

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELL'INSUBRIA

FACOLTA' DI SCIENZE MM.FF.NN.

Corso di Dottorato di Ricerca in Scienze Ambientali (XXIII Ciclo)

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

Il capello come matrice per il monitoraggio
della esposizione ad antiparassitari

Dottoranda:

Dott.ssa Rosa Mercadante

N. Matricola 708057

Tutor: Prof. Domenico Cavallo

Co-tutor: Prof.ssa Silvia Fustinoni

Anno accademico 2011-2012

INDICE

Sintesi

1. Introduzione

1.1. Antiparassitari.	pg. 11
1.2. La terbutilazina	pg. 11
1.2.1.Utilizzo della terbutilazina	pg. 16
1.3. Esposizione ad antiparassitari	pg. 18
1.4. Monitoraggio dell'esposizione	pg. 19
1.4.1.Monitoraggio ambientale	pg. 19
1.4.2.Monitoraggio biologico	pg. 20
1.4.3.Matrici utilizzate nel monitoraggio biologico e antiparassitari	pg. 20
1.5. La matrice capello e suo utilizzo	pg. 21
1.6. Struttura del capello	pg. 23
1.7. Meccanismi di incorporazione delle sostanze nel capello	pg. 26
1.8. Scopo del lavoro	pg. 27

2. Sviluppo del metodo analitico per la determinazione di TBA e DET nella matrice urina e nella matrice capello

2.1. Introduzione	pg. 30
2.2. Reagenti e preparazione delle soluzioni di lavoro	pg. 30
2.3. Strumentazione	pg. 31
2.4. Analisi in LC-MS/MS	pg. 32
2.5. Preparazione dei campioni urinari	pg. 32
2.6. Preparazione del campione di capelli o pelo	pg. 33
2.7. Sviluppo del metodo	pg. 33
2.7.1. Analisi in MS/MS	pg. 33
2.7.2.LC: scelta della fase mobile	pg. 33
2.7.3.Stabilità di TBA e DET	pg. 34
2.7.4.Ottimizzazione del metodo	pg. 34
2.7.4.1. Urine: procedura di estrazione e recuperi	pg. 34
2.7.4.2. Capelli: procedure di lavaggio ed estrazione	pg. 34
2.7.5. Validazione del metodo	pg. 35
2.7.5.1. Curve di calibrazione, limiti di detezione, precisione, accuratezza e controllo di qualità	pg. 35
2.7.5.2. Effetto matrice	pg. 36
2.7.6. Risultati e discussione	pg. 37
2.7.6.1. Analisi in MS/MS	pg. 37
2.7.6.2. LC: scelta della fase mobile	pg. 39
2.7.6.3. Stabilità di TBA e DET	pg. 40
2.7.6.4. Ottimizzazione del metodo di estrazione e recuperi	pg. 42

2.7.6.5. Curve di calibrazione, limiti di detezione, precisione, accuratezza e controllo di qualità	pg. 43
2.7.6.6. Effetto matrice	pg. 45
2.8. Valutazioni conclusive sul metodo analitico sviluppato	pg. 46
3. Valutazione dell'esposizione a TBA	
3.1. Valutazione della effettiva incorporazione della TBA nei capelli	pg. 48
3.1.1. Studio effettuato sui ratti	pg. 48
3.1.2. Risultati	pg. 49
3.1.3. Discussione	pg. 49
3.2. Strategia di indagine sul campo e casistica di soggetti indagati	pg. 53
3.3. Modalità di raccolta dei campioni (urine e capelli) e compilazione dei questionari	pg. 54
3.4. Analisi statistica	pg. 55
3.5. Campagna di raccolta campioni 2009 – campagna pilota	pg. 56
3.5.1. Risultati e discussione – campagna 2009	pg. 57
3.6. Campagna d'indagine 2010	pg. 58
3.6.1. Cinetica di escrezione	pg. 58
3.6.1.1. Risultati e discussione – cinetica di escrezione	pg. 59
3.6.2. Raccolta dei campioni urinari	pg. 60
3.6.3. Raccolta dei campioni di capelli	pg. 62
3.6.4. Caratteristiche della popolazione indagata	pg. 64
3.6.5. Risultati – campagna indagine 2010	pg. 67
3.6.6. Discussione – campagna indagine 2010	pg. 73
4. Conclusioni	pg. 77
Bibliografia	pg. 79
Allegati	pg. 85
Strumenti di lavoro:	
Informative	
Consensi informati	
Moduli di campionamento	
Questionari	
Appendice 1: Pubblicazione prodotte e partecipazioni ai congressi	pg. 99

Sintesi

Introduzione

La terbutilazina (TBA) è un erbicida largamente utilizzato nella coltivazione del mais, che è la principale coltura del nord Italia (238 mila ettari coltivati solo in Lombardia) (ISTAT, 2010). Questo erbicida è dotato di grande persistenza, sia nel suolo, dove ha un tempo di dimezzamento $t_{1/2}$ di 55.5 giorni, che nelle acque, $t_{1/2}$ maggiore di un anno (WHO, 1998). Gli agricoltori presentano particolari condizioni d'esposizione: applicazioni intermittenti, differenti vie espositive (dermica, inalatoria), uso di dispositivi di sicurezza sporadico e/o non sempre appropriato, dipendenza dell'esposizione dai fattori atmosferici, dalla tipologia della coltura e dalle tecnologie applicative. Anche la popolazione residente nelle campagne è potenzialmente esposta, data la vicinanza alle colture. La valutazione dell'esposizione a pesticidi utilizzando le tradizionali tecniche di monitoraggio della concentrazione aerodispersa è poco significativa, data l'importanza dell'esposizione dermica in agricoltura. Anche il monitoraggio biologico può fornire dati poco rappresentativi, in quanto la determinazione degli indicatori biologici (spesso metaboliti dei pesticidi) viene generalmente effettuata su campioni estemporanei raccolti al termine di una singola applicazione e non tiene perciò conto dell'intera stagione di utilizzo (Maroni, 2000).

Il capello è una matrice biologica correntemente impiegata per la determinazione delle droghe d'abuso. Il capello cresce alla velocità di circa 1 cm/mese e tende ad incorporare sostanze lipofile non ionizzate, con particolare affinità per quelle a carattere basico (ad esempio la cocaina) (Nakahara, 1995). Anche se il meccanismo con cui questa incorporazione avviene non è completamente noto, un ruolo di rilievo è giocato dallo scambio tra il sangue e le cellule del capello immature presenti nel follicolo, prima che si completi il processo che porta alla loro cheratinizzazione (Pragst, 1998). Dato il carattere basico della TBA è stato ipotizzato che questa sostanza potesse accumularsi nel capello, e che questo potesse perciò rappresentare una matrice ideale per il monitoraggio dell'esposizione cumulativa.

Scopo

Scopo di questo lavoro è stato quello di valutare la possibilità di utilizzare i capelli per la determinazione della esposizione a medio termine ad antiparassitari.

Metodo analitico

Sviluppo di un In questo lavoro è stato sviluppato un metodo originale per la determinazione di TBA e del suo metabolita desetil-terbutilazina (DET) sia nella matrice urina e nei capelli in presenza dei rispettivi standard interni deuterati terbutilazina-d5 (TBA-d5) e desetil-terbutilazina-d9 (DET-d9). Il metodo per la matrice urina prevede una estrazione in fase solida (SPE) effettuata con cartucce Oasis HLB (Waters), estraendo con metanolo; il metodo per la matrice capello prevede, dopo il lavaggio del campione con acqua per eliminare eventuali contaminazioni esterne, una estrazione diretta con metanolo in bagno a ultrasuoni a 59 KHz per 5 ore a 50 °C. Negli estratti di entrambe le matrici, la separazione degli analiti di interesse è stata effettuata in cromatografia liquida tramite una colonna Betasil C18 (150 mm di lunghezza, 2,1 mm di diametro interno e 5 dimensione delle particelle micron; Thermo Scientific) mantenuta a temperatura ambiente, utilizzando come eluente un miscela isocratica di acido formico in soluzione acquosa (0,5%) e MeOH (30:70) a 0,3 ml/min. La cromatografia liquida è stata accoppiata alla spettrometria di massa con triplo quadrupolo (LC-MS/MS) dotato di sorgente di ionizzazione riscaldata (H-ESI). TBA, DET e i rispettivi internal standard, sono stati rilevati in modalità di ionizzazione positiva e la quantificazione è basata sul *selected reaction monitoring* (SRM) seguendo le transizioni m/z 230 \rightarrow 174 per TBA, m/z 235 \rightarrow 179 per TBA-d5, m/z 202 \rightarrow 146 per DET e m/z 211 \rightarrow 147 per DET-d9. I tempi di ritenzione TBA e DET sono rispettivamente 4.04 e 2.33 min. Le efficienze di estrazione assoluta e relativa calcolate rispettivamente per la matrice urina e la matrice capello sono risultate accettabili. Il metodo ha una precisione, valutata come coefficiente di variazione percentuale, inferiore al 10% in entrambe le matrici, una accuratezza compresa tra 91 e 107% e un limite di detezione (LOD) di 0.25 μ g/L per TBA e DET nelle urine, e 0.01 ng/mg capello

per le stesse nei capelli.

Studio sul ratto

E' stata eseguito un protocollo di somministrazione orale di TBA in un gruppo di ratti per verificare l'effettiva incorporazione di TBA e del suo metabolita DET nel capello dopo una esposizione in condizioni controllate. L'esperimento è stato effettuato su 5 esemplari di ratti Sprague Dowely a cui sono stati somministrati 5mg/kg di peso corporeo di TBA per 3 giorni, per un totale di 2.25 mg di TBA per ratto. Da questi individui sono stati prelevati: un campione di peli pre-somministrazione, ottenuto rasando l'animale in un'area della zona dorsale, e due campioni post-somministrazione, uno nella stessa zona precedentemente rasata, l'altro in una zona non precedentemente rasata attigua a quella precedentemente rasata. La DET non è stata trovata in nessun campione, mentre la TBA è stata trovata in tutti i campioni post-esposizione ed è stato calcolato un tasso di incorporazione nei capelli di circa 0.12% della dose di TBA somministrata. Possiamo concludere che, dopo una esposizione a TBA, la TBA tal quale, e non la DET, viene incorporata nei capelli in concentrazioni quantificabili.

Studio sull'uomo

Casistica di soggetti indagati e raccolta dei campioni

I soggetti indagati in questo studio sono divisi in tre classi: 12 agricoltori di un paese della provincia di Cremona esposti a TBA durante il diserbo del mais, 14 soggetti residenti rurali, provenienti dallo stesso paese degli agricoltori, le cui abitazioni sono circondate da coltivazioni di mais, e 17 soggetti che vivono e lavorano nell'area urbana di Milano, che dista mediamente 40 km dai primi campi di mais. A ciascun soggetto è stato chiesto un campione estemporaneo di urine nel periodo precedente alle applicazioni di TBA (T_u0), e solo per gli agricoltori, due campioni post-esposizione. Il primo è stato raccolto la sera del giorno in cui sono stati effettuati i trattamenti prima di andare a dormire (T_u1), il secondo il mattino successivo al giorno delle applicazioni della TBA sul campo (T_u2). Inoltre a tutti i soggetti sono stati richiesti due campioni di capelli, uno prima dell'inizio della stagione dei trattamenti

(fine febbraio – T_c0), l'altro al termine della stagione applicativa (inizio luglio - T_c1). A ciascun soggetto è stata tagliata una ciocca di capelli adiacente alla radice, nella zona occipitale della testa; i primi 3 cm sono stati analizzati per la determinazione di TBA e DET. Ad ogni soggetto è stato somministrato un questionario per raccogliere informazioni personali e, per gli agricoltori, dati sull'impiego della TBA. La determinazione di TBA e DET è stata effettuata processando e analizzando i campione con il metodo analiti precedentemente illustrato.

Monitoraggio biologico dell'esposizione nell'urina

In tutti campioni di urine pre-esposizione non è stata trovata né TBA né DET in concentrazioni maggiori del LOQ. Negli agricoltori la TBA è presente solo in pochi campioni post-esposizione, al contrario la DET è presente nella maggior parte dei campioni in T_u1 e in tutti i campioni in T_u2 con livelli crescenti ($p < 0.001$ per T_u0 rispetto a T_u1 e T_u2; $p > 0.05$ per T_u1 e T_u2). Se paragoniamo le tre classi di soggetti i livelli di DET nelle urine mostrano una esposizione a TBA solo negli agricoltori. I risultati ottenuti suggeriscono che la DET, e non la TBA, è sempre presente nelle urine dei soggetti dopo una applicazione di TBA e quindi può essere utilizzata come biomarker di esposizione a breve termine. Nella raccolta dei campioni urinari è importante identificare il miglior tempo di raccolta che per la DET è risultato essere dopo circa 16 ore dalla fine dell'esposizione, cioè la prima minzione del mattino successivo alla applicazione. Infine ne la DET ne la TBA possono essere utilizzate per la valutazione della esposizione a TBA sia nei residenti rurali e nei residenti urbani.

Monitoraggio biologico dell'esposizione nei capelli

Nei campioni di capelli, la DET non è stata quantificata in nessun campione di ciascuna delle classi di soggetti indagati sia nei campioni pre- che nei campioni post-esposizione. Questi dati concordano con quelli ottenuti nei ratti, confermando che come per altre sostanze (es. la cocaina), i metaboliti, che sono specie più polari dei rispettivi composti da cui si generano,

vengono escrete nelle urine mentre le quantità eventualmente accumulate nel capello, risultano di 2-3 ordini di grandezza inferiori a quelle delle sostanze da cui si originano.

Nei campioni post-esposizione, la TBA è stata quantificata in tutti i campioni degli agricoltori e dei residenti rurali e in nessun campione dei residenti urbani, con livelli medi di rispettivamente 0.128, 0,017 e <0,01 ng/mg di capelli. Questa prevista tendenza è risultata statisticamente significativa, e può essere correlata alla esposizione a TBA avvenuta nei mesi precedenti al prelievo dei capelli. I livelli di TBA negli agricoltori erano variabili, con un valore minimo pari a 0.026 ng/mg di capelli e uno massimo di 4.64 ng/mg di capelli. La mancanza di correlazione tra queste concentrazioni con la quantità di TBA applicata durante i trattamenti e la marginale correlazione tra questi livelli e la superficie trattata, può essere attribuita sia al piccolo numero di soggetti indagati che all'efficacia dell'uso dei mezzi di protezione individuali durante le operazioni manuali e da altri fattori come le esposizioni accidentali. Valutare il corretto utilizzo dei dispositivi di protezione personale è molto difficile in quanto è stata basata sulle dichiarazioni dei soggetti che pertanto possono essere state influenzate dalla percezione personale del rischio. E' stata inoltre trovata una correlazione tra la quantità di TBA nei capelli post-esposizione e l'età dei soggetti, tale risultato potrebbe rafforzare questa tesi in quanto i soggetti più anziani tendono ad avere una minore percezione del rischio associato alle sostanze che maneggiano, e quindi a proteggersi meno, rispetto ai colleghi più giovani.

La presenza di TBA anche nei campioni dei residenti rurali può essere dovuta ad una esposizione multisorgente. Innanzitutto vi potrebbe essere una esposizione per inalazione durante la stagione di applicazione dell'erbicida poiché le loro abitazioni sono molto vicine ai campi di mais. Inoltre anche l'ingestione di alimenti contaminati può rappresentare una ulteriore significativa fonte di esposizione. In letteratura è stata documentata la presenza di TBA nelle acque di falda vicine ai campi coltivati con mais (Otto, 2007); tutti i residenti rurali indagati in questo studio coltivano e consumano verdure coltivate nei propri orti che vengono

irrigati con l'acqua dei fossi, che oltre a contenere le acque di lisciviazione dei campi di mais circostanti, vengono a loro volta puliti dalle infestanti trattando con TBA. La presenza di TBA anche nei campioni pre-esposizione, dove la TBA era quantificabile nel 50% degli LA, nel 36% dei RR e in nessuno dei UR, con livelli simili negli LA e RR risultati statisticamente maggiori rispetto a quelli degli UR ($p < 0.001$), evidenzia che la TBA è presente nelle e zone rurali anche nei periodi di assenza dei trattamenti supportando il modello di esposizione multisorgente.

Negli agricoltori i livelli di TBA misurati nei campioni di capelli post-esposizione sono risultati statisticamente superiori a quelli misurati nei campioni pre-esposizione, ne consegue che i livelli di TBA nei capelli aumentano con la esposizione. I residenti urbani, che non presentano valori di TBA quantificabili in nessun campione, se eventualmente esposti a TBA negli ambienti di vita, non lo sono a concentrazioni tali da essere apprezzabili nei capelli.

I risultati ottenuti per i campioni di capelli ci portano a concludere che, dopo una esposizione a TBA, la TBA tal quale, e non la DET, è sempre presente nei campioni cheratinici, prelevati alla fine del periodo espositivo, e perciò potrebbe essere utilizzata come biomarker di esposizione cumulativa a TBA. I livelli di TBA nei capelli aumentano con l'esposizione e, al contrario dei livelli di DET nei campioni urinari, ci hanno permesso di evidenziare l'esposizione dei residenti rurali.

1. Introduzione

1.1. Antiparassitari

Gli antiparassitari sono sostanze largamente utilizzate in tutto il mondo, e sono volontariamente emesse dall'uomo nell'ambiente per la protezione delle colture da agenti nocivi. Le sostanze chimiche hanno un'intrinseca capacità d'essere tossiche per gli organismi target ma non sono mai completamente specifiche, infatti, direttamente o indirettamente possono esercitare i loro effetti dannosi su diversi organismi viventi, uomo compreso. Sulla base del loro target o del loro effetto prevalente possono essere divisi in acaricidi, erbicidi, fungicidi, fumiganti, insetticidi, molluschicidi, nematocidi regolatori della crescita e rodenticidi (ICPS-ANPA, 1998). Tra gli antiparassitari impiegati una vasta quota del mercato (circa il 30%) è costituita dagli erbicidi e tra essi un ruolo importante è occupato dai composti triazinici.

1.2. La terbutilazina

Le triazine (Figura 1.1.) sono composti eterociclici azotati, formati da un anello esa-atomico con alternanza di atomi di carbonio e azoto, con gruppi sostituenti in posizione 2 (un atomo di cloro, un gruppo S-CH₃, OH oppure O-CH₃) e in posizione 4 e 6 con gruppi alchilici (etilammina, isopropilammina, terbutilammina) (Figura 1.2.). La Terbutilazina (TBA - Figura 1), insieme con atrazina (ATZ), simazina (SIM) e propazina (PROP), è un erbicida che appartiene alla classe dei composti cloro-triazinici potenti inibitori della fotosintesi. Questi composti sono erbicidi selettivi per il mais, sorgo, patate, piselli, canna da zucchero, viti, alberi da frutto, agrumi, caffè, cacao, olive, gomma e forestali in vivai e di nuovo impianto. Il loro utilizzo è diffuso in tutto il mondo, in particolare in Italia gli ingredienti attivi ancora presenti nelle formulazioni sono la SIM e la TBA.

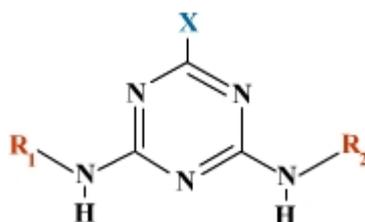


Figura 1.1. Struttura dei composti cloro-triazinici

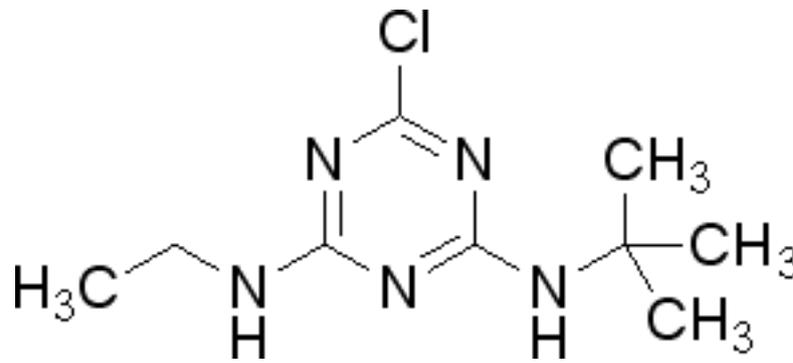


Figura 1.2. Terbutilazina (2-cloro-4-etilamino-6-terbutilamino-1,3,5-triazina)

L'ATZ è stata la molecola più utilizzata in passato, ma a causa della sua alta solubilità in acqua e persistenza ambientale, e il conseguente arricchimento delle acque sotterranee nel tempo (Health and Safety Database Atrazina, 2011; Funari, 1988), ha subito restrizioni e infine ne è stata vietata la vendita e l'utilizzo sia in Italia (con Decreto del Ministero della Sanità del 18 marzo 1992, n.705/910) che in diversi paesi europei (Comunità europea, 2004). L'ATZ è stata gradualmente sostituita dalla TBA che ha una minore solubilità in acqua (8,5 vs 33,0 mg/L a 20 °C) e le cui principali caratteristiche sono elencate nella tabella 1.1.

Tabella 1.1. - Caratteristiche chimico-fisiche della Terbutilazina.

Nome IUPAC	6-cloro-N-(1,1-dimetil)-N-etil-1,3,5-triazina-2,4-diamina
CAS no	59-15-41-3
Formula molecolare:	C ₉ H ₁₆ ClN ₅
Massa molecolare	g/mol
Stato fisico a 25°C	Polvere solida, cerea e globulare
Colore	Biancastro
Odore	Rancido, putrido
Densità relativa (acqua = 1) a 20 °C	1.188
Temperatura di ebollizione	177-179 °C
Tensione di vapore a 25°C	0.15 mPa
Volatilità a 20°C	0.014 mg/m ³
Solubilità a 25°C	Acqua 8.5 mg/L (WHO, 1998, 1985) Acetone 4,13 g/100mL Etanolo 1,50 g/100mL Toluene 1,04 g/mL n-Ottanolo 1,25 g/mL
Coeficiente di ripartizione ottanolo/acqua, Pow:	1,6*10 ³
Tempo di dimezzamento in acqua a 20°C	- a pH 1: 8 giorni - a pH 5: 86 giorni - a pH 7: >200 giorni - a pH 9: >200 giorni - a pH 13: 12 giorni
Stabilità	Non è sensibile ai metalli, ioni metallici Stabile alle alte temperature Non è fotosensibile

Per quanto riguarda la tossicità, gli studi effettuati su animali hanno generalmente mostrato una tossicità acuta molto bassa e, proprio per questo, la TBA è stata classificata nella Toxicity Category III (USEPA, 1995), il penultimo livello su quattro categorie, per gli effetti acuti dovuti alla esposizione orale, dermica e per inalazione. La TBA è moderatamente irritante per gli occhi, e leggermente irritante per la pelle, ma non un sensibilizzante (Health and Safety

Database, 2011).

In studi di tossicità subcronica effettuati su ratti, la TBA ha causato diminuzione del peso corporeo così come diminuzione nel peso di timo, reni e fegato. Sui conigli ha causato, oltre la perdita di peso corporeo e diminuzione dell'appetito, anche la morte per un individuo femmina. In altri studi su conigli, sono stati riscontrati in tutti gli animali difficoltà respiratorie, sedazione, postura curva ed irritazione dermica. Anche negli studi di tossicità cronica e cancerogenicità su topi e ratti è stata osservata una diminuzione in peso degli animali e un minor consumo di cibo. In altri due studi non è stato evidenziato un incremento dell'incidenza di tumori né nei topi né nei ratti, mentre in un terzo, ad una dose in cui è stata rilevata una eccessiva tossicità sistemica, è stato riscontrato un aumento dell'incidenza del tumore ai testicoli per gli individui maschi e del carcinoma alle ghiandole mammarie negli individui femmina. Sulla base di questi studi il "*Carcinogenity Peer Review Committee*" dell'EPA ha inserito la TBA nella classe D e cioè tra le sostanze per cui non vi sono sufficienti e adeguate evidenze di carcinogenicità per l'uomo (USEPA 1995).

In studi di effettuati su conigli, la TBA non ha mostrato effetti di tossicità sullo sviluppo, al contrario studi sui ratti hanno evidenziato segni di tossicità sia della madre, con riduzione del peso e minor consumo di cibo, che sulla cucciolata dove è stata evidenziata la mancata formazione dell'osso di un dito. Non sono disponibili studi di tossicità sul sistema riproduttivo, infine studi di mutagenicità hanno evidenziato che la TBA non è mutagena (USEPA 1995).

La presenza di TBA è stata indagata con diversi livelli di approfondimento nelle matrici aria, acqua e cibo. Per quanto riguarda l'aria non ci sono studi specifici ma studi effettuati sulle acque piovane indicano che la concentrazione di TBA in aria sarebbe molto bassa, anche se aumenta in primavera, periodo di applicazione della TBA (Bossi, 2002). Al contrario, è stata largamente investigata la presenza di TBA sia nelle acque di superficie come in laghi e fiumi, che nelle acque di pozzo, potabili e di falda, in zone dove veniva utilizzata la TBA in diversi paesi europei, Italia compresa. In uno studio italiano sono stati monitorati i livelli di TBA nel fiume Po per un periodo di 3 anni (1988-1991) e sono stati osservate concentrazioni tra 0,01 e 0,3 mg/litro (Brambilla, 1993). In Friuli Venezia Giulia, nei mesi tra Ottobre 1991 e Aprile 1992, è stata analizzata l'acqua di sette pozzi per più di 29 volte. La TBA è stata rilevata in 7 campioni su un totale di 200: in 3 campioni le concentrazioni di TBA erano comprese tra 0,1 e 0,2 mg/litro, e in 4 campioni i livelli erano superiori ai 0,2 mg/litro (Barbina, 1993). La TBA, anche se in una piccola percentuale di campioni e in concentrazioni ridotte (al di sotto di 0,01 µg/L), è stata inoltre trovata nelle acque potabili, sotterranee e di pozzo in Germania e Svezia, e in laghi e fiumi di Svizzera e Germania (WHO, 1998) così come nelle falde acquifere in una zona del nord Italia in cui sono presenti coltivazioni di mais (Otto, 2007). Per quanto riguarda

gli alimenti, negli Stati Uniti dal 1989 al 1991 è stata effettuata una vasta indagine sui residui di antiparassitari su diverse varietà di frutta e verdura ma non è stato trovato nessun residuo TBA (Schattenberg, 1992). Anche in uno studio del 2009, sempre effettuato campionando frutta e verdura, non sono stati trovati livelli apprezzabili di TBA (Garcia-Reyes, 2009). Residui sono stati trovati solo in uno studio effettuato su campioni di mais destinato al silaggio per l'alimentazione sperimentalmente di bestiame e pollame, anche se non sono stati rilevati residui misurabili in carne, uova o latte (WHO, 1998).

