



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze del Farmaco

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN: Scienze Farmacologiche

CURRICOLO: Farmacologia, Tossicologia e Terapia

CICLO XXX

**Monitoraggio ambientale e biologico per la determinazione dell'esposizione  
occupazionale a diisocianati**

**Coordinatore:** Ch.mo Prof. Piero Maestrelli

**Supervisore:** Ch.mo Prof. Andrea Trevisan

**Dottoranda :** Federica Maratini



*A Maia, il mio esperimento più bello*



# INDICE

RIASSUNTO	pag. 1
INTRODUZIONE	pag. 3
SCOPO	pag. 41
MATERIALI E METODI	pag. 43
RISULTATI E DISCUSSIONE	pag. 59
CONCLUSIONI	pag. 93
BIBLIOGRAFIA	pag. 95
RINGRAZIAMENTI	pag. 101



## RIASSUNTO

Il progetto di ricerca si è incentrato sulla messa a punto e sulla validazione di una metodica analitica per la determinazione combinata della concentrazione in aria ambiente di 3 dei diisocianati maggiormente utilizzati in ambito lavorativo: 1,6-esametilene diisocianato (1,6-HDI), 4,4'-difenilmetano diisocianato (4,4'-MDI) e 2,6-tolueno diisocianato (2,6-TDI). Il metodo analitico è stato sviluppato a partire da procedure indicate dall'*Occupational Safety and Health Administration* (OSHA; ID OSHA 42 e ID OSHA 47) utilizzando la cromatografia liquida ad alte prestazioni accoppiata a un rivelatore fluorimetrico. Il metodo è stato validato e ha dimostrato di avere sensibilità e precisione adeguate per l'analisi di campioni reali, nell'ambito di monitoraggi ambientali per la determinazione delle concentrazioni aerodisperse di tali sostanze. Il metodo è stato quindi applicato nella determinazione dei livelli di concentrazione ambientale di 1,6-HDI, 4,4'-MDI e 2,6-TDI, nell'ambito di due campagne di monitoraggio, in due diversi contesti lavorativi.

Ulteriore scopo del progetto di ricerca è stata la messa a punto e la validazione di metodiche analitiche per la determinazione delle concentrazioni urinarie dei metaboliti dell'1,6-HDI, del 4,4'-MDI e dei due isomeri del TDI, 2,4- e 2,6-TDI, ovvero le corrispondenti diammine. A tal fine è stata utilizzata come tecnica di separazione ed identificazione analitica la gascromatografia accoppiata al rivelatore spettrometro di massa. La metodica è stata individuata a partire da una comparazione della letteratura scientifica sull'argomento e dalle indicazioni fornite da una delle agenzie di settore di maggiore rilievo, l'*American Conference of Governmental Industrial Hygienists* (ACGIH). Le condizioni analitiche ottimali sono state individuate conducendo una serie di prove, prima in solvente organico quindi in matrice urinaria di soggetti non esposti professionalmente a diisocianati o a solventi. La matrice urinaria delle prove è stata trattata mediante idrolisi acida ad alta temperatura, come indicato dalla maggioranza dei lavori riportati in letteratura ed in accordo con quanto indicato nella *Documentation* ACGIH per l'analisi dei campioni urinari dei lavoratori esposti a TDI e a HDI. I 3 metodi messi a punto sono stati validati ed hanno restituito una sensibilità ed una precisione adeguate alla determinazione dei livelli di concentrazione delle diammine dei diisocianati oggetto del presente progetto di ricerca. Ad oggi è stato possibile applicare tali metodiche per la valutazione della dose interna registrata per campioni di pazienti esposti a test di provocazione bronchiale specifici per la diagnosi di asma professionale.

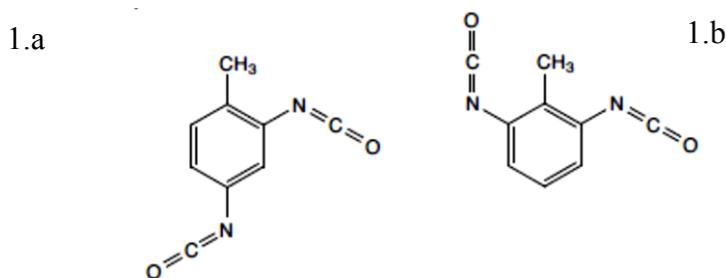


# INTRODUZIONE

## CARATTERISTICHE CHIMICO-FISICHE, PRODUZIONE E UTILIZZI

### 1. 2,4-Toluen diisocianato (2,4-TDI) e 2,6-toluen diisocianato (2,6-TDI)

Con il nome toluendiisocianato, in seguito indicato come TDI, si indicano una famiglia di isomeri caratterizzati in particolare dalla presenza di un anello benzenico sostituito con tre gruppi (due gruppi isocianato  $N=C=O$  e un gruppo metile  $CH_3$ ), ragion per cui rientra nella categoria dei diisocianati aromatici. In particolare, qui ed in seguito, con TDI si vorranno includere i due isomeri maggiormente diffusi in ambito industriale e professionale, come tali scelti per il presente lavoro di ricerca, ovvero: il 2,4-toluen diisocianato (2,4-TDI) e il 2,6-toluen diisocianato (2,6-TDI). La struttura molecolare dei due isomeri del TDI è indicata in figura 1.



**Figura 1** Struttura molecolare del 2,4-TDI (figura 1.a) e del 2,6-TDI (figura 1.b).

Il TDI si presenta in forma di solido oppure di liquido, in relazione alla temperatura ambiente, da incolore a giallognolo, sensibile al calore e alla luce, e con un caratteristico odore acre: in letteratura la soglia olfattiva del 2,4-TDI è riportata essere fra 0,17 e 3,2 ppm (ACGIH, 2016). Le proprietà chimiche sono essenzialmente legate alla presenza del gruppo isocianato, caratterizzato da un'elevata reattività con le specie nucleofile, contenenti gruppi NH oppure OH: in acqua, ad esempio, decompone immediatamente; è caratterizzato da una buona solubilità con la maggior parte dei solventi organici polari, quali benzene, acetone e diclorometano. Le principali proprietà chimico-fisiche sono presentate in tabella I.

**Tabella I** Principali proprietà chimico-fisiche del 2,4-TDI, del 2,6-TDI e della miscela con proporzione 80:20 in peso, rispettivamente (ACGIH, 2016).

<b>TDI</b>	<b>CAS</b>	<b>MM (g mol<sup>-1</sup>)</b>	<b>T<sub>f</sub>760mmHg (°C)</b>	<b>T<sub>e</sub>760mmHg (°C)</b>	<b>d<sub>25°C</sub> (g ml<sup>-1</sup>)</b>	<b>Solubilità in acqua 25°C (g l<sup>-1</sup>)</b>	<b>Tensione di vapore (mmHg)</b>	<b>d vapori versus aria (d<sub>aria</sub>=0)</b>
2,4-TDI	584-84-9	174.15	19,5 – 21,5	251	1,22	0,0376	8,0×10 <sup>-3</sup>	6
2,6-TDI	91-08-7		18.3	250		Decompono	2,1×10 <sup>-2</sup>	6

Dal punto di vista commerciale i diisocianati, ed in particolare il TDI, sono materie prime in forte uso sin dagli anni Ottanta, sia puri che, per lo più, in forma di miscela (Allport *et al.*, 2003). Il TDI è un'importante materia prima utilizzata in molti ambiti industriali, tra cui emerge l'uso nella produzione delle schiume poliuretatiche (PUR), sia morbide utilizzate nelle componenti di arredo che rigide come rivestimento dei cavi elettrici ad esempio, o come materia prima per la realizzazione di adesivi, rivestimenti, resine, prodotti per finiture, colle e nella produzione di isolanti (IARC, 1999; Rosenberg *et al.*, 2002). Le formulazioni commerciali maggiormente diffuse ed utilizzate sono riportate in tabella II. Fra le tipologie di TDI indicate, quelle prodotte su scala industriale sono: l'isomero 2,4-TDI puro (per particolari applicazioni nella produzione di alcuni tipi di elastomeri), le miscele isomeriche delle due forme di TDI (2,4- e 2,6-TDI) ed infine il TDI modificato in forma prepolimerica. L'isomero 2,6-TDI puro viene utilizzato come tale unicamente in ambito laboratoristico. Il prodotto più diffuso in ambito industriale (95% degli utilizzi industriali) è rappresentato dalla miscela 80/20 TDI, che è caratterizzato da una composizione percentuale pari all'80% in peso dell'isomero 2,4-TDI e dal restante 20% in peso dal 2,6-TDI; è nota anche la miscela commerciale composta dal 65% in 2,4-TDI e dal 35% in 2,6-TDI (65/35 TDI), sebbene rappresenti un formulato commerciale minoritario.

**Tabella II** Tipologie di TDI diffuse in ambito industriale.

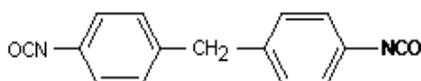
<b>Tipo di TDI</b>	<b>Descrizione</b>	<b>Stato fisico e aspetto 25°C</b>
<b>TDI</b>	Termine generico per tutti i tipi di TDI non chimicamente modificato	-
<b>2,4-TDI</b>	Isomero puro, utilizzato come tale o in miscele isomeriche del TDI	Liquido, incolore
<b>2,6-TDI</b>	Isomero puro, utilizzato come tale o in miscele isomeriche del TDI	Liquido, incolore
<b>80/20 TDI (anche nota come 80:20 TDI)</b>	Miscela isomerica con composizione in peso 80% 2,4-TDI e 20% 2,6-TDI	Liquido, incolore
<b>65/35 TDI (anche nota come 65:35 TDI)</b>	Miscela isomerica con composizione in peso 65% 2,4-TDI e 35% 2,6-TDI	Liquido, incolore
<b>TDI modificato noto anche come “TDI prepolimerico”</b>	Isomeri del TDI parzialmente reagiti al fine di ottenere maggiore versatilità nella manipolazione e/o per ottenere determinate proprietà nella forma polimerica finale	Liquido, incolore

Dal punto di vista delle lavorazioni maggiormente diffuse, le già citate schiume poliuretaniche vengono prodotte spruzzando la materia prima (il diisocianato puro) in presenza di vapore acqueo, dando così il via alla reazione di polimerizzazione. Una successiva lavorazione di tale materia finita prevede il taglio mediante la tecnica del filo a caldo, al fine di ricavare forme diverse a partire dalla massa grezza polimerizzata. La produzione industriale di TDI negli Stati Uniti si attestava sulle 500000 tonn / anno fino al decennio scorso (U.S. ITC, 1996).

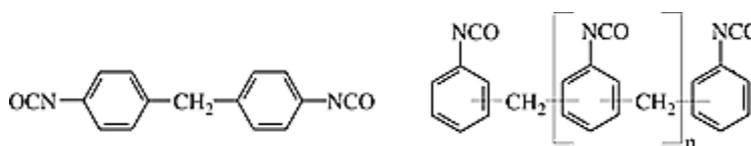
## **2. 4,4'-Difenilmetano diisocianato (4,4'-MDI)**

Il 4,4'-difenilmetano diisocianato (figura 2) è un composto organico caratterizzato da un carbonio metilenico cui sono legati due anelli benzenici caratterizzati dalla presenza di un gruppo isocianato -N=C=O in posizione 4 di ciascun anello; è un diisocianato aromatico ma la sua reattività è essenzialmente legata alla presenza dei due gruppi isocianato, che reagiscono velocemente con gruppi nucleofili quali ammine, gruppi ossidrilici o tiolici. Mostra un'elevata reattività anche in

relazione a reazioni di polimerizzazione, a vari livelli: è presente infatti sia in forma monomerica che oligomerica o polimerica (PMDI), le relative strutture molecolari sono rappresentate in figura 3.



**Figura 2** Struttura molecolare del 4,4'-MDI.



**Figura 3** Rappresentazione delle forme di aggregazione oligomerica del 4,4'-MDI (MAK, 2015).

Il MDI si presenta in forma di solido inodore, in forma aggregata (in fiocchi) con una colorazione da bianco a giallognolo; le principali proprietà chimico-fisiche sono raccolte in tabella III. È convenzione considerare con termine MDI la specie pura (il monomero 4,4'-MDI) e con il termine “MDI tecnico” miscele del monomero con varie forme aggregate (oligoisocianati), impropriamente definite come MDI polimerico”. In tabella IV sono descritte le forme di aggregazione diffuse in ambito commerciale per il MDI.

**Tabella III** Principali proprietà chimico-fisiche del 4,4'-MDI (ACGIH, 2001).

	CAS	MM ( $\text{gmol}^{-1}$ )	$T_f$ <sub>760mmHg</sub> (°C)	$T_e$ <sub>760mmHg</sub> (°C)	$d_{70^\circ\text{C}}$ ( $\text{gm}^{-1}$ )	Solubilità in acqua 25°C (g/100g)	Tensione di vapore (mmHg, a 25°C)
4,4-MDI	101-68-8	250,26	37,2	194-199	1,197	0,2%	$1,4 \times 10^{-4}$

**Tabella IV** Tipologie di MDI diffuse in ambito industriale.

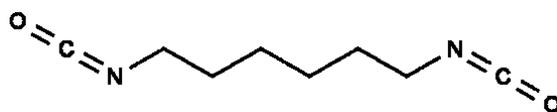
<b>Tipo di MDI</b>	<b>Descrizione</b>	<b>Stato fisico e aspetto 25°C</b>
<b>MDI</b>	Termine generico per tutti i tipi di TDI non chimicamente modificato	-
<b>MDI polimerico (“MDI tecnico”)</b>	Miscele di MDI monomero ed altre specie a più alto peso molecolare	Liquido, marrone traslucido
<b>MDI puro (“MDI monomero” o “4,4’-MDI”)</b>	MDI monomero commerciale, la cui composizione chimica in peso è: 98% 4,4’-MDI, il restante 2% è dato dall’insieme delle due forme isomeriche minoritarie (2,2’-MDI e 2,4’-MDI)	Solido (fuso o in fiocchi), bianco
<b>MDI modificato noto anche come “TDI prepolimerico”</b>	MDI puro o in forma polimerica modificato al fine di ottenere maggiore versatilità nella manipolazione e/o per aumentare la variabilità della forma polimerica finale (ampia gamma di intermedi commerciali)	Solido o liquido marrone-biancastro (in base alla formulazione specifica)

I principali utilizzi del MDI in ambito industriale sono nella produzione di prodotti a base di poliuretani, dei quali esiste una vastissima gamma, che include componenti di arredo, mobili, materassi, sedute di automobili (a partire dalle schiume poliuretatiche flessibili o semi-rigide), oppure elementi strutturali utilizzati nel settore delle costruzioni o come isolante termico (a partire da schiume poliuretatiche rigide) e infine applicazioni nel settore calzaturiero (materia prima in forma elastomerica). Ulteriori utilizzi del MDI che non prevedono la formulazione come poliuretano, sono come legante nella produzione di pannelli di compensato, come legante per la produzione di stampi

da fonderia a base sabbia e per la produzione di schiume a base di poliurea (“low density polyurea foams”) utilizzate per il confezionamento (Allport *et al.*, 2003).

### 3. 1,6-Esametilen diisocianato (1,6-HDI)

L'1,6-esametilen diisocianato (figura 4) è un diisocianato alifatico, in quanto costituito da due gruppi isocianato legati ad una stessa catena alifatica costituita da 6 atomi di carbonio.



**Figura 4** Struttura chimica dell'1,6-HDI.

La presenza dei due gruppi isocianato conferisce a questa specie chimica caratteristiche di elevata reattività nei confronti di specie che presentano il gruppo ossidrilico, come l'acqua, gli alcoli e i polioli, e anche nei confronti di substrati che presentano gruppi nucleofili come molti gruppi funzionali che caratterizzano le proteine, quali gruppi amminici, gruppi sulfidrilici e gruppi ossidrilici. È nota inoltre l'estesa capacità di dare reazioni di polimerizzazione a vari livelli (reazioni di *crosslinking*). In condizioni standard è un liquido, da incolore a debolmente colorato di giallo, dal caratteristico intenso odore pungente: la soglia olfattiva è di 0,001 ppm (U.S. ATSDR, 1998). In tabella V sono indicate le principali proprietà chimico-fisiche dell'1,6-HDI.

**Tabella V** Principali proprietà chimico-fisiche dell'1,6-HDI (ACGIH, 2015).

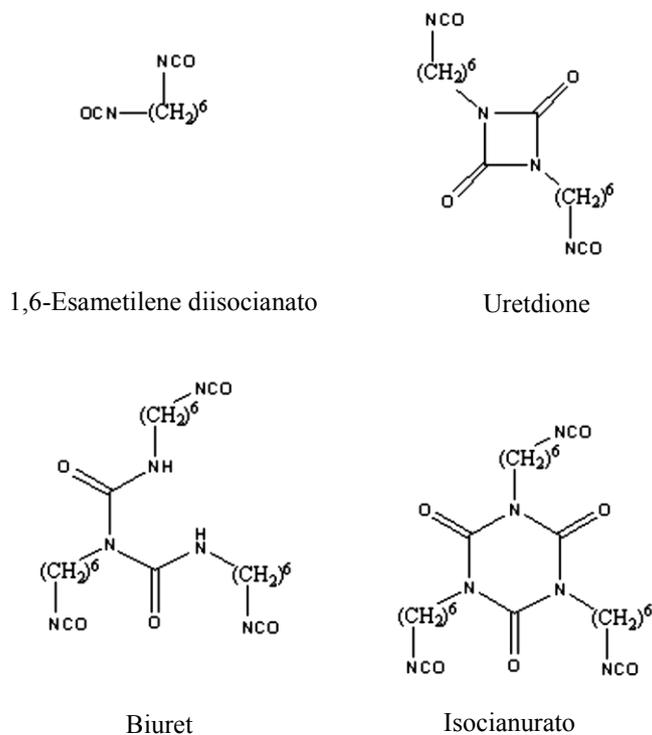
	CAS	MM ( $\text{g mol}^{-1}$ )	$T_{e760\text{mmHg}}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$T_{f760\text{mmHg}}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$d_{25^{\circ}\text{C}}$ ( $\text{g ml}^{-1}$ )	Solubilità in acqua ( $\text{g}/100\text{g}$ , $25^{\circ}\text{C}$ )	Tensione di vapore ( $\text{mmHg}$ , $25^{\circ}\text{C}$ )
1,6-HDI	822-06-0	168,196	212,8	-67	1,04	scarsa	0,05

In tabella VI sono descritte le forme di oligomeriche maggiormente rappresentative dell'HDI, nel settore industriale (Rosenberg *et al.*, 1984; Fent *et al.*, 2009a; Fent *et al.*, 2009b).

**Tabella VI** Derivati dell'HDI più rappresentativi in ambito industriale.

Tipo di MDI	Descrizione	Peso molecolare (g/mol)	Stato fisico e aspetto 25°C
<b>HDI</b>	Monomero 1,6-HDI	168,2	Liquido, incolore-giallognolo
<b>Uretdione</b>	Dimero	336,4	-
<b>Biuret</b>	Trimerico	478,4	-
<b>Isocianurato</b>	oligomero (4 unità monomeriche)	504,7	-

Delle quattro forme di diisocianato indicate in tabella VI, è noto che la forma oligomerica più rappresentativa nelle formulazioni commerciali a base di HDI è l'isocianurato; in figura 5 sono rappresentate le forme oligomeriche dell'HDI descritte in tabella VI.



**Figura 5** Strutture molecolari dei 4 oligomeri dell'HDI presenti nelle formulazioni commerciali a base di HDI (Robbins, 2011).

L'HDI viene utilizzato principalmente nella produzione *on-site* di oligomeri e poliisocianati a più alto peso molecolare, che hanno il ruolo di agenti indurenti nella formulazione di vernici poliuretatiche destinate al settore automobilistico, all'impiego nei rivestimenti nautici, alle opere di mantenimento degli edifici industriali e ad altre formulazioni per prodotti di rivestimento ad elevata prestazione. In tali prodotti finiti si è stimato che il contenuto di HDI monomero si attesti fra lo 0,5% e l'1,6%.

## CARATTERISTICHE TOSSICOLOGICHE ED EFFETTI SULLA SALUTE

Le caratteristiche di reattività dei diisocianati sono essenzialmente dovute alla presenza dei gruppi isocianato, ma alcune proprietà chimico-fisiche derivanti dal tipo specifico di molecola o dallo stato di aggregazione in cui essa si trova, possono influenzare la modalità di interazione con l'organismo. A carico dei tessuti del tratto respiratorio, l'evoluzione del danno può variare notevolmente in funzione della specifica molecola di diisocianato coinvolta (DFG, 2015).

È noto che l'esposizione a diisocianati può determinare l'insorgenza di effetti sia acuti che cronici, a carico dell'apparato respiratorio e della cute (Bernstein, 1993).

Per quanto riguarda gli studi tossicologici sulla cancerogenicità di tali composti, le più importanti agenzie tossicologiche internazionali hanno proposto le classificazioni riportate in Tabella VII.

**Tabella VII** Classificazione di cancerogenicità per i due isomeri di TDI, per MDI e per HDI (ACGIH, 2015).

NOME	SIGLA	CLASSIFICAZIONE DI CANCEROGENICITÀ
1,6-Esametilen-diisocianato	1,6-HDI	-
2,4-Toluen-diisocianato*	2,4-TDI	2B (IARC)*, R (NTP)*, 3A (MAK), Ca (NIOSH)
2,6-Toluen-diisocianato*	2,6-TDI	2B (IARC)*, R (NTP)*, 3A (MAK), Ca (NIOSH)
4,4'-Difenilmetano-diisocianato	4-4'-MDI	3 (IARC), 4 (MAK), CBD - D (EPA)

(\* come monomeri o in miscela, CAS 26471-62-5)

Inalati ad alte concentrazioni provocano tosse, dispnea, aumento di secrezioni, ridotta funzionalità polmonare, dolore al petto, bruciore agli occhi e vertigini; gli effetti in genere si osservano dopo un periodo di esposizione che va da alcuni mesi ad anni, ma in alcuni casi sono stati riportati effetti dannosi per la salute anche dopo una sola esposizione acuta (ACCGIH, 2001; ACGIH, 2004). A

partire dagli ultimi anni è emerso come i diisocianati siano la causa preminente di asma occupazionale (Bello, 2007).

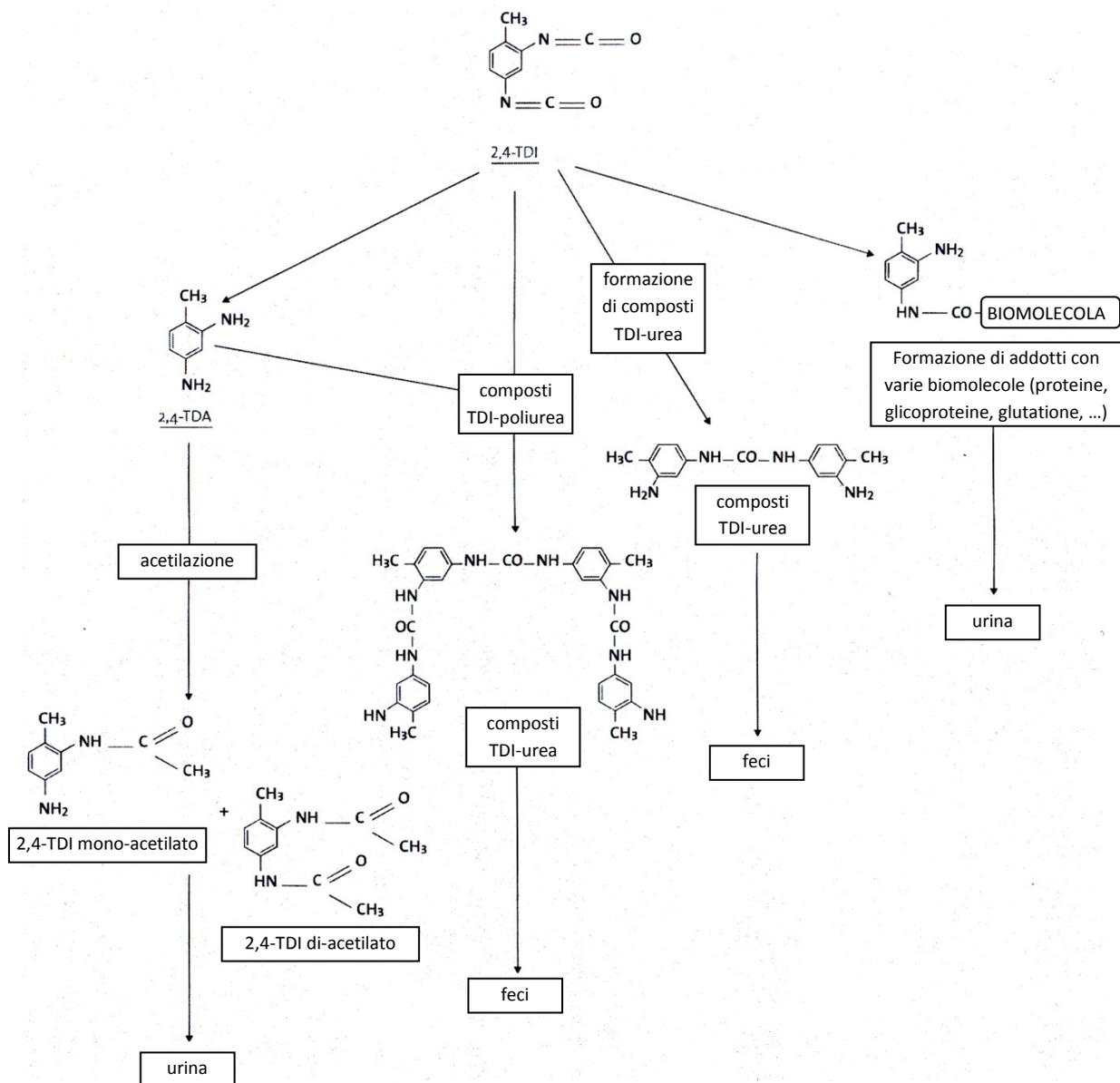
Fra gli effetti cronici a seguito dell'esposizione a tali sostanze, si riportano sensibilizzazione respiratoria e cutanea, irritazione del tratto respiratorio, irritazione oculare e della cute; le disfunzioni e patologie maggiormente osservate sono una ridotta funzionalità polmonare, bronchiti, riniti, polmoniti, edema polmonare, congiuntiviti e reazioni allergiche, tra cui asma, oculorinite, alveolite allergica estrinseca (o polmonite da ipersensibilizzazione) e dermatite allergica da contatto. In Gran Bretagna e Stati Uniti sono una delle principali cause di asma, fino al 30% e al 40% dei casi rispettivamente (Huggins, 2001; NIOSH, 1996). Per quanto concerne le patologie allergiche, in particolare, nonostante il miglioramento delle condizioni di lavoro e la generale tendenza alla riduzione dei livelli di esposizione a sostanze tossiche in ambiente di lavoro, tali patologie sono ad oggi ancora molto diffuse nella popolazione lavorativa, probabilmente per fattori legati alla suscettibilità inter-individuale.

### **Assorbimento e metabolismo**

A seguito dell'interazione con le sostanze eventualmente presenti in aria ambiente si possono scatenare sia complessi meccanismi metabolici, che reazioni di *clearance* o, infine, complessi meccanismi di risposta dell'organismo non ancora elucidati per tutte le sostanze utilizzate in ambito lavorativo. Nel caso dei diisocianati, le principali vie di assorbimento nell'uomo sono l'inalazione (vie respiratorie) e il contatto cutaneo. Una volta assorbite tali molecole interagiscono velocemente mediante reazioni di coniugazione (aptenazione) con le proteine del tessuto epidermico (cheratina, in particolare) e delle vie respiratorie (in particolare albumina, tubulina, laminina e actina): l'addotto maggioritario che si forma in seguito per reazione con alcune importanti proteine circolanti nel sangue, quali albumina ed emoglobina (NIOSH, 1996). Il campo di studio risulta piuttosto complesso, se si considera l'aspetto immunologico delle patologie associate all'esposizione a diisocianati. Le riniti e le forme asmatiche allergiche professionali da esposizioni a isocianati sono largamente non IgE specifiche (solo il 20% dei casi è risultato IgE specifico) rendendo ancora più complessa l'identificazione di molecole che possano agire da *biomarker* specifici per la valutazione dell'esposizione a diisocianati.

In figura 6 è riportato uno schema del meccanismo metabolico relativo al 2,4-TDI proposto in letteratura (Allport *et al.*, 2003), dal quale emergono le principali vie di biotrasformazione del 2,4-TDI, sostanzialmente estendibile anche al 2,6-TDI e, a livello generale, ai 3 diisocianati considerati nel progetto di ricerca. Dallo schema in figura 6 risulta chiaro come il TDI, assorbito attraverso il tratto respiratorio e la cute, interagisca mediante i gruppi diisocianato i quali, essendo caratterizzati da un'estrema reattività anche in ambiente fisiologico, possono venire idrolizzati alle corrispondenti

ammine (TDA), le quali a loro volta possono essere escrete come tali, o reagire con svariate biomolecole (principalmente proteine) formando dei mono-addotti o dei di-addotti, oppure possono portare alla formazione di mono- o di-acetil derivati, per reazione delle diammine con agenti acetilanti presenti nell'organismo. Una via metabolica ulteriore inclusa nello schema è quella ipotizzata per i composti potenzialmente presenti in ambiente lavorativo, ovvero derivati polimerici TDI-urea che possono essere dispersi in aria a seguito di specifiche lavorazioni o manipolazioni della materia prima: si tratta quindi di derivati polimerici del TDI di varia estensione, di cui non è nota la biotrasformazione.



