

G.B. Bartolucci¹, P. Bavazzano², A. Perico², L. Perbellini³

Valori di riferimento di solventi e metaboliti in campioni biologici

¹ Dipartimento di Medicina Ambientale e Sanità Pubblica - Università degli Studi di Padova

² Laboratorio di Sanità Pubblica - Tossicologia Occupazionale, Dipartimento della Prevenzione - ASL di Firenze

³ Servizio di Medicina del lavoro, Dipartimento di Medicina e Sanità Pubblica - Università degli Studi di Verona

RIASSUNTO. Viene presentata una rassegna dei dati di letteratura riferiti ai valori di riferimento degli indicatori biologici di esposizione ai principali solventi organici occupazionali e ambientali. Alcune ricerche sono state realizzate nell'ambito delle attività della Società Italiana Valori di Riferimento (SIVR). La maggioranza delle esperienze riportano i risultati ottenuti su gruppi di controllo per la verifica delle esposizioni occupazionali. Sono prese in considerazione, quali indicatori, le concentrazioni ematiche ed urinarie dei solventi immodificati e le concentrazioni di alcuni dei loro principali metaboliti. In particolare si riportano dati riguardanti il benzene, il toluene, lo xilene, il n-esano, il cicloesano, il tricloroetilene, il percloroetilene, il metanolo, l'acetone, la N,N-dimetilformammide ed il solfuro di carbonio. Nella discussione vengono anche analizzati i possibili fattori di confondimento nell'interpretazione dei risultati.

Parole chiave: valori di riferimento, solventi, metaboliti, fattori di confondimento.

ABSTRACT. *www.gimle.fsm.it - This article presents a review of reference values for organic solvent biomarkers. Some of these results were obtained in the research activities of the Italian Society Reference Values (SIVR). Most experiences show data obtained from control groups during occupational exposures assessment investigations. We considered only data related to the following biomarkers: unmodified solvents in blood and urine, their main urinary metabolites. The reference values of the following solvents are reported: benzene, toluene, xylene, n-hexane, cyclohexane, trichloroethylene, perchloroethylene, methanol, acetone, N,N-dimethylformamide, carbon disulphide. In the text also the influence of some confounding factors is discussed.*

Key words: *reference values, solvents, metabolites, confounding factors.*

Introduzione

Per inquadrare i valori di riferimento (VR) dei solventi e metaboliti in campioni biologici, è opportuno richiamare alcuni cenni sulla loro cinetica nell'organismo umano. Successivamente saranno analizzati e discussi i risultati delle principali ricerche finalizzate alla definizione dei VR o, comunque, i risultati delle indagini che hanno considerato il dosaggio di solventi e metaboliti nella popolazione generale.

I solventi sono stati scelti sulla base della qualità e quantità delle ricerche presenti in letteratura e laddove più approfondita è l'esperienza dei gruppi di lavoro in ambito della Società Italiana Valori di Riferimento (SIVR).

I solventi organici vengono assorbiti prevalentemente attraverso le vie aeree, mentre l'assorbimento percutaneo può essere anche considerevole per alcuni solventi, quali ad esempio N,N-dimetilformammide, metanolo, metiletilchetone, 2-metossietanolo. L'assorbimento polmonare è direttamente proporzionale alla concentrazione ambientale del solvente, alla sua ritenzione polmonare, alla ventilazione alveolare e al tempo di esposizione.

L'individuazione degli indicatori biologici di esposizione a solventi organici deriva dall'esame delle tre principali vie di escrezione: polmonare, urinaria e quella associata ai processi metabolici.

Per alcuni solventi l'escrezione polmonare rappresenta la via di elezione attraverso la quale l'organismo umano elimina queste sostanze. I solventi organici caratterizzati da una buona solubilità nel sangue e che vengono facilmente metabolizzati, sono escreti per via polmonare in quantità alquanto limitate, mentre quelli con scarsa affinità per il sangue e i tessuti e che sono scarsamente metabolizzati presentano un'escrezione polmonare molto elevata: essa può raggiungere anche il 90% della dose assorbita.

L'escrezione urinaria del sovente immodificato, pur modesta in termini quantitativi (nella maggior parte dei casi inferiore all'1% della dose assorbita), risulta molto utile nel monitoraggio biologico delle esposizioni occupazionali. La presenza di solventi nelle urine dipende da tre principali fattori: la concentrazione del solvente nel sangue arterioso (in equilibrio con quella dell'aria ambiente e alveolare), il flusso ematico ai reni, il coefficiente di ripartizione urina/sangue del solvente.

Al momento è ancora limitato l'uso sul campo dell'escrezione urinaria di solventi immodificati quali indicatori di esposizione. Ciò è motivato dalla particolare attenzione richiesta per la raccolta dei campioni di urina, dalle difficoltà analitiche, dalla cinetica d'escrezione.

La via più importante e più utilizzata nel monitoraggio biologico delle esposizioni è quella dell'escrezione urinaria dei metaboliti dei solventi. Ciascun metabolita presenta aspetti cinetici caratteristici. Nella Tabella I è riportata l'emivita urinaria dei metaboliti di alcuni solventi. I prodotti metabolici con emivita urinaria inferiore a 2-4 ore sono sintetizzati ed escreti molto rapidamente, per cui il reperimento di concentrazioni urinarie elevate è segno di un assorbimento recente del solvente. In questo caso la raccolta del campione deve essere effettuata in maniera rigorosa al termine dell'effettiva esposizione. Dopo qualche ora verranno infatti rilevate concentrazioni simili a quelle ritrovabili nella popolazione generale. Un discreto numero di metaboliti presenta un'emivita urinaria 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, questo gruppo di metaboliti tenderà ad un pur modesto accumulo nel corso della settimana lavorativa. I metaboliti con emivita superiore a 15 ore sono pochi [cicloesandiolo, N-acetil-S-(N-metilcarbamoil)cisteina]; le loro concentrazioni urinarie aumentano durante la settimana lavorativa ed elevata è la loro tendenza all'accumulo nell'organismo.

Data l'importanza dell'utilizzo e delle caratteristiche tossicologiche intrinseche, questa rassegna prende avvio dai dati sui biomarcatori di esposizione a quattro idrocarburi aromatici (benzene, toluene, xileni e stirene), per continuare con gli indicatori di esposizione a idrocarburi alifatici (*n*-esano), aliciclici (cicloesano), idrocarburi alogenati (tricloroetilene e percloroetilene), alcoli (metanolo), chetoni (acetone), ammidi (N,N-dimetilformammide), solfuro di carbonio.

Dal momento che sono pochi gli studi che hanno valutato la concentrazione dei solventi organici nell'aria alveolare della popolazione generale, in questa rassegna non verranno presi in considerazione i dati relativi a questo biomarcatore di esposizione.

I Valori di Riferimento dei principali solventi

Il **benzene** è un inquinante ubiquitario, presente anche all'interno delle comuni abitazioni spesso in concentrazioni maggiori di quelle rilevabili all'esterno. La sua concentrazione nei carburanti per autoveicoli e le conseguenti emissioni con i gas di scarico sono tra le principali cause d'inquinamento dell'atmosfera urbana, mentre la maggiore sorgente *indoor* è il fumo di tabacco.

Minoia e coll. (38) hanno rilevato in 165 bambini in età scolare in tre piccole città del centro-nord Italia un'esposizione personale mediana *outdoor* e *indoor* prossima a 8 µg/m³ (95° percentile: 20 µg/m³). All'interno delle abitazioni in sei grandi città europee (52) è stata trovata una concentrazione mediana di benzene di 1,99 µg/m³ (95° percentile: 10,5 µg/m³), mentre all'esterno la mediana era di 2,25 µg/m³ (95° percentile: 9,5 µg/m³). Nella città di Birmingham (34) l'esposizione *indoor* a benzene (media 15,7 µg/m³) è risultata superiore al valore misurato dalle centraline atmosferiche situate in zone periferiche della città (media 3,8 µg/m³).

