2.1 ASSORBIMENTO POLMONARE, CUTANEO E GASTRO-ENTERICO

Come tutti i solventi prevalentemente liposolubili, il n-esano può essere assorbito dall'organismo umano per via polmonare, digestiva e cutanea.

L'assorbimento polmonare rappresenta la principale via di penetrazione nell'organismo. Per effetto della bassa solubilità ematica la maggior parte di esso viene eliminata con l'aria espirata. Mediante campionamenti ambientali e alveolari su soggetti volontari, alcuni studi (Brugnone et al., 1978; Veulemans et al., 1982; Mutti et al., 1984; Hamelin et al., 2004) evidenziano una concentrazione alveolare di n-esano esalato compresa tra 73 e 85% della dose inalata; ne consegue una ritenzione polmonare compresa tra 15 e 27%. A parità di esposizione, la percentuale assorbita è diversa da soggetto a soggetto in funzione di variabili individuali quali costituzione corporea, ventilazione polmonare, ecc.

L'assorbimento cutaneo del n-esano può avvenire in modo significativo, ma i dati disponibili in questo senso non sono numerosi. Si stima che la dose di solvente assorbita per via inalatoria durante un'esposizione a 50 ppm per 8 h possa essere incrementata di oltre il 30% dall'assorbimento percutaneo (Cardona et al., 1993). A conferma è stato verificato che l'uso di adeguati dispositivi di protezione individuale (guanti) riduce significativamente l'assorbimento del solvente (Prieto et al., 2003).

L'assorbimento gastro-enterico non è mai stato studiato in modo specifico. È probabile che il n-esano possa facilmente superare le membrane biologiche e raggiungere il circolo ematico; il basso punto di ebollizione potrebbe però mantenere

una quota del solvente in forma gassosa e rallentarne quindi l'assorbimento intestinale.

2.2.2 BIOTRASFORMAZIONE

La biotrasformazione del n-esano porta alla formazione di diversi metaboliti. La figura 1 sintetizza le tappe metaboliche nell'uomo. La prima trasformazione avviene nei polmoni e consiste nell'ossidazione del n-esano sul carbonio in posizione 2, dando origine al 2-esanolo (Strassnig et al., 2004). Il 2-esanolo e il residuo n-esano vengono trasportati dal sangue nel fegato dove, mediante il citocromo P-450, i processi ossidativi portano alla formazione di 2,5-esandiolo oppure di metil-n-butilchetone (2-esanone), i quali generano il 5-idrossi-2-esanone. La maggior parte di quest'ultimo si trasforma, dopo un'ulteriore ossidazione, in 4,5-diidrossi-2-esanone, che è il metabolita prevalente del n-esano; una percentuale minore, invece, dà origine al 2,5-esandione. Sia il 5-idrossi-2-esanone che il 4,5-diidrossi-2-esanone vengono velocemente escreti per via urinaria dopo coniugazione con acido glucuronico, ed entrambi sono in costante equilibrio con il 2,5-esandione, che non è invece coniugato. La coniugazione viene interpretata come una via di detossificazione, in quanto limita la formazione del metabolita responsabile della tossicità del n-esano, il 2,5-esandione (Oliveira et al., 2009; Nolasco et al., 2007).

Sottoponendo ad idrolisi acida un campione di urina, i glucuronati decompongono portando alla formazione prevalente di 2,5-esandione; una piccola parte di essi può dare origine a 2,5-dimetilfurano e γ -valerolattone, soprattutto in relazione al pH al quale viene effettuata l'idrolisi. Il 2,5-esandione misurabile dopo questa operazione, ovvero quello derivato dalla decomposizione dei glucuronati sommato a quello non coniugato, viene definito 2,5-esandione "totale"; il 2,5-esandione non coniugato, ovvero quello presente nell'urina senza alcun trattamento, viene definito 2,5-esandione "libero" (AICGH, 2010; Minoia et al., 2001).

È interessante notare che nelle tappe del metabolismo del n-esano compare il metil-n-butilchetone, una sostanza chimica che, in alcune industrie o in laboratori di analisi chimiche, può essere utilizzata direttamente come solvente organico. È intuitivo, e comunque dimostrato da studi sperimentali (Abdel-Rahman et al., 1976; Bos et al., 1991), che i processi metabolici siano comuni ai due solventi.

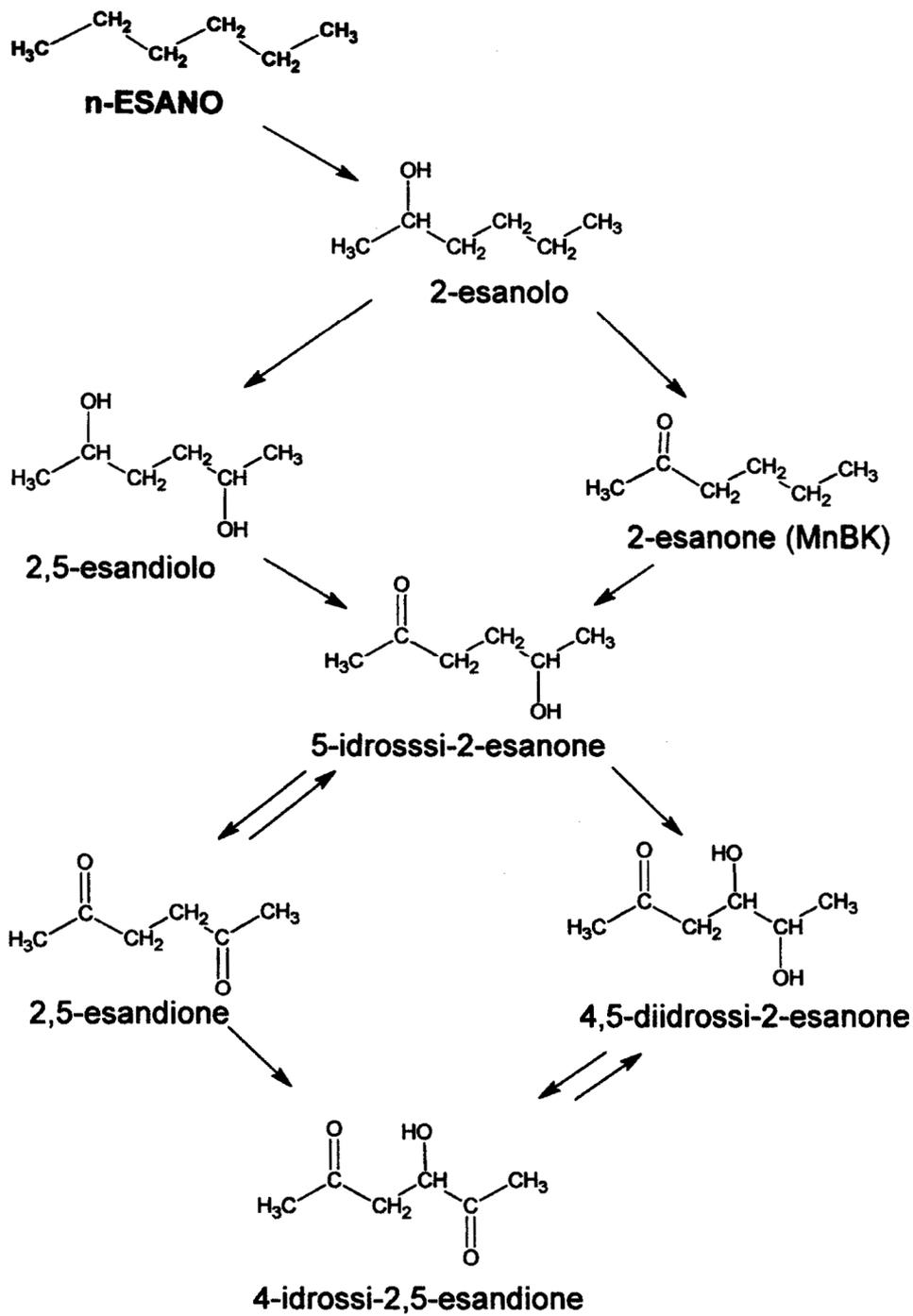


Figura 1: schema del metabolismo del n-esano.

2.2.3 ELIMINAZIONE

Il n-esano assorbito si distribuisce rapidamente nei tessuti tramite il sangue e viene eliminato immodificato oppure attraverso i suoi metaboliti dall'organismo e l'escrezione può avvenire per diverse vie.

Studi condotti da Mutti e coll. (1981) hanno evidenziato che circa il 10% della dose di n-esano assorbita era rilevabile nell'aria esalata nelle ore successive all'esposizione. Tali studi hanno inoltre evidenziato come vi siano due stadi di eliminazione, con un'emivita rispettivamente di 10 e 98 minuti, associabili alle fasi durante le quali il n-esano lascia i tessuti a più elevata vascolarizzazione e quelli muscolari. Una terza fase riguarda il rilascio di n-esano da parte del tessuto adiposo la quale presenta un'emivita prossima alle 64 ore: i tempi molto più lunghi sono dovuti all'elevata liposolubilità del solvente (Perbellini et al., 1986 A).

L'escrezione urinaria di n-esano è molto modesta. La velocità di comparsa del solvente nelle urine è rapida, così come la cinetica di eliminazione.

La maggior parte del n-esano assorbito viene escreto nelle urine sotto forma di metaboliti. A parità di esposizione al solvente, le concentrazioni urinarie dei principali metaboliti sono differenti: le più elevate riguardano il 2,5-esandione "totale". Gli studi si sono concentrati su questo metabolita in quanto, oltre ad essere quello prevalente, è considerato il più neurotossico tra i prodotti metabolici del n-esano. Perbellini e coll. (1985) hanno rilevato che la velocità di escrezione urinaria del 2,5-esandione in soggetti esposti a n-esano presentava un'emivita di 11-14 ore; Kawai e coll. (1992) hanno raggiunto risultati simili, con emivita fino a 17 ore. Questi dati indicano un potenziale accumulo del metabolita durante l'esposizione quotidiana.

2.3 TOSSICITÀ DEL n-ESANO

Come per molte sostanze, anche per il n-esano si distinguono una tossicità acuta, che si manifesta in seguito ad un'esposizione breve e ad elevate concentrazioni, ed una tossicità cronica, che si manifesta per esposizioni prolungate anche a basse concentrazioni.

2.3.1 TOSSICITÀ ACUTA

La tossicità acuta conseguente ad un'esposizione inalatoria è prevalentemente a carico del sistema nervoso centrale (effetto aspecifico comune a quasi tutti i solventi). A basse dosi non sono state riscontrate conseguenze immediate sulla salute, mentre a dosi elevate l'effetto è di tipo anestetico, simile a quello provocato da molti solventi, causato da un effetto depressivo diretto, non mediato da metaboliti. Per esposizioni a concentrazioni comprese tra 1000 e 5000 ppm (5000 ppm per 10 minuti) la sintomatologia dell'intossicazione comprende sonnolenza, stordimento, confusione, vertigine, narcosi, cefalea, nausea (Hathaway et al., 1991; Clayton e Clayton, 1982); l'esposizione a concentrazioni maggiori e/o per tempi più prolungati, oltre ai sintomi già elencati, può portare a vomito, perdita di coordinazione, visione offuscata, fino a convulsioni, perdita di coscienza, coma o morte per esposizioni estreme.

Soggetti esposti a 880 ppm di n-esano per 15 minuti hanno manifestato sintomi quali irritazione delle mucose respiratorie ed oculari, tosse, difficoltà respiratoria e, in pochi casi, visione sdoppiata per qualche giorno dopo la fine dell'esposizione (Clayton e Clayton, 1982).