**Figura 6** Schema del meccanismo metabolico dell'isomero 2,4-TDI (Allport *et al.*, 2003).

Secondo quanto proposto in letteratura (Pauluhn *et al.*, 2006), il metabolismo dell'MDI prevede la formazione prioritaria di addotti con il glutatione (GSH), sia mono-coniugati che bi-coniugati. Da studi in vitro si è osservato che, mentre la specie bi-addotta ha un tempo di emivita piuttosto breve (circa 1 ora) la specie mono-addotta ha un tempo di emivita di circa 8 ore; studi su lavoratori esposti a MDI inoltre hanno evidenziato l'assenza di escrezione di MDA libera, che risulta presente, invece, unicamente in forma legata a delle proteine (Sennbro *et al.*, 2003). In base a queste considerazioni, gli intermedi metabolici ipotizzati per il 4,4'-MDI assorbito dall'organismo sono indicati in figura 7.

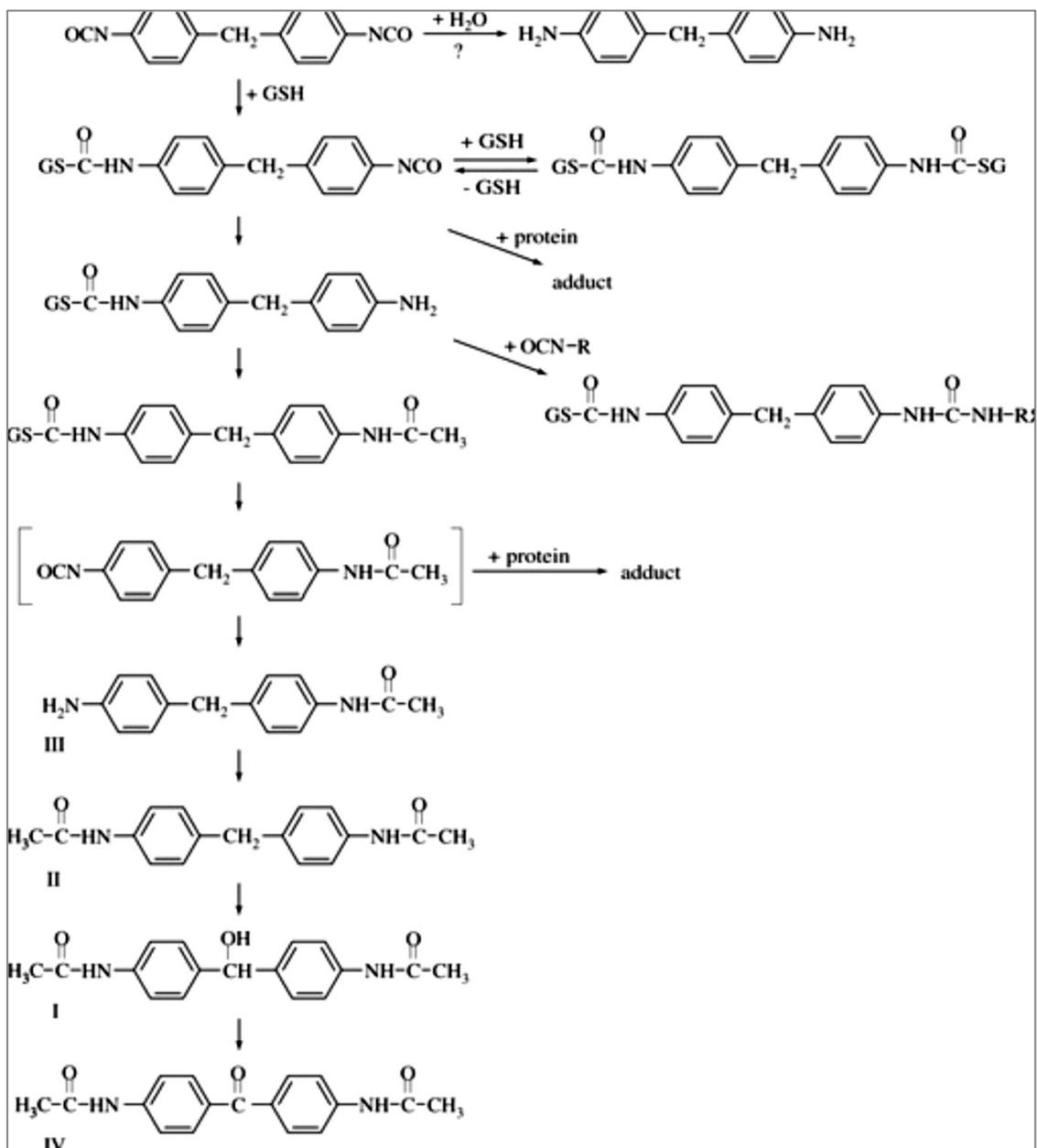


Figura 7 Trasformazioni metaboliche del 4,4'-MDI (Pauluhn *et al.*, 2006).

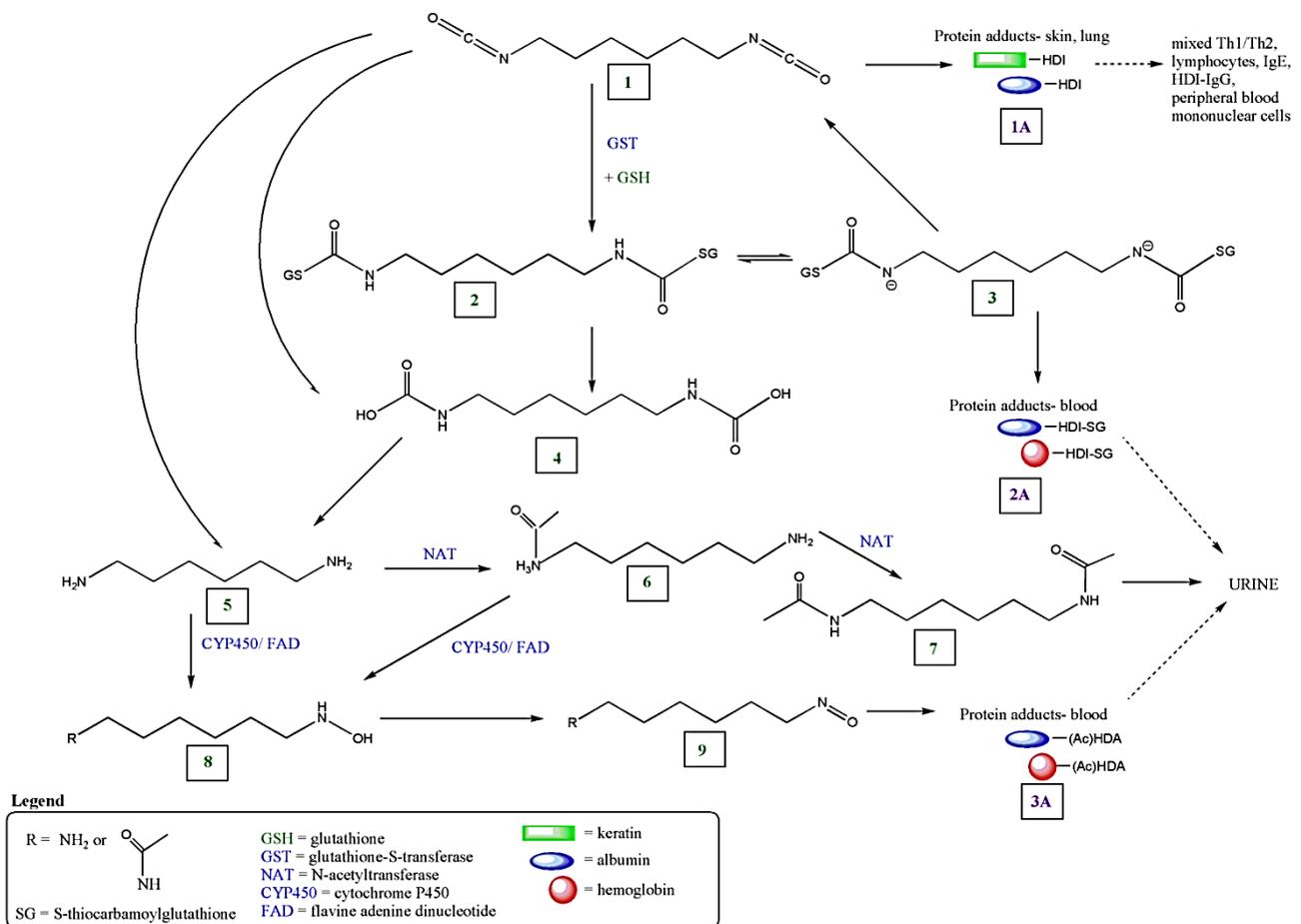
L'elevata reattività chimica del MDI si riflette sulle sue caratteristiche tossicologiche e sulla modalità di interazione con il corpo umano; il grado di interazione con le biomolecole cambia in base alla forma (monomerica, oligomerica o polimerica, PMDI) in cui si presenta tale specie chimica, poiché a parità di composizione chimica aumenta il numero di gruppi funzionali presenti nella struttura. In genere anche la forma polimerica ha un contenuto compreso fra il 30% e l'80% di MDI monomerico. Tuttavia si assume che, aumentando la lunghezza della catena polimerica, diminuisca la reattività della specie chimica nei confronti delle reazioni di addizione elettrofila, che possono verificarsi con alcune biomolecole (DFG, 2015). Studi sperimentali condotti sui ratti hanno inoltre confermato che la disponibilità sistemica del MDI è maggiore di quella della forma oligomerica o del PMDI (Pauluhn, 2002 a; Pauluhn *et al.*, 2006).

I principali effetti tossici, come dimostrato da studi sperimentali condotti sia sull'animale che sull'uomo, sono l'irritazione e la sensibilizzazione delle vie respiratorie, evidenziando come l'organo target degli effetti tossici di MDI siano i polmoni (DFG, 2015). Studi di esposizione a lungo termine su ratti hanno dimostrato l'insorgenza di irritazione cronica del tratto respiratorio, registrando anche un caso di adenoma polmonare, a seguito dell'esposizione continuativa ad un aerosol di MDI alla concentrazione di 2 mg/m<sup>3</sup>. Da studi condotti sull'uomo, il contatto prolungato cutaneo di MDI ha evidenziato l'induzione di un'iperresponsività a carico delle vie aeree (DFG, 2015) e analoghi studi condotti su animali hanno dimostrato un effetto sensibilizzante a carico della cute per il MDI, ma non per il PMDI. A seguito dell'esposizione a MDI si è osservata anche l'insorgenza di dermatiti da contatto, ma non ci sono evidenze analoghe per quanto riguarda il PMDI.

Per quanto riguarda il meccanismo d'azione, a seguito dell'esposizione per inalazione la molecole di MDI reagiscono con le specie nucleofile a basso e ad alto peso molecolare presenti nella mucosa respiratoria, in particolare con le molecole di glutatione (GSH).

Gli addotti e coniugati delle biomolecole a basso peso molecolare vengono successivamente assorbiti dall'organismo, mentre gli addotti ad alto peso molecolare vengono eliminati mediante meccanismo di *clearance*. Per quanto riguarda il metabolismo, si è ipotizzato che gli addotti a basso peso molecolare subiscano idrolisi e degradazione alle corrispondenti diammine, che vengono successivamente acetilate, in particolare si sono osservati prodotti di acetilazione degli addotti di MDI e GSH. Ad oggi non sono stati osservati effetti mutageni a carico di MDI o di PMDI, nemmeno in studi di esposizione a lungo termine, né effetti teratogeni.

Per quanto riguarda l'1,6-HDI, Flack e coll. hanno presentato il ciclo metabolico basato su reazioni enzimatiche e non, con cui questo diisocianato interagisce con il nostro organismo (figura 8).



**Figura 8** Schema del metabolismo proposto per l'1,6-HDI (Flack *et al.*, 2010).

Anche per l'1,6-HDI il meccanismo metabolico proposto prevede reazioni di coniugazione e idrolisi alla corrispondente diammina, la quale a sua volta può coniugarsi con alcune proteine, macromolecole o dare prodotti di acetilazione. Proprio l'interazione con le proteine, a questo livello del metabolismo dell'HDI, potrebbe dare origine ad apteni, originando quindi l'effetto sensibilizzante spesso associato a tali sostanze (ACGIH, 2015). In generale gli effetti tossicologici osservati per questa molecola sono analoghi a quelli evidenziati anche dagli altri diisocianati, la maggiore diffusione ed utilizzo in ambito industriale fino a qualche decennio fa, avevano fatto registrare per l'HDI il maggior numero di asma indotto da isocianato.

## **Patologie respiratorie occupazionali**

Fra le patologie respiratorie croniche registrate a seguito dell'esposizione occupazionale a diisocianati le più importanti sono l'asma, l'alveolite allergica estrinseca e la BPCO (Bronco Pneumopatia Cronico Ostruttiva). A partire dagli ultimi decenni, in particolare, l'asma rappresenta una delle più diffuse patologie respiratorie croniche su scala mondiale, coinvolgendo circa 300 milioni di persone nei paesi industrializzati, dove negli ultimi 30 anni si è osservato un progressivo aumento fino ad arrivare ad una stabilizzazione dei casi registrati (prevalenze del 10-12% negli adulti e del 15% nei bambini); fra il 5% e il 25% dei casi riportati per l'adulto risulta essere correlato al lavoro (Ameille *et al.*, 2006). Nonostante siano note più di 350 sostanze con potenziale effetto asmogeno (Bernstein *et al.*, 1993; Testi *et al.*, 2009), da recenti studi è emerso che più dell'80% di tutti i casi di asma occupazionale sono riconducibili a pochi agenti eziologici: tra questi i diisocianati rappresentano i principali agenti, con il 42% dei casi riconosciuti (Mapp *et al.*, 2005); ciò si deve sia per la loro larga diffusione in svariati settori industriali oltre che in contesti domestici, sia per le proprietà chimico-fisiche che li contraddistinguono.

Per asma occupazionale si intende “una patologia respiratoria caratterizzata da una limitazione variabile del flusso aereo e/o da una stabile iperreattività bronchiale, dovute all'esposizione a sostanze, semplici o complesse, presenti nell'ambiente di lavoro e con nesso di causa con la malattia” (Bernstein *et al.*, 1993). La medicina non ha ancora elucidato in maniera chiara il meccanismo che sottende ad un'asma indotta da diisocianati, ma la via immunologica sembrerebbe quella più probabile (Mapp, 2001). La diagnosi eziologica di asma può essere formulata mediante un test di stimolazione bronchiale con l'agente specifico (SIC). All'asma si associano frequentemente anche altre manifestazioni, spesso anche dopo la cessazione dell'esposizione all'agente asmogeno, ad esempio uno stato di infiammazione cronica delle vie aeree (iperresponsività bronchiale aspecifica). È importante sottolineare come non siano ancora noti i livelli occupazionali in grado di assicurare che non si verifichi l'insorgenza di asma nei lavoratori esposti, probabilmente anche perché i livelli ambientali efficaci sull'apparato respiratorio per tali sostanze si ritiene siano estremamente bassi. Inoltre va ricordato che soggetti sensibilizzati possono presentare sintomatologie o patologie respiratorie a concentrazioni di sostanza inferiori rispetto a quelle che l'hanno originata (Chan-Yeung *et al.*, 1995). La spirometria costituisce l'esame di primo livello nel sospetto clinico di asma; oltre all'analisi spirometrica, può essere consigliabile eseguire una valutazione allergologica approfondita, mediante test allergologici cutanei, come indagine di primo livello utilizzando estratti allergenici standardizzati, e/o dosaggio delle IgE specifiche sieriche, come esame di secondo livello. Nel caso dei diisocianati non sono disponibili esami diagnostici di primo livello, quali test allergologici cutanei (*Skin Prick Test*, SPT) specifici, oppure

ve ne sono di carattere sperimentale per la determinazione eziologica di asma indotto da diisocianati. Vi è infine la possibilità di condurre test di provocazione bronchiale specifici con agenti occupazionali, quali i diisocianati, per valutare la presenza di una condizione definita iperreattività bronchiale aspecifica (IBA) o la presenza di asma.

## NORMATIVE E REGOLAMENTAZIONI

Per quanto riguarda la valutazione dell'esposizione a diisocianati in ambiente di lavoro, in assenza di normative vigenti su territorio nazionale, si fa riferimento a quanto proposto dall'*American Conference of Governmental Industrial Hygienists* (ACGIH), che per il 2018 ha adottato dei valori limite di soglia ponderati sulle 8 ore lavorative (TLV-TWA®) o su brevi periodi di esposizione (TLV-STEL®), per tutte le specie prese in considerazione nel progetto di ricerca e per alcuni di essi ha adottato anche degli indici biologici di esposizione (BEI®). I valori adottati per l'anno 2018 sono riportati in tabella VIII.

**Tabella VIII** Valori limite e classificazioni adottate dall'ACGIH per 1,6-HDI, 4,4'-MDI, 2,4-TDI e 2,6-TDI (ACGIH, 2018).

<b>SOSTANZA [CAS] (anno della Documentation)</b>	<b>TLV-TWA® ppm</b>	<b>TLV-STEL® ppm</b>	<b>ANNOTAZIONI</b>	<b>EFFETTI CRITICI</b>
<b>Toluene diisocianato, 2,4- o 2,6- (o come miscela) [584-84-9; 91-08-7] (2015)</b>	0,001 IFV	0,005 IFV	cute; senD; senR; A3 BEI®	asm; fnpl; irrt oclr
<b>Diisocianato di difenilmetano [101-68-8] (1985)</b>	0,005	-	-	sen rspr
<b>Diisocianato di esametilene [822-06-0] (1985)</b>	0,005	-	BEI®	irrt TRS; sen rspr

IFV = frazione inalabile e vapori

In particolare si può osservare come esista un TLV-TWA® per tutte i 3 diisocianati considerati, ma solo per il più tossico (TDI) esiste un TLV-STEL®. Dai dati riportati in tabella VIII, inoltre, si può

notare che, mentre il TLV-TWA® di MDI e di HDI siano invariati dal 1985, l'analogo valore soglia per il TDI è stato recentemente aggiornato (proposta del 2015, adottata nel 2016), abbassando il valore limite ponderale da 0,005 ppm a 0,001 ppm ed il valore limite di breve esposizione da 0,02 ppm a 0,003 ppm, inserendo però la specifica indicazione di valutare la frazione inalabile delle polveri ed i vapori per la determinazione del livello di sostanza aerodispersa. Lo stesso anno l'ACGIH ha proposto la modifica anche delle annotazioni relative alla classe di cancerogenicità per il TDI, passando da A4 (sostanza non classificabile cancerogena per l'uomo) ad A3 (cancerogeno confermato per gli animali, con pertinenza non nota per l'uomo), aggiungendo inoltre l'indicazione di sensibilizzante cutaneo e la considerazione che l'esposizione cutanea possa contribuire in maniera significativa all'esposizione in ambiente di lavoro. La notazione "Cute", infatti, indica che non si possono escludere situazioni in cui il lavoratore possa essere sovraesposto per via cutanea alla sostanza, nonostante il livello ambientale risulti pari o inferiore al TLV TWA®.

Per quanto riguarda la definizione di un BEI®, a partire dal 2016 l'ACGIH ha adottato la proposta di modifica fatta nel 2015 per il TDI, con un valore di concentrazione nelle urine pari a 5 µg/grammo di creatinina, tutt'ora in corso di adozione. L'aggiornamento dei valori limite di esposizione per tale diisocianato è corredato anche da un'estesa "Documentazione dei valori limite di soglia e indici biologici di esposizione" curata e redatta dalla stessa ACGIH, all'interno della quale si possono reperire anche le informazioni che hanno portato all'adozione di tali valori limite, unitamente all'adozione della notazione "Ns" (non specifico) per il metabolita del TDI, ovvero di sostanza che può essere presente nell'organismo anche a seguito dell'esposizione ad altri inquinanti, siano essi in ambiente lavorativo o di vita.

Va sottolineato come nel 2014 l'ACGIH abbia proposto l'adozione di un BEI® per i metaboliti urinari di 1,6-HDI, di 2,4-TDI e di 2,6-TDI (le corrispondenti diammine, ovvero 1,6-HDA, 2,4-TDA e 2,6-TDA rispettivamente) ma che nel 2015 sia stato adottato solo quello relativo all'1,6-HDA, pari a 15 µg/g creatinina.

A tal proposito, l'agenzia inglese HSE (*Health and Safety Executive*) in accordo con il COSHH (*Control of Substances Hazardous to Health Regulation*) nel 2005 ha proposto un valore guida (BMVG, *Biological Monitoring Guidance Value*) per i metaboliti urinari dei principali isocianati utilizzati in ambito industriale, pari a 0,5 µmol/mol creatinina (HSE, 2005). In questo caso si tratta di un valore guida da applicarsi genericamente a scopo preventivo e che non costituisce un limite definito per legge, quanto un riferimento per il contenimento dell'esposizione professionale da attuarsi secondo uno specifico protocollo proposto da tale agenzia ("G408-Urine sampling for

isocyanateexposuremeasurement”, Biological Monitoring Methods October 2005, COSHH essentials: General guidance, [www.hse.gov.uk/](http://www.hse.gov.uk/)).

Nonostante il campo della ricerca in tale ambito sia ancora aperto e in via di evoluzione, ad oggi ci sono una serie di azioni che si possono realizzare per interpretare i risultati del monitoraggio ambientale e biologico dell’esposizione a diisocianati in ambito professionale.

## **Regolamento REACH e CLP**

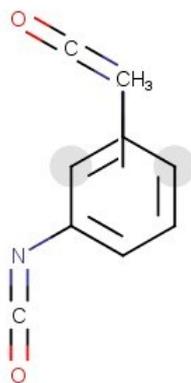
Il regolamento REACH prevede che i produttori, gli importatori o gli utilizzatori a valle debbano classificare ed etichettare le sostanze e le miscele pericolose, al fine di garantire la sicurezza e la salute dell’uomo e dell’ambiente, nei processi che coinvolgono la produzione, l’etichettatura e il confezionamento di sostanze o miscele pericolose.

Per quanto riguarda la salute, i pericoli che destano le maggiori preoccupazioni [cancerogenicità, mutagenicità, tossicità per la riproduzione (CMR) e sensibilizzazione delle vie respiratorie] e per altre sostanze individuate caso per caso, è previsto che la classificazione e l’etichettatura siano armonizzate in tutta l’Unione Europea (CLH), per garantire un’adeguata gestione dei rischi.

Le classificazioni armonizzate sono elencate nell’allegato VI al regolamento CLP e devono essere applicate da tutti i fabbricanti, gli importatori o gli utilizzatori a valle di tali sostanze e delle miscele contenenti tali sostanze. Per quanto riguarda i diisocianati, il cui effetto sensibilizzante è noto e comprovato da innumerevoli studi e agenzie operanti nel campo della prevenzione e della salvaguardia della salute dei lavoratori, il livello di classificazione è riassunto di seguito.

### **1. 2,4-TDI e 2,6-TDI**

Il TDI risulta classificato e registrato in forma armonizzata secondo la normativa CLP [*Harmonised classification - Annex VI of Regulation (EC) No 1272/2008 (CLP Regulation)*], sia per i singoli isomeri, che per la miscela delle due specie. In tabella IX si riportano i nominativi e i corrispondenti numeri identificativi della specie inserita nella classificazione armonizzata proposta dall’ECHA; in tabella X si riporta un estratto delle informazioni relative alla classificazione CLP.



**Figura 9** Formula di struttura del “2-methyl-*m*-phenylene diisocyanate” (m-TDI), rappresentativa di entrambi gli isomeri 2,4- e 2,6-TDI.

La formula di struttura riportata in Figura 9 e le informazioni sulle principali proprietà tossicologiche dei due isomeri del TDI, sono reperibili nella sezione dedicata del portale dell’*European Chemical Agency*, ECHA (<https://echa.europa.eu/it/substance-information/-/substanceinfo/100.043.369>).

**Tabella IX** Estratto della scheda informativa per il TDI.

Identificazione chimica internazionale	Numero EC / N° lista	CAS	Formula Molecolare	Traduzioni del nome della sostanza
toluene-2,6-di-isocyanate	202-039-0	91-08-7	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	diisocianato di 2-metil- <i>m</i> -fenilene,
toluene-2,4-di-isocyanate	209-544-5	584-84-9		diisocianato di 4-metil- <i>m</i> -fenilene,
2-methyl- <i>m</i> -phenylene diisocyanate	247-722-4	26471-62-5		diisocianato di <i>m</i> -tolilidene, 2,4-toluen-diisocianato, 2,6-toluen-diisocianato

In tabella X sono riportate le frasi H, unitamente alle indicazioni di “pericolo” e ai pittogrammi da riportare esplicitamente sulle etichette. Le classi di pericolo sono: irritante per la pelle di categoria 2, irritante oculare di categoria 2, sensibilizzante per la cute di categoria 2, tossicità acuta di categoria 2, tossicità organo specifica per singola esposizione di categoria 3, sensibilizzante

respiratorio di categoria 1, cancerogeno di categoria 2 e tossicità cronica per l'ambiente acquatico di categoria 3.

Va sottolineato che è prevista la classificazione di sensibilizzante respiratorio di classe 1 per miscele in cui è presente una quantità maggiore o uguale allo 0,1% in peso sul totale.

**Tabella X** Estratto della scheda informativa, con indicazioni della classificazione, dell'etichettatura, con i pittogrammi e le annotazioni specifiche per il TDI (<https://echa.europa.eu/it/substance-information/-/substanceinfo/100.043.369>).

Classification		Labelling			Specific Concentration limits, M-Factors, Acute Toxicity Estimates (ATE)
Hazard Class and Category Code(s)	Hazard Statement Code(s)	Hazard Statement Code(s)	Supplementary Hazard Statement Code(s)	Pictograms, Signal Word Code(s)	
Skin Irrit. 2	H315	H315		GHS08 GHS06 Dgr	Resp. Sens. 1; H334: C ≥ 0,1 %
Eye Irrit. 2	H319	H319			
Skin Sens. 1	H317	H317			
Acute Tox. 2	H330	H330			
STOT SE 3	H335	H335			
Resp. Sens. 1	H334	H334			
Carc. 2	H351	H351			
Aquatic Chronic 3	H412	H412			
Signal Words	Pictograms				
Danger	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>Systemic health hazard</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Toxic cat. 1 - 3</p> </div> </div>				

## 2. 4,4'-MDI

L'MDI risulta classificato e registrato in forma armonizzata secondo la normativa CLP [*Harmonised classification - Annex VI of Regulation (EC) No 1272/2008 (CLP Regulation)*]. In tabella XI si riportano i nominativi e i corrispondenti numeri identificativi della specie inserita nella classificazione armonizzata proposta dall'ECHA; in tabella XII si riporta un estratto di quanto compare nel portale dell'ECHA, in relazione alla classificazione CLP del MDI (<https://echa.europa.eu/it/registration-dossier/-/registered-dossier/25170/2/1>).

**Tabella XI** Estratto della scheda informativa per il 4,4'-MDI presente nel portale dell'*European Chemical Agency*, ECHA.

<b>Identificazione chimica internazionale</b>	<b>Numero EC / N° lista</b>	<b>CAS</b>	<b>Formula Molecolare</b>	<b>Traduzioni del nome della sostanza</b>
4,4'-methylenediphenyl diisocyanate, diphenylmethane-4,4'-diisocyanate	202-966-0	101-68-8	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	diisocianato di 4,4'-metilendifenile, isocianato di o-(p-isocianatobenzil)fenile, diisocianato di 2,2'-metilendifenile, metilendifenilediisocianato, difenilmetan-2,4'-diisocianato, difenilmetan-4,4'-diisocianato, difenilmetan-2,2'-diisocianato

**Tabella XII** Estratto della scheda informativa, con indicazioni della classificazione, dell'etichettatura, con i pittogrammi e le annotazioni specifiche per il 4,4'-MDI (<https://echa.europa.eu/it/information-on-chemicals/cl-inventory-database/-/discli/details/5150>).

Classification		Labelling			Specific Concentration limits, M-Factors, Acute Toxicity Estimates (ATE)
Hazard Class and Category Code(s)	Hazard Statement Code(s)	Hazard Statement Code(s)	Supplementary Hazard Statement Code(s)	Pictograms, Signal Word Code(s)	
Skin Irrit. 2	H315	H315		GHS08 GHS07 Dgr	STOT SE 3; H335: C ≥ 5 % Resp. Sens. 1; H334: C ≥ 0,1 % Skin Irrit. 2; H315: C ≥ 5 % Eye Irrit. 2; H319: C ≥ 5 %
Eye Irrit. 2	H319	H319			
Skin Sens. 1	H317	H317			
Acute Tox. 4	H330	H330			
STOT SE 3	H335	H335			
Resp. Sens. 1	H334	H334			
Carc. 2	H351	H351			
STO RE 2	H373	H373			
Aquatic Chronic 3	H412	H412			
<b>Signal Words</b>	<b>Pictograms</b>				
Danger	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>Systemic health hazard</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Toxic cat. 4 Irritant cat. 2 or 3 Lower systemic health hazards</p> </div> </div>				

In tabella XII sono riportate le frasi H per il 4,4'-MDI, unitamente all'indicazione "pericolo" e ai pittogrammi da riportare esplicitamente sulle etichette. Va sottolineato come per tale sostanza le classi di pericolo indicate sono: irritante per la pelle di categoria 2, irritante oculare di categoria 2, sensibilizzante per la cute di categoria 1, tossicità acuta di categoria 4, tossicità organo specifica per singola esposizione di categoria 3, sensibilizzante respiratorio di categoria 1, cancerogeno di categoria 2, tossicità organo specifica per esposizione ripetuta di categoria 2 e tossicità cronica per l'ambiente acquatico di categoria 3.