Anche se non ci sono prove sulla mutagenicità e cancerogenicità della TBA, è stato comunque calcolato un valore guida per le acque potabili basato sull'approccio della massima dose giornaliera ammissibile (Total Daily Intake-TDI). Considerando un NOAEL (No Observed Admissible Effect Level) di 0,22 mg/kg di peso corporeo al giorno, che è stato identificato grazie ad uno studio di tossicità e cancerogenicità di 2 anni su ratti che hanno evidenziato una riduzione del peso corporeo alla dose superiore di 1 mg/kg di peso corporeo al giorno, è stato calcolato un TDI di 2,2 µg/kg di peso corporeo utilizzando un fattore di incertezza di 100 (per la variazione inter- e intraspecifica). Assumendo che una persona di 60 kg consuma 2 litri di acqua potabile al giorno, e considerando che l'acqua potabile costituisce il 10% della TDI, può essere calcolato un valore guida indicativo di TBA in acqua potabile di 7 mg/litro (WHO, 1998).

Nei mammiferi la degradazione metabolica della TBA è a carico del sistema ossidativo del citocromo P-450, attraverso de-etilazioni ossidative, ossidazioni di un gruppo metilico del gruppo tert-butilico, e successive coniugazioni dell'alcool col gruppo glucuronidico (Figura 1.3.). L'alcol può essere ulteriormente ossidato in acido carbossilico. Sono state descritte anche vie metaboliche minori con la formazione di esteri solfato dei derivati dell'alcol, dechlorazione via glutatione e successiva formazione di derivati dell'acido mercapturico, e la formazione dei metaboliti 2-idrossitrazina (WHO, 1998). Studi effettuati su ratti e bovini a cui è stata somministrata TBA marcata con ¹⁴C, hanno inoltre dimostrato la sua completa metabolizzazione ed escrezione in urine e feci con un tempo di dimezzamento di 16-17 ore (WHO, 1998). In uno studio pubblicato sul Bollettino Trimestrale del ICPS (International Centre for Pesticides and Health Risk Prevention) "*Pesticide Safety News*" del marzo 1998 dal titolo "Monitoraggio biologico dell'esposizione a terbutilazina e propazina in ambito industriale produttivo" (Catenacci, 1998), viene riportato che approssimativamente il 50-60% dei metaboliti escreti sono rappresentati dalla TBA de-etilata (DET), il 30-35% dalla TBA bi-dealchilata (DACT), circa il 5% dalla TBA deterbutilata (DIA) e solo lo 1-2% dalla TER immodificata.

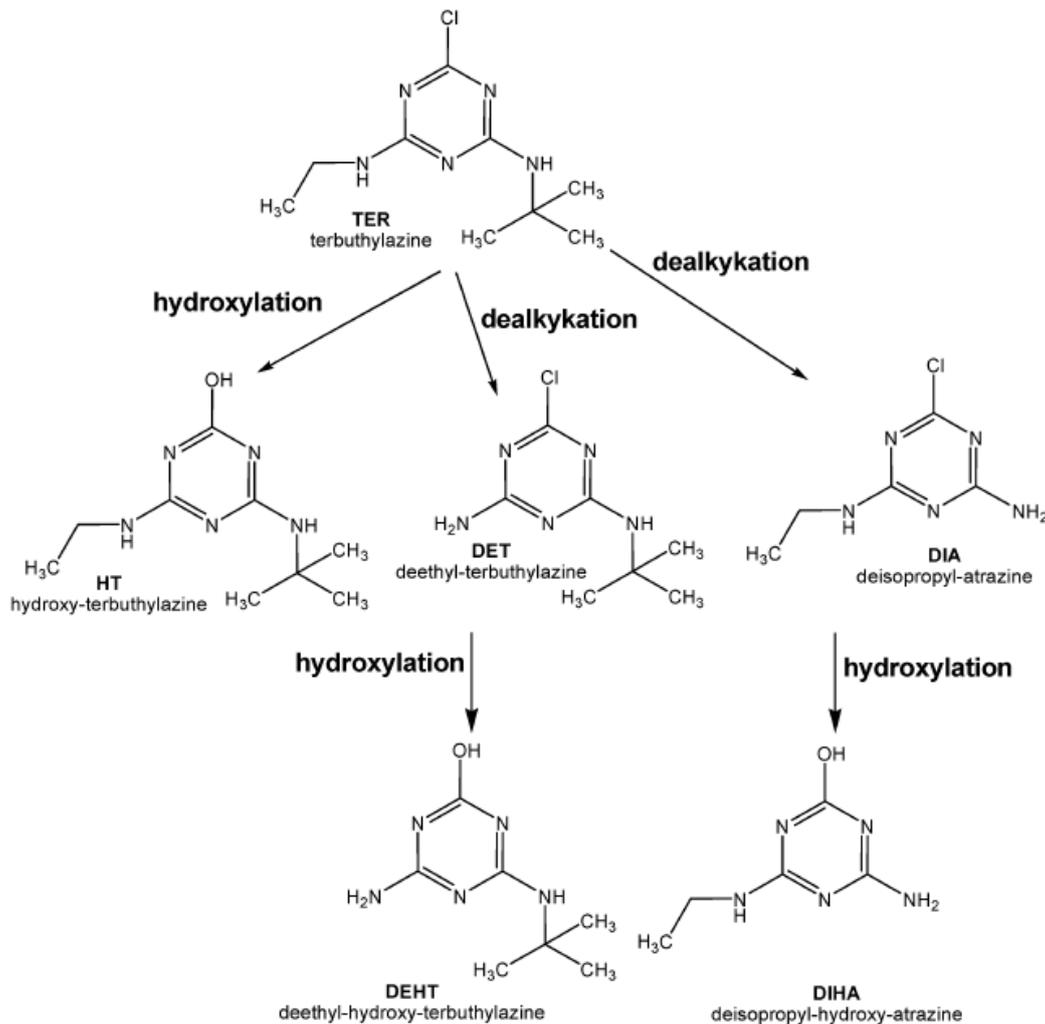


Figura 1.3. Schema metabolico TBA (Panuwet, 2008).

1.2.1. Utilizzo della terbutilazina

La TBA viene utilizzata per il diserbo del mais anche se in diverse miscele con altri prodotti. In Italia circa 15,8 milioni di ettari sono adibiti ad uso agricolo (Eurostat, 2007) di cui circa 1,1 milioni di ettari, localizzati prevalentemente nelle regioni del settentrione, sono utilizzati per la semina del mais. Il mais rappresenta una delle colture prevalenti del nord Italia e il periodo di semina, a seconda della piovosità delle diverse zone, parte a inizio febbraio e si protrae fino ai primi di maggio (Rapparini, 2009).

La TBA è un erbicida selettivo, viene assorbita dalla pianta sia attraverso le foglie che attraverso la radice e, dopo la nascita, viene distribuita in tutto l'organismo. Grazie a questo può essere utilizzata sia nei trattamenti pre- che post-emergenza (WHO, 1998). L'applicazione della TBA ha il pregio di non risentire dell'andamento stagionale ed è risolutivo se piove subito dopo l'applicazione. Di contro produce molti prodotti residuali, non ha un bersaglio

mirato, è meno efficace se non piove dopo l'applicazione e non può essere applicata su tutti i tipi di terreno.

Il trattamento non viene effettuato con il formulato commerciale tal quale, ma diluendo il prodotto in acqua con proporzioni che variano a seconda delle indicazioni del produttore (Figura 1.4.). Tale miscelazione è resa possibile grazie alla presenza nel prodotto stesso, oltre che del principio attivo, di co-formulati in percentuali variabili. Il prodotto viene poi applicato con apparecchiature di vario genere più o meno meccanizzate. Un esempio di apparecchiatura è mostrato in Figura 1.5.A e B dove ad un trattore è montata una autobotte fornita di sistema a barre.

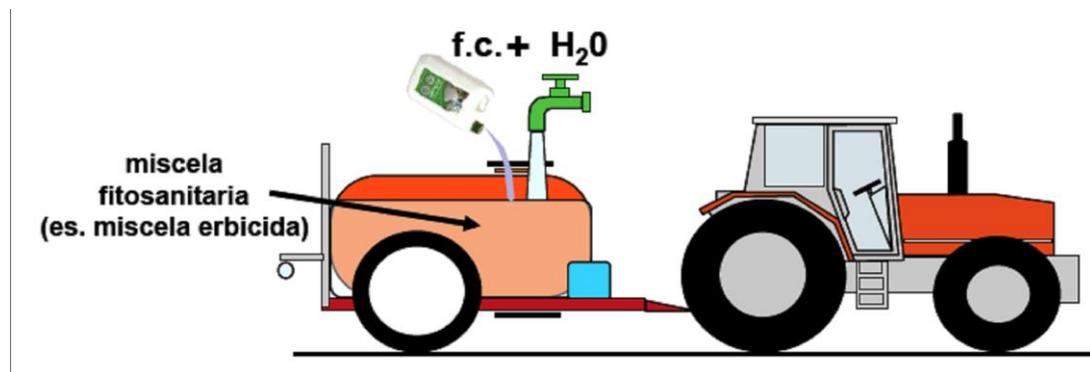


Figura 1.4. Modalità d'uso dei formulati in agricoltura



A)



B)

Figura 1.5.A e 1.5.B Trattore con autobotte dotata di sistema a barre con ugelli per l'applicazione del diserbo

1.3. Esposizione ad antiparassitari

L'esposizione ad antiparassitari può essere sia di tipo occupazionale, durante la produzione delle sostanze o durante il loro utilizzo in agricoltura, che non occupazionale.

In agricoltura, gli antiparassitari sono assorbiti principalmente per via inalatoria e cutanea durante le diverse fasi di lavorazione (Arbuckle, 2002). L'assorbimento attraverso il tratto gastrointestinale è di minor rilevanza in quanto può essere causato dalla ingestione di particelle aerodisperse che si depositano a livello delle prime vie aeree. Al contrario il contributo dell'ingestione può diventare rilevante se non vengono rispettate le opportune norme igieniche che riguardano il consumo di cibi e bevande e l'abitudine a fumare sul luogo di lavoro. La quota assorbita per via inalatoria non è trascurabile, in virtù delle dimensioni elevate delle particelle aerodisperse, tuttavia è di gran lunga inferiore rispetto a quella cutanea (Garrod, 1998; Machera, 2003; Protano, 2009). Infatti, la contaminazione della cute non adeguatamente protetta può rappresentare quote significative della quantità assorbita, pari ad oltre il 50% della dose totale (Davis, 1980).

Nella popolazione generale la maggior via di esposizione è quella gastrointestinale attraverso l'ingestione di alimenti e bevande contaminati o per contatto dermico se viene utilizzato per usi domestici; nei residenti della zona rurale, oltre all'ingestione, l'esposizione può essere causata anche della vicinanza alle colture e ai siti di applicazione e quindi alla presenza di antiparassitari negli ambienti di vita (Tzatzakis, 2008; Health and Safety Database, 2010).

Valutare l'esposizione ad antiparassitari nei lavoratori dell'agricoltura è un compito difficile; infatti, oltre alle differenti vie d'esposizione, le esposizioni non sono regolari ma discontinue perché dipendenti dalle applicazioni programmate ed effettuate in base alle condizioni meteorologiche e all'esigenza della coltura. Inoltre, sono diverse le tecnologie utilizzate, i tipi di colture, e le formulazioni utilizzate. Infine, i lavoratori solitamente hanno una bassa istruzione e scarsa consapevolezza dei rischi per la salute legati all'uso degli antiparassitari e alla loro prevenzione.

La valutazione dell'esposizione ad antiparassitari può essere effettuata con diversi strumenti: mediante l'utilizzo di modelli predittivi, utilizzando dati di misura esistenti, effettuando misure in condizioni sperimentali o con campionamenti rappresentativi attraverso il monitoraggio ambientale e biologico. I modelli predittivi si basano sulle caratteristiche chimico-fisiche delle sostanze e quindi non tengono conto dei molti aspetti che determinano l'esposizione. Sono perciò utilizzati più in ambito epidemiologico per la stima dell'esposizione ambientale che per la valutazione del rischio professionale. L'utilizzo dei dati esistenti è sicuramente un metodo più pratico e meno costoso ma è una procedura non sufficientemente testata, il cui utilizzo richiede che l'esposizione sia determinata più dalle proprietà fisiche del formulato, dai metodi e dalle condizioni d'uso che dalle proprietà chimiche della sostanza. Anche l'impiego di misure ottenute in condizioni sperimentali non riescono a dare una stima precisa della esposizione, in quanto è difficile riprodurre tutte le condizioni espositive che si verificano nella realtà. Sicuramente la misura diretta dei livelli di esposizione resta la via migliore per la valutazione della esposizione, anche se costosa e più difficile da attuare. In letteratura diversi sono gli studi che riportano valutazioni sull'esposizione dermica ed inalatoria, mentre minori, anche se consistenti, sono gli studi di monitoraggio biologico.

1.4. Monitoraggio dell'esposizione

In generale, esaminare i lavoratori esposti ad sostanze nocive equivale, oltre che a valutare gli effetti di tali agenti sulla salute (la cd. sorveglianza sanitaria, questione non strettamente connessa allo svolgimento della presente ricerca) ad effettuare controlli in modo sistematico e nel tempo. A tal proposito si parla di "monitoraggio".

Il monitoraggio dell'esposizione può essere ambientale e biologico.

1.4.1. Monitoraggio ambientale

Il monitoraggio ambientale dell'esposizione consiste nel valutare qualitativamente e quantitativamente la presenza di inquinanti nell'ambiente di lavoro. Esso viene effettuato

misurando la concentrazione dell'inquinante, usualmente a livello atmosferico, al fine di valutare l'esposizione ambientale ed il relativo rischio per la salute dei lavoratori.

1.4.2. Monitoraggio biologico

Il monitoraggio biologico è uno strumento che consente di sorvegliare sia singoli soggetti che gruppi di lavoratori. Esso consiste nella misura – nel sangue, nelle urine, nei tessuti, nei secreti, nell'aria espirata dei soggetti esposti - degli agenti presenti nel luogo di lavoro, dei loro metaboliti nonché delle alterazioni biologiche quanto più specifiche dovute alla sostanza indagata, che non rappresentino già espressione di danno alla salute (indicatori biologici di esposizione, di dose e di effetto).

Il monitoraggio biologico è un mezzo vantaggioso per la valutazione della esposizione a sostanze tossiche poiché consente una misura della reale quantità di sostanza assorbita dall'organismo. Esso integra il contributo di tutte le vie di esposizione, considerando i singoli fattori, tipici di ogni soggetto, che influenzano l'assorbimento, tenendo conto dello sforzo compiuto durante l'esposizione.

In particolare, l'efficacia di tale monitoraggio è connessa alla possibilità di valutare (Bertazzi, Alessio, Duce, Marubini):

- l'esposizione, in relazione ad un periodo di tempo prolungato; in tal modo non ci si limita alla considerazione della quantità di sostanza presente nell'ambiente di lavoro al momento della verifica;
- l'esposizione, tenendo conto della mobilità del lavoratore, dei suoi reali spostamenti nell'ambiente di lavoro e non soltanto con riguardo alla quantità di sostanza presente a livello del proprio posto di lavoro "teorico";
- l'assorbimento delle sostanze attraverso varie vie, e non solo attraverso l'apparato respiratorio;
- l'esposizione, intesa in senso globale, cioè come derivante dall'inquinamento professionale ed extraprofessionale;
- la quantità di sostanza assorbita dal soggetto in funzione di fattori diversi quali il carico di lavoro, i fattori climatici, età, sesso, caratteristiche genetiche etc.

1.4.3. Matrici utilizzate nel monitoraggio biologico e antiparassitari

La valutazione dell'esposizione umana agli antiparassitari in matrici convenzionalmente utilizzate per il monitoraggio biologico, come sangue o urine, è di difficile applicazione sia in

agricoltura che per la popolazione generale e rurale. Infatti queste matrici sono adatte per indagare l'esposizione solo a breve o medio termine (Maroni, 2000), il campionamento deve essere effettuato entro una ristretta finestra temporale e, nel caso del sangue, richiede personale sanitario. Negli studi sul campo, è difficile raccogliere un campione rappresentativo del momento espositivo a causa della discontinuità delle applicazioni che, come già detto, vengono effettuate più volte nella stagione e in momenti non sempre prevedibili.

I capelli sono una matrice interessante poiché potrebbero essere utilizzati per la quantificazione dell'esposizione cumulativa e ridurre la variabilità inter-individuale osservata nei campioni urinari ed ematici.

1.5. La matrice capello e suo utilizzo

L'utilizzo del capello come matrice in tossicologia è cominciato negli anni '60 e '70 per valutare l'esposizione a metalli pesanti tossici. Già agli inizi degli anni '80 lo sviluppo delle metodologie analitiche, sia in termini di sensibilità che di specificità, come l'immunoassay e la gas cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa, ha permesso anche l'analisi di sostanze organiche intrappolate nel capello (Villain, 2004). Sempre più numerosi sono attualmente i campi di applicazione: vengono, infatti, largamente utilizzati come mezzo per la determinazione di farmaci o droghe d'abuso (Boumba, 2006; Nakahara, 1999; Pragst, 2006; Tsatsakis, 1997, 2000), per valutare la carenza di elementi in tracce (Rodrigues, 2008; Li, 2011), o nel monitoraggio dell'esposizione a sostanze inorganiche come i metalli (Yasutake, 2004; Gault, 2008; Shah, 2011).

La matrice capello è stata utilizzata anche come indicatore di esposizione a lungo termine legata all'utilizzo di antiparassitari, in particolare in studi di intossicazione acuta in lavoratori agricoli (Tsatsakis, 2001), in agricoltori impegnati nel diserbo dei campi (Covaci, 2002), in studi sulla popolazione generale (Covaci, 2001) e residenti rurali (Tsatsakis, 2008), ed infine in categorie di soggetti particolarmente sensibili (bambini e donne in gravidanza) (Neuber, 1999; Ostrea, 2008).

Come mostrato in tabella 1.2., nei capelli è stata indagata la presenza di diverse categorie di antiparassitari sia appartenenti alla classe delle sostanze persistenti organoclorurate come DDT (D'Halvè, 2008; Nakao, 2002, Zhang, 2007) e HCH (Tsatsakis, 2004, Covaci, 2008), che ad altre classi di sostanze come diazinone, parathion metile, malathion, metomil, fention, clorpirifos, bioalletrina, pretilachlor e propoxur (Tsatsakis, 2008; Proseccion, 2006). Non esistono studi in letteratura che valutano la presenza di TBA nei capelli.

Tabella 1.2. – Tabella riassuntiva delle bibliografia sul monitoraggio dell'esposizione ad antiparassitari nei capelli.

Composto	Livelli rilevati nel capello	Soggetti	Riferimento															
Diazinon Methyl Parathion Malathion Fenthion	2.8 pg/mg ND ND ND	211 lavoratori agricoli divisi in tre gruppi: 1. lavoratori delle serre 2. allevatori 3. lavoratori dei campi	Tsatsakis e altri 2007															
Malathion Chlorpyrifos Bioallethrin Pretilachlor Propoxur	(µg/g) 4.85 4.58 6.78 2.68 2.80	282 donne gravide di un paese agricolo delle Filippine	Posecion e altri 2006															
PCDDs PCDFs nCo-PCBs	17.4 a 97.7 pg/g OCDD 17.2 a 46.1 pg/g 3,3',4,4'-TCB 1.18 a 3.26 pgTEQ/g 2,3,7,8-TCDD	6 donatori generici con le stesse caratteristiche	Nakao e altri 2002															
DDT lindano	0.15-0.40 µg/g 0.25-0.40 µg/g	193 bambini in età pre scolare di un area rurale nelle vicinanze di Rostok	Neuber e altri 1999															
PCBs DDTs HCHs	ng/g da <2 a 44.7 da 12.7 a 754.2 da 8.8 a 95.2	14 campioni di capelli provenienti da Belgio, Romania e Grecia	Covaci e altri 2001															
HCB HCHs DDTs PCBs	Mean <table border="1"> <thead> <tr> <th>G</th> <th>R</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.5</td> <td>0.9</td> <td>0.9</td> </tr> <tr> <td>40.8</td> <td>31.8</td> <td>14.7</td> </tr> <tr> <td>101</td> <td>52.2</td> <td>18.8</td> </tr> <tr> <td>5.2</td> <td>10.2</td> <td>13.7</td> </tr> </tbody> </table>	G	R	B	0.5	0.9	0.9	40.8	31.8	14.7	101	52.2	18.8	5.2	10.2	13.7	35 soggetti Grecia(G) 2 soggetti Romania (R) 10 soggetti Belgio (B)	Covaci e altri 2002
G	R	B																
0.5	0.9	0.9																
40.8	31.8	14.7																
101	52.2	18.8																
5.2	10.2	13.7																

La matrice capello ha destato interesse perché presenta diversi vantaggi rispetto alle matrici comunemente utilizzate (come ad esempio urine e sangue) primo fra tutti la maggiore finestra di acquisizione del dato (da settimane a mesi a seconda della lunghezza del campione raccolto). Un ulteriore vantaggio, comparato all'utilizzo di sangue ed urina, è rappresentato dalla maggior facilità di raccolta e stoccaggio dei campioni, poiché (i) il prelievo non è invasivo ed è molto facile da realizzare; (ii) il campione non è facilmente adulterabile come, al contrario, potrebbe avvenire nel caso di urine, attraverso la diluizione con acqua; (iii) in caso di perdita del campione è possibile ottenere un altro campione identico (Gallardo, 2008). Inoltre, la stabilità della matrice stessa e delle sostanze in essa contenute, per lunghi periodi di tempo e senza l'utilizzo di particolari condizioni per la conservazione, ha permesso l'utilizzo dei capelli anche in casi *post-mortem* (Kronstrand, 2007).

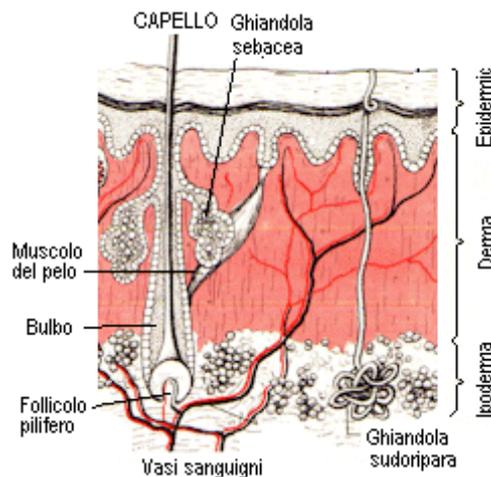
L'utilizzo del capello, in ogni caso, comporta alcuni svantaggi. In primo luogo, si tratta di un

campione esterno rispetto al corpo, soggetto pertanto a possibili contaminazioni. Per tale ragione, è necessario un trattamento di decontaminazione del campione finalizzato ad eliminare la componente esogena ed evitare falsi positivi. Inoltre la difficile interpretazione dei dati potrebbe derivare dalla complessità nel definire range di riferimento e dalle differenze intraindividuali nella velocità di crescita del capello (Schramm, 2008).

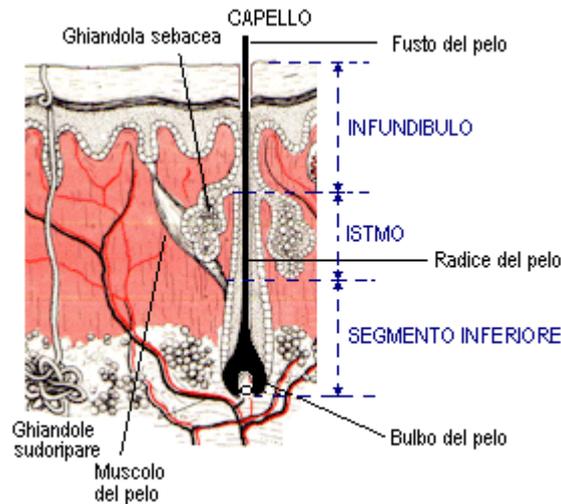
1.6. Struttura del capello

Il capello è composto al 65-95% da proteine, soprattutto cheratina, dal 1-9% da lipidi e da una porzione di minerali inferiore all'1% (Gallardo, 2008). Alla vista la struttura del capello pare uniforme, mentre in realtà è molto complessa e la sua biologia non è ancora del tutto chiara.

Il capello è essenzialmente formato da due componenti (Figura 1.6.A e B): una esterna alla cute, il fusto, ed una interna, il follicolo, con struttura a sacco radicato nell'epitelio dell'epidermide, associato alle ghiandole sebacee e, nelle zone pubica ed ascellare, alle ghiandole apocrine (Boumba, 2006).



A)



B)

Figura 1.6.A e 1.6.B Struttura del capello

I capelli nascono nei follicoli piliferi, un'invaginazione dell'epidermide nel derma, di forma più o meno cilindrica, che termina in profondità con una formazione concava di nome bulbo. Sul follicolo si innesta il muscolo erettore del pelo e in questo sbocca il dotto della ghiandola sebacea. Il bulbo racchiude tessuto dermico riccamente vascolarizzato, cioè la papilla dermica, che serve per il nutrimento del pelo. Il follicolo può essere diviso in tre parti: l'infundibulo, che va dall'imbocco follicolare al punto in cui il dotto della ghiandola sebacea sbocca nel follicolo, l'istmo, che è il segmento compreso tra lo sbocco della ghiandola sebacea e l'inserzione del muscolo erettore del pelo ed il segmento inferiore del follicolo, che si diparte dal muscolo erettore del pelo ed è l'unica parte temporanea dello stesso, perché scompare durante il ciclo di crescita. Anche le ghiandole sudoripare sono localizzate vicino al follicolo, ma i dotti non si svuotano al suo interno. Il bulbo è la parte più importante del follicolo in quanto contiene le cellule della matrice del pelo che danno origine a tutte le sue strutture. Le cellule del bulbo si dividono ogni 23-72 ore, cioè molto più velocemente di qualsiasi altra cellula dell'organismo (Boumba, 2006). Tra le cellule della matrice, poste al di sopra della papilla dermica, si trovano sparsi i melanociti responsabili del colore dei capelli. La parte cheratinizzata che emerge dal follicolo pilifero e costituisce il pelo propriamente detto, è il fusto. La cheratina contiene un pigmento, la melanina, presente in 2 forme diverse: una filamentosa, che imprime un colore giallo, e una granulare, con un colore variabile dal bruno al nero.

Il fusto, a forma cilindrica, non è una fibra omogenea ma è formato da cellule cheratinizzate legate tra loro da una membrana (Pragast, 2006). Se si taglia un capello in senso orizzontale (Figura 1.7.) se ne può apprezzare la struttura. Le cellule cheratinizzate formano tre strutture concentriche: una prima più esterna, la cuticola, formata da un'unica fila di cellule trasparenti

e sottili, una intermedia, la corteccia, la parte più abbondante e formata da cellule più grosse, di forma fusata che contengono la melanina, e l'interno, il midollo, formato da cellule arrotondate, disposte in colonne.