Anche il contatto diretto con la pelle causa irritazione e può portare a dermatite, con gonfiore e formazione di vesciche. Non sembra invece nocivo per gli organi interni l'assorbimento per via cutanea.

2.3.2 TOSSICITÀ CRONICA

L'esposizione cronica a n-esano porta principalmente ad effetti neurotossici, ben documentati. Questa è una caratteristica peculiare dell'esano a catena lineare e che gli isomeri ramificati invece non presentano. Più precisamente essa può provocare un serio danno del sistema nervoso, classificato come assonopatia degenerativa distale centrale-periferica. Il primo sintomo che manifesta l'insorgenza di questa polineuropatia è una sensazione di parestesie ai piedi e alle mani; successivamente compaiono debolezza muscolare e leggero dolore alle estremità degli arti, con un modesto ritardo di quelli superiori rispetto a quelli inferiori. Il decorso clinico prosegue includendo atrofia muscolare, debolezza motoria, intorpidimento e formicolio degli arti; nei casi più gravi la debolezza motoria si può estendere alla muscolatura pelvica e si può inoltre giungere alla paralisi di gambe e braccia. Studi neurologici hanno evidenziato dei danni neurogenici, in particolare una diminuzione nella conduzione dei motoneuroni e una ipertrofia dei neuroni associata a un assottigliamento della guaina mielinica. I disturbi neurologici continuano per qualche mese dopo la fine dell'esposizione e la totale guarigione avviene generalmente entro un anno, sebbene siano riportati dei casi in cui sono stati necessari più di due anni (Hathaway et al., 1991).

Studi tossicologici hanno dimostrato che il responsabile della neuropatia sensitivo-motoria non è direttamente il n-esano, bensì il suo principale metabolita, il 2,5-esandione. Chimicamente, il metabolita è un γ -dichetone in grado di reagire coi gruppi amminici per formare pirroli (in tutti i tessuti), ma l'effetto rilevante si ha nel sistema nervoso dove il citoscheletro dell'assone, in particolare i neurofilamenti, è costituito da proteine molto stabili; lo sviluppo di aggregati di neurofilamenti nell'assone distale causa massivo rigonfiamento assonale, spesso in prossimità dei nodi di Ranvier. Ciò esita in una marcata distorsione dell'anatomia nodale, inclusa la mielina paranodale. In ogni caso, la derivatizzazione del pirrolo non è sufficiente a causare rigonfiamento neurofilamentoso; è necessaria l'ossidazione seguita da un attacco nucleofilo e un legame crociato coi neurofilamenti (Zhu et al., 1994; Woehrling et al., 2006).

In associazione alle polineuropatie indotte dal n-esano sono stati riscontrati altri effetti, quali astenia, cefalea, visione offuscata, riduzione del campo visivo, atrofia del nervo ottico e, in taluni casi, cardiotossicità.

Le informazioni disponibili sugli effetti cancerogeni del n-esano sono molto scarse. Esperimenti effettuati sugli animali (Bio/Dynamics, 1995) hanno evidenziato solo in qualche caso un aumento del cancro al fegato, dopo un'esposizione di due anni. In seguito a mancanza di evidenze il n-esano non è classificato come cancerogeno.

Discorso analogo si può fare riguardo ad eventuali danni all'apparato riproduttivo. Studi effettuati sui ratti (EPA, 1999) hanno constatato una progressiva atrofia testicolare, spesso irreversibile. Per quanto concerne l'uomo, il n-esano è considerato potenzialmente dannoso, ma ciò non è dimostrato.

Negli ultimi decenni, molti studi hanno cercato di correlare l'esposizione a n-esano con i sintomi delle polineuropatie nei soggetti professionalmente esposti.

Yamamura (1969) ha riscontrato la presenza di polineuropatie in 93 su 296 lavoratori esposti a n-esano nella lavorazione di sandali: l'esposizione era in un range di concentrazioni comprese tra 500 e 2500 ppm per 48 ore durante la settimana lavorativa. Sullo stesso gruppo di lavoratori, Inoue e coll. (1970) hanno evidenziato che alcuni soggetti mostravano effetti tossici nonostante un'esposizione mai superiore a 500 ppm di n-esano. Herskowitz e coll. (1971) hanno descritto 3 casi di polineuropatie tra i lavoratori impiegati in un mobilificio dove le concentrazioni di n-esano nell'aria erano mediamente pari a 650 ppm. Takeuchi e coll. (1975) hanno descritto 4 soggetti affetti da polineuropatia i quali utilizzavano un solvente contenente il 12,5% di n-esano: la concentrazione dei vapori di n-esano nell'aria probabilmente non superava i 210 ppm.

Abritti e coll. (1976) e Buiatti e coll. (1978) hanno valutato l'incidenza di polineuropatie tra i lavoratori dell'industria calzaturiera italiana e documentato la correlazione tra l'incidenza e l'intensità dei sintomi neurologici e il grado di esposizione ai solventi nelle colle contenenti principalmente pentani, esani ed eptani. Per Buiatti e coll. (1978), i solventi apparentemente responsabili degli 86 casi di polineuropatie su 338 lavoratori contenevano dal 40% al 90% di n-esano: non sono state misurate le concentrazioni nell'aria dei vapori dei solventi, ma alcuni lavoratori affetti usavano meno di 1,3 kg di colla al giorno, inducendo a pensare che la concentrazione media del solvente non superasse i 500 ppm.

Nel corso degli anni le condizioni di esposizione sono notevolmente migliorate, sia per la regolamentazione dell'uso del n-esano, sia per le migliori norme igieniche adottate nei luoghi di lavoro. Già negli anni ottanta i casi di polineuropatie erano in netta diminuzione.

ESPOSIZIONE AL n-ESANO E MONITORAGGIO

3.1 EVOLUZIONE STORICA DELL'ESPOSIZIONE AL n-ESANO

Nel corso del secolo scorso, il problema del rischio derivante dal n-esano ha interessato prevalentemente l'esposizione professionale, nell'ambito della quale si è assistito all'insorgenza di polineuropatie. Storicamente i lavoratori che hanno fatto registrare le maggiori esposizioni a n-esano e che sono stati affetti da disturbi neurologici sono quelli impiegati nell'industria calzaturiera: al riguardo ci sono parecchi dati. Altre tipologie di lavoratori a rischio sono ad esempio quelli impiegati nel settore della pelletteria o altri settori in cui vengano utilizzati collanti contenenti n-esano, o nella ricostruzione di pneumatici, oppure quelli a contatto con inchiostri. Negli anni sessanta e settanta sono stati riscontrati molti casi di soggetti con danni al sistema nervoso: la causa principale dell'elevata esposizione era la scarsa ventilazione degli ambienti di lavoro. Basandosi sulle condizioni di esposizione tipiche degli anni settanta, è stato stimato che più di seicentomila lavoratori erano potenzialmente esposti a n-esano (NOES, 1991). Le recenti regolamentazioni più rigide hanno permesso, in Italia e in numerosi altri paesi occidentali, la riduzione dell'esposizione professionale a n-esano e i casi di polineuropatie ad essa collegati erano in netto calo già a partire dagli anni ottanta, ma in alcuni paesi questo problema continua a sussistere.

Per quanto riguarda invece l'esposizione non professionale, la concentrazione di n-esano negli ambienti di vita è molto bassa e non è tale da poter provocare danni per la salute. L'unico rischio è quello dell'uso di solventi, collanti, pitture, agenti sgrassanti e detersivi contenenti n-esano in ambito domestico, il quale può portare a degli effetti tossici acuti.

3.2 IL MONITORAGGIO DELL'ESPOSIZIONE

Con il termine “monitoraggio” viene indicata qualsiasi indagine, ripetuta e sistematica, effettuata con lo scopo di raccogliere informazioni relative alla modalità o alla frequenza con cui un certo evento ha luogo.

Le finalità del monitoraggio dell'esposizione sono di tipo preventivo e protettivo, in quanto mirano ad evitare che vengano a verificarsi (o a segnalare qualora si verificano) condizioni espositive che, se protratte nel tempo, possono dar luogo all'insorgenza di effetti dannosi per la salute. In base ai risultati del monitoraggio, potranno essere effettuati degli interventi di bonifica o risanamento ambientale e prese misure di protezione personale per ridurre l'entità dell'esposizione.

La valutazione del grado di contaminazione ambientale e del rischio espositivo viene effettuata per confronto dei valori ottenuti dal monitoraggio con appropriati riferimenti (limiti ambientali e biologici di riferimento).

Il monitoraggio può essere ambientale o biologico: le finalità delle due modalità possono essere differenti, ma entrambi forniscono informazioni utili per la valutazione dell'entità dell'esposizione e quindi del rischio per la salute.

3.2.1 MONITORAGGIO AMBIENTALE

Il monitoraggio ambientale consiste nella misura della concentrazione aerodispersa o depositata sulle superfici di un determinato agente. Per la valutazione della concentrazione aerodispersa il monitoraggio ambientale viene eseguito mediante l'analisi di volumi d'aria, opportunamente campionati, rappresentativi dell'aria presente in un certo ambiente ed in un certo tempo. Le modalità con cui viene effettuato il campionamento dell'aria sono diverse: è possibile distinguere una tecnica di campionamento diretto, la quale prevede la raccolta di un certo volume d'aria che, senza alcun trattamento, viene introdotta in un idoneo recipiente e trasportata in laboratorio per essere analizzata; oppure una tecnica di campionamento con concentrazione, che prevede di far fluire una quantità nota d'aria attraverso un dispositivo di captazione nel quale l'inquinante viene accumulato e dal quale viene

successivamente recuperato per l'analisi. Il tipo di informazione che si ottiene dipende dalla durata del prelievo. Se il campionamento è molto breve, l'analisi del volume d'aria campionata fornisce informazioni sulla concentrazione istantanea dell'inquinante, mentre se il prelievo ha lunga durata, l'informazione che si ottiene è relativa ad un valore medio di concentrazione (campionamento integrato).

Per la determinazione della concentrazione ambientale del n-esano si utilizzano, come per altri solventi, dei campionatori in posizione fissa nei luoghi di lavoro, permettendo di differenziare le aree in base al grado di contaminazione, di localizzare le fonti di emissione dell'inquinante o di individuare i processi e le fasi della lavorazione che comportano la maggiore emissione dell'inquinante nell'ambiente; oppure si utilizzano dei campionatori posizionati direttamente sui soggetti da monitorare (campionatori personali) permettendo così la valutazione dell'esposizione individuale, poiché tengono conto degli spostamenti della persona che li indossa e quindi dell'aria che effettivamente essa respira.

Se il monitoraggio viene condotto per verificare l'osservanza delle norme relative ai limiti di esposizione, poiché questi si riferiscono comunemente a concentrazioni medie ponderate nel tempo, il prelievo dell'aria viene effettuato con la tecnica della concentrazione, facendo fluire forzatamente l'aria mediante l'uso di pompe aspiranti a portata nota attraverso adatti sistemi di captazione (campionatori attivi): fra questi, quelli di uso maggiore sono costituiti da un adatto materiale adsorbente contenuto in un tubicino o una fiala di vetro collegata con una pompa aspirante. Esistono anche dei campionatori passivi nei quali il contatto tra l'aria e il materiale adsorbente si verifica per effetto dei moti atmosferici naturali e dei processi diffusivi. In entrambi i casi il materiale adsorbente utilizzato è il carbone attivo che è ottimo per questo scopo in quanto molto poroso e con una superficie effettiva molto più estesa di quella geometrica (a 1 cm² di superficie geometrica corrisponde una superficie adsorbente di 1000 m²). Inoltre questo materiale cattura in maniera efficiente un gran numero di inquinanti, che restituisce per l'analisi con procedure semplici, e ne è sufficiente l'impiego in piccola quantità ai fini del campionamento. L'analita viene successivamente desorbito utilizzando come solvente una quantità nota di solfuro di carbonio e l'analisi è poi condotta mediante gascromatografia.