Sono previste inoltre una serie di classificazioni specifiche in caso di miscele commerciali con un determinato contenuto di 4,4'-MDI, definito in termini di percentuale in peso rispetto al peso totale del prodotto. In particolare, in caso di contenuto maggiore o uguale allo 0,1% di questo diisocianato l'intera miscela assume la classificazione di sensibilizzante respiratorio di categoria 1, mentre in caso di contenuto maggiore o uguale al 5% la classificazione adottata per la miscela è di tossicità organo specifica per singola esposizione di categoria 3, irritante per la pelle di categoria 2 e di irritante oculare di categoria 2.

Come indicato nell'Allegato XVII del Regolamento REACH "Condizioni di restrizione", a partire dal dicembre 2010 sono state introdotte le seguenti condizioni restrittive in relazione alla produzione, alla commercializzazione, al trasporto e all'utilizzo del gruppo di sostanze denominate "MDI" (CAS 26447-40-5), comprendente le seguenti specie chimiche: 4,4'-Metilen difenil diisocianato (CAS 101-68-8), 2,4'- Metilen difenil diisocianato (CAS 5873-54-1) e 2,2'- Metilen difenil diisocianato (CAS 2536-05-2).

Le condizioni di restrizione prevedono che:

1. a partire dal 27 dicembre 2010, tale gruppo di sostanze non può essere immesso nel mercato come componente di una miscela in quantità uguali o superiori allo 0,1% in peso di "MDI" per vendita al pubblico, a meno che il venditore non garantisca, preventivamente la messa in mercato, che l'imballaggio della suddetta categoria di sostanze rispetti le seguenti regole:
  - a. contenga guanti protettivi in accordo con i requisiti posti dalla Direttiva del Consiglio delle Comunità Europee 89/686/EEC (89/686/EEC) e come recepito dal Regolamento (UE) 2016/425 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 9 marzo 2016, in sostituzione effettiva della 89/686/EEC a partire dal 21 aprile 2018 sui dispositivi di protezione;
  - b. sia marcato visibilmente, in maniera leggibile ed indelebile quanto segue, senza pregiudicare altre legislazioni comunitarie riguardanti la classificazione, l'imballaggio e l'etichettatura di sostanze e miscele:

- “Persone sensibilizzate agli isocianati possono sviluppare reazione allergica, qualora usino questo prodotto.”
- “Persone affette da asma, eczema o problemi cutanei dovrebbero evitare il contatto, incluso il contatto cutaneo, con questo prodotto.”
- Questo prodotto non dovrebbe essere utilizzato in condizioni di scarsa ventilazione, a meno di indossare una maschera respiratoria protettiva, dotata dell’opportuno filtro per gas (*i.e.* tipo A1 in accordo con quanto prevista dagli standard EN 14387).

2. In deroga, quanto indicato al punto 1.a. non si applica alle sostanze adesive calde, fuse.

### 3. 1,6-HDI

Per quanto riguarda l’esametilene diisocianato non è presente, ad oggi, una classificazione armonizzata secondo la normativa CLP (*Harmonised classification - Annex VI of Regulation (EC) No 1272/2008 (CLP Regulation)*) per tale sostanza o per formulazioni oligomeriche commerciali a base di 1,6-HDI.

Ciò nonostante anche per l’1,6-HDI, nell’allegato VI del regolamento, sono previste una serie di classificazioni ed indicazioni specifiche che individuano le proprietà tossicologiche ed i pericoli per la salute e per l’ambiente associati alla produzione e manipolazione di tale sostanza. In tabella XIII si riportano i nominativi e i corrispondenti numeri identificativi della specie inserita nel *database* dall’ECHA; in tabella XIV si riporta un estratto di quanto compare nel portale dell’ECHA, in relazione alla classificazione CLP dell’HDI (<https://echa.europa.eu/it/substance-information/-/substanceinfo/100.011.350>).

**Tabella XIII** Estratto della scheda informativa per l’1,6- HDI presente nel portale dell’ *European Chemical Agency*, ECHA.

<b>Identificazione chimica internazionale</b>	<b>Numero EC / N° lista</b>	<b>CAS</b>	<b>Formula Molecolare</b>	<b>Traduzioni del nome della sostanza</b>
hexamethylene diisocyanate, hexamethylene-di-isocyanate	212-485-8	822-06-0	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	esametilene diisocianato

In tabella XIV sono riportate le frasi H per questa specie chimica, unitamente all'indicazione "pericolo" e ai pittogrammi da riportare esplicitamente sulle etichette. Va sottolineato come per tali sostanze le classi di pericolo indicate sono: sensibilizzante per la pelle di categoria 1, sensibilizzante oculare di categoria 1, tossicità organo specifica per singola esposizione di categoria 3, irritante oculare di categoria 2, irritante cutaneo di categoria 2, tossicità acuta di categoria 3 ed altre indicazioni che non rientrano (ancora) in una classificazione armonizzata di questa sostanza. Va sottolineato che è prevista la classificazione di sensibilizzante respiratorio di classe 1 e di sensibilizzante cutaneo di categoria 1 per miscele in cui è presente una quantità maggiore o uguale allo 0,5% in peso sul totale di HDI.

**Tabella XIV** Estratto della scheda informativa, con indicazioni della classificazione, dell'etichettatura, con i pittogrammi e le annotazioni specifiche per l'HDI (<https://echa.europa.eu/it/substance-information/-/substanceinfo/100.011.350>).

Classification		Labelling			Specific Concentration limits, M-Factors, Acute Toxicity Estimates (ATE)
Hazard Class and Category Code(s)	Hazard Statement Code(s)	Hazard Statement Code(s)	Supplementary Hazard Statement Code(s)	Pictograms, Signal Word Code(s)	
AcuteTox.3 *	H331	H331	GSH05	GHS06 GHS08 Dgr	* Resp. Sens. 1; H334: C ≥ 0,5 %  Skin Sens. 1; H317: C ≥ 0,5 %
STOT SE 3	H335	H319			
Skin Irrit.2	H315	H335			
Eye Irrit.2	H319	H315			
Resp.Sens1	H334	H334			
SkinSens.1	H317	H317			
<b>Signal Words</b>	<b>Pictograms</b>				
Danger	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>Systemic health hazard</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Acute Toxicity</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Corrosive cat. 1</p> </div> </div>				

## Portale “GESTIS”

L'Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (IFA, analogo tedesco dell'INAIL italiano) consente la libera consultazione di uno dei più completi *database* su scala mondiale, relativo ai valori limite delle sostanze chimiche pericolose (IFA - <https://www.dguv.de/ifa%3B/index.jsp>). In particolare, per quanto riguarda TDI, MDI e HDI dispersi tal quali o in forma aggregata in aria ambiente, si riportano le relative indicazioni dei valori limite internazionali, come raccolte dall'IFA (tabelle XV – XX).

**Tabella XV** Valori limite relativi al gruppo di molecole denominato “diisocianati”, riportato sul portale GESTIS *International Limit Values* dell'IFA.

Sostanza	Diisocianati			
	CAS No.			
	Valore Limite – 8 ore		Valore Limite – breve termine	
	ppm	mg/m <sup>3</sup>	ppm	mg/m <sup>3</sup>
Irlanda		0,02 (1)		0,07 (1) (2)
Nuova Zelanda		0,02 (1) (2)		0,07 (1) (2)
Svezia			0,005 (1)	
	<b>Note</b>			
Irlanda	(1) come -NCO (2) periodo di riferimento pari a 15 minuti			
Nuova Zelanda	(1) tutti, come -NCO (2) questi valori si applicano a tutti gli isocianati, inclusi i prepolimeri, presenti in ambiente di lavoro in aria, come vapori, nebbie o polveri.			
Svezia	(1) valore limite per breve tempo di esposizione, valore medio su 5 minuti			

**Tabella XVI** Valori limite relativi al gruppo di molecole denominato “isocianati, tutti (come –NCO)”, riportato sul portale GESTIS *International Limit Values* dell’IFA.

<b>Sostanza</b>	Isocianati, tutti (come –NCO)			
<b>CAS No.</b>	-			
	<b>Valore Limite – 8 ore</b>		<b>Valore Limite – breve termine</b>	
	ppm	mg/m <sup>3</sup>	ppm	mg/m <sup>3</sup>
Australia		0,02		0,07
Finlandia				0,035 (1)
Regno Unito		0,02		0,07
Svizzera	0,005	0,02	0,005	0,02
	<b>Note</b>			
Finlandia	(1) valore medio pari a 15 minuti			

**Tabella XVII** Valori limite relativi al gruppo di molecole denominato “esametilen diisocianato (HDI)”, riportato sul portale GESTIS *International Limit Values* dell’IFA.

<b>Sostanza</b>	Esametilen diisocianato (HDI)			
<b>CAS No.</b>	822-06-0			
	<b>Valore Limite – 8 ore</b>		<b>Valore Limite – breve tempo</b>	
	ppm	mg/m <sup>3</sup>	Ppm	mg/m <sup>3</sup>
Australia	(1)			
Austria	0,005	0,035	0,005	0,035
Belgio	0,005	0,034		
Canada - Ontario	0,005		0,02 (1)	
Canada - Québec	0,005	0,034		
Corea del Sud	0,005	0,034		
Danimarca	0,005	0,035 (1)	0,01	0,07

Francia	0,01	0,075	0,02	0,15
Germania (AGS)	0,005 (1)	0,035 (1)	0,005 (1) (2) 0,01 (1) (3)	0,035 (1) (2) 0,07 (1) (3)
Germania (DFG)	0,005 (1)	0,035 (1)	0,005 (1) (2) (3)	0,035 (1) (3)
Giappone - JSOH	0,005	0,034		
Irlanda	0,005 (1)			
Israele	0,005	0,034		
Italia		1		
Lettonia		0,05		
Polonia		0,04		0,08
Repubblica Popolare Cinese		0,03		
Romania	0,007	0,05	0,14 (1)	1 (1)
Singapore	0,005	0,034		
Spagna	0,005	0,035		
Svezia	0,002	0,02	0,005 (1)	0,03 (1)
Stati Uniti – NIOSH		0,035		0,14 (1)
Ungheria		0,035		0,035
	<b>Note</b>			
Australia	(1) vedi “isocianati, tutti”			
Canada – Ontario	valore limite <i>Ceiling</i>			
Germania (AGS)	(1) Vapori e aerosol inalabili (2) periodo di riferimento pari a 15 minuti (3) valore limite <i>Ceiling</i>			
Germania (DFG)	(1) Frazione inalabile e vapori (2) periodo di riferimento pari a 15 minuti (3) non dovrebbe essere superato un valore temporaneo pari a 0,01 mL/m <sup>3</sup> (0,070 mg/m <sup>3</sup> ).			
Irlanda	(1) come –NCO			
Romania	(1) valore medio pari a 15 minuti			
Spagna	<i>Sen</i>			

Stati Uniti – NIOSH	(1) Valore limite <i>Ceiling</i> (10 minuti)
Svezia	(1) Valore limite a breve termine, valore medio pari a 5 minuti

**Tabella XVIII** Valori limite relativi al gruppo di molecole denominato “esametilene diisocianato(HDI), prepolimero”, riportato sul portale GESTIS *International Limit Values* dell’IFA.

<b>Sostanza</b>	Esameilen diisocianato (HDI), prepolimero			
<b>CAS No.</b>	-			
	<b>Valore Limite – 8 ore</b>		<b>Valore Limite – breve termine</b>	
	Ppm	mg/m <sup>3</sup>	Ppm	mg/m <sup>3</sup>
Francia				1

**Tabella XIX** Valori limite relativi al gruppo di molecole denominato “metilene bisfenil isocianato (MDI)”, riportato sul portale GESTIS *International Limit Values* dell’IFA.

<b>Sostanza</b>	Metilene bisfenil isocianato (MDI)			
<b>CAS No.</b>	101-68-8			
	<b>Valore Limite – 8 ore</b>		<b>Valore Limite – breve tempo</b>	
	ppm	mg/m <sup>3</sup>	ppm	mg/m <sup>3</sup>
Australia	(1)			
Austria	0,005	0,05	0,01	0,1
Belgio	0,005	0,052		
Canada - Ontario	0,005		0,02 (1)	
Canada - Québec	0,005	0,051		
Corea del Sud	0,005	0,055		
Danimarca	0,005	0,05	0,01	0,1
Francia	0,01	0,1	0,02	0,2
Germania (AGS)		0,05 (1)		0,05 (1) (2) 0,1 (1) (3)

Germania (DFG)		0,05 (1)		0,05 (1) (2) (3)
Giappone - JSOH		0,05		
Irlanda		0,02 (1)		0,07 (1) (2)
Israele	0,005	0,051	0,02 (1)	0,21 (1)
Polonia		0,05		0,2 (1)
Repubblica Popolare Cinese		0,05		0,1 (1)
Romania				0,15 (1)
Singapore	0,005	0,051		
Spagna	0,005	0,052		
Svezia	0,002	0,03	0,005 (1)	0,05 (1)
Stati Uniti – NIOSH	0,005	0,05	0,02 (1)	0,2 (1)
Stati Uniti – OSHA			0,02	0,2
Ungheria		0,05		0,05
	<b>Note</b>			
Australia	(1) vedi “isocianati, tutti”			
Canada - Ontario	(1) valore limite <i>Ceiling</i>			
Germania (AGS)	(1) Vapori e aerosol inalabili (2) periodo di riferimento pari a 15 minuti (3) valore limite <i>Ceiling</i>			
Germania (DFG)	(1) Frazione inalabile e vapori (2) periodo di riferimento pari a 15 minuti (3) non dovrebbe essere superato un valore temporaneo pari a 0,1 mg/m <sup>3</sup> .			
Irlanda	(1) come –NCO (2) periodo di riferimento pari a 15 minuti			
Israele	(1) valore medio pari a 15 minuti			
Polonia	(1) valore limite <i>Ceiling</i>			
Repubblica Popolare Cinese	(1) valore medio pari a 15 minuti			

Romania	(1) valore medio pari a 15 minuti
Spagna	<i>Sen</i>
Stati Uniti – NIOSH	(1) Valore limite <i>Ceiling</i> (10 minuti)
Svezia	(1) Valore limite a breve termine, valore medio pari a 5 minuti

**Tabella XX** Valori limite relativi al gruppo di molecole denominato “difencilmetano diisocianato polimerico”, riportato sul portale GESTIS *International Limit Values* dell’IFA.

<b>Sostanza</b>	Difenilmetano diisocianato polimerico			
<b>CAS No.</b>	9016-87-9			
	<b>Valore Limite – 8 ore</b>		<b>Valore Limite – breve termine</b>	
	Ppm	mg/m <sup>3</sup>	Ppm	mg/m <sup>3</sup>
Germania (AGS)		0,05 aerosol inalabile		0,05 (1) 0,1 (2)
Germania (DFG)		0,05 frazione inalabile (1)		0,05 frazione inalabile (1) (2) (3)
	<b>Note</b>			
Germania (AGS)	(1) Valore medio pari a 15 minuti (2) valore limite <i>Ceiling</i>			
Germania (DFG)	(1) “MDI polimerico” è un MDI di tipo tecnico con un contenuto di 4,4’-metilenebisfenil diisocianato compreso fra il 30% e l’80% p/p, il rimanente è costituito da oligomeri del MDI e specie omologhe del MDI. (2) <i>STV</i> valore medio nel tempo di 15 minuti (3) un valore istantaneo pari a 0,1 mg/m <sup>3</sup> non dovrebbe essere superato.			

## ESPOSIZIONE OCCUPAZIONALE A DIISOCIANATI

Nell’ambito dell’igiene industriale ricerche ventennali si sono focalizzate sulla ricerca e sull’ottimizzazione della valutazione dell’esposizione dei lavoratori in ambito professionale. Considerando le caratteristiche chimico-fisiche e in particolare la tensione di vapore dei diisocianati, si può immaginare come l’aria ambiente sia la matrice di diffusione primaria di tali sostanze, soprattutto per HDI, per TDI e in misura nettamente minore per MDI. Tuttavia l’inquinamento ambientale in ambito lavorativo non riguarda solo l’aria ambiente ma anche le

superfici di lavoro esposte a determinate lavorazioni (dalle manipolazioni meccaniche, alle formulazioni con altri prodotti chimici e alle operazioni ad alta temperatura). Va inoltre specificato che, essendo sostanze altamente reattive con diverse specie chimiche, la tipologia e complessità delle specie prodotte per interazione chimica secondaria non è determinabile a priori, rendendo così più complessa la valutazione dell'esposizione professionale dei lavoratori. Inoltre emerge sempre più chiaramente in studi recenti che il contributo dovuto all'assorbimento cutaneo è determinante nella definizione del livello di esposizione professionale.

## **MONITORAGGIO AMBIENTALE**

La valutazione dell'esposizione ad un determinato inquinante disperso in aria ambiente va realizzata mediante il monitoraggio ambientale in luogo di lavoro, con le opportune metodiche identificate per la sostanza d'interesse e per le mansioni ed operazioni identificate come quelle più a rischio di esposizione a tale specifica sostanza.

In generale i metodi riportati in letteratura prevedono il convogliamento controllato dell'aria attraverso filtri trattati con un opportuno reattivo o sistemi di convogliamento e gorgogliamento ("impinger") in soluzioni contenenti il reattivo. Il principio alla base è in ogni caso quello di sfruttare l'elevata reattività degli isocianati, a prescindere dallo stato fisico (allo stato di gas, vapore o aerosol di particelle solide) o dal livello di aggregazione (in forma di monomero, oligomero o polimero) in cui si trovano in ambiente di lavoro. Si tratta di un campionamento attivo di aria ambiente condotto durante l'attività lavorativa, realizzato mediante un sistema composto da una pompa che aspira l'aria ad un flusso opportuno, un tubo di collegamento in gomma ed una membrana impregnata di reagente che faccia passare l'aria campionata, trattenendo le particelle e/o i vapori della sostanza inquinante che si vuole rilevare. Il campionamento può essere sia di tipo "personale" (campionatore posto in zona respiratoria del lavoratore) che di tipo "ambientale" (campionatore posto su cavalletto a 1,60 m dal piano di calpestio).

L'OSHA (*Occupational Safety and Health Administration*), nel suo manuale dei metodi, riporta due metodiche di campionamento ed analisi relative al dosaggio degli isocianati (sito OSHA), ed in particolare:

- Metodo n° 42 per il monitoraggio ambientale di 1,6-HDI, 2,4-TDI e 2,6-TDI;
- Metodo n° 47 per il monitoraggio ambientale del 4,4'-MDI.

In entrambi i metodi, si utilizzano filtri impregnati con 1-(2-piridil) piperazina (1-2PP) contenuti in un selettore a “faccia aperta”, cui segue l’analisi in HPLC-UV o HPLC-fluorimetro. La differenza tra i due metodi è legata esclusivamente alla quantità di 1-2PP con cui vengono impregnati i filtri.

Gli isocianati reagiscono con l’1-2PP per dare i corrispondenti derivati che risultano essere stabili, rendendo possibile il campionamento di queste sostanze altamente reattive. In particolare le specie chimiche che si formano nelle membrane di campionamento sono:

- 2,6-bis(4-(2-piridil)-1-piperazilcarbamil) toluene per il 2,6-TDI;
- 2,4-bis(4-(2-piridil)-1-piperazilcarbamil) toluene per il 2,4-TDI;
- N,N'-(Metilen-bisfenilen)bis 4-(2-piridinil)-1-piperazino carbossiamide per il 4,4’-MDI;
- 1,6-bis(4-(2-piridil)-1-piperazilcarbamil) esano per l’1,6-HDI.

Il campionamento può avere una durata minima di 15 minuti, ma in genere viene protratto fino a 4 ore. I filtri devono essere conservati a bassa temperatura e al riparo dalla luce, per preservare la concentrazione nominale di reattivo e, quindi, l’efficacia nel rilevare i diisocianati aerodispersi (conservazione a 4°C fino a 6 mesi prima dell’utilizzo e a 4°C fino ad un massimo di 18 giorni dopo il monitoraggio ambientale).

## **MONITORAGGIO BIOLOGICO**

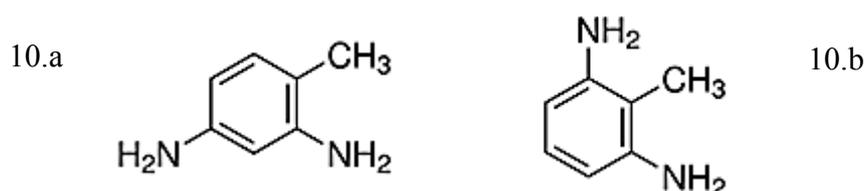
Il monitoraggio biologico costituisce uno strumento fondamentale per la valutazione dell’esposizione professionale a xenobiotici, in quanto permette di integrare le informazioni ottenute con il monitoraggio ambientale. Spesso, infatti, è possibile stabilire una correlazione tra i dati ottenuti dal monitoraggio ambientale ed i risultati del monitoraggio biologico (si veda Sennbro *et al.*, 2004; Geens *et al.*, 2012 a titolo di esempio). Esistono tuttavia anche lavori che presentano casi controversi, in cui vi è assenza di correlazione fra i dati ottenuti dal monitoraggio ambientale e quello biologico, e in particolare questo si è osservato quando non veniva preso in considerazione il contributo dell’esposizione cutanea alla determinazione della dose interna (ad esempio in Tinnerberg *et al.*, 1997, Austin, 2007, Gaines *et al.*, 2010, e Gaines *et al.*, 2011).

Dal punto di vista della valutazione dell’esposizione professionale va sottolineato come in ambiente di lavoro l’aria e le superfici siano presumibilmente inquinate dalla stessa miscela utilizzata come materia prima o ottenuta come prodotto finale, oltre che, nel caso specifico dei diisocianati, da un insieme complesso di derivati monomerici, oligomerici o polimerici, in forma di vapore oppure di particelle solide aerodisperse. I dati derivanti dal monitoraggio biologico assumono particolare importanza, in quanto tengono conto dell’esposizione personale attraverso tutte le vie di

penetrazione. Va sottolineato come, per la messa a punto di metodi analitici per il dosaggio di specifici inquinanti o di loro metaboliti, sia importante conoscere quali siano le concentrazioni ambientali a cui possono essere esposti i lavoratori, in modo da poter identificare un metodo adatto ai livelli analitici che si andranno poi a dosare nelle urine dei soggetti professionalmente esposti. Vanno infine considerati, se presenti, i valori limite stabiliti dalla normativa vigente o, in caso la legislatura nazionale non si pronunci in tal senso, si fa riferimento ai livelli di esposizione indicati dalle agenzie internazionali più importanti in materia di igiene e salute occupazionale; fra queste rappresentano un riferimento internazionale l'*American Conference of Governmental Industrial Hygienists*, ACGIH, il *National Institute of Occupational Safety and Health*, NIOSH, l'*Occupational Safety and Health Administration*, OSHA, il *Deutsche Forschungsgemeinschaft*, DFG e l'*Health and Safety Executive*, HSE.

### 1. 2,4-TDI e 2,6-TDI

Per quanto riguarda il TDI, in particolare nelle sue forme isomeriche 2,4-TDI e 2,6-TDI, il metabolita urinario osservato è la corrispondente diammina: in figura 10 si riporta la struttura molecolare delle due diammine isomeriche 2,4-TDA e 2,6-TDA. In tabella XXI si riporta il BEI® proposto dall'ACGIH nel 2012 per i lavoratori esposti a TDI (a una o a entrambe le specie 2,4- e 2,6-TDI, come singoli isomeri o in miscela) ed infine adottato a partire dal 2016 (ACGIH, 2016).



**Figura 10** Struttura molecolare delle diammine 2,4-TDA (10.a) e 2,6-TDA (10.b).

**Tabella XXI** Indice biologico di esposizione professionale adottato per il 2,4-TDI e il 2,6-TDI dall'ACGIH nel 2018.

SOSTANZA (anno della <i>Documentation</i> ) Indicatore biologico	Raccolta del campione	BEI® µg/g creatinina	NOTE
2,4-TDI , 2,6-TDI o come miscela di isomeri (2016) Toluendiammine nelle urine (*)	Fine turno lavorativo	5	Ns

\* con idrolisi; Ns= metabolita non specifico.

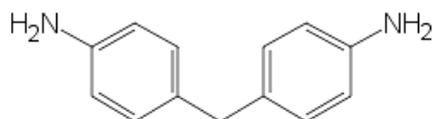
In tabella XXII sono riportati i più significativi lavori di letteratura relativi alla valutazione dell'esposizione a TDI mediante monitoraggio biologico, indicando in particolare la metodica analitica utilizzata, l'agente derivatizzante (laddove utilizzato) ed il limite di rilevabilità ottenuto.

**Tabella XXII** Principali metodi analitici e relativi limiti di rilevabilità (LR) o di quantificazione (LQ) in µg/L per il dosaggio del metabolita urinario del 2,4-TDI e del 2,6-TDI (HFBA = anidride eptafluorobutirrica, PFPA = anidride pentafluoropropionica).

<b>METODO ANALITICO</b>	<b>AGENTE DERIVATIZZANTE</b>	<b>LR (µg/L)</b>	<b>RIFERIMENTO BIBLIOGRAFICO</b>
GC-MS	PFPA	0,1	Brorson <i>et al.</i> , 1991
GC-MS NCI	HFBA	0,1	Mâitre <i>et al.</i> , 1993
LC-MS	-	< 1,0	Sakai <i>et al.</i> , 2002
LC-ESI MS/MS	PFPA	0,002	Marand <i>et al.</i> , 2004
GC-MS NCI	HFBA	0,1	Sakai <i>et al.</i> , 2005
GC-MSNCI	PFPA	0,4 (2,4-TDI) 0,2 (2,6-TDI)	Budnik <i>et al.</i> , 2011
GC-MS	HFBA	0,1 (LQ)	De Palma <i>et al.</i> , 2012
GC-MS NCI	HFBA	1,0 (LQ)	Geens <i>et al.</i> , 2012
GC-MS NCI	PFPA	0,1	Tinnerberg <i>et al.</i> , 2014
GC-MS NCI	HFBA	0,017 (2,4-TDA) 0,015 (2,6-TDA)	Świerczyńska-Machura <i>et al.</i> , 2015

## 2. 4,4'-MDI

In tabella XXIII sono raccolti i più significativi lavori di letteratura relativi alla valutazione dell'esposizione a MDI mediante monitoraggio biologico con determinazione della concentrazione del metabolita urinario difenilmetano 4,4'-diammina (4,4'-MDA), la cui struttura molecolare è riportata in figura 11; in tabella sono riportati anche la metodica analitica utilizzata, l'agente derivatizzante (ed il limite di rilevabilità ottenuto).



**Figura 11** Struttura molecolare della diammine 4,4'-MDA.

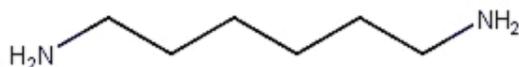
Ad oggi non è stata avanzata alcuna proposta di indice biologico di esposizione da parte dell'ACGIH, ma l'agenzia tedesca DFG, già a partire dal 1996 come BAT (*Biological Tolerance Value*) e dal 2006 come BLW (*Biologischer Leitwert*”, valore limite biologico), ha adottato un indice biologico di riferimento per valutare l'esposizione a MDI pari a 10 µg/L, corrispondente alla concentrazione urinaria di 4,4'-MDA dopo idrolisi del campione biologico (DFG, 2015). Analogamente l'agenzia inglese HSE ha proposto un indice biologico di riferimento per l'esposizione professionale a diisocianati, pari a 1,0 µmol di diammina per grammo di creatinina (HSE, 2005).

**Tabella XXIII** Principali metodi analitici e relativi limiti di rilevabilità (LR) in µg/L per il dosaggio del metabolita urinario del 4,4'-MDI (HFBA = anidride eptafluorobutirrica, PFPA = anidride pentafluoropropionica).

<b>METODO ANALITICO</b>	<b>AGENTE DERIVATIZZANTE</b>	<b>LR (µg/L)</b>	<b>RIFERIMENTO BIBLIOGRAFICO</b>
GC-MS NCI	PFPA	0,5	Skarping et al., 1995
GC-MS NCI	HFBA	0,3	Schütze et al., 1995
GC-MS NCI	PFPA	0,04	Scarping et al., 1996
LC-ESI MS/MS	PFPA	0,008	Marand et al., 2004
GC-MS	PFPA	0,3	Budnik et al., 2011
GC-MS NCI	PFPA	0,01	Mirohammadi et al., 2013
GC-MS	PFPA	0,2	Pearson et al., 2013
GC-MS	PFPA	0,05	Tinnerberg et al., 2014

### 3. 1,6-HDI

Per quanto riguarda l'HDI, il metabolita urinario osservato è la corrispondente diammina e in figura 12 si riporta la struttura molecolare; in tabella XXIV è riportato il BEI® proposto dall'ACGIH nel 2014 per i lavoratori esposti a 1,6-HDI ed adottato a partire dal 2015 (ACGIH, 2015-*Documentation*).