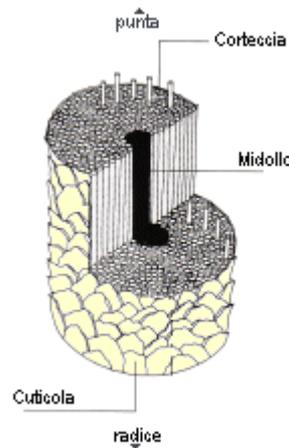


Figura 1.7. Sezione orizzontale del fusto del capello

Il ciclo di crescita del capello dura da 2 a 6 anni ed è costituito dalla successione di tre fasi: "*anagen*", il periodo di crescita, "*catagen*", periodo di transizione, e "*telogen*", periodo di quiescenza. Alla fine di ciascun ciclo il capello cade e viene sostituito (Pragast, 2006).

La prima fase *anagen* è la fase attiva in cui le cellule del bulbo si dividono rapidamente, il nuovo capello si forma e le cellule che lo compongono sono allungate e formano un sottile filamento. Successivamente le cellule cominciano a svilupparsi verso l'alto nel canale follicolare, mentre avviene il processo di cheratinizzazione e differenziazione delle cellule in cuticola, corteccia e midollo all'altezza del segmento inferiore. In questo periodo il capello cresce di circa 1 cm ogni 28 giorni e resta in questa fase per circa 2-6 anni. La velocità di crescita, comunque, non è universale, ma dipende da diversi fattori quali la collocazione anatomica, la razza, il genere e l'età. Durante questa fase i vasi capillari che circondano il follicolo donano nutrienti al capello ma, allo stesso tempo, rilasciano sostanze estranee eventualmente contenute nella circolazione sanguigna come metalli, droghe o altre sostanze che vengono incorporate e bloccate all'interno delle molecole che andranno a costituire il fusto. Nella zona cheratinogenica inoltre possono essere incorporate nel fusto sostanze chimiche provenienti dai tessuti circostanti trasportate da linfa e fluidi intracellulari. La seconda fase, *catagen*, è una breve fase di transizione in cui le divisioni cellulari si interrompono e il capello smette di crescere. Questa fase dura circa 2-3 settimane durante le quali il follicolo diminuisce in volume. Infine la fase *telogen* è di quiescenza, la crescita si arresta completamente e il capello resta ancorato al follicolo attraverso la radice. Sotto, nel

bulbo le cellule germinali si preparano una nuova fase anagen mentre il vecchio capello viene spinto verso l'esterno per poi cadere entro 10 settimane (Boumba, 2006).

1.7. Meccanismi di incorporazione delle sostanze nel capello

Il meccanismo esatto attraverso il quale gli xenobiotici si legano al capello non è ancora ben noto ma è diffusamente ritenuto che ciò avvenga attraverso tre vie: dal sangue, durante la crescita del fusto per diffusione passiva, da sudore e sebo per diffusione nel capello già cresciuto, infine dalla deposizione di sostanze presenti nell'ambiente (Figura 1.8. e 1.9.).

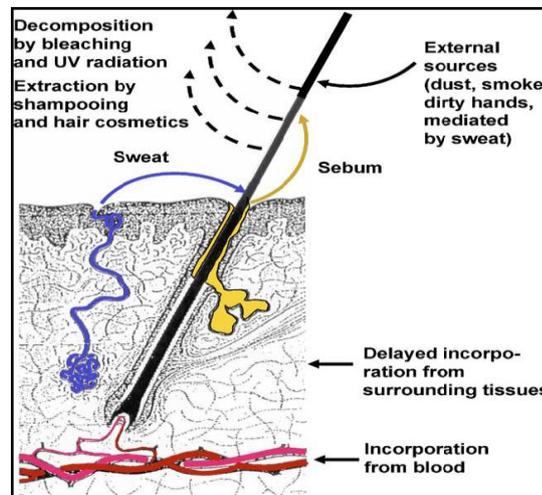


Figura 1.8. Meccanismi di incorporazione delle sostanze nel capello (Pragst,2006)

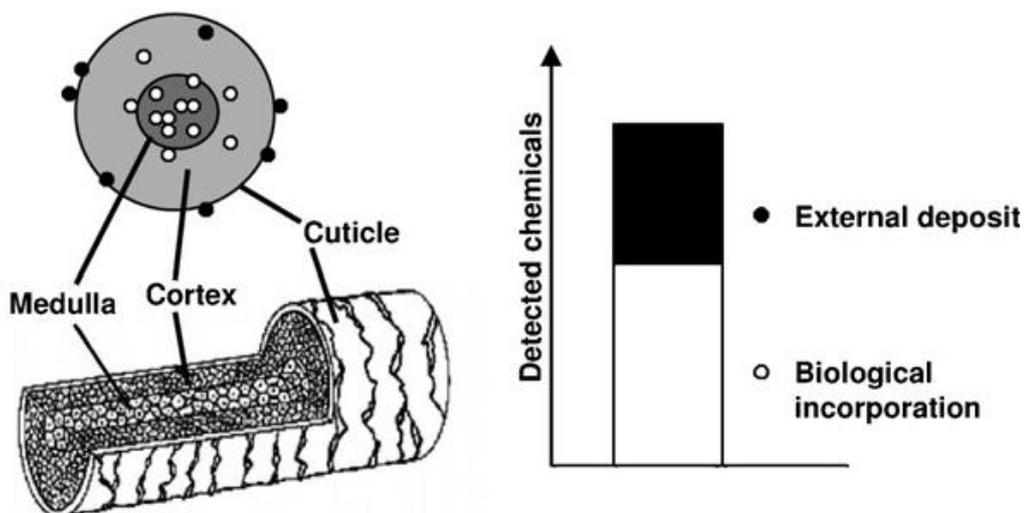


Figura 1.9. Incorporazione e deposito esterno di sostanze nel capello.

E' stata descritta anche la migrazione di sostanze chimiche attraverso i capelli a causa di forze

capillari nella regione non cheratinica (Skopp, 1996), che sono perciò legate più debolmente alla matrice.

L'incorporazione di sostanze nel capello è, inoltre, influenzata sia dalle caratteristiche dello stesso, come la quantità di melanina, che dalla lipofilità e la basicità delle sostanze. Per esempio, studi effettuati su soggetti brizzolati in cui sono presenti sia capelli pigmentati che non, hanno dimostrato che, la concentrazione di sostanza indagata è circa 10 volte superiore nei capelli pigmentati che in quelli non pigmentati. Le sostanze lipofile non cariche attraversano le pareti delle membrane cellulari e diffondono in relazione alla differenza di concentrazione nella cellula. Al contrario la parete cellulare è impermeabile per sostanze idrofobe e ioni di medio peso molecolare (Pragst, 2006).

Un altro fattore che influenza l'incorporazione è la velocità di crescita, in genere di 0.3-1.5 cm al mese, che più è lenta maggiore è l'accumulo di contaminanti. Tuttavia, quando non sono disponibili capelli, possono essere utilizzati altri tipi di peli (pube, ascelle, sopracciglia) che differiscono tra loro nella velocità di crescita. Quelli che crescono più in fretta sono quelli del viso, i più lenti, quelli delle estremità del corpo e le sopracciglia. I peli pubici e degli arti sono in grado di accumulare maggiormente sostanze, favoriti dalle più alte temperature e, inoltre, possono assorbire rispettivamente contaminanti dalle urine e dal sudore (Bogdanow, 2006).

1.8. Scopo del lavoro

Gli obiettivi principali del presente progetto di ricerca sono:

Sviluppo di metodi analitici per la misura di TBA, e del suo metabolita DET, nei campioni di urine e di capelli

Verifica dell'effettiva incorporazione della TBA nella matrice capello

Applicazione dei metodi sviluppati all'analisi delle urine e dei capelli di agricoltori professionalmente esposti a TBA, residenti rurali e residenti urbani

3) Valutazione degli aspetti che possono influenzare l'esposizione

4) Valutazione dell'utilizzo dei composti individuati quali possibili indicatori biologici di esposizione a TBA.

Per lo svolgimento del progetto si è prevista l'articolazione dello stesso in più fasi che vengono qui di seguito illustrate:

Fase 1.

Sviluppo di metodi analitici per la misura di TBA, e del suo metabolita DET, nei campioni di urine e di capelli

a. Individuazione di composti analoghi ai composti considerati e adatti ad essere utilizzati come standard interni.

Messa a punto delle procedure estrattive per isolare i composti di interesse dalle urine e dai capelli.

Selezione della tecnica strumentale più adatta e messa a punto delle procedure per l'identificazione e la quantificazione dei composti di interesse.

Ottimizzazione delle condizioni sperimentali per ottenere la massima sensibilità del metodo e ottimizzarne precisione e accuratezza.

Valutazione delle caratteristiche analitiche dei metodi sviluppati (sensibilità, specificità, ripetibilità).

Fase 2.

Verifica dell'effettiva incorporazione della TBA nella matrice capello.

Messa a punto e applicazione di un protocollo di somministrazione orale di TBA nei ratti

Raccolta di campioni di pelo degli individui studiati

Esecuzione delle analisi per la determinazione di TBA e DET nei campioni di peli

Elaborazione dei dati e valutazione dei risultati ottenuti.

Fase 3.

Applicazione dei metodi all'analisi delle urine di soggetti professionalmente esposti a TBA.

Raccolta di urine e capelli di soggetti esposti in ambito professionale a TBA, dei residenti rurali e residenti urbani

Esecuzione delle analisi per la determinazione di TBA e DET nei campioni di urine e dei campioni di capelli.

Fase 4.

Valutazione degli aspetti che possono influenzare l'esposizione e considerazioni conclusive sull'utilizzo dei composti individuati quali possibili indicatori biologici di esposizione a TBA.

Costituzione di un database.

Inserimento dei dati relativi ai questionari anamnestici e dei dati relativi al monitoraggio biologico

c. Elaborazione statistica dei risultati.

d. Valutazione dei risultati ottenuti.

I risultati ottenuti verranno valutati anche in base alla valutazione degli aspetti che possono influenzare l'esposizione .

2. Sviluppo del metodo analitico per la determinazione di TBA e DET nella matrice urina e nei capelli

2.1. Introduzione

In letteratura non sono disponibili metodi per la misura della TBA in matrici biologiche ma sono stati sviluppati diversi lavori in cui viene indagata la presenza di erbicidi triazinici in svariate matrici quali acqua (Bossi, 2002; Comoretto, 2005; Jiang, 2005; Marìn, 2009; Mazzella, 2009; Mouvet, 1997; Nogueira, 2004; Papadopoulos, 2007), suolo (Amalric, 2008; Chapuis, 2004; Mouvet, 1997), cibo (Garcia-Reyes, 2009) e succhi (Chapuis, 2004), inoltre sono stati pubblicati studi sulla presenza di ATZ e sui metaboliti nelle urine (Panuwet, 2008; Brian, 2005).

In generale queste procedure analitiche prevedono uno *step* di preparazione del campione con estrazione in fase solida (SPE) seguito da una procedura analitica in cromatografia liquida ad alte prestazioni accoppiata o al detector diode array (HPLC-DAD) (Bjarnason, 1999; Chapuis, 2004, Papadopoulos, 2007) o all'electro-spray e spettrometro di massa (LC-ESI-MS/MS) (Borba da Cunha, 2004; Bossi, 2002; Comoretto, 2005; Marìn, 2009; Mazzella, 2009; Nogueira, 2004; Zrostlikovà, 2002), e, infine, in gas cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS) (Jiang, 2005; Mouvet, 1997).

Lo scopo di questa parte del lavoro è stato quello di sviluppare una procedura analitica per la determinazione di TBA, e il suo metabolita DET, sia nella matrice urina che nei capelli. La metodica prevede la misurazione dei due analiti in LC-MS/MS, in presenza dei rispettivi internal standards deuterati, dopo la preparazione del campione che per le urine consiste in una estrazione SPE e per i capelli in una estrazione in solvete utilizzando metanolo.

2.2. Reagenti e preparazione delle soluzioni di lavoro

Per lo sviluppo del metodo sono stati utilizzati TBA e DET (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) per la preparazione delle soluzioni standard; TBA d-5 e DET d-9 (99%) (CDN ISOTOPI, Chemical Research 2000, Roma, Italia) e per la preparazione delle soluzioni degli standards interni.

Per la preparazione delle soluzioni standard, per l'ottimizzazione del metodo e per la preparazione dei campioni sono stati utilizzati metanolo (MeOH), acetonitrile (CH₃CN), acetone (C₃H₆O), diclorometano (CH₂Cl₂) e acido cloridrico al 37% acquistati da Carlo Erba Reagenti (Rodano, Italia) di purezza analitica. Sono stati utilizzati anche acido formico 99%

(LC-MS, Riedel de Haen, Sigma Aldrich, Milano, Italia) e penta-idrato-tetrametilammonioiodrossido (TMAH, 99% Sigma Aldrich, Milano, Italia). Idrossido di sodio (NaOH), e i sali per la preparazione del tampone fosfato, potassio fosfato monobasico (KH_2PO_4) e sodio fosfato bibasico diidrato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$), sono Carlo Erba Reagenti (Rodano, Italia). In tutto lo studio è stata utilizzata acqua per LC prodotta col sistema Milli Q plus ultra Millipore (Milford, MA).

Per la curva di calibrazione e lo sviluppo del metodo, sono state preparate le soluzioni standard contenenti TBA e DET, ciascuna alle concentrazioni di 1250, 125 e 12,5 mg/L in metanolo. Dai composti puri deuterati, è stata preparata un'unica soluzione contenente TBA d-5 e DET d-9, alla concentrazione di 125 mg/L in metanolo (IS). Le soluzioni standard sono state conservate in vial di vetro, a -20°C al buio. Queste soluzioni sono state utilizzate per generare diluizioni di lavoro nelle urine, MeOH e/o MeOH+capelli, necessarie per lo sviluppo del metodo. Per la preparazione delle soluzioni di calibrazione e di lavoro è stato utilizzato un pool di urine di soggetti non fumatori e senza esposizione occupazionale ai pesticidi. I campioni di capelli utilizzati per lo sviluppo del metodo sono stati ottenuti sia da donatori sani senza esposizione professionale a pesticidi che da agricoltori che utilizzano TBA nei loro campi.

Per valutare la linearità del metodo, diverse quantità di soluzioni standard sono state addizionate ad 1 ml di urina o MeOH per ottenere sei soluzioni di calibrazione contenenti TBA e DET ognuno alle concentrazioni di 0,12, 0,25, 0,50, 2,5, 5, 12,5 mg/L. Un campione sia di urine che di MeOH non addizionato è stato utilizzato come bianco.

Per la messa a punto del metodo, la sua ottimizzazione e validazione, sono state inoltre preparate soluzioni contenenti TBA e DET alle concentrazioni 2, 10 mg/L (QC basso e alto).

Tutte le soluzioni di lavoro sopra indicate sono state addizionate con una quantità di soluzione IS tale da ottenere una concentrazione finale di TBA d-5 e DET d-9 di 2,5 mg/L.

2.3 Strumentazione

L'estrazione dalle urine è stata effettuata utilizzando cartucce Oasis SPE (30 mg, 1 ml) ottenute da Waters (Massachusetts, USA). Per l'evaporazione del campione è stato utilizzato evaporatore a secco con flusso di azoto (Instruments S.r.l.). L'estrazione dai capelli è stata effettuata mediante vasca ultrasuoni modello LB52 (Falc).

Per l'analisi in LC-MS/MS sono state utilizzate vials da 1,8 ml di vetro con tappi a vite

(Nazional Scientific, Milano, Italia). I campioni sono stati iniettati tramite auto campionatore CTC, PAL System (Thermo Scientific, Rodano, Italia) dotato di unità refrigerante, mantenendo i campioni a 20 °C. La separazione degli analiti è stata eseguita in cromatografia liquida (LC-Surveyor, Thermo Scientific, Rodano, Italia) con colonna Betasil C18 (150 mm di lunghezza, 2,1 mm di diametro interno e 5 micron di dimensione delle particelle, Thermo Scientific, Rodano, Italia). Il cromatografo è stato interfacciato con uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo dotato di una sorgente di ionizzazione elettrospray riscaldata (TSQ Quantum Access con H-ESI, Thermo Scientific, Rodano, Italia) e metal needle.

2.4. Analisi in LC-MS/MS

La separazione LC è stata effettuata mantenendo la colonna a temperatura ambiente in isocratica a 0,3 ml/min utilizzando come eluente una miscela di acido formico allo 0,5% in acqua Milli Q e MeOH (30:70).

La sorgente di ionizzazione H-ESI è stata utilizzata in modalità positiva con i seguenti parametri: spray voltage 4000 V, ion transfer tube 290° C, temperatura di vaporizzazione 250° C, pressione dello sheath gas 60 e del gas ausiliario 5 (entrambi i gas sono azoto e la scala del valore è arbitraria), tube lens offset 96 V e skimmer offset -14 V. Nella cella di collisione è stato utilizzato Argon come gas di collisione ad una pressione di 1,5 millitorr.

La quantificazione degli analiti è stata effettuata in selective reaction monitoring (SRM) seguendo le transizioni: m/z 230 \rightarrow 174 (energia di collisione 17 eV) per TBA, m/z 235 \rightarrow 179 (energia di collisione 18 eV) per TBA d-5, m/z 202 \rightarrow 146 (energia di collisione 15 eV) per DET e m/z 211 \rightarrow 147 (energia di collisione 18 eV) per il DET d-9. I tempi di ritenzione di TBA e DET sono rispettivamente 3,91 min e 3,24 min.

2.5. Preparazione dei campioni urinari

Prima dell'estrazione a 2 mL di ciascuna delle soluzioni di calibrazione, al bianco e ai campioni sconosciuti si aggiungono 20 μ l di soluzione IS ad ottenere una concentrazione finale di TBA d-5 e DET d-9 nelle urine di 2,5 mg/L. Prima di caricare 1 mL di campione, le cartucce SPE si condizionano con 1 ml di MeOH e poi con 1 ml di acqua Milli Q. Il campione caricato si lava con 1 mL di MeOH al 5% in acqua e successivamente gli analiti si estraggono con 1 ml di MeOH direttamente in un vial di vetro per auto campionatore. L'estratto si asciuga

con un leggero flusso di azoto a temperatura ambiente e ricostituisce a 100 μL con MeOH. I campioni si agitano su vortex e il MeOH si trasferisce in un inserto conico per vial, infine 10 μL di questa soluzione si iniettano nella porta di iniezione e analizzano in LC-MS/MS seguendo la procedura sopra descritta.

2.6. Preparazione del campione di capelli o pelo

Circa 50 mg di capelli o peli si lavano con 2,5 mL di acqua Milli Q in un vial di vetro agitando per alcuni secondi, poi l'acqua di lavaggio si rimuove e si conserva in un vial separato. Successivamente al campione si aggiungono 2,5 ml di MeOH ed si estrae per 5 ore, a 50°C in bagno ad ultrasuoni a 59 KHz. Ad aliquote da 0,5 mL sia della soluzione di lavaggio (SL) che dell'estratto (E) di ciascun campione, punto curva e QC, si aggiungono 10 μL di SI e si agita su vortex. 10 μL di campione così ottenuto si iniettano e analizzano in LC-MS/MS seguendo la procedura sopra descritta.

2.7. Sviluppo del metodo

Sono state eseguite diverse prove al fine di ottimizzare sia la parte analitica del metodo che le procedure di estrazione degli analiti di interesse nelle diverse matrici.

2.7.1 Analisi in MS/MS

I parametri dell'H-ESI, la selezione delle transizioni MS/MS e le energie di collisione sono state ottimizzate con infusione diretta di ogni standard ad una concentrazione di 5 mg/L, e sono state ottenute attraverso la combinazione di tuning manuali e automatici.

2.7.2. LC: scelta della fase mobile

Al fine di ottenere i migliori picchi cromatografici possibili e tempi di ritenzione ottimali sono state testate due diverse combinazioni di fase mobile sulla colonna cromatografica Betasil C18. Le fasi mobili utilizzate sono 30-70 o 20-80 di MeOH/acido formico allo 0,5% in acqua. Per ogni combinazione di fase mobile sono state analizzate due curve di calibrazione.

2.7.3. Stabilità di TBA e DET

E' stata valutata l'influenza del materiale utilizzato per lo stoccaggio delle soluzioni paragonando le risposte cromatografiche ottenute dopo aver conservato due soluzioni di TBA e DET (1mg/L e 10mg/L) in diversi contenitori (polipropilene e vetro) in diverse condizioni di temperatura (temperatura ambiente e -20°C).

2.7.4. Ottimizzazione del metodo

2.7.4.1. Urine: procedura di estrazione e recuperi

E' stato valutato l'utilizzo delle cartucce SPE per estrarre TBA, DET e i rispettivi standards deuterati dal campione urinario. In letteratura non sono riportati studi in cui si effettuano estrazioni di TBA dalla matrice urinaria, ma, al contrario, diversi sono gli studi sulla TBA e la sua presenza nelle acque superficiali e o sotterranee. Nei lavori riportati, per le estrazioni sono state utilizzate diversi tipi di cartucce SPE (Nogueira, 2004; Papadopoulos, 2007; Otto, 2007). Vista la frequenza di utilizzo delle Oasis HLB (Bossi, 2002; Gervais, 2008; Marin, 2009; Montoro, 2007) sono state effettuate prove di estrazione e ripetibilità seguendo la procedura standard proposta dal produttore. Sono stati preparati e analizzati campioni di urina e acqua con quantità note di TBA e DET a due livelli diversi nel range delle concentrazioni attese (0,5 e 5 mg/l, cinque volte nello stesso giorno). Recuperi e efficienza di estrazione sono stati calcolati come il rapporto percentuale fra il valore medio del segnale cromatografico dei campioni di urina estratta e il valore medio del segnale cromatografico di campioni di acqua non estratti.

2.7.4.2. Capelli: procedure di lavaggio ed estrazione

Dieci campioni di capelli di circa 50 mg di un soggetto esposto a TBA sono stati collocati in vials di vetro da 4 mL e utilizzati per l'ottimizzazione della procedura di lavaggio (2 campioni) e per quella di estrazione (8 campioni).

Per valutare l'eventuale perdita di TBA nel corso di un normale processo di lavaggio dei capelli, i campioni sono stati lavati con 2,5 mL di H₂O a 37° C in bagno ad ultrasuoni (59 KHz) per 10 minuti, ripetendo i lavaggi tre volte per ciascun campione. Aliquote di 0,5 mL di

ogni soluzione di risciacquo sono stati trasferiti in vials di vetro per analisi, addizionati di SI, iniettati e analizzati in LC-MS/MS seguendo la procedura sopra descritta.

Per la messa a punto della procedura di estrazione gli altri campioni sono stati sciacquati con 2,5 mL di H₂O agitando per alcuni secondi e l'acqua di ciascun lavaggio è stata rimossa e messa in vials separati. I campioni di capelli così ottenuti sono stati divisi in quattro gruppi di due campioni e utilizzati per testare quattro diversi supporti di estrazione: MeOH, acqua, HCl 0,1 M e TMAH 0,5% v/v in acqua. In ogni caso i capelli sono stati addizionati con 2,5 mL di mezzo di estrazione e sonicati per 5 ore, a 59 KHz, a 50° C. Gli estratti di MeOH e acqua sono stati direttamente sottoposti ad analisi. Prima dell'analisi l'HCl di estrazione è stato neutralizzato con 0,5 mL di NaOH 1M e 0,5 mL di tampone fosfato 0,1 M, pH 6. La soluzione di TMAH ha completamente sciolto i capelli generando una soluzione marrone torbido che è stata neutralizzata con HCl 1 M e tampone fosfato 0,1 M pH 6, filtrata (0,45 micron cellulosa rigenerata filtro), e 1 mL di soluzione limpida ottenuta per filtrazione è stato trattato con SPE seguendo la procedura sopra descritta per l'estrazione dei campioni urinari.

Ogni esperimento è stato eseguito in duplicato. Tutte le soluzioni di lavaggio ed estratti sono stati addizionati di SI e analizzati per la determinazione del TBA e DET per LC-MS/MS col metodo precedentemente descritto.

2.7.5. Validazione del metodo

2.7.5.1. Curve di calibrazione, limite di detezione, precisione e accuratezza e controllo di qualità

Per la costruzione delle curve di taratura sono state preparate le soluzioni di TBA e DET nel range di concentrazioni attese come descritto nel paragrafo 2.2. Per interpolare le coppie di dati ottenuti da ciascuna soluzione di taratura è stata utilizzata l'analisi di regressione lineare dei minimi quadrati, dove y è il rapporto tra l'area del picco cromatografico di ciascun analita e l'area del picco cromatografico del corrispondente analita deuterato sottratto dal rapporto analogo del campione bianco, e x è la concentrazione (mg/L) di ciascun analita. Per lo sviluppo del metodo sono state analizzate tre repliche di ogni livello della curva di calibrazione. Il limite di detezione (LOD) per TBA e DET sono stati calcolati secondo l'espressione:

$$\text{LOD} = (3SE_q + q)/m$$

dove SE_q è l'errore standard della intercetta q e m la pendenza della curva.

La precisione intra- e inter-day e l'accuratezza sono stati determinati analizzando le soluzioni QC basso e alto, cinque volte nello stesso giorno e in tre giorni diversi nel corso di un periodo di 6 mesi. La precisione è stata espressa come coefficiente di variazione (CV%), l'accuratezza è stata calcolata come la percentuale del rapporto tra la concentrazione della soluzione calcolata dalla curva di calibrazione e il valore teorico di concentrazione.

I QC sono stati utilizzati anche come controllo di qualità all'interno delle sequenze di analisi, infatti per testare la stabilità del processo di analisi sono stati utilizzati i CV% calcolati con i dati dei campioni QC analizzati nella stessa corsa. Una tipica sequenza di analisi di un set di campioni sconosciuti è accompagnata da due curve di calibrazione eseguite all'inizio e alla fine della sequenza, un campione sconosciuto in doppio ogni dieci campioni, due campioni QC (basso e alto) ogni dieci campioni sconosciuti.

2.7.5.2. Effetto matrice

Un aspetto importante da valutare nello sviluppo di un metodo in LC-MS/MS è la possibilità che si verifichi un effetto matrice. L'effetto matrice è definito come una variazione diretta o indiretta nella risposta dell'analita, dovuta all'effetto combinato di tutte le componenti dei diversi campioni biologici e/o alla presenza accidentale nel campione degli analiti di interesse o di altre sostanze interferenti [IUPAC].