Le concentrazioni ematiche di benzene in soggetti non professionalmente esposti sono state invece determinate in varie situazioni. Brugnone e coll. (13) hanno confermato le differenze tra fumatori (mediana 291 ng/l, intervallo 7-2241 ng/l) e non fumatori (163 ng/l, intervallo 7-924 ng/l) e segnalato che nei soggetti non fumatori che vivono in città la benzenemia è significativamente maggiore (mediana 180 ng/l) di quella rilevata nei soggetti che vivono in campagna (mediana 140 ng/l). Complessivamente (11, 13), i livelli medi di benzenemia si incrementano in base alla residenza (più alti in città), ma ancor più con l'abitudine al fumo che determina un valore due volte superiore della concentrazione del solvente nel sangue sia negli abitanti delle zone rurali (mediana 209 ng/l, intervallo 7 - 1003 ng/l) che nei residenti in città (mediana 342 ng/l, intervallo 41 - 2241 ng/l).

Le concentrazioni urinarie di benzene sono state finora poco utilizzate per valutare l'esposizione al solvente e quindi ancor più limitate sono le esperienze nei confronti

Tabella I. Emivita urinaria di alcuni metaboliti di solventi

Solvente	Metabolita urinario	Emivita (in ore)	Bibliografia
Benzene	Acido S-fenilmercapturico	7,5-12,8	(54)
Benzene	Acido t,t-muconico	3 - 4	(51 - 68)
Toluene	o-cresolo	3,5	(3 - 66)
Toluene	Acido ippurico	3	(1 - 3)
Xileni	Acidi metilippurici	1	(55)
<i>n</i> -esano	2,5-esandione	11 - 14	(44)
Cicloesano	1,2-cicloesandiolo	17	(39)
Cicloesano	1,4-cicloesandiolo	16,1	(39)
N,N-dimetilformammide	N-metilformammide	4 - 5,1	(27 - 40)
N,N-dimetilformammide	N-acetil-S-(N-metilcarbamoil) cisteina (AMCC)	22 - 28	(16 - 40)
Solfuro di carbonio	Acido tio-tiazolidin-4-carbossilico (TTCA)	2	(56)

della popolazione generale. L'esame della letteratura evidenzia una notevole variabilità dei risultati dovuta alla metodica analitica utilizzata: in particolare l'aumento della temperatura e dell'acidificazione determinano aumenti nella concentrazione urinaria di benzene (45). Ciononostante, i livelli di benzene nei soggetti non fumatori sono, in media, da 2 a 5 volte inferiori a quelli ritrovati nei fumatori. I livelli mediani attesi nella popolazione generale vanno da 113 a 159 ng/l nei non fumatori (32, 38), con un intervallo 16 - 504 ng/l, mentre nei fumatori si può arrivare a 1453 ng/l (32).

Per quanto riguarda i numerosi metaboliti del benzene, si può fare riferimento alle esperienze condotte sull'utilizzo dell'acido *trans,trans*-muconico urinario nella popolazione generale. La maggior parte degli studi non era però finalizzata alla definizione dei valori di riferimento di questo metabolita, bensì a gruppi di controllo usati per evidenziare incrementi nel corso dell'esposizione professionale a benzene. In Tabella II è riportata una sintesi dei VR proposti per questo metabolita. I valori mediani di escrezione del metabolita nei non fumatori sono compresi tra 22 e 65 µg/g creatinina, mentre nei fumatori variano tra 36 e 130 µg/g creatinina. La concentrazione massima rilevata nelle urine di soggetti fumatori e non, è rispettivamente di 625 e 590 µg/g creatinina. Nonostante la non completa specificità di questo indicatore, dovuta alla possibile ingestione di acido sorbico (51), un conservante presente in molti alimenti, la maggior parte della letteratura sull'argomento non ha segnalato significative interferenze nell'utilizzo dell'acido *trans,trans*-muconico per il monitoraggio anche delle basse esposizioni a benzene.

Per quanto riguarda l'acido **S-fenilmercapturico**, pur con le difficoltà che l'analisi di questo metabolita comporta, è disponibile in letteratura un discreto numero di dati sulle concentrazioni urinarie in soggetti non professionalmente esposti a benzene, anche considerando l'influenza dell'abitudine al fumo. La Tabella III sintetizza i dati della letteratura.

A causa delle ridotte concentrazioni di questo metabolita nelle urine (circa 50-100 volte inferiori a quelle dell'acido *trans,trans*-muconico) i primi dati disponibili erano di difficile interpretazione, in quanto inferiori al limite di rilevabilità (LR) dei metodi; in fasi successive il miglioramento di sensibilità e specificità analitica hanno permesso di discriminare i soggetti fumatori dai non fumatori, ma anche di valutare l'andamento del metabolita in presenza di modeste concentrazioni ambientali di benzene.

L'impiego di **toluene** in molti materiali d'uso quotidiano (colle, vernici, lacche, inchiostri ecc.) e il microinquinamento ambientale derivato dall'utilizzo di carburante per autoveicoli comportano che tutta la popolazione sia esposta a modeste concentrazioni di questo solvente organico. Una sorgente *indoor* importante è costituita dal fumo di tabacco: nelle case di fumatori è stata misurata (63) una concentrazione di toluene superiore del 50% rispetto a quelle di soggetti non fumatori. De Bortoli e coll. (17) in 15 abitazioni del nord Italia hanno stimato concentrazioni medie di 128 ng/l a fronte di una concentrazione *outdoor* di 40 ng/l.

Wang e coll. (65) hanno trovato in soggetti non professionalmente esposti concentrazioni ematiche mediane di toluene pari a 418 ng/l (95° percentile: 2863 ng/l), con valori medi superiori nei fumatori (519 ng/l) rispetto ai non

Tabella II. Valori di riferimento proposti per l'acido *trans,trans*-muconico urinario (i dati sono espressi in µg/g creatinina)

Media		Mediana		Intervallo		Bibliografia
Fumatori	Non Fumatori	Fumatori	Non Fumatori	Fumatori	Non Fumatori	
190	140	-	-	60 - 430	10 - 290	(33)
255	114	-	-	93 - 604	1 - 235	(23)
58	37	-	-	-	-	(10)
150	70	110	30	5 - 340	<LR - 480	(37)
109	<23	<23	<23	<LR - 625	<LR - 86	(31)
47	32	36	22	8 - 141	<LR - 147	(15)
-	-	130	65	60 - 390	20 - 590	(57)

LR = limite di rilevabilità

Tabella III. Valori di riferimento per l'acido S-fenilmercapturico urinario (i dati sono espressi in µg/g creatinina)

Media		Mediana		Intervallo		Bibliografia
Fumatori	Non Fumatori	Fumatori	Non Fumatori	Fumatori	Non Fumatori	
3,61	1,99	-	-	-	-	(10)
9,1	4,8	5,8	3,6	<LR - 33,4	1 - 19,6	(37)
7,8*	1,0*	-	-	-	-	(21)
2,8	1,3	0,3	0,3	<LR - 13	<LR - 18	(31)
9,2	1,3	-	-	-	-	(35)

* media geometrica; LR = limite di rilevabilità

fumatori (392 ng/l). I dati di letteratura sono piuttosto omogenei. Dato che il coefficiente di ripartizione sangue/aria del toluene è circa 15, la concentrazione ematica dovrebbe raggiungere un valore circa 15 volte maggiore rispetto all'ambiente. Ciò significa che valori ematici compresi tra 800 e 2000 ng/l esprimerebbero esposizioni comprese tra 50 e 130 µg/m³. Si ritiene che il valore di 3000 ng/l potrebbe essere un attendibile VR della concentrazione ematica di toluene.