**Figura 12** Struttura molecolare dell'1,6-HDA.

**Tabella XXIV** Indice biologico di esposizione professionale adottato per il 2,4-TDI e il 2,6-TDI dall'ACGIH nel 2018.

<b>SOSTANZA (anno della <i>Documentation</i>) Indicatore biologico</b>	<b>Raccolta del campione</b>	<b>BEI® µg/gcreatinine</b>	<b>NOTE</b>
<b>1,6-HDI (2015) Esametildiamminenelle urine (*)</b>	Fine turno lavorativo	15	Ns

\* con idrolisi; Ns= metabolita non specifico.

In tabella XXV sono riportati i più significativi lavori di letteratura relativi alla valutazione dell'esposizione a HDI mediante monitoraggio biologico, indicando in particolare la metodica analitica utilizzata, l'agente derivatizzante ed il limite di rilevabilità (LR) ottenuto.

**Tabella XXV** Principali metodi analitici e relativi limiti di rilevabilità (LR) in µg/L per il dosaggio del metabolita urinario dell'1,6-HDI (HFBA = anidride eptafluorobutirrica, TFECF = 2',2',2'-trifluoroetil cloroformiato, PFPA = anidride pentafluoropropionica).

<b>METODO ANALITICO</b>	<b>AGENTE DERIVATIZZANTE</b>	<b>LR (µg/L)</b>	<b>RIFERIMENTO BIBLIOGRAFICO</b>
GC-MS	HFBA	0,5	Brorson et al., 1990
GC-MS	TFECF	0,5	Dalene et al., 1994
LC-MS	PFPA	0,1	Skarping et al., 1994
GC-MS/MS	PFPA	≤ 0,1	Tinnerberg et al., 1995
GC-MS	HFBA	0,35	Maitre et al., 1996
GC-MS	HFBA	0,45	Rosenberg et al., 2002
GC-MS	HFBA	0,2	Liu et al., 2004
LC-ESI MS/MS	PFPA	0,002	Marand et al., 2004
GC-MS	HFBA	3,0	Pronk et al., 2006
GC-MS/MS	HFBA	0,04	Gaines et al., 2011

## **ESPOSIZIONE NON OCCUPAZIONALE A DIISOCIANATI**

Essendo così eterogeneamente ed endemicamente presenti negli ambienti di vita, ad esempio in forma di schiume poliuretatiche come componente dei materiali di destinazione domestica, non si può escludere un'esposizione di tipo non occupazionale. Tuttavia, da dati di letteratura il rilascio di TDI da materiali finiti risulta minimo o assente (Hugo *et al.*, 2010). Un lavoro in particolare riporta un caso di rilascio di TDI da una protesi mammaria (Benoit, 1993). Non va sottovalutata l'eventuale esposizione laddove vengano applicate schiume poliuretatiche *in situ* per l'isolamento termico o in caso di incendio per degradazione termica di materiali contenenti schiume poliuretatiche a base di diisocianati (Dalene *et al.*, 1997). In alcuni studi di letteratura si considerano gli effetti dell'inquinamento ambientale da diisocianati, nello sviluppo di patologie respiratorie e immunologiche (Krone, 2004) e la presenza di anticorpi specifici per il TDI in soggetti non esposti professionalmente ma residenti in zone limitrofe a strutture che utilizzavano TDI (Bernstein *et al.*,

2006). Tuttavia, secondo quanto riportato dalla *Documetation* dell'ACGIH (ACGIH, 2016) i valori di TDA urinario nella popolazione non esposta professionalmente a TDI sono significativamente inferiori (95% inferiore a 0,4 µg/g creatinina) al BEI adottato dall'ACGIH come indicatore biologico di esposizione (pari a 5 µg/g creatinina) quindi tali da non interferire con i valori eventualmente derivanti dall'esposizione occupazionale.

Per quanto riguarda l'HDI, ad oggi non sono noti *database* relativi al monitoraggio biologico nella popolazione non occupazionalmente esposta, dal momento che né il *National Report on Human Exposure to Chemicals*, CDC, né alcuna altra istituzione di riferimento in tale settore ha deciso di includere il monitoraggio biologico di tale sostanza; non è nota ad oggi alcuna letteratura scientifica che riporti dati sui livelli di HDA urinaria nella popolazione non esposta occupazionalmente. Analogamente a quanto indicato per il TDI, una potenziale esposizione della popolazione potrebbe derivare dall'utilizzo di materiali e prodotti finiti contenenti HDI, quali poliuretani o adesivi epossidici o dall'inquinamento ambientale potenzialmente derivante da attività industriali che utilizzano tale diisocianato alifatico o come materia prima per processi di produzione o nell'applicazione di tale sostanza per processi di verniciatura a spray, come nelle industrie automobilistiche (Bello *et al.*, 2007a). Un'ulteriore fonte di esposizione potenziale ad HDI, quindi di presenza di HDA nelle urine di soggetti non occupazionalmente esposti a HDI, è stata individuata in protesi chirurgiche o in impianti realizzati a partire da polimeri biodegradabili (Gogolewski, 1989). Emerge quindi l'opportunità di indagare i livelli di background di tale metabolita urinario nella popolazione non esposta in ambiente di lavoro.

## SCOPO

Scopo del presente lavoro è la realizzazione di metodiche analitiche finalizzate al monitoraggio ambientale e biologico per la determinazione dell'esposizione professionale ai diisocianati.

A tal fine, è stata messa a punto e validata una procedura analitica per la determinazione della concentrazione in aria ambiente di tre diisocianati largamente diffusi in ambito lavorativo: le specie di interesse nel presente progetto di ricerca sono il toluen diisocianato, nella forma dei suoi due isomeri commerciali 2,4-toluen diisocianato (2,4-TDI) e 2,6-toluen diisocianato (2,6-TDI), il 4,4'-difenilmetano diisocianato (4,4'-MDI) e l'1,6-esametilene diisocianato (1,6-HDI).

Tale procedura è stata applicata per la determinazione dell'esposizione professionale a 2,6-TDI, 4,4'-MDI e a 1,6-HDI nell'ambito di due campagne di monitoraggio ambientale.

Parallelamente, sono state sviluppate e validate tre metodiche per la determinazione in matrice urinaria dei metaboliti dei quattro diisocianati considerati nel presente progetto di ricerca, ovvero la 2,4-toluen diammina (2,4-TDA), la 2,6-toluen diammina (2,6-TDA), la 4,4'-difenilmetan diammina (4,4'-MDA) e l'1,6-esametilen diammina (1,6-HDA). Tali procedure sono state applicate per la determinazione del livello di concentrazione dei suddetti metaboliti in campioni di pazienti sottoposti a test di provocazione bronchiale specifica.



# MATERIALI E METODI

## MONITORAGGIO AMBIENTALE DI DIISOCIANATI

### MATERIALI

#### Campionamento di aria ambiente

Il campionamento ambientale dei diisocianati aerodispersi prevede l'utilizzo del seguente materiale:

- filtro in fibra di vetro (figura 13), diametro 37 mm, trattato con 1-(2-piridil)piperazina, precaricato in una cassetta portafiltro in stirene trasparente, diametro 37 mm, (*Preloaded Coated Filters*, Cat.n° 225-9002, SKC).

La strumentazione utilizzata per realizzare il monitoraggio ambientale è la seguente:

- pompa di campionamento *Universal DeLuxe TX/XR* della SKC tarata al flusso di 1,0 mL / minuto;
- cavalletto e tubi in gomma per realizzare la linea di campionamento.



**Figura 13** Filtri a cassetta *Preloaded Coated Filters*, Cat.n° 225-9002, SKC: il tappo blu indica il punto di ingresso dell'aria convogliata, mentre il tappo rosso indica il foro di uscita del flusso d'aria.

#### Preparazione della retta di calibrazione e trattamento analitico del campione

Gli standard (tutti acquistati da Supelco) e i solventi (tutti acquistati da Sigma Aldrich) utilizzati per la preparazione delle rette di calibrazione e per il trattamento analitico delle membrane post campionamento sono acquistati con grado di purezza adeguato all'utilizzo:

- *2,6-TDI piperazine derivative* 1000 µg/mL in dimetilsolfossido (DMSO); *4,4'-MDI piperazine derivative* 1000 µg/mL in DMSO; *1,6-HDI piperazine derivative* 1000 µg/mL in DMSO;

- acetonitrile (ACN), *HPLC grade*, Sigma Aldrich; dimetilsolfossido (DMSO) *Reagent grade*, Sigma Aldrich).

Sono state inoltre preparate all'occorrenza le seguenti soluzioni per l'analisi strumentale (miscela di eluizione) e per l'analisi dei campioni (estrazione), utilizzando dove necessario acqua ultrapura *MilliQ* da laboratorio:

- acetato di ammonio 0,05 M in H<sub>2</sub>O, verificando che il pH sia pari a 6,1 (analisi strumentale);
- miscela di ACN e DMSO in proporzione 80 / 20, rispettivamente (analisi dei campioni).

### **Strumentazione analitica**

La strumentazione utilizzata per l'analisi di laboratorio delle membrane dopo avere eseguito il monitoraggio ambientale è la seguente:

- HPLC *Series 200Q Perkin Elmer* con rivelatore fluorimetrico.

La colonna cromatografica utilizzata è una *C8 Holder*, lunghezza = 83 mm, diametro interno = 4,6 mm, porosità della fase stazionaria = 5 µm - 80 Å.

## **METODI**

### **Campionamento di aria ambiente**

Per il campionamento di aria ambiente si è fatto riferimento alla procedura ufficiale descritta dall'*Occupational Safety and Health Administration (OSHA)*, in particolare alla metodica numero 42 (OSHA 42) per il dosaggio del 2,4-TDI, 2,6-TDI e dell'1,6-HDI e alla metodica numero 47 (OSHA 47) per il dosaggio del 4,4'-MDI.

Tutti i campionamenti ambientali sono stati condotti in posizione fissa posizionando i sistemi di campionamento ad un'altezza di 1,60 metri dal piano di calpestio, per un tempo di campionamento di circa 4 ore.

I campionamenti sono stati effettuati con campionatori posti in commercio già assemblati dalla ditta fornitrice, in cui il filtro in fibra di vetro è posto all'interno di una cassetta portafiltro in plastica formata da 3 moduli, con diametro di 37 mm su un supporto in cellulosa, ed è funzionalizzato con 2,0 mg di 1,2-piridil piperazina (1-2PP): una quantità superiore a quanto proposto dal corrispondente metodo OSHA sia per il dosaggio del 2,4-TDI, 2,6-TDI e dell'1,6-HDI (pari a 0,1 mg) che per il dosaggio del 4,4'-MDI (pari a 1 mg); tale accorgimento è finalizzato ad aumentare

sia la stabilità della specie derivatizzata presente sui filtri dopo il campionamento, che la longevità dei dispositivi prima dell'uso.

### Preparazione della retta di calibrazione dei 3 standard

Per la determinazione quantitativa dei diisocianati sui campioni reali è stato utilizzato il metodo della calibrazione esterna; è stata quindi preparata una retta di calibrazione a 5 livelli di concentrazione (10; 25; 50; 100 e 250 µg/L) degli standard relativi ai diisocianati utilizzati nel momento in cui è stato condotto il campionamento ambientale. I diversi livelli di concentrazione sono stati ottenuti di volta in volta mediante diluizioni successive degli standard analitici con la miscela ACN/DMSO in proporzione 90/10.

### Metodo cromatografico per la separazione e la determinazione degli analiti

Una volta preparate le soluzioni per la retta di calibrazione, queste sono state analizzate per iniezione diretta in HPLC accoppiato con rivelatore fluorimetrico. In tabella XXVI sono riportati i dati relativi al metodo analitico ed alla strumentazione utilizzata.

**Tabella XXVI** Caratteristiche strumentali del metodo analitico per l'analisi in HPLC-fluorimetro.

Fase mobile	t <sub>0</sub> : 70% acetato di ammonio 0,05 M e 30% ACN; t <sub>1</sub> : 70% acetato di ammonio 0,05 M e 30% ACN; t <sub>2</sub> : 80% acetato di ammonio 0,05 M e 20% ACN;
Eluizione in gradiente	t <sub>0</sub> = 5 minuti a 1,5 mL/min.; t <sub>1</sub> = 10 minuti a 1,5 mL/min.; t <sub>2</sub> = 10 minuti a 1,5 mL/min.
Pressione di lavoro	1950 psi
Volume di iniezione	20 µL
Detector fluorimetro	ECCITAZIONE $\lambda_{\text{xcs}} = 240 \text{ nm}$ ; EMISSIONE $\lambda_{\text{em}} = 370 \text{ nm}$ ; fattore di attenuazione = 64.

## **Trattamento analitico del campione e calcolo della concentrazione di diisocianati in aria**

La metodica messa a punto per il dosaggio dei diisocianati in aria prevede i seguenti *step* operativi:

- eluizione dei filtri campionati con 4 ml di miscela costituita da ACN e DMSO in proporzione relativa pari a 90 / 10 rispettivamente;
- sonicazione in bagno a ultrasuoni a 40 kHz per 60 minuti al riparo dalla luce, per favorire il rilascio dell'analita nel solvente organico;
- analisi diretta in HPLC con rivelatore fluorimetrico.

All'analisi di un *set* di campioni ambientali viene sempre associata l'analisi di un filtro non utilizzato per i monitoraggi ambientali ("bianco"), come suggerito dalle metodiche ufficiali dell'OSHA, per confrontare la risposta strumentale dei dispositivi di campionamento in assenza di derivatizzazione del substrato.

# DOSAGGIO DEI METABOLITI URINARI

## 1. Dosaggio della 2,4-TDA e della 2,6-TDA

### MATERIALI

I reagenti utilizzati per le rette di calibrazione degli standard, per la soluzione dello standard interno e per la reazione di derivatizzazione sono stati acquistati da Sigma Aldrich, con grado di purezza adeguato allo scopo:

- 2,4-toluen diammina (2,4-TDA, standard), 2,6-toluen diammina (2,6-TDA, standard), 3,4-toluen diammina (3,4-TDA, standard interno S.I.), anidride eptafluorobutirrica (HFBA).

I solventi utilizzati per preparare le soluzioni madre, per la reazione di idrolisi, per l'estrazione liquido/liquido e per la rigenerazione dei campioni prima dell'analisi strumentale, sono stati acquistati da Sigma Aldrich, con grado di purezza adeguato allo scopo:

- acetonitrile, acido solforico, diclorometano, toluene.

Sono state preparate inoltre all'occorrenza le seguenti soluzioni acquose utilizzando acqua ultrapura *MilliQ* da laboratorio:

- soluzione 0,1 M di acido cloridrico HCl (37% in peso, Sigma Aldrich),
- soluzione 8 M di idrossido di sodio NaOH (*Reagent grade*  $\geq 98\%$ , Sigma Aldrich),
- soluzione 1,2 M di acido tricloroacetico (*ACS reagent*  $\geq 99,0\%$ , Sigma Alrich),
- soluzione 1,6 M di idrossido di sodio,
- soluzione di acido picrico (*moistened with water*,  $\geq 98\%$ , Sigma Aldrich) alla concentrazione di 0,035 mmoli/L.

La soluzione dello standard, alla concentrazione di 20 mg/L, per la determinazione della creatinina urinaria è stata preparata all'occorrenza, previa diluizione in acqua ultrapura *Millipore* da laboratorio a partire dal reagente puro (*Creatinine, anhydrous*,  $\geq 98\%$ , Sigma Aldrich). Per l'analisi della creatinina urinaria sono stati utilizzati i controlli di qualità di commerciali *Lyphocheck*<sup>®</sup> *quantitative urine control level 1 e level 2*, della Bio-Rad.

### Strumentazione analitica

La strumentazione utilizzata è la seguente:

- Gascromatografo *AutoSystem XL GC* della Perkin Elmer. La colonna cromatografica utilizzata è una HP Pona 100% poli-dimetilsilossano della Agilent Technologies con le

seguenti caratteristiche: 0,20 mm (diametro interno), 50 m (lunghezza), 0,50  $\mu\text{m}$  (spessore della fase stazionaria).

- Rivelatore Spettrometro di massa a singolo quadrupolo *Turbo Mass Upgrade* della Perkin Elmer con autocampionatore per liquidi.
- Spettrofotometro a doppio raggio *Lambda 25* della Perkin Elmer (per la determinazione della creatinina urinaria).

## **METODI**

### **Preparazione delle rette di calibrazione degli standard 2,4-TDA e 2,6-TDA in presenza dello S.I. 3,4-TDA.**

Le soluzioni madre vengono sempre preparate di fresco, in miscela 50/50 di ACN e HCl 0,1M. Le diluizioni successive si realizzano in matrice urinaria di un gruppo di soggetti non esposti né a diisocianati né ad altri solventi, ottenendo soluzioni da 10 mg/L e 100  $\mu\text{g/L}$ . Da quest'ultima si preparano, per diluizione successiva, 5 soluzioni standard (in doppio) nel *range* di concentrazione 0,5-50  $\mu\text{g/L}$  (0,5; 1,0; 5,0; 10 e 50  $\mu\text{g/L}$ ). Il volume finale delle soluzioni standard è pari a 5 mL.

Analogamente, la soluzione madre dello S.I. viene preparata sempre di fresco in miscela 50/50 di ACN e HCl 0,1M, per ottenere una soluzione da 10 mg/L in matrice urinaria. Tale soluzione viene poi utilizzata per aggiungere la medesima quantità di S.I. (50  $\mu\text{L}$ ) nelle soluzioni da analizzare in GC-MS, in cui la concentrazione finale di S.I. risulterà pari a circa 55  $\mu\text{g/L}$ .

### **Trattamento dei campioni**

Soluzioni standard e campioni vengono trattati secondo la seguente procedura:

- aggiunta dello S.I. 3,4-TDA: alle soluzioni standard ed ai campioni vengono aggiunti 50  $\mu\text{L}$  della soluzione di S.I. da 10 mg/L;
- idrolisi acida ad alta temperatura: a 5 mL di urina si aggiungono 0,5 mL di acido solforico concentrato (18 M, 96% in peso) e si fa reagire, in provette sigillate, a 100°C per 1,5 ore;
- alcalinizzazione delle soluzioni idrolizzate: i campioni e gli standard vengono raffreddati a temperatura ambiente e vengono addizionati con 3,5 mL di soluzione acquosa di idrossido di sodio 8 M (pH finale delle soluzioni > 12);
- estrazione liquido/liquido: i metaboliti vengono estratti mediante solvente organico (diclorometano) e agitazione per 20 minuti. Le soluzioni vengono centrifugate a 3000 rpm

per 3 minuti per favorire la separazione tra le fasi. La fase organica viene quindi rimossa e raccolta in una provetta. Tale procedura viene ripetuta due volte. Le fasi organiche unificate vengono infine ridotte di volume sotto flusso di azoto (volume finale pari a circa 10 ml);

- derivatizzazione: alla fase organica vengono aggiunti 100 µL di anidride HFBA e la reazione di derivatizzazione viene condotta a 55°C per 1 ora; la soluzione viene portata quindi a completa secchezza sotto flusso di azoto; il residuo ottenuto viene ridisciolto con 100 µL di toluene e analizzato in GC-MS.

## Analisi

L'analisi gascromatografica viene condotta acquisendo il segnale sia in modalità *Full Scan* sia in modalità SIR (*Single Ion Recording*) per la ricerca di specifici frammenti molecolari, i più rappresentativi dell'analita di interesse, al fine di massimizzare la sensibilità e la specificità della risposta strumentale.

I parametri strumentali del metodo gascromatografico utilizzato per l'analisi del 2,4-TDA e del 2,6-TDA in presenza dello S.I. sono riportati in tabella XXVII:

**Tabella XXVII** Parametri di impostazione del metodo gascromatografico per l'analisi di 2,4-TDA e 2,6-TDA.

Experiment Time	18,00 min
Sampling Rate	1,56250 pts/s
Injection Volume	1,0 µL
Oven Temperature Program	100°C for 1,00 min Ramp 1: 20°C/min to 280°C; hold for 8 min.

I parametri strumentali del metodo di massa utilizzato per l'analisi della 2,4-TDA e della 2,6-TDA in presenza dello S.I. sono riportati in tabella XXVIII.

**Tabella XXVIII** Parametri di impostazione del metodo di massa per l'analisi di 2,4-TDA e 2,6-TDA.

Total Run Time	15,00 min
Solvent Delay 1	Start: 0,00 min – End: 5,00 min
MS Full Scan	Time: 5,00 to 15,00 min Mass: 40,00 to 550,00 m/z Ionization Mode: EI+ Data: Centroid Scan Time: 0,15 secs Inter-Scan Delay: 0,01 secs
SIR of 2 masses	Time: 7,00 to 11,00 min Ionization Mode: EI+ Inter-Channel Delay: 0,01 secs Repeats: 1 Span: 0,2 Mass: 345,00 m/z Dwell: 0,100 secs Mass: 514,00 m/z Dwell: 0,100 secs

Lo strumento viene calibrato mediante procedura interna di *Autotuning* e il Multiplier viene impostato al valore di 600 al fine di massimizzare la risposta strumentale.

### **Determinazione della creatinina urinaria**

Per l'espressione dei risultati delle analisi dei campioni si riporta anche il dato analitico corretto per il valore di creatinina urinaria determinata sul medesimo campione di urina: la correzione del dato analitico è stata applicata nel caso in cui il valore di creatinina fosse compreso nell'intervallo 0,3 - 3,0 g/L, come suggerito dall'Organizzazione Mondiale della Sanità. Per la procedura analitica di determinazione della creatinina urinaria si rimanda a quanto riportato in letteratura (Jaffe, 1986).

## 2. Dosaggio della 4,4'-MDA

### MATERIALI

I reagenti utilizzati per le rette di calibrazione dello standard, per la soluzione dello standard interno e per la reazione di derivatizzazione sono stati acquistati da Sigma Aldrich, con grado di purezza adeguato allo scopo:

- 4,4'-metilenbisfenil diammina (4,4'-MDA, standard), 3,4-toluen diammina (3,4-TDA, standard interno S.I.), anidride eptafluorobutirrica (HFBA).

I solventi utilizzati per preparare le soluzioni madre, per la reazione di idrolisi, per l'estrazione liquido/liquido e per la rigenerazione dei campioni prima dell'analisi strumentale, sono stati acquistati da Sigma Aldrich, con grado di purezza adeguato allo scopo:

- acetonitrile, acido solforico, diclorometano, toluene.

Sono state preparate inoltre all'occorrenza le seguenti soluzioni acquose utilizzando acqua ultrapura *MilliQ* da laboratorio:

- soluzione 0,1 M di acido cloridrico HCl (37% in peso, Sigma Aldrich),
- soluzione 8 M di idrossido di sodio NaOH (*Reagent grade*  $\geq 98\%$ , Sigma Aldrich),
- soluzione 1,2 M di acido tricloroacetico (*ACS reagent*  $\geq 99,0\%$ , Sigma Alrich),
- soluzione 1,6 M di idrossido di sodio,
- soluzione di acido picrico (*moistened with water*,  $\geq 98\%$ , Sigma Aldrich) alla concentrazione di 0,035 mmoli/L.

Lo soluzione dello standard, alla concentrazione di 20 mg/L, per la determinazione della creatinina urinaria è stata preparata all'occorrenza, previa diluizione in acqua ultrapura *Millipore* da laboratorio a partire dal reagente puro (*Creatinine, anhydrous*,  $\geq 98\%$ , Sigma Aldrich). Per l'analisi della creatinina urinaria sono stati utilizzati i controlli di qualità di commerciali *Lyphocheck® quantitative urine control level 1 e level 2*, della Bio-Rad.

### Strumentazione analitica

La strumentazione utilizzata è la seguente:

- Gascromatografo *AutoSystem XL GC* della Perkin Elmer. Elmer con autocampionatore per liquidi. La colonna cromatografica utilizzata è una HP Pona 100% poli-dimetilsilossano della Agilent Technologies con le seguenti caratteristiche: 0,20 mm (diametro interno), 50 m (lunghezza), 0,50  $\mu\text{m}$  (spessore della fase stazionaria).

- Rivelatore Spettrometro di massa a singolo quadrupolo *Turbo Mass Upgrade* della Perkin Elmer con autocampionatore per liquidi.
- Spettrofotometro a doppio raggio *Lambda 25* della Perkin Elmer (per la determinazione della creatinina urinaria).

## METODI

### **Preparazione delle rette di calibrazione dello standard 4,4'-MDA in presenza dello S.I. 3,4-TDA**

Le soluzioni madre vengono sempre preparate di fresco, in miscela 50/50 di ACN e HCl 0,1M. Le diluizioni successive si realizzano in matrice urinaria di un gruppo di soggetti non esposti né a diisocianati né ad altri solventi, ottenendo soluzioni da 10 mg/L e 100 µg/L. Da quest'ultima si preparano, per diluizione successiva, 5 soluzioni standard (in doppio) nel *range* di concentrazione 0,5-50 µg/L (0,5; 1,0; 5,0; 10 e 50 µg/L). Il volume finale delle soluzioni standard è pari a 5 mL.

Analogamente, la soluzione madre dello S.I. viene preparata sempre di fresco in miscela 50/50 di ACN e HCl 0,1M, per ottenere una soluzione da 10 mg/L in matrice urinaria. Tale soluzione viene poi utilizzata per aggiungere la medesima quantità di S.I. (50 µL) nelle soluzioni da analizzare in GC-MS, in cui la concentrazione finale di S.I. risulterà pari a circa 55 µg/L.

### **Trattamento dei campioni**

Soluzioni standard e campioni vengono trattati secondo la seguente procedura:

- aggiunta dello S.I. 3,4-TDA: alle soluzioni standard ed ai campioni vengono aggiunti 50 µL della soluzione di S.I. da 10 mg/L;
- idrolisi acida ad alta temperatura: a 5 mL di urina si aggiungono 0,5 mL di acido solforico concentrato (18 M, 96% in peso) e si fa reagire, in provette sigillate, a 100°C per 1,5 ore;
- alcalinizzazione delle soluzioni idrolizzate: i campioni e gli standard vengono raffreddati a temperatura ambiente e vengono addizionati con 3,5 mL di soluzione acquosa di idrossido di sodio 8 M (pH finale delle soluzioni > 12);
- estrazione liquido/liquido: i metaboliti mediante solvente organico (diclorometano) e agitazione per 20 minuti. Le soluzioni vengono centrifugate a 3000 rpm per 3 minuti per favorire la separazione fra le fasi. La fase organica viene quindi rimossa e raccolta in una provetta. Tale procedura viene ripetuta due volte e le fasi organiche unificate vengono ridotte di volume sotto flusso di azoto (volume finale pari a circa 10 mL);

- derivatizzazione: alla fase organica raccolta vengono aggiunti 150  $\mu\text{L}$  HFBA e la reazione di derivatizzazione viene condotta a 40°C per 1 ora;
- la soluzione viene portata quindi a completa secchezza sotto flusso di azoto; il residuo ottenuto viene ridisciolti con 100  $\mu\text{L}$  di toluene e analizzato in GC-MS.

## Analisi

L'analisi gascromatografica viene condotta acquisendo il segnale sia in modalità *Full Scan* sia in modalità SIR (*Single Ion Recording*) per la ricerca di specifici frammenti molecolari, i più rappresentativi dell'analita di interesse, al fine di massimizzare la sensibilità e la specificità della risposta strumentale.

I parametri strumentali del metodo gascromatografico utilizzato per l'analisi del 4,4'-MDA in presenza dello S.I. è riportato in tabella XXIX.

**Tabella XXIX** Parametri di impostazione del metodo gascromatografico per l'analisi del 4,4'-MDA.

Experiment Time	18,00 min
Sampling Rate	1,56250 pts/s
Injection Volume	1,0 $\mu\text{L}$
Oven Temperature Program	100°C for 1,00 min Ramp 1: 20°C/min to 280°C; hold for 8 min.

I parametri strumentali del metodo di massa utilizzato per l'analisi della 4,4'-MDA in presenza dello S.I. sono riportati in tabella XXX.

**Tabella XXX** Parametri di impostazione del metodo di massa per l'analisi della 4,4'-MDA.

Total Run Time	16,00 min
Solvent Delay 1	Start: 0,00 min – End: 7,00 min
MS Scan	Time: 7,00 to 16,00 min Mass: 40,00 to 550,00 m/z Ionization Mode: EI+ Data: Centroid Scan Time: 0,15 secs Inter-Scan Delay: 0,01 secs
SIR of 1 mass	Time: 7,00 to 9,00 min Ionization Mode: EI+ Inter-Channel Delay: 0,01 secs Repeats: 1 Span: 0,2 Mass: 514,00 m/z Dwell: 0,100 secs
SIR of 3 masses	Time: 13,00 to 16,00 min Ionization Mode: EI+ Inter-Channel Delay: 0,01 secs Repeats: 1 Span: 0,2 Mass: 132,00 m/z Dwell: 0,100 secs Mass: 302,00 m/z Dwell: 0,100 secs Mass: 393,00 m/z Dwell: 0,100 secs

Lo strumento viene calibrato mediante procedura interna di *Autotuning* e il Multiplier viene settato al valore di 600 al fine di massimizzare la risposta strumentale.

#### **Determinazione della creatinina urinaria**

Per l'espressione dei risultati delle analisi dei campioni si riporta anche il dato analitico corretto per il valore di creatinina urinaria determinata sul medesimo campione di urina: la correzione del dato analitico è stata applicata nel caso in cui il valore di creatinina fosse compreso nell'intervallo 0,3 -

3,0 g/L, come suggerito dall'Organizzazione Mondiale della Sanità. Per la procedura analitica di determinazione della creatinina urinaria si rimanda a quanto riportato in letteratura (Jaffe, 1986).