L'applicabilità del metodo alle diverse matrici è un aspetto molto importante nelle analisi biologiche così, in questo studio, l'effetto matrice è stato valutato in diversi modi. In primo luogo, l'effetto matrice assoluto ($Matrix_{abs}\%$) è stato determinato confrontando il segnale cromatografico ottenuto analizzando quattro differenti campioni di urina (2 maschi e 2 femmine) e tre diversi campioni di capelli (3 femmine) addizionati con due quantità note di TBA e DET (QC basso -QC alto, tre replicati per ogni livello), rispettivamente con il segnale cromatografico ottenuto dall'analisi di campioni di acqua (processate con cartucce Oasis HLB) e MeOH, addizionate con le stesse quantità di TBA e DET (tre repliche per ogni livello). L'effetto matrice è stato calcolato con la formula:

$$Matrix_{abs}\% = (Area_{QC(urine)} / Area_{QC(acqua)}) * 100$$

In secondo luogo, è stato valutato l'effetto matrice relativo in due modi: con i valori di precisione (CV%) ottenuti dall'analisi dei livelli di QC nelle diverse matrici, e dal valore di precisione (CV%) delle pendenze di quattro curve di calibrazione ottenute da urine di quattro

differenti soggetti, e da tre curve di calibrazione ottenute da campioni di capelli di tre diversi soggetti. Infine, è stata calcolata la percentuale di variazione delle pendenze (% R_{slope}) secondo la formula:

$$R_{slope}\% = [(Max_{slope} - Min_{slope}) / Min_{slope}] * 100$$

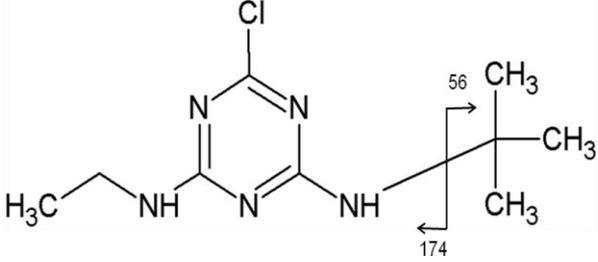
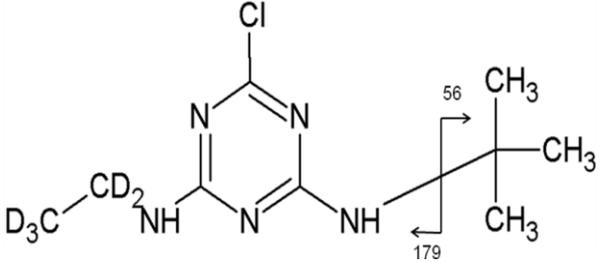
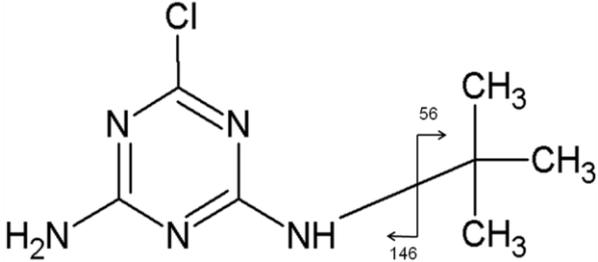
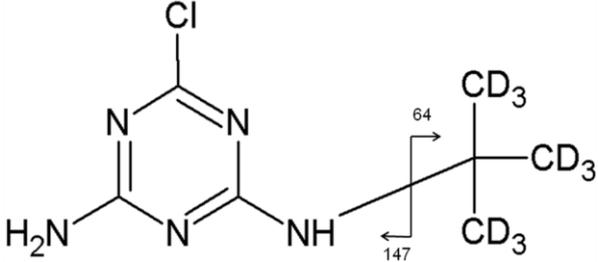
2.7.6. Risultati e discussione

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di sviluppare un metodo LC-MS/MS per l'analisi di TBA e DET in campioni di urina e capelli al fine di valutare l'esposizione a TBA sia a breve termine che cumulativa. Per estrarre gli analiti d'interesse dall'urina e dalla matrice capello sono stati sviluppati rispettivamente una procedura estrattiva SPE e una estrazione diretta con metanolo.

2.7.6.1. Analisi MS/MS

L'infusione diretta di TBA e DET è stata effettuata utilizzando la sorgente H-ESI in modalità di ionizzazione positiva. L'acquisizione degli spettri di massa delle molecole figlie in full scan è stata effettuata mantenendo il Q1 bloccato sul valore m/z corrispondente alle molecole d'interesse protonate. Spray voltage, temperatura dell'ion transfer tube, temperatura di vaporizzazione, pressione dello sheat e auxigliry gas, tube lens e skimmer offset, sono stati ottimizzati al fine di ottenere il segnale più abbondante possibile dello ione precursore da mandare in MS/MS; i parametri ottimali del tuning per TBA e DET sono riassunti nel paragrafo "analisi LC-MS/MS" della sezione sperimentale. Per la quantificazione sono state selezionate le energie di collisione scegliendo le transizioni più abbondanti e specifiche, e per entrambe le molecole è stata selezionata la perdita del gruppo terbutilico seguendo per la TBA (TBA e d-5) la transizione m/z 230 → 174 (e m/z 235 → 179) e per la DET (DET e d-9) la transizione m/z 202 → 146 (e m/z 211 → 147) (Tabella 2.1.). I tempi di ritenzione di TBA e DET sono rispettivamente 4.04±0.01 min e 2.33±0.01.

Tabella 2.1. Struttura delle molecole, transizioni acquisite in *selected reaction monitoring*, e energie di collisione utilizzate per acquisizione e quantificazione di TBA e DET.

Struttura molecolare	Transizioni in <i>selected reaction monitoring</i> , e energie di collisione
 <p style="text-align: center;">Terbutilazina</p>	<p style="text-align: center;">m/z 230 → 174 17 eV</p>
 <p style="text-align: center;">Terbutilazina -d5</p>	<p style="text-align: center;">m/z 235 → 179 18 eV</p>
 <p style="text-align: center;">Desetil-terbutilazina</p>	<p style="text-align: center;">m/z 202 → 146 15 eV</p>
 <p style="text-align: center;">Desetil-terbutilazina -d9</p>	<p style="text-align: center;">m/z 211 → 147 18 eV</p>

2.7.6.2. LC: scelta della fase mobile

L'acido formico è stato aggiunto alla fase mobile al fine di stabilizzare la formazione delle specie anioniche. La combinazione 30/70 di MeOH/acido formico 0,5% in acqua è stata scelta come fase mobile perché con questa combinazione abbiamo ottenuto la miglior risoluzione dei picchi in tutti i livelli delle curve di calibrazione con un'ottima stabilità dei tempi di ritenzione la cui deviazione standard relativa è risultata inferiore al 0,3%. I cromatogrammi delle molecole di interesse sono mostrati in Figura 2.1. e 2.2..

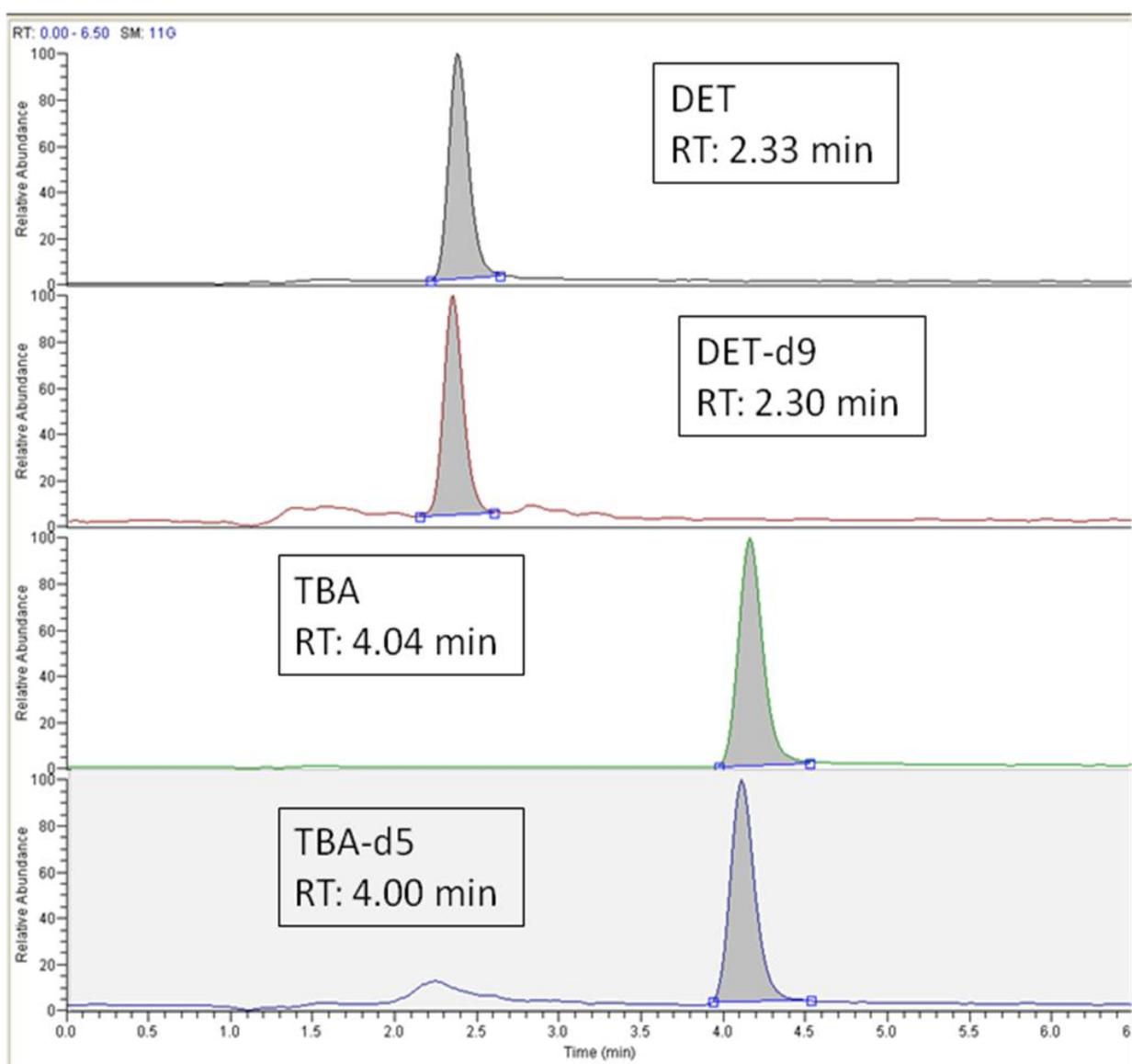


Figura 2.1. Cromatogramma del punto curva 5 μ g/L di TBA e DET in urina

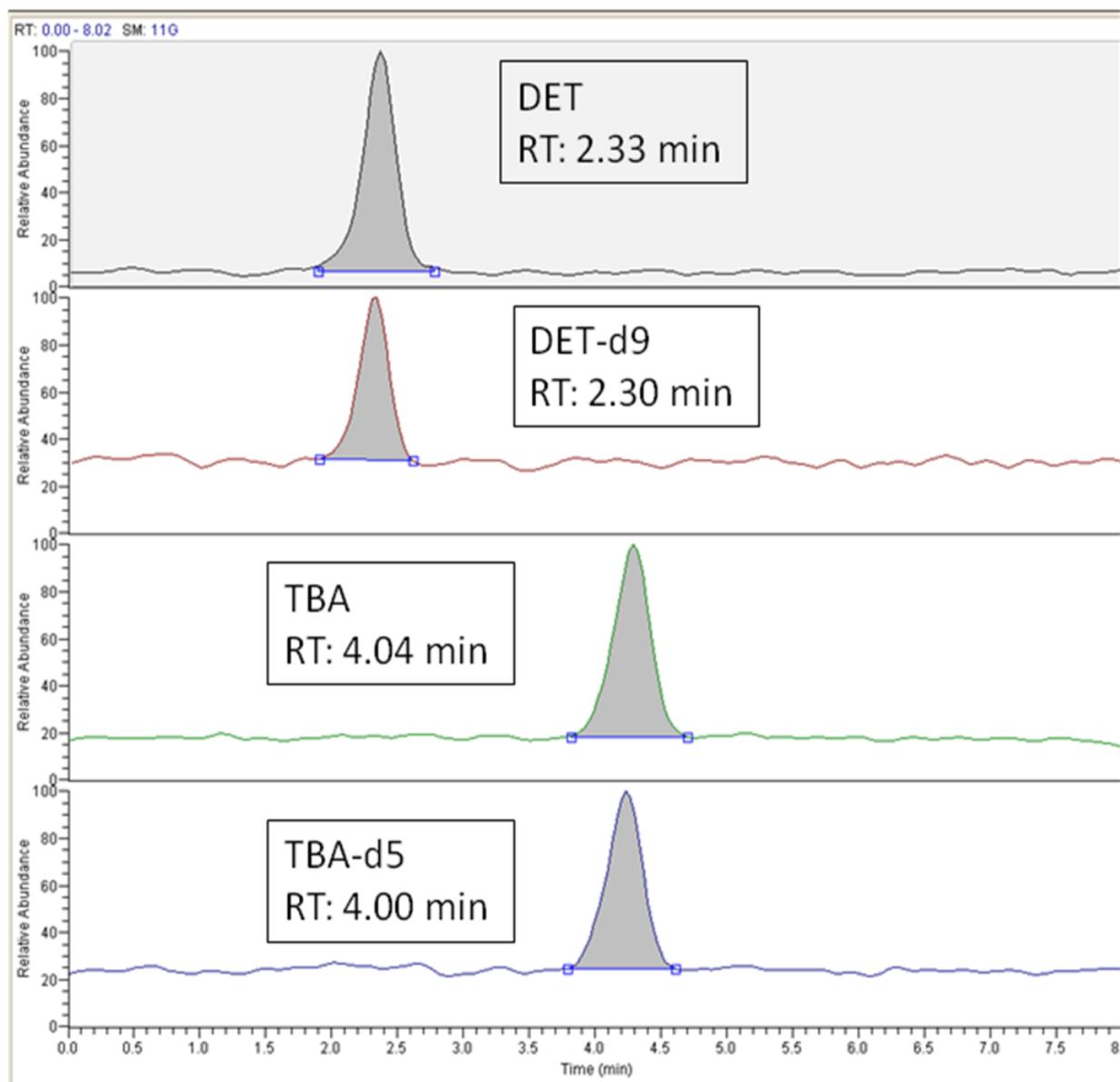


Figura 2.2. Cromatogramma del punto curva 0.2 ng/mg capello di TBA e DET in metanolo

2.7.6.3. Stabilità di TBA e DET

Nell'ottimizzazione del metodo, per lo stoccaggio delle soluzioni abbiamo valutato la possibilità di usare due diversi tipi di vials: polietilene o vetro. Al fine di valutare l'eventuale perdita di analiti a causa della aderenza degli stessi alle pareti del contenitore di stoccaggio, sono state così confrontate le aree cromatografiche ottenute analizzando le soluzioni contenenti gli analiti di interesse in MeOH tenuti per una notte a temperatura ambiente o a -20° C, sia in flaconcini di vetro che di polietilene. Come mostrato in Figura 2.3., ne è risultato

che, pur non essendoci grosse variazioni nelle risposte rispetto al contenitore di stoccaggio, sia preferibile utilizzare contenitori in vetro e conservare le soluzioni a -20° C.

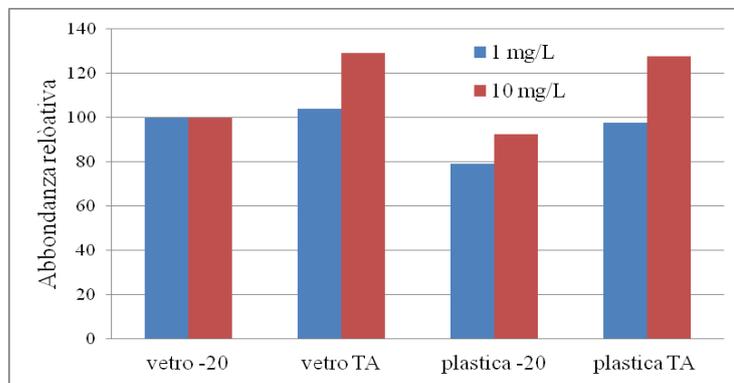


Figura 2.3. Abbondanze relative delle soluzioni di TBA stoccate in contenitori di polietilene e vetro in diverse condizioni di temperatura.

2.7.6.4. Ottimizzazione del metodo di estrazione e recuperi

Campioni urinari

I risultati dei recuperi ottenuti utilizzando le cartucce Oasis HLB sono riportati in tabella 2.2.. La percentuale di recupero per TBA, TBA d-5, DET e DET d-9 variano tra il 56% e l'89%. Entrambi gli analiti hanno recuperi simili a quelli dei corrispondenti standard, ma i recuperi di DET e DET d-9 sono inferiori a quelli di TBA e TBA d-5. Per minimizzare questo problema ogni campione reale è stato addizionato con gli standard interni e le curve di calibrazione sono state preparate in matrice e processate nello stesso modo dei campioni reali.

Tabella 2.2. Recuperi di TBA e DET e dei loro rispettivi standards interni deuterati ottenuti utilizzando urine addizionate e processate in SPE utilizzando le cartucce Oasis HLB.

	Concentrazioni µg/L	Recuperi (CV%)
TBA	0.5	89 (3.0)
	5	79 (9.7)
TBA d-5	2.5	84 (8.4)
DET	0.5	62 (13.5)
	5	56 (3.7)
DET d-9	2.5	60 (13.2)

Matrice capello

Nello sviluppo del metodo sono state testate diverse condizioni al fine di ottenere una buona efficienza di estrazione dalla matrice capello. Per effettuare le prove di estrazione sono stati utilizzati campioni reali positivi ottenuti da soggetti esposti a TBA anzichè con capelli addizionati poiché, come precedentemente descritto (Mussohff, 2007; Dominguez-Romero, 2011), l'utilizzo di capelli addizionati può essere fuorviante data la diversa natura dei legami chimici tra i campioni reali, che si sono arricchiti di sostanze esogene attraverso l'assorbimento dal ciclo sanguigno e/o dalle secrezioni sebacee o sudoripare durante la crescita del capello, e i capelli addizionati in cui si presenta una semplice deposizione esterna. Pur avendo verificato la presenza di TBA nei campioni di capelli utilizzati, non è possibile conoscere il reale contenuto e perciò il recupero può essere calcolato solo come recupero relativo paragonando le diverse efficienze di estrazione dei diversi mezzi indagati. In figura 2.4. sono illustrati i risultati del test effettuato, dalla comparazione dei recuperi relativi ottenuti con i diversi media di estrazione indagati derivano la scelta del metanolo come solvente di estrazione e le condizioni finali precedentemente descritte.

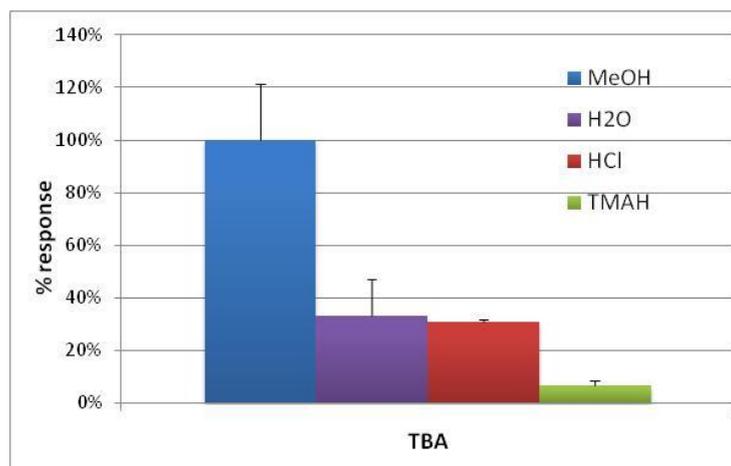


Figura 2.4. Risposta cromatografica della TBA effettuando la procedura di estrazione dalla matrice capello in MeOH, acqua, HCl 0.1M e TMAH.

2.7.6.5. Curve di calibrazione, limite di deteazione, precisione e accuratezza e controllo di qualità

I dati sulle curve di calibrazione, limite di deteazione, precisione e accuratezza sono riassunti nella tabella 2.3.. Il metodo è risultato lineare per TBA e DET nei rispettivi range indagati, con coefficienti di correlazione lineare (r^2) superiori a 0.993. I limiti di quantificazione per entrambi gli analiti sono 0,25 mg/L nelle urine e 0,01 μ g/mg di capelli nei capelli. Le caratteristiche analitiche di precisione e accuratezza inter-e intra-run sono molto buone per entrambi gli analiti in entrambe le matrici e soddisfano i requisiti della US FDA per la validazione di metodi analitici per campioni biologici, complessivamente le CV% sono <11% e le accuratezze vicino al 100% della concentrazioni addizionate. Le performance del metodo sono risultate stabili oltre un periodo di sei mesi.

Tabella 2.3. Curve di calibrazione, limiti di quantificazione (LOQ), precisione e accuratezza del metodo analitico per la determinazione di TBA e DET nelle urine e nei capelli

Analiti	Curve di calibrazione			QC precision e accuratezza								
	Ranges indagati	CV% _{slope} ^a	LOD	Conc.ni	Giorno 1 N=5		Giorno 2 N=5		Giorno 3 N=5		Complessiva N=15	
					CV% ^b	%Theoretical ^c	CV% ^b	%Theoretical ^c	CV% ^b	%Theoretical ^c	CV% ^d	%Theoretical ^c
TBA urine (µg/L)	0.25- 12.5	4.7	0.25	2	2.0	98	1.3	101	0.6	117	6.8	103
				10	2.1	100	1.0	99	1.9	105	2.6	100
DET urine (µg/L)	0.25- 12.5	4.2	0.25	2	0.7	104	2.4	103	3.8	112	3.9	105
				10	1.0	102	0.2	102	0.9	104	1.2	102
TBA capelli (ng/mg capelli)	0.013- 5.0	4.4	0.01	0.1	5.1	103	2.7	101	1.1	99	3.9	101
				0.5	2.1	107	3.4	100	1.0	100	3.5	102
DET capelli(ng /mg capelli)	0.013- 5.0	4.3	0.01	0.1	1.3	102	1.2	106	2.1	101	5.6	103
				0.5	1.3	107	5.6	105	0.4	101	3.7	103

2.7.6.6. Effetto matrice

I risultati ottenuti nella valutazione dell'effetto matrice sono riportati in tabella 2.4.. L'effetto matrice assoluto, che rappresenta la differenza nella risposta cromatografica post estrazione degli standard presenti nella matrice rispetto a quella degli standard in acqua, vi è un leggero effetto matrice sia per TBA e DET nei capelli che per la TBA nelle urine, con un valore di circa il 103% ($\pm 3,8\%$), valore che comunque cade all'interno del range osservato nella valutazione della precisione del metodo. La DET nelle urine, come ci si poteva aspettare, ha un effetto matrice assoluto più alto con un valore del 76%. Infatti, la matrice urina è più complessa del MeOH addizionato di capelli, inoltre DET è più polare di TBA, e così anche il tempo di ritenzione è più vicino al fronte del solvente. Tuttavia questo valore è accettabile e l'uso di IS riduce l'influenza dell'effetto matrice. Come si può notare infatti, l'effetto matrice relativo calcolato sui QC, che rappresenta la variabilità del metodo combinato all'effetto delle diverse matrici, è $<4\%$ (Matuszewsky, 2006) per tutti gli analiti in entrambe le matrici, il che significa che la matrice non esercita un significativo effetto sul metodo. Inoltre, l'effetto matrice relativo è stato anche calcolato come variazione sulle pendenze delle rette ottenute utilizzando campioni di urina e di capelli di diversi soggetti e anche in questo caso tutti i valori sono risultati inferiori al 4%, il che conferma l'assenza di effetto matrice.

Tabella 2.4. Effetto matrice assoluto, effetto matrice relativo sui campioni QC, effetto matrice relativo calcolato sulle curve di calibrazione e percentuale di variazione delle pendenze delle curve di calibrazione.

	Livelli	Effetto matrice assoluto (Matrix _{abs} %)	Effetto matrice relativo QC (CV%)	Effetto matrice relativo sulle curve (CV%)	% range slope (%R _{slope})
TBA urine (µg/L)	2	105	2.3	0.1	0.3
	10	100	0.5		
DET urine (µg/L)	2	76	1.7	0.4	0.8
	10	76	0.6		
TBA capelli (ng/mg capelli)	0.1	100	1.1	2.0	3.7
	0.5	108	0.6		
DET capelli (ng/mg capelli)	0.1	106	3.7	1.2	2.3
	0.5	99	1.4		

2.8. Valutazioni conclusive sul metodo analitico sviluppato

In questo lavoro di tesi è stato sviluppato un metodo per la determinazione di TBA e del suo metabolita DET, nella matrice urina e nei capelli, che prevede l'estrazione dai campioni rispettivamente via SPE e diretta con MeOH, e l'analisi in cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa con triplo quadrupolo (LC-MS/MS) con sorgente di ionizzazione riscaldata (H-ESI). Nello sviluppo del metodo è stata scelta l'utilizzo dell'LC-MS/MS al fine di ottenere un metodo quanto più possibile specifico e sensibile. Infatti, tale tecnologia permette un'identificazione certa delle molecole d'interesse mediante l'acquisizione degli ioni "figli" che, con l'applicazione di una data energia di collisione, vengono generati da una data molecola "parent". In più la quantificazione attraverso l'acquisizione dei soli frammenti figli più abbondanti e meno interferiti permette il raggiungimento di ottimi limiti di rilevabilità. Allo scopo di ottenere una buona precisione della metodica è stato inserito l'utilizzo degli standard interni deuterati (TBA d-5 e DET d-9) la cui aggiunta ai campioni permette la

correzione di eventuali errori prodotti nelle fasi di estrazione e analisi.

Concludendo, l'efficienza dei metodi estrattivi e gli ottimi risultati ottenuti nella valutazione della linearità, accuratezza, precisione e il contenuto effetto matrice, consentono di affermare che il metodo analitico sviluppato nella presente ricerca è risultata adatta alla quantificazione di TBA e DET sia nelle urine che nei capelli.

3. Valutazione dell'esposizione a TBA

3.1. Valutazione della effettiva incorporazione della TBA nei capelli

Prima di procedere alla analisi di campioni reali di soggetti esposti a TBA è stata valutata la effettiva incorporazione dell'erbicida nei capelli come conseguenza della esposizione. A tal proposito è stata verificata la presenza di TBA nei peli di un gruppo di ratti che sono stati sottoposti ad un protocollo di somministrazione di TBA per via orale. Questo esperimento è stato effettuato in collaborazione col dipartimento di Biologia dell'Università degli Studi di Milano.

