



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI MEDICINA MOLECOLARE
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

I traccianti chimici nella valutazione dell'esposizione professionale a polveri di teak

Relatore: Ch.mo Prof. ANDREA TREVISAN

Correlatore: Dott.ssa MARIELLA CARRIERI

Controrelatore: Dott.ssa Gabriella Favaro

Laureando: MARTINELLI ANDREA

ANNO ACCADEMICO 2012/2013

“E quindi uscimmo a riveder le stelle.”

Dante, Divina Commedia, Inferno, canto XXXIV

Indice

Abbreviazioni utilizzate	1
Introduzione.....	3
1.1 Classificazione e struttura del legno.....	3
1.2 Componenti chimici del legno	6
1.3 Lavorazioni e applicazioni del legno	7
1.4 Esposizione a polveri di legno	7
1.5 Effetti sulla salute delle polveri di legno	9
1.5.1 Meccanismi d'azione.....	9
1.5.2 Effetti non cancerogeni.....	10
1.5.3 Effetti cancerogeni.....	11
1.6 La legislazione	13
1.7 Monitoraggio ambientale delle polveri di legno aerodisperse.....	14
1.7.1 Dimensioni delle polveri.....	14
1.7.2 Campionamento delle polveri	17
1.8 I possibili marker chimici del legno.....	18
1.8.1 I monoterpeni	19
1.8.2 I tannini	20
1.8.3 Altri traccianti	21
1.9 Esposizione a polvere di teak e i possibili traccianti.....	21
Scopo della tesi	25
Materiali e metodi.....	27
3.1 Il metodo analitico per la determinazione dei traccianti del teak	27
3.1.1 Materiali.....	27
3.1.2 Prove di solubilità.....	29
3.1.3 Determinazione della lunghezza d'onda di lettura.....	29

3.1.4 Determinazione dei tempi di ritenzione	29
3.1.5 Parametri strumentali	30
3.1.6 Preparazione delle soluzioni standard	30
3.1.7 Validazione del metodo analitico.....	31
3.2 Determinazione del contenuto di LP, 2-MEA e DLP nelle polveri di legno ...	31
3.3 Valutazione dell'esposizione a polveri aerodisperse	32
3.4 Determinazione del contenuto di LP, 2-MEA e DLP nella polvere depositata sui filtri.....	36
Risultati e discussione.....	37
4.1 Prove di solubilità	37
4.2 Determinazione della lunghezza d'onda di lettura	37
4.3 Determinazione dei tempi di ritenzione	40
4.4 Validazione del metodo analitico	43
4.4.1 Separazione cromatografica	43
4.4.2 Linearità.....	44
4.4.3 Precisione	45
4.4.4 Limite di rilevabilità (LR)	46
4.4.5 Limite di quantificazione (LQ)	46
4.5 Determinazione del contenuto di LP, 2-MEA e DLP nelle polveri di legno ...	47
4.6 Valutazione dell'esposizione a polveri aerodisperse	47
4.7 Determinazione del contenuto di LP, 2-MEA e DLP nella polvere depositata sui filtri.....	49
Conclusioni	53
Bibliografia	55

ABBREVIAZIONI UTILIZZATE

ACGIH	<i>American Conference Of Governmental Industrial Hygienists</i>
ACN	Acetonitrile
CI	Intervallo Di Confidenza
DFG	<i>Deutsche Forschungsgemeinschaft</i>
D.Lg.	Decreto Legislativo
DLP	Deossilapacolo
IARC	<i>International Agency For Research On Cancer</i>
ICH	<i>International Conference On Harmonization</i>
LP	Lapacolo
LQ	Limite Di Quantificazione
LR	Limite Di Rilevabilità
2-MEA	2-Metilanttrachinone
NIOSH	<i>National Institute For Occupational Safety And Health</i>
OR	<i>Odds Ratio</i>
PP	Polipropilene
PVC	Polivinilcloruro
SCOEL	<i>Scientific Commitee For Occupational Exposure Limits</i>
SEN	Sensibilizzante
t _R	Tempo Di Ritenzione

INTRODUZIONE

1.1 Classificazione e struttura del legno

Con la parola legno si intende generalmente, il materiale che si trova sotto la corteccia e viene ricavato dagli arbusti, ma in particolare dai fusti degli alberi. A seconda delle specie da cui derivano si possono distinguere vari tipi di legno aventi caratteristiche molto diverse tra loro; è possibile comunque individuare una struttura generale presentata in figura 1.1.

Il legno è una delle più importanti risorse rinnovabili al mondo e cresce in foreste che coprono circa un terzo della superficie terrestre, 3,4 milioni di km². Le specie di alberi conosciute sono circa 12000 e possono essere suddivise in due grandi categorie botaniche: quella delle Latifoglie (*Angiosperme*), caratterizzate dalla presenza di semi “incapsulati” e quella delle Conifere (*Gimnosperme*), caratterizzate dalla presenza di semi “esposti”.

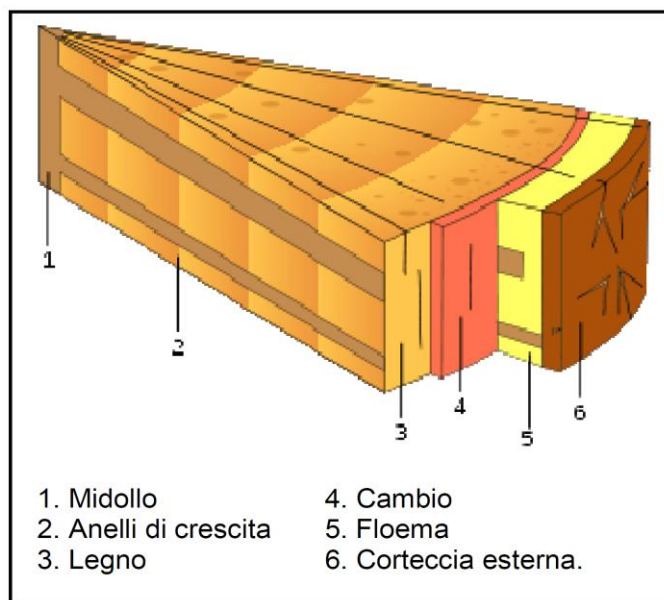


Figura 1.1: struttura del legno.

Ulteriori suddivisioni possono essere fatte quando inteso come materiale di lavoro. La merceologia infatti, distingue i vari tipi di legno secondo due basi:

1. in base alla provenienza, indigeni (rispetto all'Europa e all'America Settentrionale) ed esotici;
2. in base alla compattezza, *hardwood*, legno duro o forte, e *softwood*, legno dolce o tenero.

Si sottolinea il fatto che la classificazione del legno in *hard* e *soft* non fa riferimento alla durezza come proprietà meccanica del materiale, ma alla presenza o meno di fibre, vasi e canali resiniferi nelle Latifoglie, che sono classificate come *hard*.

Nelle tabelle 1.1 e 1.2 viene riportata la classificazione *hard/soft* effettuata dalla *International Agency for Research on Cancer* (IARC) nel 1995 (IARC, 1995).

Si stima che il 58% del legno tagliato sia di tipo *hard*, per la gran parte utilizzato come combustibile, il 70% del legno lavorato è invece di tipo *soft*.

Secondo i dati dell'*International Information System on Occupational Exposure to Carcinogens*, circa 2,5 milioni di lavoratori in Europa sono attualmente esposti alla polvere di legno (1,1-3% della forza lavoro dei Paesi dell'Unione Europea) (Foà *et al.*, 2007).

Tabella 1.1: elenco dei legni tipo *soft* secondo la IARC e relativa traduzione in italiano.

Genere e Specie	Nome comune inglese	Nome comune italiano
<i>Abies</i>	<i>Fir</i>	Abete
<i>Charmecyparis</i>	<i>Cedar</i>	Cipresso-Cedro
<i>Cupressus</i>	<i>Cypress</i>	Cipresso
<i>Larix</i>	<i>Larce</i>	Larice
<i>Picea</i>	<i>Spruce</i>	Abete Rosso
<i>Pinus</i>	<i>Pine</i>	Pino
<i>Pseudotsuga Menziesii</i>	<i>Douglas Fir</i>	Abete di Douglas
<i>Sequoia Sempervirens</i>	<i>Redwood</i>	Sequoia Gigante
<i>Thuja</i>	<i>Thuja</i>	Tuia
<i>Tsuga</i>	<i>Hemlock</i>	Tsuga

Tabella 1.2: elenco dei legni tipo *hard* secondo la IARC e relativa traduzione in italiano.

Genere e Specie	Nome comune inglese	Nome comune italiano
<i>Acer</i>	<i>Maple</i>	Acero
<i>Alnus</i>	<i>Alder</i>	Ontano (Olmo)
<i>Betulla</i>	<i>Birch</i>	Betulla
<i>Carya</i>	<i>Hickory</i>	Noce Hickory
<i>Carpinus</i>	<i>Hornbeam, White Beech</i>	Carpino o Faggio Bianco
<i>Castanea</i>	<i>Chestnut</i>	Castagno
<i>Fagus</i>	<i>Beech</i>	Faggio
<i>Fraxinus</i>	<i>Ash</i>	Frassino
<i>Juglans</i>	<i>Walnut</i>	Noce
<i>Platanus</i>	<i>Sycamore</i>	Platano Americano
<i>Populus</i>	<i>Aspen, Poplar</i>	Pioppo
<i>Prunus</i>	<i>Cherry</i>	Ciliegio
<i>Salix</i>	<i>Willow</i>	Salice
<i>Quercus</i>	<i>Oak</i>	Quercia
<i>Tilia</i>	<i>Lime, Basswood</i>	Tiglio
<i>Ulmus</i>	<i>Elm</i>	Olmo
<i>Agathis Australis</i>	<i>Kauri Pine</i>	Pino Kauri
<i>Chlorophora Excelsa</i>	<i>Iroko</i>	Iroko
<i>Dacrydium Cupressinum</i>	<i>Rimu, Red Pine</i>	Pino Rosso
<i>Dalbergia</i>	<i>Palisander</i>	Palissandro
<i>Dalbergia Nigra</i>	<i>Brazilian Palisander</i>	Palissandro Brasiliano
<i>Diospyros</i>	<i>Ebony</i>	Ebano
<i>Khaya</i>	<i>African Mahogany</i>	Mogano Africano
<i>Mansonia</i>	<i>Mansonia, Bete</i>	Mansonia
<i>Ochroma</i>	<i>Balsa</i>	Balsa
<i>Palquium Hexandrum</i>	<i>Nyatoh</i>	Nyatoh
<i>Pericopsis Elata</i>	<i>Afrosomia</i>	Afrosomia
<i>Shorea</i>	<i>Meranti</i>	Meranti
<i>Tectona Grandis</i>	<i>Teak</i>	Teak
<i>Terminalia Superba</i>	<i>Limba, Afara</i>	Frakè Bianco
<i>Triplochiton Scleroxylon</i>	<i>Obeche</i>	Ayous

1.2 Componenti chimici del legno

Dal punto di vista chimico il legno presenta una grande varietà di composti che può variare in funzione di tre fattori: specie vegetale considerata, struttura anatomica considerata (corteccia midollo, ecc.) ed età della pianta.

In generale si può però affermare che i costituenti principali di ogni tipo di legno sono composti macromolecolari noti, ossia:

- cellulosa, il componente maggiore (40-50%) sia per quanto riguarda i legni tipo *hard* che quelli tipo *soft*, consiste in un polisaccaride lineare formato da unità di D-glucosio legate insieme da legami glicosidici di tipo β ;
- emicellulosa, presente maggiormente nei legni di tipo *hard*, è un polisaccaride ramificato composto da una miscela di cinque tipologie di zuccheri (i tre esosi, glucosio, mannosio e galattosio e i due zuccheri pentosi xilosio e arabinosio), la cui composizione in percentuale varia a seconda della specie di albero;
- lignina, presente maggiormente nei legni di tipo *soft*, consiste in un polimero di composti fenolici molto ramificato.

In aggiunta a questi tre costituenti principali, il legno è costituito da centinaia di composti chimici di natura inorganica e organica. La parte inorganica è presente in percentuali molto basse, tra lo 0,2% e lo 0,5% ed è composta da sali di potassio, di calcio, di magnesio e da composti a base di silicio. La parte organica è costituita da una grande varietà di molecole estraibili con solventi polari e apolari, chiamate anche “estrattibili”, dall’inglese “*extractives*”. I composti polari più presenti sono in genere composti aromatici come tannini, flavonoidi, fenoli e chinoni, mentre la parte apolare comprende acidi grassi, resine, cere, terpeni e terpenoidi.

1.3 Lavorazioni e applicazioni del legno

Il legno, in base alle sue caratteristiche composizionali ed alle proprietà fisiche, viene utilizzato per le più disparate applicazioni. Ad esempio: come materiale da costruzione, per fondazioni, travature, solai, oppure nella cantieristica navale; un ambito di applicazione altrettanto importante è quello della fabbricazione di mobili, infissi, parquet; inoltre viene utilizzato nella fabbricazione di strumenti musicali. Una più recente applicazione si ha come biomassa, utilizzando materiale derivanti da scarti di lavorazione.

Le lavorazioni del legno possono essere suddivise in tre grandi aree:

- prima lavorazione, parte dal materiale grezzo e lo trasforma in assi, pannelli e listelli;
- seconda lavorazione, trasforma i prodotti della prima in prodotti finiti;
- terza lavorazione, prevede il recupero dei materiali legnosi per ottenere pannelli che sono a loro volta impiegati dalle imprese per la seconda lavorazione.

1.4 Esposizione a polveri di legno

L'esposizione a polveri di legno dipende in primo luogo dalla tipologia di legno trattato; a tal proposito si riportano, in tabella 1.3, le principali specie di legno in uso a livello nazionale nell'industria del legno e mobiliera (Foà *et al.*, 2007).

La quantità e la dimensione delle particelle variano considerevolmente a seconda del tipo di lavorazione e del posto di lavoro. Queste variazioni dipendono, anche se non in maniera sistematica, dalle differenze nei processi di trattamento del legno (il metodo di taglio, la velocità degli strumenti rotanti, la larghezza delle lame e l'affilatura delle stesse, la sabbiatura, ecc.), dal tipo di legno (verde o stagionato, pannelli, estratti, ecc.), dalla ventilazione e dai sistemi aspiranti. Inoltre, a seconda del trattamento a cui è stato sottoposto il legno prima della lavorazione, la polvere può contenere additivi, conservanti o collanti.

I livelli più elevati di polverosità ambientale sono stati riscontrati nella produzione dei mobili, soprattutto nelle operazioni di carteggiatura o similari, con concentrazioni in aria superiori a 5-10 mg/m³. Concentrazioni di polveri superiori a

1-2 mg/m³ sono state misurate durante operazioni dove venivano utilizzate seghe meccaniche e pialle e nelle operazioni di finitura e fresatura (Foà *et al.*, 2007).

Tabella 1.3: legni usati nell'industria italiana del legno e mobiliera.

Legni teneri: abete bianco, abete rosso, cedro, cipresso, larice, pino silvestre, cirmolo, pino insigne
Legni duri: acero, ontano, betulla, noce americano, carpino, castagno, faggio, frassino, noce, platano, ciliegio, salice, quercia, olmo
Legni duri tropicali: iroko, palissandro dell' Honduras, palissandro dell'India, palissandro brasiliano, ebano, mogano africano, mogano americano.

Numerosi dati evidenziano come in ambienti di lavoro dove siano presenti sistemi di ventilazione ed aspirazione efficienti, macchine tecnologicamente avanzate e carichi di lavoro adeguati, si rilevano livelli di polverosità ambientale inferiori a 1-2 mg/m³. Resta invece particolarmente oneroso ridurre l'esposizione sotto 1 mg/m³ (Apostoli e Gelmi, 2002).

