

I. Pavan, C. Baroffio, E. Buglione, V. Passini, E. Pira

Ammine aromatiche ad azione cancerogena certa, probabile o possibile: valori di riferimento

Dipartimento di Traumatologia Ortopedia e Medicina del Lavoro - Università di Torino

Questo lavoro si propone di verificare i tenori attuali di alcune AA, nelle urine di soggetti professionalmente non esposti, e fornire indicazioni chimico-analitiche praticabili, al fine di definire un valore standard di riferimento per esposizioni professionali. Dall'esame della bibliografia risulta che solo alcune delle AA tossicologicamente rilevanti sono state dosate su urine (Anilina, Benzidina, 2-Naftilamina, o-Toluidina, 3,3'-Diclorobenzidina, 4-Cloro-o-Toluidina e 4-Cloroanilina) e che, per monitorare l'esposizione ad AA cancerogene in operatori non esposti professionalmente, non è assolutamente significativo il dosaggio delle AA totali, in quanto legate a fattori di vita (dieta alimentare, farmaci o necessità estetiche quale la colorazione dei capelli). La necessità analitica di dosare le AA a concentrazioni pari od inferiori a 1 µg/L su urine richiede l'impiego di metodi semplici, dotati di elevata sensibilità e specificità. In base all'esame della bibliografia e alla nostra esperienza, il metodo proposto da Lichtenstein è quello che permette di raggiungere i risultati analitici più interessanti.

Parole chiave: ammine aromatiche, urine, popolazione non esposta.

ABSTRACT. *www.gimle.fsm.it - The aim of this work is to determine the amount of some aromatic amines in urine of non-exposed people in order to define a reference value.*

The literature examination has showed that only a small numbers of aromatic amines are usually determined in urine namely: aniline, benzidine, 2-naphthylamine, o-toluidine, 3,3'-dichlorobenzidine, 4-chloro-o-toluidine and 4-chlorobenzidine. On the basis of our experience the analytical method proposed by Lichtenstein is appropriate for obtaining reliable analytical results.

Key words: aromatic amines, urine, no-exposed people.

1. Introduzione

Appartengono alle ammine aromatiche (aa) i prodotti derivanti dall'ammoniaca di cui almeno un atomo di idrogeno è sostituito da un radicale aromatico (es. Benzene, Naftalene, Difenile). Si tratta quindi di una vastissima famiglia di composti il cui capostipite è rappresentato dall'anilina. Le ammine aromatiche si dividono in aa primarie, secondarie, terziarie in base al numero di atomi di idrogeno che sono sostituiti sul radicale -NH₂.

Dal punto di vista chimico-fisico le aa sono caratterizzate da una elevata reattività con conseguente capacità di formare molecole complesse, da proprietà catalizzanti ed ossidanti, caratteristiche sfruttate in campo industriale soprattutto nei settori della produzione di coloranti ed isocianati, dell'industria della gomma, delle materie plastiche, della petrolchimica, della farmaceutica e dei laboratori chimici.

Nella valutazione della tossicità sull'uomo è importante considerare il fatto che molecole strutturalmente molto simili presentano, sia dal punto di vista sperimentale sia epidemiologico, caratteristiche molto differenti anche per l'attività oncogena per cui, al momento, solo tre aa primarie appartengono al gruppo 1 secondo la classificazione IARC (International Agency Research of Cancer) (1) (4-Aminodifenile, Benzidina, 2-Naftilamina) per la loro provata azione sul tratto urinario nella specie umana.

Il differente grado di volatilità e di liposolubilità è in grado di influenzare l'assorbimento per via inalatoria e gastroenterica e conferisce alle diverse aa la capacità di penetrare anche attraverso la cute integra.

L'esposizione a tali composti avviene prevalentemente in ambito professionale.