I campionatori attivi sono costituiti da un tubo di vetro saldato alle estremità e con diametro fisso; all'interno del tubo è presente carbone attivo compresso e fissato con lana di vetro, che ha pure la funzione di trattenere le polveri. Solitamente si

utilizzano due strati di materiale adsorbente, disposti in serie, di volume e peso l'uno la metà dell'altro e separati da un setto di schiuma poliuretana, uno denominato strato di testa e l'altro strato di coda. Tale sistema permette di evidenziare se vi sia stata o meno saturazione del substrato nella fase del prelievo. Questo non si verifica qualora la quota dell'inquinante riscontrata nello strato di coda non superi il 10-20% di quella nello strato di testa.

Recentemente si è diffuso sempre di più l'utilizzo dei campionatori passivi. Essi catturano le sostanze per adsorbimento su carbone attivo, come i campionatori attivi, ma sono costituiti da un substrato di raccolta per la sostanza inquinante, da una resistenza primaria di equilibrio che costituisce la superficie di esposizione del campionatore a contatto con l'aria esterna, e da una camera di diffusione tra la resistenza ed il substrato dove si verificano le condizioni di diffusione. La portata del campionamento è legata alle caratteristiche del campionatore stesso e il tempo di esposizione deve essere valutato in base alla prevedibile concentrazione ambientale, pena il rischio di saturare il substrato. Un esempio di campionatore passivo è il Radiello®, caratterizzato da un sistema di diffusione radiale. E' composto essenzialmente da una piastra di supporto in policarbonato, un cilindro diffusivo in polietilene sinterizzato ed una cartuccia adsorbente cilindrica in rete di acciaio (diametro 5,9 mm) contenente il materiale adsorbente diverso per dimensione e qualità a seconda della sostanza che si vuole monitorare.

3.2.2 MONITORAGGIO BIOLOGICO

Il monitoraggio biologico rappresenta, a differenza di quello ambientale, una misura diretta dell'esposizione a sostanze aerodisperse attraverso tutte le vie di penetrazione. Questa si effettua mediante la determinazione delle concentrazioni di idonei indicatori biologici, le quali sono correlabili quantitativamente alla dose effettivamente assorbita da ogni singolo soggetto (dose interna).

La base teorica su cui si fonda la pratica del monitoraggio biologico è che l'indicatore biologico, riflettendo la dose interna dell'agente tossico, permette una valutazione quantitativa più accurata dei potenziali effetti sulla salute e quindi una migliore stima del rischio.

Il monitoraggio biologico dell'esposizione a n-esano prevede il dosaggio del solvente tal quale oppure un prodotto metabolico e, tra tutti, i metaboliti urinari sono potenzialmente i marcatori preferiti, se sufficientemente sensibili e specifici nella pratica del monitoraggio biologico.

La valutazione della dose assorbita dall'organismo può essere fatta mediante la determinazione delle concentrazioni del n-esano immodificato nell'aria alveolare espirata, nel sangue e nelle urine.

Attualmente la misura del n-esano nell'aria alveolare espirata (Mutti et al., 1984; Raymer e Pellizzari, 1996; Veulemans et al., 1982) è sempre meno utilizzata.

Il campionamento deve avvenire subito dopo l'esposizione in quanto, dopo la fine di quest'ultima, la concentrazione dei vapori nell'aria espirata decresce esponenzialmente. E' stato stimato che per esposizioni comprese tra 100 e 200 ppm di n-esano, è possibile rinvenire il solvente nell'aria esalata per circa 12-24 ore, ma il valore sperimentale è influenzato dal tempo di campionamento e dalla modalità di raccolta. Nel 1991 l'ACGIH ha segnalato che l'interpretazione dei risultati ottenuti con questa tecnica è semiquantitativa.

Per quanto riguarda la valutazione del n-esano nel sangue, alcuni studi (Brugnone et al., 1978; Veulemans et al., 1982) hanno evidenziato che, durante l'esposizione professionale, la concentrazione ematica del solvente era pari al 50-60% di quella ambientale. In conseguenza della limitata solubilità del n-esano nel sangue, le concentrazioni ematiche si modificano rapidamente in funzione dei livelli ambientali, quindi il n-esano nel sangue raccolto al termine del turno di lavoro è in equilibrio con le concentrazioni ambientali presenti nelle ultime fasi dell'esposizione. È stato inoltre rilevato un aumento significativo dei livelli del solvente nel sangue nei fumatori rispetto ai non fumatori (Brugnone et al., 1994).

Le concentrazioni urinarie di n-esano raggiungono livelli molto modesti, dato che il coefficiente di ripartizione urina/sangue di questo solvente è inferiore a 1. Dallo studio di Imbriani e coll. (1984) risulta che i valori di n-esano nelle urine raccolte dopo 4 ore di attività da parte di un gruppo di lavoratori calzaturieri erano prossimi al 7% dei livelli ambientali e che l'escrezione urinaria del solvente è caratterizzata da una cinetica molto più rapida dei suoi metaboliti.

Nel caso del n-esano, è da molto tempo utilizzato come indicatore di esposizione professionale il 2,5-esandione urinario. La concentrazione urinaria di tale metabolita è risultata ben correlata con l'esposizione ambientale negli ambienti di lavoro

qualora si tenga conto della farmacocinetica urinaria del metabolita. In uno studio condotto da Mutti e coll. (1984) è stata evidenziata un'escrezione urinaria di 2,5-esandione pari a 3 mg/g creatinina per un'esposizione a n-esano pari a 50 ppm.

Fino al 2003 i campioni urinari venivano sottoposti ad idrolisi acida in modo che altri metaboliti si trasformassero in 2,5-esandione, il quale andava a sommarsi a quello presente tal quale (o, meglio, in forma "libera") nell'urina. Dal 2003 l'American Conference of Governmental Industrial Hygienist (ACGIH) raccomanda di utilizzare come indicatore biologico il 2,5-esandione "libero" urinario, presente in concentrazione minore ma più direttamente correlato ai rischi per la salute.

3.3 IL 2,5-ESANDIONE URINARIO

Il 2,5-esandione è un dichetone di formula bruta $C_6H_{10}O_2$, noto soprattutto per essere il metabolita tossico del n-esano. A temperatura e pressione ambiente si presenta come un liquido incolore; la sua temperatura di ebollizione è pari a $191,4^{\circ}C$, mentre il punto di fusione è di $-5,5^{\circ}C$ ed è abbastanza volatile. Possiede una densità pari a $0,973 \text{ kg/l}$ e il suo peso molecolare è di $114,14 \text{ g/mol}$. La solubilità in acqua è $\geq 10 \text{ g/100 ml}$.

Dopo esposizione a n-esano il metabolismo ossidativo porta alla formazione di 2,5-esandione, come evidenziato dallo schema metabolico riportato in figura 1. Questo metabolita è prevalentemente in forma di 4,5-diidrossi-2-esanone, mentre solo una quantità pari all'incirca al 10–30% è escreto come 2,5-esandione tal quale.

Il primo composto viene escreto con le urine in forma coniugata con l'acido glucuronico: sottoponendo il campione biologico ad idrolisi acida, il 4,5-diidrossi-2-esanone dà luogo ad una reazione di ciclizzazione con formazione di 2,5-dimetil-furano; in condizioni di elevata acidità il 2,5-dimetil-furano è instabile, con conseguente reazione di apertura dell'anello e formazione di 2,5-esandione. La trasformazione completa è possibile soltanto per un valore di $pH < 0,5$ (Minoia et al., 2001). In figura 2 è riportata la formula di struttura.

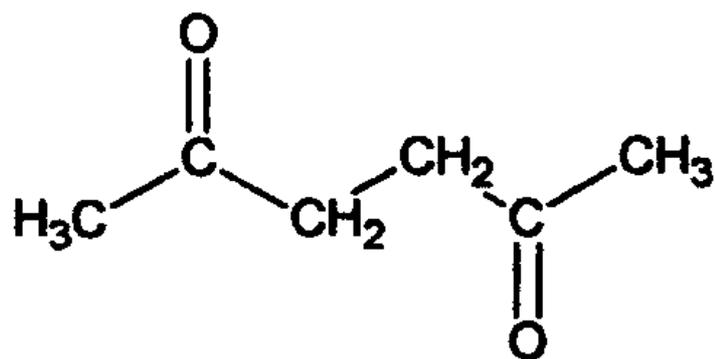


Figura 2: formula di struttura del 2,5-esandione.

Come già riportato, fino al 2003 l'indicatore di esposizione normalmente utilizzato era il 2,5-esandione "totale", dato dalla somma del 2,5-esandione tal quale e di quello ottenuto con l'idrolisi acida. L'analisi veniva condotta sottoponendo il campione urinario ad idrolisi acida mediante l'aggiunta di HCl concentrato. Ad idrolisi avvenuta si procedeva con la derivatizzazione del 2,5-esandione utilizzando una soluzione di 2,4-dinitrofenilidrazina, così da ottenere il 2,4-dinitrofenilidrazone, un composto stabile e con un ragionevole tempo di ritenzione per l'analisi che veniva condotta in HPLC con rivelatore UV (Gori et al., 1995).

3.4 LIMITI DI ESPOSIZIONE

Il limite di esposizione ad un dato agente (chimico, fisico, biologico) è un valore di riferimento che permette la valutazione del grado di contaminazione di un certo ambiente e del potenziale rischio per la salute conseguente ad un dato evento espositivo.

Parlando di limiti di esposizione, ci si riferisce generalmente a limiti ambientali, ovvero a valori limite di presenza di un dato agente nell'ambiente. Per sostanze aerodisperse (gas, vapori, particelle), il limite rappresenta il valore di concentrazione della sostanza nell'aria che non deve essere superato. Esistono anche limiti biologici di esposizione, ovvero valori di concentrazione limite dei marcatori biologici

nell'organismo. Tanto i limiti ambientali quanto i limiti biologici di esposizione rappresentano dei valori di riferimento che permettono la gestione dei dati provenienti dalle misure condotte nel monitoraggio ambientale e biologico, e quindi la valutazione della salubrità degli ambienti in funzione della protezione della salute umana.

3.4.1 LISTA DEI TLV DELL'ACGIH

La lista dei limiti di riferimento più nota, e a cui fanno riferimento numerosi enti normatori di molti paesi, è quella dell'ACGIH. I valori limite di soglia, Threshold Limit Value - Time Weighted Average (TLV-TWA), si riferiscono a concentrazioni atmosferiche di sostanze alle quali si ritiene che pressoché tutti i lavoratori possano essere esposti giornalmente senza incorrere in effetti nocivi. Il TLV-TWA si riferisce alla concentrazione media ponderata nel tempo (giorno di 8 ore lavorative, 40 ore settimanali).

In particolare, gli sforzi per il controllo dell'esposizione professionale a n-esano iniziarono attorno al 1940. Il primo limite fu introdotto nel 1946 dall'ACGIH, che fissò un valore limite al solvente di 500 ppm inteso come MAC (Maximum Allowable Concentration)-TWA, valore confermato due anni dopo ed inteso come TLV-TWA.

Nel corso degli anni il limite ha subito delle variazioni fino al TLV-TWA adottato dall'ACGIH dal 1998, ancora in vigore, pari a 50 ppm (176 mg/m³). Esso è accompagnato dalla notazione *skin* (cute) e cioè vale solo se è evitato l'assorbimento cutaneo per mezzo di guanti protettivi.

