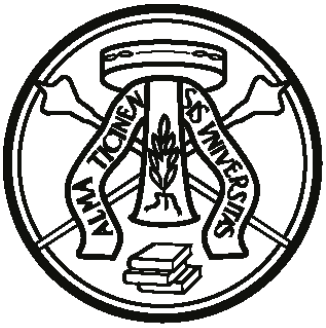


UNIVERSITA DEGLI STUDI DI PAVIA

Dipartimento di Biologia e Biotecnologie “L. Spallanzani”

Laurea Magistrale in Biologia Sperimentale e Applicata

Validazione di un metodo GC-MS/MS per il monitoraggio del 2-fenil-2-propanolo urinario a basse dosi: confronto tra popolazione generale e operatori professionalmente esposti

Relatore: Prof.ssa Ornella Pastoris

Correlatore: Dott. Francesco Saverio Robustelli della Cuna

Tesi Sperimentale di

Volpe Alessandro

Matricola n° 536312

Anno accademico 2024/2025

INDICE

1. INTRODUZIONE 1
1.1. Contaminazione ambientale e personale 3
1.2. Proprietà chimico-fisiche 5
1.3. Metabolismo 7
1.4. Metodiche analitiche disponibili per l'analisi del 2P2P 10
1.5. Normative 14
1.6. Validazione di un metodo cromatografico secondo le linee guida FDA . 15
1.6.1. Selettività 15
1.6.2. Limite inferiore di quantificazione 16
1.6.3. Curva di calibrazione 17
1.6.4. Sensibilità. 17
1.6.5. Precisione 18
1.6.6. Accuratezza 19
1.6.7. Recupero 20
1.6.8. Effetto matrice 21
1.6.9. Stabilità 23
2. SCOPO DELLO STUDIO 24
3. MATERIALI E METODI 26
3.6. Partecipanti allo studio 29
3.7. Questionario 30
3.8. Gestione analisi dei dati 30
3.9. Determinazione dei valori di riferimento (RVs) per il 2P2P urinario 31
4. RISULTATI 32
4.1. descrizione della popolazione di studio 41
4.2. Valori di 2P2P nei campioni biologici di soggetti non esposti 44
4.3. Valori di 2P2P nei campioni biologici di soggetti esposti 47
4.4. Valutazione dei livelli di 2P2P nei soggetti esposti tra prima e dopo il turno di lavoro 51
4.5. Valutazione dei livelli di 2P2P nei soggetti non esposti rispetto a soggetti esposti 51
5. DISCUSSIONE 56
6. CONCLUSIONI 57
7. BIBLIOGRAFIA 58

1. INTRODUZIONE

Il termine esposizione ambientale fa riferimento al contatto tra i soggetti e le sostanze presenti nell'ambiente in cui vivono o lavorano. Nell'ambiente possono essere presenti numerose tipologie di agenti, quali sostanze chimiche, fattori fisici o organismi biologici, il cui contatto avviene attraverso differenti modalità. Le vie di esposizione principali sono rappresentate dall'esposizione inalatoria, cutanea e per ingestione accidentale. Gli effetti dell'esposizione sulla salute umana dipendono da diversi fattori, quali la quantità della sostanza, il tempo di esposizione e le caratteristiche del soggetto esposto.

Nella società moderna vengono utilizzate moltissime sostanze chimiche, soprattutto nei processi industriali, nei carburanti e in molti prodotti di uso quotidiano. Tali sostanze possono disperdersi nell'ambiente, nell'aria, nell'acqua o nel suolo, divenendo una possibile fonte di esposizione sia per la popolazione sia per i lavoratori. Per tale motivo è molto importante studiare le esposizioni ambientali, così da poter meglio comprendere i possibili rischi e individuare strategie per ridurle e proteggere la salute. Per analizzare l'esposizione ambientale è fondamentale conoscere le sostanze coinvolte, le caratteristiche chimiche e i possibili effetti sull'organismo.

I composti organici volatili, utilizzati soprattutto nell'industria chimica e petrolchimica, rappresentano le sostanze più studiate. Tra questi si ritrova il Cumene, un idrocarburo aromatico ampiamente impiegato a livello industriale. Il cumene (isopropil-benzene) è un idrocarburo aromatico appartenente alla famiglia dei derivati del benzene. La struttura è composta da un anello benzenico al quale è legata una catena isopropilica (Figura 1).

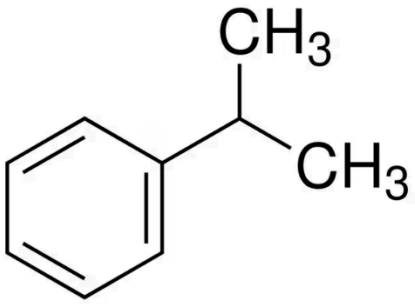


Figura 1: struttura chimica del cumene.

Il cumene è un composto presente naturalmente nel petrolio e nei prodotti da esso derivati [1]. A livello industriale viene principalmente utilizzato come intermedio nella produzione di acetone e fenoli. Tra gli utilizzi industriali minori sono noti: sintesi di stireni, metil stireni, acetofenone e detergenti, utilizzato come agente catalizzante per resine acriliche e poliestere, diluente per vernici e come solvente di estrazione [2]. Quantità minori sono impiegate nella stampa, nella produzione della gomma e nella miscelazione della benzina per l'ottenimento di carburante ad alto numero di ottani [3]. A livello ambientale, il cumene è un inquinante ubiquitario emesso dai prodotti derivati dal petrolio, come combustibili dei mezzi di trasporto, dalle stazioni di rifornimento, attraverso perdite evaporative e dal fumo di sigaretta [4]. Tracce di cumene sono state trovate in acqua, aria e terreno in percentuali ridotte e variabili a seconda della zona presa in esame (rurale, cittadina e industriale). La presenza è anche riportata in alcune piante e spezie (i.e. *Arnica montana*, *Zingiber roseum*) e in frutti (papaya e pomodori) [5].

Capire dove si trova il cumene, come può avvenire l'esposizione e quali effetti può avere sulla salute è importante per poter monitorare la presenza nell'ambiente e adottare misure di sicurezza adeguate, con l'obiettivo di tutelare la salute.[6].

1.1. Contaminazione ambientale e personale

Il composto si trova come costituente minore in composti geologici (es. petrolio greggio, catrame di carbone), di conseguenza il rilascio ambientale è prevalentemente antropogenico, derivante soprattutto dalla combustione di carburanti e dalle emissioni dei processi industriali [7,8]. Inoltre il cumene viene utilizzato per la sintesi di stireni, metil stireni, acetofenone e detergenti o come intermedio di reazione per la produzione di acetone e fenoli [2]. La via preferenziale dell'assorbimento del cumene è la via respiratoria e in forma minore la via transcutanea. Dopo l'assorbimento circa il 5% del cumene inalato viene eliminato tramite espirazione.

Il cumene si trova principalmente nell'aria grazie all'elevata volatilità. Nell'atmosfera si degrada fotochimicamente con tempi di dimezzamento da alcune ore a pochi giorni [8]. In acqua e suolo presenta moderata mobilità e tendenza ad essere adsorbito dalla materia organica. L'esposizione della popolazione generale avviene principalmente per inalazione dell'aria contaminata. I lavoratori nel settore petrolchimico o che impiegano direttamente il cumene sono invece esposti a concentrazioni molto più elevate [9].

Esposizioni a dosi minori sono possibili attraverso l'alimentazione, aree intensamente trafficate e in soggetti fumatori.

I principali organi bersaglio sono:

- Sistema nervoso centrale: cefalea, vertigini, narcosi, riduzione della coordinazione motoria
- Apparato respiratorio: irritazione delle mucose.
- Cute: dermatiti irritative per effetto solvente sui lipidi epidermici.

Essendo classificato come IARC 2B (possibile cancerogeno per l'uomo), gli effetti di un'esposizione cronica portano a:

- epatotossicità con danni al fegato che possono causare stress ossidativo, necrosi e apoptosi degli epatociti.
- nefrotossicità con danni ai reni con possibili necrosi, alterazione della funzione renale e aumento di creatinina nel sangue.
- possibili tumori epatici e polmonari

1.2. Proprietà chimico-fisiche

La struttura chimica conferisce stabilità e rende il composto solubile in numerosi solventi organici, ma poco solubile in acqua. A temperatura ambiente il cumene si presenta come un liquido incolore con odore aromatico simile alla benzina e, come molti idrocarburi, è volatile e infiammabile. La densità è di poco inferiore a quella dell'acqua. Ha un punto di ebollizione di circa 152 °C e un punto di fusione intorno a −96 °C, questo permetterebbe di rimanere allo stato liquido in quasi tutte le condizioni ambientali. Il cumene tende a evaporare abbastanza facilmente, perciò i vapori possono diffondersi rapidamente nell'aria.

Chimicamente è stabile, ma può reagire con l'ossigeno formando composti ossidati, proprietà sfruttata in industria per produrre altri prodotti chimici come il fenolo e l'acetone.

Le proprietà chimico-fisiche più importanti sono riassunte nella Tabella 1

Proprietà	Informazioni
Formula bruta	C_9H_{12}
Peso molecolare	120.2 a
Punto di fusione	-96°C
Punto di ebollizione	152.4° C
Punto di infiammabilità	102° C
Solubilità	
Acqua (20°)	50 mg/L
Solventi organici	Solubile
Coefficiente di ripartizione ottano/acqua (log Kow)	3.66 b
Pressione di vapore (mm Hg)	
Densità di vapore (air=1)	4.1 a
Temperatura critica	358° C

Tabella 1: proprietà chimico-fisiche del cumene

Il cumene ha dimostrato di possedere proprietà tossiche, responsabili di effetti depressivi a carico del SNC. L'esposizione può portare alla formazione di carcinomi polmonari, soprattutto a livello degli alveoli, dei bronchi, e adenomi renali. [10,11].

Nell'uomo una breve esposizione porta a confusione, sonnolenza, perdita di conoscenza e irritazione della cute e del tratto respiratorio.

La Classificazione di pericolo (CLP – Reg. CE 1272/2008) ha definito il cumene come possibile cancerogeno per l'uomo (IARC 2B), altamente tossico sia per la popolazione che per l'ambiente esterno.

1.3. Metabolismo

La via preferenziale dell'assorbimento del cumene è la via respiratoria e in forma minore la via transcutanea e gastro-enterica. Dopo l'assorbimento circa il 5% del cumene inalato viene eliminato tramite l'apparato respiratorio. Come per la maggior parte delle sostanze assorbite dall'organismo, anche il cumene viene metabolizzato a livello epatico tramite ossidazione della catena isopropilica (reazione di Fase 1). I metaboliti generati dopo l'ossidazione sono: 2-fenil-2-propanolo (metabolita principale 50% della dose assorbita), 2-fenil-1-propanolo (25%) e acido 2-fenil-propionico (25%). Successivamente i due metaboliti idrossilati sono coniugati con acido glucuronico (reazione di Fase 2) per formare i corrispondenti glucuronidi (Figura 2). Al contrario, l'acido 2-fenilpropionico è coniugato con la glicina [8]. I prodotti finali del metabolismo del cumene vengono eliminati principalmente attraverso le urine, mentre una piccola quantità può essere eliminata immodificata tramite l'aria espirata. Nel complesso, il metabolismo del cumene rappresenta un importante meccanismo di detossificazione che consente all'organismo di ridurre la potenziale tossicità della sostanza. Tuttavia, in caso di esposizione elevata o prolungata, alcuni metaboliti possono contribuire agli effetti tossici osservati in organi quali fegato e SNC.

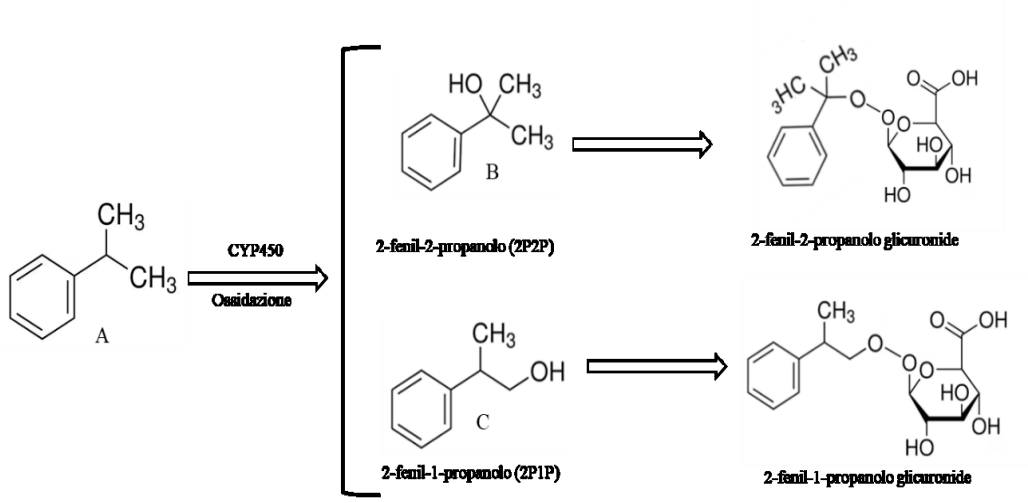


Figura 2: metabolismo epatico del cumene.