L'esposizione di natura non professionale può avvenire per la loro presenza in alcune matrici ambientali (cibo, acqua, suolo, cosmetici, medicinali). Rilevante, inoltre, è l'apporto dovuto al fumo di sigaretta (1 sigaretta contiene una quantità di anilina tra 50.6 e 577ng pari a 1-10 µg per pacchetto di sigarette): ne deriva quindi che in un fumatore medio l'escrezione urinaria di anilina dovrebbe essere compresa tra 0.4 e 4 µg/L (2).

Lo scopo di questo lavoro è verificare quali sono attualmente i tenori di alcune aa nelle urine di soggetti professionalmente non esposti e fornire indicazioni chimico-

analitiche praticabili per verificare le concentrazioni di tali ammine in questo substrato biologico anche al fine di definire un valore standard di riferimento per esposizioni professionali.

2. Aspetti Normativi e Legislativi

Nella Tabella I sono riportate le aa oggetto di questa revisione, classificate secondo le indicazioni della IARC.

La produzione e l'utilizzo di aa sono regolamentati nel nostro Paese dalle seguenti norme:

DPR 303/56, CM 46/79, CM 61/81, Dlgs 77/92, Dlgs 626/94 allegato n° 8.

In base alla CM n. 46/79 le aa sono suddivise in 3 gruppi a loro volta suddivisi in serie:

- Gruppo 1: aa che hanno dimostrato attività cancerogena
Serie 1: accertata capacità di aumentare significativamente nell'uomo il rischio di cancerogenesi
Serie 2: evidenza di cancerogenicità in più specie di mammiferi

Tabella I.

Ammine Aromatiche	Gruppo	CAS	Peso Molecolare
4-Aminodifenile	1	92-67-1	169.22
Benzidina	1	92-87-5	184.23
2-Naftilamina	1	91-59-8	143.18
4-Cloro-o-toluidina	2A	95-69-2	141
4,4'-Metilen-bis (2 cloroanilina)	2A	101-14-4	267.15
4-Aminoazobenzolo	2B	60-09-3	197.23
2-Aminoazotoluolo	2B	97-56-3	225.28
4-Cloroanilina	2B	106-47-8	127.57
2,4-diaminoanisolo	2B	615-05-4	138.16
4,4'-Diaminodifenilmetano	2B	101-77-9	198
3,3'-Diclorobenzidina	2B	91-94-1	253.13
3,3'-Dimetossibenzidina	2B	119-90-4	244.28
3,3'-Dimetilbenzidina	2B	119-93-7	212.28
3,3'-Dimetil-4,4'-Diaminodifenilmetano	2B	838-88-0	226
p-Cresidina	2B	120-71-8	137
4,4'-Ossidianilina	2B	101-80-4	200
4,4'-Tioanilina	2B	139-65-1	216
o-Toluidina	2B	95-53-4	107.15
2,4-Toluidindiamina	2B	95-80-7	122
2,4,5-Trimetilanilina	3	137-17-7	135
Anilina	3	62-53-3	93.13

note:

gruppo 1: agenti carcinogeni per l'uomo;

gruppo 2A: agenti probabili carcinogeni per l'uomo;

gruppo 2B: agenti possibili carcinogeni per l'uomo;

gruppo 3: agenti non classificabili come carcinogeni per l'uomo;

gruppo 4: agenti probabili non carcinogeni per l'uomo.

Serie 3: evidenza di cancerogenicità su una sola specie di mammiferi

- Gruppo 2: aa in cui è stata testata la cancerogenicità con i seguenti risultati:

Serie 1: sostanze dimostrate cancerogene in una sola specie animale d'esperimento

Serie 2: sostanze testate, ma con risultati non chiaramente valutabili

- Gruppo 3: aa rimanenti non elencate negli altri gruppi

Attualmente sono vietate la produzione e l'utilizzo delle seguenti aa: 2-Naftilamina e suoi sali, 4-Aminodifenile e suoi sali, Benzidina e suoi sali, 4-Nitrodifenile, fatta eccezione il caso in cui siano presenti in concentrazione inferiore allo 0.1% in peso.