La concentrazione urinaria di toluene è stata misurata in poche situazioni ed è rientrata in un intervallo non particolarmente ampio: solo in un numero piuttosto limitato di casi il solvente nelle urine superava il valore di 1000 ng/l. Brugnone e coll. (12) non hanno riscontrato significative variazioni dei livelli urinari in base alla residenza (urbana o rurale).

L'escrezione urinaria di **acido ippurico** è stata studiata in numerose situazioni ed è risultata influenzata dalla dieta, dal ritmo circadiano, dal fumo di tabacco, dal sesso (l'escrezione media nelle donne è maggiore rispetto ai maschi), dal caffè (8). La dieta è certamente uno dei principali fattori di variabilità dell'escrezione di questo metabolita: in cibi quali alcuni tipi di frutta (prugne) e vari alimenti conservati (prodotti ittici o a base di uova) è presente acido benzoico dal quale prende origine anche l'acido ippurico. L'elevata escrezione fisiologica di acido ippurico e la notevole variabilità interindividuale (circa 10 volte) della velocità d'escrezione (in media 42,3 mg/h) sono state confermate anche recentemente (53). I livelli mediani del metabolita sono prossimi generalmente a valori di 300 - 400 mg/g creatinina, con intervalli molto ampi (21 - 2231 mg/g creatinina nei maschi; 46 - 3150 mg/g creatinina nelle femmine) (7).

L'escrezione urinaria di **o-cresolo** è molto bassa: la velocità di eliminazione è di circa 1,08 mg/h (53) e notevole è la variabilità interindividuale confermata sia da Pierce e coll. (53) che da Inoue e coll. (26). Sempre Inoue e coll. (25) hanno ritrovato concentrazioni medie di 38 µg/g creatinina nei maschi e 25 µg/g creatinina nelle femmine. Secondo Nise e coll. (42) il VR per l'o-cresolo può raggiungere un valore massimo di 200 µg/g creatinina ed è influenzato soprattutto dal fumo di tabacco: concentrazioni di 60 µg/g creatinina nei non fumatori, 3 o 4 volte superiori nei fumatori.

Per la popolazione generale l'esposizione a **xileni** è stata rilevata in specifiche condizioni. Nello studio condotto nella città di Birmingham (34), le concentrazioni degli xileni in zone urbane non erano significativamente diverse da quelle rurali. De Bortoli e coll. (17) in 15 abitazioni del nord Italia hanno rilevato una concentrazione media di *p*- e *m*-xilene pari a 89 µg/m³, con valori *outdoor* di 24 µg/m³ (1/3 della concentrazione rilevata era riferibile a *o*-xilene). Minoia e coll. (38) hanno misurato l'esposizione personale a vari inquinanti volatili, tra cui gli xileni, in tre gruppi di bambini residenti in tre città del centro-nord Italia. Le esposizioni medie sono risultate 20,2 - 21,2 - 12,7 µg/m³ e il 95° percentile è risultato rispettivamente di 50,9 - 33,5 e 30,4 µg/m³.

Le concentrazioni ematiche di xileni non paiono essere influenzate dal fumo di tabacco (20). Perbellini e coll. (47) hanno trovato concentrazioni medie di *p*-xilene pari a 501 ng/l (intervallo: 35-1827 ng/l) in donatori di sangue. Tenendo presente un coefficiente di ripartizione sangue/aria di

circa 35 e considerando che l'esposizione a xileni per la popolazione generale è nictemerale, si ritiene che in queste condizioni i livelli ematici siano in condizioni di steady state. Valori ematici medi compresi tra 500 e 900 ng/l sono perciò associabili a livelli ambientali medi di 14 - 26 µg/m³.

La concentrazione di xileni nelle urine di soggetti non professionalmente esposti è stata misurata in poche occasioni. Perbellini e coll. (47) in 48 soggetti di controllo hanno misurato concentrazioni medie di *p*-xilene urinario pari a 212 ng/l (intervallo 10 - 867 ng/l), in media circa la metà della concentrazione nel sangue del solvente. Nello studio di Minoia e coll. (38) la somma delle concentrazioni dei tre isomeri dello xilene è risultata 316 ng/l negli scolari di Treviglio, 112 ng/l in quelli di Poggibonsi e 132 ng/l in quelli di Valenza, con un 95° percentile rispettivamente pari a 909 - 230 e 332 ng/l.

I VR dei metaboliti urinari degli xileni (**acidi metilippurici**) sono stati definiti in poche occasioni. Tra queste è da segnalare l'ampia casistica di soggetti di controllo studiata da Inoue e coll. (24): le concentrazioni urinarie degli acidi metilippurici hanno presentato valori mediani dell'acido *o*-, *m*-, *p*-metilippurico rispettivamente di 8,5 mg/g creatinina, <LR, <LR, con intervalli rispettivamente pari a <LR - 144,9, <LR - 9,6 e <LR - 20,5 mg/g creatinina. Risultati non molto diversi sono stati trovati da Kawai e coll. (29) in 20 soggetti di controllo. Il 95% dei limiti superiori delle concentrazioni erano i seguenti: acido *o*-metilippurico 56,4 mg/g creatinina, acido *m*-metilippurico 19,9 mg/g creatinina, acido *p*-metilippurico 18,8 mg/g creatinina, acidi metilippurici totali 70,3 mg/g creatinina. È verosimile che le "elevate" concentrazioni di acido *o*-metilippurico non siano riferibili al microinquinamento ambientale da *o*-xilene (non molto diverso da quello degli altri xileni), ma piuttosto al metabolismo intermedio di prodotti aromatici fisiologici oppure a un precursore (es. l'acido *o*-toluico) presente in qualche alimento.

Dato il largo impiego dello **stirene** è logico attendersi che la popolazione generale sia esposta a questo solvente. In base allo studio condotto da Phillips e coll. (52) in sei città europee, tra cui Torino, lo stirene è presente in modo diffuso, ma in concentrazioni contenute; l'interno delle abitazioni è mediamente più inquinato dell'ambiente esterno (valori mediani negli interni 0,771 µg/m³, negli esterni 0,296 µg/m³); il fumo non pare contribuire all'inquinamento da stirene.

Brugnone e coll. (14) hanno misurato le concentrazioni di stirene nel sangue di 81 soggetti non professionalmente esposti. Nel 95% dei campioni analizzati è stata rilevata la presenza del solvente. Rispetto ad un microinquinamento ambientale di 5 µg/m³, la concentrazione ematica mediana è stata stimata in 172 ng/l e i livelli nei soggetti fumatori (233 ng/l) erano simili a quelli ritrovati nei non fumatori (211 ng/l). Le concentrazioni urinarie mediane di stirene in un gruppo di donatori di sangue non professionalmente esposti al solvente sono risultate pari a 286 ng/l (47).

Per quanto riguarda l'analisi dei due principali metaboliti urinari dello stirene (**acidi mandelico e fenilgliossilico**), le informazioni sui VR sono scarse. Elia e coll. (18) in 34 soggetti non esposti hanno ritrovato una concentrazione media di acido mandelico di 3,8 mg/g creatinina.

Murer e coll. (41) in 59 soggetti esposti solamente al microinquinamento ambientale da stirene hanno trovato l'acido mandelico inferiore a LR (11 mg/l) nell'80% dei campioni, con un valore medio di 7,3 mg/g creatinina; l'acido fenilglicosilico, misurato negli stessi campioni di urina, era inferiore a LR (5,2 mg/l) nel 66% dei casi, con un valore medio di 4,3 mg/g creatinina.