Non ci sono sufficienti dati a disposizione per raccomandare le notazioni SEN (sensibilizzazione) e di cancerogenicità oppure un TLV-STEL (Short Term Exposure Limit), che è il limite al quale si ritiene che i lavoratori possano essere esposti senza effetti negativi acuti, riferito ad un tempo minore o uguale a 15 minuti.

In tabella 1 sono riportate le modifiche apportate ai limiti espositivi americani dagli anni quaranta ai giorni nostri (ACGIH, 2009).

Tabella 1: Evoluzione dei valori limite ambientali di esposizione per il n-esano.

Anno	Limiti dell'ACGIH per il n-esano
1946-1947	MAC-TWA, 500 ppm
1948-1975	TLV-TWA, 500 ppm
1974	Proposto: TLV-TWA, 100 ppm
1976-1981	TLV-TWA, 100 ppm; TLV-STEL, 125 ppm
1979	Proposto: TLV-TWA, 25 ppm; TLV-STEL, 100 ppm
1980	Proposto: TLV-TWA, 50 ppm
1982	TLV-TWA, 50 ppm
1997	Proposta: notazione <i>skin</i>
1998	TLV-TWA, 50 ppm; <i>skin</i>

3.4.2 LIMITI BIOLOGICI DI ESPOSIZIONE

I limiti biologici di esposizione (BEI o Biological Exposure Indices) rappresentano per il monitoraggio biologico gli analoghi dei limiti di esposizione ambientale per il monitoraggio ambientale.

Il valore del limite biologico di esposizione per una sostanza viene determinato in maniera indiretta. Partendo dal presupposto che per molte sostanze la correlazione tra concentrazione esterna e danno per la salute è nota, si cerca di stabilire la relazione tra dose esterna (concentrazione ambientale) e dose interna (indicatore biologico). Da questa relazione diventa possibile, mediante la quantificazione dell'indicatore biologico, la valutazione (indiretta) del rischio espositivo.

Per il monitoraggio dell'esposizione a n-esano, l'indicatore incluso nell'elenco dei limiti biologici di esposizione dell'ACGIH è il 2,5-esandione, il principale metabolita; dal 2003 il valore adottato è pari a 0,4 mg/l, senza correzione per la creatinina, in campioni di urina raccolti a fine turno alla fine della settimana lavorativa ed è basato sul TLV-TWA di 50 ppm. È importante sottolineare che questo limite si riferisce al 2,5-esandione presente in urina nella forma "libera", ovvero quello misurabile senza che il campione venga sottoposto ad idrolisi acida.

Il BEI adottato prima del 2003 era pari a 5 mg/g creatinina di 2,5-esandione in campioni di urina raccolti con le stesse modalità; quello a cui si faceva riferimento

era però il 2,5-esandione “totale” e cioè dato dalla somma del 2,5-esandione libero e di quello coniugato con l’acido glucuronico (ACGIH, 2009).

La scelta di utilizzare il 2,5-esandione libero quale indicatore biologico di esposizione a n-esano, piuttosto che quello totale, è legata principalmente al fatto che riflette meglio il rischio da esposizione al solvente. Infatti il 2,5-esandione libero è il vero responsabile della neurotossicità, mentre i rischi provenienti dai metaboliti coniugati sono irrilevanti ed inoltre questi ultimi vengono escreti rapidamente nelle urine (Hamelin et al., 2005).

Per quanto riguarda invece il n-esano urinario tal quale, non esistono attualmente limiti biologici di esposizione.

In tabella 2 sono riportate le modifiche apportate ai limiti biologici di esposizione.

Tabella 2: evoluzione dei valori limite biologici di esposizione per il n-esano.

Anno			Campionamento	BEI
1985	Proposti	2,5-esandione totale in urina	Fine turno	5 mg/l
		n-esano in aria di fine espirazione	Durante il turno	40 ppm
1987	Adottati	2,5-esandione totale in urina	Fine turno	5 mg/l
		n-esano in aria di fine espirazione	Durante il turno	40 ppm
1991	Rivisti	2,5-esandione totale in urina	Fine turno	5 mg/g creatinina
		n-esano in aria di fine espirazione	Durante il turno	Semi-quantitativo
2002	Proposto	2,5-esandione libero in urina	Fine turno fine settimana	0,4 mg/l
2003	Adottato	2,5-esandione libero in urina	Fine turno fine settimana	0,4 mg/l

3.4.3 VALORI DI RIFERIMENTO

I valori di riferimento si riferiscono alla presenza di una sostanza xenobiotica o dei suoi metaboliti nella popolazione generale non professionalmente esposta. Gli studi condotti in questo senso non sono numerosi per quanto riguarda il n-esano. La presenza del 2,5-esandione “totale” nelle urine di persone non professionalmente esposte è stata riscontrata da Fedtke e Bolt (1986) e da Perbellini e coll. (1986 B), ma non ne è stata ancora fornita una motivazione esaustiva: il microinquinamento ubiquitario (dovuto alla presenza di n-esano nelle benzine e in vari prodotti di uso comune) e/o la produzione endogena di 2,5-esandione (e di 4,5-diidrossi-2-esanone e 5-idrossi-2-esanone), derivato da processi di perossidazione lipidica, ne potrebbero essere la causa. Uno studio condotto da Bavazzano e coll. (1998) sulla popolazione italiana non professionalmente esposta ha riscontrato livelli di 2,5-esandione, calcolati come estremo superiore dell’intervallo di tolleranza unilaterale al 95% di confidenza, nei maschi e nelle femmine rispettivamente pari a 0,795 mg/l e 0,627 mg/l. In tale studio è emersa una dipendenza dell’escrezione del metabolita dal sesso ma non dall’abitudine al fumo o dalla zona di residenza. La Società Italiana Valori di Riferimento (SIVR) ha adottato dal 2005 un range di concentrazione urinaria del 2,5-esandione in soggetti non professionalmente esposti pari a <0,1-0,76 mg/l mettendo in evidenza, al contrario, come tali valori possano essere condizionati dalla zona di residenza dei soggetti.

Non sono invece ancora stati definiti dei valori di riferimento per il 2,5-esandione “libero”, il quale era considerato non essere presente in soggetti non esposti, ma del quale, mediante l’utilizzo di metodi analitici più sensibili, sembra accertata la presenza.

SCOPO DELLA TESI

Scopo del presente lavoro di tesi è stato quello di mettere a punto un metodo validato per la determinazione della concentrazione di 2,5-esandione libero urinario per la valutazione dell'esposizione a n-esano. Tale metodo è stato quindi oggetto di un controllo interlaboratoriale esterno nell'ambito di un circuito promosso dalla Società Italiana Valori di Riferimento. Come successivo obiettivo sono stati dosati i livelli urinari di 2,5-esandione libero in un gruppo di soggetti non professionalmente esposti al fine di definire i valori di riferimento della popolazione generale. Su un ridotto numero di soggetti sono stati inoltre dosati i livelli del metabolita, previa idrolisi acida, ed è quindi stato calcolato il rapporto tra il 2,5-esandione libero e quello totale.

MATERIALI E METODI

Uno degli obiettivi del presente lavoro di tesi è stato quello di mettere a punto un metodo analitico per la determinazione del 2,5-esandione libero mediante gascromatografia utilizzando lo spettrometro di massa come rivelatore. Come riportato nell'introduzione, l'escrezione di tale metabolita è correlata con l'esposizione occupazionale a n-esano, pertanto il 2,5-esandione rappresenta un indicatore biologico di esposizione per il n-esano.

La procedura analitica utilizzata, che prevede l'estrazione con solvente organico dell'analita dai campioni urinari previa aggiunta di uno standard interno e analisi in GC/MS EI/SIM, è di seguito riportata.

5.1 DETERMINAZIONE ANALITICA DEL 2,5-ESANDIONE LIBERO

A 4800 μl di urina vengono aggiunti 200 μl di una soluzione acquosa contenente cicloesano, che funge da standard interno. Si procede quindi con l'estrazione solido-liquido della fase organica con 8 + 8 ml di diclorometano utilizzando delle colonnine in terra di diatomee. All'estratto ottenuto vengono addizionati 10 μl di p-isopropiltoluene (p-cimene), che funge da *keeper* (sostanza utilizzata per mantenere in soluzione gli analiti d'interesse così da evitarne l'evaporazione); la soluzione viene quindi sottoposta ad evaporazione per la riduzione di volume in centrifuga aspirata fino ad ottenere un volume pari a circa 500 μl . L'utilizzo di soluzioni *keeper* è già stato testato, in particolare nella determinazione degli idrocarburi policiclici aromatici (Matthiessen A., 1997).

L'estratto concentrato viene quindi trasferito in *vials* da autocampionatore ed analizzato in GC/MS EI/SIM.

La strumentazione utilizzata consiste in un gascromatografo Perkin Elmer AutoSystem XL Gas Chromatograph equipaggiato con colonna PONA da 50 m, i.d.

0,2 mm, film 0,5 μm della J&W Scientific e come rivelatore uno spettrometro di massa Perkin Elmer Turbo Mass Upgrade.

Le condizioni operative del gascromatografo sono le seguenti:

- Temperatura dell'iniettore: 250°C
- Volume iniettato: 1 μl
- Programma di temperatura:
 - isoterma a 50°C per 1 minuto
 - rampa di 10°C/min fino a 80°C, mantenuti per 5 minuti
 - rampa di 20°C/min fino a 200°C, mantenuti per 5 minuti
- Prelavaggi della siringa con diclorometano: 4
- Prelavaggio con il campione: 3
- Post lavaggio con diclorometano: 2

In queste condizioni operative i tempi di ritenzione del 2,5-esandione e del cicloesanone sono rispettivamente pari a 11,39 e 10,92 minuti; la durata della corsa è pari a 20 minuti.

Le condizioni operative dello spettrometro di massa sono le seguenti:

- Full Scan da 40 a 350 m/z
- SIR: 43 e 99 m/z e 55 e 98 m/z

La retta di calibrazione per la determinazione del contenuto di 2,5-esandione libero nelle urine è stata preparata aggiungendo quantità note dell'analita in urina partendo da una soluzione madre A preparata nel modo seguente:

- *Soluzione madre A (486,5 mg/l di 2,5-esandione):* 50 μl di 2,5-esandione standard vengono diluiti a 100 ml con acqua. La soluzione è stabile per almeno 8 mesi se conservata ad una temperatura <8°C.

Dalla soluzione madre A vengono preparate 8 soluzioni di riferimento secondo il seguente schema:

- *Soluzione di riferimento diluita 1 (60,81 mg/l di 2,5-esandione):* 1 ml della soluzione madre A di 2,5-esandione viene diluito a 8 ml con acqua.

- *Soluzione di riferimento diluita 2 (38,92 mg/l di 2,5-esandione):* 2 ml della soluzione madre A di 2,5-esandione vengono diluiti a 25 ml con acqua.
- *Soluzione di riferimento diluita 3 (19,46 mg/l di 2,5-esandione):* 1 ml della soluzione di riferimento diluita 2 di 2,5-esandione viene diluito a 2 ml con acqua.
- *Soluzione di riferimento diluita 4 (9,73 mg/l di 2,5-esandione):* 1 ml della soluzione di riferimento diluita 3 di 2,5-esandione viene diluito a 2 ml con acqua.
- *Soluzione di riferimento diluita 5 (4,865 mg/l di 2,5-esandione):* 1 ml della soluzione di riferimento diluita 4 di 2,5-esandione viene diluito a 2 ml con acqua.
- *Soluzione di riferimento diluita 6 (2,432 mg/l di 2,5-esandione):* 1 ml della soluzione di riferimento diluita 5 di 2,5-esandione viene diluito a 2 ml con acqua.
- *Soluzione di riferimento diluita 7 (1,216 mg/l di 2,5-esandione):* 1 ml della soluzione di riferimento diluita 6 di 2,5-esandione viene diluito a 2 ml con acqua.
- *Soluzione di riferimento diluita 8 (0,608 mg/l di 2,5-esandione):* 1 ml della soluzione di riferimento diluita 7 di 2,5-esandione viene diluito a 2 ml con acqua.