L'utilizzo di tali aa, a fini sperimentali, è comunque possibile in seguito ad autorizzazione in deroga rilasciata dal Ministero del Lavoro con validità di tre anni; tale autorizzazione dovrà essere richiesta anche nel caso in cui tali aa compaiano come prodotti intermedi o siano presenti in concentrazione superiore allo 0.1% (Dlgs 77/92).

La concentrazione non potrà in alcun caso superare l'1% in peso per le altre aa appartenenti al gruppo 1 e 2 serie 1 ed il 5% in peso per le aa di gruppo 2 serie 2 e gruppo 3 (CM 61/81).

3. Esame della Letteratura

È stata analizzata la letteratura relativa all'ultimo ventennio, selezionando i lavori più significativi.

Da questa analisi risulta che tra le aa di rilevante importanza tossicologica solo alcune sono state dosate su urine di soggetti esposti o non esposti professionalmente e precisamente: Anilina, Benzidina, 2-Naftilamina, o-Toluidina, 3-3'-Diclorobenzidina, 4-Cloro-o-Toluidina e 4-Cloroanilina (Tab. II e III) (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12). Per comodità di lettura le Tabelle II e III riportano in sintesi i risultati raccolti.

L'esame della bibliografia fa emergere che per monitorare l'esposizione ad aa cancerogene in operatori non esposti professionalmente, non è assolutamente significativo il dosaggio delle aa totali in quanto queste ultime sono legate a fattori di vita (dieta alimentare, farmaci o necessità estetiche quale la colorazione dei capelli).

Nei soggetti non professionalmente esposti emergerebbe una correlazione significativa tra concentrazione urinaria di questi metaboliti e fumo (Tab. II) (4, 5, 6, 7, 8), mentre tale associazione nei soggetti professionalmente esposti non viene chiaramente evidenziata (Tab. III) (4, 5, 7, 9, 10, 11, 12).

Inoltre, a nostro parere, una possibile fonte esogena di esposizione ad aa sarebbe rappresentata dall'assorbimento di coloranti azoici (coloranti tessili, tinture per capelli, coloranti in genere a base amminica, etc.) (Tab. IV) (12, 13, 14, 15, 16, 17); tali composti potrebbero contenere infatti una piccola concentrazione di aa sotto forma di impurezza, che potrebbe essere assorbita ritrovandosi successivamente in tracce nelle urine (7, 14).

Tabella II. Non esposti professionalmente

Ammina aromatica	Autore	Anno	Concent. Urinaria ($\mu\text{g/L}$)	Concent. Urinaria fumatori ($\mu\text{g/L}$)			Concent. Urinaria non fumatori ($\mu\text{g/L}$)			Metodo analitico
				min	medio	max	min	medio	max	
Anilina	Riffelmann	1995		0.0	1.1	5.1	0.0	0.0	1.2	GC-ECD
4-Cloroanilina				0.0	0.0	0.8	0.0	0.0	0.0	
o-Toluidina				0.0	1.5	4.1	0.0	0.0	0.0	
4-Cloro-o-Toluidina				0.0	2.2	8	0.0	1.8	6.3	
2-Naftilamina				0.0	3.1	7.4	0.0	0.0	1.6	
Benzidina				0.0	0.0	1.4	0.0	0.0	0.0	
Anilina	Teass	1993	3.8						HPLC	
o-Toluidina			2.7							
Anilina *	Bayoumy	1986		0.3	2.0	3.8	0.2	1.8	3.5	GC/MS
o-Toluidina *				1.7	4.2	6.6	0.6	2.7	4.8	
3-3' Diclorobenzidina	Hatfield	1982	0-1.8						GC/MS	
Ammine Aromatiche totali	Armeli	1980		3992 (p.s.1024)	5140 (p.s.1024)	6360 (p.s.1024)	3960 (p.s.1024)	5140 (p.s.1024)	6340 (p.s.1024)	Spettrofotometria

* I risultati forniti dall'autore in mg/24h sono stati corretti basandosi su una diuresi media di 1.5 L