3.1.1. Studio effettuato sui ratti

Per l'esperimento sono stati utilizzati cinque ratti Sprague Dawley maschi (CRL: CD Charles River Laboratories, Calco, Italia), di circa 7-8 settimane di età (Figura 3.1.). Prima di iniziare il trattamento, è stato ottenuto tramite rasatura un campione di peli pre-trattamento (T_r0) dalla regione dorsale (circa 10 cm^2 di superficie), precisamente tra le scapole dell'animale. Questo campione è stato utilizzato come controllo negativo. Gli animali sono stati tenuti in gabbie singole con cicli di 12h buio/luce e sono stati nutriti con cibo in pallet (Italiana Mangimi) *ad libitum*. Agli animali è stata somministrata la TBA disciolta in etanolo (5mg/kg di peso corporeo) mediante sonda gastrica, una volta al giorno per tre giorni, per un totale di 2,25 mg/ratto di TBA somministrata. La dose somministrata è stata scelta come un ragionevole compromesso tra un livello a bassa tossicità [nessun livello di effetti osservabili (NOEL): 2,1 mg/kg di peso corporeo al giorno; WHO, 1998] e una quantità tale da poter osservare un assorbimento significativo nei peli del ratto. Il quarto giorno, quando la ricrescita dei peli era apparentemente quasi completa, ma la zona precedentemente depilata risultava ancora visibile, i ratti sono stati sacrificati e sono stati raccolti campioni di peli post-trattamento sia dalla zona precedentemente rasata (T_r1) che da una zona prossimale dorsale non precedentemente rasata (T_r2). Per ogni campione di pelo sono stati registrati il peso e la zona depilata. I campioni così ottenuti sono stati estratti e analizzati con il metodo descritto nel capitolo precedente.

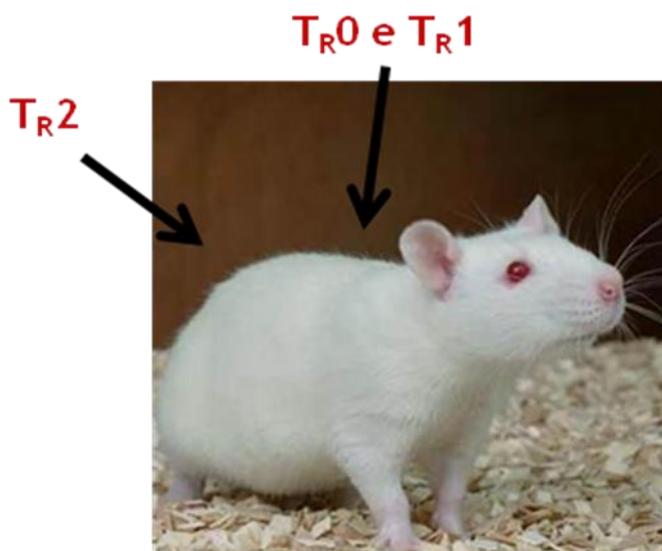


Figura 3.1. Esemplare di Sprague Dawley utilizzato nello studio.

3.1.2. Risultati

Come mostrano i risultati contenuti in tabella 3.1., la DET non è mai stata quantificata nei campioni di ratto analizzati. La TBA è stata quantificata in entrambe le frazioni SL ed E, in entrambi i campioni T_r1 e T_r2 ma non nei campioni pre-trattamento T_r0. Data la somiglianza dei valori di T_r1 e T_r2, questi dati sono stati raggruppati ed è stato stimato un contenuto medio di TBA pari a 0,92 (± 0,27) ng/mg di pelo nei campioni post-trattamento. Sulla base del peso medio di ciascun campione di peli e l'area corrispondente rasata, è stata stimata una densità di circa 10 mg di peli per cm² di superficie. Calcolando, secondo la seguente formula (Diack, 1930):

$$(7,47 * \text{peso del corpo})^{0,66}$$

una superficie complessiva media del ratto di circa 200 cm², è stato stimato che in totale un ratto possiede circa 2000 mg capelli. Considerando il livello medio TBA nei campioni, è stato calcolato che, nei capelli dell'intero ratto, ci sarebbero circa 1843 (± 533) ng di TBA, che corrispondono ad un tasso di incorporazione di circa 0,12% (± 0,036%).

3.1.3. Discussione

E' stata eseguita una somministrazione orale TBA ai ratti per indagare l'incorporazione della stessa e del suo metabolita DET nei capelli in condizioni controllate.

La somministrazione orale di TBA nei ratti hanno mostrato che questo erbicida è in grado di essere incorporato nella matrice di cheratina, mentre DET non lo è. Questo comportamento è simile a quello che si osserva per le droghe d'abuso, per le quali i composti tal quali nei capelli (es. la cocaina) vengono utilizzati come marcatori di consumo di droga, mentre i loro metaboliti (es. benzoilecgonina), vengono rilevati a concentrazioni di 1-2 ordini di grandezza inferiore (Nakahara, 1995). Questo è congruente con il meccanismo di diffusione passiva per cui le molecole piccole e lipofile riescono ad essere incorporate nel capello durante il processo di cheratinizzazione, e le specie più idrofile polari vengono maggiormente escrete nelle urine.

L'aver trovato TBA nei peli del ratto suggerisce che vi sia stato un reale assorbimento di TBA nei peli, ma alcuni aspetti dei nostri risultati ci sono sembrati controversi. Le perplessità si riferiscono innanzitutto alla grande quantità di TBA (circa un terzo del totale) rilevata nella soluzione di risciacquo e, successivamente, alla presenza di TBA in quantità simili nel solvente di estrazione in entrambe le aree pre-rasata (T_{r1}) e non pre-rasata (T_{r2}). Il primo dato indica la presenza di TBA legata debolmente ai peli, suggerendo che parte della TBA non è stata incorporata nelle cellule e/o nel fusto del pelo, ma è stata semplicemente depositata sulla superficie, forse per contaminazione per mezzo di fluidi orali e/o di urine. Allo stesso modo la presenza di livelli simili di TBA in entrambe le aree pre-rasata (T_{r1}) e non pre-rasata (T_{r2}) può in parte riflettere la concomitante presenza nell'animale di diverse fasi di crescita del pelo. Anche se non abbiamo abbastanza informazioni sulle modalità di crescita di peli dei ratti, è stato ampiamente descritto nel capitolo introduttivo che, sulla testa di un soggetto sano, l'80-90% di capelli è in fase di crescita attiva, o meglio in fase anagen, circa il 2% è nella fase di transizione, o fase catagen, e 10-18% è nella fase di riposo, o fase telogen, in cui la crescita si è fermata completamente (Boumba, 2006). In realtà, dato che la maggior parte dei peli contenuti nel campione T_{r2} corrispondono a peli che sono cresciuti prima dei tre giorni di trattamento, la concentrazione di TBA contenuta dovrebbe essere significativamente inferiore a quella contenuta nei campioni T_{r1} che sono cresciuti tutti durante il trattamento. Anche in questo caso la contaminazione esterna potrebbe avere un ruolo significativo nello spiegare i risultati. Tuttavia, anche se non si può escludere, ci sembra difficile che ci possa essere stata una contaminazione per contatto con i fluidi biologici sia per via orale che attraverso le urine, in quanto, anche se è noto che i ratti sono soliti leccare il proprio e l'altrui pelo, sono stati tenuti in gabbie separate per evitare che potessero leccarsi a vicenda; inoltre, anche l'auto-contaminazione non spiega i nostri risultati in quanto il campione è stato prelevato in una zona, la parte di schiena tra le scapole, molto difficile da leccare. Infine il contatto dei peli con l'urina avrebbe evidenziato la presenza del metabolita urinario DET, la cui presenza è stata

valutata ma non rilevata.

Un'altra possibilità è che i diversi meccanismi che favoriscono l'incorporazione delle sostanze nei capelli possono avere reciprocamente consentito la presenza di TBA nei peli: si ricorda che oltre all'incorporazione nelle cellule del capello per diffusione passiva dal sistema di capillari presenti vicino al follicolo e per deposizione nel fusto dello stesso negli strati profondi della pelle tramite le secrezioni di sebo e/o sudore prima che il pelo sia emerso dalla cute (Prasgt, 2006), è stata descritta anche la migrazione di sostanze chimiche attraverso i capelli a causa di forze capillari nella regione non cheratinica (Skopp, 1996) che sono perciò legate più debolmente alla matrice e che potrebbero essere rimosse semplicemente durante il lavaggio del campione.

In questo studio, il livello di TBA misurata nei peli di ratto è risultata paragonabile ai risultati ottenuti in un altro studio, 0,24-0,53 ng di diazinone per mg di peli, in cui il prodotto fitosanitario è stato somministrato ai ratti per via orale a dosi di 6 e 3 mg/kg di peso corporeo al giorno per 1,5 mesi (Tutudaki, 2005). Nei due studi la dose giornaliera somministrata è simile ma per il periodo di somministrazione differente, minore in quello qui presentato, e perciò differente la dose totale somministrata, considerando questi aspetti si può ipotizzare che la TBA ha una maggiore affinità per la matrice capello rispetto al diazinone, tale affinità può essere attribuita alla maggiore lipofilità e limitata solubilità in acqua della TBA (log P ottanolo/acqua; 3,21; solubilità in acqua: 8,5 mg/L; ChemIDplus, 2011) rispetto al diazinone (log P ottanolo/acqua : 3,81; solubilità in acqua: 40 mg/L). D'altra parte i diversi risultati ottenuti nei due studi possono essere spiegati anche considerando le differenti procedure di lavaggio ed estrazione applicate alla matrice capello.

Infine, un'altra osservazione peculiare del nostro esperimento è stato l'inaspettata repentina crescita del pelo del ratto. Il protocollo di somministrazione iniziale prevedeva la somministrazione di TBA per due settimane ma, dopo soli tre giorni, il pelo nell'area pre-rasata è quasi completamente ricresciuta, per cui si è resa necessaria la sospensione della somministrazione e la raccolta dei campioni post-esposizione molto prima del tempo preventivato. Tale elevato tasso di crescita del pelo potrebbe essere attribuito alla giovane età degli animali trattati (7-8 settimane), ma risultano necessarie ulteriori indagini per confermarlo.

Tabella 3.1. Percentuale di campioni quantificabili e livelli di TBA nei peli dei ratti.

		Peli pre-trattamento T _{r0}		Peli pre-rasati e post-trattamento T _{r1}			Non-shaved post treatment hair T _{r2}			Mean T _{r1} +T _{r2}
		Soluzione di lavaggio	Estratto	Soluzione di lavaggio	Estratto	Somma	Soluzione di lavaggio	Estratto	Somma	Soluzione di lavaggio + estratto
TBA (ng/mg peli)	% campioni \geq LOQ	0	0	100	100	100	100	100	100	100
	Media (\pm SD)	<0.01	<0.01	0.36 (\pm 0.04)	0.66 (\pm 0.25)	1.02 (\pm 0.29)	0.30 (\pm 0.06)	0.53 (\pm 0.19)	0.83 (\pm 0.24)	0.92 (\pm 0.27)
	Mediana	<0.01	<0.01	0.36	0.67	1.03	0.31	0.57	0.88	0.91
	Minimo- massimo	na	na	0.32-0.40	0.37-0.92	0.70-1.31	0.22-0.35	0.29-0.69	0.50-1.05	0.50-1.31
DET (ng/mg capelli)	% campioni \geq LOQ	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Media (\pm SD)	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
	Mediana	na	na	na	na	na	na	na	na	na

na= non applicabile

3.2. Strategia di indagine sul campo e casistica di soggetti indagati

La ricerca della casistica di soggetti a cui applicare la metodica analitica sviluppata per la determinazione di TBA e DET nelle urine e nei capelli, è stata effettuata in due direzioni: nell'ambito di un progetto della Regione Lombardia e tramite conoscenze personali.

Nel primo caso l'oggetto dello studio era la misurazione dell'esposizione ad antiparassitari dei lavoratori addetti alla coltivazione di mais e riso in Lombardia, con l'obiettivo di definire il livello di concordanza tra l'allocatione in classe di rischio ottenuta utilizzando il profilo e quella ottenuta attraverso la misura dei livelli di esposizione (dose interna e dose esterna).

Nel secondo caso è stato direttamente contattato un gruppo di agricoltori della provincia di Cremona, Lombardia, coltivatori principalmente di mais che applicano TBA nei trattamenti pre- e post-emergenza delle colture. A questi soggetti è stato proposto uno studio mirato alla valutazione della dose di TBA assorbita attraverso la quantificazione, in un campione di capelli e nelle urine, degli antiparassitari utilizzati durante la stagione.

Oltre al gruppo degli agricoltori (lavoratori agricoli; LA) sono state individuate altre due casistiche di soggetti, residenti rurali e residenti urbani. Il primo gruppo è costituito da abitanti dello stesso paese degli agricoltori cremonesi le cui abitazioni sono circondate da coltivazioni di mais (residenti rurali; RR), ma senza legami familiari con gli LA; il secondo, gruppo di controllo, è costituito da soggetti che vivono e lavorano nell'area urbana di Milano (residenti urbani; UR), il capoluogo lombardo, che si trova a 40 km dalle zone rurali.

Sono state programmate due campagne di raccolta campioni, la prima nel 2009, campagna pilota, in cui sono state acquisite una serie di informazioni utili alla programmazione della seconda, campagna di indagine, eseguita nella stagione di trattamenti 2010. Nel 2009 sono state effettuate le visite nelle aziende volte al coinvolgimento dei lavoratori illustrando agli stessi gli obiettivi del progetto e informandoli sulla entità della richiesta dei campioni e le modalità di campionamento.

Durante le visite, inoltre, gli agricoltori sono stati seguiti per l'intera giornata di lavoro in tutti gli spostamenti e in tutte le fasi del trattamento: miscelazione, carico, applicazione del prodotto ed eventuali manutenzioni delle attrezzature. Nella figura 3.2. è mostrato un agricoltore che controlla gli ugelli del sistema a barre per l'applicazione della TBA, osservato durante un sopralluogo effettuato in una cascina nel maggio 2009. Tale lavoro è servito innanzitutto ad identificare tutte le fasi in cui il lavoratore può venire a contatto con la TBA e, in secondo luogo, è stato utile per raccogliere informazioni che riguardavano l'applicazione. In particolare: numero e tempi di applicazione per unità di superficie, modalità di applicazione,

quantità di formulato utilizzato durante l'applicazione, e valutare l'utilizzo dei dispositivi di protezione individuale (DPI) quali mascherina, guanti e tuta di lavoro. Infine le visite nelle aziende agricole oggetto di studio sono servite ad avere un'immagine d'insieme su tutte le fasi in cui sono coinvolti i lavoratori che operano sul campo e ad ottimizzare la stesura del questionario da sottoporre agli stessi al fine di raccogliere più informazioni possibili per una completa interpretazione dei risultati. Inoltre sono stati raccolti campioni di urina e di capelli indispensabili per la validazione dei metodi analitici messi a punto.



Figura 3.2. Agricoltore che controlla gli ugelli del sistema a barre per l'applicazione della TBA.

Nella campagna d'indagine 2010 è stata effettuata la raccolta completa dei campioni sia urinari che cheratinici accompagnata dalla compilazione dei questionari e dei diari di trattamento.

3.3. Modalità di raccolta dei campioni (urina e capelli) e compilazione dei questionari

Tutti i soggetti indagati sono stati informati dello scopo dello studio (Allegato 1a e 1b) e hanno firmato il loro consenso informato (Allegato 2).

I soggetti hanno raccolto autonomamente i campioni urinari richiesti per lo studio in opportuni contenitori precedentemente forniti, compilando contestualmente un foglio di campionamento dove sono state richieste informazioni riguardanti la data e l'ora della raccolta. I soggetti hanno conservato i campioni così raccolti in frigorifero fino al momento del trasferimento in laboratorio, avvenuto il giorno successivo alla raccolta trasportando i campioni in un frigorifero da viaggio, dove sono stati conservati a -20°C fino al momento dell'analisi.

Al contrario, i campioni di capelli sono stati prelevati da un operatore selezionando una ciocca dalla zona occipitale, tagliando il più vicino possibile alla radice (Figura 3.2.). Un tipico esempio di prelievo pesava 100 mg, ed era di 5 cm di lunghezza (da 2 a 10 cm). La ciocca prelevata è stata attaccata con nastro adesivo di carta su un foglio di campionamento (Allegato 3) dove era indicata la direzione del capello (radice-punta), ed i campioni sono stati conservati a temperatura ambiente al buio fino al momento dell'analisi.

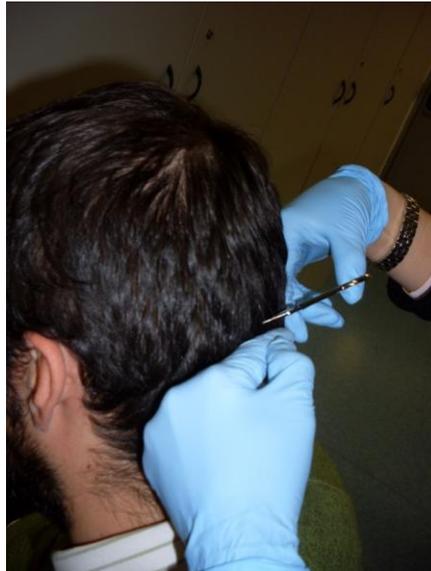


Figura 3.2. L'immagine mostra la modalità di raccolta del campione di capelli.

Inoltre a tutti i soggetti indagati è stato somministrato un questionario per raccogliere informazioni sulle caratteristiche personali, tra cui il colore dei capelli, l'abitudine al fumo, e solo per LA e RR la vicinanza della residenza ai campi di mais, il consumo di vegetali di propria produzione o di produzione locale, e l'utilizzo quotidiano per uso alimentare dell'acqua dei pozzi artesiani. Solo agli agricoltori sono state inoltre richieste ulteriori informazioni circa l'utilizzo dei prodotti fitosanitari, quali il nome e marchio della formulazione, la concentrazione di TBA nella formulazione, modalità di miscelazione e di carico, area trattata, quantità di formulazione applicata per area, numero di trattamenti effettuati durante la stagione, tecniche di applicazione e le attrezzature utilizzate, eventuali manutenzioni dei macchinari durante le attività e l'uso di dispositivi di protezione individuale, cioè un diario delle applicazioni in cui sono stati annotati particolari aspetti che possono influenzare l'esposizione. (Allegati da 4 a 6).

3.4. Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il programma SPSS 15.0 per Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Ai valori inferiori al LOD è stato assegnato un valore pari alla metà dello stesso. Per l'analisi descrittiva dei gruppi studiati sono mostrati media, mediana, deviazione standard, minimo e massimo della distribuzione. Per l'analisi statistica tra gruppi di soggetti (LA vs. RR, vs. UR) sono stati utilizzati il test t di Student's per campioni indipendenti o test Anova, mentre per i confronti all'interno dei gruppi tra i diversi momenti di campionamento è stato utilizzato il test t di Student per campioni accoppiati. Per valutare la correlazione tra variabili è stata impiegata la correlazione lineare semplice. Per effettuare questi test le variabili sono state trasformate nei rispettivi logaritmi decimali ed impiegate dopo aver verificato che le distribuzioni logaritmiche risultassero normali (test di Kolmogorov-Smirnov). E' stato considerato significativo un valore di $p < 0.05$.

I dati sono stati descritti graficamente utilizzando i grafici "a scatola" (box-plot) secondo il seguente modello:

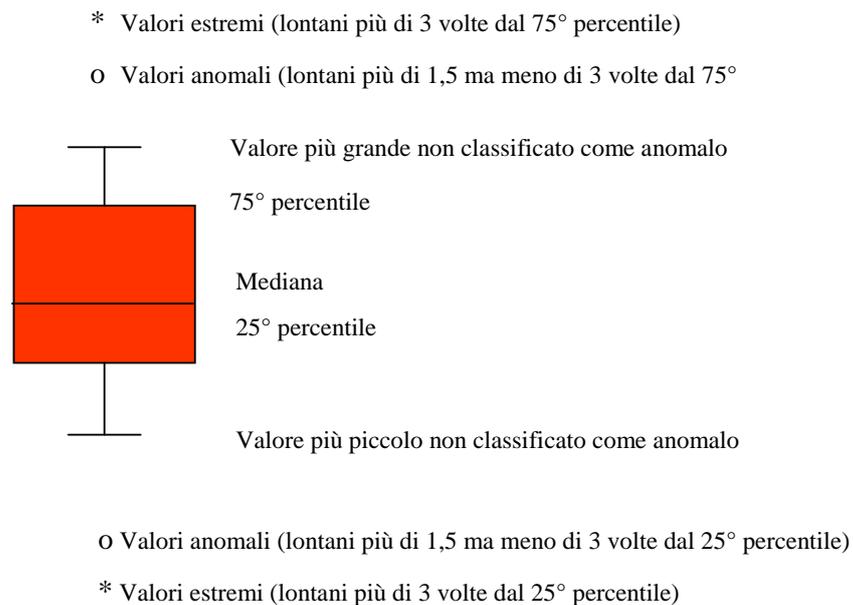


Figura 3.5. Significato del grafico di tipo box-plot.

3.5. Campagna di raccolta campioni 2009- campagna pilota

La campagna pilota è stata condotta nel 2009 e ha coinvolto un totale di 13 agricoltori, 3 del progetto della regione Lombardia e 10 agricoltori della provincia di Cremona. Ai primi 3 soggetti è stato chiesto di raccogliere due campioni di urina uno pre e uno post-esposizione. Il

primo è stato raccolto in un qualsiasi momento della giornata dopo un periodo di assenza di esposizione; il secondo nel giorno in cui hanno effettuato il primo trattamento con TBA nella stagione. In particolare hanno raccolto il campione a partire dalla fine del turno di lavoro per le successive 24 ore (Figura 3.3.). Agli altri 10 agricoltori, invece, al termine della stagione applicativa con TBA, è stata tagliata una ciocca di capelli nelle modalità sopra descritte. Tutti i campioni raccolti sono stati sottoposti alla determinazione della concentrazione di TBA e DET in presenza di standard interni deuterati, per la validazione della metodica precedentemente descritta.



Figura 3.3. Protocollo di raccolta dei campioni urinari della campagna di indagine 2009.

3.5.1. Risultati e discussione - campagna 2009

Nella tabella 3.2. sono riportati i campioni totali raccolti e i risultati ottenuti. Nei campioni di urine sia pre- che post-applicazione non è stato possibile quantificare la TBA mentre la DET è presente in tutti i campioni pre-esposizione con una mediana di 0.26 µg/L, e in tutti i campioni post-esposizione con una media di 1.8 µg/L. Al contrario, nei campioni di capelli solo la TBA, e non la DET, è presente in concentrazioni quantificabili in tutti i campioni con una media di 0.61 ng/mg capelli. Questi risultati mostrano che il metodo è sufficientemente sensibile da permettere l'analisi di campioni reali sia urinari che cheratinici.

Tabella 3.2. Livelli di TBA e DET nei campioni di urine e capelli degli agricoltori raccolti nella campagna pilota 2009. I risultati sono espressi in µg/L per i campioni di urina e in ng/mg capelli per i campioni di

capelli.

	N° campioni			TBA	DET
Urine pre-applicazione	3	µg/L	Mediana	< lod	0.26
			Min-max	-	<0.25-0.27
Urine post-applicazione	3	µg/L	Mediana	< lod	1.8
			Min-max	-	0.9-2.6
Capelli post-stagione applicazione	10	ng/mg capelli	Mediana	0.61	< lod
			Min-max	0.07-4.60	-

3.6. Campagna di indagine 2010

Come indicato in tabella 3.3. alla campagna di indagine effettuata durante la stagione dei trattamenti alle colture di mais del 2010 hanno aderito 12 LA, provenienti solo dalla provincia cremonese, 13 RR e 17 UR, ai quali sono stati richiesti sia campioni urinari che campioni di capelli. Nella tabella è stato indicato il numero totale di campioni raccolti per ciascuno dei momenti espositivi indagati.

Tabella 3.3. Soggetti indagati e campioni raccolti nella campagna 2010

	Numero campioni di urine pre-esposizione	Numero campioni di urine post-esposizione	Numero campioni di capelli pre-esposizione	Numero campioni di capelli post-esposizione
LA	12	37	12	12
RR	13	-	13	13
UR	17	-	17	17

3.6.1. Cinetica di escrezione

La raccolta del campione di urina nelle 24 ore successive al campionamento è un mezzo di indagine utile ma l'impegno del soggetto coinvolto è notevole e in alcuni casi difficile da attuare. Infatti, considerando la tipologia di lavoratori indagati in questo studio, la raccolta di

campioni per 24 ore risulta complessa in quanto i lavoratori non hanno una ubicazione stabile durante la giornata e le attività che compiono li costringono a spostarsi continuamente ricoprendo inoltre ampi spazi. Per cercare di ridurre al massimo l'impegno dei soggetti indagati (e quindi ottenere il maggior numero possibile di adesioni al progetto), al fine di valutare una cinetica di escrezione, nella campagna 2010 sono stati reclutati due agricoltori volontari, che hanno effettuato prima degli altri agricoltori trattamenti con TBA, che hanno raccolto il campione di urina post esposizione per circa 36-48 ore raccogliendo le singole minzioni separatamente e annotando la diuresi e l'ora di raccolta (Allegato 7). Nelle urine è stata determinata la presenza di TBA e DET ed è stato scelto il momento più indicato per la raccolta del campione di urina post esposizione.

3.6.1.1 Risultati e discussione - Cinetica di escrezione

Come atteso, la TBA non è stata quantificata in nessun campione, mentre la DET nel 100% dei campioni è risultata superiore ai limiti di quantificazione. L'escrezione della DET nei due soggetti, come illustrato in Figura 3.4., anche se in quantità variabili legate sia alle caratteristiche del soggetto stesso che a quelle dei trattamenti (quantità di TBA applicata, durata del trattamento, uso mezzi di protezione individuale, etc.), ha un andamento simile ed è ben visibile già nel primo campione raccolto dopo la fine dell'applicazione. L'escrezione continua poi a crescere fino al raggiungimento di un picco massimo fra le 10 e le 16 ore successive alla fine dei trattamenti. Come si può notare, dopo circa 50 ore la DET risulta essere ancora quantificabile con valori di circa 3 volte superiori al LOD.

I risultati della cinetica di escrezione, probabilmente a causa del limitato numero di soggetti che hanno volontariamente aderito al programma, non sono molto chiari e quindi risolutivi. Infatti è risultato che il miglior tempo per la raccolta dei campioni di urine post-esposizione sia a cavallo tra l'ultima minzione della giornata di applicazione della TBA, e cioè quella prima di andare a dormire, e la prima minzione del mattino successivo. Visti i risultati incerti, per evitare la perdita di campioni rappresentativi, è stata pianificata la raccolta di entrambi i campioni.