L'esposizione a elevate dosi di cumene avviene principalmente nei luoghi di lavoro dove il composto viene manipolato o è presente come prodotto di scarto o aerodisperso. Come altri alchilbenzeni, nell'animale da esperimento anche il cumene ha dimostrato di possedere proprietà tossiche a carico del SNC. In modelli murini dopo l'esposizione a vapori di cumene (2000-8000 ppm per 20 minuti) sono stati evidenziati sintomi correlati a farmaci con effetti depressivi del SNC [10]. È stata osservata un'elevata incidenza di adenomi e carcinomi polmonari a livello degli alveoli e dei bronchi [11] e adenomi renali in modelli murini di sesso maschile. Nell'uomo l'esposizione a breve termine causa confusione, sonnolenza, disturbi di coordinazione lievi e, nei casi più gravi, perdita di conoscenza e irritazione a occhi, cute e tratto respiratorio. La classificazione del cumene nell'Unione Europea (UE) è stata recentemente aggiornata. Secondo il regolamento delegato (UE) 2022/692, che modifica il Regolamento (CE) n. 1272/2008 (18° ATP) per il suo adeguamento al progresso tecnico e scientifico, è attualmente classificato come H226 (Liquido infiammabile 3), H350 (carcinogeno 1B), H304 (può essere

letale se ingerito o inalato) H335 (può irritare le vie respiratorie) e H411 (tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata) [12]. Sebbene il cumene sia classificato nell'UE come cancerogeno di classe 1B (possibile cancerogeno per l'uomo) [13], il valore limite di esposizione professionale non è ancora stato modificato. Inoltre, la classificazione della cancerogenicità è A3 (cancerogeno confermato per gli animali con rilevanza sconosciuta). Dal momento che il 2P2P rappresenta il metabolita principale, è stato scelto come biomarker per la valutazione del grado di esposizione al cumene. [14],

1.4. Metodiche analitiche disponibili per l'analisi del 2P2P

Dal 1976 ad oggi, per la determinazione dei principali metaboliti del cumene, sono presenti in letteratura solo tre metodi analitici [15-17]. Il primo metodo proposto da Goenechea et al. [15] prevede l'idrolisi acida dei glicuronati presenti nell'urina (100ml) mediante l'utilizzo di HCl 37% per 15 minuti. Successivamente il campione viene alcalinizzato con NaOH ed estratto con metil cloruro. Il solvente è evaporato a secchezza, ripreso con acetone e addizionato dello standard interno (*n*-undecano). Le analisi sono effettuate mediante gascromatografia abbinata a detector a ionizzazione di fiamma (GC-FID), utilizzando una colonna OV-17 (50% Difenil, 50% Dimetilpolisilossano). Il limite di sensibilità del metodo è di 950 ng/ml. Il secondo metodo, sviluppato da Knecht [16], prevede l'idrolisi acida del campione di urina (2 ml) addizionato dello standard interno 2-(4-fluorofenil)etanolo, mediante l'utilizzo di HCl 37% per 60 minuti a 90°C. Successivamente il campione viene neutralizzato con NaOH e saturato con NaCl. Seguono due estrazioni con etere dietilico e successiva evaporazione del solvente, previa aggiunta di n-butil acetato (keeper) per evitare la perdita di analita durante l'evaporazione. Il residuo viene derivatizzato con anidride acetica e piridina a 75°C per 60 minuti. Le analisi sono effettuate mediante gascromatografia abbinata a detector a ionizzazione di fiamma (GC-FID), utilizzando una colonna CP-Sil 19 CB (14%-cianopropilfenil-86%-dimetilpolisilossano). Il limite di sensibilità del metodo è di 500 ng/ml. Recentemente Dugheri et al. [17] hanno sviluppato un metodo che utilizza la gascromatografia abbinata a spettrometria di massa a singolo quadrupolo (GC-MS). Anche in questo caso la deconiugazione dei glicuronidi avviene mediante idrolisi acida. Nel dettaglio, il campione di urina (2 ml) addizionato di standard interno 2-(4-fluorofenil)etanolo , viene idrolizzato con HCl 37% per 60 minuti a 90°C in vial da spazio di testa. Successivamente il campione è

neutralizzato con NaOH e derivatizzato con anidride acetica e piridina a 75°C per 50 minuti. L'estrazione è effettuata mediante l'utilizzo di un dispositivo per micro-estrazione in fase solida (SPME) con fibra in polidimetil silossano (PDMS-FFA) a 10°C per 5 minuti. Le analisi sono effettuate mediante GC-MS, utilizzando una colonna CP-Sil 19 CB (14%-cianopropilfenil-86%-dimetilpolisilossano). Il limite di sensibilità del metodo è pari a 100 ng/ml. Nel 2025, presso il Centro ricerche ambientali dell'IRCCS Maugeri di Pavia è stato sviluppato e validato un metodo in GC-MS/MS in grado di determinare il 2P2P con un limite di rilevabilità pari a 0.04 ng/ml. Le caratteristiche dei metodi analitici descritti è riassunta nella Tabella 2.

Autori	Goenechea et al. [15]	Knecht [16]	Dugheri et al. [17]	Robustelli della Cuna et al. [18]
Strumentazione	(GC/FID)	(GC/FID)	(GC-MS)	(GC-MS/MS)
Preparazione del Campione	Idrolisi con HCl 37%, LLE con cloruro di metile	Idrolisi con HCl 37%, LLE con etere dietilico,	Idrolisi con HCl 37%, SPME per l'estrazione del campione	Idrolisi con β-glicuronidasi, LLE con etile acetato
Derivatizzazione	No	Anidride acetica e piridina	Anidride acetica e piridina	No
LOD 2P2P	NR	0,5 mg/L	0,034 mg/L	0,04 ng/ml
LOQ 2P2P	NR	1,5 mg/L	0,10 mg/L	0,16 ng/ml
Effetto Matrice 2P2P	NR	NR	NR	85-90%
Precisione (CV% intra-day e inter-day) 2P2P	6,90%	8,6% (intra-day), 9,8% (inter-day)	<5% (metodo ottimizzato)	<5% (intra-day), 6.19% (inter-day)
LOD 2P1P	NR	NR	NR	0,16 ng/ml
LOQ 2P1P	NR	NR	NR	0,0.44 ng/ml
Effetto Matrice 2P1P	NR	NR	NR	100%
Precisione (CV% intra-day e inter-day) 2P1P	NR	NR	NR	<5% (intra-day), 10.16% (inter-day)

LLE= estrazione liquido/liquido, NR= non riportato, LOD =limite di rilevabilità , LOQ= limite di quantificazione .

Tabella 2: confronto dei metodi analitici per la determinazione del 2P2P e 2P1P in urina.

Il metodo di Robustelli della Cuna et al. è stato applicato all'analisi di campioni biologici (urina) di operatori professionalmente esposti a cumene. Sono stati sottoposti a monitoraggio 49 lavoratori professionalmente esposti a cumene idroperossido. Il prelievo dei campioni di urina è stato effettuato all'inizio e alla fine di un giorno lavorativo. Unitamente all'analisi dei metaboliti di interesse, è stata determinata la creatinina urinaria per correlare il dato relativo alle

concentrazioni di analita. Le caratteristiche dei soggetti analizzati e le concentrazioni di 2P2P sono riassunti nella Tabella 3.

Operatori	Sesso	Fumatori	Età (range)	2P2P IT μg/g creatinina (range)	2P2P FT μg/g creatinina (range)
45	M	5	25-61	0.29-27.24	0.96-104.49
4	F	1	23-59	1.64-11.23	1.56-37.08

Tabella 3: caratteristiche degli operatori e risultati del monitoraggio biologico

1.5. Normative

Secondo il regolamento delegato (UE) 2022/692 il cumene è attualmente classificato come H226 (Liquido infiammabile 3), H304 (può essere letale se ingerito o inalato), H335 (può irritare le vie respiratorie), H350 (cancerogeno 1B) e H411 (tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata) [12]. Le principali organizzazioni stabiliscono limiti di esposizione nell'arco della giornata lavorativa (TWA) e limiti di esposizione professionale nel breve termine (STEL). I valori sono riassunti nella tabella 4.

PARAMETRO	**VALORE**
TWA	50 mg/m³
	10 ppm
STEL	250 mg/m³
	50 ppm

Tabella 4: valori limite soglia di esposizione

1.6. Validazione di un metodo cromatografico secondo le linee guida FDA

Lo sviluppo del metodo include l'ottimizzazione dei seguenti parametri bioanalitici per garantire l'efficacia del metodo per la validazione:

1) Selettività
2) Limite inferiore di quantificazione
3) Curva di calibrazione
4) Accuratezza ed esattezza
5) Precisione
6) Recupero
7) Effetto matrice
8) Stabilità

1.6.1. Selettività

La selettività o specificità di un metodo potrebbe essere influenzata dalla presenza di analiti e/o metaboliti interferenti, dal protocollo seguito per la preparazione del campione e dal metodo strumentale utilizzato come ad esempio la separazione cromatografica. Il metodo cromatografico deve essere in grado di differenziare nella matrice biologica sia gli analiti d'interesse sia lo standard interno (IS) dai composti endogeni o da altri componenti presenti nel campione del paziente. La selettività deve essere provata analizzando almeno 6 diverse matrici bianche, analizzate individualmente, verificando l'assenza di potenziali interferenti. Se vengono analizzate delle molecole esogene, possono essere usati 6 campioni di soggetti che non contengono la molecola d'interesse. Inoltre, devono anche essere considerati i principali contaminanti che potrebbero

essere presenti nella popolazione dello studio. Solo in caso di uso di matrici rare (quali essudati, fluido cerebrospinale, tessuti solidi) e per applicazioni non routinarie il numero di tali prove può essere ridotto. Generalmente, l'assenza di inferenti è accettata quando la risposta per gli analiti è al di sotto del 20% del limite inferiore di quantificazione (LLOQ) e del 5% per lo IS. Come richiesto dalle linee guida, per tutti i metodi è necessario valutare quali tra i possibili analiti che potrebbero interferire con gli analiti d'interesse, possono essere riscontrati nei campioni dei pazienti. È necessario prestare attenzione ad eventuali interferenze date da prodotti di degradazione generati durante la preparazione dei campioni; effettuando delle preparazioni complesse (che richiedono ad esempio idrolisi o derivatizzazione) è necessario valutare la presenza o l'assenza di picchi interferenti derivati dal trattamento del campione. Questa valutazione può essere fatta analizzando almeno sei differenti campioni ottenuti da pazienti reali. Se i picchi interferenti hanno dei tempi di ritenzione vicini a quelli dell'analita(i) e/o dello/degli IS, devono essere separati cromatograficamente, oppure i metodi devono essere ottimizzati al fine di effettuare la totale separazione. Per verificare le interferenze durante le analisi di campioni reali, la valutazione di transizioni di massa multiple, assieme al rapporto delle loro intensità relative, permette di discriminare gli analiti target da tutte le possibili interferenze.

1.6.2. Limite inferiore di quantificazione

Il LLOQ rappresenta la concentrazione più bassa di analita, misurata su 40 replicati per almeno 5 sedute analitiche che fornisce un picco identificabile con una precisione del 20% e un'inaccuratezza del 15%. Il LOQ dovrebbe essere utilizzato come punto più basso della curva di calibrazione.

1.6.3. Curva di calibrazione

Per ogni analita studiato deve essere allestita una curva di calibrazione che copra un intervallo di valori clinicamente significativo. Gli standard di calibrazione possono contenere più di un analita. La risposta (segnale, area/altezza del picco) dello strumento in relazione alla concentrazione di analita deve essere valutata e descritta adeguatamente nell'intervallo di concentrazione specificato. La curva deve essere preparata utilizzando un minimo di 6 livelli di concentrazione. Nella curva deve essere presente il calibratore zero (non utilizzato solitamente per costruire la curva) ovvero la matrice priva dell'analita, ma contenente lo SI. La curva di calibrazione dovrebbe essere inserita all'inizio di ciascuna seduta analitica (eventualmente anche alla fine per metodi e/o sessioni di analisi estremamente lunghe). L'equazione generalmente che meglio descrive la curva di calibrazione è di tipo lineare. Per ogni curva di calibrazione con un equazione: $Y = bX + a$, si raccomanda di valutare R^2 (ideale > 0.995), pendenza e intercetta. Il materiale utilizzato per la preparazione delle curve di calibrazione deve essere del massimo grado di purezza disponibile. I calibratori possono essere acquistati se commercialmente disponibili, oppure sintetizzati in laboratorio. Le curve di calibrazione dovrebbero essere preparate aggiungendo quantità note di standard alla stessa matrice utilizzata per l'analisi. Le curve di calibrazione possono essere congelate se si dimostra che l'analita è stabile mediante appropriati studi di stabilità.

1.6.4. Sensibilità.

La sensibilità (capacità discriminare tra l'intensità di due segnali di campioni a concentrazione diversa) in cromatografia può essere confusa con il LOD, ovvero la concentrazione alla quale il rivelatore restituisce un segnale dell'analita almeno 5 volte superiore il segnale di base di un campione bianco. Secondo le linee guida FDA del 2013 la sensibilità viene

definita come “la concentrazione minima di analita che può essere misurata con precisione e accuratezza accettabili (precisamente il LLOQ)”.

1.6.5. Precisione

La precisione o imprecisione di un metodo analitico è definita come il grado di concordanza fra misurazioni indipendenti di concentrazione di un’analita e deve includere tutto il processo di analisi, dalla raccolta del campione e conservazione, alla preparazione (estrazione e purificazione) fino all’analisi strumentale. Per una valutazione adeguata della precisione devono essere preparate e conservate, nelle stesse e opportune condizioni (è essenziale verificare prima la stabilità dell’analita), più aliquote di una sufficiente quantità omogenea della matrice biologica utilizzata. Possono essere utilizzati, se disponibili commercialmente, materiali di controllo a più livelli di concentrazione. È importante verificare che tra i materiali di controllo e i campioni da analizzare non esistano delle discrepanze di matrice (è essenziale valutare prima l’effetto matrice). In alternativa, o meglio anche contestualmente, è preferibile utilizzare dei pool di diversi campioni di soggetti rispetto ai singoli campioni. La concentrazione dei materiali da valutare deve essere scelta in maniera tale da coprire l’intero intervallo di misurazione e, se previsto, deve includere un valore soglia o di decisione clinica. Nel caso non si riesca a ottenere dei pool a elevate concentrazioni si può effettuare una aggiunta di standard puro (“spiking”; il campione così trattato viene definito “spiked”). La precisione deve essere valutata per un minimo di tre livelli di concentrazione (basso, medio ed elevato). Qualora si utilizzassero materiali di controllo commerciali è necessario valutare la precisione anche per almeno un pool di campioni per verificare l’effettiva commutabilità della matrice. La precisione deve essere valutata con almeno 10 misurazioni indipendenti per ogni livello di

concentrazione e viene espressa come coefficiente di variazione percentuale con la seguente formula:

%CV = DS della Media x 100 / Media.