Tabella III. Esposti professionalmente

Ammina aromatica	Autore	Anno	Concent. Urinaria ($\mu\text{g/L}$)	Concent. Urinaria fumatori ($\mu\text{g/L}$)			Concent. Urinaria non fumatori ($\mu\text{g/L}$)			Metodo analitico
				min	medio	max	min	medio	max	
Anilina	Riffelmann	1995		1.1	7.7	58.7	0.0	9.6	134	GC-ECD
4-Cloroanilina				0.0	0.0	7.8	0.0	0.0	20.5	
o-Toluidina				0.0	0.0	2.8	0.0	0.0	4.2	
4-Cloro-o-Toluidina				0.0	0.4	14.2	0.0	0.0	10.4	
2-Naftilamina				0.0	3.9	9.8	0.0	1.7	11.6	
Benzidina				0.0	0.0	2.2	0.0	0.0	2.3	
Anilina	Teass	1993	32						HPLC	
o-Toluidina			104							
Benzidina	Meal	1981	1.2-25.4 (nmoli/mmol x Creat)						GC-MS dopo idrolisi acida delle urine	
Anilina	Pozzoli	1982	7.8-40.3 (inizio turno)						GC	
			8.0-165.3 (fine turno)							
3-3' Diclorobenzidina	Hatfield	1982	0-1.6						GC/MS	
Benzidina	Dewan	1988	0-362.5						HPLC	
3-3' Diclorobenzidina	Pavan		<0.01-1.32						GC-MS	

Altri autori, invece, sostengono che i coloranti azoici, una volta introdotti nell'organismo, possono liberare, mediante un processo di azoriduzione, aa potenzialmente cancerogene. A tale proposito studi sperimentali su animale hanno dimostrato che i coloranti azoderivati possono essere metabolizzati a livello intestinale ad opera dell'attività enzimatica della flora batterica ed a livello epatico ad opera del sistema enzimatico azoriduttasi (13, 15, 17). Tale biotrasformazione può avvenire anche a livello cutaneo in quanto su

di essa sono presenti batteri con attività enzimatica azoriducante (11). Esempi di tale reazione relativi a coloranti azoici con formazione di diclorobenzidina possono essere (12):

PIGMENT YELLOW 55 \Rightarrow 3-3'DICLOROBENZIDINA
+ 2 (P- ACETACETOTOLUIDINE)

PIGMENT ORANGE 34 \Rightarrow 3-3'DICLOROBENZIDINA
+ 2 (3-METIL-1-P-TOLIL-5-PIRROLONE)

Tabella IV.

Autore	Anno	Analisi colorante (impurità)	Organismo	Ammina aromatica	Concent. Urinaria (µg/L)	Limite di detezione	Metodo analitico
Gregory	1984	Benzidina (3 mg/Kg) 4-Aminodifenile (6 mg/Kg) 2-4-Diaminoazobenzene (670 mg/Kg)	Hamsters	Benzidina monoacetilbenzidina Diacetilbenzidina 4-Aminodifenile Benzidina idrossilata 4-Aminodifenile idrossilato	7.4 424 21 9.9 257 5.1	-	-
Mondino	1978	3-3'-Diclorobenzidina	Topi Conigli Scimmie	3-3'-Diclorobenzidina	0	0.05 µg	TLC
Kennelly	1982	Benzidine (80 mg/Kg) o-Dianisidine (0.5 mg/Kg)	Topi	Benzidina *	13.3	-	HPLC
Hofmann	1993	Non effettuata	Topi	3-3'-Diclorobenzidina	0	5 µg/L	GC
Cerniglia	1982	Non effettuata	Batteri	Benzidina 3-3-Dimetilbenzidina 3-3-Dimetoxibenidina	Prove in vitro	-	GC/MS
Pavan		3-3'-Diclorobenzidina (2-103 mg/Kg)	Uomini	3-3'-Diclorobenzidina	<0.01-1.32	0.01 µg/L	GC/MS

* I risultati forniti dall'autore in mg/24h sono stati corretti basandosi su una diuresi media di 1.5 L

Qualora questa ipotesi fosse confermata nella specie umana, potrebbero sorgere problematiche nella valutazione del rischio e nella sorveglianza sanitaria dei soggetti professionalmente esposti, in quanto molte aa tra cui la stessa 3-3'-Diclorobenzidina sono etichettate come R45 (agenti cancerogeni), ma da un punto di vista strettamente normativo la presenza di impurezze nel colorante azoico a concentrazione inferiore allo 0.1% non richiede la necessità di etichettare come carcinogeno il colorante stesso.