Inoltre, a seconda delle lavorazioni prevalenti, il tipo di legno utilizzato può variare anche considerevolmente da regione a regione, con conseguente diverso rischio espositivo. I potenziali effetti dannosi sulla salute provocati dalle polveri di legno sono determinati dalla penetrazione e dalla deposizione delle particelle nelle vie aeree: la frazione respiratoria di interesse è quella inalabile. Per le polveri di legno è stata in particolare dimostrata una distribuzione bimodale delle particelle con diametri compresi fra 20-30 µm e 1-2 µm (Apostoli e Gelmi, 2002).

In genere le polveri con diametro maggiore sono prodotte durante le operazioni di taglio e quelle con diametro minore durante la sabbatura e la carteggiatura del legno secco (Vaughan e Davis, 1991). I legni *hard* sono considerati più pericolosi per la salute rispetto ai legni *soft* perché, durante la loro lavorazione, generano particelle più fini di polvere, aventi un diametro inferiore ai 30 µm e spesso inferiore ai 10 µm. Tali particelle possono quindi penetrare nell'albero respiratorio e depositarsi nella zona alveolare di scambio gassoso. Ciò non avviene per le polveri

prodotte dalla lavorazione dei legni dolci, costituite da particelle più grossolane che hanno maggiore difficoltà a penetrare in profondità.

1.5 Effetti sulla salute delle polveri di legno

1.5.1 Meccanismi d'azione

I principali meccanismi, che spesso agiscono in associazione tra loro, alla base degli effetti dannosi delle polveri di legno possono essere suddivisi nelle seguenti categorie (Bartolucci *et al.*, 2005):

- meccanismi fisici, in relazione alle proprietà fisico-meccaniche delle particelle (diametro, forma, grandezza, durezza), da cui può dipendere l'azione irritante delle polveri di legno. Le polveri prodotte durante la lavorazione entrano nell'organismo tramite le prime vie aeree e la concentrazione di polveri nei diversi segmenti dell'albero respiratorio dipendono dall'equilibrio tra i fenomeni di deposizione e di eliminazione delle particelle inalate. Benché l'organismo umano sia dotato di meccanismi di difesa e di auto-pulizia (clearance mucociliare, tosse, ecc...), tali meccanismi non sono talora sufficienti a controbilanciare una prolungata esposizione ad agenti inquinanti come le polveri e si vengono quindi a determinare effetti negativi per la salute;
- meccanismi tossici, dovuti all'azione specifica di alcune delle sostanze chimiche presenti nelle polveri dei legni (ad esempio, alcool sinapico e conifero, 2,6-dimetossi-1,4-benzochinone, 3,4,5-trimetossi-cinnamaldeide) o nei preservanti e nelle vernici;
- meccanismi allergici, dovuti a sostanze presenti nei legni che possono fungere da allergeni e determinare una sensibilizzazione con effetti a carico della cute con dermatiti da contatto, e a livello polmonare con alveoliti allergiche estrinseche (muffe) e asma (sostanze chimiche come i chinoni, le resine, i glucosidi).

Il *Scientific Committee For Occupational Exposure Limits* (SCOEL, 2003) ha classificato gli effetti attesi sulla salute secondo diverse soglie (0,5, 1 e 5 mg/m³) e ha

considerato solo gli studi che riportano livelli medi di esposizione inferiori a questi valori.

Gli studi condotti con esposizioni medie inferiori a $0,5 \text{ mg/m}^3$ sono pochi; l'effetto più significativo evidenziato è quello causato dal cedro rosso sulle basse vie respiratorie (asma, iper-reattività bronchiale e diminuzione della funzionalità polmonare).

Gli studi che riportano esposizioni medie tra $0,5$ e 1 mg/m^3 sono anch'essi rari, ma segnalano effetti importanti per la salute (tosse, oppressione toracica, asma) di singoli lavoratori esposti a diversi tipi di legno.

Per esposizioni maggiori o uguali a 1 mg/m^3 , riguardo agli effetti sulla salute (sintomi a carico delle alte vie respiratorie, alterazione dei parametri funzionali, asma) sono chiare le relazioni dose-effetto e dose-risposta. E' inoltre emerso come non vi sia una netta differenza tra esposizioni a polveri di legno hard o soft e che quindi tutti i tipi di legno sono in grado di provocare vari sintomi respiratori nei lavoratori esposti.

1.5.2 Effetti non cancerogeni

L'esposizione a polveri di legno è responsabile dell'insorgere di patologie di tipo irritativo-allergico a carico della cute, delle mucose respiratorie e oculari. (Fransman *et al.*, 2003).

Tra queste sono segnalate mucostasi e alterazioni della clearance muco-nasale, alterazioni citologiche nasali, quali quadri di infiammazione cronica, iperplasia delle cellule caliciformi, displasia (sviluppo anomalo di un tessuto), metaplasia (trasformazione di un tessuto in una forma insolita) squamosa o cuboidale non associati a presenza di cellule tumorali, epistassi, effetti di tipo irritativo - allergico a carico delle mucose delle prime vie aeree e oculari (Goldsmith e Shy, 1988; Enarson *et al.*, 1990); tali effetti possono verificarsi anche a livelli relativamente bassi di esposizione alle polveri di legno (a partire da 1 mg/m^3).

Sono stati inoltre descritti gli effetti non cancerogeni a carico delle basse vie respiratorie, anche per bassi livelli di esposizione a polveri di legno (sia legni *soft* che *hard*). In particolare sono stati riscontrati in lavoratori esposti quadri di alveoliti allergiche (da allergeni o di origine fungina), tosse, bronchite cronica, ostruzione

cronica non asmatica delle vie aeree, fibrosi polmonare idiopatica (Tabona *et al.*, 1984; Dahlgvist *et al.*, 1992).

Una trattazione a parte merita l'asma professionale in relazione, anche se non esclusivamente, all'esposizione a legni tropicali (tra cui in particolare il cedro rosso). Gli studi hanno rivelato una significativa relazione dose-risposta tra le concentrazioni di polveri inalabili e i sintomi asmatici (Malo *et al.*, 1986; Douwes *et al.*, 2001); in aggiunta, è stata riscontrata la presenza di fischi respiratori a livelli molto bassi di polverosità (inferiori a $0,5 \text{ mg/m}^3$) (Chan, 1994).

Diversi studi hanno inoltre riportato effetti di tipo irritativo - allergico a carico della cute (Gonçalo *et al.*, 1986); solitamente questi sono causati dal contatto diretto della pelle con la polvere di legno con effetti limitati alle aree più esposte (mani, avambracci, volto, collo).

1.5.3 Effetti cancerogeni

Dal 1987 la IARC ha proposto una classificazione di sostanze, miscele di sostanze e situazioni occupazionali che potenzialmente esporrebbero a rischio cancerogeno. Secondo tale classificazione e sulla base dei dati presenti in letteratura, a partire dal 1995 le polveri di legno sono state introdotte nel Gruppo 1 (tabella 1.4), come cancerogeno certo per l'uomo.

Tabella 1.4: classificazione IARC delle sostanze.

GRUPPO	CLASSIFICAZIONE
1	Cancerogeno certo per l'uomo
2a	Cancerogeno probabile per l'uomo
2b	Cancerogeno possibile per l'uomo
3	Non classificabile cancerogeno per l'uomo
4	Probabilmente non cancerogeno per l'uomo

In particolare il ruolo fondamentale dell'esposizione a polveri di legno nell'insorgenza del cancro dei seni nasali (tumore assai raro nella popolazione generale) è stato dimostrato in modo inequivocabile da numerosi studi epidemiologici effettuati su popolazioni di diverse aree geografiche, esposte per

periodi differenti e in diverse tipi di attività. Il primo di questi è stato pubblicato in Inghilterra nel 1965 dove su 20 pazienti affetti da adenocarcinoma nasale, 15 avevano lavorato nell'industria dei mobili (Machbet, 1965). In studi successivi è stato dimostrato come il rischio di contrarre questo tumore fosse maggiore nei lavoratori maschi dei mobilifici (OR = 41,1%; 95% CI = 24,5-68,7), piuttosto che nei taglialegna, nei forestali e nei lavoratori della cartapesta (Demers *et al.*, 1995). Uno dei limiti degli studi disponibili è che solitamente non è possibile distinguere, nelle attività lavorative, tra esposizione a polveri di legno *hard* o *soft*, a causa del contemporaneo utilizzo di questi.

L'associazione sembra comunque più forte con la polvere dei legni *hard*. Infatti l'*American Conference of Governmental Industrial Hygienists* (ACGIH) ha classificato le polveri di quercia e faggio come cancerogeni per l'uomo inserendole nel gruppo A1, come riassunto in tabella 1.5 (ACGIH, 2012).

I dati hanno evidenziato una chiara relazione con la dose e la durata dell'esposizione, tuttavia il rischio di tumore era elevato anche per periodi più brevi di esposizione (< 5 anni); inoltre gli studi hanno indicato un lungo periodo di latenza, di almeno 20 anni, che può essere inferiore in caso di coesposizione a solventi, vernici preservanti, o se i soggetti sono fumatori. E' stato provato che l'effetto cancerogeno delle polveri di legno *hard* è attribuibile alla presenza di particolari sostanze estraibili (tannini) presenti nel legno in grado di alterare le strutture proteiche e intervenire nella replicazione cellulare, e non alle sostanze applicate al legno come per esempio colle e vernici (Giannini *et al.*, 2003).

Molti studi hanno anche riportato un legame tra il cancro naso - faringeo e le lavorazioni legate al legno; tuttavia sono stati considerati i possibili fattori di confondimento quali l'esposizione a formaldeide e ai clorofenoli; quindi quest'associazione non è confermata. L'eccesso di rischio sembra limitato ai lavoratori che hanno iniziato a lavorare almeno 30 anni prima della comparsa del cancro.

La IARC ha concluso che è presente un'evidenza insufficiente per la relazione causale tra l'esposizione occupazionale a polveri di legno e i tumori a carico di nasofaringe, orofaringe, ipofaringe, polmone, stomaco, colon, retto, sistema linfatico ed ematopoietico e studi anche più recenti non si discostano da tale conclusione (IARC, 1995).

Tabella 1.5: cancerogenicità delle polveri di legno riconosciuta da ACGIH.

Tipo di polveri di legno	Gruppo	Classificazione
quercia, faggio	A1	Cancerogeno certo per l'uomo
betulla, mogano, teak, noce	A2	Cancerogeno sospetto per l'uomo
Tutte le altre polveri di legno	A4	Non classificabile cancerogeno per l'uomo

1.6 La legislazione

A livello normativo le polveri di legno *hard* sono state riconosciute come sostanze cancerogene dal Direttivo dell'Unione Europea (1999) e, in seguito, nel nostro Paese tramite il D. lg. del 2000.

La legislazione italiana, attraverso il D.Lg. 81/2008, pone vincoli e normative ben precise per quanto riguarda l'esposizione lavorativa a polveri di legno *hard*, che viene trattata nel titolo IX "sostanze pericolose" (capo II, "protezione da agenti cancerogeni e mutageni"). Gli articoli 234 e 235 rimandano agli allegati XLII e XLIII ("Elenco di sostanze, preparati e processi" e "Valori limite di esposizione personale") dove viene identificata come cancerogena l'esposizione a polveri di legno *hard*, e viene fissato un limite di esposizione pari a 5 mg/m^3 tramite campionamento personale della frazione inalabile, specificando che se le polveri di legno *hard* sono mescolate con altre polveri di legno, il valore limite si applica a tutte le polveri di legno presenti nella miscela in questione (D.lg. 81/2008). Nell'allegato XLIII è specificato che tale valore deve essere misurato o calcolato in relazione ad un periodo di riferimento di otto ore.

In altri Paesi sono stati fissati valori limite inferiori (tabella 1.6) (Gori *et al.*, 2007); in particolare il *National Institute for Occupational Safety and Health* (NIOSH, 2000) ha fissato un valore limite di 1 mg/m^3 per tutti i tipi di polveri di legno, sottolineando il rischio cancerogeno; in Germania invece è in vigore un valore limite di 2 mg/m^3 per tutti i tipi di polveri di legno (DFG, 2004).

L'ACGIH dal canto suo, ha stabilito per il 2012 un valore limite di 1 mg/m^3 per tutti i tipi di polveri di legno; inoltre è stato indicato un valore limite di $0,5 \text{ mg/m}^3$ per le polveri del cedro rosso dell'Ovest al quale è stato associato la notazione SEN (effetto sensibilizzante ed asmogeno) (ACGIH, 2012).

Tabella 1.6: riassunto dei TLV adottati.

Ente (anno)	Tipologie di legno	TLV e annotazioni
NIOSH (2000)	Tutte	1 mg/m ³
DFG (2002)	Tutte	2 mg/m ³
Italia (2008)	Tutti i legni duri	5 mg/m ³
ACGIH (2012)	Tutte	1 mg/m ³
	Cedro Rosso dell'Ovest	0,5 mg/m ³ SEN

1.7 Monitoraggio ambientale delle polveri di legno aerodisperse

L'attenzione rivolta alla problematica delle polveri in generale e, nello specifico, alle polveri di legno *hard*, è determinata dalla possibilità che hanno le stesse di essere inalate. L'inalazione comporta un rischio per la salute, dovuto alle dimensioni delle particelle di polvere che, se sufficientemente piccole, possono generare delle neoplasie ed un rischio dovuto al fatto che le polveri fungono da veicolanti per le sostanze contenute nel legno, che possono arrivare quindi, a depositarsi nella zona alveolare dei polmoni, con passaggio di sostanze tossiche nel sangue.

Il fattore da considerare determinante dunque, per la pericolosità e la quantità di polvere assunta è la dimensione, perché è la prima discriminante per l'inalazione.

1.7.1 Dimensioni delle polveri

Per la valutazione della quantità di polvere inalata dal personale esposto si deve considerare l'apparato respiratorio umano che costituisce, in genere, un "filtro" all'inalazione delle polveri. Tale apparato può essere diviso in tre regioni anatomiche (figura 1.2) che si differenziano per le dimensioni delle particelle che vi si depositano:

1. regione naso-faringea (15-30 μm),
2. regione tracheo-bronchiale (5-15 μm),
3. regione bronchiolo-alveolare, altrimenti detta regione respiratoria (0,1-5 μm).

Esistono inoltre quattro diversi modi di deposizione a seconda delle dimensioni del particolato:

1. intercettazione,
2. impatto inerziale,
3. sedimentazione,
4. diffusione.

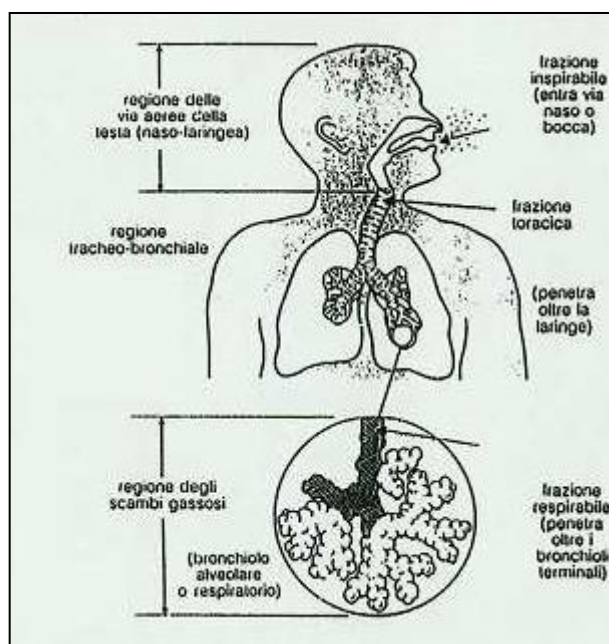


Figura 1.2: caratterizzazione delle frazioni di massa delle tre regioni anatomiche.

La modalità di deposizione per intercettazione delle polveri si verifica quando il percorso del particolato viene contrastato fisicamente; questo è un meccanismo efficace soprattutto nel caso di polveri fibrose allungate, quindi la regione anatomica dove si manifesta questo tipo di deposizione è quella naso-faringea.

