

P. Lovreglio¹, A. Barbieri², M. Carrieri³, L. Sabatini², M.E. Fracasso⁴, D. Doria⁴, I. Drago¹, A. Basso¹, M.N. D'Errico¹, G.B. Bartolucci³, F.S. Violante², L. Soleo¹

Minore validità del benzene urinario rispetto all'acido S-fenilmercapturico nel rilevare l'esposizione occupazionale ed ambientale a concentrazioni molto basse di benzene

¹ Dipartimento di Medicina Interna e Medicina Pubblica, Sezione di Medicina del Lavoro "E.C. Vigliani", Università di Bari, Bari

² Dipartimento di Medicina Interna, dell'Invecchiamento e Malattie Nefrologiche - Unità Operativa di Medicina del Lavoro, Università di Bologna, Bologna

³ Dipartimento di Medicina Ambientale e Sanità Pubblica, Università di Padova, Padova

⁴ Dipartimento di Medicina e Salute Pubblica, Sezione di Farmacologia, Università di Verona, Verona

RIASSUNTO. *Obiettivo.* Studiare la validità del benzene urinario quando l'esposizione al tossico varia da bassa a molto bassa, confrontando il benzene urinario con l'acido *t,t*-muconico (*t,t*-MA) e con l'acido S-fenilmercapturico (SPMA) e tenendo conto dell'influenza del fumo di sigaretta e della co-esposizione a toluene sulla sua eliminazione urinaria. *Materiali e metodi.* Sono stati confrontati i risultati ottenuti in due diversi studi: nel primo lavoratori esposti a basse concentrazioni occupazionali di benzene (18 autisti di autocisterne di carburanti e 23 benzinai) sono stati esaminati contro 31 controlli e nel secondo lavoratori esposti a concentrazioni occupazionali molto basse di benzene (gli stessi 23 benzinai) sono stati studiati contro i 31 controlli. L'esposizione ambientale a benzene e toluene è stata monitorata con campionatori personali passivi (Radiello®). Sulle urine raccolte a fine turno di lavoro sono stati determinati il *t,t*-MA, l'SPMA ed il benzene urinario. Con questionario sono state raccolte informazioni sulle abitudini di vita dei soggetti esaminati.

Risultati. I tre gruppi non differivano per età ed abitudine al fumo di sigaretta. L'esposizione occupazionale a benzene e toluene e le concentrazioni urinarie di *t,t*-MA, SPMA e benzene urinario sono risultate più elevate negli autisti rispetto ai benzinai e in questi rispetto ai controlli. Il fumo di sigaretta è risultato associato con l'eliminazione urinaria di *t,t*-MA, SPMA e benzene urinario sia per bassa che per molto bassa esposizione a benzene. *t,t*-MA, SPMA e benzene urinario sono risultati pressoché sempre correlati sia per bassa che per molto bassa esposizione a benzene. Per bassa esposizione a benzene è risultata una relazione di dipendenza dei livelli di *t,t*-MA, SPMA e benzene urinario sia dal fumo di sigaretta che dal benzene aerodisperso; l'esposizione molto bassa al tossico, invece, ha mostrato una relazione di dipendenza dell'SPMA dal fumo di sigaretta e dal benzene aerodisperso, del benzene urinario soltanto dal fumo di sigaretta e del *t,t*-MA da nessuna delle variabili considerate.

Conclusioni. Per esposizione a basse concentrazioni di benzene occupazionale il benzene urinario e l'SPMA hanno dimostrato una validità sostanzialmente sovrapponibile, mentre per esposizione a concentrazioni molto basse dello stesso l'SPMA conferma la sua validità ed il benzene urinario risulta meno valido. Il fumo di sigaretta rappresenta il principale fattore in grado di condizionare l'escrezione di tutti gli indicatori biologici del benzene in presenza di esposizione occupazionale sia bassa che molto bassa al tossico, per cui si raccomanda l'astensione dal fumo di sigaretta almeno nelle ore immediatamente precedenti la raccolta delle urine.

Parole chiave: benzene urinario, acido S-fenilmercapturico (SPMA), acido *t,t*-muconico (*t,t*-MA), monitoraggio biologico.