Gli studi sull'inquinamento ambientale da **n-esano** non sono particolarmente numerosi. La sua presenza in molti tipi di benzina per autoveicoli induce a pensare che il *n*-esano sia anch'esso un microinquinante ubiquitario. Lo studio di Minoia e coll. (38) sull'aria urbana di tre città del centro-nord Italia ha confermato la costante presenza di questo solvente. La concentrazione media *indoor* + *outdoor* alla quale erano esposti i bambini di Treviglio, Poggibonsi e Valenza era rispettivamente 8,4 - 8,8 e 15,2 µg/m³. Così pure lo studio di De Bortoli e coll. (17) in 15 abitazioni del nord Italia ha confermato la costante presenza di *n*-esano: all'esterno la media era 14 µg/m³ (intervallo 2 - 42 µg/m³), all'interno 71 µg/m³ (intervallo 3 - 590 µg/m³). Phillips e coll. (52) hanno segnalato in varie città europee una concentrazione mediana di *n*-esano pari a 4,4 µg/m³ all'esterno e 4,5 µg/m³ all'interno delle abitazioni.

L'indicatore biologico d'esposizione a *n*-esano più utilizzato è certamente il **2,5-esandione** urinario. La presenza di questo metabolita nelle urine di persone non professionalmente esposte a *n*-esano è stata riscontrata da Fedtke e Bolt (19) e da Perbellini e coll. (49). Tuttora non ne è stata fornita una motivazione esaustiva: il microinquinamento ubiquitario e/o la produzione endogena di 2,5-esandione (e di 4,5-diidrossi-2-esanone), derivato da processi di perossidazione lipidica, ne potrebbero essere la causa. Nella Tabella IV sono riportate le concentrazioni di 2,5-esandione rilevate da quegli Autori che più di altri si sono interessati del monitoraggio biologico dell'esposizione a *n*-esano e che si sono perciò posti pure il problema di una corretta interpretazione dei dati.

Bavazzano e coll. (5) hanno trovato concentrazioni inferiori alle altre casistiche probabilmente a causa di una maggiore attenzione rispetto ai criteri di selezione della popolazione e al controllo dei fattori preanalitici. I fattori analitici sono stati studiati mediante un apposito confronto inter-laboratoriale. Infatti lo studio, nato in ambito SIVR, aveva l'esplicita finalità, a differenza degli altri citati in ta-

bella, di stimare le concentrazioni del 2,5-esandione nella popolazione generale italiana. È stato utilizzato un apposito questionario per raccogliere le informazioni su sesso, età, ambiente di vita, fumo, consumo di alcool, dieta. Inoltre è stato verificato lo stato di salute dei 123 soggetti coinvolti nello studio. L'abitudine al fumo e la sede dell'abitazione (città o campagna) non hanno influenzato i livelli di 2,5-esandione; è risultato statisticamente significativo il sesso. Il VR, calcolato come estremo superiore dell'intervallo di tolleranza unilaterale al 95% di confidenza, è risultato nei maschi e nelle femmine rispettivamente pari a 0,795 mg/l e 0,627 mg/l.

Gli studi disponibili sull'inquinamento ambientale da **cicloesano** sono limitati. Come per il *n*-esano, è ragionevole pensare che anch'esso possa essere considerato un microinquinante ubiquitario. Minoia e coll., nella ricerca più volte citata (38), hanno misurato l'esposizione media a cicloesano di bambini di Treviglio, Poggibonsi e Valenza: i livelli medi (*indoor* + *outdoor*) erano rispettivamente di 6,4 - 4,5 e 6,7 µg/m³.

Informazioni sulla presenza dei metaboliti del solvente nelle urine di soggetti non professionalmente esposti sono state fornite da Perico e coll. (50): in 31 soggetti di controllo (13 maschi e 18 donne), l'**1,2-cicloesandiolo** è risultato rilevabile in tutti i campioni di urine con una concentrazione mediana di 0,4 mg/g creatinina (intervallo 0,1 - 2,7 mg/g creatinina); l'**1,4-cicloesandiolo** presentava una mediana di 2,1 mg/g creatinina (intervallo 0,1 - 10,7 mg/g creatinina). Il sesso e l'abitudine al fumo non sono risultate variabili influenti in maniera significativa sulla concentrazione dei due metaboliti del cicloesano.

L'inquinamento da **tricloroetilene** è molto diffuso, analogamente a quanto si verifica per altri idrocarburi alifatici clorurati: nella popolazione generale questo solvente è assorbito per via inalatoria, in relazione al microinquinamento dell'aria, ma anche per via gastro-enterica, considerando che è sempre rilevabile nelle acque degli acquedotti. Phillips e coll. (52), nello studio già citato sull'inquinamento *indoor* e *outdoor* da composti organici volatili in cinque città europee, hanno confermato la costante presenza di tricloroetilene: all'interno delle abitazioni la concentrazione mediana era di 0,226 µg/m³ (95° percentile: 4,3 µg/m³); all'esterno sono stati rilevati valori mediani di 0,216 µg/m³ (95° percentile: 1,6 µg/m³). Wallace e coll. (63), valutando l'e-

Tabella IV. Concentrazione urinaria di 2,5-esandione (mg/l) rilevata in soggetti non professionalmente esposti a n-esano

N° campioni	Valore medio	Deviazione Standard	Intervallo	Bibliografia
12	0,45	0,20	0,12 - 0,78	(19)
10	0,49	0,14	0,32 - 0,64	(49)
53	0,33	0,47	-	(28)
26	0,56	-	0,17 - 0,98	(48)
40	0,47	0,21	0,10 - 1,00	(6)
22	0,44	0,11	0,18 - 0,73	(36)
60 (maschi)	0,27*	-	0,08 - 0,86	(5)
63 (femmine)	0,19*	-	0,09 - 0,95	(5)

* mediana

sposizione individuale di 355 persone dello Stato di New York, hanno trovato concentrazioni medie di 2,6 e 3,0 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, rispettivamente in periodo diurno e notturno.

L'analisi del tricloroetilene nel sangue è stata più volte utilizzata per valutare esposizioni non professionali a questo solvente. Brugnone e coll. (12) in un gruppo di 277 soggetti non professionalmente esposti hanno rilevato il solvente nel 65 % dei campioni analizzati, con valore mediano di 109 ng/l (95° percentile: 1338 ng/l). In un gruppo di 39 soggetti della popolazione di Zagabria (60) è stata segnalata una concentrazione ematica mediana di 32 ng/l (intervallo: < 20 - 90 ng/l).

La concentrazione urinaria di tricloroetilene in soggetti non professionalmente esposti è stata segnalata unicamente da Brugnone e coll. (12): le concentrazioni mediane sono risultate pari a 0,104 $\mu\text{g}/\text{l}$ (intervallo: 0,025 - 1,245 $\mu\text{g}/\text{l}$).

Il dosaggio dell'**acido tricloroacetico**, metabolita del tricloroetilene, nel sangue di soggetti non professionalmente esposti è stato effettuato da Skender e coll. (60), che hanno trovato valori plasmatici mediani di 37,8 $\mu\text{g}/\text{l}$ (intervallo: 13,5 - 160,4 $\mu\text{g}/\text{l}$). Gli stessi Autori hanno determinato l'acido tricloroacetico nelle urine delle 24 ore, con un valore mediano di 28,6 $\mu\text{g}/24$ ore (intervallo: 1,7 - 291,8 $\mu\text{g}/24$ ore). Sulla base di una escrezione urinaria di 1 ml/min, la concentrazione mediana di acido tricloroacetico nelle urine dovrebbe essere prossima a 20 $\mu\text{g}/\text{l}$.