La precisione deve essere valutata sia nella stessa seduta analitica che tra sedute analitiche diverse. Per i campioni con una concentrazione pari ai tre controlli di qualità (alto, medio e basso), il CV non deve essere superiore al 15%; per i campioni con una concentrazione pari al LLOQ, il CV non deve essere superiore al 20%. Valori superiori di imprecisione possono essere accettati o valori di imprecisione inferiore devono essere rispettati, qualora esistano documenti riconosciuti validi come linee guida locali o regionali o specifiche per una determinata classe di sostanza (ad esempio i farmaci) oppure da criteri universalmente riconosciuti basati sulla variabilità biologica.

1.6.6. Accuratezza

L'esattezza o inesattezza (bias) rappresenta il grado di concordanza tra il valore medio ottenuto a partire da diverse determinazioni dello stesso misurando e un valore di riferimento accettato (detto anche valore vero del misurando). Viene espressa come bias, ossia lo scostamento sistematico rispetto al valore vero (la differenza tra il valore ottenuto e il valore atteso) che può quindi essere positivo oppure negativo. L'esattezza non deve essere considerata un sinonimo di accuratezza, termine che attualmente viene utilizzato per indicare il grado di concordanza fra il risultato di una singola misurazione e il valore vero del misurando, e questo viene espresso come errore totale della misura. L'esattezza dipenderà da quanto accurata è la scelta dei materiali di calibrazione, dalla concentrazione e soprattutto dalla scelta della matrice che deve essere il più possibile simile con quella dei campioni reali. L'esattezza può essere valutata come bias utilizzando un materiale di riferimento certificato. Il recupero, parametro che indica la quantità di analita determinata da un metodo di analisi rispetto alla quantità

totale, viene espresso come percentuale del rapporto tra la concentrazione aggiunta (nella fase di valutazione dello stesso) rispetto a quella misurata. La differenza tra il recupero ottimale (100%) e il valore ottenuto determina il valore di bias% da utilizzare per valutare l'esattezza del metodo. Utilizzare più di un approccio è decisamente raccomandato, in modo tale da assicurare una valutazione più accurata e completa possibile dell'esattezza.

I controlli di qualità [22] vengono utilizzati per valutare la precisione e l'accuratezza di un test e la stabilità dei campioni. I QC devono essere preparati nella stessa matrice dei campioni in studio e analizzati con il metodo validato. Durante la validazione del metodo, i QC valutano le prestazioni di un metodo e la stabilità dell'analita. I QC di stabilità valutano la stabilità dell'analita in varie condizioni di stress. I QC dovrebbero essere recuperati privi di interferenze o effetti matrice.

1.6.7. Recupero

L'elevato recupero dell'analita dalla matrice è un risultato desiderabile della preparazione del campione, ed è quindi una caratteristica importante della procedura di estrazione. La valutazione del recupero è suddivisa in recupero assoluto, relativo e recupero dell'estrazione. Il recupero assoluto è il rapporto percentuale della risposta del rivelatore ottenuto da un campione di matrice bianca fortificata con l'analita, trattata seguendo l'intera procedura analitica, e un campione standard pulito e direttamente iniettato nello strumento, che rappresenta il recupero del 100%. Quando non è disponibile una matrice bianca, si consiglia di utilizzare almeno 6 campioni con bassa concentrazione di analita misurata prima della procedura di estrazione. Il recupero relativo è il rapporto percentuale della risposta del rivelatore ottenuto da un campione in bianco con l'aggiunta dell'analita e un campione standard pulito, entrambi trattati secondo l'intera procedura analitica. Per entrambi, il recupero dell'analita non deve

essere necessariamente al 100%, i criteri di accettazione sono soddisfatti quando i risultati sono tra 90-110%. Il recupero dell'estrazione è il rapporto percentuale della risposta del rivelatore ottenuta da un campione di matrice vuota fortificata con l'analita prima del trattamento e lo stesso campione in bianco fortificato con l'analita, alla stessa concentrazione nominale, dopo essere stato trattato secondo l'intera procedura analitica. Il recupero dell'estrazione di un analita e del suo IS devono essere coerenti e riproducibili (criteri di accettazione 60-140%), possibilmente con un errore standard relativo inferiore al 10%. Per valutare se le perdite di analita nell'estrazione sono dovute a effetti matrice o realmente a scarsa estrazione, tutti gli esperimenti di recupero dovrebbero essere eseguiti durante lo sviluppo del metodo.

1.6.8. Effetto matrice

L'effetto matrice (ME) è uno dei più importanti parametri da investigare durante lo sviluppo di un metodo in spettrometria di massa; tale effetto può dare origine a una soppressione o, più raramente, a un incremento del segnale. L'effetto matrice è collegato all'eluizione di componenti della matrice del campione in analisi, quali i fosfolipidi, gli acidi organici, i sali, capaci di influenzare lo stato di carica all'interno della sorgente ionica. Questo effetto può condizionare parametri quali il LOD, il LOQ, la precisione e l'accuratezza del metodo.

Per questo motivo, l'effetto matrice di un metodo dovrebbe essere entro ±20%; in caso contrario il laboratorio deve valutare il suo impatto sugli altri parametri di validazione. Se il ME supera ±20%, potrebbero essere necessarie modifiche al metodo cromatografico e/o alla preparazione del campione e/o all'IS. La valutazione post-estrazione dell'effetto matrice è il metodo di eccellenza in quanto permette una misurazione diretta sia sugli analiti che sugli standard interni. I campioni privi di analita e i campioni fortificati post-estrazione devono essere preparati da almeno 6

lotti di campioni differenti e/o, se possibile, devono derivare da donatori differenti. La matrice priva di analita viene estratta secondo metodica. Al campione estratto viene aggiunta una quantità nota di analita. L'area dell'analita ottenuta da questo campione viene comparata con l'area ottenuta da una soluzione di analita in solvente con una concentrazione uguale al campione fortificato. L'analisi deve essere effettuata almeno su 6 lotti differenti di matrice commerciale o su 6 differenti donatori (ove disponibili) entrambi privi dell'analita. Per ogni lotto di matrice (o paziente) devono essere analizzate 3 differenti concentrazioni rappresentative della distribuzione dei valori biologici/patologici o terapeutici/tossici. L'effetto matrice è calcolato indipendentemente per ogni lotto di matrice/paziente e per ogni analita nel seguente modo:

*ME%: (Ax Solvente / Ax matrice)*100*

Ax Solvente = Area dell'analita "x" in solvente

Ax matrice = Area dell'analita "x" nel campione di matrice dopo estrazione

La media dei ME% è comunemente utilizzata per la valutazione dell'effetto matrice. La valutazione della relazione degli effetti matrice di analita e IS è particolarmente importante nel caso in cui si utilizzino IS non marcati con isotopi stabili o nel caso in cui si usino IS marcati con isotopi stabili ma con separazione con "Ultra High Performance Liquid Chromatography" (UHPLC) nella quale la differente acidità degli IS marcati con deuteri (2H) potrebbe dare una sufficiente separazione cromatografica tale da non sovrapporre perfettamente i cromatogrammi di IS e analita. Per questo motivo la valutazione di un effetto matrice

normalizzato (nME) diventa importante al fine di valutare tutti gli analiti coinvolti nel metodo quantitativo (analita e IS).

1.6.9. Stabilità

Lo studio della stabilità è una parte importante del metodo di validazione al fine di garantire una corretta gestione di tutti i reagenti e dei campioni durante l'intero processo di analisi. Lo studio della stabilità deve valutare tutte le soluzioni, reagenti e campioni durante la raccolta dei campioni (prelievo), lo stoccaggio dei campioni a breve termine, lo stoccaggio dei campioni a lungo termine, i cicli di congelamento/scongelamento, lo stoccaggio dopo processamento/estrazione (prima dell'analisi). I parametri e le condizioni da valutare dovrebbero eccedere o al limite coprire i normali tempi delle procedure di campionamento e analisi (come stimato dalla normale gestione del laboratorio). In generale le condizioni minime da valutare sono: stabilità a differenti tempi di conservazione e a differenti temperature, stabilità alla luce (indiretta ed eventualmente diretta), stabilità a ripetuti cicli di congelamento/scongelamento. Un campione è considerato stabile alla specifica condizione in valutazione se la concentrazione media di ogni livello è entro ±15% della concentrazione determinata al tempo zero rispetto alla concentrazione media degli stessi livelli preparati con reattivi freschi.

2. SCOPO DELLO STUDIO

L'interpretazione dei risultati del biomonitoraggio umano per il cumene richiede valori di riferimento (RVs) basati sulla popolazione, che delineino le concentrazioni di fondo negli individui non esposti professionalmente. Attualmente, tali valori non sono disponibili e non esistono limiti biologici di esposizione, il che limita la comparabilità e la capacità decisionale.

Il 2P2P rappresenta il biomarcatore urinario primario e più affidabile per la valutazione dell'esposizione umana al cumene: esso è derivato dall'ossidazione metabolica del cumene e riflette la dose interna conseguente all'inalazione o all'assorbimento cutaneo [16]. La quantificazione del 2P2P nelle urine fornisce una misura diretta dell'esposizione recente ed è ampiamente utilizzata nel monitoraggio della salute occupazionale [19].

Ad oggi, tuttavia, non sono stati definiti valori di riferimento biologici per il 2P2P nella popolazione generale e ciò, insieme alla necessità di quantificare concentrazioni di fondo molto basse con adeguata precisione, ha motivato il presente studio. Presso il Centro Ricerche Ambientali degli istituti Clinici Scientifici S. Maugeri di Pavia è stato validato un metodo GC–MS/MS ad alta sensibilità, con rigorosi controlli pre-analitici e limite di quantificazione estremamente basso, per migliorare la rilevabilità nella parte inferiore della distribuzione e aumentare l'interpretabilità attraverso gli studi.

In questo contesto, lo studio si propone di:

1. Derivare valori di riferimento provvisori (TRV) per il cumene determinando il 2P2P urinario in un campione di popolazione generale;

2. Valutare e confrontare i livelli di 2P2P nella popolazione generale e nei lavoratori esposti, utilizzando nel gruppo occupazionale un disegno pre- e post-turno per cogliere l'assorbimento intra-turno e meglio identificare il contributo lavorativo;

3. Esaminare se variabili demografiche e di stile di vita (es. fumo, BMI, luogo di residenza, hobby ed attività extra-occupazionali) influenzassero sistematicamente l'esposizione interna all'interno e tra i gruppi.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Reagenti

2-fenil-2-propanolo 97% (CAS 617-94-7), 2-(4-fluorofenil)etanolo 97% (CAS 7589-27-7) (IS), *β-glucuronidasi* da *Helix pomatia* e Sigmatrix urine diluent sono stati forniti da Sigma Aldrich, Milano, Italia. L'acetato di etile, il metanolo, l'acido cloridrico e l'acetato di sodio anidro sono stati forniti da VWR International S.r.l, Milano, Italia. L'acqua ultra è stata prodotta utilizzando il sistema Milli Q-Milli RO, Millipore, Burlington, MA, USA.

3.2. Preparazione del tampone sodio acetato 0.1M pH 5

In un matraccio da 1L, pesare 8.2 g di acetato di sodio anidro e scioglierli in 800 ml di acqua in bagno ad ultrasuoni per 10 minuti. Aggiungere successivamente 2 ml di acido acetico glaciale e portare a volume. Verificare il pH con cartina tornasole.

3.3. Preparazione di HCl 4N

In un matraccio da 100 ml contenente 50 ml di acqua, aggiungere 34.4 ml di HCl 37%. Portare a volume.

3.4. Raccolta e preparazione del campione

I campioni di urina della popolazione di riferimento sono stati raccolti e conservati a -20 °C fino all'analisi. L'idrolisi del glicuronato del 2P2P è stata condotta secondo il metodo descritto da Schettgen et al., 2015 [20] con alcune modifiche. Nel dettaglio, 2 ml del campione di urina sono stati trasferiti in una provetta di polipropilene da 15 ml e addizionati con 20 µl di soluzione IS (1000 ng/ml). Per l'idrolisi dei metaboliti coniugati, ai campioni di urina sono stati aggiunti 4 ml di tampone acetato 0,1 M (pH

5,0) e 10 µl di HCl 4 N, seguiti da un trattamento con vortex per 1 minuto. Successivamente, sono stati aggiunti 50 µl della soluzione di *β-glucuronidasi* e i campioni sono stati mantenuti per una notte a 37°C in blocco termostatato. Dopo raffreddamento a temperatura ambiente, i campioni sono stati estratti con 2 ml di acetato di etile e agitati su vortex per 5 minuti. Per ottenere la separazione della fase organica, i campioni sono stati centrifugati per 5 minuti a 5000 giri/min. da ultimo, 1 ml della fase organica è stato trasferito in vial di vetro per l'analisi GC-MS/MS.

3.5. Strumentazione e condizioni analitiche

Le analisi sono state condotte utilizzando un gascromatografo (modello Agilent 7890 A) combinato con spettrometro di massa in modalità sorgente ionica a impatto elettronico (GC-EI-MS/MS) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Per l'acquisizione e l'analisi dei dati è stato utilizzato il software Agilent MassHunter Workstation (B.06.00). La separazione cromatografica è stata ottenuta utilizzando una colonna capillare Rtx-1701 (14% cianopropilfenil/86% dimetilpolisilossano, 30 m × 0,25 mm ID, 1 µm df) (Restek, Cernusco sul Naviglio MI, Italia). I parametri strumentali sono riassunti nella Tabella 5.