Introduzione

L'esposizione occupazionale a benzene, ancora presente nell'industria di raffinazione del petrolio e petrolchimica, nelle cokerie, nei laboratori di ricerca, nell'industria chimica e nelle attività di trasporto ed erogazione di carburanti, è nei paesi occidentali generalmente 2-3 ordini di grandezza inferiore al TLV-TWA proposto dall'American Conference of Governmental Industrial Hygienist (ACGIH) (1, 2). Un'esposizione a concentrazioni molto basse è possibile anche negli ambienti di vita, essendo il benzene contenuto oltre che negli scarichi autoveicolari anche nel fumo di sigaretta, che rappresenta la principale fonte di esposizione non occupazionale al tossico (3). Sia negli ambienti di lavoro che negli ambienti di vita, inoltre, il benzene è quasi sempre presente in co-esposizione con il toluene (1, 3, 4).

La possibilità che anche a queste concentrazioni basse o molto basse il benzene possa esercitare la sua azione cancerogena, per la quale non è stata definita una soglia d'effetto, rende di estremo interesse individuare indicatori di dose interna sensibili e specifici da utilizzare per la valutazione dell'esposizione occupazionale al tossico. In passato, a questo scopo è stato utilizzato il fenolo urinario, sostituito, con la progressiva riduzione dell'esposizione occupazionale a benzene, dall'acido *t,t*-muconico (*t,t*-MA) e dall'acido S-fenilmercapturico (SPMA), suggeriti anche dall'ACGIH (2, 5, 6). Anche l'utilizzo di questi due indicatori biologici è messo in discussione alla luce delle concentrazioni molto basse di benzene attualmente presenti negli ambienti di lavoro (7). È stato proposto, pertanto, il benzene urinario quale nuovo indicatore da utilizzare nel monitoraggio biologico, anche se esso necessita ancora di ulteriori studi per poter essere applicato in ambito occupazionale (8).

L'obiettivo di questo lavoro, pertanto, richiamando i risultati riportati in due recenti pubblicazioni del nostro gruppo di ricerca sulla validità dei diversi indicatori di dose interna a rilevare l'esposizione a benzene, è stato quello di mostrare come si modifica la validità del benzene urinario quando l'esposizione occupazionale al tossico varia da bassa a molto bassa, confrontando il benzene urinario con il *t,t*-MA e l'SPMA e tenendo conto dell'influenza che il fumo di sigaretta e la co-esposizione a toluene hanno sulla sua eliminazione urinaria (9, 10).

ABSTRACT. LESSER VALIDITY OF URINARY BENZENE THAN S-PHENYLMERCAPTURIC ACID FOR MEASURING OCCUPATIONAL AND ENVIRONMENTAL EXPOSURE TO VERY LOW CONCENTRATIONS OF BENZENE.

Aim. To study the validity of urinary benzene as a biomarker of low and very low exposure to this toxicant, as compared with *t,t*-muconic acid (*t,t*-MA) and *S*-phenylmercapturic acid (SPMA), also taking into account the influence of cigarette smoking and co-exposure to toluene on the urinary excretion of benzene.

Materials and methods. The results obtained in two different studies were compared: in the first, workers occupationally exposed to low concentrations of benzene (18 fuel tanker drivers and 23 filling station attendants) were compared with 31 controls and in the second, workers exposed to very low concentrations of benzene (the same 23 filling station attendants) were compared with the 31 controls. Exposure to airborne benzene and toluene was monitored with passive personal samplers (Radiello®). Then the urine collected at the end of the work shift was analyzed for *t,t*-MA, SPMA and urinary benzene. All participants also filled out a questionnaire about their lifestyle habits.

Results. There were no differences among the three groups in terms of age and smoking habit. Occupational exposure to benzene and toluene and the urinary concentrations of *t,t*-MA, SPMA and urinary benzene were higher in the fuel tanker drivers than the filling station attendants and higher in the latter than in the controls. Cigarette smoking was found to be associated with urinary excretion of *t,t*-MA, SPMA and urinary benzene at both low and very low exposure to benzene. The biomarkers *t,t*-MA, SPMA and urinary benzene were almost always correlated, for both low and very low exposure to benzene. Notably, for low exposure to benzene a dependency relation was found with the levels of *t,t*-MA, SPMA and urinary benzene on both cigarette smoking and airborne benzene, whereas for very low exposure to benzene there was a dependency relation of SPMA on cigarette smoking and airborne benzene, of urinary benzene only on cigarette smoking and of *t,t*-MA on none of the variables considered.