L'impatto inerziale è caratterizzato da un brusco cambio di direzione del flusso aereo delle polveri per ragioni anatomiche (nelle prime vie aeree vi sono notevoli cambiamenti di direzione del flusso: turbinati, naso-faringe, laringe, trachea). Quando una particella è trasportata da un flusso d'aria che cambia direzione, essa tende a mantenere la direzione originale per forza d'inerzia andando a sbattere contro le pareti dove infine si deposita; tale fenomeno è tanto maggiore quanto più grande è la massa della particella. Come per l'intercettazione, la deposizione per impatto inerziale avviene per lo più nella regione naso-faringea.

Le particelle più piccole invece, continuano il loro viaggio penetrando nelle zone più profonde; la sedimentazione è legata alla forza di gravità delle particelle che si

depositano quindi sulle pareti quando la forza di sostenimento dinamico nel flusso aereo viene a mancare o a ridursi di molto.

Sedimentano prima a livello bronchiale le particelle più grandi (10 μm) e poi a livello bronchiolo-alveolare le particelle di diametro inferiore.

La modalità di deposizione per diffusione è caratteristica delle particelle più piccole (0,5-5 μm), ed è associata alla regione bronchiolo alveolare.

In conclusione, il monitoraggio ambientale per la valutazione dell'esposizione alle polveri di legno, come descritto dalla norma europea UNI EN 481, prevede la determinazione della concentrazione in aria, espressa in mg/m^3 , a seguito di un campionamento delle diverse frazioni di particolato, in base al tipo di deposizione. Le differenti frazioni vengono definite in base al diametro aerodinamico delle particelle, dove per diametro aerodinamico si intende il diametro di una particella di forma sferica e di densità unitaria (massa/volume = 1 g/cm^3), che ha il comportamento uguale a quello della particella in esame (es. la stessa velocità di sedimentazione o di diffusione). Tali frazioni vengono differenziate in:

- frazione inalabile, la frazione in massa delle particelle aerodisperse totali che viene inalata attraverso naso e bocca. Ci si riferisce a particelle con diametro aerodinamico compreso nel range 0 - 100 μm . Tale frazione è di interesse per tutte le lavorazioni industriali poiché se è presente un effetto tossico, esso si manifesta già a contatto con le mucose nasali;
- frazione toracica, coincide con la frazione in massa delle particelle inalate in grado di penetrare oltre la laringe; è anche detta frazione tracheo-bronchiale e non raggiunge la zona alveolare. Storicamente la frazione toracica si riferisce a particelle con diametro aerodinamico tra i 10 ed i 30 μm e con valore mediano fissato a 11,64 μm ;
- frazione respirabile, la frazione in massa delle particelle inalate che penetra nelle vie respiratorie non ciliate (zona alveolare); è costituita da particelle con diametro aerodinamico inferiore a 5 μm e con valore mediano fissato a 4,25 μm .

La frazione toracica e quella respirabile sono contenute nella frazione inalabile.

1.7.2 Campionamento delle polveri

Dal punto di vista pratico, il campionamento delle polveri disperse in aria prevede una linea costituita da una pompa meccanica, una membrana che agisce da filtro, come mezzo di captazione delle polveri e da un selettore o testa di campionamento che permette il frazionamento delle particelle interessate.

Le pompe aspiranti possono essere di tipo personale o statico. Le pompe personali sono relativamente leggere ed alimentate a batteria in modo da poter essere indossate dall'operatore. Le pompe fisse, invece, sono generalmente alimentate dalla rete elettrica, garantiscono flussi più elevati rispetto alle pompe personali e vengono utilizzate in postazione fissa.

I due tipi di campionamento rispondono a diverse esigenze: il campionamento personale è utilizzato per verificare l'esposizione dell'addetto durante lo svolgimento delle sue mansioni lavorative, al fine di confrontare il dato rilevato con un valore limite; il campionamento in posizione fissa serve, invece, per verificare l'inquinamento di un'area ristretta, ad esempio può essere utilizzato per preparare una mappa delle fonti inquinanti all'interno dell'ambiente di lavoro.

I selettori hanno la funzione di intrappolare una determinata frazione granulometrica su dei filtri, costituiti da materiali vari e con diversa porosità media. I materiali più frequentemente utilizzati sono gli esteri misti di cellulosa, il PVC, le fibre di vetro. La quantità raccolta è poi determinata per via gravimetrica.

Con l'entrata in vigore del D.Lg. 66/2000, poi recepito nel D.Lg. 81/2008, che classifica le polveri di legno *hard* cancerogene, i comitati scientifici hanno affrontato il problema del campionamento da diversi punti di vista. Si evince dalla bibliografia che non esiste un metodo ufficiale o un campionatore specifico per il campionamento delle polveri; in commercio ne esistono di varie tipologie, tutte relative al campionamento della frazione inalabile delle polveri. Studi sull'affidabilità di tali selettori nella valutazione dell'esposizione a polveri di legno sono stati effettuati in varie situazioni lavorative (Bonfiglio *et al.*, 2005; Harper *et al.*, 2002 e 2004).

I dispositivi di prelievo devono essere indossati dall'operatore, con l'orifizio di aspirazione a livello degli organi respiratori e posto in direzione parallela al viso per tutta la durata del prelievo.

Per quanto riguarda le caratteristiche delle membrane da utilizzare per il dosaggio gravimetrico delle particelle totali, secondo quanto riportato dalle Linee Guida della Regione Veneto (regione Veneto), in analogia alle Linee Guida già espresse da altre regioni, si fa riferimento alla metodica NIOSH 0500 relativa alla determinazione delle polveri totali aerodisperse non altrimenti regolate, che prevede:

- uso di filtri in PVC o in altro materiale idrofobo (fibra di vetro),
- bilancia analitica con sensibilità almeno alla quinta cifra decimale (0,01 mg),
- condizionamento dei filtri in atmosfera controllata per almeno due ore.

1.8 I possibili marker chimici del legno

Studi recenti hanno proposto una valutazione dell'esposizione a polveri di legno attraverso il dosaggio di marker chimici, specifici per ogni tipologia. Tale esigenza è nata proprio in relazione alla contemporanea presenza di vari tipi di legno negli ambienti di lavoro e alla differente classificazione in base alla cancerogenicità o differente azione tossica (Gori *et al.*, 2005 e 2009).

Il “marker ideale” è una sostanza realmente dotata di attività biologica che è causa diretta di una determinata patologia. Al momento non sono ancora stati individuati dei composti con tali caratteristiche per quanto riguarda l'effetto cancerogeno delle polveri di legno; sono invece conosciute varie sostanze dotate di differenti effetti tossicologici sull'uomo (ad esempio dermatiti o asma).

Tra le varie sostanze studiate sono stati individuati dei “traccianti” di particolari tipi di legno, sostanze specifiche di un tipo di legno (anche se non dotate di particolari effetti tossicologici), che possono essere utilizzati per stimare la dose interna di polvere di tale legno effettivamente assorbita. Questa possibilità è molto importante nel monitoraggio dell'esposizione a polveri di legno che non sempre risulta facile da eseguire, specie in particolari ambienti lavorativi, come ad esempio cantieri navali o mobilifici. In tali lavori spesso vengono usati differenti tipi di legno simultaneamente e vengono quindi generate complesse miscele di polveri, con differenti rischi per la salute: sapere identificare tra queste miscele uno specifico tipo di legno è dunque di fondamentale importanza.

1.8.1 I monoterpeni

La prima classe di composti studiata come possibile marker chimici è quella dei monoterpeni. Questi composti appartengono alla famiglia dei terpeni, idrocarburi formati da due o più unità di isoprene (2-metil-1,3-butadiene) legate tra loro attraverso la “regola dell’isoprene” enunciata per la prima volta da Ruzicka; tale regola prevede che lo scheletro carbonioso dei terpeni sia composto da unità di isoprene legate tra loro attraverso arrangiamenti regolari (*head to tail*) o irregolari (Ruzicka, 1953). I terpeni vengono di conseguenza classificati in base al numero di unità isopreniche presenti per molecola, in particolare i monoterpeni sono composti da un numero di subunità pari a due, tabella 1.7 (Granström, 2010).

Tabella 1.7: classificazione dei terpeni.

Numero di unità isopreniche	Tipologia di terpeni	Numero di atomi di C
2	Monoterpeni	10
3	Sesquiterpeni	15
4	Diterpeni	20
6	Triterpeni	30
8	Tetraterpeni	40
>8	Politerpeni	>40

Come riportato in letteratura (Welling *et al.*, 2001) quando il legno “fresco”, non ancora essiccato, viene segato e trattato nelle segherie si ha lo sviluppo di fumi contenenti i seguenti monoterpeni: α -pinene, β -pinene, 3-carene, limonene. In particolare le operazioni che espongono maggiormente a monoterpeni sono: scortecciatura, segazione, rifinitura, piallatura (Rosenberg *et al.*, 2002) e produzione di *pellets* (Edman *et al.*, 2003). La probabilità di esposizione a tali composti aumenta a seconda della tipologia di legno, infatti i terpeni sopra citati sono i maggiori componenti della resina di legni di tipo *soft* come pino, abete, abete rosso (Demers *et al.*, 1997) e larice (Isidorov *et al.*, 2005). L’esposizione a monoterpeni provoca effetti di tipo irritativo nelle vie respiratorie (Hedenstierna *et al.*, 1983) e forme irritative della pelle, occhi e mucose (Falk-Filpsson, 1996).

Per quanto riguarda i monoterpeni è possibile eseguire anche un monitoraggio biologico in quanto sono stati individuati i relativi metaboliti urinari specifici; i primi a essere individuati sono stati il *cis*-verbenolo e il *trans*-verbenolo, entrambi metaboliti dell' α -pinene (Eriksson, Levin, 1990); ulteriori idrossiterpeni sono stati individuati come metaboliti del limonene (Poon *et al.*, 1996). Per questi motivi i monoterpeni e i relativi metaboliti urinari si possono considerare marker specifici e vengono comunemente usati per il monitoraggio ambientale e biologico per l'esposizione professionale a polveri di conifere nelle segherie e falegnamerie dei paesi nordici (Eriksson *et al.*, 1997; Sandner *et al.*, 2002).

1.8.2 I tannini

Un'altra classe di composti molto studiata riguarda quella dei tannini, polifenoli complessi che si trovano in tutti i tipi di polveri di origine vegetale ed in particolare nelle polveri di legno. Tale classe di composti è stata infatti individuata in estratti di diversi tipi di legno, in particolar negli estratti derivanti dalla quercia, che si sono rivelati cancerogeni per le cavie da laboratorio (Kirby, 1960). Per questi motivi è stata proposta l'analisi dei tannini totali nelle varie polveri di legno, per verificare la potenziale cancerogenicità di certi tipi di legno rispetto ad altri (Bianco *et al.*, 1994). Analisi condotte tramite cromatografia liquida, associata alla spettrometria di massa, hanno permesso l'identificazione dei tannini presenti negli estratti di alcune Latifoglie (Mammela *et al.*, 2000); è stato inoltre verificato che alcuni composti, appartenenti alla classe dei tannini, sono presenti esclusivamente negli estratti di acacia, noce e quercia, mentre non sono stati rilevati in quelli di abete e larice (Bianco *et al.*, 1997). Tali composti sono: acido gallico, acido vanillico, acido ellagico e la siringaldeide. In particolare l'acido gallico è uno dei composti presenti in maggiore concentrazione nell'estratto di quercia ed è quindi stato proposto come tracciante della polvere di legno di quercia (Mammela *et al.*, 2001), classificata come A1, ossia cancerogeno per l'uomo, dall'ACGIH, come indicato in tabella 1.5.

1.8.3 Altri traccianti

Sono stati individuati altri marker tipici dei seguenti legni: cedro rosso dell'Ovest e pioppo.

L'esposizione professionale alle polveri di cedro rosso dell'Ovest, legno di tipo *soft*, è causa di malattie professionali in alcune regioni degli USA, la più importante delle quali è l'asma; da uno studio condotto su pazienti affetti da tale malattia è stato dimostrato che la molecola responsabile nell'insorgere dell'asma è l'acido plicatico che è stato dunque adottato come marker specifico per l'esposizione a polveri di cedro rosso (Chan, 1994).

I marker specifici per il pioppo sono stati individuati nell'alcol salicilico e nell'aldeide salicilica (Jolanki *et al.*, 1997, Aalto-Korte *et al.*, 2005) responsabili di malattie di tipo allergico, quali le DAC, dermatiti allergiche da contatto.

1.9 Esposizione a polvere di teak e i possibili traccianti

Il teak, nome scientifico *Tectona Grandis*, cresce naturalmente nel Sud-Est asiatico e rappresenta una delle specie di legno maggiormente apprezzate nel mercato internazionale, in relazione alla sua facilità di lavorazione e alla sua naturale durevolezza nel tempo. Per queste sue peculiarità viene impiegato in molti settori quali la costruzione di abitazioni, barche, mobili e sculture. La sua naturale durabilità sembra sia legata alla presenza di particolari sostanze che si formano nella trasformazione dell'alburno, la parte più giovane del tronco dell'albero che si trova immediatamente dopo la corteccia, in legno duro. Tali sostanze sono state identificate come una miscela di naftochinoni e antrachinoni, in particolare, è stato identificato come composto maggioritario il 2-metilantrachinone (2-MEA) (Singh *et al.*, 1989; Wang *et al.*, 2006). Per questo motivo tale chinone è stato proposto come marker per l'esposizione professionale a polveri di teak (Gori *et al.*, 2009).

Il 2-metilantrachinone, 2-metil-9,10-diidro-9,10-antracendione, è una polvere marrone chiaro. E' riconosciuto possedere proprietà insetticida e antimicotiche (Rudman *et al.*, 1958; Sumthong *et al.*, 2006). Risulta essere tossico per gli organismi acquatici, ma non sono conosciuti effetti dannosi per l'uomo; la sua struttura è presentata in figura 1.3.

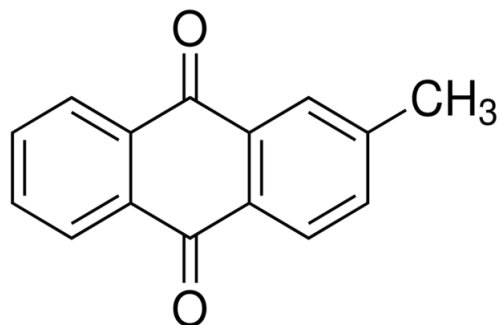


Figura 1.3: struttura del 2-metilanttrachinone.

Ulteriori composti di particolare interesse sono il lapacolo (LP) e il deossilapacolo (DLP). La percentuale di queste sostanze nel teak varia in relazione all'età dell'albero, alla provenienza geografica, nonché alla posizione del pezzo di legno nel tronco. In ogni caso tali sostanze sembrano essere presenti solo nel teak, in particolare il DLP, e quindi specifiche di tale tipo di legno. La loro specificità li rende quindi dei possibili marker chimici nella valutazione dell'esposizione professionale a polvere di teak che, come riportato in precedenza, tabella 1.4, viene classificata come sospetto cancerogeno per l'uomo.

Inoltre, sin dal 1905, è nota la capacità della polvere di teak di indurre eruzioni cutanee (Evans, 1905). Uno studio epidemiologico, condotto in Norvegia nel 1960 in una fabbrica di mobili, ha evidenziato l'insorgenza di eczema da contatto nel 12% dei soggetti esposti a polvere di teak, (Krogh, 1962). Studi più recenti hanno individuato nel lapacolo e nel deossilapacolo le sostanze responsabili dell'azione sensibilizzante (Schulz e Dietrichs, 1962; Schulz, 1965) e allergizzante della polvere di teak (Schulz e Hausen, 1975; Estlander *et al.*, 1999; Estlander *et al.*, 2001).