Condizioni GC		Condizioni MS	
Sistema GC	Agilent 7890 A	Sistema MS	Agilent 7000B
Colonna	Rtx-1701, 30 m x 0.25 mm, 1 µm df	Modalità di ionizzazione	Impatto elettronico (70 eV)
Carrier gas	He 1 ml/min	Transfer line	280° C
Programma di temperatura	Temperatura iniziale 70°C x 1 min, 25°C/min a 190°C, x 1 min, 15°C/min a 260°C	Sorgente ionica	300° C
Iniettore	270° C	Quadrupolo	180°C (Q1), 180°C (Q2)
Volume di iniezione	1 µl splitless	Gas di collisione	He (2.25 ml/min)
			N_2 (1.5 ml/min)
Durata analisi	17 minuti	Energia di collisione 2P2P (Quantifier /Qualifier)	5 eV
		Energia di collisione IS (Quantifier)	10 eV

Tabella 5: condizioni del sistema GC e parametri del triplo quadrupolo.

3.6. Partecipanti allo studio

Per definire il TRV per la popolazione generale italiana, un campione di soggetti non esposti è stato arruolato tra gennaio e luglio 2025. Sono stati considerati idonei all'arruolamento soggetti maschi e femmine con età compresa tra 18 e 70 anni, non professionalmente esposti al cumene e che avessero espresso volontà a partecipare allo studio. Gli individui arruolati sono stati invitati a compilare un questionario e a fornire un campione di urina dopo aver espresso il consenso informato.

Per confronto, sono stati reclutati anche lavoratori esposti, impegnati in attività note per essere associate a esposizione occupazionale al cumene, presso un'azienda situata nel nord-ovest dell'Italia. Analogamente, anche questi lavoratori sono stati invitati a rispondere a un questionario e a fornire campioni di urina.

Lo studio è stato condotto in conformità con la Dichiarazione di Helsinki e il protocollo è stato approvato dal "Comitato Etico Campania 3" dell'Università degli Studi di Napoli Federico II (numero protocollo: 485/21).

3.7. Questionario

Per il questionario anamnestico vedi allegato I.

3.8. Gestione analisi dei dati

I dati sono stati raccolti in un file su Microsoft Excel contenente i codici anonimi identificativi di ogni partecipante e i risultati analitici relativi ad ogni soggetto. Successivamente il dataset è stato importato in GraphPad Prism 8.0.2 per l'analisi statistica.

La popolazione oggetto dello studio è stata cosi suddivisa:

- Genere
- Età
- Abitudine al fumo
- Area di residenza
- Attività extra-lavorative potenzialmente influenti

In relazione ai risultati ottenuti sono stati calcolati:

- Media
- Mediana
- Percentili
- Deviazione standard
- Errore standard nella media

In questo contesto, le analisi statistiche principalmente utilizzate sono state:

- T-test per campioni indipendenti per permettere il confronto fra gruppi non appaiati tra loro, quali esposti vs non esposti.
- T-test per campioni appaiati per favorire il confronto di un campione pre-post turno dello stesso lavoratore.

- Un valore di $p < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo.

3.9. Determinazione dei valori di riferimento (RVs) per il 2P2P urinario

Gli RVs rappresentano intervalli statistici che descrivono le concentrazioni di un biomarcatore in una popolazione considerata non esposta e in condizioni fisiologiche normali. Essi costituiscono un benchmark per il biomonitoraggio umano[21]. La valutazione degli RVs è stata condotta seguendo le procedure della Società Italiana dei Valori di Riferimento (SVR). Il processo fa riferimento a diverse caratteristiche:

- uso di una coorte della popolazione generale
- definizione degli RVs sulla base dei percentili
- criteri prespecificati per l'inclusione/esclusione dei dati
- trattamento uniformato per garantire trasparenza e riproducibilità

Una ricerca nelle banche dati scientifiche ha dimostrato che non esistono RVs disponibili per il 2P2P.

4. RISULTATI

Il metodo analitico è stato ottimizzato attraverso le seguenti fasi: inizialmente, la temperatura del forno del GC è stata impostata a 100 °C e aumentata rapidamente per consentire l'eluizione veloce di 2P2P e IS (1 µg/mL), campionati dallo spettrometro di massa in modalità scanning (range m/z 40–200). Lo spettro di massa completo del 2P2P è mostrato nella Figura 3. La frammentazione è dovuta principalmente alla scissione alfa, caratteristica degli alcoli terziari aromatici. Questo processo forma il picco base a *m/z* 121 per la perdita di un radicale metilico. Il frammento risultante è molto stabile poiché la carica positiva è delocalizzata sull'ossigeno tramite mesomeria e sull'anello aromatico per risonanza.

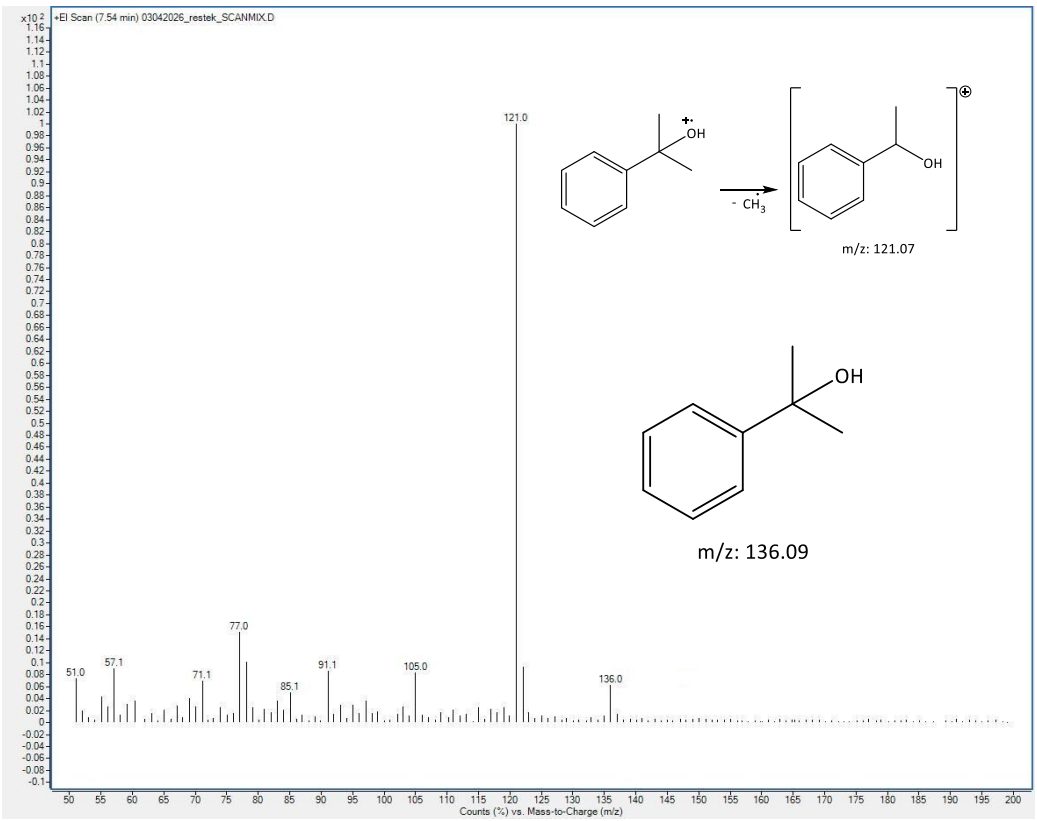


Figura 3: spettro in full scan di 2P2P.

Successivamente, sono state effettuate delle prove MS/MS utilizzando diverse energie di collisione (5, 10, 25 e 35 eV) per ottimizzare gli ioni prodotto. La Figura 4 mostra lo spettro di frammentazione per gli ioni prodotto del 2P2P, specificamente a *m/z* 136 e *m/z* 121. La transizione da *m/z* 136 a *m/z* 121 rappresenta l'evento di frammentazione più significativo (pannello A). Al contrario, la transizione da *m/z* 121 a *m/z* 43 comporta un riarrangiamento più complesso, con la rottura del legame tra l'anello aromatico e la catena etilica, portando alla perdita neutra del gruppo fenilico (pannello B).

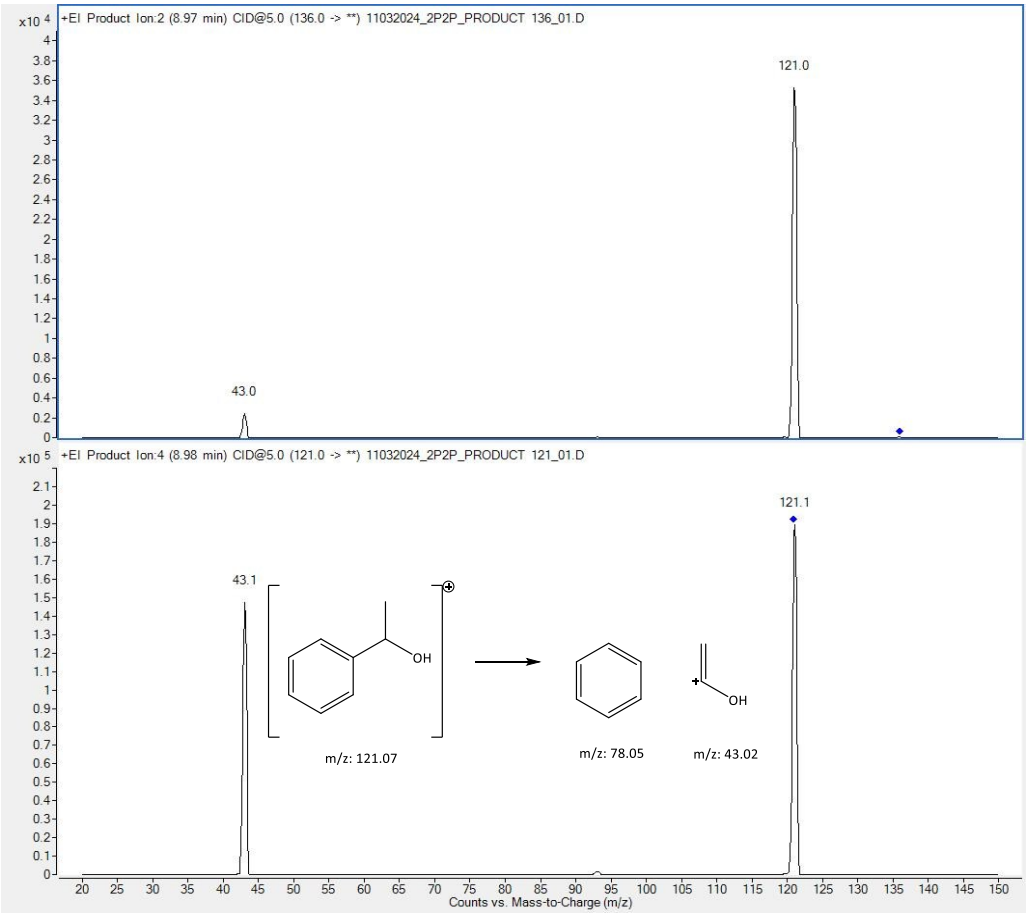


Figura4: ioni prodotto *m/z* 136 e *m/z* 121 di 2P2P.

2P2P e IS sono stati quantificati in modalità Multiple Reaction Monitoring (MRM) utilizzando le seguenti transizioni di massa:

2P2P: *m*/*z* 121→*m*/*z* 43 (quantificatore), *m*/*z* 136→*m*/*z* 121 (qualificatore);

IS: *m*/*z* 140→ *m*/*z* 109 (quantificatore).

Utilizzando le condizioni cromatografiche riassunte nella Tabella 1, i tempi di ritenzione per 2P2P e IS sono risultati essere rispettivamente di 6.9 e 7.7 minuti.

Selettività

Dal momento che il 2P2P rappresenta un contaminante ubiquitario, la selettività del metodo è stata valutata mediante analisi di 6 campioni di urina sintetica (Sigmatrix urine diluent) . Il profilo cromatografico di un campione che non contiene gli analiti in esame è rappresentato nella Figura 5.

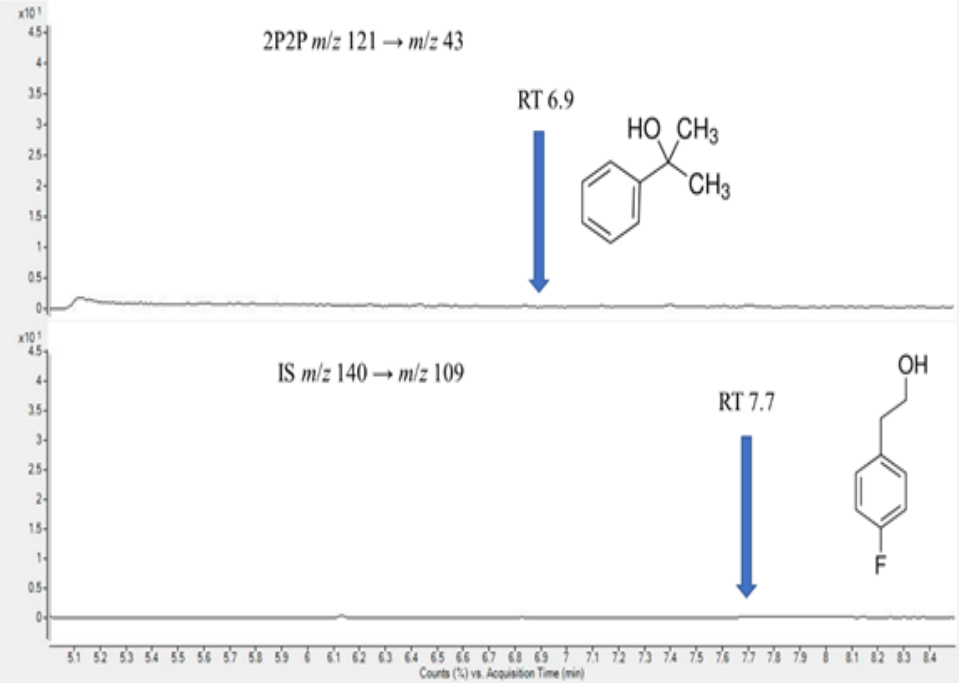


Figura 5: profilo cromatografico di un campione di urina che non contiene gli analiti e lo standard interno

Linearità

Il metodo è risultato lineare nel range di concentrazione di 0.05-5 ng/ml con un r^2 medio di 0.9992 per 2P2P. La Figura 6 mostra la curva di calibrazione media per 2P2P ottenuta dopo analisi di 6 curve indipendenti eseguite in giorni differenti. Le curve di calibrazione sono state ottenute riportando sull'asse delle x le concentrazioni dell'analita e sull'asse delle y il rapporto tra l'area dell'analita/l'area dello IS.