4. Esame dei metodi analitici

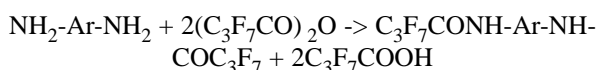
La necessità analitica di dosare le aa a concentrazioni pari od inferiori a 1 µg/L su urine richiede l'impiego di metodi che consentano di avere contemporaneamente elevata sensibilità e specificità, con la possibilità di una facile preparazione del campione. L'esame della bibliografia in argomento e le esperienze da noi condotte hanno evidenziato che il metodo proposto da Lichtenstein et al. (3) è quello che, nel caso delle aa considerate, permette di raggiungere interessanti risultati analitici.

Il metodo descritto nelle sue fasi essenziali da noi parzialmente modificato (18) è il seguente:

Preparazione del campione:

- 10 ml di urina, raccolta al termine del turno lavorativo, viene basificata con 0.5 ml di NaOH e saturata con NaCl.
- L'urina viene estratta con 2 ml di etilacetato. L'estrazione viene ripetuta due volte. Gli estratti vengono riuniti, il tutto viene portato a secco sotto flusso d'azoto.
- Il campione viene ripreso con 0.5 ml di toluene e trasferito in "Vials" da 2 ml in cui viene eseguita la reazione di derivatizzazione mediante 25 µl di anidride eptafluorobutirrica (HFBA).

Le aa reagiscono con l'HFBA secondo la reazione:



Tale reazione avviene in "Vials" chiusi ermeticamente ed incubati in stufa a 80° per 30 minuti.

I "Vials" vengono poi trasferiti su campionatore automatico, ed 1 µl viene iniettato in un sistema GC/MS equipaggiato per l'analisi in frammentografia ionica monitorando lo ione dell'aa ricercata.

L'analisi viene completata in 45 minuti circa.

Nella Tabella V viene riportato, per le aa considerate, il frammento ionico di interesse analitico per ogni singola ammina (3).

Condizioni strumentali:

Per l'analisi delle urine è stata preparata una curva di taratura aggiungendo urina liofilizzata precedentemente testata con aliquote di 2, 5, 20, 50 µg/L di ammina; tali standard sono stati trattati ed estratti come le urine dei soggetti esposti.

Tabella V.

Ammina Aromatica	Tempo di Ritenzione (min)	Frammento Ionico m/z
Anilina	8.6	289
Benzidina	22.3	576
2-Naftilamina	15.7	339
o-Toluidina	9.4	303
3-3'-Diclorobenzidina	23.2	644
4-Cloro-o-Toluidina	12.0	331
4-Cloroanilina	11.3	323

Sulle urine è stata scelta l'estrazione liquido-liquido anziché l'estrazione solido-liquido con cartucce SPE, in quanto da prove preliminari si è visto che il recupero era del 95% con la prima tecnica e del 70% con la seconda.

La sensibilità analitica è pari a 0.01 µg/L.

5. Discussione

Ad eccezione dei soggetti esposti professionalmente ad aa e dei casi di esposizione accidentale o volontaria, la presenza di alcune aa nelle urine di soggetti non esposti potrebbe derivare da due condizioni:

1. presenza di aa come impurezza originaria in alcune matrici ambientali (19, 20);
2. possibile formazione di aa durante un processo metabolico di azoriduzione di un colorante ingerito od assorbito attraverso la cute (11, 12, 13, 15, 17).