Anche l'inquinamento da **percloroetilene** è piuttosto diffuso: la popolazione generale risulta esposta per via inalatoria in relazione al microinquinamento dell'aria, ma anche per via gastro-enterica in quanto il solvente è frequentemente rilevabile in acque destinate al consumo umano. De Bortoli e coll. (17) hanno segnalato che nell'aria *indoor* di 15 abitazioni del nord Italia i valori medi di percloroetilene erano di 18 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (intervallo: 3 - 47 $\mu\text{g}/\text{m}^3$). All'esterno delle abitazioni i valori risultavano lievemente inferiori, con una media di 14 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (intervallo: 1 - 48 $\mu\text{g}/\text{m}^3$). Phillips e coll. (52) hanno segnalato la presenza costante del solvente in 120 campioni di aria, con valori mediani di 0,284 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (95° percentile: 1,6 $\mu\text{g}/\text{m}^3$). Esposizioni individuali medie di percloroetilene pari a 6,3 e 9,2 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, rispettivamente in periodo diurno e notturno, sono state segnalate da Wallace e coll. (63).

L'analisi del percloroetilene nel sangue è stata più volte utilizzata per valutare l'esposizione non professionale. Brugnone e coll. (12) in un gruppo di 248 soggetti non professionalmente esposti hanno riscontrato un livello ematico mediano di 39 ng/l (95° percentile: 363 ng/l). Gli stessi Autori hanno misurato il percloroetilene nelle urine, trovando concentrazioni mediane pari a 0,041 $\mu\text{g}/\text{l}$ (intervallo: 0,025 - 1,155 $\mu\text{g}/\text{l}$).

La presenza di **metanolo** nei liquidi biologici deriva comunemente da alcuni prodotti alimentari (frutta, verdura, succhi di frutta, bevande fermentate, ecc.) o dalla sua formazione ad opera di batteri intestinali che degradano molecole quali l'aspartame, un dolcificante artificiale. Anche alcuni processi enzimatici fisiologici possono liberare metanolo durante la catabolizzazione proteica.

Il metanolo nelle urine di soggetti non professionalmente esposti è stato determinato in varie situazioni. Yasugi e coll. (67) in un gruppo di controllo di 149 persone han-

no rilevato una concentrazione media di metanolo urinario di 1,89 mg/l, senza differenze tra maschi e femmine. Batterman e coll. (4) hanno trovato livelli simili nelle urine di 15 volontari prima di un'esposizione sperimentale: media di 1,3 mg/l. Ogata e coll. (43) in 30 soggetti di controllo hanno determinato concentrazioni medie di 1,34 mg/l, mentre Berode e coll. (9) hanno trovato una media di 1,69 mg/l (intervallo: <1 - 2,6 mg/l).

L'analisi del metanolo nel sangue è stata riportata da Batterman e coll. (4), che nella popolazione generale hanno rilevato concentrazioni medie pari a 1,8 mg/l. Stegink e coll. (61) hanno segnalato un aumento di metanolo nel sangue fino a 10 mg/l dopo ingestione di 100 mg/kg di aspartame. I livelli ematici erano inferiori a 0,4 mg/l in condizioni basali e raggiungevano un livello massimo dopo 2 ore dall'ingestione del dolcificante, mantenendosi sopra i livelli iniziali per 7-8 ore. Dal momento che è ancora in studio la validità dell'acido formico urinario quale indicatore biologico di esposizione a metanolo, non riteniamo opportuno riportare in questa sede i dati relativi agli studi fin qui condotti sui soggetti non professionalmente esposti.

L'**acetone** è un prodotto che rientra nella biochimica fisiologica: modeste quantità si formano come prodotto del metabolismo di grassi e carboidrati. Oltre il 50% dell'acetone assorbito dall'esterno per via inalatoria, viene eliminato dall'organismo umano in forma di anidride carbonica. Nel sangue venoso la presenza fisiologica di acetone è stata misurata in numerose situazioni: Wang e coll. (64) hanno trovato in 88 soggetti concentrazioni ematiche mediane di 697 $\mu\text{g}/\text{l}$, con un intervallo di 188-3029 $\mu\text{g}/\text{l}$.

Le concentrazioni urinarie di acetone dovrebbero presentare valori non molto differenti da quelli ematici perché il coefficiente di ripartizione sangue/acqua dell'acetone è prossimo a 1. Wang e coll. (64) hanno misurato un valore mediano pari a 454 $\mu\text{g}/\text{l}$ (intervallo: 127 - 9350 $\mu\text{g}/\text{l}$) in 88 soggetti.

L'inquinamento ambientale da **N,N-dimetilformammide (DMF)** è da considerare molto modesto ed è prevalentemente localizzato in prossimità di industrie che utilizzano questo solvente e che lo disperdono nell'ambiente esterno. La DMF presente nell'aria esterna alle fabbriche viene in parte degradata e in parte è veicolata al suolo dalla pioggia, dove subisce processi di decomposizione biologica con sintesi di acido formico, dimetilammina e successivamente ammoniaca, anidride carbonica e acqua.

La presenza del metabolita della DMF, la N-metilformammide (come somma della molecola tal quale più la N-idrossi-N-metilformammide) in urine di persone non professionalmente esposte a DMF è stata segnalata unicamente da Kawai e coll. (30): in 42 soggetti di controllo (21 maschi e 21 femmine) la concentrazione media del metabolita era di 0,2 mg/l. Forse per una minore sensibilità analitica, nessun altro gruppo di lavoro ha segnalato la presenza di N-metilformammide nelle urine di soggetti non professionalmente esposti. Comunque tale livello è certamente così modesto da non poter interferire significativamente nell'interpretazione dei dati ottenuti nei soggetti professionalmente esposti a DMF.

Il **solfito di carbonio (CS₂)** assorbito viene trasportato da amminoacidi e proteine, con i quali instaura legami

piuttosto labili, ma che facilitano la sintesi di molteplici prodotti solforati. Il 70-90% della dose assorbita subisce una serie di rapide biotrasformazioni. Sono state identificate due distinte vie metaboliche principali: la prima porta alla formazione di ditiocarbammati e a coniugati con glutazione, la seconda conduce a solfuri reattivi attraverso una mono-ossigenasi. Nell'uomo sono stati identificati quattro metaboliti: la tiocarbammide (o tiourea), l'acido 2-tiotiazolidina-4-carbossilico (TTCA), il 2-mercaptotiazolinone, l'acido 2-ossitiazolidina-4-carbossilico.

Perbellini e coll. (47) in un gruppo di donatori di sangue hanno ritrovato, a livello *indoor*, concentrazioni ambientali mediane di CS₂ pari a 3 µg/m³ (intervallo 1-5 µg/m³, il 43% dei dati inferiore a LR).

Lo stesso gruppo di lavoro (46) ha rilevato in 62 soggetti non professionalmente esposti, concentrazioni ematiche mediane di CS₂ libero pari a 139 ng/l (intervallo 37 - 1320 ng/l), mentre la quota acido-labile (quota di CS₂ legata all'emoglobina e resa libera dall'acidificazione del sangue) era circa 20 volte maggiore (mediana 2743 ng/l, intervallo 520 - 22600 ng/l). Nelle urine di 50 soggetti della popolazione generale, Ghittori e coll. (22) hanno rilevato una concentrazione mediana di CS₂ libero pari a 230 ng/l (95° percentile: 520 ng/l).