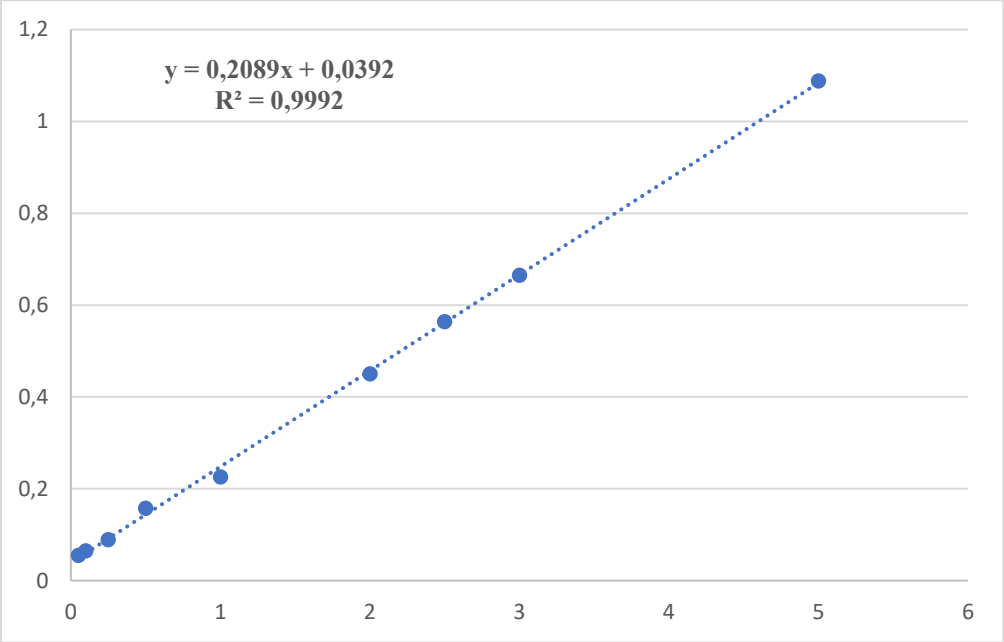


Figura 6: curva di calibrazione media di 2P2P

Il limite di rilevabilità strumentale (LOD) è risultato pari a 0.015 ng/mL per 2P2P. È stato calcolato utilizzando la formula

$$[(YB + 3SB) /m]$$

dove YB è l'intercetta, SB è la sua deviazione standard e m è la pendenza della curva.

Il limite inferiore di quantificazione (LLOQ) è risultato pari a 0.019 ng/mL per 2P2P. È stato calcolato utilizzando la formula

$$[(YB + 10SB) /m]$$

dove YB è l'intercetta, SB è la sua deviazione standard e m è la pendenza della curva.

Precisione e accuratezza

I controlli di qualità e il LOQ sono stati analizzati in 4 replicati in tre sessioni analitiche differenti così da determinare la precisione e l'accuratezza intra-day e inter-day. La Tabella 6 riassume i valori di precisione e accuratezza ottenuti.

2P2P							
	Accuratezza (%)				**Precisione (CV %)**		
	Intra day				Intra day		
	Giorno 1	Giorno 2	Giorno 3		Giorno 1	Giorno 2	Giorno 3
L1	108,04	113,6	105,31	L1	1,3	0,83	11,84
QC1	99,85	101,34	98,77	QC1	0,67	0,7	2,69
QC2	87,75	87,52	97,25	QC2	1,28	1,19	3,03
QC3	98,18	100,55	103,85	QC3	4,82	4,19	3,86
	Accuratezza (%)				**Precisione (CV%)**		
	Inter day				Inter day		
L1	108,98			L1	11,17		
QC1	99,98			QC1	7,46		
QC2	90,84			QC2	4,71		
QC3	100,86			QC3	6,3		

Tabella 6: precisione e accuratezza per la determinazione del 2P2P in campioni biologici.

Effetto matrice e recupero

I risultati di effetto matrice e recupero sono riportati nella Tabella 7. Il recupero di 2P2P è stato valutato confrontando il rapporto tra area dei picchi dell'analita e area del picco dello standard interno nei campioni (QC e LOQ) addizionati degli analiti e dello standard interno prima dell'estrazione (Set C), in confronto con le rispettive aree dei campioni addizionati degli analiti e dello standard interno dopo l'estrazione (Set B). L'effetto matrice è stato ricavato comparando il rapporto di aree (analita/IS) del Set B contro il rapporto delle aree del Set A (analiti sciolti in solvente). Non è stato individuato un effetto matrice rilevante per l'analisi di 2P2P in urina.

	2P2P		
	Set B	Set C	Recupero (%)
L1	0,0508 ± 0,00500	0,0519 ± 0,005798	102,16
QC1	0,0636 ± 0,002686	0,0617 ± 0,004607	96,94
QC2	0,2349 ± 0,01666	0,2316 ± 0,010901	98,62
QC3	0,6888 ± 0,018523	0,6838 ± 0,043052	99,56
	Set A	Set B	Effetto Matrice (%)
L1	0,0479 ± 0,007987	0,0508 ± 0,00500	106,03
QC1	0,0585 ± 0,00708	0,0636 ± 0,002686	108,85
QC2	0,2395 ± 0,017255	0,2349 ± 0,01666	98,1
QC3	0,6868 ± 0,040906	0,6888 ± 0,018523	100,3

Tabella 7: effetto matrice e recupero per 2P2P in campioni biologici.

Stabilità

Le soluzioni madre degli analiti e dello IS (solvente metanolo) mostrano una stabilità di 90 giorni, se conservate a -20°C. Analogamente, le soluzioni di lavoro alle 3 concentrazioni testate, mostrano una stabilità di 30 giorni alle stesse modalità di conservazione. I campioni di urina, addizionati degli analiti (alle concentrazioni dei QCs) e dello IS alla concentrazione di lavoro, hanno una stabilità di 6 ore a temperature ambiente. I risultati dei test di stabilità sono riassunti nella Tabella 8.

Condizioni di stoccaggio	Concentrazione (□g/ml)	Stabilità (%)
Soluzione madre 2P2P -20°C 90 giorni	1000	99.5
Soluzione madre IS -20°C 90 giorni	1000	99.2
Soluzione di lavoro 2P2P -20°C 30 giorni	1	95.9
	0.1	94.8
	0.01	89.4
	0.001	87.9
Soluzione di lavoro IS -20°C 30 giorni	1	96.6
	Concentrazione (ng/ml)	
Campioni processati 6 ore 25°C	0.1	97.2
	1	98.5
	3	98.8

Tabella 8: stabilità di 2P2P nelle soluzioni standard e nei campioni biologici.

4.1.descrizione della popolazione di studio

Lo studio è stato condotto su una popolazione adulta di soggetti non esposti a cumene. Sono stati reclutati 206 soggetti (105 maschi e101 femmine) di età compresa tra 18 e 70 anni. Lo studio ha coinvolto 159 soggetti non esposti (61 uomini, 38%; 98 donne, 62%). I partecipanti allo studio avevano un'età media di 32 anni ± 9 e circa il 26.4% era fumatore. Il peso corporeo, valutato attraverso l'indice di massa corporea (BMI) ha evidenziato una media di 23.8 e quindi classificato nella norma. Circa la metà dei partecipanti erano ubicati in centro città, i restanti abitavano principalmente in periferia. Sono state considerate anche alcune abitudini quotidiane che possono influenzarne l'esposizione: il 40% ha dichiarato di utilizzare detergenti per la pulizia delle superfici e circa la metà (48.4%) di effettuare rifornimento carburante in maniera autonoma.

I 47 lavoratori esposti sono stati reclutati da un'industria chimica che produce perossidi organici, con manipolazione di routine di intermedi reattivi come il cumene idroperossido, utilizzato come iniziatore nella polimerizzazione e reticolazione di materie plastiche, resine ed elastomeri. Le attività si svolgono su tre turni di produzione (06:00–14:00; 14:00–22:00; 22:00–06:00), su due turni di laboratorio e confezionamento (06:00–14:00; 14:00–22:00) e dalle 08:00 alle 17:00 per il personale diurno. Il lavoro viene svolto nel rispetto di rigorosi protocolli di sicurezza con controlli collettivi (ossidatori termici rigenerativi, filtri a carbone

attivo, depuratori, filtri a cartuccia/a sacco, cappe aspiranti e ventilazione locale) e dispositivi di protezione individuale (respiratori a pieno facciale o ad aria compressa con filtri ABEK, guanti resistenti agli agenti chimici, indumenti protettivi); l'accesso ad aree specifiche è limitato senza protezione respiratoria. All'interno dell'impianto, il cumene viene generato tramite alchilazione del benzene ed è presente come componente/impurità del cumene idroperossido e dei flussi di spurgo derivanti dalla sintesi del perossido.

I lavoratori esposti erano prevalentemente di sesso maschile (44 uomini contro 3 donne; 94%) con un'età media di 50 anni ± 10, di cui cinque fumatori (10,6%). L'indice di massa corporea (BMI) medio era di 27,6 ± 27.6 comprendente 13 normopeso (28,8%), 23 sovrappeso (51,1%) e 9 obesi (20%). 8 lavoratori vivevano in centro città (17,7%), 25 in periferia (55,5%), 11 in aree rurali (24,4%) e 1 in una zona industriale (2,2%). Le attività legate allo stile di vita includevano l'uso di detergenti per superfici dure in 13 partecipanti (28,8%) e il rifornimento di carburante self-service in 33 (73,3%). Il confronto tra i soggetti non esposti- esposti è riassunto nella tabella 9.

FATTORI		ESPOSTI	NON ESPOSTI
età media		50	32
sesso		44 M- 3 F	61 M- 98 F
indice di massa corporea medio		27.6	23.8
fumatori		5 (10.6%)	42 (24%)
residenza	centro città	8 (17.7%)	82 (51.5%)
	periferia	25 (55.5%)	66 (41.5%)
	rurale	11 (24.2%)	10 (6.2%)
	industriale	1 (2.2%)	1 (0.6%)
hobby	uso detergenti superfici	13 (28.8%)	64 (40%)
	rifornimento self-service carburante	33 (73.3%)	77 (48.8%)

Tabella 9: confronto tra soggetti esposti e non esposti in relazione ai fattori considerati

4.2. Valori di 2P2P nei campioni biologici di soggetti non esposti

In 15 soggetti, i livelli urinari di 2P2P erano al di sotto del limite di quantificazione (LoQ). I livelli urinari di 2P2P (µg/g creatinina) misurati nella coorte hanno mostrato le seguenti statistiche chiave (Tabella 10):

• Concentrazione media: 0.1447 µg/g creatinina

• Concentrazione mediana: 0.1000 µg/g creatinina

• Concentrazione minima: 0.0200 µg/g creatinina

• Concentrazione massima: 1.840 µg/g creatinina

• Intervallo percentile (5° - 95°): 0.0300 – 0.3100 µg/g creatinina

Non sono state osservate differenze significative in base al sesso, allo stato di fumatore, al luogo di residenza , alle categorie di BMI o agli hobby e alle attività che potrebbero influenzare l'esposizione, valutati durante lo studio. Questa omogeneità supporta l'utilizzo di un intervallo di riferimento unificato per la popolazione. La normalizzazione della creatinina ha attenuato la variabilità dovuta alla diluizione delle urine.

ANALITA	UNITA'	5-95 PERCENTILE	MEDIA	FATTORI DI VARIABILITA'
2P2P	ug/g creatinina	0.03-0.31	0.1002	Sesso età Residenza Fumo Hobby

Tabella 10: TRV del 2P2P in urina

Nei 159 soggetti non esposti reclutati per lo studio, l'analisi del metabolita urinario 2P2P mediante GC-MS/MS ha identificato 15 individui con valori inferiori al limite di quantificazione (LOQ). Di conseguenza, questi individui sono stati esclusi dalle analisi statistiche.

Come riportato nella Tabella 11, i livelli urinari di 2P2P nei soggetti non esposti non hanno mostrato differenze statisticamente significative (valore p = 0.667) tra la popolazione maschile (media 0.134±0.149) e la popolazione femminile (media 0.150± 0.249).

Per quanto riguarda l'età, l'analisi statistica non ha mostrato differenze significative (valore p = 0.808) tra le fasce d'età considerate: 18-29 anni (media 0.134±0.227), 30-39 anni (media 0.148±0.205),

40-49 anni (media 0.224±0.305), 50-59 anni (media 0.136±0.088) e 60-67 anni (media 0.080±0.000).

Il fumo non sembra influenzare i livelli di metaboliti del cumene, come indicato dall'assenza di una differenza significativa tra fumatori (media = 0.124±0.058) e non fumatori (0.152± 0.251 valore p = 0.494). Non sono state osservate differenze significative (valore p = 0.206) rispetto alle categorie di BMI, che includevano partecipanti sottopeso (media = 0.076±0.044), normopeso (media = 0.174±0.270), sovrappeso (media = 0.094±0.054) e obesi (media = 0.132± 0.064).