Conclusions. For occupational exposure to low concentrations of benzene, urinary benzene and SPMA showed a comparable validity, while for exposure to very low concentrations of this toxicant the validity of SPMA was confirmed while urinary benzene was found to be less useful. Cigarette smoking was the main factor conditioning the excretion of all the biomarkers of benzene in conditions of both low and very low exposure to the toxicant, so for the analysis of occupational exposure to benzene it is best to recommend abstention from smoking at least in the hours immediately before urine collection.

Key words: urinary benzene, *S*-phenylmercapturic acid (SPMA), *t,t*-muconic acid (*t,t*-MA), biological monitoring.

per età ed abitudine al fumo di sigaretta. Tutti i soggetti partecipanti allo studio hanno fornito il consenso scritto a partecipare alla ricerca.

Valutazione dell'esposizione e metodi analitici

Campionamento ambientale

L'esposizione ambientale a benzene e toluene è stata verificata sia per i lavoratori professionalmente esposti che per i controlli mediante campionamento personale passivo, utilizzando campionatori diffusivi radiali (Radiello®) contenenti una cartuccia di carbone attivo, indossati dai soggetti in zona respiratoria per otto ore. Le fiale di Radiello®, dopo il campionamento, sono state conservate a +4°C fino al momento dell'analisi, effettuata in Gas-Cromatografia con rilevatore di fiamma (GC-FID), applicando il metodo NIOSH modificato (11). Il limite di rilevanza (LOD) sia per il benzene che per il toluene è stato di 3 µg/m³. Il toluene ambientale è stato determinato soltanto in 9 controlli. Tutte le analisi sono state eseguite in cieco. Per ulteriori dettagli sulla metodologia analitica si rimanda al lavoro citato in precedenza (9).

Campionamento delle urine

Lo stesso giorno del campionamento ambientale, alla fine della giornata di lavoro, esposti e controlli hanno raccolto un campione di urine per la misurazione degli indicatori biologici di dose interna del benzene (*t,t*-MA, SPMA, benzene urinario). Tutte le analisi sono state eseguite in cieco.

L'analisi del *t,t*-MA è stata eseguita in HPLC-UV a 264 nm, dopo estrazione in fase solida (12). Il LOD è stato di 10 µg/L. Quella dell'SPMA è stata effettuata con cromatografia liquida/spettrometria di massa tandem electrospray (HPLC-ESI-MS/MS) secondo quanto riportato da Sabatini *et al.* (13). Il LOD è stato di 0.20 µg/L. La determinazione del benzene urinario è stata eseguita con analisi mediante Gas-Cromatografia/Spettrometria di massa (14). Il LOD è stato di 0.02 µg/L. L'analisi della creatinina urinaria è stata eseguita usando un analizzatore DCA 2000®+ (15). Per ulteriori dettagli sulle metodologie analitiche si rimanda al lavoro citato in precedenza (9).

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il programma SPSS (versione 14.0, Chicago, IL, USA). I dati risultati inferiori al limite di rilevanza del metodo analitico sono stati riportati nel database con un valore corrispondente a metà del limite di rilevanza. Per tutte le variabili è stata verificata la normalità della distribuzione mediante il test di Kolmogorov-Smirnov. Le variabili non distribuite normalmente sono state analizzate con test parametrici dopo trasformazione logaritmica o con test non parametrici. L'analisi della correlazione è stata effettuata utilizzando il test di Spearman. La relazione di dipendenza dei differenti indicatori biologici dalle variabili indipendenti è stata valutata mediante modelli di regressione lineare multipla. Il livello di significatività è stato individuato per una *p* inferiore a 0.05.