### 3. Dosaggio dell'1,6-HDA

#### **MATERIALI**

I reagenti utilizzati per le rette di calibrazione degli standard, per la soluzione dello standard interno e per la reazione di derivatizzazione sono stati acquistati da Sigma Aldrich, con grado di purezza adeguato allo scopo:

- 1,6-esametilen diammina (1,6-HDA, standard), 1,7-eptan diammina (1,7-HpDA, standard interno S.I.), anidride eptafluorobutirrica (HFBA).

I solventi utilizzati per preparare le soluzioni madre, per la reazione di idrolisi, per l'estrazione liquido/liquido e per la rigenerazione dei campioni prima dell'analisi strumentale, sono stati acquistati da Sigma Aldrich, con grado di purezza adeguato allo scopo:

- acetonitrile, acido solforico, cicloesano, diclorometano, toluene.

Sono state preparate inoltre all'occorrenza le seguenti soluzioni acquose utilizzando acqua ultrapura MilliQ da laboratorio:

- soluzione 0,1 M di acido cloridrico HCl (37% in peso, Sigma Aldrich),
- soluzione 8 M di idrossido di sodio NaOH (*Reagent grade*  $\geq 98\%$ , Sigma Aldrich),
- soluzione 1,2 M di acido tricloroacetico (*ACS reagent*  $\geq 99,0\%$ , Sigma Alrich),
- soluzione 1,6 M di idrossido di sodio,
- soluzione di acido picrico (*moistened with water*,  $\geq 98\%$ , Sigma Aldrich) alla concentrazione di 0,035 mmoli/L.

Lo soluzione dello standard, alla concentrazione di 20 mg/L, per la determinazione della creatinina urinaria è stata preparata all'occorrenza, previa diluizione in acqua ultrapura Millipore da laboratorio a partire dal reagente puro (*Creatinine, anhydrous*,  $\geq 98\%$ , Sigma Aldrich). Per l'analisi della creatinina urinaria sono stati utilizzati i controlli di qualità di commerciali *Lyphocheck® quantitative urine control level 1 e level 2*, della Bio-Rad.

#### **Strumentazione analitica**

La strumentazione utilizzata è la seguente:

- Gascromatografo *AutoSystem XL GC* della Perkin Elmer. La colonna cromatografica utilizzata è una HP Pona 100% poli-dimetilsilossano della Agilent Technologies con le seguenti caratteristiche: 0,20 mm (diametro interno), 50 m (lunghezza), 0,50  $\mu\text{m}$  (spessore della fase stazionaria)
- Rivelatore Spettrometro di massa a singolo quadrupolo *Turbo Mass Upgrade* della Perkin Elmer con autocampionatore per liquidi.
- Spettrofotometro a doppio raggio *Lambda 25* della Perkin Elmer (per la determinazione della creatinina urinaria).

## METODI

### **Preparazione delle rette di calibrazione dello standard 1,6-HDA in presenza dello S.I. 1,7-HpDA**

Le soluzioni madre vengono sempre preparate di fresco, in miscela 50/50 di ACN e HCl 0,1M. Le diluizioni successive si realizzano in matrice urinaria di un gruppo di soggetti non esposti né a diisocianati né ad altri solventi, ottenendo soluzioni da 10 mg/L e 100  $\mu\text{g/L}$ . Da quest'ultima si preparano, per diluizione successiva, 5 soluzioni standard (in doppio) nel *range* di concentrazione 0,5-50  $\mu\text{g/L}$  (0,5; 1,0; 5,0; 10 e 50  $\mu\text{g/L}$ ). Il volume finale delle soluzioni standard è pari a 5 mL.

Analogamente, la soluzione madre dello S.I. viene preparata sempre di fresco in miscela 50/50 di ACN e HCl 0,1M, per ottenere una soluzione da 10 mg/L in matrice urinaria. Tale soluzione viene poi utilizzata per aggiungere la medesima quantità di S.I. (50  $\mu\text{L}$ ) nelle soluzioni da analizzare in GC-MS, in cui la concentrazione finale di S.I. risulterà pari a circa 55  $\mu\text{g/L}$ .

### **Trattamento dei campioni**

Soluzioni standard e campioni vengono trattati secondo la seguente procedura:

- aggiunta dello S.I. 1,7-HpDA: alle soluzioni standard ed ai campioni vengono aggiunti 50  $\mu\text{L}$  della soluzione di S.I. da 10 mg/L;
- idrolisi acida ad alta temperatura: a 5 mL di urina si aggiungono 0,5 mL di acido solforico concentrato (18 M, 96% in peso) e si fa reagire, in provette sigillate, a 100°C per 1,5 ore;
- alcalinizzazione delle soluzioni idrolizzate: i campioni e gli standard vengono raffreddati a temperatura ambiente e vengono addizionati con 3,5 mL di soluzione acquosa di idrossido di sodio 8 M (pH finale delle soluzioni > 12);

- estrazione liquido/liquido: i metaboliti mediante solvente organico (diclorometano) e agitazione per 20 minuti. Le soluzioni vengono centrifugate a 3000 rpm per 3 minuti per favorire la separazione fra le fasi. La fase organica viene quindi rimossa e raccolta in una provetta. Tale procedura viene ripetuta due volte e le fasi organiche unificate vengono ridotte di volume sotto flusso di azoto (volume finale pari a circa 10 mL);
- derivatizzazione: alla fase organica raccolta vengono aggiunti 50  $\mu\text{L}$  HFBA e la reazione di derivatizzazione viene condotta a 55°C per 1 ora;
- la soluzione viene portata quindi a completa secchezza sotto flusso di azoto; il residuo ottenuto viene ridisciolto con 100  $\mu\text{L}$  di toluene e analizzato in GC-MS.

## Analisi

L'analisi gascromatografica viene condotta acquisendo il segnale sia in modalità *Full Scan* sia in modalità SIR (*Single Ion Recording*) per la ricerca di specifici frammenti molecolari, i più rappresentativi dell'analita di interesse, al fine di massimizzare la sensibilità e la specificità della risposta strumentale.

I parametri strumentali del metodo gascromatografico utilizzato per l'analisi dell'1,6-HDA in presenza dello S.I. è riportato in tabella XXXI:

**Tabella XXXI** Parametri di impostazione del metodo gascromatografico per l'analisi dell'1,6-HDA.

Experiment Time	18,00 min
Sampling Rate	1,56250 pts/s
Injection Volume	1,0 $\mu\text{L}$
Oven Temperature Program	100°C for 1,00 min Ramp 1: 20°C/min to 280°C; hold for 8 min.

I parametri strumentali del metodo di massa utilizzato per l'analisi dell'1,6-HDA in presenza dello S.I. sono riportati in tabella XXXII.

**Tabella XXXII** Parametri di impostazione del metodo per l'analisi dell'1,6-HDA.

Total Run Time	11,00 min
Solvent Delay 1	Start: 0,00 min – End: 5,00 min
MS Scan	Time: 5,00 to 11,00 min Mass: 40,00 to 550,00 m/z Ionization Mode: EI+ Data: Centroid Scan Time: 0,15 secs Inter-Scan Delay: 0,01 secs
SIR of 3 masses	Time: 7,00 to 11,00 min Ionization Mode: EI+ Inter-Channel Delay: 0,01 secs Repeats: 1 Span: 0,2 Mass: 226,00 m/z Dwell: 0,150 secs Mass: 339,00 m/z Dwell: 0,150 secs Mass: 353,00 m/z Dwell: 0,150 secs

Lo strumento viene calibrato mediante procedura interna di *Autotuning* e il Multiplier viene settato al valore di 600, al fine di massimizzare la risposta strumentale.

### **Determinazione della creatinina urinaria**

Per l'espressione dei risultati delle analisi dei campioni si riporta anche il dato analitico corretto per il valore di creatinina urinaria determinata sul medesimo campione di urina: la correzione del dato analitico è stata applicata nel caso in cui il valore di creatinina fosse compreso nell'intervallo 0,3 - 3,0 g/L, come suggerito dall'Organizzazione Mondiale della Sanità. Per la procedura analitica di determinazione della creatinina urinaria si rimanda a quanto riportato in letteratura (Jaffe, 1986).

# RISULTATI e DISCUSSIONE

## MONITORAGGIO AMBIENTALE

Nell'ambito del presente progetto è stato messo a punto un metodo per il dosaggio contemporaneo dei 3 diisocianati 1,6-esametilene diisocianato (1,6-HDI), Difenilmetano-4,4'-diisocianato (4,4'-MDI) e 2,6-tolueno diisocianato (2,6-TDI) in aria, modificando i metodi OSHA di riferimento per tale analisi (OSHA 42, OSHA 47) ed applicandoli alla strumentazione disponibile presso il laboratorio. Tale metodo è stato testato quindi sul campo raccogliendo ed analizzando campioni reali presso gli stabilimenti di due aziende in cui vengono svolte alcune lavorazioni per le quali è previsto l'uso dei diisocianati precedentemente riportati.

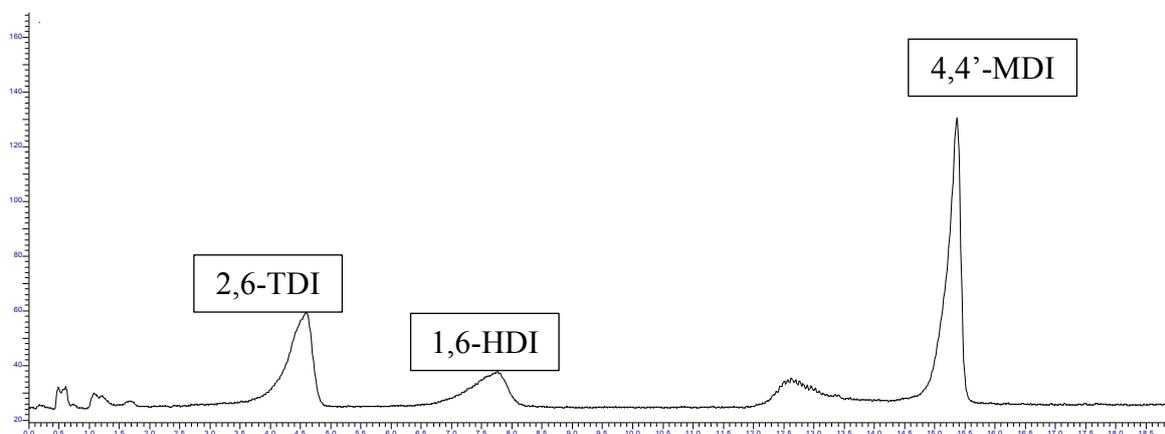
### Determinazione dei tempi di ritenzione degli standard

Nelle condizioni strumentali indicate per il metodo analitico utilizzato, i tempi di ritenzione per i 3 analiti sono quelli indicati in tabella XXXIII.

**Tabella XXXIII** Tempi di ritenzione dei 3 standard nell'analisi in HPLC fluorimetro.

$t_R$ 2,6-TDI	4,6 min
$t_R$ 1,6-HDI	7,7 min
$t_R$ 4,4'-MDI	15,2 min

In figura 14 è riportato il cromatogramma ottenuto per le tre specie analitiche.



**Figura 14** Cromatogramma ottenuto per i 3 standard dall'analisi in HPLC-fluorimetro (concentrazione dei 3 standard pari a 100 µg/L).

### **Validazione del metodo analitico**

Il metodo analitico è stato validato valutando i parametri descrittivi delle prestazioni, di seguito riportati.

### **Separazione cromatografica**

Gli analiti risultano bene separati, all'interno di un'unica corsa cromatografica e risultano esenti da interferenze analitiche.

### **Linearità**

Per tutti e tre i diisocianati considerati il metodo analitico si è dimostrato lineare nell'intervallo di concentrazione testato, ovvero fra valori di concentrazione inferiori al limite di rilevabilità (L.R.) fino a 250 µg/L, con un coefficiente di determinazione  $R^2 > 0,99$ .

### **Limiti di rilevabilità e limiti di quantificazione**

I limiti di rilevabilità (LR) del metodo analitico sono stati determinati come di seguito indicato:

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

dove  $\sigma$  rappresenta la deviazione standard del segnale analitico e  $m$  rappresenta la pendenza della retta di calibrazione.

In tali condizioni i limiti di rilevabilità ottenuti sono pari a 3,2 µg/L per il 2,6-TDI, a 6,0 µg/L per l'1,6-HDI e a 1,7 µg/L per il 4,4'-MDI.

I limiti di quantificazione (LQ) del metodo analitico sono stati determinati come di seguito indicato:

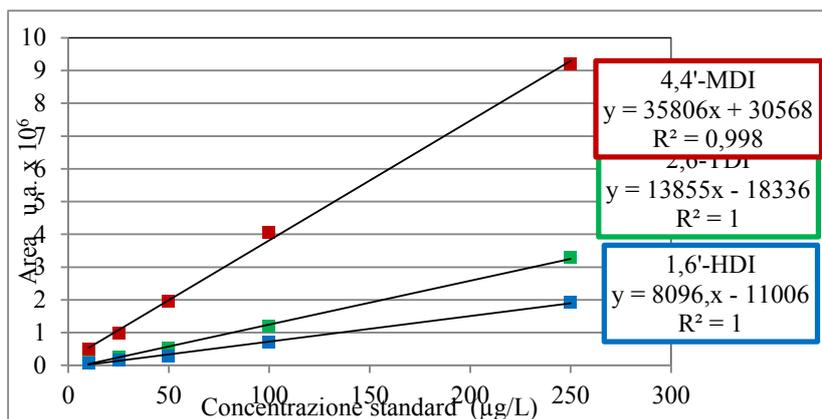
$$LQ = \frac{10\sigma}{m}$$

dove  $\sigma$  rappresenta la deviazione standard del segnale analitico e  $m$  rappresenta la pendenza della retta di calibrazione.

In tali condizioni i limiti di quantificazione ottenuti sono pari a 9,6 µg/L per il 2,6-TDI, a 18,0 µg/L per l'1,6-HDI e a 5,0 µg/L per il 4,4'-MDI.

I limiti LR e LQ ottenuti per il metodo analitico risultano adeguati per l'analisi dei diisocianati considerati.

In Figura 15 è riportato un esempio delle rette di calibrazione ottenute per i tre diisocianati analizzati.



**Figura 15** Rette di calibrazione dei 3 standard ottenute dall'analisi in HPLC-fluorimetro.

### Campionamento di aria ambiente – Azienda n. 1

Sono stati effettuati 6 campionamenti di aria ambiente presso un'azienda che produce grandi lastre in vetro ed esegue su alcune di esse specifici trattamenti di *coating* con diisocianati come materia prima. I campionamenti sono stati realizzati secondo la procedura illustrata nel capitolo “Materiali e Metodi” del presente lavoro, al fine di determinare il livello di esposizione ambientale a diisocianati. I campionamenti sono stati condotti presso il reparto degli “incapsulati” del 1° stabilimento e presso il reparto “primer” del 2° stabilimento, in corrispondenza delle posizioni in cui era previsto l'utilizzo di tali reagenti.

### Analisi dei filtri campionati

I campioni raccolti sono stati analizzati in HPLC fluorimetro, col metodo analitico ottimizzato in laboratorio, descritto nel capitolo “Materiali e Metodi”.

I risultati del monitoraggio ambientale sono raccolti in Tabella XXXIV, dove sono riportati anche i dettagli delle posizioni di campionamento.

**Tabella XXXIV** Concentrazione ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) dei 3 diisocianati nelle postazioni di lavoro monitorate.

Stabilimento	Posizione di campionamento	2,6-TDI ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	1,6-HDI ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	4,4'-MDI ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )
1	Linea estrusione 3	< 0,042	< 0,088	< 0,030
1	Linea microiniezione	< 0,042	< 0,088	< 0,030
1	Ricetta TPE 2	< 0,042	< 0,088	< 0,030
1	Ricetta TPE 3	< 0,042	< 0,088	< 0,030
1	Linea estrusione 2, stazione B sx	< 0,042	< 0,088	< 0,030
2	Primer	< 0,042	< 0,088	< 0,030

In tutte le posizioni di prelievo esaminate sono state rilevate concentrazioni di isocianati (in  $\mu\text{g}/\text{L}$ ) inferiori ai limiti di quantificazione ma superiori ai limiti di rilevabilità.

Da un confronto con i valori limite di riferimento ponderali TLV-TWA® in corso di adozione dall' *American Conference of Governmental Industrial Hygiene* (ACGIH) nel periodo di esecuzione delle analisi, e riportati in tabella XXXV, le concentrazioni di diisocianati rilevate nel monitoraggio ambientale risultano inferiori di un fattore pari a circa  $10^{-4}$  rispetto al valore limite: si può quindi concludere che nei reparti monitorati il rischio di esposizione per tali sostanze può essere considerato sostanzialmente trascurabile.

**Tabella XXXV** Valori limite di soglia per l'esposizione occupazionale a 1,6-HDI, 4,4'-MDI, 2,4-TDI e 2,6-TDI (ACGIH, 2014).

	TLV-TWA® 3 mg/m <sup>3</sup> - ppm	TLV-STEL® 3 mg/m <sup>3</sup> - ppm	EFFETTI CRITICI	NOTE
<b>1,6-HDI *</b>	0,034 – 0,005	-	irrt TRS, sen	-
<b>4,4'-MDI *</b>	0,051 – 0,005	-	sen rspr	-
<b>2,4- , 2,6-TDI (* o miscela)</b>	0,036 – 0,005	0,14 – 0,02	sen rspr	sen, A4

\* come monomero; \*\* sostanza inclusa nell'avviso per le proposte di modifica

Va sottolineato come, per i due isomeri del TDI, nel 2014 l'ACGIH avesse in corso di valutazione la proposta di modifica dei valori limite ponderale TLV-TWA® e del valore limite per esposizioni di breve durata TLV-STEL® e anche per la ridefinizione degli effetti critici e delle annotazioni a corredo di tali valori: tali proposte di modifica sono state recepite ed adottate dall'ACGIH a partire dal 2016. In particolare, le modifiche adottate hanno portato ad un abbassamento dei valori limite per gli isomeri del TDI, modificando il TLV-TWA® da 0,005 ppm a 0,001 ppm e il TLV-STEL® da 0,02 ppm a 0,005 ppm, con la specifica indicazione di valutare la frazione inalabile delle polveri ed i vapori per la determinazione del livello di sostanza aerodispersa.

### **Campionamento di aria ambiente – Azienda n.2**

Sono stati condotti 6 campionamenti di aria ambiente presso l'azienda n.2, dove è previsto l'uso di 1,6-esametilene diisocianato. L'HDI viene applicato sulle schede elettroniche da sottoporre al trattamento di resinatura, durante il quale tale diisocianato viene applicato sulle schede che in seguito vengono poste sotto lampada UV, per generare *on site* una resina poliuretanica sullo strato superficiale. I campionamenti sono stati realizzati secondo la procedura illustrata nel capitolo "Materiali e Metodi" del presente lavoro, al fine di determinare sia il livello di esposizione ad 1,6-HDI in aria ambiente sia l'esposizione dell'addetto all'operazione di resinatura. I campionatori in posizione fissa sono stati collocati in corrispondenza delle posizioni in cui veniva svolta l'operazione di resinatura, ma anche in posizioni adiacenti nel medesimo reparto, per valutare l'eventuale dispersione dell'inquinante. Inoltre è stata valutata l'esposizione dell'addetto alla resinatura tramite campionamento personale. La durata dei campionamenti è stata di circa 7 ore per 5 dei 6 campionamenti e di circa 1 ora per il campionamento in posizione fissa condotto in corrispondenza dell'operazione di resinatura, al fine di valutare la concentrazione di picco dell'HDI aerodisperso.

### **Analisi dei filtri campionati**

I campioni raccolti sono stati analizzati in HPLC fluorimetro, col metodo analitico ottimizzato in laboratorio, descritto nel capitolo "Materiali e Metodi". I risultati del monitoraggio ambientale sono raccolti in Tabella XXXVI, dove sono riportati anche i dettagli dei campionamenti realizzati.

**Tabella XXXVI** Concentrazione ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) dell'1,6-HDI nelle postazioni di lavoro e per il personale monitorati.

<b>Tipo di campionamento</b>	<b>Durata del campionamento</b>	<b>Posizione di campionamento</b>	<b>1,6-HDI (<math>\mu\text{g}/\text{m}^3</math>)</b>
posizione fissa	lunga	Banco resinatura	0,212
posizione fissa	lunga	Carrello Stazionamento	0,215
posizione fissa	lunga	Zona assemblaggio schede	0,152
posizione fissa	lunga	Zona scrivanie	0,215
personale	lunga	-	0,190
posizione fissa	breve	banco resinature	2,045

Dai risultati ottenuti dal monitoraggio ambientale emerge come, per quanto riguarda i 5 campionamenti di lunga durata condotti in posizione fissa e per il campionamento personale, emerge una concentrazione di 1,6-HDI omogeneamente diffusa in aria ambiente, ma comunque inferiore a 1/100 del valore limite ponderale in corso di adozione dall'ACGIH nel periodo di esecuzione delle analisi, pari a  $34 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (ACGIH, 2015). Il campionamento di breve durata, in corrispondenza dell'operazione di resinatura, evidenzia un livello di 1,6-HDI decisamente più alto, ma comunque inferiore a 1/10 del TLV-TWA®. Va sottolineato che, nonostante le concentrazioni riscontrate si attestino tutte a valori inferiori al TLV-TWA®, l'esposizione ambientale ad un inquinante con effetto sensibilizzante a carico delle vie respiratorie, quale è l'1,6-HDI, va sempre mantenuta al livello più basso possibile per salvaguardare la salute dei soggetti esposti.

## DOSAGGIO DEI METABOLITI URINARI

### 1. DOSAGGIO DELLA 2,4-TOLUEN DIAMMINA (2,4-TDA) E DELLA 2,6-TOLUEN DIAMMINA (2,6-TDA)

Per la messa a punto di un metodo analitico per la determinazione dei metaboliti urinari del 2,4-TDI e del 2,6-TDI si è presa in considerazione la relativa letteratura scientifica nazionale ed internazionale, selezionando in particolare i lavori dove fosse stata utilizzata la gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa come metodo di separazione ed identificazione analitica.

Le prime prove della metodica sono state condotte su soluzioni in solvente (diclorometano) per l'individuazione delle condizioni analitiche ottimali, quindi su matrice urinaria. La matrice urinaria utilizzata di volta in volta è stata ottenuta da un *pool* di urine di soggetti non esposti professionalmente a diisocianati o ad altri solventi chimici. La procedura di estrazione dei metaboliti dalla matrice urinaria è stata sviluppata realizzando delle prove con due diversi metodi di purificazione ed estrazione: su fase solida con l'ausilio di colonnine pre-confezionate (colonnine *SPE* "Chem Elut", *Waters*) e liquido/liquido utilizzando come solvente di estrazione il diclorometano. Il confronto dei risultati ottenuti ha permesso di valutare quale fosse la procedura ottimale per tale fase della metodica da mettere a punto. Sono state quindi condotte ulteriori prove inserendo un pre-trattamento di idrolisi acida della matrice urinaria, come riportato in alcuni lavori di letteratura (Sandström *et al.*, 1989; Lind *et al.*, 1996; Tinnerberg *et al.*, 1997; Rosenberg *et al.*, 2002; Sakai *et al.*, 2005; De Palma *et al.*, 2012; Świerczyńska-Machura *et al.*, 2015). Tale procedura di pretrattamento della matrice urinaria per la determinazione dei metaboliti degli esposti a diisocianati è stata inserita anche all'interno delle indicazioni raccolte dall'ACGIH nella *Documentation* relativa ai valori limite ambientali e biologici (a partire dal 2015 per l'HDI e a partire dal 2016 per il TDI) (ACGH, 2015; ACGIH, 2016).

#### **Preparazione delle soluzioni madre in diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)**

Le soluzioni madre per i 2 standard 2,4-TDA e 2,6-TDA, e per lo standard interno 3,4-TDA sono state preparate in diclorometano (solvente utilizzato nella fase finale di estrazione e derivatizzazione) ad una concentrazione pari a 1 g/L. La stabilità di tali soluzioni, se conservate a 4°C, è risultata pari ad almeno 3 mesi.

#### **Identificazione qualitativa in GC-MS - Prove in solvente e ottimizzazione del metodo di massa**

Per l'identificazione qualitativa dei tempi di ritenzione dei 3 isomeri sono state iniettate in GC-MS, con il metodo precedentemente indicato, le soluzioni dei 3 standard in concentrazione pari a 500

$\mu\text{g/L}$  ed in seguito una soluzione contenente sia i 2 standard e che lo standard interno in concentrazione pari a  $500 \mu\text{g/L}$ .

Il tempo di ritenzione dei 3 isomeri è indicata in tabella XXXVII.

**Tabella XXXVII** Tempi di ritenzione ( $t_R$ ) determinati per i 3 isomeri del TDA in GC-MS.

<b>analita</b>	<b><math>t_R</math> / minuti</b>
3,4 TDA	8,70
2,6 TDA	9,13
2,4 TDA	9,20

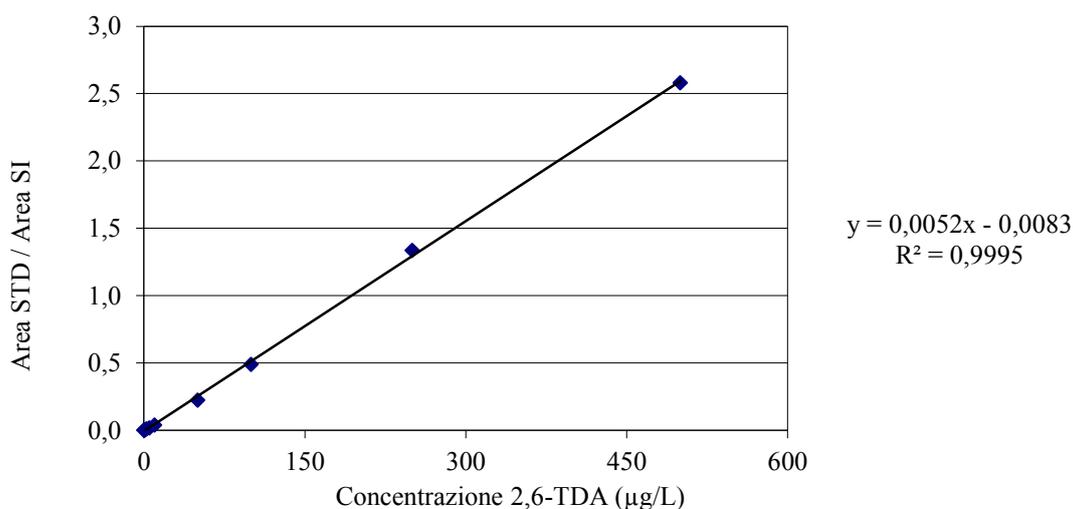
A seguito delle prime prove eseguite in solvente, per ottimizzare la prestazione del *detector* spettrometro di massa, il metodo di massa è stato modificato inserendo un *Delay Time* di 5 minuti, in modo da evitare l'analisi del solvente.

### **Linearità**

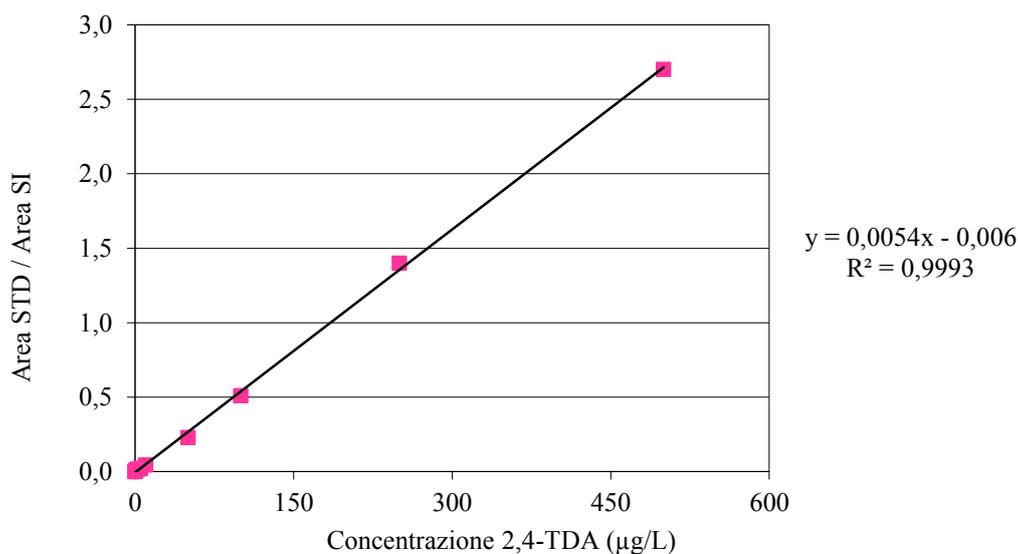
Al fine di determinare la linearità della risposta strumentale è stata preparata una retta di calibrazione in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  nell'intervallo di concentrazione dei 2 standard  $0,5 - 500 \mu\text{g/L}$  e concentrazione dello standard interno pari a  $250 \mu\text{g/L}$ .

La risposta strumentale è risultata lineare con un coefficiente di determinazione  $R^2 > 0,99$  in tutti i casi.