Per quanto riguarda i metaboliti del CS₂, Simon e Nicot (58) non hanno trovato concentrazioni apprezzabili di acido 2-tiotiazolidina-4-carbossilico (TTCA) in 38 campioni di urine di soggetti non esposti. Successivamente (59) è stato segnalato che in 122 campioni di urine di soggetti di controllo il TTCA era presente nell'intervallo 0,05 - 1,17 mg/g creatinina (media 0,09 mg/g creatinina). Alcuni volontari che avevano assunto una dieta con 100 g di cavoli crudi (in questa verdura sono state ritrovate concentrazioni di TTCA pari a 3 - 6 mg/kg) le concentrazioni urinarie di TTCA variavano da livelli medi prima del pasto di 0,04 mg/g creatinina a 0,77 mg/g creatinina dopo il pasto. Il riscontro che il TTCA è il metabolita dell'antiparassitario *Captan* e del farmaco *Disulfiram* (62) conferma la possibilità che modeste quantità di TTCA possano essere rilevabili nelle urine di soggetti non professionalmente esposti a CS₂.

Conclusioni

La disponibilità di indicatori biologici in numero sempre crescente ha di fatto introdotto l'utilizzo del monitoraggio biologico, accanto e/o in sostituzione del più tradizionale monitoraggio ambientale, per il controllo dell'esposizione a solventi. La problematica del monitoraggio biologico è ormai dibattuta da più di 30 anni in numerose sedi scientifiche e a tale metodologia fanno abitualmente ricorso i medici del lavoro nell'ambito degli accertamenti integrativi alle visite mediche periodiche ed anche gli igienisti industriali per la valutazione del rischio espositivo in ambiente di lavoro.

Il monitoraggio biologico presenta indubbi vantaggi rispetto a quello ambientale per la misura dell'esposizione individuale, in quanto fornisce un indice complessivo dell'assorbimento considerando le vie di quest'ultimo (ad es. cutanea) diverse da quella respiratoria e tiene anche conto delle diverse interferenze metaboliche e ambientali.

La definizione ancor oggi più accettata di monitoraggio biologico è quella che lo identifica come "la misurazione e quantificazione di sostanze chimiche o di loro metaboliti in tessuti fluidi, secreti, escreti, aria espirata o in qualsiasi loro combinazione, condotte per valutare esposizioni e rischi per la salute, comparate con un appropriato riferimento".

È stato già osservato (2) che questo "appropriato riferimento" con cui si debbono comparare i risultati delle misurazioni dovrebbe permettere di interpretare il significato dei dosaggi eseguiti fornendo con immediatezza almeno due tipi di informazioni:

- come il risultato del monitoraggio biologico si colloca rispetto ai valori determinati in popolazioni per le quali è stata esclusa una specifica esposizione lavorativa allo xenobiotico in esame: dovrebbe quindi "orientare" rispetto all'esistenza di un'esposizione maggiore di quella della popolazione generale;
- come il risultato del monitoraggio biologico si colloca rispetto a valori ai quali è stato attribuito (su base scientifica o amministrativa) un determinato significato rispetto alla possibile modificazione dello stato di salute degli esposti: dovrebbe quindi "orientare" rispetto alla probabilità della comparsa di effetti sulla salute e quindi alla necessità di determinati interventi.

È evidente che accanto ai Valori Limite Biologici adottati da diversi organismi internazionali e ormai largamente utilizzati per la valutazione del rischio espositivo in ambiente di lavoro, non possono non essere presi in considerazione per una accurata interpretazione dei dati biologici anche i VR determinati in soggetti non professionalmente esposti.

Nel nostro paese non esistono a tutt'oggi norme che fissino i Valori Limite Biologici per i solventi. Attualmente vengono in genere utilizzati gli Indici Biologici di Esposizione (BEI) adottati dall'ACGIH e proposti come valori guida nella pratica dell'igiene industriale per la valutazione dei rischi per la salute. I BEI rappresentano la concentrazione di un solvente e/o di un metabolita presente nelle matrici biologiche che, con elevata probabilità, è possibile riscontrare in campioni prelevati su lavoratori sani, esposti a livelli di concentrazione nell'aria dell'ordine di grandezza del TLV-TWA; essi tuttavia non rappresentano una linea di demarcazione netta fra esposizione pericolosa o non pericolosa: a causa della variabilità biologica i risultati delle misure individuali possono occasionalmente superare i BEI senza che vi sia un significativo aumento di rischio per la salute.

In pratica essi possono essere definiti come limiti biologici equivalenti: infatti mentre esiste per molti solventi ampia documentazione in letteratura sulle relazioni esistenti tra livelli ambientali e biologici, decisamente inferiori sono i dati disponibili per definire un vero limite biologico al di sotto del quale non siano prevedibili effetti per la salute.

In realtà la diffusa ecodispersione di sostanze chimiche quali i solventi ha comportato, quando le tecniche analitiche lo hanno permesso, il loro reperimento in matrici biologiche di gruppi sempre più ampi della popolazione generale. Per una tale presenza di composti non è (o non è stato ancora) dimostrato alcun effetto sulla salute umana; da qui la tendenza a parlare ancora, per questi livelli di composti, di "valori normali". In realtà la Chimica Clinica ci ha indicato già da molti anni che, in questi casi, non è

corretto parlare di valori normali quanto piuttosto di "reference values".

In medicina occupazionale e ambientale il termine VR sta ad indicare il valore di un determinato indicatore ottenuto dalla elaborazione statistica dei risultati del suo dosaggio in campioni biologici prelevati da una popolazione di riferimento non professionalmente esposta; a tali valori ci si riferisce per interpretare i risultati delle determinazioni dello stesso analita effettuate in individui o gruppi ad esposizione nota o sospetta.

È evidente che quando si confrontano i dati del monitoraggio biologico con i VR, oltre alla attenta valutazione dei metodi con i quali questi ultimi sono stati ottenuti, devono essere prese in considerazione anche altre variabili di confondimento come la zona di residenza, le abitudini alimentari, il fumo, ecc.

Al di là comunque degli aspetti relativi alla esatta definizione dei VR per i solventi, non c'è dubbio che si tratti di *bio-marker* di estrema utilità nel campo della medicina ambientale e del lavoro, in quanto non solo sono degli indicatori dell'inquinamento complessivo dell'ecosistema, ma possono essere utilizzati come termine di confronto per valutare l'esposizione professionale, diventando il necessario strumento per "mettere in osservazione" chi presenta livelli di solventi superiori ai VR, per individuare fonti e modalità di assorbimento e per monitorare la comparsa di eventuali effetti. In particolare diventano strumento insostituibile quando si debba valutare l'esposizione a solventi cancerogeni (per rispettare il principio di tenere l'esposizione al livello più basso possibile) o l'efficacia di mezzi di protezione individuale.