Ad ogni campione e/o standard sono stati aggiunti circa 200 µl di una soluzione acquosa di cicloesano ottenuto per diluizioni successive (sotto riportate) al fine di ottenere nei campioni una concentrazione finale pari a 947 µg/l.

Preparazione della soluzione acquosa dello standard interno cicloesano:

- *Soluzione di riferimento diluita 1 di cicloesano usato come standard interno (9,47 g/l):* 50 µl di cicloesano standard vengono diluiti a 5 ml con acqua.
- *Soluzione di riferimento diluita 2 di cicloesano usato come standard interno (94,7 mg/l):* 50 µl della soluzione di riferimento diluita 1 di cicloesano vengono diluiti a 5 ml con acqua.

- *Soluzione di riferimento diluita 3 di cicloesano* usato come standard interno (23,675 mg/l): 1 ml della soluzione di riferimento diluita 2 di cicloesano viene diluito a 4 ml con acqua.

In tabella 3 viene schematizzata la procedura analitica per la preparazione dei campioni e degli standard.

Tabella 3: schema della preparazione dei campioni e degli standard.

	μl urina	μl SR dil. 3 SI	μl SR dil. 8	μl SR dil. 7	μl SR dil. 6	μl SR dil. 5	μl SR dil. 4	μl SR dil. 3	μl SR dil. 2	μl SR dil. 1	2,5-esandione addizionato ($\mu\text{g/l}$)
bianco urina	4800	200	–	–	–	–	–	–	–	–	0
St 1	4700	200	100	–	–	–	–	–	–	–	12,16
St 2	4700	200	–	100	–	–	–	–	–	–	24,32
St 3	4700	200	–	–	100	–	–	–	–	–	48,65
St 4	4700	200	–	–	–	100	–	–	–	–	97,30
St 5	4700	200	–	–	–	–	100	–	–	–	194,6
St 6	4700	200	–	–	–	–	–	100	–	–	389,2
St 7	4700	200	–	–	–	–	–	–	100	–	778,4
St 8	4700	200	–	–	–	–	–	–	–	100	1216
Camp.	4800	200	–	–	–	–	–	–	–	–	

Tutte le soluzioni sono state preparate subito prima dell'utilizzo. In figura 3 è riportato un esempio della curva di calibrazione.

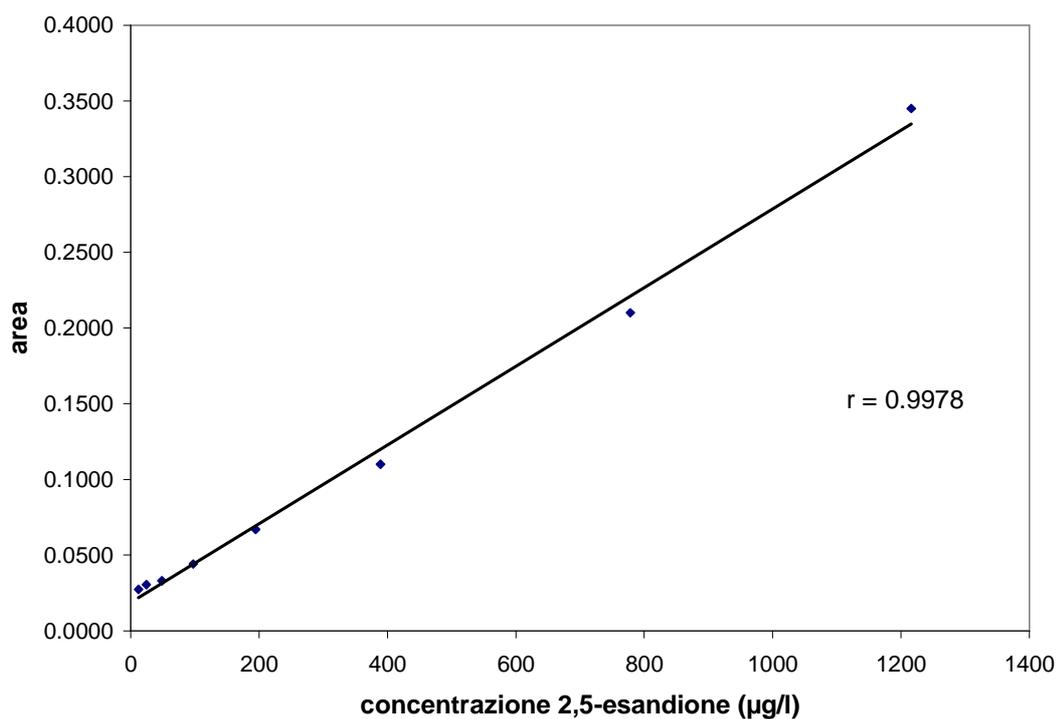


Figura 3: retta di calibrazione per il 2,5-esandione urinario.

5.2 CONTROLLO INTERLABORATORIALE

Il metodo messo a punto per il dosaggio del 2,5-esandione libero urinario è stato sottoposto a controllo interlaboratoriale a cui hanno partecipato 4 differenti laboratori aderenti al circuito della Società Italiana Valori di Riferimento (SIVR) di Siena, Firenze, Torino e Padova.

Ogni laboratorio ha analizzato due campioni a concentrazione ignota (L1 e L2) preparati per aggiunta del 2,5-esandione a un pool di urine provenienti da soggetti non professionalmente esposti a n-esano.

In tabella 4 sono riportati i dettagli dei metodi utilizzati dai quattro laboratori.

Tabella 4: tecniche analitiche usate dai 4 laboratori.

Laboratorio	Tecnica analitica	Preparazione campione	Standard interno
1	LC/MS	Derivatizzazione con 2,4-dinitrofenilidrazina (accreditato SINAL)	–
Padova	GC/MS	Estrazione con diclorometano su colonnine in terra di diatomee	cicloesano
2	GC/FID	SPE	–
3	GC/MS	Estrazione con diclorometano (accreditato SINAL)	cicloesano

5.3 DETERMINAZIONE ANALITICA DEL 2,5-ESANDIONE LIBERO IN SOGGETTI NON PROFESSIONALMENTE ESPOSTI

Sono stati raccolti 39 campioni di urina di altrettanti soggetti non professionalmente esposti a n-esano, sui quali è stato determinato il 2,5-esandione libero al fine di determinare il range di riferimento per la popolazione generale.

Ad ogni soggetto è stato somministrato un questionario per raccogliere informazioni su età, sesso, peso, altezza, fumo, luogo di residenza e abitudini di vita.

Una copia del questionario è riportata in allegato.

RISULTATI E DISCUSSIONE

6.1 DETERMINAZIONE DEL 2,5-ESANDIONE LIBERO URINARIO

6.1.1 RACCOLTA, CONSERVAZIONE E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI BIOLOGICI

I campioni di urina dei soggetti di controllo sono stati raccolti in contenitori sterili senza aggiunta di conservativi e/o stabilizzanti. I campioni sono stati quindi conservati in congelatore fino al momento dell'analisi. I campioni sono risultati stabili per almeno 5 mesi dalla raccolta.

6.1.2 VALIDAZIONE DEL METODO

SEPARAZIONE CROMATOGRAFICA

Il picco del 2,5-esandione è risultato ben separato dallo standard interno nonché dal resto dei componenti della matrice urinaria. In figura 4 è riportato un cromatogramma di una soluzione di concentrazione pari a 97,3 µg/l.

LINEARITÀ

La linearità di un metodo analitico è la sua capacità di dare risultati che sono direttamente proporzionali alla concentrazione degli analiti nei campioni, all'interno di un determinato campo di validità.

Il metodo si è dimostrato lineare nell'intervallo di concentrazioni esaminato (12,16-1216 µg/l).

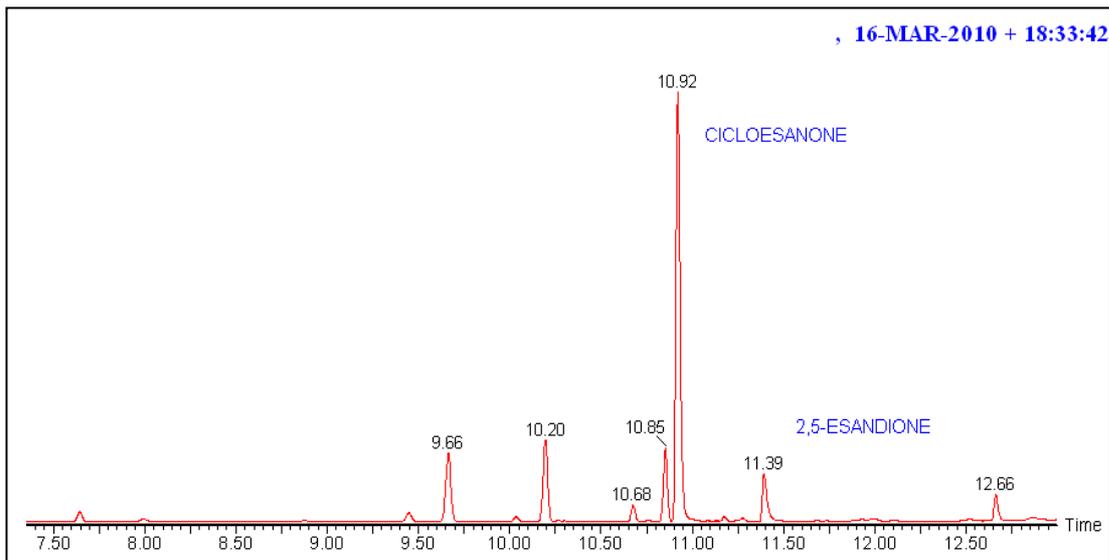


Figura 4: cromatogramma del 2,5-esandione in urina.

LIMITE DI RILEVABILITÀ E QUANTIFICAZIONE

Il limite di rilevabilità (LR) che esprime la minima quantità di analita rilevabile con un determinato metodo analitico, ma non necessariamente determinabile quantitativamente, nelle condizioni sperimentali del metodo può essere espresso come:

$$LR = \frac{3,3\sigma}{S}$$

dove σ = deviazione standard del bianco

S = pendenza della retta di calibrazione

Il LR è risultato nel nostro caso pari a 12 $\mu\text{g/l}$.

Il limite di quantificazione (LQ) che esprime la minima quantità di analita che può essere determinata con un livello accettabile di precisione (ripetibilità) ed esattezza nelle condizioni sperimentali del metodo può essere espresso come:

$$LR = \frac{10\sigma}{S}$$

dove σ = deviazione standard del bianco

S = pendenza della retta di calibrazione

Nel nostro caso il LQ è risultato pari a 20 $\mu\text{g/l}$.

PRECISIONE ED ACCURATEZZA

La precisione del metodo, espressa come coefficiente di variazione percentuale, è stata calcolata sia in termini di ripetibilità che di riproducibilità.