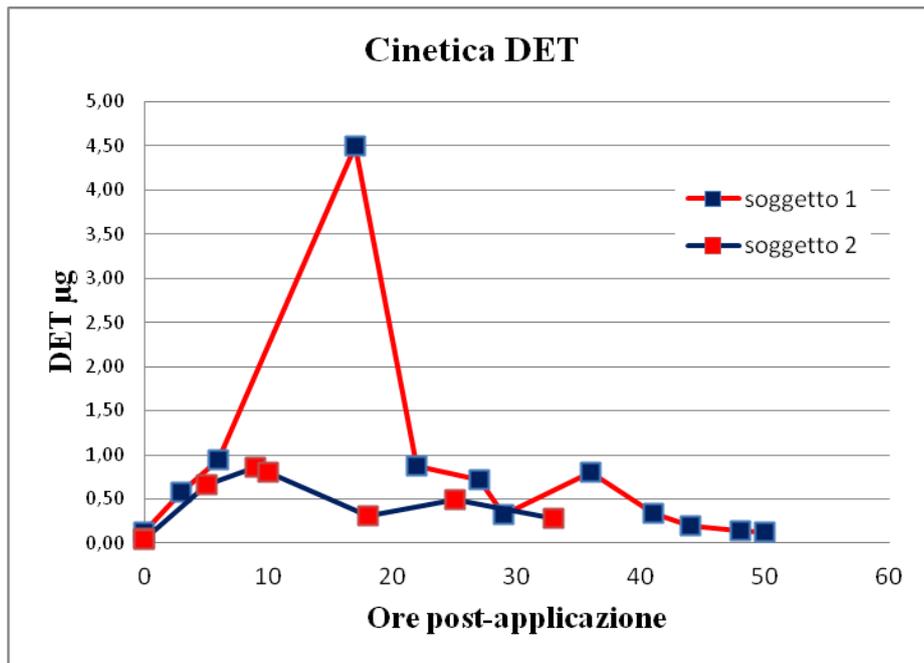


Figura 3.4. Cinetica di escrezione della DET valutata in due agricoltori

3.6.2. Raccolta dei campioni urinari

Il protocollo di raccolta dei campioni urinari dei soggetti coinvolti in questo studio è illustrato in Figura 3.5. Agli agricoltori è stato chiesto di raccogliere un campione di urina pre-esposizione (T_u0) in un qualsiasi momento della giornata dopo un periodo di assenza di esposizione, e due campioni post-esposizione, in particolare il primo (T_u1) da raccogliere prima di andare a dormire nel giorno in cui hanno effettuato il primo trattamento con TBA nella stagione, e il secondo (T_u2) il mattino successivo. Agli RR e UR è stato richiesto un campione estemporaneo in un qualsiasi momento della giornata nel periodo di pre-applicazione.

Tutti i campioni raccolti sono stati processati ed analizzati con la procedura precedentemente descritta per la determinazione di TBA e DET nei campioni urinari. (Figura 3.6.)

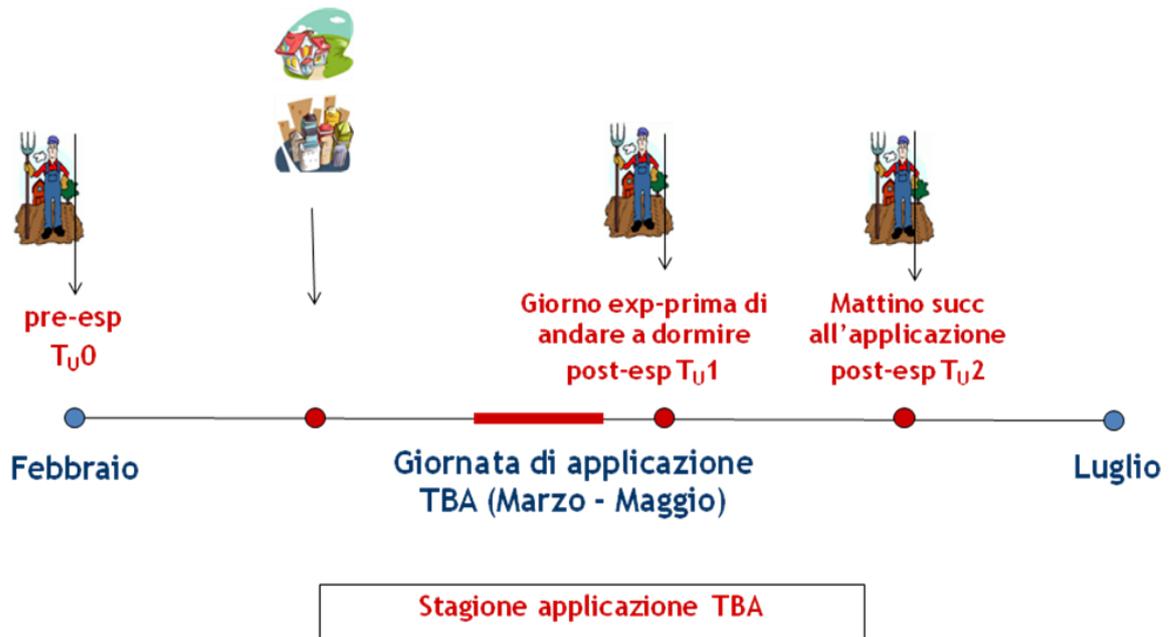


Figura 3.5. Protocollo di raccolta dei campioni urinari della campagna di indagine 2010.

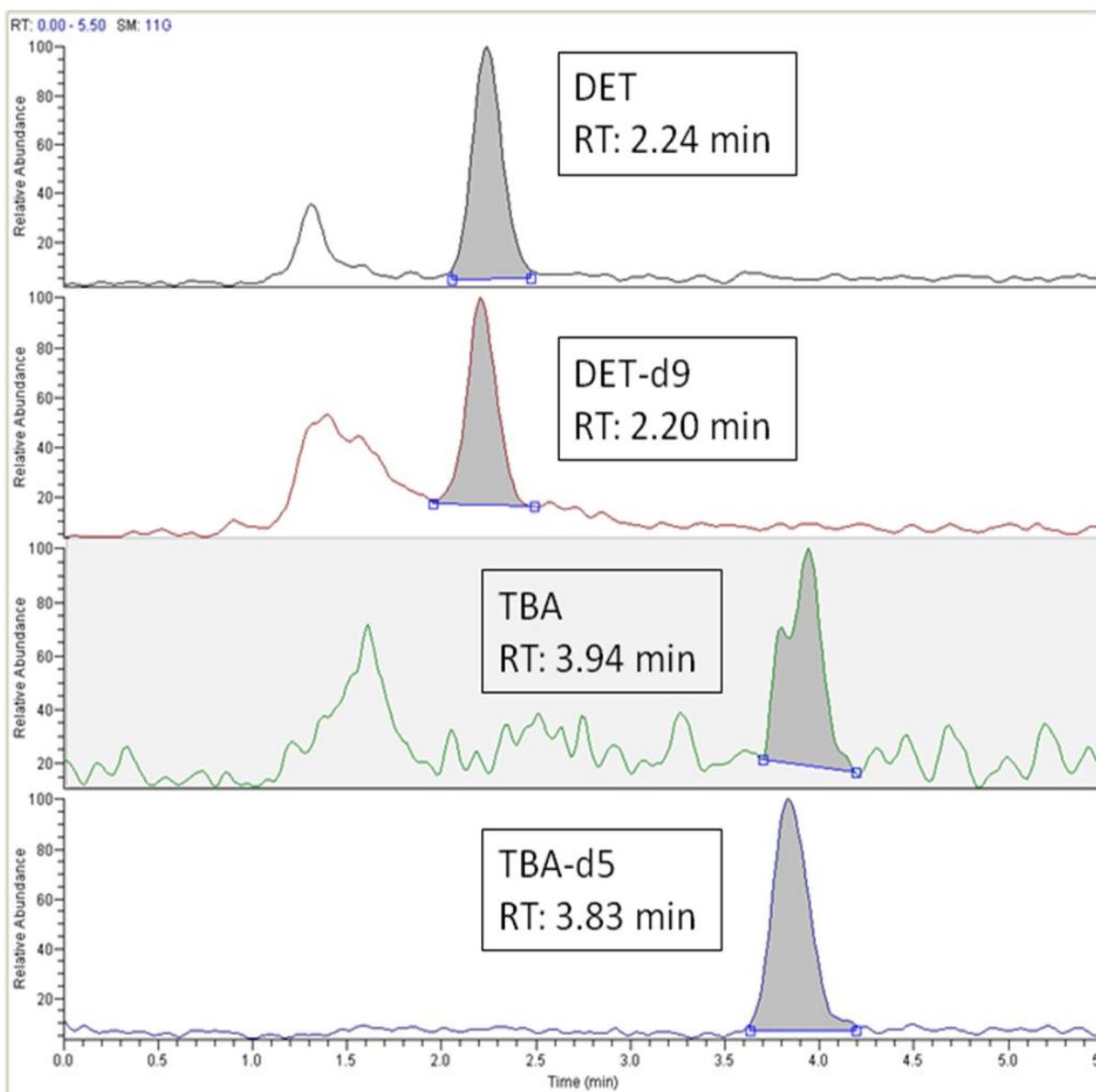


Figura 3.6. Cromatogramma di TBA e DET in un campione reale urinario ottenuto da un agricoltore esposto a TBA. I livelli degli analiti sono: TBA < 0.25 µg/L, DET 2.63 µg/L.

3.6.3. Raccolta dei campioni di capelli

Per la quantificazione di TBA e DET nei campioni di capelli alle tre casistiche di soggetti coinvolti nello studio, nelle modalità sopra descritte, sono stati prelevati due campioni uno pre- e uno post-esposizione. Come mostrato in figura 3.7. il primo (T_c0) è stato tagliato nel mese di febbraio, cioè prima dell'inizio della stagione dei trattamenti con TBA, e il secondo (T_c1) all'inizio del mese di luglio, alla fine della stagione dei trattamenti.



Figura 3.7. Protocollo di raccolta dei campioni di capelli della campagna di indagine 2010.

Tutti i campioni raccolti sono stati sottoposti alla determinazione della concentrazione di TBA e DET in presenza di standards interni deuterati, seguendo la metodica precedentemente descritta. (Figura 3.8.)

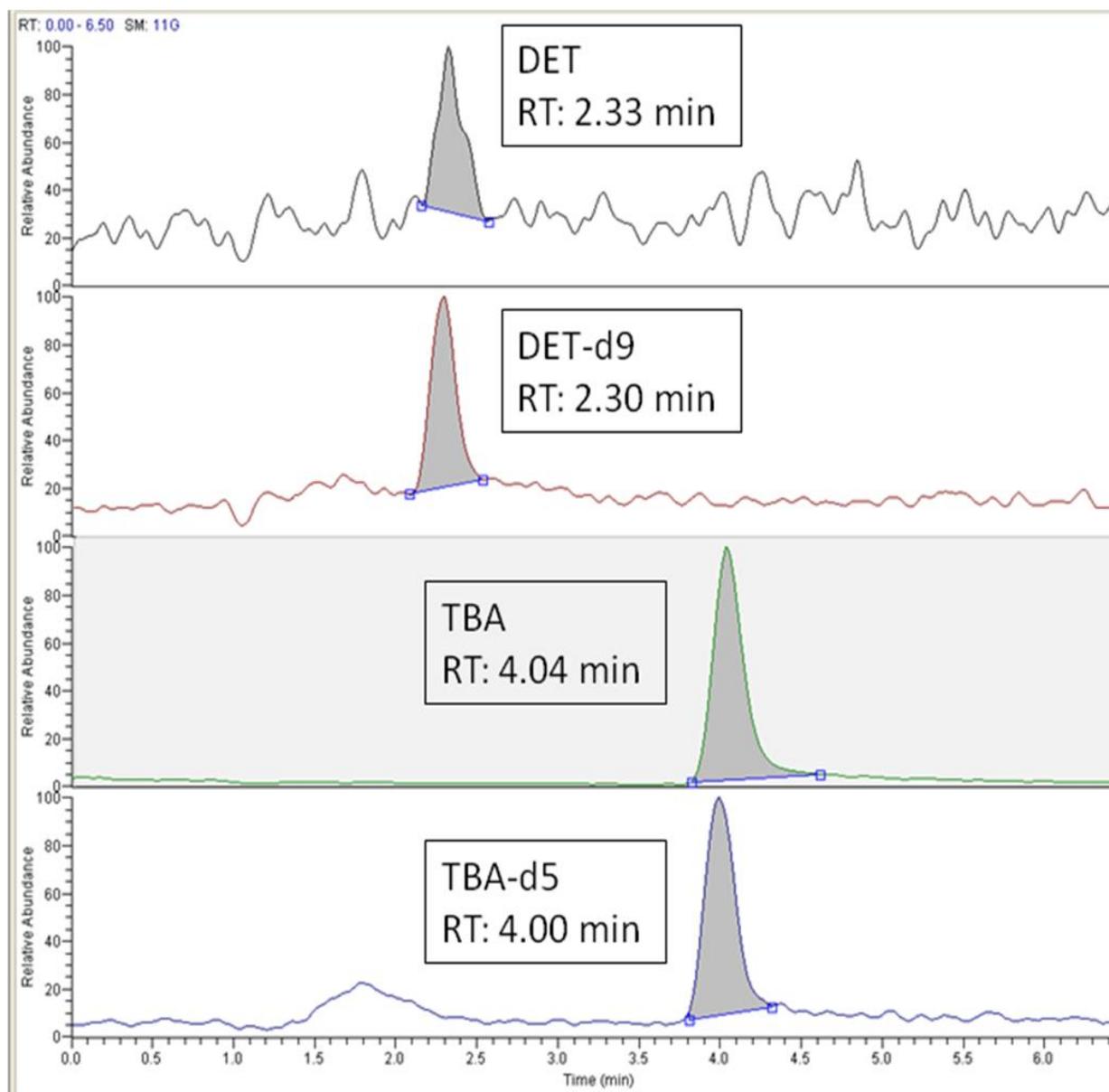


Figura 3.8. Cromatogramma di TBA e DET in un campione reale di capelli ottenuto da un agricoltore esposto a TBA .I livelli degli analiti nel campione sono: TBA 1.33 ng/mg capello, DET <0.01 ng/mg capello.

3.6.4. Caratteristiche della popolazione indagata

Le principali caratteristiche della popolazione indagata nello studio sono riportate in Tabella 3.4. I gruppi differivano per alcune caratteristiche: il sesso non era uniformemente distribuito tra i gruppi, i maschi in LA rappresentavano il 100% mentre in RR e UR rispettivamente il 57% e l'82%; gli LA avevano una età (56) di poco superiore sia agli RR (50) che agli UR (53) così come il peso corporeo con una media di 85 kg in LA rispetto a 72 e 78 kg di RR e UR; circa la metà degli agricoltori aveva capelli scuri mentre negli RR e nei UR solo un terzo. Anche l'abitudine al fumo è risultata diversa nei tre gruppi, con la percentuale maggiore di

fumatori tra gli RR e minore percentuale in UR, e con un consumo di sigarette molto più alto in RR e UR che in LA. Sia gli LA che gli RR avevano le loro residenze molto vicino ai campi di mais e coltivavano e consumavano verdure e ortaggi prodotte nei loro orti.

Tutti gli agricoltori hanno applicato solo una volta la TBA alle colture di mais durante il periodo indagato. Su una media di 11 ha trattati (min 4-max 24), è stata applicata una quantità di TBA che variava tra gli 0.4 e i 13.5 kg, con un valore medio di 6.3 kg. Gli LA hanno utilizzato attrezzature simili per l'applicazione, trattori con cabine aperte dotati di botte con sistema automatico di miscelazione e carico e barra con ugelli. Infine nessun LA ha riferito di aver eseguito manutenzioni ai macchinari e, durante le attività sul campo, hanno utilizzato adeguati dispositivi di protezione individuale (tute, guanti e una maschera antipolvere).

Tabella 3.4. Tabella descrittiva delle caratteristiche dei soggetti indagati.

	Agricoltori	Residenti rurali	Residenti urbani
No soggetti	12	14	17
Maschi (%)	100	57	82
Età (anni) *	56 (± 11)	50 (± 16)	53 (± 13)
Peso (kg) *	83 (± 7.53)	72 (± 16.08)	78 (± 13.88)
Fumatori (%)	25	43	12
No sigarette/giorno*	3 (± 1.73)	11 (± 6.38)	13 (± 10.61)
Vicinanza delle abitazioni ai campi di mais (m) *	48 (± 51.01)	79 (± 36.26)	>10.000
No capelli scuri	6	5	5
Consumatori di prodotti dell'orto (%)	100	100	0
No applicazioni TBA*	1	na	na
Quantità di TBA applicata(kg) *	6.3 (± 3.9)	na	na
Area trattata (ha)*	11 (± 6.24)	na	na
Modalità automatica di diluizione e carico (%)	100	na	na
Pulizia e manutenzione delle attrezzature (%)	0	na	na
Uso di mezzi di protezione individuale (%)	92	na	na

*media (\pm SD)

na non applicabile

3.6.5. Risultati - campagna indagine 2010

I risultati delle analisi di urine e capelli delle tre casistiche di soggetti sono riportati rispettivamente nelle tabelle 3.5. e 3.6. come percentuale di campioni quantificabili, media, mediana, minimo e massimo della distribuzione.

Come mostrato in Figura 3.9., nei campioni post esposizione degli agricoltori la DET è presente nella maggior parte dei campioni in T_u1 e in tutti i campioni in T_u2 con livelli crescenti ($p < 0.001$ per T_u0 rispetto a T_u1 e T_u2; $p > 0.05$ per T_u1 e T_u2), mentre la TBA è presente solo in 3 campioni in T_u1 e 2 campioni in T_u2. In tutti i campioni di urine in T_u0 non è stata trovata né TBA né DET in concentrazioni maggiori del LOQ. Se paragoniamo le tre classi di soggetti, Figura 3.10., i livelli di DET nelle urine mostrano una esposizione a TBA solo negli agricoltori.

Nei campioni pre-esposizione, la TBA era quantificabile nel 50% degli LA, nel 36% dei RR e in nessuno dei UR, con una differenza statistica significativa nella distribuzione di campioni positivi tra i gruppi ($p = 0,004$). Inoltre i livelli di TBA pre-esposizione sia degli LA che degli RR sono risultati statisticamente maggiori rispetto a quelli degli UR ($p < 0.001$). Nei campioni post-esposizione (Figura 3.11.), la TBA era quantificabile in tutti gli LA e RR e in nessuno dei UR, con una differenza statistica significativa nella distribuzione di campioni positivi tra i gruppi ($p < 0.001$). Inoltre i livelli di TBA in LA sono statisticamente maggiori rispetto sia agli RR che agli UR ($p < 0.001$) e in RR i livelli sono statisticamente maggiori rispetto agli UR ($p < 0.001$). Infine nel gruppo degli agricoltori i livelli di TBA in T_c1 sono statisticamente maggiori che in T_c0 (Figura 3.12.). Nei campioni di capelli, la DET non è stata quantificata in nessun campione di ciascuna delle classi di soggetti indagati sia nei campioni pre- che nei campioni post-esposizione in entrambe le soluzioni RS e E. A differenza dei risultati ottenuti nei ratti, anche la TBA non è mai stata quantificabile nella RS di tutti i campioni.

Tra tutti i soggetti ne la DET nelle urine ne la TBA nei capelli è risultata correlata con peso corporeo, abitudine al fumo, e con la vicinanza della residenza ai campi di mais. Solo per gli agricoltori la TBA nei capelli è risultata correlata con l'età del soggetto ($p = 0.02$). Inoltre dopo il trattamento non è stata trovata nessuna correlazione tra il livello di DET nelle urine e TBA dei capelli e la quantità di TBA applicata durante la stagione mentre la TBA nei capelli è risultata marginalmente correlata alla durata del trattamento ($p = 0.08$). Nei campioni pre-esposizione degli LA e dei RR è stata studiata l'influenza del colore dei capelli sulla presenza di valori di TBA maggiori del LOD. Nel gruppo dei soggetti con capelli scuri il 64% dei soggetti ha livelli di TBA > LOD mentre solo il 27% dei soggetti con capelli bianchi o biondi

ha la TBA al di sopra del LOQ, tuttavia, la distribuzione di frequenza tra i gruppi non è risultata statisticamente differente.

Tabella 3.5. Risultati dei campioni urinari di agricoltori, residenti rurali e residenti urbani

		Agricoltori	Residenti rurali	Residenti urbani
DET (µg/L) pre-exp T_u0	% campioni ≥ LOQ	0	0	0
	Media (±SD)	<0.25	<0.25	<0.25
	Mediana	<0.25	<0.25	<0.25
	Min-max	na	Na	na
DET (µg/L) post-exp T_u1	% campioni ≥ LOQ	91	-	-
	Media (±SD)	9.32 (±17.93)	-	-
	Mediana	1.81	-	-
	Min-max	<0.25-2.60	-	-
DET (µg/L) post-exp T_u2	% campioni ≥ LOQ	100	-	-
	Media (±SD)	15.66 (±35.90) ^a	-	-
	Mediana	2.95	-	-
	Min-max	0.61-116.99	-	-
TBA (µg/L) pre exp T_u0	% campioni ≥ LOQ	0	0	0
	Media (±SD)	<0.25	<0.25	<0.25
	Mediana	<0.25	<0.25	<0.25
	Min-max	na	Na	na
TBA (µg/L) post exp T_u1	% campioni ≥ LOQ	27	-	-
	Media (±SD)	0.44 (±0.75)	-	-
	Mediana	<0.25	-	-
	Min-max	<0.25-2.60	-	-
TBA (µg/L) post exp T_u2	% campioni ≥ LOQ	18	-	-
	Media (±SD)	5.90(±17.99)	-	-
	Mediana	<0.25	-	-
	Min-max	<0.25-57.09	-	-

^a statisticamente maggiore di T_u1
na non applicabile

Tabella 3.6. Risultati dei campioni di capelli di agricoltori, residenti rurali e residenti urbani

		Agricoltori	Residenti rurali	Residenti urbani
DET (ng/mg capello) pre-exp T_{c0}	% campioni ≥ LOQ	0	0	0
	Media (±SD)	<0.01	<0.01	<0.01
	Mediana	<0.01	<0.01	<0.01
	Min-max	na	Na	na
DET (ng/mg capello) Post-exp T_{c1}	% campioni ≥ LOQ	0	0	0
	Media (±SD)	<0.01	<0.01	<0.01
	Mediana	<0.01	<0.01	<0.01
	Min-max	na	Na	na
TBA (ng/mg capelli) pre exp T_{c0}	% campioni ≥ LOQ	50	36	0
	Media (±SD)	0.017(±0.024) ^b	0.013(±0.012) ^b	<0.01
	Mediana	0.009	0.010	<0.01
	Min-max	<0.01-0.09	<0.01-0.039	na
TBA (ng/mg capelli) post exp T_{c1}	% campioni ≥ LOQ	100	100	0
	Media (±SD)	0.128(±0.129) ^{a,b,c}	0.017(±0.015) ^b	<0.01
	Mediana	0.073	0.011	<0.01
	Min-max	0.026-0.427	0.010-0.062	na

^a statisticamente maggiore di RR

^b statisticamente maggiore di UR

^c statisticamente maggiore di T_{c0}

na non applicabile

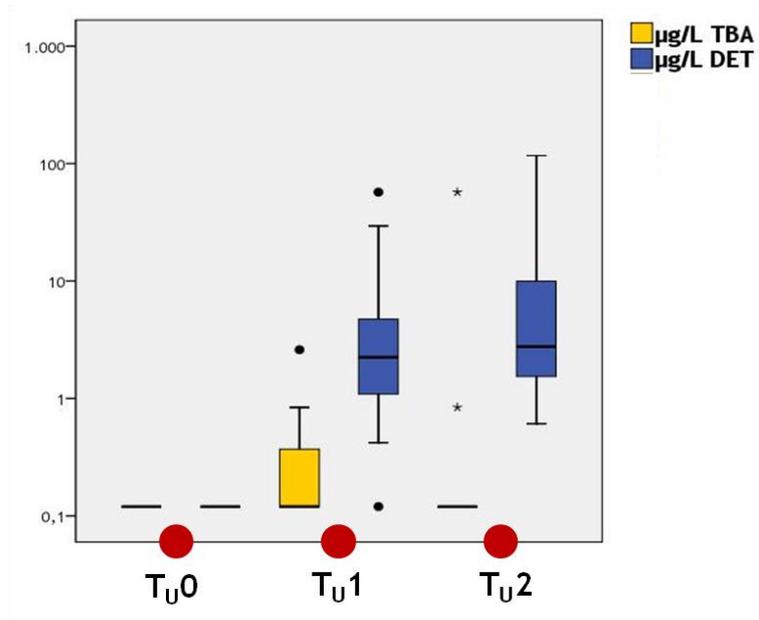


Figura 3.9. Box-plot dei livelli di TBA e DET espressi in µg/L nei campioni di urine degli agricoltori.

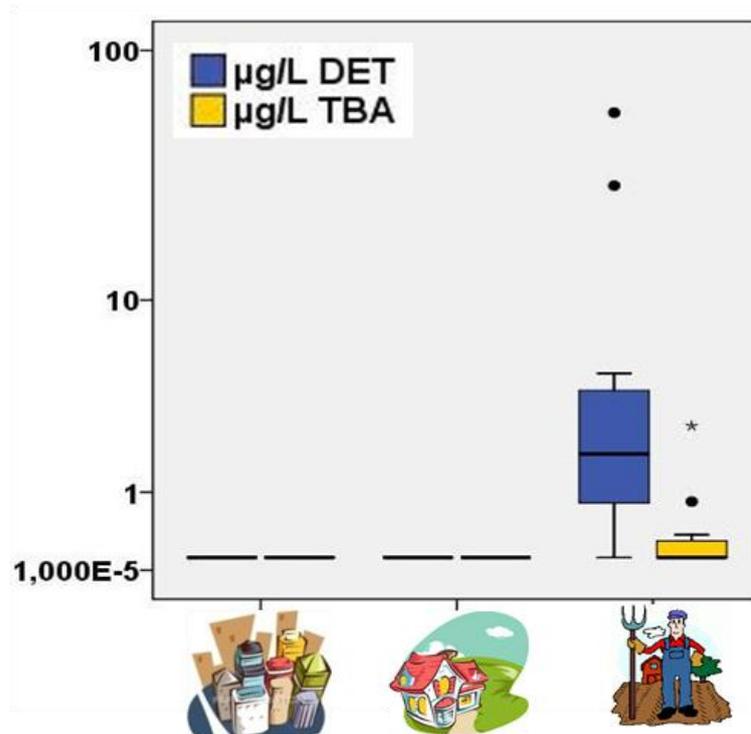


Figura 3.10. Box-plot dei livelli di TBA e DET espressi in µg/L nei campioni di urine degli agricoltori, residenti rurali e residenti urbani.