La struttura (figura 1.4) del deossilapacolo, 2-(3 metilbutil-2-enil)-1,4-diidro-1,4-naftalendione, è stata identificata sin dal 1963 (Schmalle e Hausen, 1984). Il deossilapacolo è un olio viscoso di colore marrone solubile in vari solventi organici come il cloroformio, l'acetonitrile, l'acetato di etile, l'acetone e il metanolo. La sua attività antimicotica funge da conservante naturale del legno e conferisce al teak la sua naturale durezza (Sumthong *et al.*, 2006).

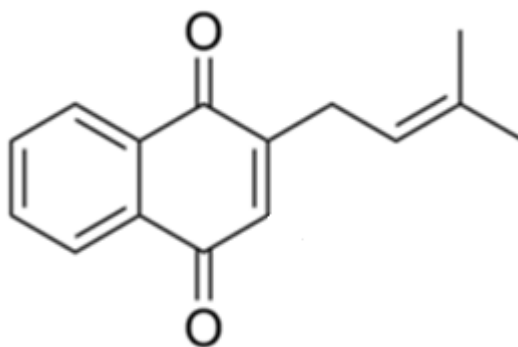


Figura 1.4: struttura del deossilapacolo.

Il lapacolo, 2-idrossi-3-(3 metilbutil-2-enil)-1,4-diidro-1,4-naftalendione, la cui struttura è riportata in figura 1.5, è una polvere gialla, debolmente acida, altamente lipofila con limitata solubilità in acqua, ma molto solubile in soluzioni alcaline. Fu isolato per la prima volta da Paterno nel 1882 dal *Tabebuia avellanae*, un albero della famiglia delle *Bignoniaceae* (Paterno, 1882). Al lapacolo sono attribuite diverse attività terapeutiche ancora oggetto di studio (anti-ascessi, anti-ulcera, antinfiammatorio, antimalarico, antisettico, antivirale, battericida, fungicida), in particolare come antitumorale, nonostante la presenza di effetti tossici collaterali (Block *et al.*, 1974; Goel *et al.*, 1987; Muller *et al.*, 1999; Portillo *et al.*, 2001).

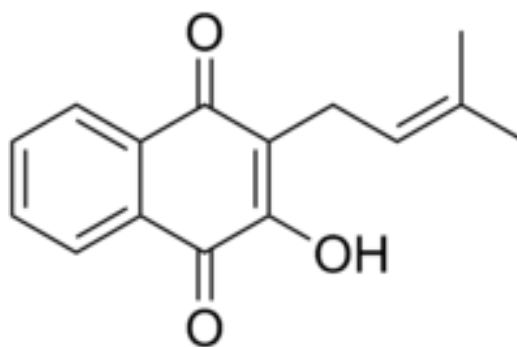


Figura 1.5: struttura del lapacolo.

Tutti i marker chimici descritti nelle pagine precedenti sono riassunti in tabella 1.8.

Tabella 1.8: marker chimici usati per valutare l'esposizione a polveri di legno.

Molecola	Specie di legno	Utilizzo
tannini totali	<i>hardwood</i>	traccianti
acido gallico	quercia	tracciante
acido plicatico	cedro rosso dell'Ovest	marker specifico
alcol salicilico aldeide salicilica	pioppo	marker specifici
2-metilanttrachinone	teak	tracciante
terpeni idrossiterpeni urinari	conifere	marker specifici

SCOPO DELLA TESI

Il presente lavoro di tesi è stato sviluppato secondo due direttrici:

- l'identificazione di marker chimici per la valutazione dell'esposizione a polveri di teak e la messa a punto di una metodica per la determinazione degli stessi in HPLC-DAD;
- monitoraggio dell'esposizione a polveri di legno teak attraverso tecniche di monitoraggio ambientale.

Lo scopo è quello di valutare i livelli di esposizione a polvere di teak di soggetti professionalmente esposti attraverso il dosaggio della frazione inalabile delle polveri aerodisperse, nonché dei traccianti chimici del teak sulle polveri raccolte durante il monitoraggio ambientale.

L'esigenza di sviluppare un metodo per la determinazione di marker chimici è legata alla necessità di valutare l'esposizione professionale a specifiche tipologie di legno in relazione alla differente attività tossica.

MATERIALI E METODI

3.1 Il metodo analitico per la determinazione dei traccianti del teak

3.1.1 Materiali

Tutte le analisi condotte per la messa a punto del metodo e per la determinazione dei tre traccianti nelle polveri di teak sono state effettuate mediante cromatografia liquida ad alta prestazione associata a un rivelatore *Diode Array* (HPLC-DAD). Lo strumento utilizzato è quindi equipaggiato con i seguenti moduli:

- pompa “Perkin-Elmer *Series 200 pump*”,
- autocampionatore “Perkin-Elmer *Series 200 autosampler*”,
- rivelatore “Perkin-Elmer *Series 200 Diode Array Detector*”,
- il software utilizzato per la gestione dello strumento e per quella dei cromatogrammi è “*Turbochrome Navigator*”, fornito dalla Perkin-Elmer.

La fase stazionaria utilizzata è una colonna di tipo C_{18} *Utrasphere-5 ODS*, 250 mm x 46 mm della HICHROM.

Gli standard del 2-MEA, del LP e i solventi utilizzati (le cui caratteristiche sono riportate nelle tabelle 3.1 e 3.2) sono stati forniti dalla ditta Sigma-Aldrich Italia; lo standard del DLP invece, è stato sintetizzato (con purezza superiore al 95%) dalla SHIRE *Tanaud International*, Dipartimento di Chimica, Università delle Indie Occidentali – Mona (Jamaica). L’acqua utilizzata per la fase mobile è stata purificata mediante il sistema “*Ultra Pure Water System Millipore (MilliQ plus)*”.

Tabella 3.1: standard utilizzati.

Composto	n° CAS	Purezza	PM (gr/mol)	p.f. (K)	p.e. (K)	Frase R/ S
LP	84-79-7	98%	242,27	414,15	-	R 20/21/22 36/37/38 S 26-36
DLP	-	≥ 95%	226,27	-	-	-
2-MEA	84-54-8	≥ 95%	222,24	443,15	509,15	S 22-24/25

Tabella 3.2: solventi utilizzati.

Composto	n° CAS	PM (gr/mol)	ρ (gr/cm³)	p.f. (K)	p.e. (K)	Frase R/ S
acido acetico A.C.S. <i>Reagent</i>	64-19-7	60,05	1,06	289,3	390,15	R 10-35 S 26-36/37/39-45
acetonitrile per HPLC	75-05-8	41,05	0,782	228,15	354,15	R 11-20/21/22-36 S 16-36/37
Metanolo Per HPLC	67-56-1	32,04	0,791	175,15	337,85	R11-23/24/25/39 S 7-16-36/37-45

3.1.2 Prove di solubilità

Per determinare la fase mobile migliore sono state eseguite delle prove di solubilità dei singoli traccianti in tre solventi (H₂O, acetonitrile, metanolo) e in una miscela H₂O/ACN:50/50. Per queste prove sono state preparate, per ogni singolo tracciante, 4 soluzioni di concentrazione pari a 1g/l, che sono state poste sotto agitazione per 20 minuti al multi mixer (VETROTECNICA, mod. 717) e in seguito ne è stata valutata la solubilità.

3.1.3 Determinazione della lunghezza d'onda di lettura

Al fine di determinare la lunghezza d'onda di massimo assorbimento sono stati registrati gli spettri UV-Vis dei singoli traccianti.

Per l'acquisizione degli spettri sono stati usati lo spettrometro monoraggio Beckmann DU 530 "*Life Science UV/Vis Spectrophotometer*" e le cuvette in quarzo fornite dalla "Hellma", con cammino ottico pari a 10 mm. Gli spettri di assorbimento sono stati registrati nell'intervallo tra 220 e 450 nm.

Le soluzioni standard analizzate sono state le seguenti:

- 5mg/l in acetonitrile, per il deossilapacolo e il lapacolo,
- 1mg/l in acetonitrile, per il 2-metilantrachinone.

3.1.4 Determinazione dei tempi di ritenzione

La determinazione dei tempi di ritenzione, t_R , dei singoli traccianti, è fondamentale per l'identificazione di ognuno di essi all'interno della stessa matrice. I tempi di ritenzione sono stati individuati analizzando soluzioni standard di 2-MEA e di DLP in metanolo e quindi una soluzione standard in metanolo contenente tutti e tre i traccianti; la lunghezza di ogni singola corsa è stata impostata a 40 minuti.

3.1.5 Parametri strumentali

Una volta determinati tutti questi parametri sono state identificate le condizioni operative migliori dell'HPLC-DAD. In particolare:

- fase mobile: ACN/acqua acidulata (0,25% di acido acetico in acqua): 50/50,
- metodo di eluizione isocratico,
- flusso di eluizione pari a 1 ml/min,
- tempo della singola analisi impostato a 40 minuti,
- volume iniettato uguale a 20 μ l,
- lunghezza d'onda di lettura del DAD impostata a 254 nm.

3.1.6 Preparazione delle soluzioni standard

Sono state preparate tre soluzioni madre, una per tracciante, sciogliendo 5 mg di composto in 10 ml di acetonitrile, ottenendo così delle soluzioni a concentrazione di 0,5 g/l.

Da queste è stata preparata una soluzione di 5 mg/l, contenente i tre traccianti operando come segue: 50 μ l di soluzione madre di ogni singolo standard (3x50 μ l = 150 μ l) sono stati aggiunti a 4850 μ l di metanolo. Grazie a diluizioni successive in metanolo, si sono ottenute le seguenti otto soluzioni standard: 1 μ g/l, 5 μ g/l, 10 μ g/l, 50 μ g/l, 100 μ g/l, 500 μ g/l, 1 mg/l, 2 mg/l.

In seguito 2 ml di ogni soluzione sono stati posti in provette di vetro da 12 ml e portati a secchezza in centrifuga aspirata sotto vuoto (UNIVAPO 100H equipaggiata con vano di aspirazione refrigerato UNIJET II, della StepBio); i residui solidi sono stati ripresi con 100 μ l di acetonitrile. Le nuove soluzioni sono state poste in un bagno di ultrasuoni (LCD *Series* della NewProject) per 5 minuti a 40 Hz; trascorso questo lasso di tempo le soluzioni sono state caricate in vials di vetro equipaggiate con riduttori di volume da 100 μ l in vetro (SUPELCO) e analizzate in HPLC-DAD.

3.1.7 Validazione del metodo analitico

Per la validazione del metodo analitico sono state seguite le norme dell'*International Conference on Harmonization* (ICH, 1996). A tal fine sono state valutate la separazione cromatografica, la linearità, la precisione, i limiti di rilevabilità e di quantificazione.

3.2 Determinazione del contenuto di LP, 2-MEA e DLP nelle polveri di legno

Al fine di valutare la presenza di LP, 2-MEA e DLP unicamente nel teak sono state analizzate, oltre al teak, 12 specie diverse di legno appartenenti alla famiglia delle Angiosperme. In particolare sono state analizzate le polveri ottenute da seguenti tipi di legno: *purpleheart*, *padauk* africano, wengè, bocotè, iroko, mogano, *canarywood*, faggio, betulla, quercia bianca, frassino e noce scuro.

I blocchi di legno sono stati macinati in polvere fine con un piccola sega elettrica. I campioni di polvere così ottenuti (100 mg ciascuna) sono stati estratti con 3 ml di metanolo e mantenuti per 30 minuti sotto agitazione al multimixer; la miscela è stata centrifugata a 3000 rpm per 15 minuti (la centrifuga usata è fornita dalla ALC, mod. 4235A), e il surnatante analizzato mediante HPLC.

Sono state inoltre analizzate le polveri ottenute da legno teak di diversa provenienza al fine di determinare la percentuale dei traccianti contenuta. In particolare sono state analizzate le polveri dei seguenti tipi di teak: teak Burma commercializzato negli Stati Uniti, teak dell'Indonesia, teak della Colombia e teak Burma commercializzato in Italia.

3.3 Valutazione dell'esposizione a polveri aerodisperse

Al fine di valutare l'esposizione a polveri di legno teak è stata condotta una campagna di monitoraggio all'interno di un'azienda, con sede in Friuli, produttrice di arredi navali per i quali il teak viene utilizzato quasi esclusivamente in relazione alle sue proprietà di durabilità e resistenza all'acqua.

Sono stati effettuati 13 campionamenti di polveri aerodisperse; in particolare sono stati effettuati 7 campionamenti in posizione fissa, ponendo i sistemi di campionamento a 1,6 metri dal piano di calpestio, figura 3.1, e 6 campionamenti personali collegando i selettori ad altezza delle vie respiratorie degli addetti, figura 3.2.



Figura 3.1: esempio di campionamento in posizione fissa.



Figura 3.2: esempio di campionamento personale.

Il sistema di campionamento utilizzato è stato un selettore IOM collegato ad una pompa aspirante.

Il selettore IOM (figura 3.3) è stato sviluppato da Vincent e Mark dell'*Institute of Occupational Medicine* scozzese e al momento è il dispositivo maggiormente utilizzato in Europa nonché quello maggiormente testato. Inoltre è l'unico selettore ad essere stato certificato per il campionamento delle particelle aerodisperse.



Figura 3.3: selettore IOM.

In figura 3.4 sono riportati gli elementi costitutivi del campionario IOM.

Le sue peculiarità sono:

- praticità d'uso,
- sistema di alloggiamento del filtro che consente di effettuare la pesata anche sulle polveri depositate sulla parete del supporto,
- utilizzabile con un flusso di aspirazione pari a circa 2 l/min,
- foro di ingresso delle polveri di 15 mm di diametro, sensibile all'ingresso di particelle di diametro superiore ai 100 μm .

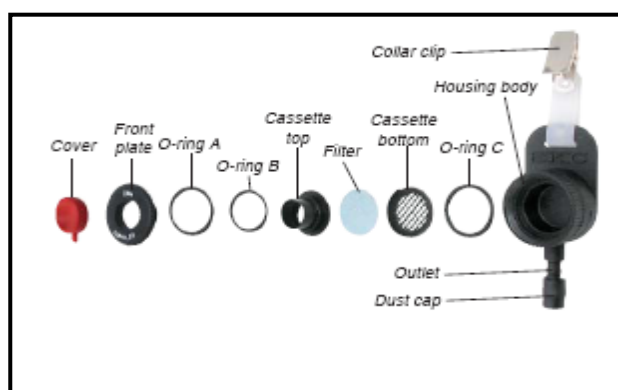


Figura 3.4: elementi costitutivi del campionario IOM.

Per il campionamento tutti i selettori IOM sono stati equipaggiati con filtri in PVC (diametro pari a 25 mm e porosità uguale a 0,8 μm) che sono stati pesati prima e dopo il campionamento previo condizionamento in camera di esposizione a $20\pm 1^\circ\text{C}$ e $50\pm 5\%$ di umidità relativa, per almeno 48 ore (cappa ACQUARIA CLIMATIC). Le pesate sono state effettuate a distanza di 5 ore fino al raggiungimento di un peso costante in due pesate successive (da 3 a 5 pesate per filtro). La bilancia impiegata per le pesate è una MICRO MC-5 della Sartorius, con un limite di sensibilità di 0,001 mg.



Figura 3.5: esempio di pompa aspirante SKC.

Il flusso di aspirazione delle pompe (figura 3.5) usate sia per i campionamenti personali che in posizione fissa, è stato tarato ad un valore di 2 l/min, flusso di aspirazione necessario per il corretto funzionamento del selettore IOM; la taratura dei flussi d'aspirazione è stata effettuata tramite un BIOS *Dry Cal Meter* (figura 3.6).



Figura 3.6: sistema di taratura del flusso aspirante delle pompe.

3.4 Determinazione del contenuto di LP, 2-MEA e DLP nella polvere depositata sui filtri

Dopo le pesate, i filtri sono stati trasferiti in provette in PP ed eluiti con 3 ml di metanolo; le provette sono state mantenute sotto agitazione per 30 minuti al multi mixer e, in seguito, centrifugate a 3000 RPM per 20 minuti. 2 ml della soluzione surnatante sono stati portati a secchezza, ripresi con 100 μ l di ACN ed analizzati nelle stesse condizioni riportate in precedenza.

RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Prove di solubilità

Il metanolo e l'ACN sono risultati i solventi migliori per il 2-MEA, il LP e il DLP, pertanto il primo solvente è stato usato per la procedura di estrazione, mentre il secondo è stato usato per riprendere i residui portati a secco, in quanto presente anche nella fase mobile.

4.2 Determinazione della lunghezza d'onda di lettura

Gli spettri di assorbimento dei tre traccianti sono riportati nelle figure 4.1, 4.2, 4.3.

Le principali bande di assorbimento osservate sono dovute alle strutture molecolari comuni in tutte le molecole indagate (Morton e Earlam, 1941), in particolare si osserva:

- un picco di assorbimento più intenso intorno a 250 nm, dovuto all'anello benzenico;
- un picco di assorbimento nel intervallo tra 260 e 280 nm, attribuito al sistema chinonico;
- un picco di assorbimento di intensità minore rispetto ai precedenti intorno a 330 nm, dovuto all'anello benzenico.

Tutti gli assorbimenti elencati sono da attribuire a transizioni π - π^* (Yoshida e Takabayashi, 1968; Mohd e Zahid, 2005).

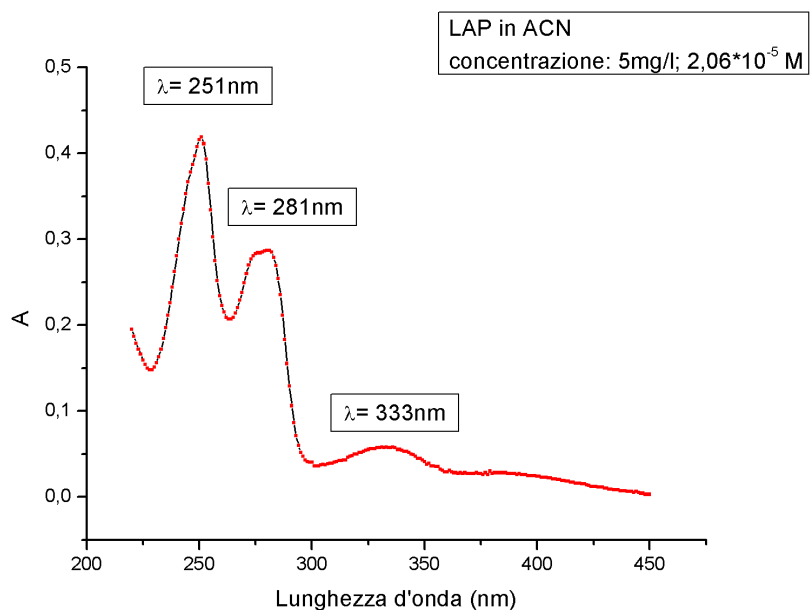


Figura 4.1: spettro UV-Vis, soluzione LP in acetonitrile, 5 mg/l.

Nello spettro di figura 4.1 si osservano tre picchi piuttosto ben risolti a 251 nm, 281 nm e 333 nm, di cui il più intenso è il primo, ascrivibile a una transizione π - π^* del sistema benzenico.

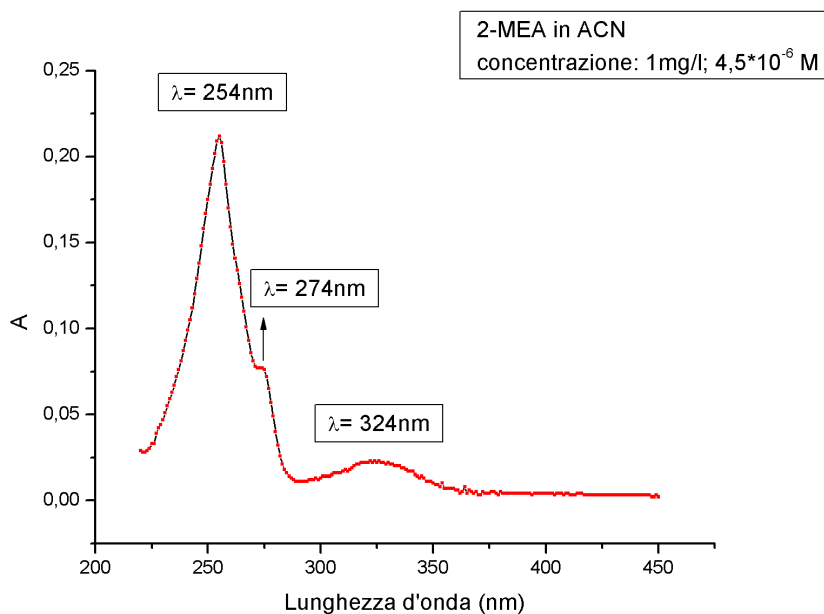


Figura 4.2: spettro UV-Vis, soluzione 2-MEA in acetonitrile, 1 mg/l.

Nello spettro di figura 4.2 si osservano due picchi ben risolti a 254 nm e 324 nm e un terzo picco non risolto a 274 nm. Come per il LP il picco più significativo corrisponde a una transizione π - π^* del sistema benzenico.

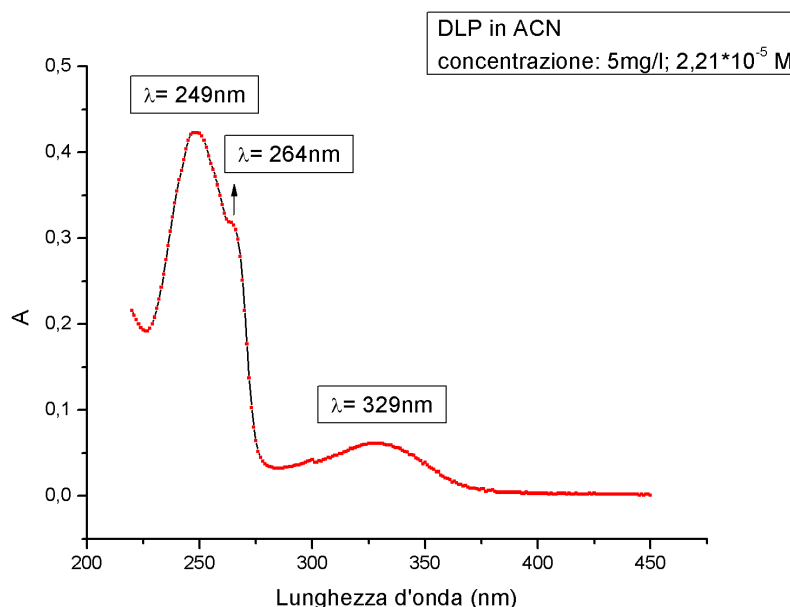


Figura 4.3: spettro UV-Vis, soluzione DLP in acetonitrile, 5 mg/l.

Nello spettro di figura 4.3 si osservano due picchi ben risolti a 249 nm e 329 nm e un terzo picco non risolto a 264 nm. Come per gli altri due traccianti il picco a intensità maggiore corrisponde a una transizione π - π^* del sistema benzenico.

Dal confronto degli spettri del LP e DLP, figura 4.4, si può notare come la banda associata alla componente chinonica della molecola cambi in funzione della presenza del gruppo ossidrilico; nello specifico si osserva un *red shift*, da 264 nm a 281 nm, e un aumento di risoluzione del picco, come riportato in letteratura (Morton e Earlam, 1941).

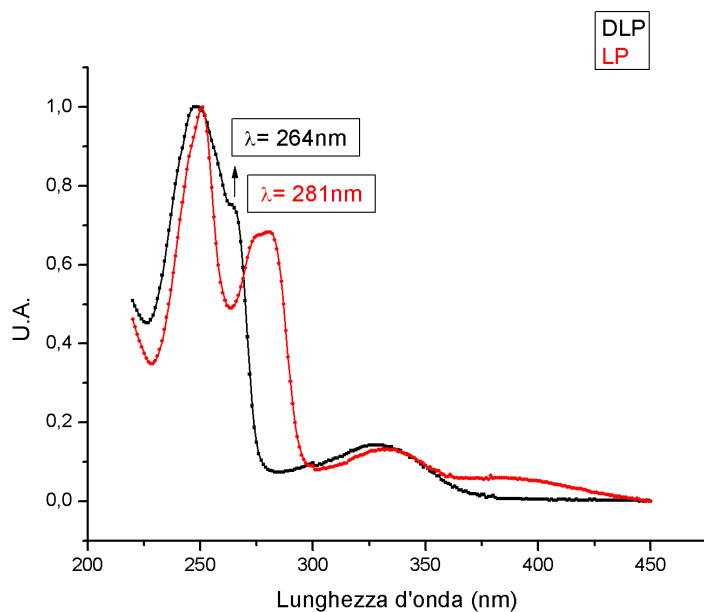


Figura 4.4: confronto tra gli spettri UV-Vis del LP e del DLP.

In seguito alla registrazione degli spettri di assorbimento UV-Vis è stato deciso di utilizzare la lunghezza d'onda di 254 nm come valore di lettura del DAD.

4.3 Determinazione dei tempi di ritenzione

Nelle condizioni strumentali del metodo utilizzato i t_R dei traccianti sono risultati rispettivamente pari a 19,49 minuti per il LP, 22,68 minuti per il 2-MEA e 34,91 minuti per il DLP.

Nelle figure 4.5 e 4.6 sono riportati i cromatogrammi relativi alle singole soluzioni di 2-MEA e DLP e in figura 4.7 il cromatogramma di una soluzione contenente tutti e tre i traccianti, in cui si evidenzia il t_R del LP.

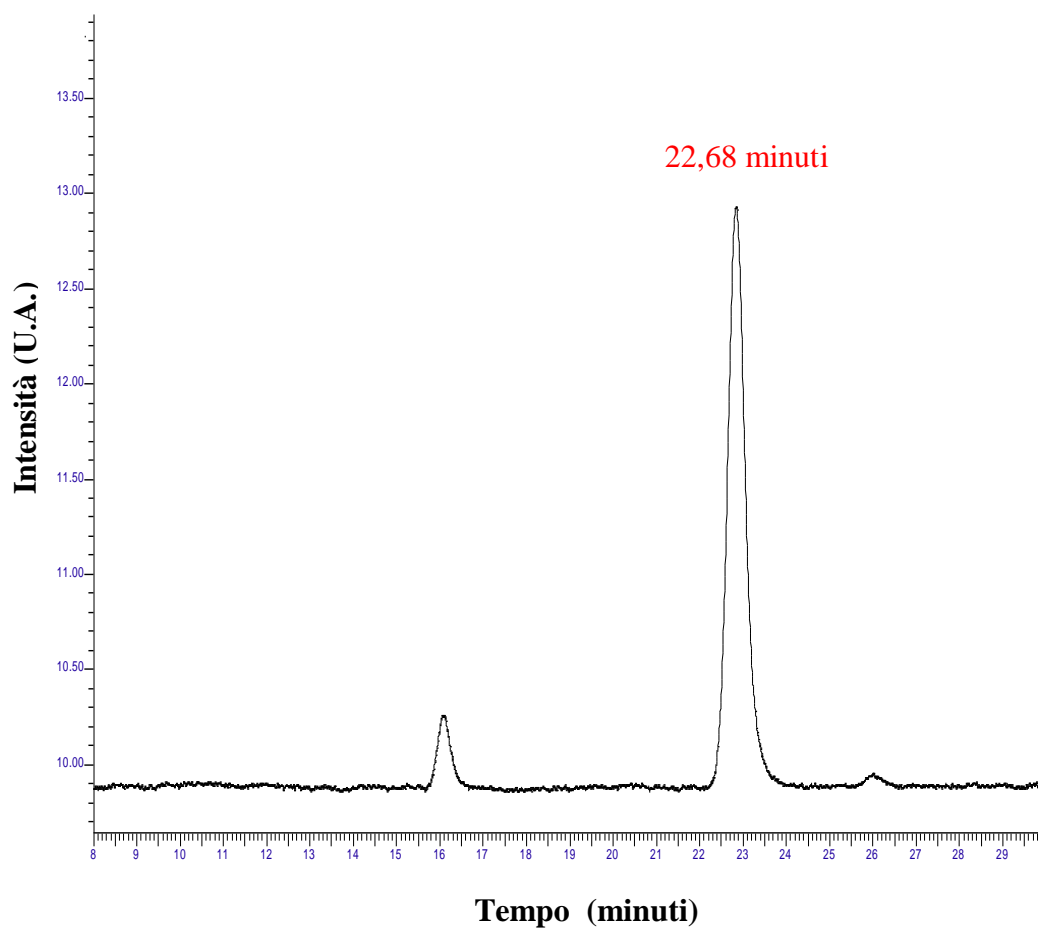


Figura 4.5: cromatogramma soluzione standard di 2-MEA in metanolo, 500 µg/l.

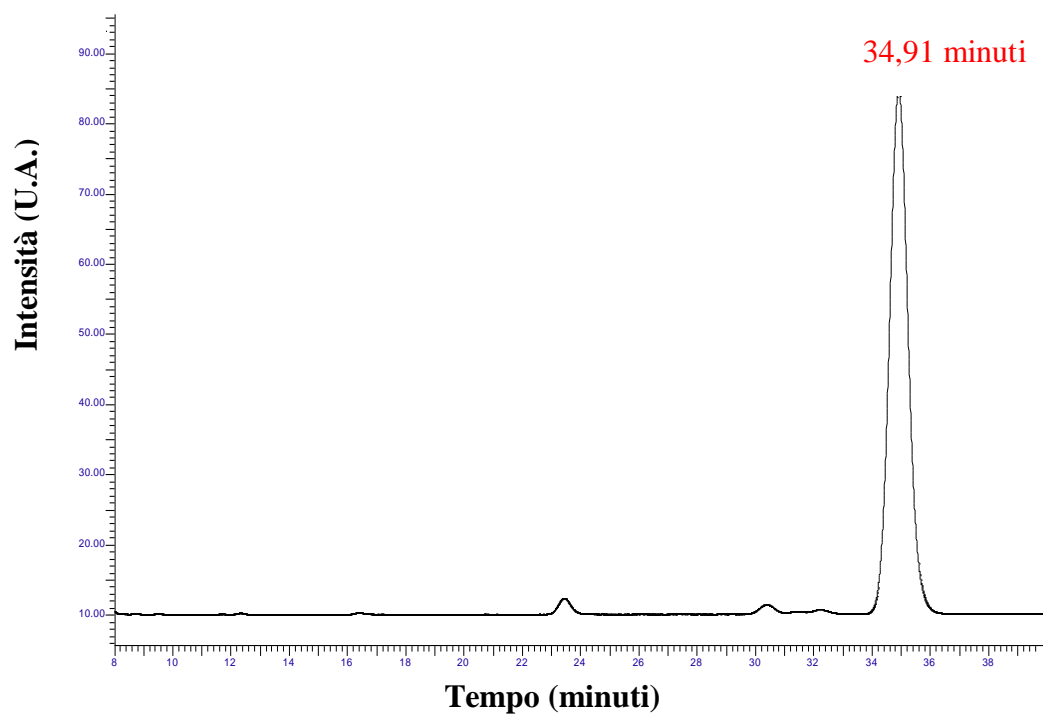


Figura 4.6: cromatogramma soluzione standard di DLP in metanolo, 50µg/l.