L'area di residenza non sembra influenzare i livelli urinari di 2P2P, come indicato dall'assenza di una differenza significativa (valore p = 0.916) tra i soggetti non esposti residenti in centro città (media= 0.141±0.0165), periferia (media = 0.156±0.283), area rurale (media = 0.106±0.082) e area industriale (media = 0.120). Per quanto riguarda le attività hobbistiche e di self-service, l'analisi statistica non ha rivelato differenze significative nel campione di urina per l'uso di detergenti per superfici (valore p = 0.136) tra i soggetti che non utilizzano detergenti per superfici (media =

0.123±0.150) e quelli che li utilizzano (media=0.179±0.292). Analogamente non sono state osservate differenze significative per il rifornimento di carburante self-service (valore p = 0.360) tra i soggetti che non si riforniscono da soli (media = 0.160±0.253) e quelli che utilizzano il self service (media = 0.127±0.169).

età	18-29	76	0.134	0.808	52.70
	30-39	45	0.148		31.25
	40-49	10	0.224		6.94
	50-59	12	0.136		8.33
	60-67	1	0.080		0.69
sesso	F	90	0.150	0.667	62.50
	M	54	0.134		37.50
fumatore	NO	105	0.152	0.494	72.91
	SI	39	0.124		27.08
Indice di massa corporea	SOTTOPESO	11	0.076	0.206	7.63
	NORMOPESO	88	0.174		61.10
	SOVRAPPESO	34	0.094		23.61
	OBESO	11	0.132		7.63
Residenza	CENTRO CITTA'	74	0.141	0.916	51.38
	PERIFERIA	59	0.156		40.97
	AREA RURALE	10	0.106		6.94
	AREA INDUSTRIALE	1	0.120		0.69
Hobby/ Sttività autonome	NESSUN UTILIZZO DI DETERGENTI	85	0.123	0.136	59.02
	UTILIZZO DI DETERGENTI	56	0.179		38.88
	RIFORNIMENTO AUTONOMO CARBURANTE	75	0.160	0.360	52.08
	NESSUN RIFORNIMENTO AUTONOMO	69	0.127		47.91

Tabella 11: Livelli urinari di creatinina 2P2P µg/g in soggetti non esposti.

4.3. Valori di 2P2P nei campioni biologici di soggetti esposti

Sono stati reclutati 47 lavoratori esposti. La coorte era prevalentemente maschile (44 uomini vs 3 donne; 94%) con un'età media di 50 ± 10 anni; cinque individui erano fumatori (10.6%). L'indice di massa corporea (BMI) medio era di 27.6 ± 4.5, comprendente 0 sottopeso, 13 normopeso (28.8%), 23 sovrappeso (5.1%) e 9 obesi (20%). Per quanto riguarda la residenza, 8 lavoratori vivevano in centro città (17.7%), 25 in periferia (55.5%), 11 in aree rurali (24.4%) e 1 in una zona industriale (2.2%). Le attività legate allo stile di vita includevano l'uso di detergenti per superfici in 13 partecipanti (28.8%) e il rifornimento di carburante self-service in 33 (73.3%). Infine, due lavoratori hanno fornito il consenso e fornito due campioni di urina più dati demografici (età, sesso, abitudini al fumo), ma non hanno completato il questionario ad hoc.

Pertanto, per l'analisi statistica, il campione è stato ridotto a 43 soggetti maschi. Le restanti due partecipanti di sesso femminile sono state escluse per evitare di introdurre variabili legate al sesso e per garantire maggiore coerenza e comparabilità all'interno del set di dati. Inoltre, durante la pre-elaborazione dei dati, un valore anomalo (104,49 µg/g di creatinina) che mostrava un livello di 2P2P post-turno insolitamente elevato è stato escluso dall'analisi post-turno, in quanto considerato non rappresentativo del campione complessivo.

Per quanto riguarda i valori pre-turno, come riportato nella Tabella 12, l'analisi statistica non ha rivelato differenze significative nelle concentrazioni urinarie di 2P2P tra le diverse fasce d'età (valore p = 0.864):

18-29 anni (media = 2.000±1.923), 30-39 anni (media = 3.083± 4.478), 40-49 anni (media = 1.313± 1.489), 50-59 anni (media = 4.068± 5.797) e 60-67 anni (media = 5.288 ± 10.760). Anche l'analisi comparativa in base all'abitudine al fumo non ha rivelato differenze significative (valore p =

0.786) tra non fumatori (media = 3.806 ± 6.270) e fumatori (media = 2.933± 3.455). La valutazione basata sulle categorie di BMI ha evidenziato differenze significative (valore p = 0.286): sottopeso (media = 0.000), normopeso (media = 4.628± 6.308), sovrappeso (media = 4.408± 6.876) e obesità (media = 0.8756± 0.453). Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative in base all'area di residenza (valore p = 0.887): centro città (media = 2.561± 2.690), periferia (media = 3.998± 5.979), area rurale (media = 4.174± 8.013) e area industriale (media = 3.460 ± 0.000). Infine, non sono state osservate associazioni significative per le attività hobbistiche/self-service. Per i detergenti per superfici (valore p = 0.839), i non utilizzatori avevano una media di 3.661± 6.153 rispetto agli utilizzatori con una media di 4.082± 6.2. Per il rifornimento di carburante self-service (valore p = 0.248), i soggetti che non ne usufruiscono hanno avuto una media = 1.776 ± 2.267 contro una media di 4.316± 6.7 per gli utenti che lo utilizzano normalmente.

ESPOSTI PRE TURNO		NUMERO INDIVIDUI	MEDIA	P. VALUE	%
età	18-29	2	2.000	0.864	4.65
	30-39	7	3.083		16.28
	40-49	4	1.313		9.30
	50-59	24	4.068		55.81
	60-67	6	5.288		13.95
fumatore	NO	39	3.806	0.786	90.70
	SI	4	2.933		9.30
Indice di massa corporea	SOTTOPESO	0	0	0.286	0
	NORMOPESO	11	4.628		25.58
	SOVRAPPESO	23	4.408		53.49
	OBESO	9	0.8756		20.93
Residenza	CENTRO CITTA'	7	2.561	0.887	16.28
	PERIFERIA	24	3.998		55.81
	AREA RURALE	11	4.174		25.58
	AREA INDUSTRIALE	1	3.460		2.33
Hobby/ Sttività autonome	NESSUN UTILIZZO DI DETERGENTI	29	3.661	0.839	67.44
	UTILIZZO DI DETERGENTI	12	4.082		30.23
	RIFORNIMENTO AUTONOMO CARBURANTE	10	1.776	0.248	23.26
	NESSUN RIFORNIMENTO AUTONOMO	33	4.316		76.74

Tabella 12: Livelli urinari di 2P2P µg/g corretti per la creatinina in soggetti esposti pre-turno.

Per quanto riguarda i valori post-turno, come riportato nella Tabella 13, l'analisi statistica non ha evidenziato delle differenze significative nelle concentrazioni del metabolita urinario del cumene tra le diverse fasce d'età (valore p = 0.423): 18-29 anni (media = 20.160 ± 23.680), 30-39 anni (media = 4.191± 3.389), 40-49 anni (media = 5.750± 5.349), 50-59 anni (media = 8.730± 8709), e 60-67 anni (media = 10.770± 19.67). L'analisi comparativa dei livelli di 2P2P tra i soggetti fumatori ha evidenziato differenze statisticamente significative (p = 0.009) tra i non fumatori (media = 7.393± 9.384) e i fumatori (media = 18.040± 18.8).

ESPOSTI POST TURNO		NUMERO INDIVIDUI	MEDIA	P. VALUE	%
età	18-29	2	20.160	0.423	4.65
	30-39	7	4.191		16.28
	40-49	4	5.750		9.30
	50-59	23	8.730		53.49
	60-67	6	10.770		13.95
fumatore	NO	38	7.393	0.009	88.37
	SI	4	18.040		9.30
Indice di massa corporea	SOTTOPESO	0	0	0.289	0
	NORMOPESO	11	10		25.58
	SOVRAPPESO	22	9.858		51.16
	OBESO	9	3.456		20.93
Residenza	CENTRO CITTA'	7	14.680	0.407	16.28
	PERIFERIA	23	6.966		53.49
	AREA RURALE	11	8.328		25.58
	AREA INDUSTRIALE	1	3.460		2.33
Hobby/ Sttività autonome	NESSUN UTILIZZO DI DETERGENTI	29	9.574	0.384	67.44
	UTILIZZO DI DETERGENTI	12	6.120		27.91
	RIFORNIMENTO AUTONOMO CARBURANTE	10	8.605	0.978	23.26
	NESSUN RIFORNIMENTO AUTONOMO	32	8.499		74.42

Tabella 13: Livelli urinari di 2P2P µg/g corretti per la creatinina in soggetti esposti post-turno

4.4. Valutazione dei livelli di 2P2P nei soggetti esposti tra prima e dopo il turno di lavoro

La differenza nei livelli urinari di 2P2P nei soggetti esposti dopo il turno di lavoro (media 8.727± 10.75) è risultata statisticamente significativa (valore p = 0.0093) rispetto ai soggetti esposti prima del turno di lavoro (media 3.777± 5.98).

4.5. Valutazione dei livelli di 2P2P nei soggetti non esposti rispetto a soggetti esposti

Al fine di confrontare i livelli urinari di 2P2P tra individui non esposti e lavoratori esposti professionalmente, nell'analisi sono stati inclusi solo soggetti di sesso maschile, per garantire una valutazione più rappresentativa e comparabile tra i due gruppi. Nella popolazione non esposta 15 soggetti (7 maschi e 8 femmine) presentavano livelli urinari di 2P2P inferiori al limite di quantificazione (LOQ) e sono stati esclusi. Inoltre, la popolazione femminile è stata esclusa per uniformare la distribuzione per sesso al gruppo esposto. Di conseguenza, il campione finale non esposto era composto da 54 soggetti di sesso maschile. Nel gruppo esposto, sono stati considerati i campioni di urina dei lavoratori di sesso maschile con dati completi del questionario e risultati analitici validi, portando a un campione finale di 43 lavoratori di sesso maschile.

Come evidenziato nella Tabella 14, le concentrazioni urinarie di 2P2P erano più elevate nei valori pre-turno dei soggetti esposti rispetto a quelli

non esposti per la maggior parte dei fattori considerati. Nella fascia di età 18-29 anni, gli individui esposti hanno mostrato una media di 2.000± 1.923 rispetto a 0.106 ± 0.051 nei soggetti non esposti ($p < 0.0001$). Nella fascia di età 30-39 anni, il gruppo esposto ha mostrato una media di 3.083 ± 4.478 contro 0.149 ± 0.105 nel gruppo non esposto (valore $p = 0.0133$). Nella fascia di età 40-49 anni, la differenza non ha raggiunto la significatività statistica (1.313 ± 1.489 vs 0.261 ± 0.364; p-value = 0.0983), e analogamente nel gruppo 50-59 anni (4.068 ± 5.797 vs 0.074 ± 0.034 ; p-value = 0.0822). La fascia di età 60-67 anni non è stata analizzata a causa del numero molto ridotto di soggetti non esposti.

In base all'abitudine al fumo , i soggetti non fumatori esposti hanno mostrato un valore pari a 3.806 ± 6.270 rispetto a 0.142 ± 0.175 nei non fumatori non esposti (valore $p = 0.0006$), e i fumatori esposti 2.933 ± 3.455 rispetto a 0.116 ± 0.056 nei fumatori non esposti (valore $p = 0.0022$). Stratificando per BMI, sono state osservate differenze significative per soggetti normopeso (4.628 ± 6.308 vs 0.179 ± 0.208; $p = 0.0013$), soggetti sovrappeso (4.408 ± 6.876 vs 0.093 ± 0.053; $p = 0.0043$) e soggetti obesi (0.8756 ± 0.453 vs 0.121 ± 0.081; $p = 0.0016$); Relativamente all'area di residenza, sono state riscontrate differenze significative nel centro città (2.561 ± 2.690 vs 0.158 ± 0.189; $p < 0.0001$) e nella periferia (3.998 ± 5.979 vs 0.108 ± 0.059 $p = 0.0072$), mentre nell'area rurale non si è osservata alcuna differenza significativa (4.174 ± 8.013 vs 0.072 ± 0.027;

p = 0.3358). Infine, i livelli urinari di 2P2P nei soggetti esposti erano più elevati indipendentemente dalle attività hobbistiche/self-service: nessun utilizzo di detergenti per superfici (3.661 ± 6.153 vs 0.128 ± 0.163 ; p-value = 0.0006), utilizzo di detergenti per superfici (4.082 ± 6.2 vs 0.154 ± 0.117; p-value = 0.0318),nessun rifornimento di carburante self-service (1.776 ± 2.267 contro 0.151 ± 0.195; valore p = 0.0007) e rifornimento self-service (4.316 ± 6.7 contro 0.118 ± 0.089; valore p = 0.0016).