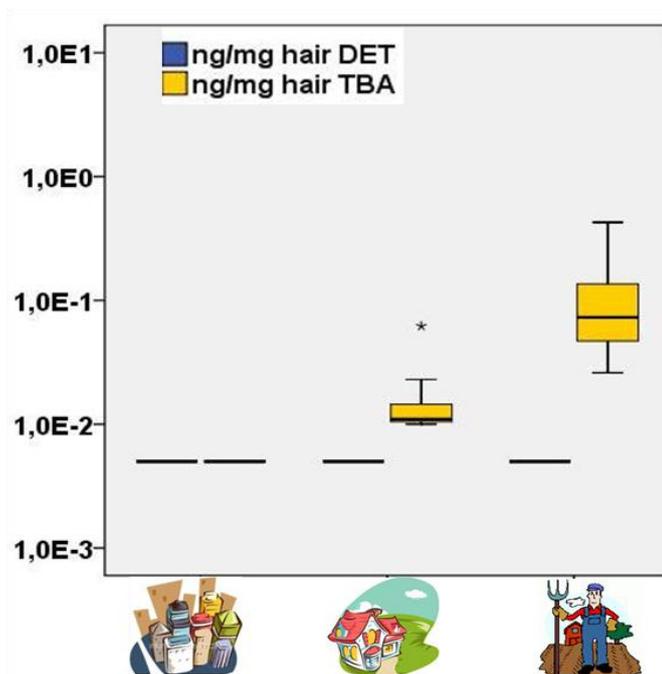


Figura 3.11. Box plot della presenza di TBA e DET, espressa in ng/mg capelli, nei campioni capelli post-esposizione degli agricoltori, residenti rurali e residenti urbani.

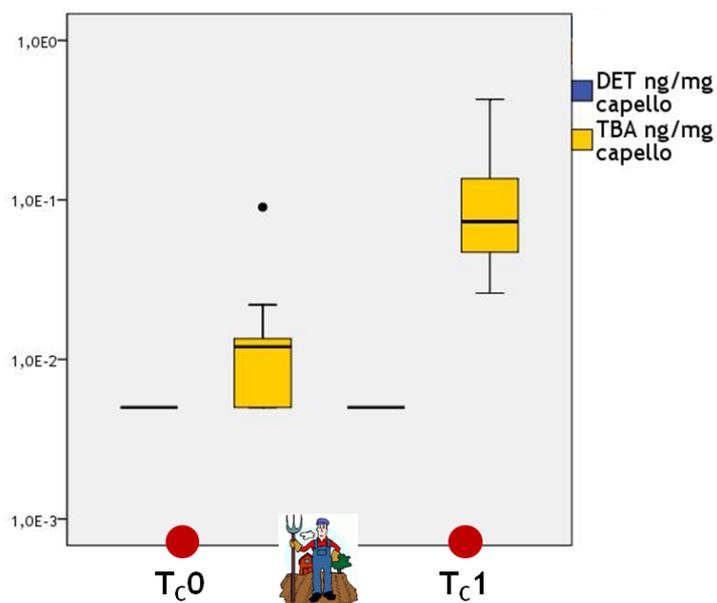


Figura 3.12. Box plot della presenza di TBA e DET, espressa in ng/mg capelli, nei campioni di capelli pre- e post-esposizione degli agricoltori.

3.6.6. Discussione - campagna indagine 2010

In questo studio, abbiamo valutato l'uso di TBA e del suo principale metabolita DET come biomarker di esposizione a TBA nelle urine e nei capelli.

Grazie allo studio di cinetica effettuato su due soggetti agricoltori che hanno raccolto tutte le urine post-esposizione per circa 36-48 ore dalla fine dei trattamenti (i cui risultati sono riportati nel paragrafo 3.6.1.1.), sono stati individuati due momenti idonei per la raccolta del campione post-esposizione: il primo la sera del giorno in cui è stata applicata la TBA ai campi, prima di andare a letto, il secondo, la prima minzione del mattino successivo ai trattamenti. In tutti i campioni post-esposizione analizzati, la DET è stata sempre trovata (tranne in un soggetto in T_u1) mentre la TBA solo in 3 campioni in T_u1 e 2 campioni in T_u2 . I risultati ottenuti concordano con quanto riportato in uno studio pubblicato sul Bollettino Trimestrale del ICPS (International Centre for Pesticides and Health Risk Prevention) "*Pesticide Safety News*" (Catenacci, Marzo 1998), dove viene indicato che solo l'1-2% della TBA assorbita viene escreta tal quale nelle urine, mentre il suo metabolita DET in quantità pari al 50-60%. La TBA e la DET non sono state misurate neanche nei campioni pre-esposizione degli agricoltori. I risultati ottenuti ci portano a concludere che, dopo una esposizione a TBA, la DET, e non la TBA tal quale, è sempre presente nelle urine e perciò potrebbe essere utilizzata come biomarker urinario di esposizione a breve termine.

Inoltre, come evidenziato nella Figura 3.9., nel secondo campione raccolto da ciascun soggetto, cioè dopo circa 16 ore dalla applicazione, i livelli di DET sono maggiori di quelli trovati nel primo campione raccolto il giorno precedente prima di andare a letto, cioè dopo circa 8-10 ore dalla applicazione di TBA. Anche se i valori ottenuti nei campioni T_u2 non sono risultati statisticamente maggiori rispetto ai valori dei campioni in T_u1 , e sulla base degli studi di cinetica di escrezione della TBA effettuati nel ratto (WHO, 1998), si ritiene di poter comunque affermare che il momento migliore per la raccolta del campione di urina sia la mattina successiva al giorno di trattamento.

TBA e DET non sono state trovate in quantità maggiori del LOD nei campioni di urine sia dei residenti rurali che dei residenti urbani. Infatti il campione urinario di questi gruppi è stato prelevato in un giorno qualsiasi della stagione dei trattamenti, in quanto nel caso dei bystanders e della popolazione generale non è possibile identificare un campione urinario che rappresenti l'esposizione alle applicazioni di TBA. Ne consegue quindi che TBA e DET urinari non possono essere utilizzati per la valutazione della esposizione a TBA sia nei residenti rurali che nei residenti urbani.

Spostando l'attenzione sulla matrice capello possiamo innanzitutto osservare come, rispetto alla DET, i risultati ottenuti concordano con quelli ottenuti nello studio effettuato sui ratti. Infatti, anche nell'uomo, la DET non è mai stata trovata nei campioni cratinici pre- e post-esposizione. Viene infatti confermato che, come per altre sostanze (es. la cocaina), i metaboliti, che sono specie più polari dei rispettivi composti parenti, vengono escreti nelle urine mentre le quantità eventualmente accumulate nel capello, risultano di 2-3 ordini di grandezza inferiori a quelle dei composti di partenza.

Nei campioni post-esposizione, la TBA è stata quantificata in tutti gli agricoltori e nei residenti rurali e in nessun campione dei residenti urbani, con livelli medi di rispettivamente 0.128, 0,017 e <0,01 ng/mg di capelli. Questa prevista tendenza è risultata statisticamente significativa, e può essere correlata alla esposizione a TBA avvenuta nei mesi precedenti al prelievo dei capelli. Di ciascun campione, sono stati analizzati circa i primi 3 cm di capelli, partendo dalla radice, che dovrebbero all'incirca rappresentare una cornice temporale di 3 mesi, corrispondente al periodo di applicazione stagionale della TBA nei campi, in quanto in media ogni mese i capelli crescono di 1 cm (Boumba, 2006). I livelli di TBA negli agricoltori erano variabili, con un valore minimo pari a 0.026 ng/mg di capelli e uno massimo di 4.64 ng/mg di capelli. La mancanza di correlazione tra queste concentrazioni con la quantità di TBA applicata durante i trattamenti e la marginale correlazione con la superficie trattata, può essere attribuita sia al piccolo numero di soggetti indagati che all'efficacia dell'uso dei mezzi di protezione individuali durante le operazioni manuali e da altri fattori come le esposizioni accidentali. Tutti i soggetti hanno dichiarato di aver utilizzato i dispositivi di protezione necessari nelle diverse fasi del lavoro, ma è difficile valutare effettivo uso appropriato di tali dispositivi in quanto gli agricoltori non sono stati seguiti in campo. Tale valutazione è stata basata sulle dichiarazioni dei soggetti che possono essere state influenzate dalla percezione personale del rischio. La correlazione trovata tra la quantità di TBA nei capelli post-esposizione e l'età dei soggetti potrebbe rafforzare questa tesi. Infatti nei soggetti più anziani è stata riscontrata la tendenza a sottovalutare i rischi associati alle operazioni in campo e di conseguenza il minor utilizzo di dispositivi di protezione. Questo atteggiamento probabilmente può derivare sia dalla maggior sicurezza nel maneggiare i prodotti fitosanitari acquisita nel tempo, che dalla minor educazione e sensibilizzazione in materia di salute e sicurezza.

La TBA è persistente nell'ambiente, ed è stata dimostrata la sua presenza anche nelle falde acquifere in una zona del Nord Italia dove si trovano coltivazioni di mais (Otto, 2007). Un modello di esposizione multisorgente potrebbe spiegare la presenza della TBA oltre che nei

capelli degli agricoltori anche in quelli dei residenti rurali. Infatti le abitazioni dei residenti rurali sono molto vicine ai campi di mais ed è elevata la probabilità che vi sia esposizione per inalazione durante l'applicazione dell'erbicida (Health and Safety Database, 2010). D'altra parte, tutti i residenti rurali coltivano e consumano verdure coltivate nei propri orti, per cui anche l'ingestione di alimenti contaminati può rappresentare una ulteriore significativa fonte di esposizione. Spesso, infatti, questi orti vengono irrigati con l'acqua dei fossi; questi fossati, che circondano i campi di mais, possono raccogliere le acque di lisciviazione dei campi e, al tempo stesso, vengono tenuti puliti dalle infestanti trattando con erbicidi. L'ingestione di acqua del pozzo nei residenti rurali, (Health and Safety Database, 2010) può inoltre rappresentare una fonte di esposizione a TBA.

Nei campioni pre-esposizione, la TBA è stata quantificata nel 50% dei campioni degli agricoltori e nel 36% dei residenti rurali e in nessun campione dei residenti urbani, con livelli medi di rispettivamente 0,017, 0,013 e <0,01 ng/mg di capelli. Le percentuali di campioni positivi nei due gruppi sono molto simili così come i valori medi di TBA ottenuti e sono entrambi risultati statisticamente maggiori rispetto a quelli dei residenti urbani. Questi risultati confermano che la TBA è presente nelle zone rurali anche nei periodi di assenza dei trattamenti supportando il modello di esposizione multisorgente.

Negli agricoltori i livelli di TBA misurati nei campioni di capelli post-esposizione sono risultati statisticamente superiori a quelli misurati nei campioni pre-esposizione, ne consegue che i livelli di TBA nei capelli aumentano con la esposizione.

I campioni dei capelli dei residenti urbani non hanno mostrato tracce di TBA. Qualsiasi inquinamento ambientale residuale, comprese le eventuali contaminazioni di acqua e cibo, anche se presenti, non hanno modificato il contenuto di TBA nei capelli dei residenti urbani a livelli superiori a 0,01 ng/mg capelli.

La concentrazione di TBA misurata nei peli dei ratti è risultata paragonabile a quella trovata negli agricoltori. Questo è un risultato inaspettato, poiché è stata stimata una esposizione molto più elevata nei ratti (che avevano ricevuto una dose totale di TBA pari a 2,25 mg/kg di peso corporeo) rispetto agli agricoltori, per i quali l'esposizione sia cutanea che per inalazione è difficile da stimare. Sulla base di studi precedenti su altri prodotti fitosanitari, tale esposizione può essere stimata in decine di mg/kg di peso corporeo (Aprea, 2005). Una possibile spiegazione della incongruità di questi risultati potrebbe essere legata all'utilizzo di topi bianchi per l'esperimento, visto che il contenuto di melanina nei capelli può influenzare positivamente l'accumulo di sostanze negli stessi (Prasgt, 2006; Schramm, 2008). Tali conclusioni sono supportate in questo lavoro, considerando il totale dei campioni di capelli

pre-esposizione degli agricoltori e dei residenti rurali, quelli scuri avevano una percentuale più alta di campioni positivi alla TBA (73%) rispetto a quelli bianchi o biondi (27%).

In conclusione, i nostri risultati indicano che il TBA è incorporata nei capelli di entrambi i ratti ed esseri umani.

I risultati ottenuti per i campioni di capelli ci portano a concludere che, dopo una esposizione a TBA, la TBA tal quale, e non la DET, è sempre presente nei campioni cheratinici, prelevati alla fine del periodo espositivo, e perciò potrebbe essere utilizzata come biomarker di esposizione cumulativa a TBA. I livelli di TBA nei capelli aumentano con l'esposizione e, al contrario dei livelli di DET nei campioni urinari, ci hanno permesso di evidenziare l'esposizione dei residenti rurali.

4. Conclusioni

Scopo

Scopo di questo lavoro è stato quello di valutare la possibilità di utilizzare i capelli per la determinazione della esposizione a medio termine ad antiparassitari.

Metodo analitico

In questo lavoro di tesi è stato sviluppato un metodo per la determinazione di TBA e del suo metabolita DET, nella matrice urina e nei capelli, che prevede l'estrazione dai campioni rispettivamente via SPE e diretta con MeOH, e l'analisi in cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa con triplo quadrupolo (LC-MS/MS) con sorgente di ionizzazione riscaldata (H-ESI). L'efficienza dei metodi estrattivi e gli ottimi risultati ottenuti nella valutazione della linearità, accuratezza, precisione e il contenuto effetto matrice, consentono di affermare che il metodo analitico sviluppato nella presente ricerca è risultato adatto alla quantificazione di TBA e DET sia nelle urine che nei capelli.

Studio sui ratti

Prima di effettuare l'analisi dei campioni di urine e capelli dei soggetti indagati nello studio, è stata eseguito un protocollo di somministrazione orale di TBA in un gruppo di ratti per verificare l'effettiva incorporazione di TBA e del suo metabolita DET nei capelli dopo una esposizione in condizioni controllate. La DET non è stata trovata in nessun campione, mentre la TBA è stata trovata in tutti i campioni post-esposizione. Nei capelli è stato calcolato un tasso di incorporazione di circa 0.12% della dose di TBA somministrata. Possiamo concludere che, dopo una esposizione a TBA, la TBA tal quale, e non la DET, viene incorporata nei capelli in concentrazioni quantificabili.

Studio sull'uomo

Il metodo di estrazione e analisi messo a punto nel presente lavoro, è stato seguito per analizzare i campioni di urina e capelli ottenuti da tre classi di soggetti, agricoltori, residenti rurali e residenti urbani.

La DET è stata trovata in tutti i campioni di urina post esposizione ma mai nei campioni pre-esposizione ne nei campioni di residenti rurali e residenti urbani. Nei due campioni post-esposizione richiesti agli agricoltori, i livelli di DET presenti nel secondo campione (raccolto dopo circa 16 ore dalla fine dei trattamenti, la prima minzione del mattino successivo), sono risultati superiori a quelli del primo campione (raccolto dopo circa 8-10 ore dalla fine dell'esposizione, l'ultima minzione prima di andare a dormire). La TBA è stata quantificata solamente in un numero irrisorio di campioni post-esposizione raccolti dagli agricoltori. Concludendo, la DET è il metabolita urinario della TBA ed il miglior tempo di

campionamento del campione urinario è la mattina successiva al giorno di trattamento; la DET nelle urine può quindi essere utilizzata come biomarker di esposizione a breve termine, ma non può essere utilizzata per la valutazione della esposizione a TBA sia nei residenti rurali che nei residenti urbani.

La TBA è stata trovata in tutti i campioni di capelli post-esposizione sia degli agricoltori che dei residenti rurali e in alcuni capelli pre-esposizione di entrambi i gruppi, ma mai nei campioni dei residenti urbani. La DET non è mai stata quantificata nei campioni di capelli raccolti. Concludendo la TBA può essere misurata nei capelli, ed i suoi livelli aumentano con l'esposizione; i risultati hanno evidenziato che la TBA nei capelli può essere utilizzata come biomarker di esposizione a medio termine. Infine la quantificazione della TBA nel capello ci ha permesso di individuare l'esposizione dei residenti rurali, non precedentemente evidenziata dai marker urinari.

Bibliografia

Amalric L., Mouvet C., Pichon V., Bristeau S. 2008. Molecularly imprinted polymer applied to the determination of the residual mass of atrazine and metabolites within an agricultural catchment (Brévilles, France). *Journal of Chromatography A* 1206, 95-104.

Apra C., Centi L., Santini S., Lughini L., Banchi B., Sciarra G. 2005. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 49:577-588.

Arbuckle, T.E., Burnet, R., Cole, D., Teschke, K., Dosemeci, M., Bancej, C., Zhang, J. 2002. Predictors of Herbicide exposure in farm applicators. *Int.Arch.Occup.Environ.Health.* 75, 406-414.

Barbina M.T., 1993. Pesticide residues in groundwater in Friuli-Venezia Giulia. In: *Proceedings of the IX Symposium on Pesticide Chemistry, Piacenza, 11-13 October 1993*, pp. 729-738 (Ciba-Geigy Document)

Bjarnason B., Chimuka L., Ramström O. 1999. On-line solid-phase extraction of triazine herbicides using a molecularly imprinted polymer for selective sample enrichment. *Anal.Chem.* 71, 2152-2156.

Bogdanow A.V., Glazkov I.N., Polenova T.V., Marutsenko I.V., Revel'skii I.A. 2006. Determination of Organic Compounds in Human Hair. *Journal of Analytical Chemistry* 61:936-951.

Borba da Cunha A.C., López de Alda M.J., Barceló D., Pizzolato T.M., dos Santos J.H.Z. 2004. Multianalyte determination of different classes of pesticides (acidic, triazines, phenyl ureas, anilines, organophosphates, molinate and propanil) by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 378:940-954.

Bossi R., Vejrup K.V., Mogensen B.B., Asman W.A.H. 2002. Analysis of polar pesticides in rainwater in Denmark by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 957, 27-36.

Boumba V.A., Ziavrou K.S., Vougiouklakis T. 2006. Hair as a Biological Indicator of Drug Use, Drug Abuse or Chronic Exposure to Environmental Toxicants. *International Journal of Toxicology* 25:143-163.

Brambilla A., 1993. The fate of atrazine pesticides in River Po water. *Science of the total environment.* 132:339-348.

Chapuis F., Pichon V., Lanza F., Sellergren B., Hennion M.-C. 2004. Retention mechanism of analytes in the solid-phase extraction process using molecularly imprinted polymers. Application to the extraction of triazines from complex matrices. *Journal of Chromatography B* 804:93-101.

ChemIDplus Lite, 2011.

<http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/ProxyServlet?objectHandle=DBMaint&actionHandle=default&nextPage=jsp/chemidlite/ResultScreen.jsp&TXTSUPERLISTID=0000333415>
(accessed 17-05-2011).

Comoretto L., Chiron S. 2005. Comparing pharmaceutical and pesticide loads into a small Mediterranean river. *Science of the Total Environment* 349, 201-210.

Covaci A., Hura C., Gheorghe A., Neels H., Dirtu A.C. 2008. Organochlorine contaminants in hair of adolescents from Iassy, Romania. *Chemosphere* 72:16-20.

Covaci A., Schepens P. 2001. Chromatographic Aspects of the Analysis of the Analysis of Selected persistent Organochlorine Pollutants in Human Hair. *Chromatographia* 53:S-366-S-371.

Curwin B.D., Hein M.J., Sanderson W.T., Barr D.B., Heederik D., Reynolds S.J., Ward E.M., Alavanja M.C 2005. Urinary and hand wipe pesticide levels among farmers and nonfarmers in Iowa. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology* 15:500-508.

Davis J.E. 1980. Minimizing occupational exposure to pesticides: personnel monitoring. *Residue Review* 75:33-50.

Decreto del Ministero della Sanità del 18 marzo 1992, n.705/910

D'Havè H., Scheirs J., Covaci A., van den Brink N.W., Verhagen R., De Coen W. 2008. Non-destructive pollution exposure assessment in the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*): IV. Hair versus soil analysis in exposure and risk assessment of organochlorine compounds. *Environmental Pollution* 145:861-868.

Diack, S.L., 1930. The determination of the surface area of the white rat. *J. Nutr.* 3, 289-296.

Dominguez-Romero J. C., Garcia-Reyes J. F., Molina-Diaz A. 2011. Screening and quantitation of multiclass drugs of abuse and pharmaceuticals in hair by fast liquid chromatography electrospray time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* doi: 10.1016/j.jchromb.2011.05.034.

European Community, 2004: Decision of European Community, 2004/248/EK/10-3-2004 (L78/53/16-3-2004).

Eurostat (European Commission). 2007. The use of plant protection products in the European Union -Data 1992-2003. Eurostat, Statistical Books.

Funari, E., Brambilla, A.L., Camoni, I., Canuti, A., Cavallaro, A., Chierici, S., Cianella, G., Donati, G., Iaforte, A., Prandi, L., Salamana, V., Silano, V., Zapponi G.A. 1988. Extensive atrazine pollution of drinking water in the Lombardia region and related public health aspects. *Biomed. Environ. Sci.* 1, 350-355.

Gallardo E., Queiroz J.A. 2008. The role of alternative specimens in toxicological analysis. *Biomedical Chromatography*.

Garcia-Reyes J, Jackson A, Molina-Diaz A, Graham-Cooks R. 2009. Desorption electrospray ionization mass spectrometry for trace analysis of agrochemicals in food. *Anal.Chem.* 81, 820-829.

Garrod, A.N., Rimmer, D.A., Robertshaw, L., Jones T. 1998. Occupational exposure through spraying remedial pesticides. *Ann. Occup. Hyg.* 42(3), 159-65.

Gault AG, Rowland HA, Charnock JM, Wogelius RA, Gomez-Morilla I, Vong S, Leng M, Samreth S, Sampson ML, Polya DA. 2008. Arsenic in hair and nails of individuals exposed to arsenic-rich groundwaters in Kandal province, Cambodia. *The Science of Total Environment*. 393(1):168-76.

Health and Safety Database Atrazina, 2011.

<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?./temp/~its6Cf:1> (ultimo accesso 30 novembre 2011)

Health and Safety Database Terbutilazina, 2011.

<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?./temp/~LvyRRA:1> (ultimo accesso 30 novembre 2011)

Jiang H., Adams C.D., Koffskey W. 2005. Determination of chloro-s-triazines including didealkylatrazine using solid-phase extraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1064, 219-226.

Kronstrand R, Roman M, Hedman M, Ahlner J, Dizdar N. 2007. Dose-hair concentration relationship and pigmentation effects in patients on low-dose clozapine. *Forensic Science Medicine and Pathology*. 3(2):107-114.

Li Y., Yang L., Wang W., Li H., Lv J., Zou X. 2011. Trace element concentrations in hair of healthy Chinese centenarians. *Science of The Total Environment* 409(8): 1385-1390.

Machera, K., Goumenou, M., Kapetanakis, E., Kalamarakis, A., Glass, C.R. 2003. Determination of potential dermal and inhalation operator exposure to malathion in greenhouses with the whole body dosimetry method. *Ann. Occup. Hyg.* 47(1), 61-70.

Marín J.M., Gracia-Lor E., Sancho J.V., López F.J., Hernández F. 2009. Application of ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry to the determination of multi-class pesticides in environmental and wastewater samples. Study of matrix effects. *Journal of Chromatography A* 1216, 1410-1420.

Maroni, M., Colsio, C., Ferioli, A., Fait, A. 2000. Biological monitoring of pesticide exposure: a review. *Toxicology*. 143, 1-123.

Matuszewski B.K. 2006. Standard line scope as a measure of a relative matrix effect in quantitative HPLC-MS bioanalysis. *Journal of Chromatography B* 830, 293-300.

Mazzella N., Delmans F., Delest B., Méchin B., Madigou C., Allenou J.-P., Gabellec R., Caquet Th. 2009. Investigation of the matrix effects on a HPLC-ESI-MS/MS method and application for monitoring triazine, phenylurea and chloroacetanilide concentrations in fresh and estuarine waters. *J Environ Monit* 11:108-115.

Mouvet C., Jeannot R., Riolland H., Maciag C. 1997. Stability of Isoproturon, Bentazone, Terbutylazine and Alachlor in natural groundwater, surface water and soil water samples stored under laboratory conditions. *Chemosphere* 35[5], 1083-1097.

Musshoff F., Madea B. 2007. New trends in hair analysis and scientific demands on validation and technical notes. *Forensic Science International* 165:204-215.

Nakahara, Y., Takahashi, K., Kikura, R. 1995. Hair analysis for drugs of abuse. X. Effect of physicochemical properties of drugs on the incorporation rates into hair. *Biol Pharm. Bull.* 18, 1223-1227.

Nakahara Y. 1999 Hair analysis for abused and therapeutic drugs. *733(1-2):161-80.*

Nakao T., Aozasa O., Ohta Souchi, Tsatsakis A.M. 2002. Assessment of human exposure to PCDDs, PCDFs and Co-PCBs using hair as a human pollution indicator sample I: development of analytical method for human hair and evaluation for exposure assessment. *Chemosphere* 48:885-896.

Neuber K., Merkel G., Randow F.F.E. 1999. Indoor air pollution by lindane and DDT indicated by haed hair samples of children. *Toxicology Letters* 107:189-192.

Nogueira J.M.F., Sandra T., Sandra P. 2004 Multiresidue screening of neutral pesticides in water samples by high performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 505, 209-215.

Ostrea Jr E., Bielawski D., Posecion Jr N., Corrion M., Villanueva-Uy E., Jin Y., Janisse J.J., Ager J.W. 2008. A comparison of infant hair, cord blood and meconium analysis to detect fetal exposure to environmental pesticides. *Environmental Research* 106:277-283.

Otto S., Altissimo L., Zanin G. 2007. Terbutylazine contamination of the aquifer north of Vicenza (North-East Italy). *Env Sci Pollut Res* 14[2], 109-113.

Panuwet P, Nguyen J, Kuklenyik P, Udunka S, Needham L, Barr D. 2008. Quantification of atrazine and its metabolites in urine by on-line solid-phase extraction- high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal.Bioanal Chem* 391, 1931-1939.

Papadopoulos N, Gikas E, Zalidis G, Tsarbopoulos A-. 2007 Simultaneous determination of terbutylazine and its major hydroxy and dealkylated metabolites in wetlan water samples using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *J.Agric.Food Chem.* 55, 7270-7277.

Posecion N. Jr, Ostrea E. Jr, Bielawski D., Corrion M. Jr, Seagraves J., Jin Y. 2006. Detection of exposure to environmental pesticides during pregnancy by the analysis of maternal hair using GC-MS. *Chromatographia* 64, 681-687.

Pragst F., Balikova M.A. 2006. State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clinica Chimica Acta* 370, 17-49.