Bibliografia

- 1) Andersson R, Carlsson A, Nordqvist M, Solleberg J. Urinary excretion of hippuric acid and o-cresol after laboratory exposure of humans to toluene. *Int Arch Occup Environ Health* 1983; 53: 101-108.
- 2) Apostoli P, Minoia C. I valori di riferimento in medicina occupazionale ed ambientale. *G Ital Med Lav Erg* 1999; 21: 25-39.
- 3) Baelum J, Dossing M, Hansen SH, Lundqvist G, Andersen NT. Toluene metabolism during exposure to varying concentrations combined with exercise. *Int Arch Occup Environ Health* 1987; 59: 281-294.
- 4) Batterman SA, Franzblau A, D'Arcy JB, Sargent NE, Gross KB, Schreck RM. Breath, urine and blood measurement as biological exposure indices of short-term inhalation exposure to methanol. *Int Arch Occup Environ Health* 1998; 71: 325-335.
- 5) Bavazzano P, Apostoli P, Balducci C, Bartolucci GB, Buratti M, Ducca 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* 1998; 71: 284-288.
- 6) Bavazzano P, Li Donni V, Baldasseroni A. Verifica di qualità in un sistema di sorveglianza biologica dell'esposizione a n-esano. *Med Lav* 1993; 84: 115-120.
- 7) Bavazzano P, Perico A, Cotti G, Zapparoli AM, Balducci C, Bartolucci GB, Bolsieri C, Buizza P, Micoli G, Minoia C, De Rosa E. Escrezione urinaria di acido ippurico in gruppi di soggetti sani non professionalmente esposti e residenti in 5 regioni italiane. In: Minoia C, Apostoli P, Sabbioni E (Eds). *Valori di riferimento di elementi in traccia e sostanze di interesse biotossicologico*. Morgan Edizioni Tecniche, Milano, 1994, pp. 357-367.
- 8) Bavazzano P, Perico A, Li Donni V, Colzi A. Esposizione professionale e fattori individuali che condizionano l'eliminazione urinaria di acido ippurico. *G Ital Med Lav* 1994; 16: 57-61.
- 9) Berode M, Sethre T, Laubli T, Savolainen H. Urinary methanol and formic acid as indicators of occupational exposure to methyl formate. *Int Arch Occup Environ Health* 2000; 73: 410-414.
- 10) Boogaard PJ, Van Sittert NJ. Biological monitoring of exposure to benzene: a comparison between s-phenylmercapturic acid, trans, trans muconic acid, and phenol. *Occup Environ Med* 1995; 52: 611-620.
- 11) Brugnone F, Perbellini L, Faccini GB, Pasini F, Danzi B, Maranelli G, Romeo L, Gobbi M, Zedde A. Benzene in the blood and breath of normal people and occupationally exposure workers. *Am J Ind Med* 1989; 16: 385-399.
- 12) Brugnone F, Perbellini L, Giuliari C, Cerpelloni M, Soave M. Blood and urine concentrations of chemical pollutants in the general population. *Med Lav* 1994; 85: 370-389.
- 13) Brugnone F, Perbellini L, Maranelli G, Romeo L, Guglielmi G, Lombardini F. Reference values for blood benzene in the occupationally unexposed general population. *Int Arch Occup Environ Health* 1992; 64: 179-184.
- 14) Brugnone F, Perbellini L, Wang GZ, Maranelli G, Raineri E, De Rosa E, Saletti C, Soave C, Romeo L. Blood styrene concentrations in a normal population and in exposed workers 16 hours after the end of the workshift. *Int Arch Occup Environ Health* 1993; 65: 125-130.
- 15) Buratti M, Fustinoni S, Colombi A. Fast liquid chromatographic determination of urinary trans,trans-muconic acid. *J Chromat B Appl* 1996; 677: 257-263.
- 16) Casal Lareo A, Perbellini L. Biological monitoring of workers exposed to N,N-dimethylformamide. II. Dimethylformamide and its metabolites in urine of exposed workers. *Int Arch Occup Environ Health* 1995; 67: 47-52.
- 17) 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, 1985, Luxembourg.
- 18) Elia VJ, Anderson LA, Macdonald TJ, Carson A, Buncher CR, Brooks SM. Determination of urinary mandelic and phenylglyoxilic acids in styrene exposed workers and a control population. *Am Ind Hyg Ass J* 1980; 41: 922-926.
- 19) Fedtke N, Bolt HM. Detection of 2,5-hexanedione in the urine of persons not exposed to n-hexane. *Int Arch Occup Environ Health* 1986; 57: 143-148.
- 20) Fustinoni S, Buratti M, Giampiccolo R, Colombi A. Biological and environmental monitoring of exposure to airborne benzene and other aromatic hydrocarbons in Milan traffic wardens. *Toxicol Lett* 1995; 77: 387-392.
- 21) Ghittori S, Imbriani M, Maestri L, Capodaglio E, Cavalleri A. Determination of S-phenylmercapturic acid in urine as an indicator of exposure to benzene. *Toxicol Lett* 1999; 108: 329-334.
- 22) Ghittori S, Maestri L, Contardi L, Zadra P, Marraccini P, Imbriani M. Biological monitoring of workers exposed to carbon disulphide in a viscose rayon fibres factory. *Am J Ind Med* 1998; 33: 478-484.
- 23) Ghittori S, Maestri L, Rolandi L, Lodola L, Fiorentino ML, Imbriani M. The determination of trans,trans-muconic acid in urine as an indicator of occupational exposure to benzene. *Appl Occup Environ Hyg* 1996; 11: 187-191.
- 24) Inoue O, Seiji K, Kawai T, Watanabe T, Jin C, Cai SX, Chen Z, Qu QS, Zhang T, Ikeda M. Excretion of methylhippuric acids in urine of workers exposed to a xylene mixture: comparison among three xylene isomers and toluene. *Int Arch Occup Environ Health* 1993; 64: 533-539.
- 25) Inoue O, Seiji K, Watanabe T, Chen Z, Huang MY, Xu XP, Qiao X, Ikeda M. Effects of smoking and drinking habits on urinary o-cresol excretion after occupational exposure to toluene vapor among Chinese workers. *Am J Ind Med* 1994; 25: 697-708.
- 26) Inoue O, Seiji K, Watanabe T, Kasahara M, Nakatsuka H, Watanabe T, Yin S, Li G, Cai S, Jin C, Ikeda M. Mutual metabolic suppression between benzene and toluene in man. *Int Arch Occup Environ Health* 1988; 60: 15-20.
- 27) Kafferlein HU, Goen T, Muller J, Wrbitzky R, Angerer J. Biological monitoring of workers exposed to N,N-dimethylformamide in the synthetic fibre industry. *Int Arch Occup Environ Health* 2000; 73: 113-120.
- 28) Kawai T, Mizunuma K, Yasugi T, Uchida Y, Ikeda M. The method of choice for the determination of 2,5-hexanedione as an indicator of occupational exposure to n-hexane. *Int Arch Occup Environ Health* 1990; 62: 403-408.