		NUMERO INDIVIDUI		MEDIA		P.VALUE	%	
		NON ESPOSTI	ESPOSTI	NON ESPOSTI	ESPOSTI		NON ESPOSTI	ESPOSTI
età	18-29	23	2	0.106	2	<0.0001	42.59	4.65
	30-39	16	7	0.149	3.083	0.0133	29.63	16.28
	40-49	7	4	0.261	1.313	0.0983	12.96	9.30
	50-59	7	24	0.074	4.068	0.0822	12.96	55.81
	60-67	1	6	0.08	5.288	-	1.85	13.95
fumatore	NO	38	39	0.142	3.806	0.0006	70.37	90.70
	SI	16	4	0.116	2.933	0.0022	29.63	9.30
Indice di massa corporea	SOTTOPESO	1	0	0.09	-	-	1.85	0
	NORMOPESO	24	11	0.179	4.928	0.0013	44.44	25.58
	SOVRAPPESO	23	23	0.093	4.408	0.0043	42.59	53.49
	OBESO	6	9	0.121	0.8756	0.0016	11.11	20.93
Residenza	CENTRO CITTA'	31	7	0.158	2.561	<0.0001	57.41	16.28
	PERIFERIA	19	24	0.108	3.998	0.0072	35.19	55.81
	AREA RURALE	4	11	0.072	4.174	0.3558	7.41	25.58
	AREA INDUSTRIALE	0	1	-	3.460	-	0	2.33
Hobby/ Sttività autonome	NESSUN UTILIZZO DI DETERGENTI	39	29	0.128	3.361	0.0006	72.22	67.44
	UTILIZZO DI DETERGENTI	19	13	0.154	4.082	0.0318	24.07	30.23
	RIFORNIMENTO AUTONOMO	26	10	0.151	1.776	0.0007	48.15	23.26
	NESSUN RIFORNIMENTO	28	33	0.118	4.316	0.0016	51.85	76.74

Tabella 14: Livelli urinari di creatinina in µg/g nei soggetti non esposti rispetto ai soggetti esposti prima del turno.

Come dettagliato nella Tabella 15, le concentrazioni urinarie di 2P2P erano significativamente più elevate nei valori post-turno dei soggetti esposti rispetto a quelli non esposti. Nella fascia di età 18-29 anni, gli individui esposti hanno mostrato livelli medi di 2P2P pari a 20.160 ± 23.68, rispetto a 0.106 ± 0.051 nei soggetti non esposti ($p < 0.0001$). Nella fascia di età 30-39 anni, il gruppo esposto ha avuto concentrazioni medie di 4.191 ± 3.389, rispetto a 0.149 ± 0.105 nel gruppo non esposto ($p < 0.0001$). Tra gli individui di età compresa tra 40 e 49 anni, i soggetti esposti hanno mostrato livelli medi di 5.750 ±5.349, rispetto a 0.261 ± 0.364 nei soggetti non esposti ($p = 0.0200$). Nella fascia di età 50-59 anni, gli individui esposti presentavano una concentrazione media di 8.730 ±8.709 , mentre i soggetti non esposti mostravano livelli di 0.074 ± 0.034 ($p = 0.0148$). L'analisi statistica per la fascia di età 60-67 anni non è stata eseguita a causa di un campione insufficiente tra i maschi non esposti. Sia i fumatori che i non fumatori nel gruppo esposto hanno mostrato livelli urinari di 2P2P significativamente più elevati rispetto alle loro controparti non esposte. Stratificando per BMI, i maschi esposti hanno mostrato livelli di 2P2P significativamente più elevati rispetto ai maschi non esposti nelle categorie di peso normale ,sovrappeso e obesità. La categoria sottopeso è stata esclusa a causa di una dimensione del campione insufficiente.

Per quanto riguarda l'area di residenza, sono state osservate differenze significative tra i maschi esposti e non esposti nel centro città e in periferia mentre l'area rurale non ha mostrato differenze significative. L'area industriale è stata esclusa dall'analisi statistica a causa dell'assenza di soggetti non esposti e della presenza di un solo soggetto esposto.

Infine, i livelli urinari di 2P2P erano significativamente più alti nei soggetti esposti, indipendentemente dal tipo di hobby o dalle attività di self-service.

		NUMERO INDIVIDUI		MEDIA		P.VALUE	%	
		NON ESPOSTI	ESPOSTI	NON ESPOSTI	ESPOSTI		NON ESPOSTI	ESPOSTI
età	18-29	23	2	0.106	20.160	<0.0001	42.59	4.65
	30-39	16	7	0.149	4.191	<0.0001	29.63	16.28
	40-49	7	4	0.261	5.750	0.02	12.96	9.30
	50-59	7	23	0.074	8.730	0.01048	12.96	53.49
	60-67	1	6	0.08	10.770	-	1.85	13.95
fumatore	NO	38	38	0.142	7.393	0.0090	70.37	88.37
	SI	16	4	0.116	18.040	0.0006	29.63	9.30
Indice di massa corporea	SOTTOPESO	1	0	0.09	-	-	1.85	0
	NORMOPESO	24	11	0.179	10	0.0001	44.44	25.58
	SOVRAPPESO	23	22	0.093	9.858	0.0004	42.59	51.16
	OBESO	6	9	0.121	3.456	0.0011	11.11	20.93
Residenza	CENTRO CITTA'	31	7	0.158	14.680	<0.0001	57.41	16.28
	PERIFERIA	19	23	0.108	6.966	0.0002	35.19	53.49
	AREA RURALE	4	11	0.072	8.328	0.2820	7.41	25.58
	AREA INDUSTRIALE	0	1	-	3.460	-	0	2.33
Hobby/ Sttività autonome	NESSUN UTILIZZO DI DETERGENTI	39	29	0.128	9.574	<0.0001	72.22	67.44
	UTILIZZO DI DETERGENTI	19	12	0.154	6.120	0.0066	24.07	27.91
	RIFORNIMENTO AUTONOMO	26	10	0.151	8.605	0.0026	48.15	23.26
	NESSUN RIFORNIMENTO	28	32	0.118	8.499	<0.0001	51.85	74.72

Tabella 15: Livelli urinari di creatinina in µg/g nei soggetti non esposti rispetto ai soggetti esposti dopo il turno di lavoro.

5. DISCUSSIONE

Il progetto di tesi si proponeva di validare un metodo analitico ad alta sensibilità con l'obiettivo di definire concentrazioni di riferimento molto basse nella popolazione generale e di analizzare eventuali incrementi associati alle attività lavorative nei soggetti professionalmente esposti. Parallelamente sono stati considerati diversi fattori che potessero agire da interferenti quali il peso, l'età, il luogo di residenza e lo stato di fumatore. I risultati relativi alla popolazione generale hanno mostrato come le concentrazioni urinarie di 2P2P riflettono l'esposizione in condizioni ambientali ordinarie. La presenza di diversi valori sotto il LOQ indica che in una buona parte dei partecipanti allo studio l'esposizione interna era molto bassa o non quantificabile. Non avendo una significativa influenza associata a possibili condizioni demografiche o abitudinarie, questa omogeneità supporta l'utilizzo di un intervallo di riferimento unico (TRV). In riferimento ai lavoratori esposti, l'analisi dei campioni prelevati pre e post-turno ha permesso di evidenziare l'incremento legato all'esposizione professionale quotidiana. Il confronto tra i due momenti lavorativi ha evidenziato un significativo aumento dei livelli di 2P2P, confermando l'assorbimento quotidiano di cumene. Inoltre, a differenza della popolazione generale, si sono osservati dei chiari e significativi aumenti dei livelli di 2P2P nei fumatori post turno. Serviranno degli studi finalizzati e approfonditi per meglio definire il ruolo del fumo come modificatore nell'esposizione professionale. Il confronto tra popolazione generale e lavoratori esposti ha evidenziato differenze significative in tutte le fasce di età, aumento marcato nei lavoratori pre-turno rispetto alla popolazione generale e livelli post-turno fino a 100 volte superiori rispetto ai soggetti non esposti. Questi risultati rafforzano la validità dei TRV derivati e supportano l'utilizzo del 2P2P come biomarcatore nella sorveglianza sanitaria.

6. CONCLUSIONI

Il 2P2P è risultato essere un biomarcatore affidabile dell'esposizione al cumene. L'utilizzo di un metodo GC-MS/MS altamente sensibile ha permesso di quantificare con precisione le concentrazioni di riferimento nella popolazione generale, consentendo di definire i TRV di riferimento come base per il biomonitoraggio umano. Il confronto tra popolazione generale e soggetti lavorativamente esposti ha evidenziato differenze significative coerenti con l'esposizione professionale, senza evidenziare influenze legate alle condizioni demografiche nei primi ma con significativi incrementi in soggetti fumatori professionalmente esposti.

Il presente lavoro rappresenta una base importante per la valutazione del rischio in ambito occupazionale. Verranno effettuati ulteriori studi per meglio comprendere in che modo fattori modificanti influiscono sui risultati ottenuti. Inoltre verrà esteso il campione occupazionale per valutare eventuali differenze di esposizione legate al sesso.

7. BIBLIOGRAFIA

1) Some Chemicals Present in Industrial and Consumer Products, Food and Drinking-Water. Available online: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK373179/ (Data ultimo accesso 03/12/2024).

2) Huang, CC., Peng, JJ., Wu, SH. et al. Effects of cumene hydroperoxide on phenol and acetone manufacturing by DSC and VSP2. *J Therm Anal Calorim* 102, 579–585 (2010). doi.org/10.1007/s10973-010-0953-z

3) Liu, J., Xie, J., Ren, Z., & Zhang, W. Solvent extraction of phenol with cumene from wastewater. Desalination and Water Treatment, 51(19–21), 3826–3831. (2013). doi.org/10.1080/19443994.2013.796993

4) Pauwels CGGM, Hintzen KFH, Talhout R., Cremers HWJM, Pennings JLA, Smolinska A., Opperhuizen A., Van Schooten FJ., Boots AW. Smoking regular and low-nicotine cigarettes results in comparable levels of volatile organic compounds in blood and exhaled breath. J Breath Res.;15(1):016010. (2020) . doi: 10.1088/1752-7163/abbf38.

5) Sugier, D., Sugier, P., Jakubowicz-Gil, J., Winiarczyk, K., Kowalski, R. Essential Oil from *Arnica montana* L. Achenes: Chemical Characteristics and Anticancer Activity. *Molecules*, 24, 4158. (2019). doi.org/10.3390/molecules24224158.

6) Programma Nazionale di Tossicologia. 15° Rapporto sui Cancerogeni [Internet]. Research Triangle Park (NC): Programma Nazionale di Tossicologia; 21 dicembre 2021.

7) Becking GC, Chen BH. International Programme on Chemical Safety (IPCS) environmental health criteria on boron human health risk assessment. Biol Trace Elem Res. 1998 Winter;66(1-3):439-52. doi: 10.1007/BF02783154. PMID: 10050936.

8) National Toxicology Program (NTP). Report on Carcinogens Monograph on cumene. RoC Monograph 02 [Internet]. Research Triangle Park (NC): NTP; 2013 Sep [cited 2025 Oct 7]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK590644/ doi:10.22427/ROC-MGRAPH-02.

9) IARC (International Agency for Research on Cancer). Some chemicals present in industrial and consumer products, food and drinking-water. Vol. 101 [Internet]. Lyon: IARC; 2013 [cited 2025 Oct 8]. Available from: https://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol101/mono101-003.pdf

10) Tegeris, JS. and Balster, RL. A comparison of the acute behavioral effects of alkylbenzenes using a functional observational battery in mice. *Fundam Appl Toxicol* 22:240–250 (1994).

11) National Toxicology Program (2009) Toxicology and carcinogenicity studies of cumene in F344/N rats and B6C3F1 mice (inhalation studies). National Institute of Environmental Health Sciences Report TR-542. National Institutes of Health, Bethesda, MD.

12) Harmonised Classification—Annex VI of Regulation (EC) (CLP Regulation). Available online: https://echa.europa.eu/it/ information-on-chemicals/cl-inventory-database/-/discli/details/132275 (Data ultimo accesso 03/12/2024).

13) Carc and Muta Directive, Annex 1—Substances, Mixtures & Processes. Available online: https://echa.europa.eu/it/carcinogensmutagens-

dir-2004-37 (accessed on 20 May 2024).

14) Chen LJ, Wegerski CJ, Kramer DJ, Thomas LA, McDonald JD, Dix KJ, Sanders JM. Disposition and metabolism of cumene in F344 rats

and B6C3F1 mice. Drug Metab Dispos. 2011 Mar;39(3):498-509. doi: 10.1124/dmd.110.034769.

15) Goenechea S, Olek K, Wardenbach P. Simultaneous gas chromatographic determination of the cumene metabolites 2-phenylpropanol-1 and 2-phenylpropanol-2 in urine. J Chromatogr. 1978 Jul 21;154(2):282-4. doi: 10.1016/s0021-9673(00)98479-6.

16) Knecht, U. 2-Phenyl-2-propanol in urine [Biomonitoring Methods, 2013]. In The MAK-Collection for Occupational Health and Safety. (2013). doi: 10.1002/3527600418.bi9882e0013

17) Dugheri S, Fanfani N, Cappelli G, Marigliano A, Bucaletti E, Squillaci D, Rapi I, Venturini L, Pizzella G, Manetta S, Pavone A, Secchi M, Rainaldi I, Mucci N. Regarding Bioanalysis Lasting a Few Minutes: Automated Cooling-SPME and Fast-GC for Urinary 2-Phenyl-2-Propanol Monitoring. Toxics. 2024 Oct 13;12(10):743. doi: 10.3390/toxics12100743

18) Robustelli della Cuna F.S., Balestra M., Sottani C., Leso V ., Volpe A., Iavicoli I., Grignani E. Simple and rapid analysis of urinary 2-phenyl-2-propanol and 2-phenyl-1-propanol metabolites for human exposure to cumene using gas chromatography tandem mass spectrometry: monitoring of occupational exposure. Submitted Journal of chromatography A, 2026.

19) Knecht U, Ulshöfer A. Bio-Monitoring nach iso-Propylbenzol-Einwirkung. In: Münzberger E,editor. Die Stellung der Arbeitsphysiologie in der heutigen Arbeitsmedizin. Begutachtung in der Arbeitsmedizin und Umweltmedizin. 36. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin; 1996 May 6–9; Wiesbaden (DE). Fulda: Rindt-Druck; 1996. p. 225–227.

20) Schettgen T, Alt A, Dewes P, Kraus T. Simple and sensitive GC/MS-method for the quantification of urinary phenol, o- and m-cresol

and ethylphenols as biomarkers of exposure to industrial solvents. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 995- 996:93-100. (2015). doi: 10.1016/j.jchromb.2015.05.023. Epub 2015 May 21. PMID:26046979.