Materiali e metodi

Soggetti

Sono stati considerati due gruppi di lavoratori maschi con diversa esposizione occupazionale a benzene, composti rispettivamente da 18 autisti di autocisterne di carburanti (autisti) e da 23 lavoratori addetti al rifornimento di carburante presso stazioni di servizio (benzinai). Questi sono stati confrontati con 31 lavoratori maschi non professionalmente esposti a benzene (controlli), residenti nella stessa area geografica ed opportunamente appaiati

Risultati

Autisti, benzinai e controlli non hanno mostrato differenze tra loro per quanto riguarda l'età, l'indice di massa corporea (BMI) e l'abitudine al fumo di sigaretta valutata sia come numero di sigarette fumate giornalmente che come numero di sigarette fumate durante il periodo campionato, mentre gli autisti hanno evidenziato un'assunzione di alcol più elevata rispetto agli altri due gruppi (tabella I). Nella tabella II sono riportate l'esposizione a benzene e toluene e le concentrazioni urinarie di *t,t*-MA, SPMA e benzene urinario nei tre gruppi esaminati. Come si può rilevare in essa i tre gruppi differiscono tra loro per quanto riguarda sia l'esposizione a benzene e a toluene che l'eliminazione dei metaboliti urinari del benzene.

I successivi risultati presentati si riferiscono al confronto tra i dati riportati nelle due pubblicazioni citate in precedenza: nella prima i lavoratori esposti a benzene erano rappresentati da autisti e benzinai che sono stati analizzati insieme ed hanno mostrato un'esposizione a benzene considerata bassa; nella seconda gli esposti erano costituiti dai soli benzinai, con un'esposizione a benzene aerodisperso considerata molto bassa (9, 10).

Per studiare la relazione tra fumo di sigaretta e rispettivamente concentrazioni ambientali di benzene e concentrazioni dei suoi metaboliti urinari, tutti i soggetti esaminati, rispettivamente autisti, benzinai e controlli nel primo lavoro e solo benzinai e controlli nel secondo lavoro, sono stati suddivisi in fumatori e non fumatori (tabella III). In entrambi gli studi, pur variando i livelli di esposizione a benzene, è stata osservata assenza di relazione tra fumo di sigaretta e livelli di benzene aerodisperso, e la presenza invece di un'associazione significativa tra fumo di sigaretta e rispettivamente *t,t*-MA, SPMA e benzene urinario.

Risultati differenti nei due studi, invece, sono emersi dall'analisi della varianza a due vie che ha valutato la contemporanea influenza dell'esposizione occupazionale a benzene e del fumo di sigaretta sull'eliminazione urinaria degli indicatori di dose interna. Infatti, considerando insieme autisti e benzinai rispetto ai controlli è stata evidenziata un'associazione significativa dei livelli di SPMA e benzene urinario sia con l'esposizione occupazionale a benzene che con il fumo di sigaretta (modello, esposizione occupazionale e fumo di sigaretta, tutti con $p < 0.001$); valutando invece solo i benzinai rispetto ai controlli, SPMA e benzene urinario hanno mostrato un'associazione con il fumo di sigaretta (modello e fumo di sigaretta, tutti con $p < 0.002$) e non con l'esposizione occupazionale. Anche il

Tabella I. Caratteristiche generali dei soggetti dei tre gruppi esaminati

	AUTISTI					BENZINAI					CONTROLLI				
	N.	Media±DS	MG	Mediana	Range	N.	Media±DS	MG	Mediana	Range	N.	Media±DS	MG	Mediana	Range
Età (anni)	18	42.8±9.0	42.3	43.0	30-57	23	40.7±9.9	39.5	40.0	19-60	31	41.7±9.1	40.7	43.0	22-62
Indice di massa corporea (BMI) (kg/m ²)	18	28.0±4.0	27.7	27.6	20.8-35.9	23	26.0±3.9	25.7	26.5	20.3-37.2	31	26.7±4.8	26.3	25.8	20.9-44.4
Alcol															
Astemio	2	11.1%				7	30.4%				10	32.3%			
<10 g/die	3	16.7%				7	30.4%				9	29.0%			
>10 g/die	13	72.2%				9	39.2%				12	38.7%			
N. sigarette/die	10	23.0±9.8	21.8	20.0	15-50	11	18.8±10.9	14.8	20.0	2-40	16	16.6±10.6	13.9	11.0	5-40
N. sigarette durante campionamento ambientale	10	11.7±5.9	-	13.0	0-22	11	13.1±10.2	-	10.0	0-40	16	7.6±5.4	-	6.0	0-20