In figura 16 e figura 17 è riportata la risposta strumentale, calcolata come rapporto delle aree fra lo standard e lo standard interno S.I., in funzione della concentrazione dei 2 analiti. È riportata inoltre l'equazione della retta di tendenza per entrambi gli standard ed il coefficiente di determinazione  $R^2$  ottenuto.



**Figura 16** Retta di calibrazione della 2,6-TDA in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.



**Figura 17** Retta di calibrazione di 2,4-TDA in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

### **Prove di derivatizzazione con anidride eptafluoro butirrica (HFBA)**

Le molecole indagate per la messa a punto del metodo, ovvero le ammine corrispondenti dei diisocianati d'interesse, sono molecole organiche con caratteristiche chimico-fisiche (polarità, volatilità) che non le rendono idonee all'analisi in gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS). È necessario modificarne la struttura molecolare in modo tale da aumentarne in modo efficace la volatilità, così da poterle poi analizzare in GC-MS.

A tal fine si è adottata una procedura analitica molto diffusa, ovvero la derivatizzazione chimica mediante reazione con un opportuno reagente da condursi in condizioni sperimentali ottimizzate (concentrazione dei reagenti, temperatura di derivatizzazione). Nel caso in questione è stata utilizzata l'anidride eptafluorobutirrica, HFBA.

Per valutare l'effetto della temperatura di derivatizzazione sulla quantitatività della reazione, sono state preparate delle rette di calibrazione dei due standard 2,4-TDA e 2,6-TDA in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  su due livelli di concentrazione pari a 10  $\mu\text{g/L}$  e 100  $\mu\text{g/L}$  ciascuno. La reazione di derivatizzazione è stata condotta in doppio, per ogni livello di concentrazione considerato, facendo reagire le soluzioni così preparate a 4 diversi valori di temperatura (40°, 55°, 65° e 75°C) e mantenendo fisso ogni altro parametro sperimentale (concentrazione di derivatizzante e tempo di derivatizzazione).

Osservando la risposta strumentale, si è verificato un andamento progressivamente decrescente all'aumentare della temperatura di lavoro, con un massimo in corrispondenza del valore di temperatura pari a 55°C, che quindi si rivela essere la temperatura ottimale per massimizzare la derivatizzazione delle diammine processate.

Per verificare la quantità ottimale di agente derivatizzante sono state preparate delle rette di calibrazione in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , scegliendo due livelli di concentrazione per i due standard 2,4-TDA e 2,6-TDA in base ai livelli di 2,4-TDA e 2,6-TDA riportati in alcuni lavori di letteratura per lavoratori esposti ai corrispondenti diisocianati (si veda ad esempio, Geens *et al.*, 2012).

Sono state quindi preparate delle soluzioni per il 2,4-TDA e il 2,6-TDA a concentrazione pari a 10  $\mu\text{g/L}$  e a 100 $\mu\text{g/L}$ . La reazione di derivatizzazione è stata condotta in doppio, per ogni livello di concentrazione dei 2 standard, aggiungendo 3 diverse quantità di HFBA pura (50, 100 e 150  $\mu\text{L}$ ). Le prove sono state effettuate alla temperatura di 55°C precedentemente individuata, per un tempo di reazione pari a 1 ora.

Osservando la risposta strumentale, si è verificato un andamento "a plateau" per volumi superiori a 100  $\mu\text{L}$  di HFBA, quindi il volume ottimale di HFBA tale da assicurare una derivatizzazione quantitativa delle diammine processate è risultato essere pari a 100  $\mu\text{L}$ .

### **Stabilità delle soluzioni degli standard e dello standard interno, dopo derivatizzazione**

Le soluzioni delle prove realizzate in solvente e derivatizzate secondo il metodo descritto, sono state conservate in frigorifero a 4 °C. Ripetendo l'analisi in GC-MS si è verificata la stabilità di tutti gli standard in tali soluzioni per un periodo di almeno 1 mese.

### **Preparazione delle rette di calibrazione in matrice urinaria - Confronto fra tecniche di purificazione: colonnine SPE ed estrazione l/l con solvente organico**

A partire da soluzioni madre da 1 g/L in acetonitrile e acido cloridrico 0,1 M (50/50 v/v), sono state preparate delle rette di calibrazione, in doppio, lavorando in matrice urinaria, nell'intervallo di concentrazione 1 – 500 µg/L. La concentrazione di standard interno era pari a 250 µg/L. In entrambi i casi, dopo l'estrazione del metabolita dalla matrice urinaria la procedura ha previsto una derivatizzazione con 100 µL di HFBA a 55°C per 1 ora, evaporazione del solvente, ridissoluzione del residuo secco con 100 µL di toluene e analisi in GC-MS.

#### ➤ Purificazione su SPE ed estrazione con solvente organico (diclorometano).

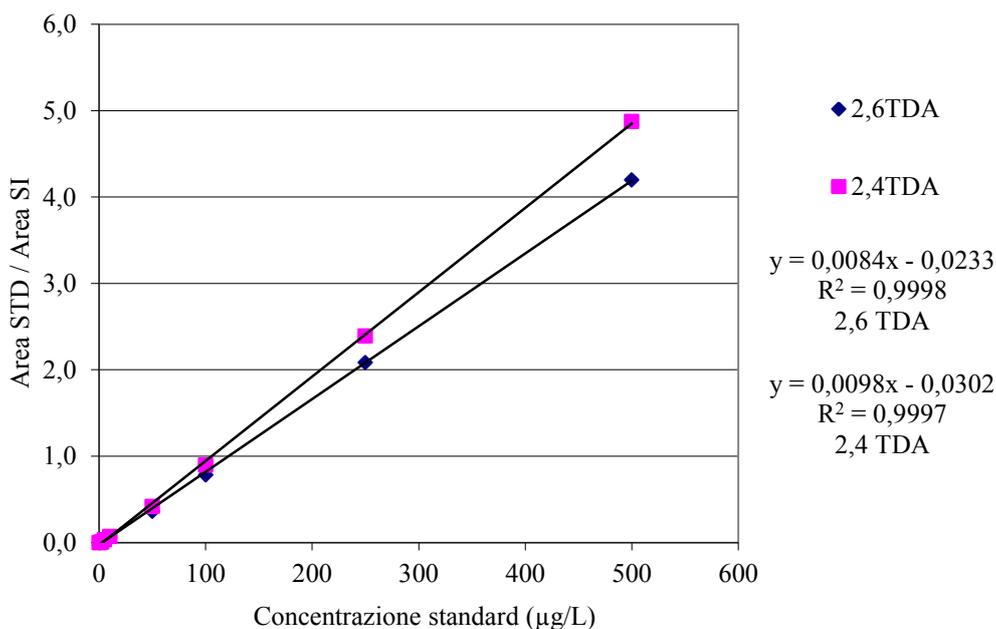
Le soluzioni per la retta di calibrazione sono state purificate mediante adsorbimento su colonnine SPE “Chem Elut” secondo la procedura descritta di seguito: lavorando su volumi di soluzione da 5 mL di urina, sono state usate 2 aliquote da 8 mL di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> per ogni soluzione trattata. Segue quanto previsto dalla procedura analitica precedentemente riassunta.

In questa modalità di estrazione, il metodo ha dimostrato una buona linearità nell'intervallo considerato, ma una presenza di picchi interferenti in particolare alle basse concentrazioni (1 µg/L).

#### ➤ Purificazione mediante estrazione liquido/liquido con solvente organico (diclorometano).

Si sono processati 5 mL di urina per ogni punto di calibrazione, in maniera analoga a quanto descritto per le prove con colonnine SPE, ma procedendo all'estrazione liquido/liquido con diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) per estrarre gli analiti di interesse dalla matrice urinaria: vengono aggiunte 2 aliquote successive, da 7 e poi da 5 mL di solvente, riunendo le fasi organiche in provette pyrex da 15 mL. Ad ogni aggiunta di solvente nella matrice urinaria segue agitazione su *vortex* a singola provetta, quindi miscelazione su agitatore a scuotimento per 20 minuti. Dopo ogni estrazione si procede con la separazione mediante centrifuga a 3000 rpm per 5 minuti, per rompere l'emulsione creatasi fra le due fasi. Al termine di ogni passaggio si raccoglie la fase organica (inferiore) per la reazione di derivatizzazione.

In figura 18 si riportano due fra le rette di calibrazione ottenute con tale metodica analitica.



**Figura 18** Retta di calibrazione dei 2 standard 2,6-TDA e 2,4-TDA in matrice urinaria, con estrazione liquido/liquido.

Da un confronto della linea di base e dei picchi presenti nei cromatogrammi ottenuti per le prove con la purificazione mediante colonnine SPE e per quelle con l'estrazione liquido/liquido si osserva una maggiore "pulizia" del tracciato cromatografico per le soluzioni realizzate mediante estrazione l/l, in particolare in corrispondenza dei tempi di ritenzione (8,70, 9,13 e 9,20 minuti) delle specie di interesse (3,4-TDA, 2,6-TDA e 2,4-TDA rispettivamente).

Al fine di ridurre ulteriormente il rumore di fondo e la presenza di eventuali interferenti, il metodo di massa per l'analisi in GC-MS è stato modificato inserendo l'acquisizione con il frammento molecolare con rapporto massa/carica pari a 514 m/z, analogamente a quanto riportato in letteratura e quindi escludendo tutte gli interferenti urinari con un peso molecolare inferiore (De Palma *et al.*, 2012). La quantificazione dei metaboliti del 2,4-TDI e del 2,6-TDI verrà quindi condotta considerando le aree dei picchi di interesse a 9,13 minuti, 9,20 minuti e 8,70 minuti (S.I.) ottenute per il frammento di massa 514 m/z, inserendolo come *quantifier* nel metodo di massa del GC-MS anche per le successive determinazioni.

### **Resa di estrazione delle prove in matrice urinaria: confronto fra colonnine SPE ed estrazione l/l con solvente organico**

A partire dalle soluzioni madre da 1 g/L in diclorometano, sono state preparate delle soluzioni in doppio, a due diversi livelli di concentrazione dei 2 standard (rispettivamente 10 e 100 µg/L) in matrice urinaria. Successivamente gli analiti sono stati estratti dalla matrice urinaria sia mediante

colonnine SPE, sia mediante estrazione liquido/liquido con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  secondo la procedura analitica già descritta. Le soluzioni ottenute con le due procedure di estrazione sono state quindi confrontate con i risultati ottenuti dall'analisi di soluzioni standard preparate in solvente alle medesime concentrazioni. La finalità di tale misura era determinare la percentuale di estrazione dalla matrice urinaria sia in relazione alla procedura utilizzata sia in valore assoluto rispetto alle prove condotte in solvente (100% del recupero). La procedura di estrazione più efficace è risultata quella liquido/liquido con una percentuale di estrazione pari all'80% rispetto ad una percentuale di recupero del 60% ottenuta con l'estrazione su fase solida.

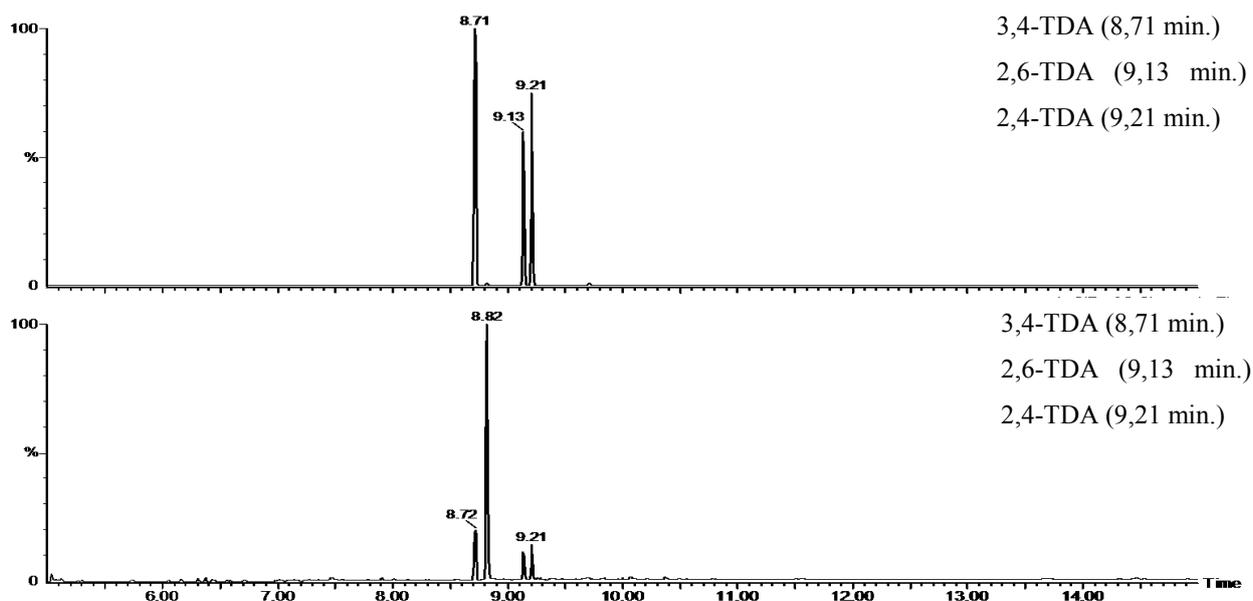
Inoltre, i valori ottenuti per i rapporti fra le singole aree dei picchi degli standard e l'area dello standard interno delle prove realizzate mediante estrazione l/l sono risultati essere del tutto confrontabili numericamente con quanto ottenuto dalle ripetute prove condotte in solvente, dove non si è in presenza di un effetto matrice.

### **Preparazione della retta di calibrazione in urina pre-trattata con idrolisi acida**

Al fine di rendere disponibili all'analisi i metaboliti urinari dei diisocianati considerati, è stato inserito un pre-trattamento di idrolisi acida ad alta temperatura come *step* iniziale della procedura analitica descritta: la finalità di tale pre-trattamento è quella di rendere disponibili all'analisi i metaboliti di interesse ed di poter poi confrontare i risultati ottenuti dall'analisi dei campioni reali con i valori limite di riferimento per tali composti. Sono state realizzate quindi alcune rette di calibrazione pre-trattando un *pool* di urine raccolte fra soggetti non professionalmente esposti, mediante idrolisi acida con acido solforico concentrato alla temperatura di 100°C, secondo quanto riportato da lavori di letteratura (Sakai *et al.*, 2005; De Palma *et al.*, 2012). Per la descrizione dettagliata della procedura di idrolisi della matrice urinaria, si rimanda al capitolo “Materiali e Metodi” del presente elaborato.

La retta di calibrazione dei due standard è stata preparata in doppio, in urina pre-trattata: l'intervallo di concentrazione testato è compreso fra 1 e 500  $\mu\text{g/L}$  e lo S.I. è presente in concentrazione fissa, pari a 250  $\mu\text{g/L}$ .

A titolo di esempio, in figura 19 è riportato sia il cromatogramma dell'acquisizione in modalità SIR, che il cromatogramma ottenuto a partire dall'acquisizione in *FullScan* estraendo il singolo frammento molecolare con rapporto massa/carica pari a 514  $m/z$  (“*quantifier*”): la figura è relativa ad una soluzione dei due standard alla concentrazione di 100  $\mu\text{g/L}$  in urina pre-trattata mediante idrolisi acida, con concentrazione dello standard interno pari a 250  $\mu\text{g/L}$ .



**Figura 19** Cromatogrammi a confronto per una soluzione dei due standard e dello S.I. in matrice urinaria: tracciato relativo all'acquisizione in SIR (sopra) e all'acquisizione in *FullScan* (sotto).

Le aree ottenute sono dello stesso ordine di grandezza, ma comunque maggiori rispetto a quelle ottenute dalle rette di calibrazione preparate a partire da matrice urinaria non pre-trattata. Inoltre il tracciato risulta più pulito e quindi l'identificazione dei picchi in corrispondenza dei  $t_R$  di interesse risulta facilitata a basse concentrazioni degli standard.

I limiti di rilevabilità e di quantificazione ottenuti dalle prove preliminari in urina pre-trattata si sono attestati a valori migliori rispetto alle prove realizzate in urina non pre-trattata.

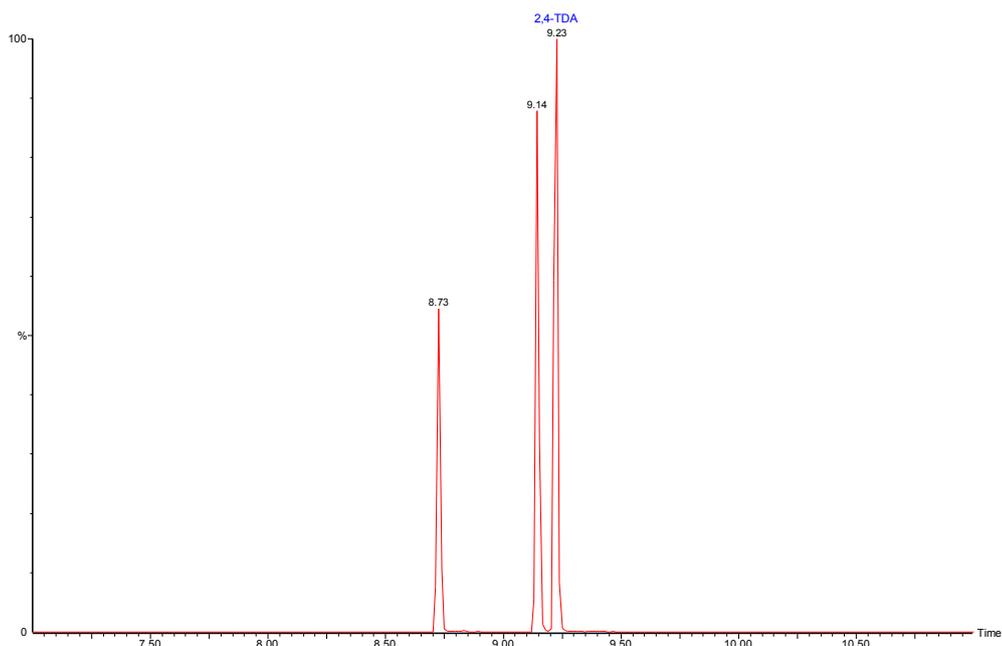
### Validazione del metodo analitico

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

### Separazione cromatografica

Gli analiti risultano bene separati, all'interno di un'unica corsa cromatografica e risultano esenti da interferenze analitiche.

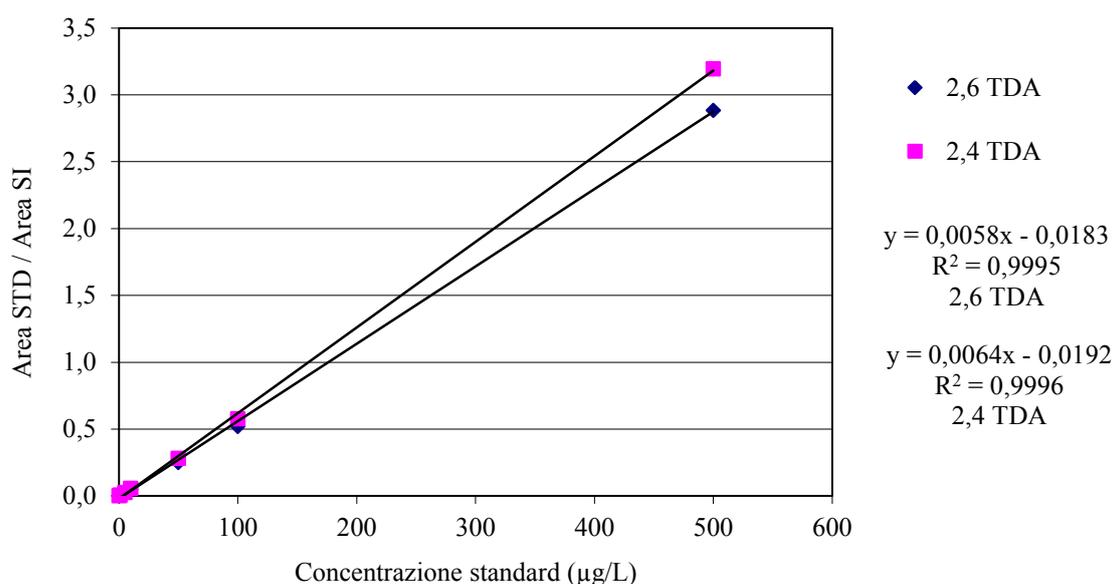
In figura 20 è riportato il cromatogramma ottenuto per le tre specie analitiche.



**Figura 20** Cromatogramma relativo ad una soluzione da 100 µg/L dei due standard, in presenza dello S.I. (55 µg/L) in urina pre-trattata mediante idrolisi acida.

### Linearità

Per tutti e tre gli isomeri del TDA considerati il metodo analitico si è dimostrato lineare nell'intervallo di concentrazione testato, ovvero fra valori di concentrazione inferiori al limite di rilevabilità (L.R.) fino 500 µg/L in presenza dello S.I. alla concentrazione di 250 µg/L, con un coefficiente di determinazione  $R^2 > 0,99$  (figura 21).



**Figura 21** Retta di calibrazione dei 2 standard 2,6-TDA e 2,4-TDA in matrice urinaria pre-trattata.

### **Limiti di rilevabilità e limiti di quantificazione**

I limiti di rilevabilità (LR) del metodo analitico sono stati determinati come di seguito indicato:

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

dove  $\sigma$  rappresenta la deviazione standard del segnale analitico e  $m$  rappresenta la pendenza della retta di calibrazione.

In tali condizioni i limiti di rilevabilità ottenuti sono pari a LR <0,05  $\mu\text{g/L}$  per la 2,6-TDA e a LR = 0,1  $\mu\text{g/L}$  per la 2,4-TDA.

Il limite di quantificazione (LQ) del metodo analitico sono stati determinati come di seguito indicato:

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

dove  $\sigma$  rappresenta la deviazione standard del segnale analitico e  $m$  rappresenta la pendenza della retta di calibrazione.

In tali condizioni i limiti di quantificazione (LQ) per i due isomeri della TDA sono risultati pari a: 0,1  $\mu\text{g/L}$  (0,6 nmol/L) per la 2,6-TDA e a 0,2  $\mu\text{g/L}$  (1,1 nmol/L) per la 2,4-TDA.

I limiti LR e LQ ottenuti per il metodo analitico risultano adeguati per l'analisi dei metaboliti del 2,4-TDI e del 2,6-TDI.

### **Precisione**

La precisione del metodo, espressa come coefficiente di variazione percentuale, in termini di ripetibilità *intra-day* per il 2,6-TDA è risultata compresa tra 3,5% e 13,6% per l'intervallo di concentrazioni fra 100  $\mu\text{g/L}$  e 10  $\mu\text{g/L}$ ; per il 2,4-TDA è risultata compresa tra 4,4% e 19,5% per l'intervallo di concentrazioni fra 100 e 10  $\mu\text{g/L}$ .

### **Accuratezza**

L'accuratezza del metodo è risultata pari al 95% per il livello di concentrazione pari a 10  $\mu\text{g/L}$ .

Le prestazioni del metodo sviluppato sono caratterizzate da un limite di rilevabilità e da un limite di quantificazione tali da poter essere confrontabili con i dati di letteratura per analoghe determinazioni condotte con la medesima tecnica analitica (GC-MS EI+); è stata verificata la linearità nel *range* di concentrazioni di interesse, al fine di poter adattare la metodica all'analisi di soggetti professionalmente esposti a TDI, per i quali gli intervalli di concentrazione dei metaboliti urinari, emersi dalla letteratura, si attestano da inferiori al limite di rilevabilità, con LR inferiore o

uguale a 0,1 µg/L (ad esempio in Brorson *et al.*, 1991; Kääriä *et al.*, 2001; Sennbro *et al.*, 2004; Creely *et al.*, 2006; De Palma *et al.*, 2012) fino a livelli di concentrazione dei metaboliti urinari pari a circa 100 µg/L (Sennbro *et al.*, 2004); è stata determinata una buona ripetibilità *intra-day* sia per le basse concentrazioni (1 µg/L) che per le alte concentrazioni, permettendo in tal modo di procedere all'analisi di campioni reali professionalmente esposti a 2,4-TDI, 2,6-TDI o ad una miscela dei due isomeri.

### **Analisi della 2,4-TDA nei campioni urinari**

È stato possibile applicare il metodo gascromatografico messo a punto per la determinazione del metabolita urinario del 2,4-TDI, applicandolo all'analisi dei campioni di urina di 13 pazienti sottoposti a un test di provocazione bronchiale specifica utilizzando tale diisocianato.

Il test prevede di sottoporre il paziente per un'ora ad un'esposizione continuativa e controllata di 2,4-TDI in cabina ventilata, con un livello di concentrazione ambientale medio compreso fra 10 e 20 ppb, verificato in tempo reale da un analizzatore dedicato (SPM Single Point Monitor, Zellweger Analysis Ltd, UK). A distanza di 7 ore dall'esposizione, è prevista la raccolta di un campione di urina del paziente.

In tabella XXXVIII sono riportati i risultati delle analisi condotte sui 13 campioni, corretti per il valore di creatinina urinaria determinata sul campione stesso, laddove tale valore fosse compreso fra 0,3 e 3,0 g/L: nel caso il valore di creatinina determinato non rientrasse in questo *range* la concentrazione del metabolita non è stata corretta (n.c.), in linea con quanto suggerisce l'OMS per la determinazione della concentrazione dei metaboliti urinari, per i quali la risposta analitica è così fortemente soggetta alle caratteristiche fisiologiche e allo stato di salute interindividuale. Ulteriori studi di letteratura confermano l'opportunità di correggere il dato della concentrazione urinaria di questi metaboliti per il valore di creatinina urinaria, soprattutto nell'eventualità di associazione dei dati del monitoraggio biologico con valori di esposizione ambientale (Sakai, 2005; ACGIH, 2016). Nel caso di valori di concentrazione dell'analita al di sotto del limite di rilevabilità attestato con il metodo analitico messo a punto, il risultato è stato indicato in funzione di tale valore.

**Tabella XXXVIII** Valori di concentrazione della 2,4-TDA nei campioni dei pazienti sottoposti al test di provocazione bronchiale con 2,4-TDI.

<b>Campione</b>	<b>2,4-TDA (µg/L)</b>	<b>creatinine (g/L)</b>	<b>2,4-TDA (µg / g creatinina)</b>
<b>C1</b>	<0,1	1,25	<0,2
<b>C2</b>	<0,1	2,35	<0,1
<b>C3</b>	<0,1	2,44	<0,1
<b>C4</b>	<0,1	0,94	<0,2
<b>C5</b>	<0,1	0,11	n.c.
<b>C6</b>	0,4	3,47	n.c.
<b>C7</b>	<0,1	1,47	<0,1
<b>C8</b>	<0,1	0,85	<0,2
<b>C9</b>	0,3	0,85	0,4
<b>C10</b>	<0,1	1,84	<0,1
<b>C11</b>	<0,1	0,93	<0,2
<b>C12</b>	<0,1	0,72	<0,3
<b>C13</b>	<0,1	0,98	<0,2

Tale metodo si è dimostrato quindi idoneo per l'analisi di 13 campioni di pazienti sottoposti al test di provocazione bronchiale reagente specifica, secondo la procedura prevista dall'Ambulatorio della Fisiopatologia Respiratoria dell'U.O.C. di Medicina del Lavoro, per pazienti esposti a diisocianati in ambiente lavorativo.

Di 13 campioni solo il 15% è risultato dosabile riportando un valore medio di concentrazione di 2,4-TDA pari a 0,3 µg/L; il rimanente 85% risulta inferiore al limite di quantificazione.

La letteratura scientifica riporta alcuni studi su soggetti volontari sottoposti ad esposizione controllata di miscele di 2,4-TDI e 2,6-TDI, dai quali emerge che l'escrezione urinaria segue uno schema a due fasi, dove una primo picco di eliminazione si ha in tempi rapidi, con valori di  $t_{1/2}$  compresi fra 1,1 e 2,5 ore per la 2,4-TDA e  $t_{1/2}$  compresi fra 1,1 e 2,2 ore per la 2,6-TDA. Per la seconda fase di eliminazione delle diammine il tempo di dimezzamento stimato è pari a circa 5 ore, per entrambi gli isomeri del TDI (Brorson *et al.*, 1991; ACGIH, 2016). Tuttavia tali dati non sono in

completo accordo con analoghi studi reperibili in letteratura, dai quali emerge come il picco di escrezione urinaria di tali composti si attesti in un intervallo compreso fra le 6 e le 8 ore (Skarping *et al.*, 1991). Dall'analisi dei lavori riportati in letteratura relativi all'esposizione controllata a TDI di soggetti volontari, quindi, emerge come non vi siano ancora sufficienti evidenze sull'influenza dei fattori legati alla soggettività interindividuale nella cinetica di eliminazione di questi metaboliti e che anche i parametri strumentali per la realizzazione di tali prove debbano essere maggiormente definiti al fine di standardizzare i test di esposizione.

Il confronto con i dati di letteratura suggerisce che probabilmente la raccolta dei campioni dei pazienti esposti a 2,4-TDI nel test di provocazione bronchiale non è stata realizzata nel momento di picco dell'escrezione urinaria della 2,4-TDA, rendendo quindi difficile dosare tale sostanza nei campioni urinari raccolti.

## 2. DOSAGGIO DELLA DIFENILMETANO-4,4'-DIAMMINA (4,4'-MDA)

Per la messa a punto di un metodo analitico per la determinazione del metabolita urinario del 4,4'-MDI si è partiti dal metodo in gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa sviluppato per la determinazione dei metaboliti delle due forme isomeriche del TDI ed apportando le modifiche necessarie.