RIPETIBILITÀ

Su un campione di urina contenente una concentrazione media di 2,5-esandione pari a 48,65 $\mu\text{g/l}$ lo scarto tipo relativo percentuale di 10 determinazioni nella stessa serie analitica è risultato pari a 2,98%. Su un campione di urina contenente una concentrazione media di 2,5-esandione pari a 389,2 $\mu\text{g/l}$ lo scarto tipo relativo percentuale di 10 determinazioni nella stessa serie analitica è risultato pari a 2,20%.

RIPRODUCIBILITÀ

Su un campione di urina contenente una concentrazione media di 2,5-esandione pari a 48,65 $\mu\text{g/l}$ lo scarto tipo relativo percentuale di 10 determinazioni in differenti serie analitiche è risultato pari a 3,07%. Su un campione di urina contenente una concentrazione media di 2,5-esandione pari a 389,2 $\mu\text{g/l}$ lo scarto tipo relativo percentuale di 10 determinazioni in differenti serie analitiche è risultato pari a 2,06%.

ACCURATEZZA

L'accuratezza è stata calcolata analizzando sempre le 10 aliquote di urina, contenenti il 2,5-esandione nelle medesime concentrazioni. L'errore relativo percentuale rispetto alla curva di calibrazione precedentemente preparata, è risultato compreso tra 0,69 e 2,77%.

6.2 CONTROLLO INTERLABORATORIALE

I risultati ottenuti dai 4 laboratori che hanno aderito al controllo interlaboratoriale sono riassunti nella tabella 5, mentre in tabella 6 è riportata l'elaborazione dei dati ottenuti da cui si evidenzia una variabilità dei dati del tutto accettabile con uno scarto tipo relativo percentuale inferiore al 30% per entrambi i livelli, inoltre nessun dato può essere considerato *outlier*.

Tabella 5: risultati del controllo interlaboratoriale.

Laboratorio	Conc. livello 1 (mg/l)	Conc. livello 2 (mg/l)
1	0,025	0,074
Padova	0,043	0,096
2	<0,100	0,115
3	0,034	0,085

Tabella 6: elaborazione delle concentrazioni rilevate (mg/l).

Parametro	Livello 1	Livello 2
Numero totale risultati	4	4
Media aritmetica	0,034	0,093
Deviazione standard	0,009	0,017
Scarto tipo relativo %	26,5	18,9
Valore massimo	0,043	0,115
Valore minimo	0,025	0,074
Mediana	0,034	0,091

6.3 DETERMINAZIONE ANALITICA DEL 2,5-ESANDIONE LIBERO IN SOGGETTI NON PROFESSIONALMENTE ESPOSTI

In tabella 7 sono riassunte le caratteristiche del gruppo di soggetti non professionalmente esposti a n-esano studiato. Il gruppo era costituito dal 31% di uomini e 69% di donne. Circa il 41% dei soggetti era fumatore (9 donne e 7 uomini); inoltre quasi l'85% dei soggetti ha dichiarato di risiedere in città ed il 28% in zone con intensità di traffico elevata.

Tabella 7: caratteristiche del gruppo di soggetti studiato.

Parametro		uomini	donne	totali
Numero		12	27	39
Età media (aa)		42	40	41
Peso medio (kg)		80	61	67
Fumo (n)	No	5	18	23
	<5 sigarette al giorno	4	5	9
	5-10 sigarette al giorno	–	1	1
	10-20 sigarette al giorno	3	3	6
Area di residenza (n)	Urbana	11	22	33
	Rurale	1	5	6
	Industriale	–	–	–
Traffico (n)	Elevato	2	9	11
	Medio	5	12	17
	Basso	5	6	11

In tabella 8 sono riportati i livelli di 2,5-esandione libero urinario riscontrati ed in figura 5 la loro distribuzione: in 11 casi su 39 i livelli sono risultati inferiori al limite di rilevabilità, mentre nessun valore ha superato il limite biologico di esposizione dell'ACGIH pari a 400 µg/l; il valore maggiore è risultato pari a circa un quarto del BEI.

Tabella 8: livelli urinari di 2,5-esandione libero.

Soggetto	Concentrazione 2,5-esandione libero urinario ($\mu\text{g/l}$)
1	<12,0
2	<12,0
3	118,0
4	<12,0
5	22,5
6	31,3
7	38,3
8	49,0
9	58,6
10	42,7
11	45,9
12	50,4
13	44,6
14	75,1
15	105,0
16	52,4
17	71,7
18	72,4
19	<12,0
20	<12,0
21	<12,0
22	<12,0
23	24,2
24	<12,0
25	<12,0
26	16,3
27	40,4
28	21,6
29	12,7
30	52,2
31	<12,0
32	50,6
33	<12,0
34	44,7
35	35,6
36	<12,0
37	45,8
38	50,2
39	119,6

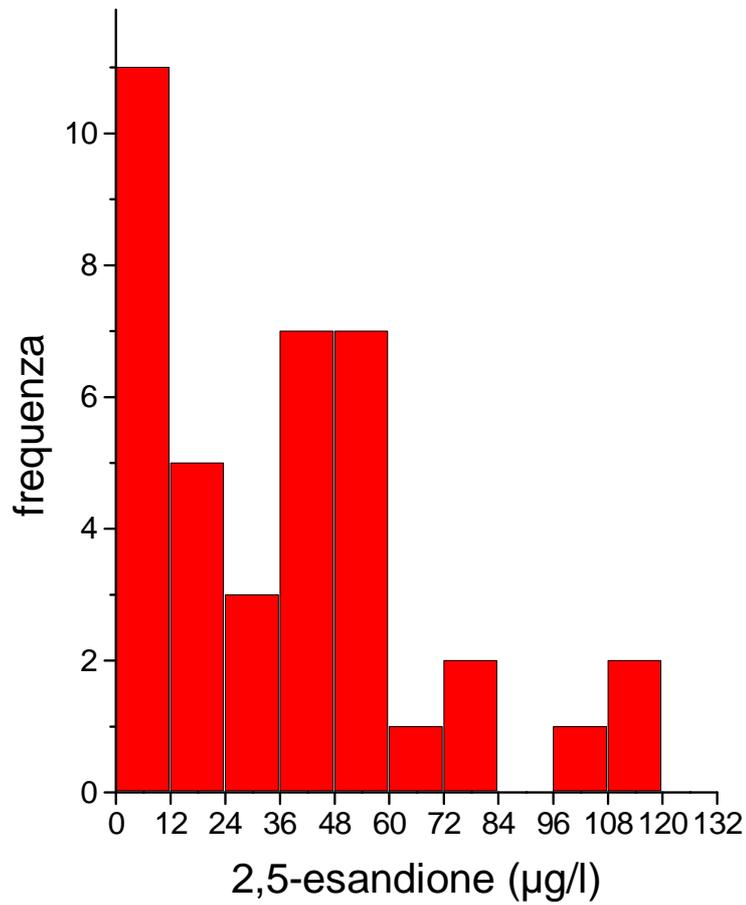


Figura 5: distribuzione dei livelli di 2,5-esandione libero riscontrati.

In tabella 9 sono riportati i livelli medi, mediani e range del 2,5-esandione libero urinario. Dai dati non emerge una sostanziale differenza nelle escrezioni (vedi valori mediani) in relazione al sesso dei soggetti anche se i valori medi sono leggermente superiori nei maschi.

Tabella 9: media, mediana e range dei livelli di 2,5-esandione libero riscontrati nei soggetti suddivisi in base al sesso.

Soggetti	n. soggetti	Concentrazione del 2,5-esandione libero ($\mu\text{g/l}$)		
		media \pm deviazione standard	mediana	range
totali	39	38,0 \pm 30,9	38,3	<12,0 – 119,6
donne	27	34,1 \pm 28,4	35,6	<12,0 – 119,6
uomini	12	46,7 \pm 35,6	39,3	<12,0 – 118,0

In tabella 10 vengono riportati i valori medi, mediani e range dei livelli di 2,5-esandione libero urinario differenziati tra soggetti fumatori e non fumatori. Nonostante i livelli di escrezione urinaria del 2,5-esandione libero siano mediamente superiori nei soggetti fumatori, la differenza non è risultata statisticamente significativa ($p = 0,0975$, test di Mann-Whitney) in accordo con quanto riportato in letteratura per il 2,5-esandione totale (Bavazzano et al., 1998).

Tabella 10: media, mediana e range dei livelli di 2,5-esandione libero riscontrati nei soggetti suddivisi in base al fumo.

Soggetti	n. soggetti	Concentrazione 2,5-esandione libero ($\mu\text{g/l}$)		
		media \pm deviazione standard	mediana	range
fumatori	16	50,3 \pm 37,0	45,9	<12,0 – 119,6
non fumatori	23	29,4 \pm 23,0	24,2	<12,0 – 75,1

Differenze statisticamente significative non sono state evidenziate neppure in relazione all'esposizione a traffico veicolare valutato attraverso il luogo di residenza (tabella 11) o l'intensità dello stesso (tabella 12); al contrario valori medi maggiori sono stati evidenziati nei soggetti residenti in zone rurali o con intensità di traffico scarsa. Risultati analoghi sono presenti in letteratura per quanto riguarda il 2,5-esandione totale (Bavazzano et al., 1998; Kaway et al., 1990; Maestri et al., 1994).

Tabella 11: media, mediana e range dei livelli di 2,5-esandione libero riscontrati nei soggetti suddivisi in base al luogo di residenza.

Luogo di residenza	n. soggetti	Concentrazione 2,5-esandione libero ($\mu\text{g/l}$)		
		media \pm deviazione standard	mediana	range
rurale	6	34,7 \pm 16,3	43,7	<12,0 – 45,9
urbana	33	38,6 \pm 33,0	35,6	<12,0 – 119,6

Tabella 12: media, mediana e range dei livelli di 2,5-esandione libero riscontrati nei soggetti suddivisi in base all'intensità del traffico.

Intensità del traffico	n. soggetti	Concentrazione 2,5-esandione libero ($\mu\text{g/l}$)		
		media \pm deviazione standard	mediana	range
scarsa	11	42,0 \pm 28,9	42,7	<12,0 – 105,0
media	17	38,7 \pm 36,1	31,3	<12,0 – 119,6
elevata	11	32,8 \pm 25,6	35,6	<12,0 – 75,1

6.4 DETERMINAZIONE ANALITICA DEL 2,5-ESANDIONE TOTALE IN SOGGETTI NON PROFESSIONALMENTE ESPOSTI

Su un numero ridotto di soggetti (n. 16) sono stati dosati anche i livelli del 2,5-esandione totale che esprime la somma del 2,5-esandione libero e del 4,5-diidrossi-2-esanone coniugato con l'acido glucuronico. Il metabolita è stato dosato con la medesima metodica messa a punto, preceduta da un'idrolisi acida condotta aggiungendo 1 ml di HCl concentrato a 5 ml di urina. I campioni sono stati posti in stufa alla temperatura di 100°C per 40 minuti; successivamente si è proceduto alla fase di estrazione e purificazione come nel caso del solo 2,5-esandione libero.

In tabella 13 sono riportati i valori medi, mediani e range del 2,5-esandione urinario, libero e totale, riscontrati. Dai dati ottenuti si evidenzia come il 2,5-esandione libero sia mediamente un terzo del totale anche se con una notevole dispersione. In uno studio condotto da Prieto e coll. (2003) in soggetti professionalmente esposti, il rapporto tra libero e totale è risultato mediamente pari a 0,142 (mediana 0,128; range 0,041–0,458) con una buona correlazione tra i due. Bisogna però rilevare che l'escrezione del 2,5-esandione sia libero che totale è superiore a quella riscontrata in questo elaborato di tesi (2,5-esandione libero: range 30–5590 µg/l; 2,5-esandione totale: range 300–32460 µg/l). In figura 6 è riportata la correlazione tra il 2,5-esandione libero e quello totale riscontrata (A) e la medesima correlazione ottenuta escludendo i soggetti con il 2,5-esandione libero inferiore al limite di rilevabilità (B).