MG = Media Geometrica

Tabella II. Concentrazione ambientale di benzene e di toluene e degli indicatori urinari di esposizione a benzene negli autisti, nei benzinai e nei controlli

	AUTISTI				BENZINAI				CONTROLLI			
	N.	Media±DS	Mediana	Range	N.	Media±DS	Mediana	Range	N.	Media±DS	Mediana	Range
Benzene ambientale (µg/m ³) ^b	18	306.7±266.7	246.6	7.4-1017.1	23	23.5±17.4	20.9	4.5-66.3	31	4.6±2.6	4.3	<3.0-11.5
Toluene ambientale (µg/m ³) ^b	17	1339.4±1191.8	1056.8	42.3-3880.7	22	144.3±108.6	130.9	19.0-479.0	9	15.2±13.0	13.1	<3.0-47.4
Acido <i>t,t</i> -muconico urinario (µg/g creat) ^a	18	134±94	109	16-400	23	86±34	89	11-157	31	93±132	59	13-734
SPMA urinario (µg/g creat) ^b	18	2.94±3.24	1.67	0.25-12.13	23	0.79±0.77	0.56	0.05-3.33	31	0.65±1.00	0.22	0.03-4.48
Benzene urinario (µg/L) ^b	18	2.96±3.01	1.49	0.16-10.42	23	0.62±0.74	0.21	0.04-2.87	31	1.23±2.63	0.12	<0.02-11.40

^ap<0.05; ^bp<0.001

Tabella III. Concentrazioni ambientali di benzene e dei suoi indicatori urinari di dose interna in tutti i soggetti esaminati suddivisi per abitudine al fumo di sigaretta, includendo o escludendo gli autisti

	SOGGETTI ESAMINATI	FUMATORI				NON FUMATORI			
		N.	Media±DS	Mediana	Range	N.	Media±DS	Mediana	Range
Benzene ambientale (µg/m ³)	Autisti + benzinai + controlli	37	88.3±177.6	9.8	<3.0-762.5	35	83.9±191.9	6.2	<3.0-1017.1
	Benzinai + controlli	27	11.8±11.1	8.0	<3.0-41.9	27	13.6±17.9	4.9	<3.0-66.3
Acido <i>t,t</i> -muconico urinario (µg/g creat)	Autisti + benzinai + controlli ^a	37	112±80	90	13-400	35	90±112	64	11-734
	Benzinai + controlli ^a	27	100±60	90	13-310	27	80±133	57	11-734
SPMA urinario (µg/g creat)	Autisti + benzinai + controlli ^b	37	1.51±1.48	1.10	0.03-6.15	35	1.00±2.46	0.22	0.04-12.13
	Benzinai + controlli ^b	27	1.09±0.98	0.80	0.03-4.48	27	0.32±0.63	0.14	0.04-3.33
Benzene urinario (µg/L)	Autisti + benzinai + controlli ^b	37	2.13±2.62	1.20	0.04-11.40	35	0.78±2.11	0.08	<0.02-10.42
	Benzinai + controlli ^b	27	1.85±2.65	1.01	0.04-11.40	27	0.09±0.08	0.06	<0.02-0.37

Fumatori vs non fumatori: ^ap≤0.05; ^bp<0.001

t,t-MA ha manifestato un differente comportamento nei due studi, mostrando quando sono stati considerati insieme autisti e benzinai rispetto ai controlli un'associazione con l'esposizione occupazionale (modello p=0.016, esposizione occupazionale p=0.028, fumo di sigaretta p=0.055), che è venuta meno dopo aver escluso gli autisti dall'analisi (modello p=0.927).

La correlazione tra benzene ambientale e rispettivamente *t,t*-MA, SPMA e benzene urinario, analizzando esposti e controlli come unico gruppo, è risultata sempre significativa in entrambi gli studi, sebbene con coefficienti rho più alti nel primo lavoro, quando sono stati considerati insieme autisti, benzinai e controlli, rispetto al secondo in cui sono stati esclusi gli autisti (tabella IV). Risultati parzialmente differenti tra i due studi, invece, sono stati osservati quando sono stati analizzati autisti + benzinai o soltanto benzinai, in quanto la correlazione tra benzene ambientale e rispettivamente SPMA e benzene urinario osser-