Le prime prove per l'analisi della 4,4'-MDA sono state condotte su soluzioni in solvente (diclorometano) per l'individuazione delle condizioni analitiche ottimali, passando poi direttamente all'esecuzione delle prove su matrice urinaria acido-idrolizzata; la matrice urinaria utilizzata di volta in volta è stata ottenuta da un *pool* di urine di soggetti non esposti professionalmente a diisocianati o ad altri solventi chimici. Si è poi studiato l'effetto della variazione di alcuni parametri sull'efficacia della reazione di derivatizzazione, quindi sull'ottimizzazione del processo ed infine è stata valutata la resa di estrazione del solvente a partire da soluzioni madre diverse, mettendo a confronto i risultati ottenuti.

### Prove di solubilità

Prima di procedere alla preparazione delle soluzioni madre, si è verificata la solubilità dello standard e dello standard interno in un set di solventi polari e apolari tal quali e anche in alcune miscele di due solventi.

In particolare, le prove di solubilità sono state condotte in:

- acetone, acetonitrile, acqua, etanolo, diclorometano, metanolo.
- acido cloridrico 0,1 M in acqua, soluzione 50/50 di acetone e acqua, soluzione 50/50 di acetonitrile e acido cloridrico 0,1 M in acqua.

Dalle prove svolte lo standard e lo S.I. sono risultati entrambi solubili in acetone, metanolo, diclorometano e nella miscela 50/50 di acetonitrile e acido cloridrico 0,1 M in acqua.

Le prove preliminari del metodo in solvente organico sono state realizzate utilizzando diclorometano, mentre per la preparazione delle soluzioni madre dello standard e dello S.I. da utilizzare nelle prove in matrice urinaria è stata scelta la miscela 50/50 di acetonitrile e acido cloridrico 0,1 M.

### Preparazione delle soluzioni madre in diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )

Sono state preparate soluzioni madre da 1 g/l dello standard 4,4'-MDA e per lo standard interno 3,4-TDA. Le soluzioni madre sono state preparate di volta in volta.

### Identificazione qualitativa in GC-MS - Prove in solvente e ottimizzazione del metodo di massa

Per l'identificazione qualitativa del tempo di ritenzione del 4,4'-MDA sono state iniettate in GC-MS soluzioni dello standard in concentrazione pari a 500 µg/L ed in seguito una soluzione contenente sia l'analita che lo standard interno in concentrazione pari a 500 µg/L e 250 µg/L rispettivamente.

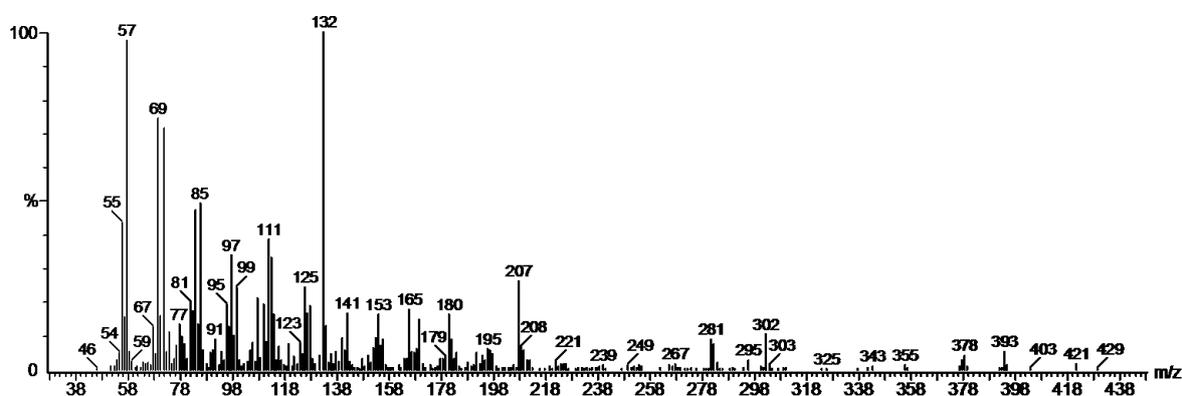
Il tempo di ritenzione dello standard e dello standard interno così identificati sono indicati in tabella XXXIX.

**Tabella XXXIX** Tempo di ritenzione ( $t_R$ ) del 4,4'-MDA e dello S.I. (3,4-TDA).

analita	$t_R$ / minuti
4,4'-MDA	14,81
3,4 TDA	8,70

Il tempo di analisi da inserire nel metodo cromatografico è stato quindi fissato a 18 minuti.

Dall'acquisizione in modalità *Full Scan* di una soluzione standard di 4,4'-MDA alla concentrazione di 10 mg/L è stato ricavato lo spettro di massa della sostanza per l'individuazione di frammenti caratteristici e più intensi, da selezionare per l'analisi quantitativa (figura 22). Si sottolinea che lo spettro di massa di questo analita non è presente nelle comuni librerie in dotazione al *software* di gestione dello spettrometro di massa.



**Figura 22** Spettro di massa dello standard 4,4'-MDA in corrispondenza del picco a  $t_R = 14,81$  minuti (soluzione da 10 mg/L).

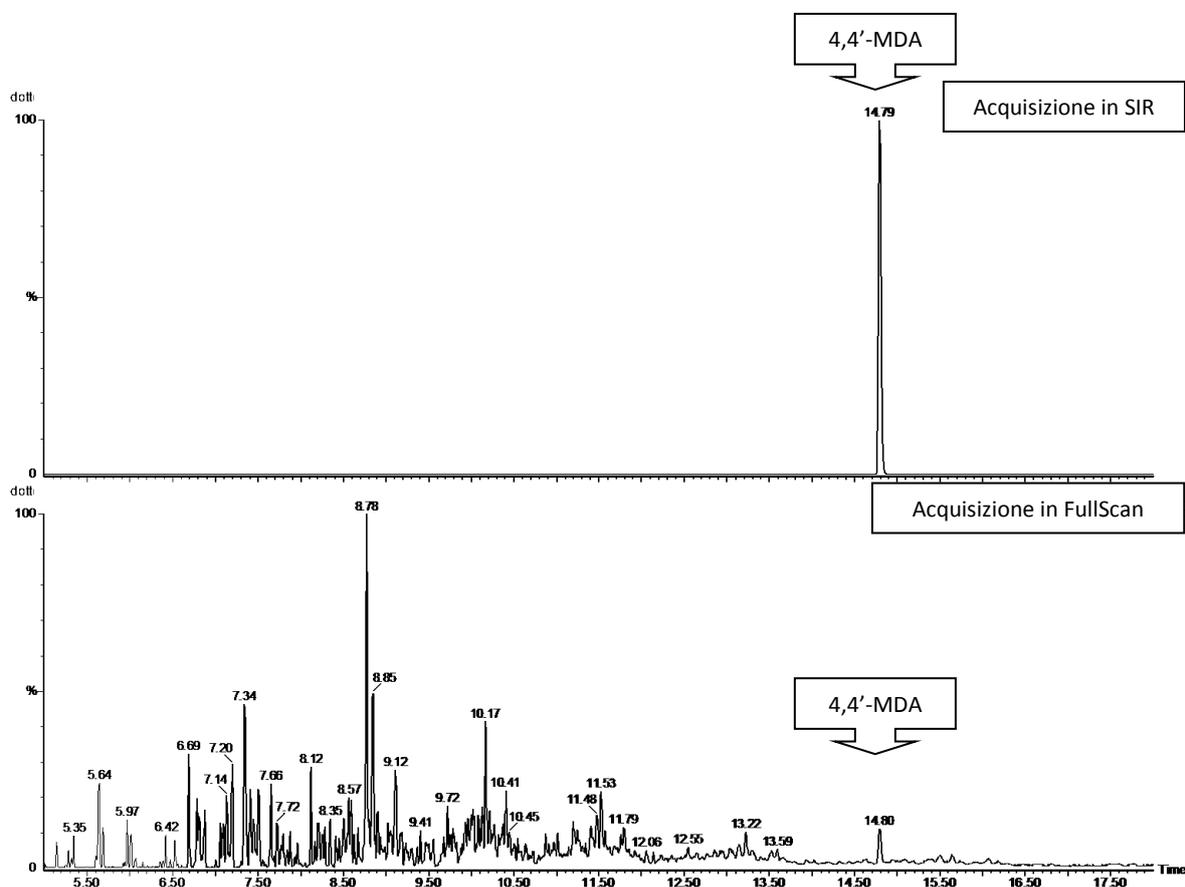
Al fine di mettere a punto un metodo analitico di massa *ad hoc* per la quantificazione del 4,4'-MDA si sono considerati i frammenti molecolari più intensi e con valori di m/z tali da non essere confondibili con altre specie molecolari presenti in ambiente di reazione.

I frammenti di massa così identificati per lo standard 4,4'-MDA sono i seguenti (fra parentesi è riportata l'intensità percentuale, calcolata rispetto al segnale più intenso dello spettro di frammentazione):

- 132 m/z (100%);
- 302 m/z (17%);
- 393 m/z (9%).

Il metodo di massa in modalità di acquisizione SIR (*Single Ion Recording*) è stato quindi modificato introducendo i valori di m/z degli specifici frammenti molecolari individuati, per poter ottimizzare la risposta strumentale alla determinazione quantitativa della specie 4,4'-MDA.

In figura 23 è riportato il confronto tra i cromatogrammi ottenuti acquisendo l'analisi in modalità SIR e in modalità *FullScan* analizzando una soluzione dell'analita (concentrazione pari a 5 mg/L) in presenza dello S.I. (concentrazione pari a 250 µg/L). Dal confronto risulta evidente l'efficacia dell'acquisizione in SIR per la messa a punto di un metodo analitico per il dosaggio del 4,4'-MDA.



**Figura 23** Confronto fra i cromatogrammi ottenuti per la medesima soluzione del 4,4'-MDA (5 mg/L) in presenza dello S.I. (250 µg/L), acquisendo in modalità SIR e in modalità *FullScan*.

### **Resa di estrazione con diclorometano dalla matrice urinaria**

A partire da una soluzione madre preparata con la miscela ACN/HCl 0,1 M = 50 / 50 sono state preparate delle soluzioni a concentrazione pari a 2,5, 5,0 e 10 mg/L dello standard in urina (*pool* di urine di soggetti non professionalmente esposti); parallelamente sono state preparate delle soluzioni a concentrazione pari a 2,5, 5,0 e 10 mg/L dello standard in diclorometano. Si procede all'estrazione liquido/liquido dell'analita con diclorometano a partire dalla matrice urinaria, alla derivatizzazione e all'analisi in GC-MS, come previsto dal metodo analitico.

Per le soluzioni preparate in solvente a partire dalle soluzioni madre preparate in diclorometano, si procede direttamente alla derivatizzazione e alla successiva analisi in GC-MS, come previsto dal metodo.

Dall'analisi dei picchi cromatografici di interesse per le diverse soluzioni, sia in solvente che in matrice urinaria, è stata calcolata la percentuale di estrazione dell'analita dalla matrice urinaria che è risultata > 90% per tutte le concentrazioni valutate.

### **Prove di derivatizzazione con anidride eptafluorobutirrica (HFBA)**

Per la messa a punto del metodo analitico per il metabolita del 4,4'-MDI con la strumentazione prescelta (GC-MS), si è reso necessario procedere con la medesima procedura analitica applicata per la determinazione dei due isomeri della TDA, ovvero la derivatizzazione chimica mediante reazione con un opportuno reagente da condursi in condizioni sperimentali ottimizzate (concentrazione dei reagenti, temperatura di derivatizzazione). Infatti anche la 4,4-difenilmetano diammina è un composto organico con caratteristiche chimico fisiche tali per cui si possa procedere all'analisi diretta in gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa senza modificarne la struttura molecolare al fine di aumentarne la volatilità; analogamente a quanto fatto per la determinazione dei due isomeri della TDA e valutando i lavori riportati in letteratura, è stata utilizzata l'anidride eptafluorobutirrica, (HFBA).

Per valutare l'effetto della temperatura di derivatizzazione sono state preparate delle rette di calibrazione dello standard 4,4'-MDA in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> su due livelli di concentrazione, pari a 10 µg/L e 100 µg/L. La reazione di derivatizzazione è stata condotta in doppio, per ogni livello di

concentrazione dello standard, facendo reagire le soluzioni così preparate a 4 diversi valori di temperatura (40°, 55°, 65° e 75°C) e mantenendo fisso ogni altro parametro sperimentale (concentrazione di derivatizzante e tempo di derivatizzazione).

Osservando la risposta strumentale, si è verificato un andamento progressivamente decrescente all'aumentare della temperatura di lavoro, quindi un valore pari a 40°C si dimostra essere la temperatura ottimale per massimizzare la derivatizzazione della 4,4'-MDA.

Per verificare la quantità ottimale di agente derivatizzante sono state preparate delle rette di calibrazione in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> scegliendo due livelli di concentrazione dello standard 4,4'-MDA, considerando i livelli di esposizione riportati in letteratura per lavoratori esposti a 4,4-MDI (si veda ad esempio, Schütze *at al.*, 1995).

Sono state quindi preparate delle soluzioni per la 4,4'-MDA di concentrazione pari a 10 µg/L e a 100µg/L. La reazione di derivatizzazione è stata condotta in doppio, per ogni livello di concentrazione dello standard, aggiungendo 3 diverse quantità di HFBA pura (100, 150 e 200 µL). Le prove sono state effettuate alla temperatura di 40°C precedentemente individuata, per un tempo di reazione pari a 1 ora.

Osservando la risposta strumentale, si è verificato un andamento progressivamente crescente all'aumentare del volume di HFBA, quindi 200 µL si dimostra essere il volume ottimale di reagente da aggiungere, tale da assicurare una derivatizzazione quantitativa della diammina processata.

### **Validazione del metodo analitico**

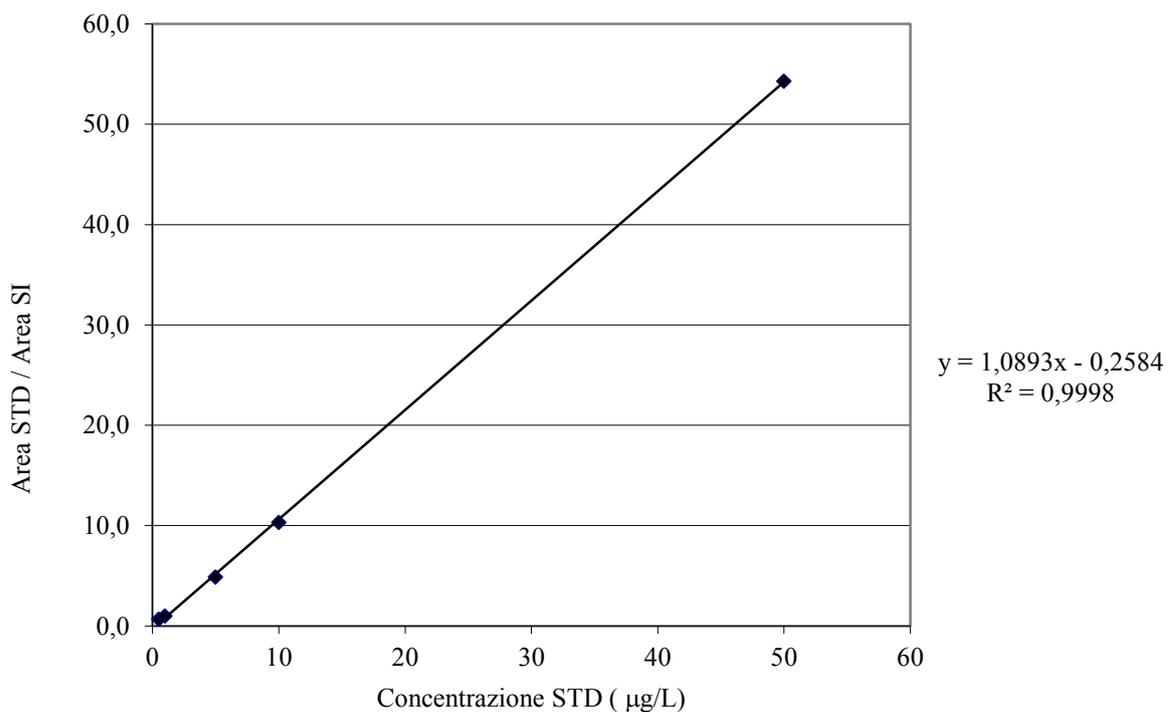
Per la validazione del metodo analitico sono state seguite le norme dell'*International Conference on Harmonization*, ICH (ICH, 1996). A tal fine sono state valutate la separazione cromatografica, la linearità, la precisione, i limiti di rilevabilità e di quantificazione.

### **Separazione cromatografica**

Gli analiti risultano bene separati, all'interno di un'unica corsa cromatografica e risultano esenti da interferenze analitiche.

### **Linearità**

Per la 4,4'-MDA e lo standard interno 3,4-TDA il metodo analitico si è dimostrato lineare nell'intervallo di concentrazione testato, ovvero fra valori di concentrazione inferiori al limite di rilevabilità (L.R.) fino a 50 µg/L in presenza dello S.I. alla concentrazione di 55 µg/L, con un coefficiente di determinazione  $R^2 > 0,99$  (figura 24).



**Figura 24** Retta di calibrazione di 4,4'-MDA in matrice urinaria.

### Limiti di rilevabilità e limiti di quantificazione

Il limite di rilevabilità (LR) del metodo analitico è stato determinato come di seguito indicato:

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

dove  $\sigma$  rappresenta la deviazione standard del segnale analitico e  $m$  rappresenta la pendenza della retta di calibrazione.

In tali condizioni il limite di rilevabilità ottenuto per la 4,4'-MDA è risultato pari a 0,1 µg/L (0,5 nmol/L).

Il limite di quantificazione (LQ) del metodo analitico è stato determinato come di seguito indicato:

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

dove  $\sigma$  rappresenta la deviazione standard del segnale analitico e  $m$  rappresenta la pendenza della retta di calibrazione. In tali condizioni il limite di quantificazione (LQ) per la 4,4'-MDA è risultato

pari a 0,3 µg/L (1,5 nmol/L). I limiti LR e LQ ottenuti per il metodo analitico risultano adeguati per l'analisi dei diisocianati considerati.

### **Precisione**

La precisione del metodo, espressa come coefficiente di variazione percentuale in termini di riproducibilità *intra-day* per le concentrazioni pari a 1 µg/L, 10 µg/L e 50 µg/L è risultata pari a 4,8%, 14,4% e 9,1% rispettivamente, mentre in termini di ripetibilità *inter-day* risulta pari a 6,5%, 7,5% e 6,9% per le concentrazioni dello standard pari a 0,5 µg/L, 1 µg/L e 10 µg/L rispettivamente.

### **Accuratezza**

L'accuratezza del metodo è risultata pari al 97% per il livello di concentrazione pari a 1 µg/L e pari al 98% per il livello di concentrazione pari a 50 µg/L.

Le prove realizzate con il metodo analitico sviluppato hanno restituito dei risultati caratterizzati da un limite di rilevabilità (LR) e di quantificazione (LQ) tali da poter essere confrontabili con i dati di letteratura; è stata verificata la linearità nell'intervallo di concentrazione di interesse per l'analisi di campioni reali; è stata ottenuta una buona riproducibilità *intra-day* e ripetibilità *inter-day* sia per le basse concentrazioni che per le alte concentrazioni. Quindi il metodo analitico messo a punto si è dimostrato essere lineare, sensibile e riproducibile ed, in conclusione, idoneo per il dosaggio del metabolita urinario del 4,4'-MDI.

### **Analisi della 4,4'-MDA nei campioni urinari**

È stato possibile applicare il metodo gascromatografico messo a punto per la determinazione del metabolita urinario del 4,4'-MDI, applicandolo all'analisi dei campioni di urina di 13 pazienti sottoposti a un test di provocazione bronchiale specifica.

Il test prevede di sottoporre il paziente per un'ora ad un'esposizione continuativa e controllata di 4,4'-MDI in cabina ventilata, con un livello di concentrazione ambientale medio compreso fra 10 e 20 ppb, verificato in tempo reale da un analizzatore dedicato (SPM Single Point Monitor, Zellweger Analysis Ltd, UK). A distanza di 7 ore dall'esposizione, è prevista la raccolta di un campione di urina del paziente.

In tabella XL sono riportati i risultati delle analisi condotte sui 13 campioni, corretti per il valore di creatinina urinaria del campione stesso, laddove compresa fra 0,3 g/l e 3,0 g/L: nel caso il valore di creatinina determinato sul campione non rientrasse in questo *range* la concentrazione del metabolita non è stata corretta (n.c.).

**Tabella XL** Valori di concentrazione della 4,4'-MDA nei campioni dei pazienti sottoposti al test provocazione bronchiale con 4,4'-MDI.

Campione	4,4'-MDA (µg/L)	creatinine (g/L)	4,4'-MDA (µg/g creatinina)
C1	1,6	4,47	n.c.
C2	1,3	2,86	0,5
C3	1,0	1,54	0,6
C4	4,5	2,56	1,8
C5	3,0	2,57	1,2
C6	0,9	0,74	1,2
C7	0,5	0,39	1,3
C8	2,5	3,05	n.c.
C9	3,6	0,05	n.c.
C10	2,2	3,18	n.c.
C11	1,6	2,49	0,7
C12	3,0	2,22	1,4
C13	1,1	0,14	n.c.

Il 100% dei campioni analizzati è risultato dosabile, riportando un valore medio di concentrazione di 4,4-MDA pari a 2,1 µg/L, mentre i risultati ottenuti si attestano in un *range* compreso fra 0,5 e 4,5 µg/L.

Non essendo noti analoghi studi di letteratura di esposizione controllata a tale diisocianato, non è possibile fare un confronto con i dati ottenuti per i pazienti sottoposti al test di provocazione bronchiale.

### 3. DOSAGGIO DELL'1,6-ESAMETILENE DIAMMINA (1,6-HDA)

Per la messa a punto di un metodo analitico per la determinazione del metabolita urinario dell'1,6-HDI si è partiti dal metodo in gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa sviluppato per la determinazione dei metaboliti delle due forme isomeriche del TDI ed apportando le modifiche necessarie.

Le prime prove per l'analisi dell'1,6-HDA sono state condotte su soluzioni in solvente (diclorometano) per l'individuazione delle condizioni analitiche ottimali, passando poi direttamente all'esecuzione delle prove su matrice urinaria acido-idrolizzata; la matrice urinaria utilizzata di volta in volta è stata ottenuta da un *pool* di urine di soggetti non esposti professionalmente a diisocianati o ad altri solventi chimici. Si è poi studiato l'effetto della variazione di alcuni parametri sull'efficacia della reazione di derivatizzazione, quindi sull'ottimizzazione del processo.

#### **Prove di solubilità**

Prima di procedere alla preparazione delle soluzioni madre, si è verificata la solubilità dello standard e dello standard interno in un set di solventi polari e apolari tal quali e anche in alcune miscele di due solventi.

In particolare, le prove di solubilità sono state condotte in:

- acetone, acetonitrile, acqua, cicloesano, etanolo, diclorometano, metanolo.

Quindi sono state provate le seguenti miscele:

- acido cloridrico 0,1 M in acqua, soluzione 50/50 di acetone e acqua, soluzione 50/50 di acetonitrile e acido cloridrico 0,1 M in acqua.

Dalle prove svolte lo standard e lo S.I. risultano entrambi solubili in cicloesano e nella miscela 50/50 di acetonitrile e acido cloridrico 0,1 M in acqua.

Si è deciso di utilizzare il cicloesano per le prove preliminari del metodo da realizzare in solvente organico, mentre la miscela 50/50 di acetonitrile e acido cloridrico 0,1 M è stata scelta per la preparazione delle soluzioni madre dello standard e dello S.I. da utilizzare nelle prove in matrice urinaria.

#### **Preparazione delle soluzioni madre in cicloesano**

Sono state preparate soluzioni madre da 1 g/l dello standard 1,6-HDA e per lo standard interno 1,7-HpDA. Le soluzioni madre sono state preparate di volta in volta.

### Identificazione qualitativa in GC-MS - Prove in solvente e ottimizzazione del metodo di massa

Per l'identificazione qualitativa del tempo di ritenzione dell'1,6-HDA e dello S.I. sono state iniettate in GC-MS soluzioni dello standard in concentrazione pari a 500 µg/L ed in seguito una soluzione contenente sia l'analita che lo standard interno in concentrazione pari a 500 µg/L e 250 µg/L rispettivamente.

Le due specie risultano ben risolte ed è quindi possibile ottenere il tempo di ritenzione per l'1,6-HDA e per lo S.I., riportati in tabella XLI.

**Tabella XLI** Tempo di ritenzione ( $t_R$ ) dell'1,6-HDA e dello S.I. (1,7-HpDA).

analita	$t_R$ / minuti
1,6-HDA	9,06
1,7-HpDA	9,64

Il tempo di analisi da inserire nel metodo cromatografico è stato quindi ridotto a 11 minuti.

Al fine di mettere a punto un metodo analitico di massa *ad hoc* per la quantificazione dell'1,6-HDA e dello standard interno, si sono considerati i frammenti molecolari più intensi e con valori di  $m/z$  tali da non essere confondibili con altre specie molecolari presenti in ambiente di reazione.

Grazie anche al confronto con lo spettro dello standard presente nella *Library* dello strumento, i frammenti di massa identificati per la determinazione quantitativa dello standard 1,6-HDA sono i seguenti:

- 339  $m/z$ ;
- 226  $m/z$ .

Per la determinazione dello S.I. invece i frammenti di massa in valori di  $m/z$  utili a tal fine sono:

- 353  $m/z$ ;
- 226  $m/z$ .

Il metodo di massa in modalità SIR (*Single Ion Recording*) è stato quindi modificato introducendo i valori di  $m/z$  dei specifici frammenti molecolari indicati, per poter ottimizzare la risposta strumentale alla determinazione quantitativa della specie 1,6-HDA in presenza dello S.I.

### **Prove di derivatizzazione con anidride eptafluorobutirrica (HFBA)**

Per la messa a punto del metodo analitico per il metabolita dell'1,6-HDI, la corrispondente diammina, con la strumentazione prescelta (GC-MS), si è reso necessario procedere con la medesima procedura analitica applicata per la determinazione dei due isomeri della TDA, ovvero la derivatizzazione chimica mediante reazione con un opportuno reagente da condursi in condizioni sperimentali ottimizzate (concentrazione dei reagenti, temperatura di derivatizzazione). Infatti anche l'1,6-esametilene diammina è un composto organico con caratteristiche chimico fisiche tali per cui si possa procedere all'analisi diretta in gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa senza modificarne la struttura molecolare al fine di aumentarne la volatilità; analogamente a quanto fatto per la determinazione dei due isomeri della TDA e valutando i lavori riportati in letteratura, è stata utilizzata l'anidride eptafluorobutirrica (HFBA).

Per valutare l'effetto della temperatura di derivatizzazione sono state preparate delle rette di calibrazione dello standard 1,6-HDA in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  su due livelli di concentrazione, pari a 10  $\mu\text{g/L}$  e 100  $\mu\text{g/L}$ . La reazione di derivatizzazione è stata condotta in doppio, per ogni livello di concentrazione dello standard, facendo reagire le soluzioni così preparate a 4 diversi valori di temperatura (40°, 55°, 65° e 75°C) e mantenendo fisso ogni altro parametro sperimentale (concentrazione di derivatizzante e tempo di derivatizzazione).

Osservando la risposta strumentale, si è verificato un massimo delle curve di analisi in corrispondenza del valore di temperatura pari a 55°C.

Per verificare la quantità ottimale di agente derivatizzante sono state preparate delle rette di calibrazione in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  scegliendo due livelli di concentrazione dello standard 1,6-HDA, considerando i livelli di esposizione riportati in letteratura per lavoratori esposti a 1,6-HDI (si veda ad esempio Gaines *et al.*, 2010).

Sono state quindi preparate delle soluzioni a concentrazione pari a 10  $\mu\text{g/L}$  e a 100 $\mu\text{g/L}$ . La reazione di derivatizzazione è stata condotta in doppio, per ogni livello di concentrazione dello standard, aggiungendo 3 diverse quantità di HFBA pura (50, 100 e 150  $\mu\text{L}$ ). Le prove sono state effettuate alla temperatura di 55°C precedentemente individuata, per un tempo di reazione pari a 1 ora.

Osservando la risposta strumentale, si è verificato un andamento progressivamente decrescente all'aumentare del volume di HFBA, quindi 50  $\mu\text{L}$  si dimostra essere il volume ottimale di reagente da aggiungere, tale da assicurare una derivatizzazione quantitativa della diammina processata.