Dall'analisi dei dati presenti in letteratura si evidenzia che nei soggetti non professionalmente esposti l'apporto di aa deriva in massima parte dall'esposizione al fumo di sigaretta, anche se alcuni autori (21) sostengono che una possibile fonte sia anche i fumi derivanti da motori diesel.

L'ipotesi dell'azoriduzione, a nostro parere, sarebbe improbabile o andrebbe per lo meno approfondita con ulteriori indagini in quanto in alcuni dei lavori da noi esaminati non viene considerata la presenza di aa come impurezza iniziale nel colorante (13, 14, 15, 16, 17).

Questi risultati potrebbero avere un importante significato nei soggetti professionalmente esposti in quanto, dal punto di vista strettamente normativo, la presenza di impurezze nel colorante azoico a concentrazione inferiore allo 0.1% non rende necessaria l'applicazione dei dispositivi di legge per la prevenzione del rischio da agenti cancerogeni.

Persiste attualmente la problematica di discriminare nei soggetti professionalmente esposti l'origine certa dell'aa presente nelle urine (esposizione professionale o abitudini di vita). Dall'esame della letteratura e dall'analisi dei nostri dati risulta che solo sette aa (Anilina, Benzidina, 4-Cloroanilina, O-Toluidina, 4-Cloro-O-Toluidina, 2-Naftilamina e 3-3'-Diclorobenzidina) sono state ritrovate nelle urine di soggetti non professionalmente esposti, la cui presenza è da attribuirsi ad abitudini voluttuarie quali principalmente il fumo.

Sarebbe pertanto opportuno effettuare uno screening su un maggior numero di soggetti non professionalmente esposti (fumatori e non fumatori) al fine di ottenere la concentrazione media su urine di tali aa. Questi dati, associati a quelli da noi riscontrati in letteratura, potrebbero essere successivamente utilizzati nel definire un valore limite di riferimento in soggetti professionalmente esposti.

Per tutta una serie di aa, riportate in Tabella VI, l'analisi della letteratura ed alcune prove da noi condotte su soggetti non esposti professionalmente consentono, allo stato attuale, di affermare che non vi è presenza, a livello urinario, di tracce di tali aa.

Tabella VI.

Ammine Aromatiche senza riscontro urinario
4-Aminodifenile
4,4'-Metilen-bis (2 cloranilina)
4-Aminoazobenzolo
2-Aminoazotoluolo
2-4-diaminoanisolo
4,4'-Diaminodifenilmetano
3,3'-Dimetoxibenzidina
3,3'-Dimetilbenzidina
3,3'-Dimetil-4,4'-Diaminodifenilmetano
p-Cresidina
4,4'-Oxidianilina
4,4'-Tiodianilina
2,4-Toluilendiamina
2,4,5-Trimetilanelina