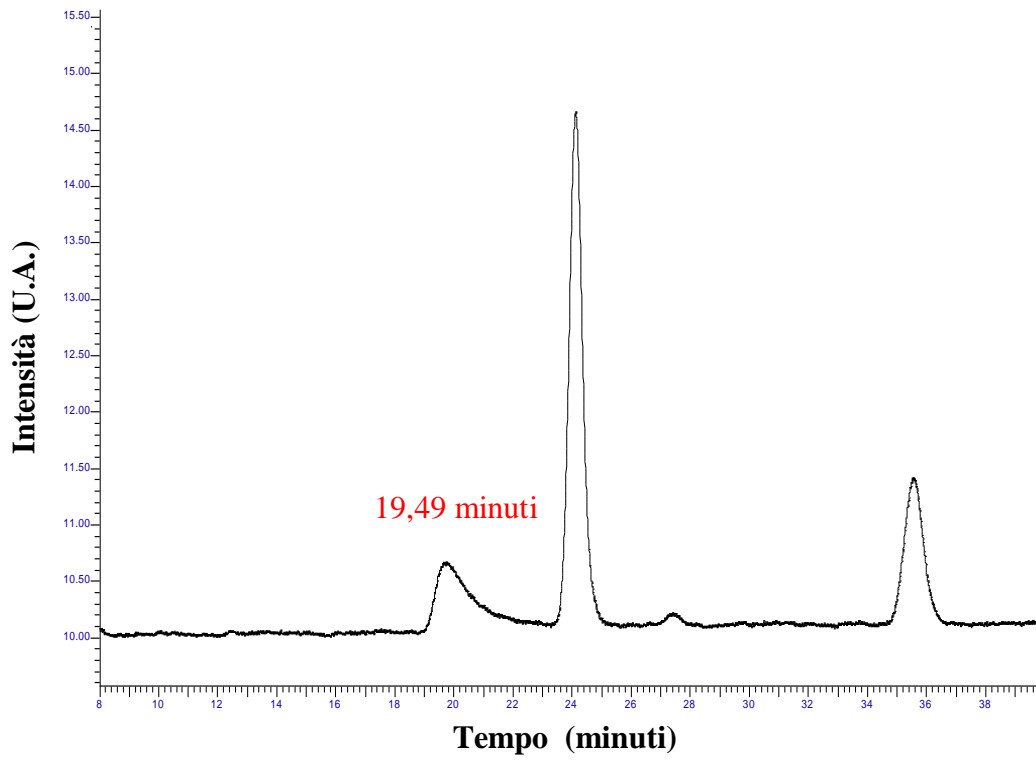


Figura 4.7: cromatogramma soluzione standard in metanolo contenente i tre traccianti, 1mg/l.

4.4 Validazione del metodo analitico

4.4.1 Separazione cromatografica

I picchi relativi ai tre traccianti analizzati sono risultati ben separati all'interno della singola corsa cromatografica; inoltre non è stata riscontrata la presenza di altri picchi interferenti relativi ad altre sostanze presenti nella polvere di teak. In figura 4.8 è riportato un cromatogramma relativo a un campione reale.

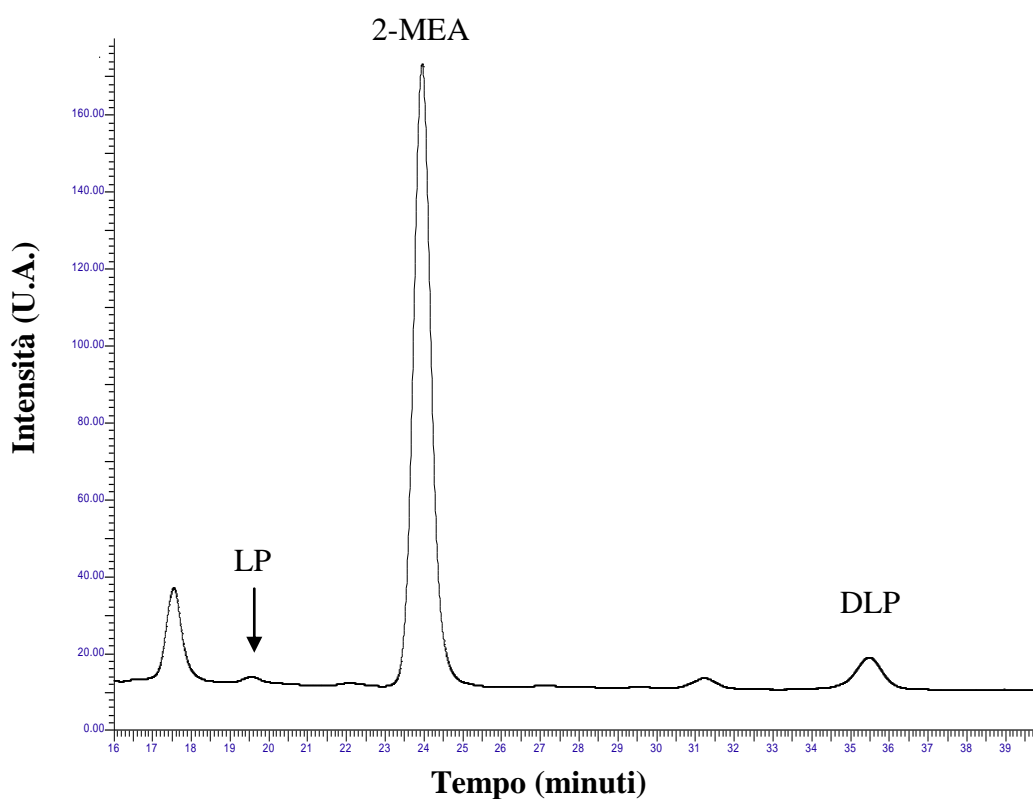


Figura 4.8: separazione cromatografica all'interno di un cromatogramma relativo a un filtro analizzato.

4.4.2 Linearità

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

Per tutti e tre i traccianti il metodo si è dimostrato lineare nell'intervallo di concentrazioni esaminato, figure 4.9, 4.10 e 4.11.

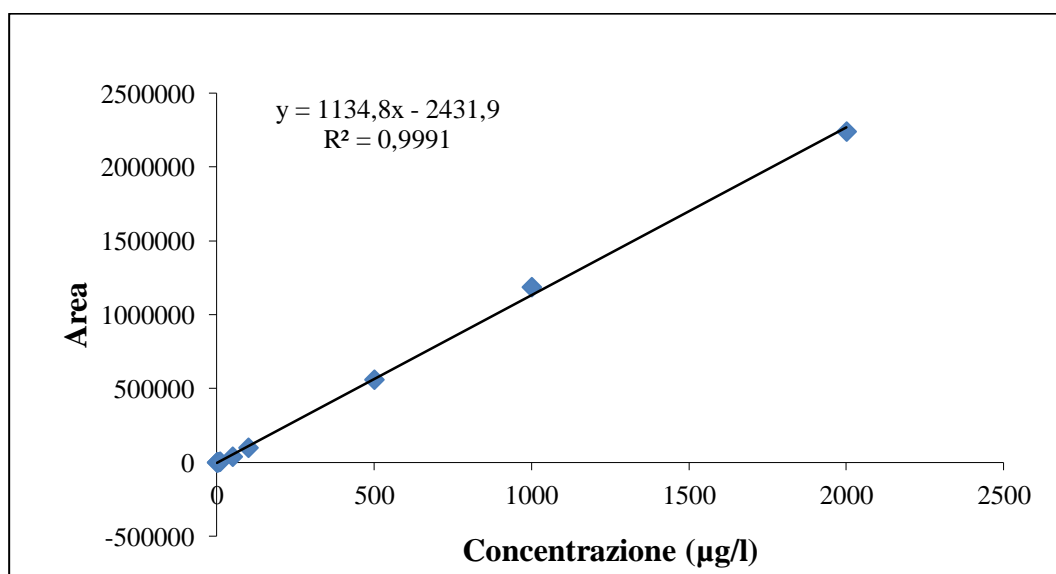


Figura 4.9: retta di calibrazione del LP nel range di concentrazione 5-2000 µg/l.

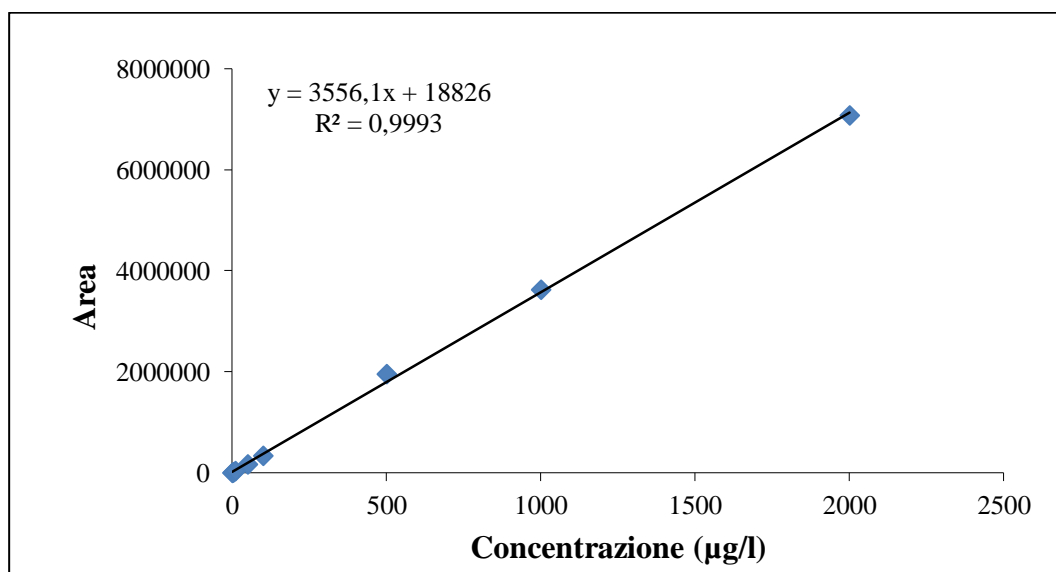


Figura 4.10: retta di calibrazione del 2-MEA nel range di concentrazione 1-2000 µg/l.

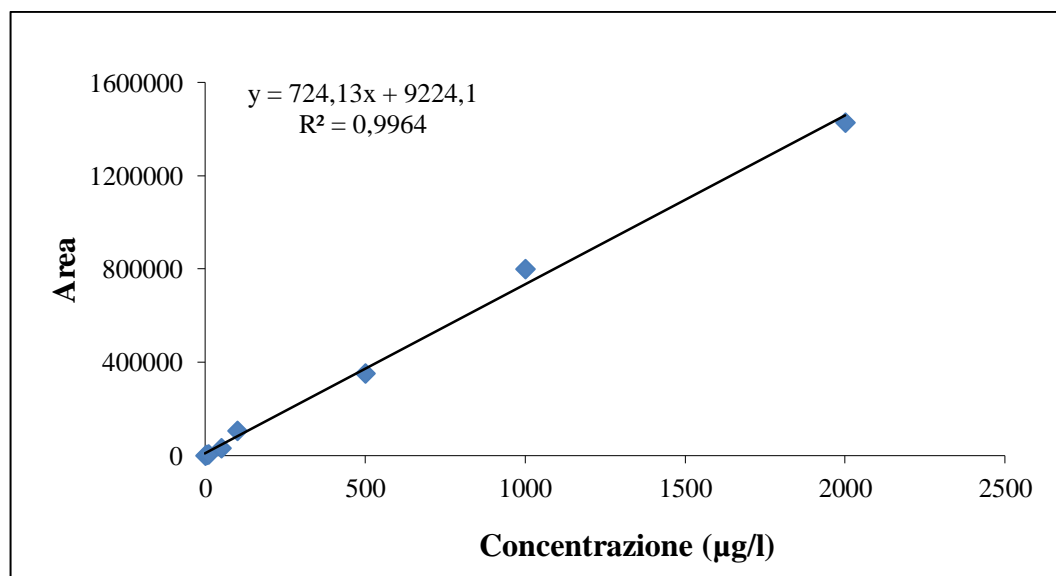


Figura 4.11: retta di calibrazione del DLP nel range di concentrazione 5-2000 µg/l.

4.4.3 Precisione

La precisione del metodo, espressa come coefficiente di variazione percentuale, per il LP è risultata, in termini di riproducibilità, compresa tra 4,2% e 16,7% e in termini di ripetibilità compresa tra 1,4% e 12,9% nel range tra 5 µg/l e 100 µg/l.

Per il 2-MEA è risultata, in termini di riproducibilità, compresa tra 3,4% e 16,1% e in termini di ripetibilità, compresa tra 0,5% e 16,4% nel range tra 1 µg/l e 100 µg/l.

Infine per il DLP la precisione è risultata compresa, in termini di riproducibilità, tra 3,2% e 7,6% e in termini di ripetibilità, compresa tra 0,8% e 6,4% nel range tra 5µg/l e 100 µg/l.

4.4.4 Limite di rilevabilità (LR)

Per LR si intende 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 = la pendenza della retta di calibrazione.

Il LR è risultato pari a 1 μ g/l per il LP e il DLP e 0,2 μ g/l per il 2-MEA.

4.4.5 Limite di quantificazione (LQ)

Per LQ si intende 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:

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

dove σ = deviazione standard del bianco,

S = la pendenza della retta di calibrazione.

Il LQ è risultato pari a 3 μ g/l per il LP e il DLP e 0,6 μ g/l per il 2-MEA.

Tali limiti sono stati considerati accettabili ai fini dell'applicazione del metodo per l'analisi di campioni reali raccolti in ambiente di lavoro.

4.5 Determinazione del contenuto di LP, 2-MEA e DLP nelle polveri di legno

L'estratto metanolico dalle polveri relative ai 13 differenti tipi di legno è stato analizzato secondo il metodo descritto in precedenza. LP, 2-MEA e DLP non sono stati rinvenuti in nessun estratto.

Tali sostanze sono state rinvenute esclusivamente nelle polveri di teak. In tabella 4.1 sono riportate le percentuali dei tre traccianti rinvenute per ogni tipologia di teak analizzata.

Tabella 4.1: percentuali di traccianti presenti in differenti tipi di teak.

Qualità di teak	% LP	% 2-MEA	% DLP
Teak Burma USA	0.012	0.647	0.497
Teak Colombia	0.265	0.152	0.068
Teak Indonesia	0.006	0.133	0.038
Teak Burma Italia	0.006	0.167	0.030

Dai dati riportati in tabella si evince come le percentuali di 2-MEA, LP e DLP varino in relazione al tipo di legno teak utilizzato; in particolare le percentuali di 2-MEA e DLP sono risultate decisamente più elevate nel legno teak commercializzato negli Stati Uniti, mentre la percentuale maggiore di LP è stata rinvenuta nel teak proveniente dalle piantagioni colombiane, probabilmente in relazione alla minore età degli alberi.

4.6 Valutazione dell'esposizione a polveri aerodisperse

In tabella 4.2, sono riportati i livelli di polveri di legno aerodisperse riscontrati con i campionatori in posizione fissa all'interno dell'azienda. La tabella riporta inoltre, le varie posizioni di campionamento. Si sottolinea che, durante la giornata di campionamento, nelle postazioni oggetto di valutazione è stato utilizzato esclusivamente teak. Dai dati riportati si evince come i livelli di polverosità siano tutti inferiori al valore limite di esposizione di 5 mg/m³ e sostanzialmente molto

simili eccetto il valore relativo allo spogliatoio, dove il campionamento è stato effettuato al fine di determinare il livello di fondo (bianco).

Tabella 4.2: livelli ambientali di polveri di teak.

Zona del campionamento	Concentrazione polveri (mg/m³)
Stanza spogliatoio	0,04
Zona levigatura, lato destro verso centro ambiente	2,46
Zona levigatura, lato sinistro verso centro ambiente	1,89
Zona macchina da taglio	2,11

In tabella 4.3 sono riportati, al contrario, i livelli di polverosità rinvenuti con i campionamenti personali suddivisi per emiterno di lavoro, da cui è stata poi estrapolata l'esposizione giornaliera per l'intero turno lavorativo (8 h).