Protano C., Guidotti M., Vitali M. 2009. Performance of different work clothing types for reducing skin exposure to pesticides during open field treatment. *Bull Environm Contam Toxicol* 83:115-119.

Rapparini, G. 2009. Pre-emergenza strategico per il mais. *L'informatore agrario.*

Rodrigues J. L., Andrade Nunes J., Lemos Batista B., Simião de Souza S., Barbosa F. Jr. 2008. A fast method for the determination of 16 elements in hair samples by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) with tetramethylammonium hydroxide solubilization at room temperature. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 23:992-996.

- Shattenberg H.J. 1992. Pesticide residue survey of produce from 1989-1991. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 75:925-932.
- Schramm K.W. 2008. Hair-biomonitoring of organic pollutants. *Chemosphere* 72:1103-1111.
- Shah F, Kazi TG, Afridi HI, Kazi N, Baig JA, Shah AQ, Khan S, Kolachi NF, Wadhwa SK. 2011. Evaluation of status of trace and toxic metals in biological samples (scalp hair, blood, and urine) of normal and anemic children of two age groups. *Biological Trace Element Research*. 141(1-3):131-49.
- Skopp, G., Pötsch, L., Adejan, R., 1996. Experimental investigations on hair fibers as diffusion bridges and opiates as solutes in solution. *J. Forensic. Sci.* 41, 117-120.
- Tsatsakis AM, Psillakis TK, Tzatzarakis M, Kourtopoulos H, Paritsis N. 1997. Carbamazepine levels in the hair of patients under long-term treatment: a preliminary study. *Clinica Chimica Acta*. 1997 Jul 25;263(2):187-95.
- Tsatsakis AM, Psillakis T, Paritsis N. 2000. Phenytoin concentration in head hair sections: a method to evaluate the history of drug use. *Journal of Clinical Psychopharmacology*. 20(5):560-73.
- Tsatsakis, A.M., Bertias, G.K., Mamas, I.N., Stiakakis, I., Georgopoulos, D.B. 2001. Acute fatal poisoning by methomyl caused by inhalation and transdermal absorption. *Bull Environ Contam Toxicol*. 66(4), 415-420.
- Tsatsakis A.M., Tutudaki M. 2004. Progress in pesticide and POPs hair analysis for the assessment of exposure. *Forensic Science International* 145:195-199.
- Tsatsakis A.M., Tzatzarakis M.N., Tutudaki M. 2008. Pesticide levels in head hair samples of Cretan population as an indicator of present and past exposure. *Forensic Science International* 176:67-71.
- Tutudaki M., Tsatsakis A.M. 2005. Pesticide hair analysis: development of a GC-NCI-MS method to assess chronic exposure to diazinon in rats. *Journal of Analytical Toxicology* 29.
- USEPA. 1995. <http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/status.htm> (ultimo accesso 30 novembre 2011)
- Villain M., Crimele V., Kintz P. 2004. Hair analysis in toxicology. *Clin Chem Lab Med* 42:1265-1272.
- WHO. 1998. *Guidelines for Drinking-Water Quality*. 2 edizione.
- Yasutake A, Matsumoto M, Yamaguchi M, Hachiya N. 2003. Current hair mercury levels in Japanese: survey in five districts. *Tohoku J Exp Med*. 199(3):161-9.
- Zhang H., Chai Z., Sun H. 2007. Human hair as a potential biomonitor for assessing persistent organic pollutants. *Environmental International* 33:685-693.

Zrostlíková J., Hajšlová J., Poustka J., Begany P. 2002. Alternative calibration approaches to compensate the effect of co-extracted matrix components in liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry analysis of pesticide residues in plant materials. *Journal of Chromatography A* 973, 13-26.

Allegato 1a Informativa agricoltori

COLTIVAZIONE DI MAIS E VALUTAZIONE DELL'ESPOSIZIONE A TERBUTILAZINA

L'obiettivo di questo studio è **valutare il rischio** legato all'utilizzo di antiparassitari in agricoltura grazie alla partecipazione volontaria di agricoltori che applicano diserbanti.

Lo studio si svolgerà presso il laboratorio di Tossicologia Ambientale e Industriale della Clinica del Lavoro "L. Devoto" - Fondazione IRCCS Ospedale Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena di Milano.

La sostanza scelta per lo studio è la **TERBUTILAZINA**.

Per valutare il rischio è necessario quantificare l'esposizione a tale sostanza e quindi la dose assorbita. Per indagare la dose assorbita durante l'applicazione del diserbante abbiamo bisogno di 2 campioni di urina; per capire la dose totale di terbutilazina assorbita dall'organismo durante l'intera stagione di trattamenti un campione di capelli. Abbiamo bisogno anche di entrambi campioni raccolti nella stagione di riposo dai trattamenti da utilizzare come valore di riferimento.

La raccolta e la determinazione di questi indicatori avrà carattere confidenziale. Se vorrà potrà ritirare i risultati di questi esami al termine dello studio previo accordo telefonico con il Laboratorio di Tossicologia professionale (tel. 02 55032631 o 55032633, dott.sse Fustinoni, Mercadante, cell. 333 4540984 dott.ssa Polledri).

L'agricoltore potrà utilizzare i dati ottenuti da questo studio ed inserirli nel documento di valutazione dei rischi.

Per informazioni contattare

Elisa Polledri

Tel. 333-4540984

Quello che le chiediamo è:

1. **CAMPIONI DI URINA:**
CAMPIONE PRE-ESPOSIZIONE
 in un giorno qualsiasi a vostra scelta

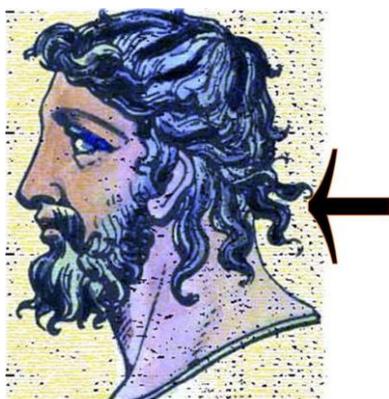


CAMPIONI POST-ESPOSIZIONE

- 2 campioni: **1** da raccogliere prima di andare a dormire nel giorno in cui effettuate il primo trattamento con TBA nella stagione, **2** il mattino successivo. (distribuiremo un sacchetto con i contenitori numerati in cui raccogliere ogni minzione, ed un foglio dove scriverne data e ora);



2. **CAMPIONI DI CAPELLI:**



La freccia indica la zona di campionamento dei capelli.

CAMPIONE PRE-ESPOSIZIONE nella stagione di riposo (Dicembre-Gennaio) o comunque prima del prossimo taglio di capelli che avete in programma (potete anche darci un campione di capelli tagliato direttamente dal vostro barbiere nella zona della nuca e depositato in una provetta da noi fornita);

CAMPIONI POST-ESPOSIZIONE a fine stagione dopo tutte le eventuali applicazioni del diserbante (Marzo-Luglio) e ogni qual volta voleste tagliarvi i capelli durante la stagione di applicazione pesticidi.

3. La compilazione del **QUESTIONARIO** e del **DIARIO DEI TRATTAMENTI** (verranno consegnati durante i prelievi dei campioni) per raccogliere informazioni relative all'utilizzo dei diserbanti. Tali informazioni sono necessarie per la corretta interpretazione dei valori misurati dei due indicatori.

Vi ringraziamo anticipatamente per la disponibilità.

Allegato 1b Informativa residenti rurali e urbani

COLTIVAZIONE DI MAIS E VALUTAZIONE DELL'ESPOSIZIONE A

TERBUTILAZINA

L'obiettivo di questo studio è **valutare il rischio** legato all'utilizzo di antiparassitari in agricoltura grazie alla partecipazione volontaria di agricoltori che applicano diserbanti.

Lo studio si svolgerà presso il laboratorio di Tossicologia Ambientale e Industriale della Clinica del Lavoro "L. Devoto" - Fondazione IRCCS Ospedale Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena di Milano.

La sostanza scelta per lo studio è la **TERBUTILAZINA**.

Per valutare il rischio è necessario quantificare l'esposizione a tale sostanza e quindi la dose assorbita. Per capire la dose totale di terbutilazina assorbita dall'organismo durante l'intera stagione di trattamenti un campione di capelli. Abbiamo bisogno anche un campione di capelli e uno di urina raccolti nella stagione di riposo dai trattamenti da utilizzare come valore di riferimento.

La raccolta e la determinazione di questi indicatori avrà carattere confidenziale. Se vorrà potrà ritirare i risultati di questi esami al termine dello studio previo accordo telefonico con il Laboratorio di Tossicologia professionale (tel. 02 55032631 o 55032633, dott.sse Fustinoni, Mercadante, cell. 333 4540984 dott.ssa Polledri).

L'agricoltore potrà utilizzare i dati ottenuti da questo studio ed inserirli nel documento di valutazione dei rischi.

Per informazioni contattare

Elisa Polledri

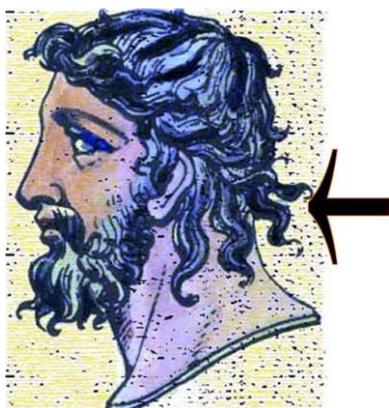
Tel. 333-4540984

Quello che le chiediamo è:

1. **CAMPIONI DI URINA:**
CAMPIONE PRE-ESPOSIZIONE
in un giorno qualsiasi a vostra scelta



2. **CAMPIONI DI CAPELLI:**



La freccia indica la zona di campionamento dei capelli.

CAMPIONE PRE-ESPOSIZIONE nella stagione di riposo (Dicembre-Gennaio) o comunque prima del prossimo taglio di capelli che avete in programma (potete anche darci un campione di capelli tagliato direttamente dal vostro barbiere nella zona della nuca e depositato in una provetta da noi fornita);

CAMPIONI POST-ESPOSIZIONE a fine stagione dopo tutte le eventuali applicazioni del diserbante (Marzo-Luglio) e ogni qual volta voleste tagliarvi i capelli durante la stagione di applicazione pesticidi.

3. La compilazione del **QUESTIONARIO** (verrà consegnato durante i prelievi dei campioni) per raccogliere informazioni relative all'utilizzo dei diserbanti. Tali informazioni sono necessarie per la corretta interpretazione dei valori misurati dei due indicatori.

Vi ringraziamo anticipatamente per la disponibilità.

Allegato 2

CONSENSO INFORMATO

Coltivazione di mais e valutazione dell'esposizione a Terbutilazina

L'obiettivo di questo studio è valutare il rischio legato all'utilizzo di antiparassitari in agricoltura grazie alla partecipazione volontaria di agricoltori che applicano diserbanti.

Lo studio si svolgerà presso il laboratorio di Tossicologia Ambientale e Industriale della Clinica del Lavoro "L. Devoto" - Fondazione IRCCS Ospedale Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena di Milano.

La sostanza scelta per lo studio è la terbutilazina che verrà determinata sia nei capelli che nelle urine.

La raccolta e la determinazione di questi indicatori avrà carattere confidenziale. Se vorrà potrà ritirare i risultati di questi esami al termine dello studio previo accordo telefonico con il Laboratorio di Tossicologia professionale (tel. 02 55032631 o 55032633, dott.sse Fustinoni o Mercadante).

Quello che le chiediamo è:

1. CAMPIONI DI URINA: **CAMPIONE PRE-ESPOSIZIONE, CAMPIONI POST-ESPOSIZIONE**
2. CAMPIONI DI CAPELLI: **CAMPIONE PRE-ESPOSIZIONE, CAMPIONI POST-ESPOSIZIONE**
3. La compilazione del **QUESTIONARIO** e del **DIARIO DEI TRATTAMENTI** allegato per raccogliere informazioni relative all'utilizzo dei diserbanti. Tali informazioni sono necessarie per la corretta interpretazione dei valori misurati dei due indicatori.

Il sottoscritto (nome e cognome) _____

acconsente a partecipare allo studio.

Data _____

Firma _____

Allegato 3

RACCOLTA CAMPIONE DI CAPELLI PER LA DETERMINAZIONE DI AGROFARMACI

data _____

Soggetto _____

Età _____ Peso _____

Fumatore SI NO

_____ **Radice** _____

Numero di sigarette fumate al giorno _____

Raccolta campione: cm dalla radice _____

_____ **Punta** _____

Allegato 4 Raccolta campioni urinari agricoltori

MODULO PER LA RACCOLTA DATI RELATIVI AI TRATTAMENTI AGRICOLTORI - Moscazzano (CR)

RACCOLTA CAMPIONE DI URINE POST ESPOSIZIONE

Generalità

NOME COGNOME	
CODICE CAMPIONE	
DATA DI NASCITA	

Trattamento

DATA TRATTAMENTO	
DURATA TOTALE TRATTAMENTO	
COLTURA	
CONDIZIONI CLIMATICHE	

Prodotto

NOME PRODOTTO	
PRINCIPIO ATTIVO	
CONCENTRAZIONE PRINCIPIO ATTIVO	
FORMULAZIONE liquido, polvere, granuli, sacchetti solubili ecc	

Miscelazione e carico

CAPACITA' SERBATOIO	
QUANTITA' FORMULATO UTILIZZATO	
DURATA OPERAZIONE	
NUMERO CARICHI AL GIORNO	

Applicazione

DOSE DI IMPIEGO (KG pa / HA)	
SUPERFICIE TRATTATA AL GIORNO	
<i>TIPO DI TRATTORE</i> (aperto - cabinato - condizionato)	
INTERVENTI SU UGELLI E ATTREZZATURE DURANTE IL TRATTAMENTO (tipo e numero)	
DURATA OPERAZIONE	

I fattori di riduzione

DISPOSITIVI DI PROTEZIONE INDIVIDUALE (stivali guanti tuta standard -fase di applicazione-, maschera -fase di miscelazione e carico-)	
---	--

Raccolta campione di urina

NUMERO CAMPIONE	DATA RACCOLTA CAMPIONE	ORA RACCOLTA CAMPIONE
1		
2		

DATA _____

Allegato 5 Raccolta campioni capelli agricoltori

MODULO PER LA RACCOLTA DATI RELATIVI AI TRATTAMENTI E ABITUDINI ALIMENTARI AGRICOLTORI - Moscazzano (CR)

RACCOLTA CAMPIONE DI CAPELLI POST ESPOSIZIONE

Generalità

NOME COGNOME	
CODICE CAMPIONE	

Trattamenti

NUMERO DI TRATTAMENTI EFFETTUATI DURANTE LA STAGIONE	
COLTURA/E	

Prodotti utilizzati

NUMERO TRATTAMENTO	DATA TRATTAMENTO	NOME PRODOTTO
1		
2		
3		
4		

DATI RELATIVI ALLE ABITUDINI ALIMENTARI**Consumo d'acqua**

TIPO DI ACQUA ASSUNTA ABITUALMENTE	RUBINETTO	POZZO	IN BOTTIGLIA
QUANTITA' GIORNALIERA ASSUNTA			

Consumo di cibi**Di stagione**

FREQUENZA (giorni mese)	MAI (0)	RARAMENTE (4-5)	SPESSO (8-10)	ABITUALMENTE (più di 15)
CONSUMO DI ORTAGGI COLTIVATI NELLA ZONA				
CONSUMO DI FRUTTA COLTIVATA NELLA ZONA				

Congelata/conserven

FREQUENZA (giorni mese)	MAI (0)	RARAMENTE (4-5)	SPESSO (8-10)	ABITUALMENTE (più di 15)
CONSUMO DI ORTAGGI COLTIVATI NELLA ZONA				
CONSUMO DI FRUTTA COLTIVATA NELLA ZONA				

DATA _____

Allegato 6 Raccolta campioni capelli residenti rurali

MODULO PER LA RACCOLTA DATI RESIDENTI RURALI - Moscazzano (CR)

RACCOLTA CAMPIONI PRE E POST ESPOSIZIONE

Generalità

NOME COGNOME	
CODICE CAMPIONE	
DATA DI NASCITA	

Attività lavorativa

OCCUPAZIONE	
LUOGO DI LAVORO	
DURATA LAVORO (ORE/DIE)	
MEZZO USATO PER RAGGIUNGERE IL LUOGO DI LAVORO	

Informazioni relative alla famiglia

Convivenza con persone che effettuano trattamenti su colture	SI	NO
Se si, lavaggio a mano di tute di lavoro	SI	NO

Informazioni relative alla residenza

Vicinanza della abitazione a campi sui quali si effettuano trattamenti su colture	SI	NO
Se si, indicare distanza		

DATI RELATIVI ALLE ABITUDINI ALIMENTARI**Consumo d'acqua**

TIPO DI ACQUA ASSUNTA ABITUALMENTE	RUBINETTO	POZZO	IN BOTTIGLIA
QUANTITA' GIORNALIERA ASSUNTA			

Consumo di cibi**Di stagione**

FREQUENZA (giorni mese)	MAI (0)	RARAMENTE (4-5)	SPESSO (8-10)	ABITUALMENTE (più di 15)
CONSUMO DI ORTAGGI COLTIVATI NELLA ZONA				
CONSUMO DI FRUTTA COLTIVATA NELLA ZONA				

Congelati/conserve

FREQUENZA (giorni mese)	MAI (0)	RARAMENTE (4-5)	SPESSO (8-10)	ABITUALMENTE (più di 15)
CONSUMO DI ORTAGGI COLTIVATI NELLA ZONA				
CONSUMO DI FRUTTA COLTIVATA NELLA ZONA				

Data _____

Allegato 7 foglio campionamento urine cinetica di escrezione

FOGLIO DI CAMPIONAMENTO DELLE URINE PER 24 ORE

Soggetto _____

RACCOLTA CAMPIONI

n.minzione	Data	Ora	Volume (mL)
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			
20			
21			
22			
23			
24			
25			
26			
27			
28			
29			
30			

Appendice: Pubblicazione prodotte e partecipazioni ai congressi

Pubblicazioni su riviste internazionali inerenti il progetto di ricerca

- R. Mercadante, E. Polledri, E. Giavini, E. Mengola, P.A. Bertazzi, S. Fustinoni. Terbutylazine in hair as a biomarker of exposure. *Toxicol. Lett.*, 2012 (doi:10.1016/j.toxlet.2011.11.018).

Pubblicazioni in preparazione su riviste internazionali inerenti il progetto di ricerca

- R. Mercadante, E. Polledri, S. Fustinoni. Determination of terbutylazine and desethylterbutylazine in human urine and hair by H-ESI-LC/MS-MS
- R. Mercadante, E. Polledri, S. Fustinoni. Biomonitoring terbutylazine in hair and urine of occupationally and environmentally exposed subject.

Pubblicazioni su riviste italiane inerenti il progetto di ricerca

- E. Polledri, R. Mercadante, P.A. Bertazzi, S. Fustinoni. Determinazione dell'erbicida terbutilazina nei capelli come indicatore di esposizione cumulativa. *G. Ital. Med. Lav. Erg.* 2010, 32:4 (Suppl. 2), 220-221.

Atti di Congressi Internazionali inerenti il progetto di ricerca

- S. Fustinoni, L. Campo, F. Rossella, R. Mercadante, P.A. Bertazzi. Validation of urinary benzene as biomarker of exposure: from occupational to environmental scenarios. "8th International Symposium on Biological Monitoring in Occupational and Environmental Health", 6-8 Settembre 2010, Espoo (Finlandia) Atti del Congresso, pag. 131.
- S. Fustinoni, R. Mercadante, E. Polledri, L. Campo, P.A. Bertazzi. Hair and urine specimens for biomonitoring short and long term terbutylazine exposure in agriculture workers and rural residents. "23rd Congress of the International Society for Environmental Epidemiology (ISEE)", 13-16 Settembre 2011, Barcellona (Spagna), Atti del Congresso.

Pubblicazioni su riviste internazionali inerenti altri progetti

- S. Fustinoni, R. Mercadante, L. Campo, L. Scibetta, C. Valla, V. Foà, Determination of urinary *ortho*- and *meta*-cresol in humans by headspace SPME gas chromatography/mass Spectrometry, *J. Chromatography B* (2005), 817: 309-317.
- S. Fustinoni, R. Mercadante, L. Campo, L. Scibetta, C. Valla, D. Consonni, V. Foà. Comparison between urinary *o*-cresol and toluene as biomarkers of toluene exposure. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, (2007), 4:1-9.
- L. Scibetta, L. Campo, R. Mercadante, V. Foà, S. Fustinoni, Determination of low level methyl tert-butyl ether, ethyl tert-butyl ether and methyl tert-amyl ether in human urine by HS-Spme gaschromatography/mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta* (2007), 581: 53-62.

- L. Campo, R. Mercadante, F. Rossella, S. Fustinoni. Quantification of 13 priority polycyclic aromatic hydrocarbons in human urine by headspace solid phase microextraction gas chromatography-isotope dilution mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* (2009), 631:196-205.
- S. Fustinoni, R. Mercadante, L. Campo. Self-collected urine sampling to study the kinetics of urinary toluene (and o-cresol) and define the best sampling time for biomonitoring. *Int Arch Occup Environ Health.* (2009), 82:703-713.
- S. Fustinoni, L. Campo, R. Mercadante, P. Manini. Methodological issues in biological monitoring of low exposures: the case of urinary benzene and s-phenylmercapturic acid. *J. Chromatogr. B* (2010), 878: 2534-2540.
- S. Fustinoni, F. Rossella, L. Campo, R. Mercadante, P.A. Bertazzi. Urinary BTEX, MTBE and naphthalene as biomarkers to gain environmental exposure profiles of the general population. *Sci. Tot. Environ.* (2010), 408: 2840-2849.
- S. Fustinoni, L. Campo, R. Mercadante, D. Consonni, D. Mielzynska, P.A. Bertazzi. A quantitative approach to evaluate urinary benzene and S-phenylmercapturic acid as biomarkers of low benzene exposure. *Biomarkers* (2011), 16(4): 334-345

Pubblicazioni su riviste italiane inerenti altri progetti

- S. Fustinoni, R. Mercadante, L. Campo, L. Scibetta, C. Valla, V. Foà. Confronto tra orto-cresolo e toluene urinari come indicatori biologici di esposizione a toluene aerodisperso. *G. Ital. Med. Lav. Erg.* 2004, 26 (4 Suppl): 63-64
- L. Scibetta, L. Campo, R. Mercadante, M. Buratti, F.M. Rubino, A. Colombi, V. Foà, S. Fustinoni, Valutazione di MTBE urinario come indicatore biologico di esposizione a vapori di benzina e traffico autoveicolare. *G. Ital. Med. Lav. Erg.* 2004, 26 (4 Suppl): 101.
- S. Fustinoni, R. Mercadante, F. Prestianni, L. Bordini, A. Todaro, L. Riboldi. Abuso di alcol etilico e lavoro: una sfida per il monitoraggio biologico. *G. Ital. Med. Lav. Erg.* 2008, 30:3 (Suppl. 2), 283-284.
- L. Campo, F. Rossella, R. Mercadante, P.A. Bertazzi, S. Fustinoni. Esposizione a composti organici volatili nella popolazione generale dell'area milanese: caratterizzazione del profilo di esposizione attraverso la misura dei composti non metabolizzati nell'urina. *G. Ital. Med. Lav. Erg.* 2009, 31:3 (Suppl. 2), 161-162.
- L. Campo, F. Rossella, R. Mercadante, E. Polledri, S. Fustinoni. Il questionario anamnestico è uno strumento valido per determinare l'abitudine al fumo di sigaretta? Valutazione di validità utilizzando la cotinina urinaria come standard. *G. Ital. Med. Lav. Erg.* 2009, 31:3 (Suppl. 2), 281-282.
- S. Fustinoni, L. Campo, R. Mercadante, P.A. Bertazzi. Confronto tra benzene urinario e acido S-fenilmercapturico urinario come indicatori di esposizione a benzene. *G. Ital. Med. Lav. Erg.* 2009, 31:3 (Suppl. 2), 307-308.

- R. Mercadante, E. Polledri, S. Fustinoni. Etilglucuronide ed etilsolfato come indicatori biologici di esposizione ad alcol etilico. *G. Ital. Med. Lav. Erg.* 2009, 31:3 (Suppl. 2), 342-343.

Atti di Congressi Internazionali inerenti altri progetti

- S. Fustinoni, R. Mercadante, L.Campo, L. Scibetta, C. Valla, V. Foà. Comparison between urinary o-cresol and toluene as biomarkers for assessing toluene exposure. 6th International Symposium on Biological Monitoring in Occupational and Environmental Health, 6-8 Settembre 2004, Heidelberg (Germany) Atti del Congresso, pag. 61.
- S. Fustinoni, R. Mercadante, F. Prestianni, D. Consonni, E. Grzybowska, L. Bisceglia, L. Campo, L. Kapka, E. Siwinska, P.A. Bertazzi, D. Mielzynska. S-phenylmercapturic acid vs. urinary benzene as biomarkers of exposure to benzene. "29th International Congress on Occupational Health (ICOH)", 22-27 Marzo 2009, Cape Town (South Africa), Atti del Congresso, pag. 90.
- S. Fustinoni, L. Campo, F. Rossella, R. Mercadante, P.A. Bertazzi. Validation of urinary benzene as biomarker of exposure: from occupational to environmental scenarios. "8th International Symposium on Biological Monitoring in Occupational and Environmental Health", 6-8 Settembre 2010, Espoo (Finlandia) Atti del Congresso, pag. 131.

Ringraziamenti

Ringrazio il Prof. Domenico Cavallo e il collegio dei Docenti della Commissione Dottorato in Scienze Ambientali per avermi dato la possibilità di svolgere questo importante percorso di formazione.

Questo lavoro è stato realizzato nel Laboratorio di Igiene Industriale e Tossicologia del Dipartimento di Medicina del Lavoro dell'Università degli Studi di Milano, desidero perciò ringraziare tutti coloro che ne hanno reso possibile lo svolgimento:

innanzitutto la Prof.ssa Silvia Fustinoni, che mi ha seguito con pazienza in tutte le fasi del lavoro, per la sua disponibilità e sostegno e per i suoi, come sempre, preziosissimi consigli;

la mia collega e amica Laura Campo per il suo sostegno fisico e mentale;

la mia collega e amica Elisa Polledri che ha collaborato con me in tutte le fasi di progettazione e realizzazione dello studio, per il suo preziosissimo supporto, impegno e infinita pazienza.

Un doveroso ringraziamento va inoltre al papà di Elisa e agli abitanti del suo paese che, rendendosi disponibili a collaborare, hanno reso possibile la realizzazione di questo progetto.

Desidero infine ringraziare mio marito Silvano e i miei figli Federico e Sveva per la profonda sensazione di serenità, felicità e amore che mi donano ogni giorno.