vata nel primo lavoro, non è stata confermata nel secondo lavoro, escludendo gli autisti dall'analisi. In entrambi gli studi, invece, non è stata osservata, negli esposti, alcuna correlazione tra benzene ambientale e *t,t*-MA. I diversi biomarcatori urinari di dose interna del benzene, infine, sono risultati tutti significativamente correlati tra loro in entrambi i lavori, sia analizzando tutti i soggetti come unico gruppo che considerando solo gli esposti, con l'eccezione della correlazione tra *t,t*-MA ed SPMA negli esposti, risultata non significativa solo nel secondo lavoro, quando nell'analisi sono stati considerati esclusivamente i benzinai.

L'applicazione di differenti modelli di regressione multipla per studiare la relazione di dipendenza di *t,t*-MA, SPMA, e benzene urinario dalle variabili indipendenti età, BMI, numero di sigarette/die e benzene ambientale ha mostrato sostanziali differenze nei due lavori al variare dei livelli di esposizione a benzene (tabella V). Nel primo lavoro, infatti, considerando nell'analisi autisti, benzinai e

Tabella IV. Correlazioni mediante test di Spearman tra benzene ambientale e i suoi indicatori urinari di dose interna in tutti i soggetti esaminati considerati come un unico gruppo, negli esposti, includendo o escludendo gli autisti, e nei controlli

	SOGGETTI ESAMINATI	Benzene ambientale	Acido <i>t,t</i> -muconico	SPMA
Acido <i>t,t</i> -muconico urinario	TOTALE			
	Autisti + benzinai + controlli (N. 72)	0.41 ^c		
	Benzinai + controlli (N. 54)	0.31 ^a		
	ESPOSTI		1	-
	Autisti + benzinai (N. 41)	0.19		
SPMA urinario	TOTALE			
	Autisti + benzinai + controlli (N. 72)	0.57 ^c	0.43 ^b	
	Benzinai + controlli (N. 54)	0.47 ^c	0.31 ^a	
	ESPOSTI			1
	Autisti + benzinai (N. 41)	0.43 ^b	0.34 ^a	
Benzene urinario	TOTALE			
	Autisti + benzinai + controlli (N. 72)	0.47 ^c	0.43 ^c	0.75 ^c
	Benzinai + controlli (N. 54)	0.32 ^a	0.33 ^b	0.68 ^b
	ESPOSTI			
	Autisti + benzinai (N. 41)	0.42 ^b	0.48 ^b	0.68 ^c
	Benzinai (N. 23)	0.23	0.49 ^b	0.59 ^b
	CONTROLLI (N. 31)	0.33	0.15	0.68 ^c

^ap<0.05; ^bp<0.01; ^cp<0.001

Tabella V. Analisi di regressione lineare multipla nei soggetti esposti e controlli analizzati come unico gruppo, includendo o escludendo gli autisti

Variabili indipendenti	Soggetti esaminati	Acido <i>t,t</i> -muconico			SPMA			Benzene urinario		
		b	t	p	b	t	p	b	t	p
Età (anni)	Autisti + benzinai + controlli (N. 72)	-	1.97	0.053	-	0.21	0.832	-	0.39	0.696
	Benzinai + controlli (N. 54)	-	1.57	0.124	-	0.33	0.742	-	0.58	0.564
BMI (Kg/m ²)	Autisti + benzinai + controlli (N. 72)	-	1.03	0.305	0.070	2.35	0.022	-	1.73	0.088
	Benzinai + controlli (N. 54)	-	1.09	0.365	-	0.93	0.359	-	0.59	0.561
Numero sigarette/die	Autisti + benzinai + controlli (N. 72)	0.015	2.07	0.042	0.050	4.35	<0.001	0.082	5.59	<0.001
	Benzinai + controlli (N. 54)	-	2.46	0.017	0.064	4.91	<0.001	0.106	6.50	<0.001
Benzene ambientale (µg/m ³)	Autisti + benzinai + controlli (N. 72)	0.001	2.27	0.026	0.003	4.24	<0.001	0.002	2.64	0.010
	Benzinai + controlli (N. 54)	-	0.95	0.345	0.025	2.67	0.010	-	1.22	0.229
		F	p	R²	F	p	R²	F	p	R²
Modello	Autisti + benzinai + controlli (N. 72)	3.17	0.013	0.19	11.68	<0.001	0.47	11.10	<0.001	0.46
	Benzinai + controlli (N. 54)	1.93	0.121	-	8.60	<0.001	0.47	10.90	<0.001	0.53