I livelli riscontrati sono risultati in due casi maggiori rispetto a quanto evidenziato con i campionamenti in posizione fissa; uno di questi è anche superiore al valore limite di esposizione. Risultati molto simili sono stati riscontrati anche in altri studi con livelli medi e mediani dei campionamenti personali circa doppi rispetto a quanto riscontrato in posizione fissa, con il superamento del limite nel 5% - 10% dei casi. Il maggior inquinamento rilevato nei campionamenti personali è probabilmente dovuto alla maggiore vicinanza dei selettori alla fonte di esposizione (Carrieri *et al.*, 2007). Se prendiamo invece, in considerazione il valore limite più restrittivo di 1 mg/m³ proposto dall'ACGIH o dal NIOSH, la situazione risulta ancora più critica: tale limite risulta superato in tutti i campionamenti (fissi e personali). A tal proposito si deve ricordare che le Linee Guida della Regione Veneto utilizzano il valore di 1 mg/m³ come livello discriminante per definire la periodicità dei controlli sanitari, suddividendo i lavoratori in due categorie: ad esposizione medio alta (compresa tra 1 e 5 mg/m³) con periodicità delle visite annuale e ad esposizione bassa (<1 mg/m³) con visite biennali.

Tabella 4.3: esposizione personale a polveri di legno.

Addetto	Turno	Concentrazione polveri (mg/m³)	Esposizione totale-8h (mg/m³)
1	Mattina	3,81	3,41
	Pomeriggio	3,03	
2	Mattina	1,38	1,50
	Pomeriggio	1,60	
3	Mattina	3,33	5,20
	Pomeriggio	7,03	

4.7 Determinazione del contenuto di LP, 2-MEA e DLP nella polvere depositata sui filtri

In tabella 4.4 sono riportati i valori medi, mediani e range dei tre traccianti, espressi in µg, riscontrati nelle polveri di teak depositate sui filtri. I tre traccianti sono stati rilevati in tutti i filtri eccetto quello relativo allo spogliatoio.

Tabella 4.4: media, mediana e range della quantità di traccianti depositata sui filtri.

	Media (µg)	Mediana (µg)	Range (µg)
LP	0,07	0,05	0,03 – 0,16
2-MEA	1,63	1,37	0,93 – 2,40
DLP	0,34	0,25	0,09 – 1,02

Mettendo in correlazione le quantità dei traccianti in funzione dei mg di polvere analizzata si evidenzia una eccellente correlazione statisticamente significativa ($p < 0,0001$) tra il 2-MEA e la polvere di teak (figura 4.13). Correlazioni statisticamente significative, ma con coefficienti di correlazione lineare più bassi sono state ottenute anche per gli altri due traccianti: r pari a 0,84 e r pari a 0,81 per LP e DLP, rispettivamente (figure 4.12 e 4.14).

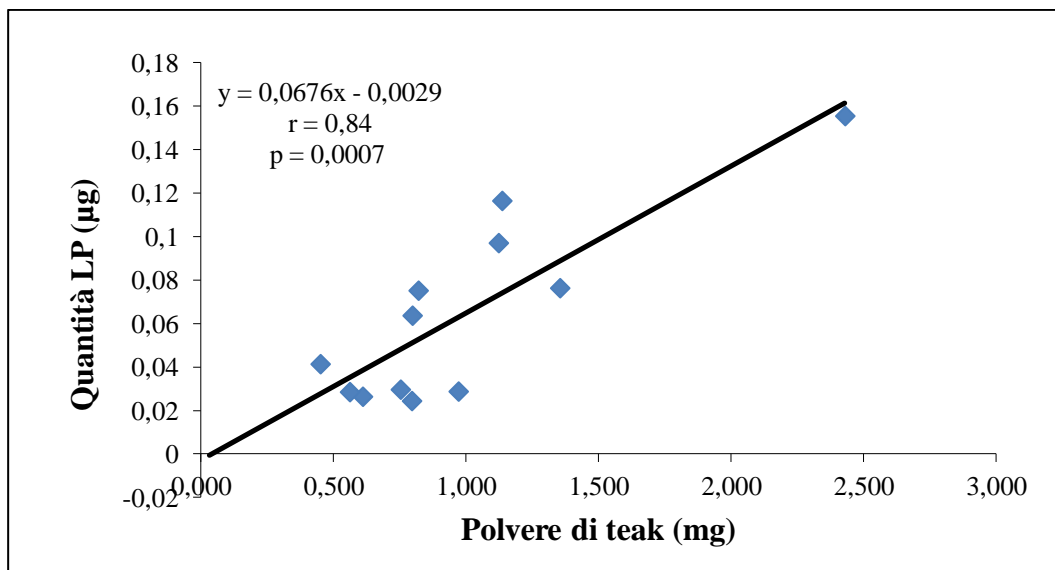


Figura 4.12: correlazione tra la quantità di LP e la polvere di teak rinvenuta sui filtri.

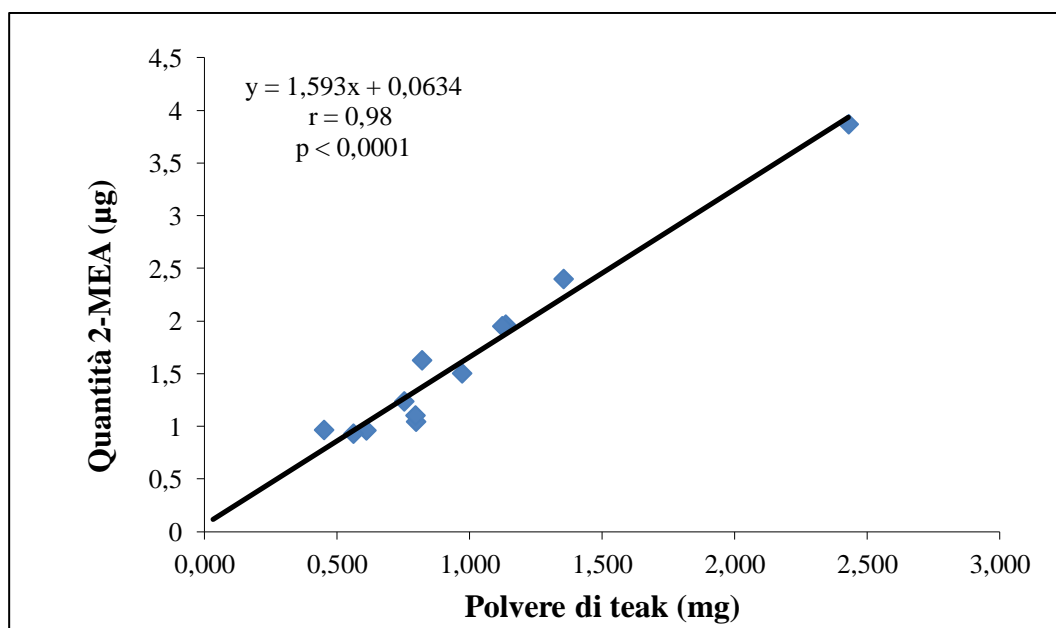


Figura 4.13: correlazione tra la quantità di 2-MEA e la polvere di teak rinvenuta sui filtri.

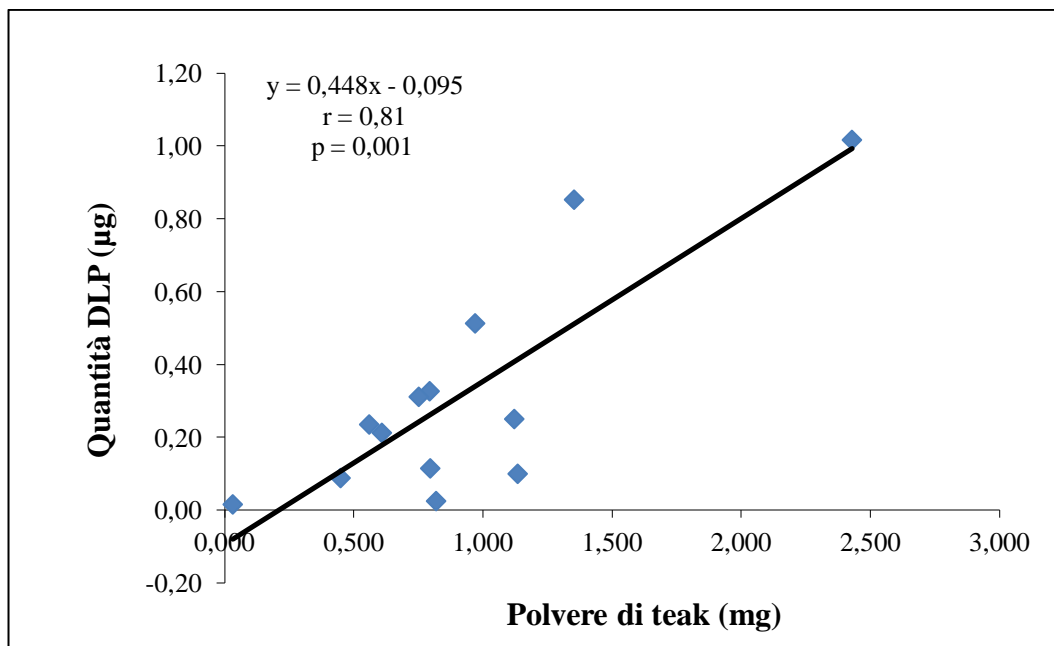


Figura 4.14: correlazione tra la quantità di DLP e la polvere di teak rinvenuta sui filtri.

Il coefficiente di correlazione migliora, come anche la significatività statistica ($r=0,87$ e $p=0,0002$), se si correla la somma di LP e DLP in funzione dei mg di polvere depositata sul filtro (figura 4.15).

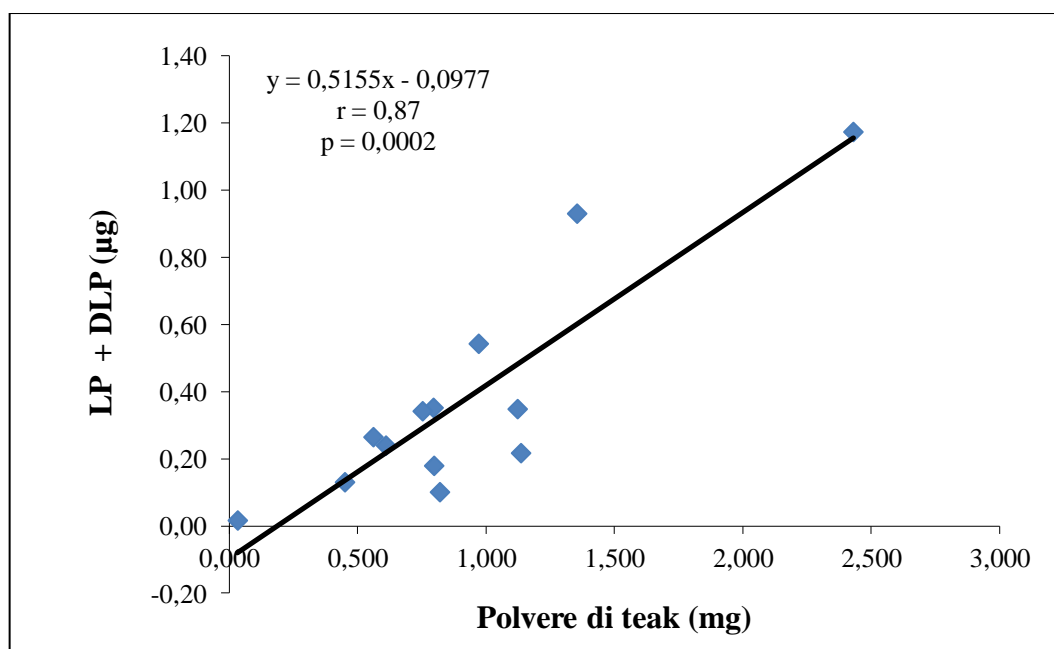


Figura 4.15: correlazione tra le quantità di LP e DLP e la polvere di teak rinvenuta sui filtri.

Tali risultati evidenziano come tutti e tre i traccianti, ed in particolar modo il 2-MEA e la somma di LP e DLP, possono essere utilizzati quali marker chimici nella valutazione dell'esposizione a polveri di teak.

CONCLUSIONI

La classificazione delle polveri di legno *hard* tra i cancerogeni e la conseguente adozione di valori limite ha stimolato la ricerca di sistemi di monitoraggio per la valutazione dell'esposizione professionale a tali polveri. La classificazione, in base alla cancerogenicità, dei tipi di legno *hard* ha reso poi interessante l'individuazione di traccianti specifici e lo sviluppo di metodi analitici idonei, al fine di valutare l'esposizione professionale considerando che nella maggior parte degli ambienti di lavoro vengono usati più tipi di legno.

Nel presente lavoro di tesi è stato messo a punto e validato, in termini di separazione cromatografica, linearità, precisione, limiti di rilevabilità e quantificazione, un metodo analitico in HPLC-DAD per la determinazione di LP, 2-MEA e DLP, sostanze da utilizzare come traccianti per le polveri di teak. Tali composti sono risultati assenti nelle polveri di altri 12 tipi di legno analizzati e quindi sono- promettenti traccianti chimici per polveri di teak.

La validità di LP, 2-MEA e DLP quali indicatori di esposizione a polvere di teak è stata verificata effettuando uno studio presso un'azienda di arredi navali in cui veniva utilizzato esclusivamente teak di provenienza Sud-Est asiatica; attraverso tecniche di monitoraggio ambientale si sono determinati i livelli di polverosità ambientale sia in posizione fissa che personale. Le polveri raccolte sui filtri sono state quindi analizzate al fine di determinare la quantità dei tre traccianti.

I risultati ottenuti con il monitoraggio ambientale in posizione fissa hanno evidenziato un'esposizione mediamente contenuta, con livelli di polverosità inferiori al limite legale italiano pari a 5 mg/m^3 . L'esposizione personale è risultata, al contrario, più elevata con superamento, in un caso, del valore limite italiano e, in tutti i casi, di quello più restrittivo del NIOSH e dell'ACGIH, 1 mg/m^3 .

I tre traccianti studiati hanno dimostrato una buona validità come indicatori dell'esposizione a polveri di teak. Le correlazioni con i livelli di polverosità ambientale e personale sono risultate tutte statisticamente significative con un fattore di correlazione elevato, in particolare per il 2-MEA.

In conclusione il metodo analitico per la determinazione dei traccianti del teak si è rivelato semplice e sufficientemente sensibile da rilevare quantità inferiori al

µg e quindi utile per la valutazione routinaria dell'esposizione professionale a polveri di teak.

Il dosaggio dei tre traccianti può essere proposto per quantificare l'esposizione specifica a polveri di teak nei casi di esposizione a polveri di legno miste. La determinazione del contenuto di tali indicatori nelle polveri inalabili, associata alla misura delle concentrazioni ambientali delle stesse, permette una stima più completa ed accurata della valutazione dell'esposizione agli agenti cancerogeni nella lavorazione del legno.

I tre composti potrebbero essere utili anche come marker biologici dell'esposizione a polveri teak, attraverso il loro dosaggio nel condensato dell'aria esalata. Durante lo studio in azienda sono stati infatti raccolti i condensati di tre lavoratori sui quali sono stati dosati i tre traccianti. Il 2-MEA presente nel condensato è risultato correlato con l'esposizione delle giornata, ma tali risultati devono essere confermati con ulteriori sperimentazioni.