- 29) Kawai T, Yasugi T, Mizunuma K, Horiguchi S, Iguchi H, Uchida Y, Iwami O, Ikeda M. Comparative evaluation of urinalysis and blood analysis as means of detecting exposure to organic solvents at low concentrations. *Int Arch Occup Environ Health* 1992; 64: 223-234.
- 30) Kawai T, Yasugi T, Mizunuma K, Watanabe T, Cai SX, Huang MY, Xi LQ, Qu JB, Yao BZ, Ikeda M. Occupational dimethylformamide exposure. 2. Monomethylformamide excretion in urine after occupational dimethylformamide exposure. *Int Arch Occup Environ Health* 1992; 63: 455-460.
- 31) Kivisto H, Pekari K, Peltonen K, Svinhufvud J, Veidebaum T, Sorsa M, Aitio A. Biological monitoring of exposure to benzene in the production of benzene and in a coker. *Sci Total Environ* 1997; 199: 49-63.
- 32) Kok PW, Ong CN. Blood and urinary benzene determined by head-space gas chromatography with photoionization detection: application in biological monitoring of low level nonoccupational exposure. *Int Arch Occup Environ Health* 1994; 66: 195-201.
- 33) Lee BL, New AL, Kok PW, Ong HY, Shi CY, Ong CN. Urinary trans,trans-muconic acid determined by liquid chromatography: application in biological monitoring of benzene exposure. *Clin Chem* 1993; 39: 1788-1792.
- 34) Leung PL, Harrison RM. Evaluation of personal exposure to monoaromatic hydrocarbons. *Occup Environ Med* 1988; 55: 249-257.
- 35) Maestri L, Ghittori S, Grignani E, Fiorentino ML, Imbriani M. Dosaggio di un metabolita del benzene l'acido s-fenilmercapturico urinario (S-PMA), nell'uomo, mediante HPLC. *Med Lav* 1993; 84: 55-65.
- 36) 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 Appl* 1994; 657: 111-117.
- 37) Melikian AA, O'Connor R, Prahalad AK, Hu P, Li H, Kagan M, Thompson S. Determination of the urinary benzene metabolites s-phenylmercapturic acid and trans,trans-muconic acid by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Carcinogenesis* 1999; 4: 719-726.
- 38) Minoia C, Meroni G, Aprea C, Oppezzo MC, Magnaghi S, Sciarra G, Barisano A, Fiorentino ML, Berri A, Bellinzona M, Robustelli della Cuna FS, Frigerio F, Schiavi A, Di Gregorio L. Environmental and urinary reference values as markers of exposure to hydrocarbons in urban areas. *Sci Total Environ* 1996; 192: 163-182.
- 39) Mráz J, Galová E, Nohová H, Vitkova D. 1,2- and 1,4-cyclohexanediol: major urinary metabolites and biomarkers of exposure to cyclohexane, cyclohexanone and cyclohexanol in humans. *Int Arch Occup Environ Health* 1998; 71: 560-565.
- 40) Mráz J, Nohová H. Absorption, metabolism and elimination of N,N-dimethylformamide in humans. *Int Arch Occup Environ Health* 1992; 64: 85-92.
- 41) Murer AJL, Christensen JM, Midtgaard T. Determination of the urinary metabolites of styrene: estimation of the method evaluation function and evaluation of reference values in Danish subjects. *Int Arch Occup Environ Health* 1994; 65: 313-318.
- 42) Nise G. Urinary excretion of o-cresol and hippuric acid after toluene exposure in rotogravure printing. *Int Arch Occup Environ Health* 1992; 63: 377-381.
- 43) Ogata M, Iwamoto T. Enzymatic assay of formic acid and gas chromatography of methanol for urinary biological monitoring of exposure to methanol. *Int Arch Occup Environ Health* 1990; 62: 227-232.
- 44) Perbellini L, Bartolucci GB, Brugnone F, De Rosa E, Valentini F. Il 2,5-esandione nel controllo biologico dell'esposizione professionale a n-esano. *Med Lav* 1985; 76: 35-43.
- 45) Perbellini L, Buratti M, Fiorentino ML, Fustinoni S, Cerpelloni M, Magnaghi S. La quota libera, la quota termolabile e la quota acidolabile del benzene urinario. In: Minoia C, Maroni M, Catenacci G, Fait A, Bersani M (Eds). *Antiparassitari, Ambiente e Salute*. 3° Congresso Nazionale S.I.V.R., Pavia, 10-12 novembre 1997, pp. 339-345.
- 46) Perbellini L, Maranelli G, Lombardini F, Gandini G, Brugnone F. Carbon disulfide in blood: a method for storing and analysing samples. *Med Lav* 1994; 85: 134-141.
- 47) Perbellini L, Pasini F, Faccini GB, Danzi B, Gobbi M, Zedde A, Cirillo P, Brugnone F. Determinazione di solventi ad uso industriale nel sangue, nell'aria alveolare e nell'urina di un gruppo di donatori di sangue. *Med Lav* 1988; 79: 460-467.
- 48) Perbellini L, Pezzoli G, Brugnone F, Canesi M. Biochemical and physiological aspects of 2,5-hexanedione: endogenous or exogenous product? *Int Arch Occup Environ Health* 1993; 65: 49-52.
- 49) Perbellini L, Tagliaro F, Maschio S, Zedde A, Brugnone F. Dosaggio gas-cromatografico del 2,5-esandione nelle urine. *Med Lav* 1986; 77: 628-634.
- 50) Perico A, Cassinelli C, Brugnone F, Bavazzano P, Perbellini L. Biological monitoring of occupational exposure to Cyclohexane by urinary 1,2 and 1,4-Cyclohexanediol determination. *Int Arch Occup Environ Health* 1999; 72: 115-120.
- 51) Pezzagno G, Maestri L, Fiorentino ML. Trans, trans muconic acid, a biological indicator to low levels of environmental benzene: some aspects of its specificity. *Am J Ind Med* 1999; 35: 511-518.
- 52) Phillips K, McKenna AM, Howard DA, Bentley MC, Cook JN. 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", 1997, Pavia, Vol. 3/3: 33-46.
- 53) Pierce CH, Dills RL, Morgan MS, Vicini P, Kalman DA. Biological monitoring of controlled toluene exposure. *Int Arch Occup Environ Health* 1998; 71: 433-444.
- 54) Qu Q, Melikian AA, Li G, Shore R, Chen L, Cohen B, Yin S, Kagan MR, Li H, Meng M, Jin X, Winnik W, Li Y, Mu R, Li K. Validation of biomarkers in human exposed to benzene: urine metabolites. *Am J Ind Med* 2000; 37: 522-531.
- 55) Riihimaki V. Conjugation and urinary excretion of toluene and m-xylene metabolites in man. *Scand J Work Environ Health* 1979; 5: 135-142.
- 56) Rosier J, Veulemans H, Masschelein R, Van Hoorne M, Van Peteghem C. Urinary excretion of 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid (TTCA) during and after exposure. *Int Arch Occup Environ Health* 1987; 59: 243-250.
- 57) Ruppert T, Scherer G, Tricker AR, Adlkofer F. Trans,trans muconic acid as biomarker of non-occupational environmental exposure to benzene. *Int Arch Occup Environ Health* 1997; 69: 247-251.
- 58) Simon P, Nicot T. Automated column-switching high-performance liquid chromatography for the determination of 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid in urine. *J Chromat B Appl* 1993; 620: 47-53.
- 59) Simon P, Nicot T, Dieudonné M. Dietary habits, a non-negligible source of 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid and possible overestimation of carbon disulfide exposure. *Int Arch Occup Environ Health* 1994; 66: 85-90.
- 60) Skender L, Karacic V, Bosner B, Prpic-Majic D. Assessment of urban population exposure to trichloroethylene and tetrachloroethylene by means of biological monitoring. *Int Arch Occup Environ Health* 1994; 49: 445-451.
- 61) Stegink LD, Brummel MC, McMartin K, Martin-Amat G, Filer LJJ, Baker LG, Tephly TR. Blood methanol concentrations in normal adult subjects administered abuse doses of aspartame. *J Toxicol Environ Health* 1981; 7: 281-290.
- 62) Van Doorn R, Leijdekkers C, Nossent SM, Henderson PT. Excretion of TTCA in human urine after administration of disulfiram. *Toxicol Lett* 1982; 12: 59-64.
- 63) Wallace LA, Pellizzari ED, Artwell TD, Sparacino CM, Sheldon LS, Zelon H. Personal exposures, indoor-outdoor relationships, and breath levels of toxic air pollutants measured for 355 persons in New Jersey. *Atmospheric Environ* 1985; 19: 1651-1661.
- 64) Wang G, Maranelli G, Perbellini L, Brugnone F. Blood acetone concentration in normal people and in exposed workers 16 h after the end of the workshift. *Int Arch Occup Environ Health* 1994; 65: 285-289.
- 65) Wang G, Maranelli G, Perbellini L, Guglielmi G, Brugnone F. Reference values for blood toluene in the occupationally nonexposed general population. *Int Arch Occup Environ Health* 1993; 65: 201-203.
- 66) Woiwode W, Drysch K. Experimental exposure to toluene: further consideration of cresol formation in man. *Br J Ind Med* 1981; 38: 194-197.
- 67) Yasugi T, Kawai T, Mizunuma K, Horiguchi S, Iwami O, Iguchi H, Ikeda M. Formic acid excretion in comparison with methanol excretion in urine of workers occupationally exposed to methanol. *Int Arch Occup Environ Health* 1992; 64: 329-337.
- 68) Young JF, Branham WS, Sheehan DM, Baker ME, Wosilait WD, Luecke RH. Physiological "constant" for BPBK models for pregnancy. *J Toxicol Environ Health* 1997; 52: 385-401.