Tabella 13: media, mediana e range dei livelli di 2,5-esandione libero e totale riscontrati nei 16 soggetti.

Analita	Concentrazione (µg/l)		
	media ± deviazione standard	mediana	range
2,5-esandione libero	43,8 ± 37,6	40,5	<12,0 – 119,6
2,5-esandione totale	269,4 ± 167,6	252,5	43,0 – 540,2
2,5-esandione libero / 2,5-esandione totale	0,285 ± 0,309	0,192	0,013 – 0,937

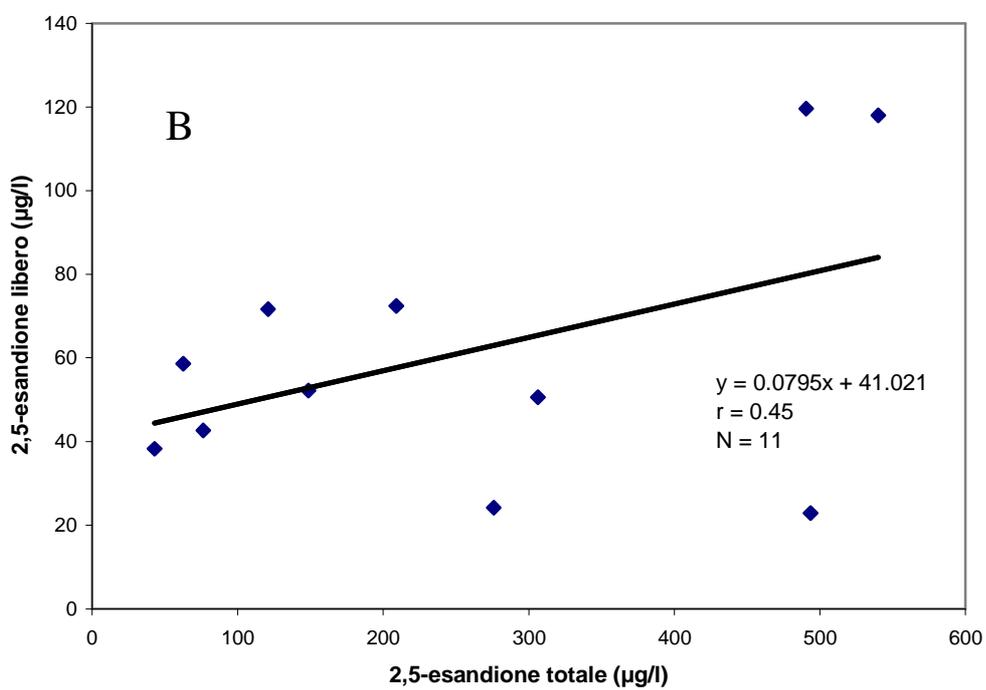
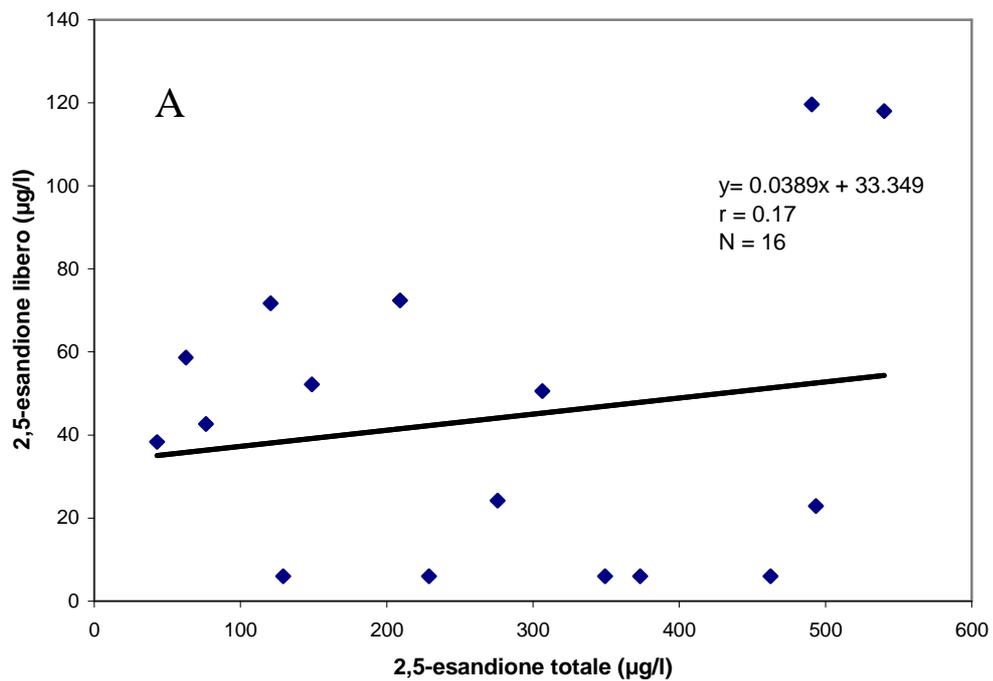


Figura 6: correlazione tra i livelli di 2,5-esandione libero e totale riscontrati.

In tabella 14 sono riportati i livelli di 2,5-esandione totale suddivisi in base al sesso. Anche nel caso del 2,5-esandione urinario totale la concentrazione media è risultata maggiore negli uomini rispetto alle donne senza raggiungere però la significatività statistica, probabilmente per l'esiguità del numero di campioni. Uno studio riportato in letteratura ha riscontrato lievi differenze, ma statisticamente significative, tra i valori urinari del 2,5-esandione totale rilevate nei soggetti maschi rispetto al gruppo di donne; la numerosità in questo caso era maggiore (maschi n. 60, donne n. 63) (Bavazzano et al., 1998).

Tabella 14: media, mediana e range in µg/l dei livelli di 2,5-esandione totale riscontrati nei soggetti suddivisi in base al sesso.

soggetti	n. soggetti	Concentrazione del 2,5-esandione totale (µg/l)		
		media ± deviazione standard	mediana	range
donne	11	235,0 ± 149,1	209,0	62,6 – 490,6
uomini	5	345,2 ± 198,1	373,4	43,0 – 540,2

CONCLUSIONI

Il n-esano ha rappresentato per molti anni il principale solvente organico di resine utilizzate per la preparazione di collanti. Anche in relazione alle restrizioni sull'uso del benzene, il n-esano è diventato il principale inquinante nei laboratori di pelletteria e nei calzaturifici. D'altro canto, la valutazione dell'esposizione di tale solvente riguarda non solo i soggetti professionalmente esposti, ma interessa anche la popolazione generale. A tal fine il monitoraggio biologico, fondamentale accanto al monitoraggio ambientale, riveste un ruolo di primaria importanza per valutare la quantità di xenobiotico assorbita o accumulata ed in grado di causare effetti dannosi. In altre parole l'uso degli indicatori biologici deve essere inteso come elemento centrale nella valutazione del rischio. Il loro utilizzo a livello individuale o di gruppo può consentire di riconoscere e stimare le esposizioni (relazione con la dose esterna), di interpretare o prevedere effetti indesiderati per la salute, di ottenere informazioni più approfondite dalle valutazioni epidemiologiche.

Nel presente elaborato di tesi è stata messa a punto una metodica analitica per il dosaggio del 2,5-esandione libero urinario, indicatore biologico introdotto recentemente dall'ACGIH per la valutazione dell'esposizione a n-esano. Livelli di 2,5-esandione urinario sono stati riscontrati anche in soggetti non professionalmente esposti, anche se la sua origine non è stata ancora definita: è un metabolita del n-esano che essendo un inquinante ubiquitario viene costantemente inalato in piccole quantità oppure può originarsi endogenamente come prodotto dei processi di perossidazione lipidica.

Il metodo analitico per la determinazione routinaria del 2,5-esandione libero urinario si è rivelato semplice e sufficientemente sensibile da discriminare tra popolazione professionalmente esposta e non. Il metodo si avvale dell'uso di uno strumento disponibile nella maggior parte dei laboratori quale il GC-MS, ed è stato validato in termini di linearità, precisione, accuratezza, limiti di rilevabilità e quantificazione. Con tale metodo è stato possibile analizzare alcuni campioni relativi alla popolazione generale ed evidenziare i livelli di 2,5-esandione libero per contribuire alla

definizione dei valori di riferimento per la popolazione italiana. I dati ottenuti sono stati valutati in relazione ai fattori che possono contribuire o influenzare l'escrezione del metabolita, come le abitudini di vita o le caratteristiche dei soggetti. Non sono state evidenziate differenze statisticamente significative tra i livelli di 2,5-esandione dei soggetti residenti in zone urbane rispetto ai residenti in zone rurali: sembra infatti che tali fattori non influenzino l'escrezione del metabolita. Un'escrezione maggiore è stata invece riscontrata nei soggetti di sesso maschile rispetto a quello femminile, come anche per i fumatori rispetto ai non fumatori anche se, come per gli altri fattori, non è stata raggiunta la significatività statistica, probabilmente per la bassa numerosità del campione.

Inoltre, su un numero minore di soggetti è stato dosato il 2,5-esandione totale, dato dalla somma del libero e di quello coniugato con l'acido glucuronico, evidenziando un rapporto medio tra i due pari a circa 0,3.

BIBLIOGRAFIA

1. Abdel-Rahman M.S., Hetland L.B., Couri D. *Toxicity and metabolism of methyl n-butyl ketone*. AM. IND. HYG. ASSOC. J. 37:95-102, 1976.
2. Abritti G., Siracusa A., Cianchetti C., Coli C.A., Curradi F., Perticoni G.F., Rosa F.D. *Shoe-makers' polyneuropathy in Italy: the aetiological problem*. BR. J. IND. MED. 33:92-99, 1976.
3. American Conference of Governmental Industrial Hygienist. *2009 TLVs and BEIs. Based on the documentations of the threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices*. CINCINNATI, OH, 2009.
4. American Conference of Governmental Industrial Hygienist. *2010 Documentation of the Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices. 7th Edition - 2010 Supplement*. CINCINNATI, OH, 2010.
5. Bartolucci G.B., Bavazzano P., Perico A., Perbellini L. *Valori di riferimento di solventi e metaboliti in campioni biologici*. G. ITAL. MED. LAV. ERG. 25:74-82, 2003.
6. Bavazzano P., Apostoli P., Balducci C., Bartolucci G.B., Buratti M., Duca P., Gori G., Li Donni V., Perbellini L., Perico A., Minoia C. *Determination of urinary 2,5-hexanedione in the general italian population*. INT. ARCH. OCCUP. ENVIRON. HEALTH. 71:284-288, 1998.
7. Bio/Dynamics. *An inhalation oncogenicity study of commercial hexane in rats and mice*. Part II. Mice, abridged final report. American Petroleum Institute Publication TR 405 41-33232, 1995.