BIBLIOGRAFIA

1. Aalto-Korte K., Valimaa J., Enricks-Eckermann M.L., Jolanki R.; Allergic contact dermatitis from salicyl alcohol and salicylaldehyde in aspen bark (*Populus tremula*); *Contact Dermatitis* 2005, 52, 93-95.
2. ACGIH (2012) TLVs and BEIs based on the documentation of the threshold limit values for chemical substances and physical agents & biological exposure indices. Cincinnati, Ohio: American Conference of Governmental Industrial Hygienists.
3. Apostoli P., Gelmi M.; Fattori di rischio e rischi correlati con l'esposizione occupazionale a polveri di legno; *G. Ig. Ind.* 2002, 27, 79-93.
4. Bartolucci G.B., Carrieri M., Scapellato M.L., Pasqua di Bisceglie A., Livieri M., Baldan P., Sanavio C., Zanetti E., Gori G. Elaborato finale della ricerca finanziata dall'ISPESL "Le polveri di legno e la ricerca dei traccianti chimici" (B1-5/DIL/05) i traccianti chimici nella valutazione dell'esposizione professionale a polveri di legno, 2005.
5. Bianco M.A, Savolainen H.; Woodworkers' exposure to tannins; *J. Appl. Toxicol.* 1994, 14, 293-295.
6. Bianco M.A., Savolainen H.; Phenolic acids as indicators of wood tannins; *Sci. Tota. Environ.* 1997, 203, 79-82.
7. Block J.B., Serpick A.A., Miller W., Wiernik P.H.; Early clinical studies with lapachol (NSC-11905); *Cancer Chemother. Rep* 2 1974, 4, 27-28.
8. Bonfiglio E., Carrieri M., Scapellato M.L., Maccà I., Bartolucci G.B., Gori G., Valutazione dell'efficienza di tre tipi di selettori per la frazione inalabile

nel campionamento delle polveri di legno; *Atti dell' 11° Convegno Nazionale AIDII*, Corvara 21-23 marzo 2005.

9. Carrieri M., Gori G., Bregamo L., Giuliani C., Maccà I., Pasqua di Bisceglie A., Salamon F., Sanavio C., Scapellato M.L., Bartolucci B.G.; Inquinamento da polveri di legno in diverse fasi lavorative e settori produttivi del Veneto; *Atti del 25° Congresso Nazionale AIDII*, Ancona 20-22 giugno 2007.
10. Chan Y.M.; Mechanism of occupational asthma due to western red cedar; *Am. J. Ind. Med.* 1994; 25, 13-18.
11. Council Directive 1999/38/EC of 29 April 1999, amending Directive 90/394/EEC on the protection of workers from risks related to exposure to carcinogens at work and extending it to mutagens. Official J Eur Commun. Vol. L138, 66–9. Available at: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1999:138:0066:0069:EN:PDF>.
12. Dahlqvist M., Johard U., Alexandersson R., Bergströme B., Ekholm U., Eklund A., Milosevich B., Tornling G., Ulfvarson U.; Lung function and precipitating antibodies in low exposed wood trimmers in Sweden; *Am. J. Ind. Med.* 1992, 21, 549-559.
13. Demers A.P., Kogevinas M., Boffetta P., Leclerc A., Luce D., Gerin M., Battista B., Belli S., Bolm-Audorf U., Brinton L.A.; Wood dust and sino-nasal cancer: pooled reanalysis of twelve case-control studies; *Am. J. Ind. Med.* 1995, 28, 151-166.
14. Demers A.P., Teschke K., CIH, Kennedy S.M.; What to do about soft wood? A review of respiratory effects and recommendations regarding exposure limits; *Am. J. Ind. Med.* 1997, 31, 385-398.
15. DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft) – List of MAK and BAT Values 2004. Report No. 40. Wiley - VCH Verlag GmbH & Co. 2004.

16. D.Lg. 66/2000; Attuazione delle Direttive 97/42/CE e 1999/38/CE; 25 febbraio 2000.
17. D. Lg 81/2008; Attuazione dell'art.1 della legge 3 agosto 2007, n.123, in materia di tutela della salute e della sicurezza nei luoghi di lavoro; 9 aprile 2008.
18. Douwes J., McLean D., Slater T., Pearce N.; Asthma and other respiratory symptoms in New Zealand pine processing sawmill workers; *Am. J. Ind. Med.* 2001, 38, 608-615.
19. Edman K., Löfstedt H., Berg P., Eriksson K., Axelsson S., Bryngelsson I., Fedeli C.; Exposure assessment to α - and β -pinene, 3-carene and wood dust in industrial production of wood pellets; *Ann. Occup. Hyg.* 2003, 47, 3, 219-226.
20. Enarson D.A., Chan Yeung M.; Characterization of health effects of wood dust exposures; *Am. J. Ind. Med.* 1990, 17, 33-38. 1990.
21. Eriksson K., Levin J-O.; Identification of *cis*- and *trans*-verbenol in human urine after occupational exposure to terpenes; *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 1990, 92, 379-383.
22. Eriksson K. A., Levin J. O., Sandström T., Lindstöm-Espeling K., Lindén G., Stjernberg N. L.; Terpene exposure and respiratory effects among workers in Swedish joinery shops; *Scand. J. Work. Environ. Health.* 1997, 23, 114-120.
23. Estlander T., Jolanki R., Kanerva L.; Occupational allergic contact dermatitis from obeche and teak dusts; *Contact. Dermatitis.* 1999, 41, 164.
24. Estlander T., Jolanki R., Alanko K., Kanerva L.; Occupational allergic contact dermatitis caused by wood dust; *Contact. Dermatitis.* 2001, 44, 213-217.

-
25. Evans W.; A note on teak dermatitis; *Br. J. Dermatol.* 1905, 17, 447-50.
26. Falk-Filipsson A.; Short term inhalation exposure to turpentine: toxicokinetics and acute effects in men; *Occup. Environ. Med.* 1996, 53, 100-105.
27. Foà V., Cavallo D.M., Scapellato M.L., Bartolucci G.B.; Effetti sanitari dell'esposizione a polveri di legno; *Atti del 25° Congresso Nazionale AIDII*, Ancona 20-22 giugno 2007.
28. Fransman W., Mclean D., Douwes J., Demers P.A., Leung V., Pearce N.; Respiratory symptoms and occupational exposures in New Zealand plywood mill workers; *Ann. occup. Hyg.* 2003, 47, 4, 287-295.
29. Giannini A., Govoni C., Gaiani W., Minelli M., De Pasquale F., Mattioli M., Tabarelli A., Fornasari C; Il "progetto legno" nella provincia di Modena, assistenza alle imprese per lo svolgimento degli adempimenti riguardanti la valutazione dell'esposizione alle polveri di legno duro. Risch 2003 la valutazione del rischio dell'esposizione ad agenti chimici pericolosi; 293-328. Modena, 17 ottobre 2003.
30. Goel R.K., Pathak N.K., Biswas M., Pandey V.B., Sanyal A.K; Effect of lapachol, a naphthaquinone isolated from *Tectona Grandis*, on experimental peptic ulcer and gastric secretion; *J. Pharm. Pharmacol.* 1987, 39, 138-40.
31. Goldsmith D.F., Shy C.M.; Respiratory health effects from occupational exposure to wood dust; *Scand. J. Work. Environ. Health* 1988, 14, 1-15.
32. Gonçalo S., Sousa I., Moreno A., Laitão A.; Occupational dermatitis from *salix Viminalis*; *Contact Dermatitis* 1986, 14, 188-189.
33. Gori G., Bonfiglio E., Carrieri M., Sturaro A., Bartolucci G.B.; Le polveri di legno duro e il rischio chimico; *Atti del 11° Convegno Nazionale AIDII*, Corvara 21-23 marzo 2005.

34. Gori G., Carrieri M., Bartolucci G.B.; I traccianti chimici nella valutazione dell'esposizione a polveri di legno; *Atti del 25° Congresso Nazionale AIDII*, Ancona 20-22 giugno 2007.
35. Gori G., Carrieri M., Scapellato M.L., Parvoli G., Ferrara D., Rella R., Sturaro A., Bartolucci G.B.; 2-Methylantraquinone as a marker of occupational exposure to teak wood dust in boatyards; *Ann. Occup. Hyg.* 2009, 53, 1, 27–32.
36. Granström K.; Underestimation of terpene exposure in the nordic wood industry; *J. Occup. Environ. Med.* 2010, 7, 144-151.
37. Harper M., Muller B.S., Bartolucci A.; Determining particle size distributions in the inhalable size range for wood dust collected by air samplers; *J. Environ. Monit.* 2002, 4, 642-647.
38. Harper M., Zabeed Akbar M., Andrew M.E.; Comparison of wood-dust aerosol size-distribution collected by air samplers; *J. Environ. Monit.* 2004, 6, 18-22.
39. Hedenstierna G., Alexandersson R., Wimander K., Rosén G.; Exposure to terpens: effect of pulmonary function; *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 1983, 22, 182-90.
40. IARC Working Group (1995): "Wood dust and formaldehyde. iarc monographs on the evaluation of the carcinogenic risks of chemicals to humans, vol 62." Lyon, France, International Agency for Research on Cancer.
41. International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceutical for human use (ICH); Validation of analytical procedures: text and methodology, 1996.

-
42. Isidorov V., Vinogorova V., Rafalowski K.; Gas chromatography determination fo extractable compounds composition and emission rate of volatile terpenes from larch needle litter; *J. Atm. Chem.* 2005; 50, 263-278.
43. Jolanki R., Suhonen R., Enricks-Eckermann M.L., Estlander T., Lanerva L.; Contact allergy to salicyl alcohol in aspen bark; *Contact Dermatitis* 1997, 37, 304-305.
44. Kirby K. S.; Induction of tumors by tannin extracts; *Br. J. Cancer* 1960, 14, 147-150.
45. Krogh H.K.; Contact eczema caused by true teak (*Tectona Grandis*) an epidemiological investigation in a furniture factory; *Brit. J. Industr. Med.* 1962, 19, 42.
46. Linee Guida per l'applicazione del Titolo VII del D.Lg. 626/94, come codificato dal D.Lg. 66/2000, alle attività comportanti esposizione a polveri di legno. Regione Veneto: www.reteambiente.it/ra/normativa/sicurezza/pdf/LineeGuidaRegVeneto.pdf.
47. Machbet R.; Carcinoma of the nasal cavity and accessory sinuses in wood workers; *J. Laringol. Otol.* 1965, 75, 592-612.
48. Malo J-L., Gartier A., Boulet L-P.; Occupational asthma in sawmills of eastern Canada and United States; *J. Allerg Clin. Immunol.* 1986, 78, 3, 392-396.
49. Mammela P., Savolainen H., Lindroos L., Kangas J., Vartiainen T.; Analysis of oak tannins by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry; *J. Chromatography A* 2000, 891, 75-83.
50. Mammela P, Tuomainen A, Savolainen H., Kangas J., Vartiainen T., Lindroos L.; Determination of gallic acid in wood dust as an indicator of oak content; *J. Environ. Monit.* 2001, 3, 509-511.

51. Mohd S.K., Zahid H.K.; Ab initio and semiempirical study of structure and electronic spectra of hydroxy substituted naphthoquinone; *Spectrochimica Acta Part A* 2005, 777-790.
52. Morton R.A., Earlam W.T.; Absorption spectra in relation to quinone: 1:4-naphthoquinone, anthraquinone and their derivatives; *J. Chem. Soc.* 1941, 159.
53. Muller K., Andreas Sellmer A., Wiegrebe W.; Potential antipsoriatic agents: lapachol compounds as potent inhibitors of hcat cell growth.; *J. Nat. Prod.* 1999, 62, 1134.
54. NIOSH (National Institute of Occupational Safety and Health) Cincinnati, OH, 2000.
55. Paterno E.; Ricerche sull'acido lapacico.; *Gazz. Chim. Ital.* 1882, 12, 337-392.
56. Poon G. K., Vigushin D., Griggs L. J., Rowlands M. G., Coombes R. C., Jarman M.; Identification and characterization of limonene metabolites in patients of advanced cancer by liquid chromatography/mass spectrometry; *Drug. Metab. Dispos.* 1996, 24, 5, 565-571.
57. Portillo A., Vila R., Freixa B., Adzet T., Canigual S.; Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine; *J. Ethnopharmacol.* 2001, 76, 93-98.
58. Rosenberg C., Liukkonen T., Kallas-Tarpila T., Ruonakangas A., Riikka R., Nurminen M., Welling I., Jäppinen P.; Monoterpene and wood dust exposures: work-related symptoms among Finnish sawmill workers; *Am. J. Med.* 2002, 41, 38-53.
59. Rudman P, Da Costa E.W.B., Gay F.J.; Relationship of tectoquinone to durability in *Tectona Grandis*; *Nature* 1958, 181, 721-722.

-
60. Ruzicka L.; The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds; *Experientia* 1953, 110, 357-367.
61. Sandner F., Fornara J., Dott W., Hollender J.; Sensitive biomonitoring of monoterpene exposure by gas chromatographic-mass spectrometric measurement of hydroxyl terpenes in urine; *J. Chromatogr. B* 2002, 780, 225-230.
62. Schmalle H. W., Hausen B. M.: The structure of deoxylapachol, the contact allergen of *Tectona grandis*; *L. Naturwissenschaften* 1984, 71, 581-582.
63. Schulz K.H, Dietrichs H.H.; Quinone as a sensitizing component of rio palisander (*Dalbergia Nigra*) and cocobolo (*Dalbergia Retusa*) wood; *Allerg. Asthma* 1962, 8, 125–31.
64. Schulz K.H., Allergic contact dermatitis caused by tropical woods; *Dermatol. Int.* 1965, 4, 121–124.
65. Schulz K.H., Hausen B.M.; Kontaktekzeme durch pflanzen und hölzer; *Hautarzt* 1975, 26, 92–96.
66. SCOEL (Scientific Committee for Occupational Exposure Limits); Recommendation from the SCOEL: risk assessment for wood dust; 2003.
67. Singh P., Jain S., Bhargava S.; A 1,4-anthraquinone derivative from *Tectona Grandis*; *Phytochemistry* 1989, 28, 1258–1259.
68. Sumthong P., Damveld R.A., Choi Y.H., Arentshorst M., Ram A.F., Van den Hondel C.A., Verpoorte R.; Activity of quinines from teak (*Tectona grandis*) on fungal cell wall stress; *Planta Med.* 2006, 72, 943-9.

69. Tabona M., Chan Yeung M., Enarson D., MacLean L., Dorken E., Schulzer M.; Host factors affecting longitudinal decline in lung spirometry among grain elevator workers; *Chest*. 1984, 84, 782-786.
70. UNI-CEN Norma Europea EN 481; Definizione delle frazioni granulometriche per la misurazione delle particelle aerodisperse, 1994.
71. Vaughan T.L., Davis S.; Wood dust exposure and squamous cell cancer of the upper respiratory tract; *Am. J. Epidemiol.* 1991, 133, 560-564.
72. Wang M.Y., Yang L., Tu Y.Y.; Studies on the chemical constituents from stem of *Chirita Longgangensis* var. Homgyao; *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2006, 31, 307–308.
73. Welling I., Mielo T., Räisänen J., Hyvärinen M., Liukkonen T., Nurkka T., Lonka P., Rosenberg C., Peltonen Y., Svedberg U., Paavo Jäppinen P.; characterization and control of terpene emissions in finnish sawmills; *AIHA J.* 2001, 62, 172–175.
74. Yoshida Z., Takabayashi F.; Electronic spectra of mono-substituted anthraquinones and solvent effects; *Tetrahedron* 1968, 24, 913-943.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare il Prof. Andrea Trevisan per la disponibilità e la fiducia dimostratemi, la Dott.ssa Gabriella Favaro per l'attenzione e per gli utili consigli che mi ha dato. Grazie anche al Dott. Giampaolo Gori per la possibilità che mi ha concesso e per l'interesse dimostratomi durante questi mesi.

Un sentito grazie a tutto il personale di Igiene Industriale: alla Dott.ssa Mariella Carrieri per la professionalità e il tempo prezioso concessomi, alla Dott.ssa Fabiola Salamon e a Federica per il loro insostituibile e indispensabile aiuto; grazie per avermi fatto sentire a mio agio fin dai primi giorni!

Vorrei ringraziare i miei genitori, mia sorella Anna, mio fratello Alessandro: il loro affetto e il loro incoraggiamento mi hanno permesso "di riveder le stelle".

Grazie a Pietro e Davide che mi hanno accompagnato per tutta l'avventura universitaria; grazie anche ai miei amici fraterni Aldo, Pietro, lontani ma sempre vicini, e a Paolo, l'ultimo dei padovani.

Grazie infine a Valeria per avermi riportato alla felicità.