21) Aprea MC, Scapellato ML, Valsania MC, Perico A, Perbellini L, Ricossa MC, et al. Methodology to define biological reference values in the environmental and occupational fields: the contribution of the Italian Society for Reference Values (SIVR). Med Lav. 2017;108(2):138–148. doi:10.23749/mdl.v108i2.5574.

22) Food and Drug Administration (2018). Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. Available at: https://www.fda.gov/files/drugs/published/ Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf8 (Data ultimo accesso 03/12/2024).

Allegato n. 1

Questionario anamnestico

Codice identificativo:

GENERE: □ Maschio □ Femmina

ETA': _____ **PESO:** _____ **ALTEZZA:** _____

STATO CIVILE: □ Non coniugato □ Coniugato/convivente □ Separato/a - divorziato/a □Vedovo/a

FIGLI: □ si □ no Se si indicare il numero ___

SCOLARIZZAZIONE: □ Elementare □ Qualifica professionale

□ Media Inferiore □Laurea/Diploma universitario

□ Media superiore

RESIDENZA

Indicare la provincia di residenza:

Da quanto tempo risiede in questa provincia?

Come definirebbe la zona in cui risiede?

□ centro città □ periferia □ zona rurale □ zona industriale

Eventuale residenza precedente (indicare la provincia):

Come definirebbe la zona in cui ha risieduto in precedenza?

□ centro città □ periferia □ zona rurale □ zona industriale

È presente una delle seguenti strutture entro 5 km da casa tua?

Strutture	SI	NO	Non so
Impianto di produzione di componenti per autoveicoli	☐	☐	☐
Impianto di produzione di batterie	☐	☐	☐
Stabilimento per la produzione di cemento	☐	☐	☐
Impianto di trasformazione chimica	☐	☐	☐
Centrale a carbone	☐	☐	☐
Impianto di produzione di componenti elettriche	☐	☐	☐
Impianto di produzione di fungicidi	☐	☐	☐
Centrale geotermica	☐	☐	☐

Strutture	SI	NO	Non so
Discariche	☐	☐	☐
Stabilimento metallurgico	☐	☐	☐
Impianto di produzione di vernici e/o pigmenti e/o pitture e/o lacche	☐	☐	☐
Impianto di produzione di prodotti farmaceutici	☐	☐	☐
Impianto di riciclaggio	☐	☐	☐
Impianto di trattamento dei fanghi di depurazione	☐	☐	☐
Impianto di incenerimento dei rifiuti	☐	☐	☐
Raffineria di petrolio	☐	☐	☐
Impianto di produzione di combustibile	☐	☐	☐
Distributore di carburanti	☐	☐	☐
Lavanderia	☐	☐	☐
Lavanderia industriale	☐	☐	☐
Impianto di produzione cosmetici	☐	☐	☐
Impianto di produzione detergenti	☐	☐	☐
Impianto di produzione plastica	☐	☐	☐
Conceria	☐	☐	☐
Industria tessile	☐	☐	☐
Impianto di pellicceria	☐	☐	☐
Autolavaggio	☐	☐	☐
Circuiti auto e/o moto	☐	☐	☐
Kartodromo	☐	☐	☐
Impianti di produzione gomma	☐	☐	☐
Crematorio	☐	☐	☐
Altri impianti industriali Specificare la struttura……	☐	☐	☐

ANAMNESI PERSONALE

ANAMNESI FAMILIARE

I suoi familiari hanno mai sofferto di:

a. malattie neoplastiche? □ si □ no _____
b. malattie autoimmuni? □ si □ no _____
c. malattie endocrine (tiroide, diabete)? □ si □ no _____

ANAMNESI FISIOLOGICA

a. Pratica attività fisica? □ si □ no

b. Fuma? □ si □ no

Se si quante sigarette al giorno? _____ Da quanti anni? _____

Ex fumatore (ho smesso da_____anni)

Con quale frequenza consuma normalmente una porzione dei seguenti alimenti?

ALIMENTI	PORZIONE	FREQUENZA DI CONSUMO AL GIORNO				
		Mai o raramente	Meno di 1 volta /giorno	1 volta /giorno	2 volte /giorno	≥ 3 volte /giorno
1. Pasta o riso di tipo integrale	80 gr	☐	☐	☐	☐	☐
2. Verdura tutti i tipi (sia cruda che cotta)	200 gr (80 gr insalata)	☐	☐	☐	☐	☐
3. Frutta tutti i tipi, anche la spremuta fresca	150 gr	☐	☐	☐	☐	☐
4. Latte e yogurt	1 bicchiere/ vasetto (125 gr)	☐	☐	☐	☐	☐
		Mai o raramente	Meno di 1 volta /giorno	1-2 volte /giorno	3-4 volte /giorno	≥ 5 volte /giorno
5. Pane e fette di tipo integrale	1-2 fette (50 gr)	☐	☐	☐	☐	☐
6. Olio di oliva per cucinare e condire	1 cucchiaio (10 ml)	☐	☐	☐	☐	☐
7. Burro, margarina o panna da cucina per cucinare	1 noce (10 gr)	☐	☐	☐	☐	☐
8. Vino (bianco e rosso)	1 bicchiere (125 ml)	☐	☐	☐	☐	☐
ALIMENTI	PORZIONE	FREQUENZA DI CONSUMO ALLA SETTIMANA				
		Mai o raramente	Meno di 1 volta /sett	1-3 volte /sett	4-6 volte /sett	≥ 7 volte /sett
9. Carne rossa (bovino, vitello, maiale), affettati e salumi	100 gr (carne) 50 gr (salumi)	☐	☐	☐	☐	☐
10. Carne bianca (pollo, tacchino, coniglio)	100 gr	☐	☐	☐	☐	☐
11. Bevande dolci o gassate (tipo coca-cola, aranciata, gassosa, ecc)	1 bicchiere (200 ml)	☐	☐	☐	☐	☐
12. Dolci o pasticcini (non fatti in casa), come torte, biscotti, creme o dolci al cucchiaio	100 gr	☐	☐	☐	☐	☐
		Mai o raramente	Meno di 1 volta /sett	1 volta /sett	2-3 volte /sett	≥ 4 volte /sett
13. Pesce (fresco o surgelato) o frutti di mare	150 gr (pesce) 50 gr (frutti di mare)	☐	☐	☐	☐	☐
14. Frutta secca (noci, mandorle, nocciole)	1 pugno (30 gr)	☐	☐	☐	☐	☐
15. Legumi (ceci, lenticchie, piselli, fagioli)	50 gr (secchi) 150 gr (scatola / freschi)	☐	☐	☐	☐	☐

Alvo regolare: □ si □ so

a. Assume farmaci *(solo per terapie croniche, non farmaci al bisogno*: □ si □ no se sì quali:

_____

b. Pratica attività fisica: □ si □ no Con quale frequenza? (indicare giorni a settimana)_____

Per le donne: età al menarca ___

Ciclo mestruale regolare	□ si □ no	Menopausa □
Gravidanze	□ si □ no	se si indicare quante _____
Aborti	□ si □ no	se si indicare quanti _____

ANAMNESI PATOLOGICA

Malattie infettive	□ si □ no _____
Malattie dell'apparato cardiovascolare	□ si □ no _____
Malattie dell'apparato respiratorio	□ si □ no _____
Malattie dell'apparato neurologico	□ si □ no _____
Malattie dell'apparato urinario	□ si □ no _____
Malattie dell'apparato emopoietico	□ si □ no _____
Malattie dell'apparato endocrino	□ si □ no _____
Interventi chirurgici	□ si □ no _____

ANAMNESI LAVORATIVA

Mansione lavorativa

Tra quali categorie rientrerebbe?

1. Legislatori, imprenditori e alta dirigenza
2. Professioni intellettuali, scientifiche e di elevata specializzazione
3. Professioni tecniche
4. Professioni esecutive nel lavoro d'ufficio
5. Professioni qualificate nelle attività commerciali e nei servizi
6. Agricoltori specializzati, selvicoltori e addetti al settore della pesca
7. Artigiani, operai specializzati
8. Conduttori di impianti, operai di macchinari fissi e mobili e conducenti di veicoli)
9. Professioni non qualificate
10. Forze armate

Attualmente ha un lavoro: □ Tempo indeterminato □ Tempo determinato

□ Contratto progetto/Collaborazione coordinata e continuativa □ Altro

Lavora nel: □ Settore Pubblico □ Settore Privato

Da quanti anni effettua la mansione che ha indicato? _____

Rischio associato all'ambiente di lavoro (una o più risposte):
□ Rischio biologico
□ Rischio fisico
□ Rischio chimico
□ Rischio organizzativo (stress, lavoro a turni)

A quali sostanze chimiche è esposto nella sua attività lavorativa?
(una o più risposte)

Olio, benzina, diesel	Si☐	No ☐	Non so ☐	Specificare: (es. raffinazione del petrolio/impianti petrolchimici/raffineria di petrolio, lavori in garage, ristrutturazione del suolo contaminato, altro lavoro, quale?.....)
Creosoto, olio di creosoto, carbone	Si☐	No ☐	Non so ☐	Specificare: (ad es. lavori con creosoto, impregnazione del legno, lavori supilastri, lavori ferroviari, ristrutturazione del suolo contaminato, altri lavori, quale?.....)
Bitume, prodotti bituminosi	Si☐	No ☐	Non so ☐	Specificare: (es. pavimentazione stradale, lavori in bitume, coperture in bitume, impermeabilizzazioni, risanamento di terreni contaminati, altri lavori, quale?) ……
Prodotti di combustione, inclusi scarichi di benzina/diesel, cenere o fuliggine	Si☐	No ☐	Non so ☐	Specificare: (es. produzione di alluminio, antincendio/pratica antincendio/formazione antincendio, fonderia, lavori in officina, riscaldamento/centrali termoelettriche, industria metallurgica, estrazione mineraria, ispezione di veicoli, depositi di veicoli, incenerimento dei rifiuti)
Idrocarburi policiclici aromatici (IPA), se non inclusi in altri gruppi/categorie di sostanze	Si☐	No ☐	Non so ☐	Specificare: ……..
Polvere metallica	Si☐	No ☐	Non so ☐	Specificare: ……..
Mercurio	Si☐	No ☐	Non so☐	Specificare: ……..
Piombo	Si☐	No ☐	Non so☐	Specificare: ……..
Cadmio	Si☐	No ☐	Non so ☐	Specificare: ……..
Cromo	Si☐	No ☐	Non so ☐	Specificare: ……..
Altri metalli	Si☐	No ☐	Non so ☐	Specificare: ……..
Farmaci	Si☐	No ☐	Non so ☐	Specificare: ……..
Vernici	Si☐	No ☐	Non so☐	Specificare: ……..
Inchiostri da stampa	Si☐	No ☐	Non so ☐	Specificare: (ad es. produzione di inchiostro, industria della stampa, altro lavoro, quale?)……..

Coloranti e pigmenti (inchiostri per tatuaggi, coloranti allo zolfo)	Si☐	No ☐	Non so ☐	Specificare: (lavoro/compito lavorativo, che tipo di colorante? .....)
Diisocianati, vernici, schiume e adesivi a base di 4,4'-metilendifenil diisocianato (MDI), toluen diisocianato (TDI) e polimeri poliuretanici a base di MDI o TDI.	Si☐	No ☐	Non so ☐	Specificare: ……..
Pitture	Si☐	No ☐	Non so☐	Specificare: ……..
Solventi	SI ☐	No ☐	Non so☐	Specificare: ……..
Plastificanti	Si☐	No ☐	Non so☐	Specificare: ……..
Pesticidi, prodotti per la disinfezione (erbicidi, fungicidi, insetticidi o battericidi).	Si ☐	No ☐	Non so☐	Specificare: ……..
Cosmetici o prodotti per il trattamento dei capelli	Si☐	No ☐	Non so ☐	Specificare: ……..
Detergenti	Si☐	No☐	Non so ☐	Specificare: ……
Aniline	Si☐	No ☐	Non so ☐	Specificare:……
Prodotti chimici della gomma	Si ☐	No ☐	Non so ☐	Specificare: ……..
Nanomateriali	Si ☐	No ☐	Non so ☐	Specificare: ……..
Rivestimenti fotoresistenti/antiriflesso	Si ☐	No ☐	Non so ☐	Specificare: ……..
Altri materiali pericolosi, rifiuti pericolosi o altre sostanze chimiche	Si	No	Non so	Specificare: ……..
Micotossine (lavorazioni con farine come prodotti da forno, gestione rifiuti, attività agricole come produzione animale, serra e altro)	Si☐	No ☐	Non so☐	Specificare: ……..
Altri composti Specificare.....	Si ☐	No ☐	Non so☐	Specificare: ……..

Ha svolto precedentemente altre attività lavorative con esposizione a sostanze chimiche?

□ SI □ NO

Se si indicare quali:

Hai svolto una delle seguenti attività come attività fai-da-te/hobby e/o sei stato esposto a una di queste sostanze in queste attività nell'ultimo mese? (non considerare la tua attività professionale per favore)

Prodotti/attività/hobbies	**Si**	**No**	**Non so**
Giardinaggio (Fertilizzanti)	☐	☐	☐
Concia del cuoio	☐	☐	☐
Fusione	☐	☐	☐
Riciclo di componenti elettriche	☐	☐	☐
Saldatura	☐	☐	☐
Vernici	☐	☐	☐
Coloranti	☐	☐	☐
Inchiostri	☐	☐	☐
Pitture (dipingere quadri, tinteggiare casa)	☐	☐	☐
Detergenti	☐	☐	☐
Lavaggio auto self-service	☐	☐	☐
Rifornimento carburante self-service	☐	☐	☐
Gare automobilistiche e/o motociclistiche su pista	☐	☐	☐
Motocross	☐	☐	☐
Go-Kart	☐	☐	☐
Smalto (manicure)	☐	☐	☐
Lacca spray per capelli	☐	☐	☐
Street art (murales, graffiti)			
Conservanti	☐	☐	☐