8. Bos P.M.J., de Mik G., Bragt P.C. *Critical review of the toxicity of methyl n-butyl ketone: risk from occupational exposure*. AM. J. IND. MED. 20:175-194, 1991.
9. Brugnone F., Perbellini L., Giuliari C., Cerpelloni M., Soave M. *Blood and urine concentrations of chemical pollutants in the general population*. MED. LAV. 85:370-389, 1994.
10. Brugnone F., Perbellini L., Grigolini L., Apostoli P. *Solvent exposure in a shoe upper factory. I. n-Hexane and Acetone concentration in alveolar and environmental air and blood*. INT. ARCH. OCCUP. ENVIRON. HEALTH. 42:51-62, 1978.
11. Buiatti E., Cecchini S., Ronchi O., Dolara P., Bulgarelli G. *Relationship between clinical and electromyographic findings and exposure to solvents in shoe and leather workers*. BR. J. IND. MED. 35:168-173, 1978.
12. Cardona A., Marhuenda D., Marti J., Brugnone F., Roel J., Perbellini L. *Biological monitoring of occupational exposure to n-hexane by measurement of urinary 2,5-hexanedione*. INT. ARCH. OCCUP. ENVIRON. HEALTH. 65:71-74, 1993.
13. Clayton G., Clayton F. *Patty's industrial hygiene and toxicology*. 3rd rev. ed. New York, NY: John Wiley & Sons, 1982.
14. De Bortoli M., Knoppel H., Pecchio E., Peil A., Rogora L., Schauenburg-Schlitt H., Vissers H. *Measurements of indoor air quality and comparison with ambient air: a study on 15 homes in Northern Italy*. EUR 9656. Environmental and quality of life series. Commission of the European Communities, Luxembourg, 1985.
15. Fedtke N., Bolt H.M. *Detection of 2,5-hexanedione in the urine of persons not exposed to n-hexane*. INT. ARCH. OCCUP. ENVIRON. HEALTH. 57:143-148, 1986.

16. Gori G., Bartolucci G.B., Sturaro A., Parvoli G., Doretta L., Troiano R., Casetta B. *High-performance liquid chromatographic determination of urinary 2,5-hexanedione as mono-2,4-dinitrophenylhydrazone using ultraviolet detection*. J. CHROMAT. B. 673:165-172, 1995.
17. Hamelin G., Charest-Tardif G., Truchon G., Tardif R. *Physiologically based modeling of n-hexane kinetics in humans following inhalation exposure at rest and under physical exertion: impact on free 2,5-hexanedione in urine and on n-hexane in alveolar air*. J. OCCUP. ENVIRON. HYG. 2:86-97, 2005.
18. Hamelin G., Truchon G., Tardif H. *Comparison of unchanged n-hexane in alveolar air and 2,5-hexanedione in urine for the biological monitoring of n-hexane exposure in human volunteers*. INT. ARCH. OCCUP. ENVIRON. HEALTH. 77:264-270, 2004.
19. Hathaway G.J., Proctor N.H., Hughes J.P., Fischman M.L. *Proctor and Hughes' hazards of the workplace*. In Van Nostrand Reinhold 3rd ed., New York, NY, 1991.
20. Heringa J.W., Huybregtse R., Van Der Linden A.C. *n-Alkane oxidation by a Pseudomonas formation and B-oxidation of intermediate fatty acids*. Antonie Van Leeuwenhoek. 27:51-58, 1961.
21. Herskowitz A., Ishii N., Schaumburg H. *n-Hexane neuropathy – A syndrome occurring as a result of industrial exposure*. N. ENGL. J. MED. 285:82-85, 1971.
22. HSDB. *Hazardous Substances Database: n-Hexane*. National Library of Medicine, National Toxicology Information Program, Bethesda, MD, 1996.
23. Imbriani M., Ghittori S., Pezzagno G., Capodoglio E. *n-Hexane urine elimination and weighted exposure concentration*. INT. ARCH. OCCUP. ENVIRON. HEALTH. 55:33-41, 1984.

24. Inoue T., Takeuchi Y., Takeuchi S., Yamada S., Suzuki H., Matsushita T., Miyagaki H., Matsumoto T. *A health survey on vinyl sandal manufacturers with high incidence of "n-hexane" intoxication occurred.* JPN. J. IND. HEALTH. 12:73-84, 1970.
25. Kaway T., Mizunuma K., Yasugi T., Uchida Y., Ikeda M. *The method of choice for the determination of 2,5-hexanedione a san indicator of occupational exposure to n-hexane.* INT. ARCH. OCCUP. ENVIRON. HEALTH. 62:403-408, 1990.
26. Kaway T., Yasugi T., Mizunuma K., Horiguchi S., Ikeda M. *Urinalysis vs. blood analysis, as a tool for biological monitoring of solvent exposure.* TOXICOL. LETT. 63:323-343, 1992.
27. Lyman W.J., Reehl W.F., Rosenblatt D.H. *Handbook of chemical property estimation methods: environmental behaviour of organic compound.* MacGraw-Hill Book Company, New York, NY, 1982.
28. Maestri L., Ghittori S., Imbriani M., Capodaglio E. *Determination of 2,5-hexanedione by high-performance liquid chromatography after derivatization with dansylhydrazine.* J. CHROMAT. B. 657:111-117, 1994.
29. Matthiessen A. *Use of a keeper to enhance the recovery of volatile polycyclic aromatic hydrocarbons in HPLC analysis.* CHROMATOGRAPHIA. 45:190-194, 1997.
30. McDermott H.J., Killiany S.E. *Quest for a gasoline TLV.* AM. IND. HYG. ASSOC. J. 39:110-117, 1978.
31. Minoia C., Meroni G., Aprea C., Oppezzo M.C., Magnaghi S., Sciarra G., Barisano A., Fiorentino M.L., Berri A., Bellinzona M., Robustelli della Cuna F.S., Frigerio F., Schiavi A., Di Gregorio L. *Environmental and urinary reference values as markers of exposure to hydrocarbons in urban areas.* SCI. TOTAL ENVIRON. 192:163-182, 1996.

32. Minoia C., Perbellini L. *Monitoraggio ambientale e biologico dell'esposizione professionale a xenobiotici*. MORGAN PUBL. EDIZIONI TECNICHE, MILANO. 6:59-81, 2001.
33. Mutti A., Falzoi M., Lucertini S., Arfini G., Zignani M., Lombardi S., Franchini I. *n-Hexane metabolism in occupationally exposed workers*. BR. J. IND. MED. 41:533-538, 1984.
34. Mutti A., Falzoi M., Lucertini S., Cavatorta A., Franchini I., Pedroni C. *Absorption and alveolar excretion of ciclohexane in workers in shoes factory*. J. APPL. TOXICOL. 1:220-223, 1981.
35. NOES. *n-Hexane: numbers of potentially exposed employees from the National Occupational Exposure Database*. Cincinnati, OH: National Institute for Occupational Safety, 1991.
36. Nolasco D.M., P.B.Siqueira A.G., P.B.Siqueira M.E. *Urinary 2,5-hexanedione in workers exposed to n-hexane: influence of the sample treatment*. QUIM. NOVA. 30:805-808, 2007.
37. Oliveira A.F.F., Maia P.P., Paiva M.J.N., P.B.Siqueira M.E. *Determination of 2,5-hexanedione in urine by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography*. J. ANAL. TOXICOL. 33:223-228, 2009.
38. Perbellini L., Brugnone F., Mozzo P., De Rosa E., Bartolucci G.B., Facinni G. *Toxicokinetic aspects of n-hexane and 2,5-hexanedione in the biological monitoring of occupational exposure to n-hexane*. ANN. AM. CONF. GOV. IND. HYG. 12:357-364, 1985.
39. Perbellini L., Mozzo P., Brugnone F., Zedde A. *Physiologico-mathematical model for studying human exposure to organic solvent: kinetics of blood-tissue n-hexane concentrations and of 2,5-hexanedione in urine*. BRIT. J. IND. MED. 43:760-768, 1986 A.

40. Perbellini L., Tagliaro F., Maschio S., Zedde A., Brugnone F. *Dosaggio gascromatografico del 2,5-esandione nelle urine*. MED. LAV. 77:628-634, 1986 B.
41. Phillips K., McKenna A.M., Howard D.A., Bentley M.C., Cook J.N. *The concentration of volatile organic compounds inside and outside the homes of the residents of six european cities*. In “Le collane della Fondazione Salvatore Maugeri”, Pavia, Vol. 3:33-46, 1997.
42. Prieto M.J., Marhuenda D., Roel J., Cardona A. *Free and total 2,5-hexanedione in biological monitoring of workers exposed to n-hexane in the shoe industry*. TOXICOL. LETT. 145:249-260, 2003.
43. Raymer J.H., Pellizzari E.D. *Estimation of recent exposure to volatile organic chemicals using alveolar air measurement*. TOXICOL. IND. HEALTH. 12:201-210, 1996.
44. Silva M.R.M.S., Bombardi S.M.J., Olle R.D., Fagà I., Possebon J., Buschinelli J.T.P. *Toxicidade da fração volátil de colas projeto estudo da exposição ocupacional a hexano: parecer técnico*. Fundacentro Atualidades em Prevenção de Acidentes. Vol. 258:6-11, 1991.
45. Strassnig S., Gfrerer M., Lankmayr E.P. *Microwave-assisted derivatization of 2,5-hexanedione in urine: evaluation using GC-MS and GC-ECD*. J. CHROMAT. B. 813:151-158, 2004.
46. Takeuchi Y., Mabuchi C., Takagi S. *Polyneuropathy caused by petroleum benzine*. INT. ARCH. ARBEITSMED. 35:185-197, 1975.
47. U.S. Department of Health and Human Service. *Toxicological profile for n-hexane*. Public Health Service for Toxic Substances and Disease Registry, 1999.
48. U.S. Environmental Protection Agency. *Integrated Risk Information System (IRIS) on n-Hexane*. National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, Washington DC, 1999.

49. Veulemans H., Van Vlem E., Janssens H., Masschelein R., Leplat A. *Experimental human exposure to n-hexane. Study of the respiratory uptake and elimination, and of n-hexane concentration in peripheral venous blood.* INT. ARCH. OCCUP. ENVIRON. HEALTH. 49: 251-263, 1982.
50. Woehrling E.K., Zilz T.R., Coleman M.D. *The toxicity of hexanedione isomers in neural and astrocytic cell lines.* ENV. TOX. PHARMACOL. 22:249-254, 2006.
51. Yamamura Y. *n-Hexane polyneuropathy.* FOLIA PSYCHIATR. NEUROL. JPN. 23:45-55, 1969.
52. Zhu M., Spink D.C., Yan B., Bank S., DeCaprio A.P. *Formation and structure of cross-linking and monomeric pyrrole autoxidation products in 2,5-hexanedione-treated amino acids, peptides and protein.* CHEM. RES. TOXICOL. 7:551-558, 1994.

QUESTIONARIO PER IL MONITORAGGIO DELL'ESPOSIZIONE A n-ESANO

(compilare o barrare la risposta esatta per tutte le domande)

Cognome:..... Nome:.....
Luogo di nascita:..... Data:.....
Peso:..... Altezza:.....
Anzianità lavorativa presso la ditta:.....Anni:.....
Mansione attuale:.....da anni.....da mesi.....
Mansioni o attività precedenti:.....

Luogo di residenza: zona urbana zona rurale zona industriale
Intensità di traffico nel luogo di residenza: elevata media scarsa
Vicinanza di distributori benzina: <100 m 100-200 m >200 m
Trasferimento abitazione-lavoro: macchina bus altro

Fumo: sì no Ex-fumatore (da anni:.....)
Se sì, numero sigarette al giorno:.....
Fumo passivo (fumatori in casa): sì no
Mediamente per ore/giorno.....

Alcool al giorno: no < ½ litro ½-1 litro >1 litro

Caffè: no sì (numero al giorno

Uso abituale di farmaci: sì no
Se sì, specificare quali:.....da quanto tempo.....

Radiografie nell'ultimo mese sì no