Bibliografia

- 1) International Agency Research of Cancer (IARC).
- 2) Pavan I, Buglione E, Colombi A, Cottica D, Della Vedova L, Larsen B, Micoli G, Mosconi G, Passini V. Aspetti metodologici e concettuali nella definizione di valori di riferimento di ammine aromatiche in fluidi biologici. Ed. Morgan. Valori di riferimento di elementi in traccia e sostanze di interesse biotossicologico. 1994.
- 3) Lichtenstein N, Pfaumbaum W, Quellmalz K, Bernards M, Henning M. Qualitative analysis of carcinogenic aromatic amines from azo dyes after azo cleavage. *Reinhaltung der Luft* 1997; 57: 139-45.
- 4) Riffelmann M, Muller G, Schmieding W, Popp W, Norpoth K. Bio-monitoring of urinary aromatic amines and arilamylne emoglobin adducts in exposed workers and non exposed control persons. *Int Arch Occup Environ Health* 1995; 68: 36-43.
- 5) Teass AW et al. Biological monitoring for occupational exposures to o-toluidine and aniline. *Int Arch Occup Environ Health* 1993.
- 6) Bayoumy K, Donahue JM, Hecht SS, Hoffmann D. Identification and quantitative determination of aniline and toluidines in human urine. *Cancer Res* 1986 Dec; 46 (12 Pt 1): 6064-7.
- 7) Hatfield T, Roberts E, Faye Bell I, Clunie J, Kalla P, Mc Kay D. Urine monitoring of textile workers exposed to Dichlorobenzidine-derived pigments. *Journal of Occupational Medicine* 1982; 24 (9): 656-58.
- 8) Armeli G, Baldratti G, Cazzoli F, Rabbi E. Determinazione delle ammine aromatiche totali nelle urine di soggetti adulti non professionalmente esposti. *G Ital Med Lav* 1980; 2: 117-120
- 9) Meal PF, Cocker J, Wilson HK, Gilmour JM. Search for benzidine and its metabolites in urine of workers weighing benzidine-derived dyes. *British Journal of Industrial Medicine* 1981; 38: 191-93.
- 10) Pozzoli L, Seghizzi P, Cassina G, Beni L, Dompè M, Pogna R. Esposizione ad anilina a basse concentrazioni: dosimetria individuale e monitoraggio biologico. *G Ital Med Lav* 1982; 4: 121-27.
- 11) Dewan A, Jani JP, Patel JS, Gandhi DN, Variya MR, Ghodasara NB. Benzidine and its acetylated metabolites in the urine of workers exposed to direct black 38. *Arch of Environ Health* 1988; 43 (4): 269-72.
- 12) Pavan I, Buglione E, Passini V, Cugliari G, Merlo E, Graziano M. Determinazione di ammine aromatiche a sospetta azione cancerogena in soggetti addetti alla preparazione di vernici in polvere pigmentate. *Atti del XVIII° congresso nazionale AIDII* 21-24/06/2000 Trento.
- 13) Gregory AR. The carcinogenic potential of benzidine-based dyes. *Journal Environ Pathol Toxicol Oncol* 1984; 5: 243-59.

- 14) Mondino A, Achari R, Dubini M, Marchisio MA, Silvestri S, Zanolo G. Absence of Dichlorobenzidine in the urine of rats, rabbits and monkeys treated with c.i. pigment yellow 13. *Med Lavoro* 1978; 69 (6) :693-97.
- 15) Kennelly JC, Hertzog PJ, Martin CN. The release of 4-4'-diamino-biphenyls from azodyes in the rat. *Carcinogenesis* 1982; 3: 947-51.
- 16) Hofmann T, Schmidt D. Investigation of possible metabolism of pigment yellow 17, a 3,3'-dichlorobenzidine-based pigment, after inhalation exposure in rats. *Arch Toxicol* 1993; 67 (2): 141-4.
- 17) Cerniglia CE, Freeman JP, Franklin W, Pack LD. Metabolism of azo dyes derived from benzidine, 3-3'-dimethylbenzidine and 3-3'-dimethoxybenzidine to potentially carcinogenic aromatic amines by intestinal bacteria. *Carcinogenesis* 1982; 3: 1255-60.
- 18) Pavan I, Buglione E, Passini V, Botta GC, Cugliari G, Merlo E, Pira E, Graziano M. L'utilizzo del monitoraggio biologico in addetti alla preparazione di vernici in polvere come strumento per l'identificazione del rischio da ammine aromatiche (3-3'-Diclorobenzidina). *Atti del XVIII° Congresso Nazionale dell'Associazione Italiana degli Igienisti Industriali* 2000.
- 19) Lancaster F, Lawrence J. Determination of total non sulphonated aromatic amines in soft drinks and hard candies by reduction and derivatization followed by high performance liquid chromatography. *Food Additives and contaminants* 1992; 9 (2): 171-82.
- 20) Li H, Lee L S, Jafvert C T, Graveel J G. Effect of substitution on irreversible binding and transformation of aromatic amines with soils in aqueous systems. *Environ Sci Technol* 2000; 34: 3674-80.
- 21) Grimmer G, Dettbarn G, Seidel A, Jacob J. Detection of Carcinogenic aromatic amines in the urine of non-smokers. *Sci Total Environ* 2000, feb 28; 247(1): 81-90.