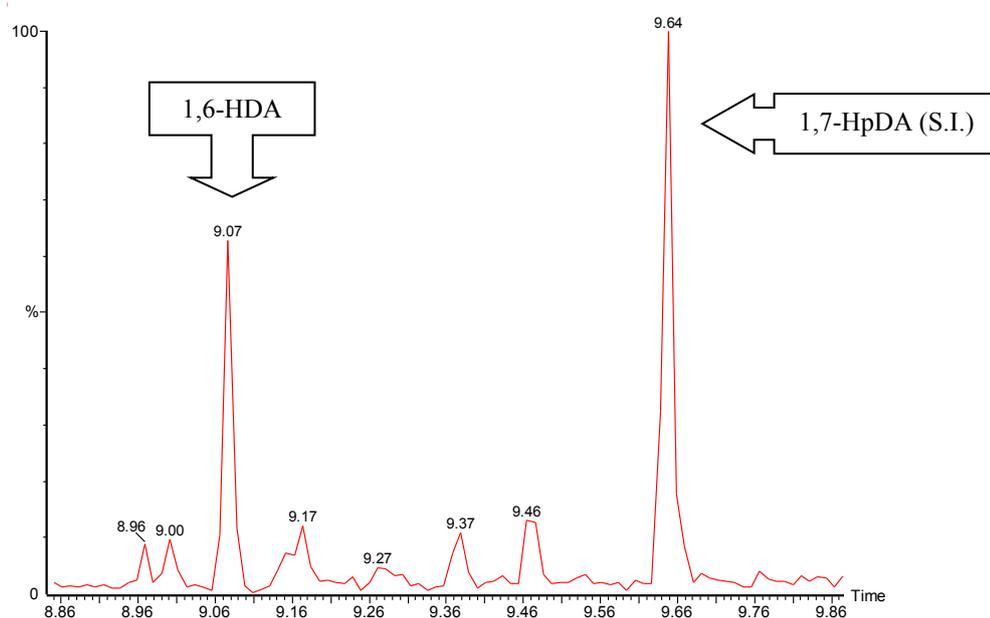
## Validazione del metodo analitico

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

## Separazione cromatografica

Gli analiti risultano bene separati, all'interno di un'unica corsa cromatografica e risultano esenti da interferenze analitiche.

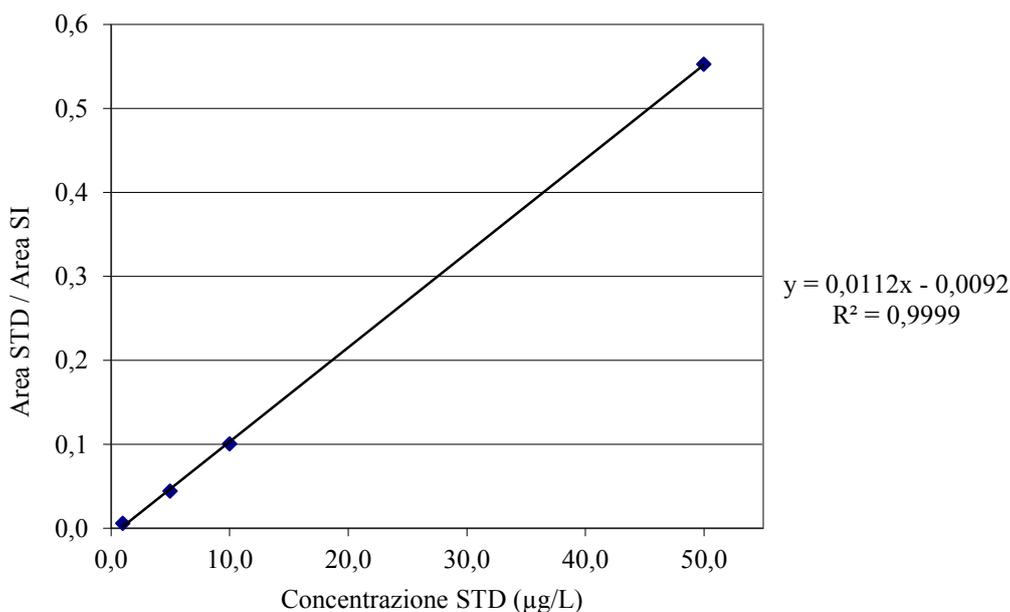
In figura 25 è riportato il cromatogramma ottenuto per le due specie analitiche.



**Figura 25** Cromatogramma dello standard 1,6-HDA (226 m/z e 339 m/z) alla concentrazione di 50 µg/L in presenza dello S.I. 1,7-HpDA alla concentrazione di 50 µg/L (226 m/z e 353 m/z).

## Linearità

Per l'1,6-HDA e lo standard interno 1,7-HpDA il metodo analitico si è dimostrato lineare nell'intervallo di concentrazione testato, ovvero fra valori di concentrazione inferiori al limite di rilevabilità (L.R.) fino a 50 µg/L in presenza dello S.I. alla concentrazione di 55 µg/L, con un coefficiente di determinazione  $R^2 > 0,99$  (figura 26).



**Figura 26** Retta di calibrazione dello standard 1,6-HDA in matrice urinaria.

### **Limiti di rilevabilità e limiti di quantificazione**

Il limite di rilevabilità (LR) del metodo analitico è stato determinato come di seguito indicato:

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

dove  $\sigma$  rappresenta la deviazione standard del segnale analitico e  $m$  rappresenta la pendenza della retta di calibrazione.

In tali condizioni il limite di rilevabilità ottenuto per l'1,6-HDA è risultato pari a 0,3 µg/L (1,8 nmol/L).

Il limite di quantificazione (LQ) del metodo analitico è stato determinato come di seguito indicato:

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

dove  $\sigma$  rappresenta la deviazione standard del segnale analitico e  $m$  rappresenta la pendenza della retta di calibrazione.

In tali condizioni il limite di quantificazione (LQ) per la 4,4'-MDA è risultato pari a LQ = 0,9 µg/L (5,4 nmol/L).

I limiti LR e LQ ottenuti per il metodo analitico risultano adeguati per l'analisi del diisocianato considerato.

### **Precisione**

La precisione del metodo, espressa come coefficiente di variazione percentuale, in termini di riproducibilità *intra-day* per le concentrazioni 1 µg/L, 5 µg/L e 10 µg/L è risultata pari a 13,6%, 14,1% e 12,1% rispettivamente, mentre in termini di ripetibilità *inter-day* risulta pari a 15,3%, 3,0% e 5,6% per le concentrazioni dello standard pari a 5 µg/L, 10 µg/L e 50 µg/L rispettivamente.

### **Accuratezza**

L'accuratezza del metodo è risultata pari al 98% per il livello di concentrazione pari a 10 µg/L e pari al 99% per il livello di concentrazione pari a 50 µg/L.

Le prove realizzate con il metodo analitico sviluppato hanno restituito dei risultati caratterizzati da un limite di rilevabilità (LR) e di quantificazione (LQ) tali da poter essere confrontabili con i dati di letteratura; è stata verificata la linearità nell'intervallo di concentrazione di interesse per l'analisi di campioni reali; è stata ottenuta una buona riproducibilità *intra-day* e ripetibilità *inter-day* sia per le basse concentrazioni che per le alte concentrazioni. Quindi il metodo analitico messo a punto si è dimostrato essere lineare, sensibile e riproducibile ed, in conclusione, idoneo per il dosaggio del metabolita urinario dell'1,6-HDI.

### **Analisi dell'1,6-HDA nei campioni di urina**

È stato possibile applicare il metodo gascromatografico messo a punto per la determinazione del metabolita urinario dell'1,6-HDI, applicandolo all'analisi dei campioni di urina di 6 pazienti sottoposti a un test di provocazione bronchiale reagente specifica.

Il test prevede di sottoporre il paziente per un'ora ad un'esposizione continuativa e controllata di 1,6-HDI in cabina ventilata, con un livello di concentrazione ambientale medio compreso fra 10 e 20 ppb, verificato in tempo reale da un analizzatore dedicato (SPM Single Point Monitor, Zellweger Analysis Ltd, UK). A distanza di 7 ore dall'esposizione è prevista la raccolta di un campione di urina del paziente.

In tabella XLII sono riportati i risultati delle analisi condotte sui 6 campioni, corretti per il valore di creatinina urinaria del campione stesso, laddove compresa fra 0,3 g/l e 3,0 g/L: nel caso il valore di creatinina determinato sul campione non rientrasse in questo *range* la concentrazione del metabolita non è stata corretta (n.c.) per il valore di creatinina. La scelta di correggere il dato analitico per il valore di creatinina urinaria è in linea anche con quanto osservato nella maggior parte dei lavori di letteratura relativi alla determinazione della concentrazione urinaria del metabolita dell'1,6-HDI (ACGIH, 2015).

**Tabella XLII** Valori di concentrazione dell'1,6-HDA nei campioni dei lavoratori sottoposti al test provocazione bronchiale con 1,6-HDI.

<b>Campione</b>	<b>1,6-HDA (µg/L)</b>	<b>creatinina (g/L)</b>	<b>1,6-HDA ( µg/g creatinina)</b>
<b>C1</b>	<0,9	1,39	<0,6
<b>C2</b>	<0,9	1,31	<0,7
<b>C3</b>	<0,9	0,98	<1,3
<b>C4</b>	2,0	2,37	0,9
<b>C5</b>	1,6	1,13	1,4
<b>C6</b>	1,8	1,48	1,2

Il 50% dei campioni analizzati è risultato dosabile, riportando un valore medio di concentrazione dell'1,6-HDA pari a 1,2 µg/L ed il *range* di valori osservati va da <L.R. (1 campione su 6) a 2,0 µg/L. La letteratura scientifica relativa ad analoghi test di esposizione su soggetti volontari è piuttosto scarsa: a titolo di esempio, un'esposizione della durata complessiva di 7,5 ore ad una concentrazione media di 1,6-HDI monomero pari a 27,5 µg/m<sup>3</sup> e con prelievi dei campioni urinari condotti ogni 2 ore e fino a 15 ore dopo il termine dell'esposizione, si è registrata una concentrazione urinaria media di HDA pari a 20,5 µg/g creatinina (Brorson et al., 1990a). Nel medesimo lavoro Brorson e collaboratori hanno stimato inoltre che la percentuale di HDA eliminata per via urinaria dopo l'esposizione ad HDI corrisponde a circa il 10% della dose inalata: tale dato è in linea con quanto riportato in altri studi di letteratura (ad esempio Dalene *et al.*, 1990)

## CONCLUSIONI

Nel corso del presente progetto di ricerca sono state sviluppate metodiche di monitoraggio ambientale e biologico per la valutazione dell'esposizione a diisocianati ed in particolare TDI nelle sue 2 forme 2,4- e 2,6-, MDI e HDI, largamente utilizzati in ambito lavorativo ma anche presenti in contesti domestici.

Il metodo analitico per la determinazione dei livelli aerodispersi dei suddetti isocianati consente la loro determinazione contemporanea e prevede l'analisi dei substrati di campionamento mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) con rivelatore fluorimetrico.

Tale metodica è risultata sensibile e precisa per l'applicazione all'analisi di campioni reali, al fine di valutare l'eventuale dispersione di inquinanti chimici in aria ambiente e quindi l'esposizione dei lavoratori a tali sostanze.

Il metodo è stato applicato all'analisi di campioni reali in due diverse aziende in cui era previsto l'utilizzo di tali sostanze: nel primo caso l'analisi dei campioni ha evidenziato un'esposizione professionale ai tre diisocianati sostanzialmente trascurabile (valori di diisocianati aerodispersi dell'ordine di 1/10000 rispetto ai relativi TLV-TWA adottati dall'ACGIH nell'anno di esecuzione delle prove). Nel caso del secondo campionamento, la valutazione è relativa al solo diisocianato alifatico (HDI) e l'analisi dei campioni reali ha permesso di registrare livelli di 1,6-HDI aerodisperso generalmente molto contenuti (livelli inferiori a 1/100 rispetto al relativo TLV-TWA adottato dall'ACGIH); in tale contesto si è registrato anche il valore di HDI aerodisperso di un'operazione specifica (resinatura) di breve durata, durante la quale il valore di 1,6-HDI determinato è risultato comunque inferiore ad un decimo del relativo TLV-TWA (pari a 0,034 mg/m<sup>3</sup>, in adozione nell'anno di realizzazione dei monitoraggi e tutt'ora in corso di adozione dall'ACGIH).

I metodi analitici messi a punto per la determinazione della concentrazione urinaria dei metaboliti del 2,4-TDI, 2,6-TDI, 4,4'-MDI e 1,6-HDI (ovvero, rispettivamente, 2,4-TDA, 2,6-TDA, 1,6-HDA e 4,4'-MDA) sono stati validati in modo da definirne le più importanti caratteristiche di prestazione analitica, dalle quali emerge che tali metodiche sono adeguatamente precise e sensibili da poter essere applicate nella determinazione della dose interna di soggetti esposti a tali diisocianati in ambiente di lavoro.

Il metodo analitico per determinazione della concentrazione delle diammine 2,4-TDI e del 2,6-TDI in matrice urinaria è stato messo a punto a partire dalla consultazione dei lavori disponibili in letteratura, ottimizzando la metodica analitica in funzione della strumentazione prescelta per

condurre le prove di laboratorio, ovvero la gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa a ionizzazione elettronica positiva (GC/MS EI+). I metodi analitici per il dosaggio dei metaboliti dell'1,6-HDI e del 4,4'-MDI in matrice urinaria sono stati elaborati a partire dal metodo messo a punto per i metaboliti del TDA nel corso del secondo anno di dottorato; le procedure ottimizzate e validate hanno permesso di dosare tali specie in campioni reali esposti alle singole sostanze, come i soggetti sottoposti a test di provocazione bronchiale reagente specifico, utilizzato per la diagnosi eziologica di asma da isocianati.

Non essendo campioni di lavoratori esposti a tali sostanze per otto ore, come avviene in ambiente lavorativo, non è possibile confrontare direttamente i risultati ottenuti per i campioni analizzati nel presente progetto con i valori limite per il controllo dell'esposizione professionale, proposti da importanti agenzie di settore, quale ad esempio l'ACGIH.

Va inoltre sottolineato come il dosaggio dei metaboliti urinari dei diisocianati dispersi in ambiente di lavoro e di vita si inserisca all'interno di un campo di ricerca altamente noto e battuto, in termini di: determinazione del livello di metaboliti urinari e/o di coniugati proteici specifici in matrici biologiche (urina o sangue) sia mediante cromatografia liquida che mediante gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (Cocker, 2011; Sabbioni *et al.*, 2012); determinazione della risposta immunologica in lavoratori esposti, mediante misura delle Ig-G e delle Ig-E isocianato-specifiche quali *biomarkers* di esposizione e di effetto, rispettivamente (Wisnewski *et al.*, 2012). Tuttavia rimane complesso ottenere un approccio validato nella definizione di *biomarkers* per la determinazione dell'esposizione professionale ai diisocianati, in parte in relazione alla componente di variabilità interindividuale e in parte anche in relazione alla difficoltà nella misura dei reali livelli di esposizione ambientali.

Infine la carenza di informazioni sulle interazioni e sulle biotrasformazioni di tali composti nell'organismo limita, al momento, la definizione di più specifici *biomarkers* di esposizione (Lockery *et al.*, 2015).

## BIBLIOGRAFIA

- ACGIH, 2001. American Conference of Governmental Industrial Hygienists: “Documentation of the Threshold Limit Values (TLVs) and Biological Exposure Indices (BEIs) - Methylene Bisphenyl Isocyanate”, ACGIH®, Cincinnati, Ohio, USA.
- ACGIH, 2015. American Conference of Governmental Industrial Hygienists: “Documentation of the Threshold Limit Values (TLVs) and Biological Exposure Indices (BEIs) - Hexamethylene Diisocyanate”, ACGIH®, Cincinnati, Ohio, USA.
- ACGIH, 2016. American Conference of Governmental Industrial Hygienists: “Documentation of the Threshold Limit Values (TLVs) and Biological Exposure Indices (BEIs) -Toluene-2,4 or 2,6-Diisocyanate (or as a mixture), ACGIH®, Cincinnati, Ohio, USA.
- ACGIH, 2015. American Conference of Governmental Industrial Hygienists: “ Guide To Occupational Exposure Values ”, ACGIH®, Cincinnati, Ohio, USA.
- ACGIH, 2014. American Conference of Governmental Industrial Hygienists: “Valori limite di soglia Indici biologici di esposizione”, ACGIH®, Cincinnati, Ohio, USA.
- ACGIH, 2016. American Conference of Governmental Industrial Hygienists: “Valori limite di soglia Indici biologici di esposizione”, ACGIH®, Cincinnati, Ohio, USA.
- ACGIH, 2018. American Conference of Governmental Industrial Hygienists: “Valori limite di soglia Indici biologici di esposizione”, ACGIH®, Cincinnati, Ohio, USA.
- Allport D.C., Gilbert D.S., Outterside S.M. (Editors) “MDI and TDI: Safety, Health and the Environment: A Source Book and Practical Guide”; John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, England; March 2003. ISBN: 978-0-471-95812-3.
- Ameille J., Labranois A., Deschata A. *et al.*, *Rev Mal Respir.*, 2006, 23, 726-740.
- American Chemistry Council, Diisocyanate Panel, Scientific Information Statement “Urine Biomonitoring for TDI Exposure”, October 2008.
- Austin S., *Occup Med*, 2007, 57, 444-448.
- Bello D., Herrick C.A., Smith T.J., Woskie S.R., Streicher R.P., Cullen M.R., Liu Y., Redlich C.A., *Env Health Perspect*, 2007, 115(3), 328-335.
- Benoit F.M., *J Biomed Mat Res*, 1993, 27(10), 1341-1348.
- Bernstein I.L., Bernstein D.I., Chan-Yeung M et al. “Definition and classification of asthma in the workplace”. New York, Marcel Dekker ed.; 1993, pp. 1-4.
- Bernstein D.I., Ott M.G., Woolhiser M., *et al.*, *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2006, 97, 357-364.

- Brorson T., Skarping G., Nielsen J., *J Occup Environ Health*, 1990, 62, 385-389.
- Brorson T., Skarping G., Sangö C., *Int Arch Occup Environ Health*, 1991, 63, 253-259.
- Budnik L.T., Noeak D., Merget R., Lemiere C., Baur X., *J Occup Med Toxic*, 2011, 6, 9.
- Chan-Yeung M., Malo J.L., *New England J Med*, 1995, 333, 107-111.
- Collins M.A., *Appl Occup Environ Hyg*, 2002, 17(12), 846-55.
- Cocker J., *Ann Occup Hyg*, 2011, 55, 127-131.
- Creely K.S., Hughson G.W., Cocker J., Jones K., *Ann Occup Hyg*, 2006, 50(6), 609-621.
- Dalene M., Skarping G., Brorson T., *J Chromatogr*, 1990, 516, 405-413.
- Dalene M., Skarping G., Tinnerberg H., *J Chromatogr B Biomed Appl*, 1994, 656, 319.
- Dalene M., Skarping G., Lind P., *Am Ind Hyg Assoc J*, 1997, 58, 587-591.
- De Palma G., Cortesi I., Ghitti R., Festa D., Bergonzi R., Apostoli P., *Med Lav*, 2012, 103, 361-371.
- DFG, 2015. Deutsche Forschungsgemeinschaft: “4,4’-Methylene diphenyl diisocyanate (MDI)” in: “The MAK.-Collection Part I, MAK Value Documentation 2015” DFG, 2015 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Direttiva 89/686/CEE del Consiglio, del 21 dicembre 1989, concernente il ravvicinamento delle legislazioni degli Stati Membri relative ai dispositivi di protezione individuale.
- Fent K.W., Jayaraj K., *et al.*, *Ann Occup Hyg*, 2009a, 53, 677-689.
- Fent K.W., Gaines L.G.T., *et al.*, *Ann Occup Hyg*, 2009b, 53, 691-702.
- Flack S.L., 2010: “Biological Monitoring of Occupational Exposure to Monomeric 1,6-HDI”, University of North Carolina, Chapel Hill (USA).
- Flack S.L., Ball L.M. *et al.*, *J Chromatogr B*, 2010, 878(27), 2635-2642.
- Gaines L.G.T., Fent K.W., Flack S.L., Thomasen J.M., Ball L.M., Richardson D.B., Ding K., Whittaker S.G., Nylander-French L.A., *Ann Occup Hyg*, 2010, 54(6), 678-691.
- Gaines L.G.T., Fent K.W., Flack S.L., *et al.*, *J Environ Monit*, 2011, 13, 119-127.
- Geens T., Dugardin S., Schockaert A., De Cooman G., Van Sprundel M., *Occup Environ Med*, 2012, 69, 93-98.
- Gogolewski S., *Colloid Polym Sci*, 1989, 267, 757-785.
- HSE, 2005. Health and Safety Executive: “Biological Monitoring for Isocyanate”, WATCH committee paper, Annex 1 - 13, WATCH/2005/4.
- Huggins V., Anees, W., Robertson, A.S., 2001, “SHIELD 2001: A surveillance scheme for occupational asthma in the Midlands”. Disponibile su [www.occupationalasthma.com/shield.aspx](http://www.occupationalasthma.com/shield.aspx).
- Hugo J.M., Spence M.W., Lickly T.D., *Appl Occup Environ Hyg*, 2000, 15, 512-519.

- IARC, 1986. International Agency for Research on Cancer: IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Vol. 39, "Some Chemicals Used in Plastics and Elastomers", pp. 287 – 323. IARC, Lyon, France.
- IARC, 1987. International Agency for Research on Cancer: IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans, Suppl. 7, "Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs" Volumes 1 to 42, p. 72. IARC, Lyon, France.
- IARC, 1999. International Agency for Research on Cancer: IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, "Re-evaluation of Some Organic Chemicals, Hydrazine and Hydrogen Peroxide", Vol. 71:1589. IARC, Lyon, France.
- ICH, 1996: ICH-The International Conference on Harmonization, Validation of Analytical Procedure: Methodology (Q 2B), Food and Drug Administration, USA (November, 1996).
- Jaffe M., *Zeitschrift fur Physiologische Chemie*, 1986, 43, 620-625.
- Kääriä K., Hirvonen A., Norppa H., Piirilä P., Vainio H., Rosenberg C., *Analyst*, 2001, 126(7), 1025-1031.
- Krone C.A., *Arch Env Health*, 2004, 59, 306-316.
- Lind P., Skarping G., Dalene M., *Anal Chim Acta*, 1996, 333, 277-283.
- Liu Y., Berode M., Stowe M.H., Holm C.T., Walsh F.X., Slade M.D., Boeniger M.F., Redlich C.A., *J Occup Environ Health*, 2004, 10, 262.
- Maitre A., Berode M., Perdrix A., Stoklov M., Mallion J.M., Savolainen H., *Int Arch Occup Environ Health*, 1996, 69, 65.
- Mapp C.E., *Occup and Environ Med*, 2001; 58, 354.
- Mapp C.E., Boschetto P., Maestrelli P., Fabbri L.M., *Am J Respir Crit Care Med*, 2005, 172, 280-305.
- Marand A., Karlsson D., Dalene M., Skarping G., *Analyst*, 2004, 129, 522-528.
- NIOSH, 1994. NIOSH Manual of Analytical Methods (NMAM), Fourth Edition, 8/15/94: ISOCYANATES: METHOD 5521, Issue 2, dated 15 August 1994. Disponibile su <https://www.cdc.gov/niosh/docs/2003-154/pdfs/5521>.
- NIOSH, 1996. "NIOSH ALERT: Request for Assistance in Preventing Asthma and Death from Diisocyanate Exposure [DHHS (NIOSH) Publication Number 96111]". Disponibile su <http://www.cdc.gov/niosh/docs/96-111/>.
- OSHA 42. <https://www.osha.gov/dts/sltc/methods/organic/org042/org042.html>.
- OSHA 47. <https://www.osha.gov/dts/sltc/methods/organic/org047/org047.html>.
- Pauluhn J., *Arch Toxicol*, 2002 a, 76, 13-22.

- Pauluhn J., Brown W.E., Hext P., Leibold E., Leng G., 2006, *Toxicology*, 222, 202-212.
- Pearson R.L., Logan P.W., Kore A.M., Strom C.M., Brosseau L.M., Kingston R.L., *Ann Occup Hyg*, 2013, 57(6), 758 - 765.
- Pronk A., Yu F., Vlaanderen J., Tielemans E., Preller L., Bobeldijk I., Deddens J.A., Latza U., Baur X., Heederik D., *Occup Environ Med*, 2006, 63, 624.
- Regolamento (UE) 2016/425 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 9 marzo 2016, sui dispositivi di protezione individuale e che abroga la direttiva 89/686/CEE del Consiglio (Testo rilevante ai fini del SEE).
- Robbins Z.G., 2011: “Determination of aliphatic amines in urine as biomarkers of exposure to 1,6-hexamethylene diisocyanate and isocyanurate”, University of North Carolina, Chapel Hill (USA).
- Rosenberg C., Tuomi T., *Am Ind Hyg Assoc J*, 1984, 45, 117.
- Rosenberg C., Nikkila K., Henriks-Eckerman M.L., Peltonen K., Engstrom J., *Environ Monit*, 2002, 4, 711.
- Sabbioni G., Gu Q., Vanimireddy L.R., *Biomarkers*, 2012, 17, 150-159.
- Sakai T., Morita Y., Kim Y, Tao Y.X., *Toxico. Let.*, 2002, 134, 259-264.
- Sakai T., Morita Y., Roh J., Kim H., Kim Y, *Int Arch Occup Environ Health*, 2005, 78, 459-466.
- Sandström J.F., Skarping G., Dalene M., *J Chromatogr*, 1989, 479, 135-143.
- Schütze D., Sepai O., Lewalter J., Miksche L., Henschler D., Sabbioni G., *Carcinogenesis*, 1995, 16(3), 573-582.
- Sennbro C.J., Lindh C.H., Tinnerberg H., Welinder H., Littorin M., Jönsson B.A.G., *Scand J Work Environ Health*, 2004, 30(5), 371-378.
- Skarping G., Dalene M.D., Tinnerberg H., *Analyst*, 1994, 119, 2051.
- Świerczyńska-Machura D., Brzeźnicki S., Nowakowska-Świrta E., Walusiak-Skorupa J., Wittczak T., Dudek W., Bonczarowska M., Wesołowski W., Czerczak S., Pałczyński C., *Int J Occ Med Environ Health*, 2015, 28, 6.
- Testi R., Rizzini P., Dal Negro R.W. *et al.*: “La salute del respiro; fattori di rischio, epidemiologia, costi e impatto sociale delle malattie respiratorie nella realtà sanitaria italiana”, Fondaz. Smith Kline, EDS Antonio Angeli, 2009.
- Tinnerberg H., Skarping G., Dalene M.Hagmar L., *Int Arch Occup Environ Health*, 1995, 67, 367.
- Tinnerberg H., Dalene M., Skarping G., *Am Ind Hyg Assoc J*, 1997, 58(3), 229-235.

- Tinnerberg H., Broberg K., Lindh C.H., Jonsson B.A., *Int Arch Occup Environ Health*, 2014, 87, 365.
- U.S. ATSDR, 1998. US Agency for Toxic Substances and Disease Registry, "Toxicological Profile for Hexamethylene Diisocyanate", US Department of Health and Human Services, ATSDR, Atlanta, GA, 1998.
- U.S. NTP, 1986. US National Toxicology Program, "Toxicology and Carcinogenesis of Commercial Grade 2,4-(80%) and 2,6-(20%) Toluene Diisocyanate in F-344/N Rats and B6C3F1 Mice". NTP Tech. Report Series N. 86-2507; NTIS Pub N. PB-87-115-176, National Technical Information Service, Springfield, VA, 1986.
- WHO, 1987. "International Programme on Chemical Safety: Toluene diisocyanates. Environmental Health Criteria 75". World Health Organization, Geneva, 1987.
- Wisnewski A.V., Stowe M.H., Nerlinger A., Opare-Addo P., Decamp D., Kleinsmith C.R., Redlich C.A., *Ann Occup Hyg*, 2012, 56(8), 901-190.



## RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare tutti coloro che, in vario modo, hanno contribuito alla realizzazione di questo percorso, che mi hanno sorretta, sospinta, aiutata e motivata in qualsiasi modo si possa intendere ed estendere il concetto di aiuto.

Sono tante le persone che ho in mente e nel cuore, inizio con chi mi ha supportato sin dall'inizio a muovere i primi passi sul piano lavorativo, quindi un ringraziamento al prof. Bartolucci, senza il quale non avrebbe avuto inizio questo percorso, e non solo questo: grazie per avermi fatto conoscere l'essenza della Medicina del Lavoro; un ringraziamento al prof. Trevisan che ha "colto" il testimone e mi ha supportato e sopportato nel periodo più difficile forse... non avrei concluso niente senza di lei!

Un ringraziamento affettuoso e "conviviale" al mio gruppo di lavoro, con il quale ho condiviso tanto, ma veramente tanto: grazie Mariella per avermi aiutata a dare forma e sostanza a questo progetto e per esserci sempre fino all'ultimo.. perché è così che a volte mi hai dato slancio per ripartire. Grazie a Fabiola per la sua energia "contagiosa" e il suo esempio indiscutibile di mamma e di chimico. Grazie ad Andrea, *last but not least* nel gruppo: grazie per il tuo esempio di lealtà incondizionata e per il tuo "burbero" affetto. Un ringraziamento doveroso va anche a Paola e a Maria Cristina, per la loro gentilezza e disponibilità.

Molte altre persone hanno contribuito, consapevolmente o meno, con un semplice gesto o con grande slancio, alla chiusura di questo *iter*... non ci sarebbe il tempo di ringraziarle tutte, ma non mancherò di farlo personalmente.

Ora che ho decantato le arcate, le volte e i contrafforti di questo edificio, non posso non rivolgermi alle fondamenta: la mia famiglia, passata-presente-futura, che assorbe nel bene e nel male ogni sussulto e vibrazione. Grazie ai miei genitori, ai miei fratelli e a tutti coloro che mi sono vicini. Il posto d'onore di questi ringraziamenti va a Matteo e alla piccola Maia, che hanno vissuto assieme a me sulla propria pelle questo percorso, da cui emergo con un sorriso morbido, come le forme paffute di un piccolo bebè.