controlli, è stata osservata una dipendenza dei livelli di *t,t*-MA, SPMA e benzene urinario sia dal fumo di sigaretta che dal benzene aerodisperso, e per l'SPMA anche dal BMI. Nel secondo lavoro, invece, analizzando solo benzinai e controlli, i risultati hanno mostrato una relazione di dipendenza dell'SPMA dal fumo di sigaretta e dal benzene aerodisperso mentre il benzene urinario è risultato dipendere solo dal fumo di sigaretta e il *t,t*-MA non ha mostrato alcuna dipendenza dalle variabili considerate.

Lo studio del rapporto tra benzene urinario e rispettivamente *t,t*-MA ed SPMA, effettuato allo scopo di valutare la contemporanea influenza del fumo di sigaretta e

della co-esposizione a differenti livelli di toluene mediante analisi della varianza a due vie, ha mostrato risultati sovrapponibili nei due lavori, con il rapporto benzene urinario/*t,t*-MA risultato associato esclusivamente al fumo di sigaretta e il rapporto benzene urinario/SPMA non associato a nessuna delle due variabili (tabella VI).

Discussione

Nel presente studio è stato effettuato un confronto tra l'eliminazione urinaria di benzene, *t,t*-MA ed SPMA in la-

Tabella VI. Rapporto tra benzene urinario e rispettivamente SPMA ed acido *t,t*-muconico in autisti, benzinai e controlli o benzinai e controlli, esaminati come unico gruppo, suddivisi per abitudine al fumo di sigaretta e distribuiti per livelli di esposizione a toluene superiori ed inferiori alla sua concentrazione mediana

	Toluene ambientale	FUMATORI				NON FUMATORI				F	p		
		N.	Media±DS	Mediana	Range	N.	Media±DS	Mediana	Range				
Benzene urinario /SPMA	Autisti + Benzinai + Controlli	Bassa esposizione	12	1.43±1.18	1.00	0.17-4.07	12	0.94±1.10	0.60	0.01-4.00	Modello	2.4	0.100
		Alta esposizione	11	1.42±0.59	1.46	0.34-2.28	13	1.20±1.13	0.76	0.02-3.08	Esposizione	0.1	0.463
		Totale	23	1.43±0.92	1.31	0.17-4.07	25	1.08±1.10	0.63	0.01-4.00	Fumo	4.4	0.041
	Benzinai + Controlli	Bassa esposizione	6	1.55±1.05	1.49	0.17-3.15	10	1.04±1.19	0.73	0.01-4.00	Interazione	0.0	0.913
		Alta esposizione	8	1.38±1.24	1.03	0.32-4.07	7	0.43±0.18	0.45	0.18-0.63	Modello	1.48	0.243
		Totale	14	1.45±1.24	1.12	0.17-4.07	17	0.79±0.79	0.57	0.01-4.00	Esposizione	0.19	0.670
Benzene urinario /acido <i>t,t</i> -muconico	Autisti + Benzinai + Controlli	Bassa esposizione	12	14.3±9.3	11.1	2.0-30.6	12	1.6±1.0	1.4	0.6-3.6	Fumo	4.4	0.041
		Alta esposizione	11	25.4±30.8	17.8	3.8-113.0	13	17.2±23.7	5.5	1.0-63.0	Interazione	0.0	0.913
		Totale	23	19.6±22.5	12.7	2.0-113.0	25	9.7±18.6	2.0	0.6-63.0	Modello	6.1	0.005
	Benzinai + Controlli	Bassa esposizione	6	14.8±10.9	10.7	2.0-30.6	10	1.5±0.9	1.4	0.56-3.64	Esposizione	2.8	0.101
		Alta esposizione	8	11.7±6.9	11.6	3.8-20.8	7	2.4±1.7	1.4	0.62-5.14	Fumo	9.4	0.004
		Totale	14	13.0±6.2	11.1	2.0-30.6	17	1.9±1.3	1.4	0.56-5.14	Interazione	3.8	0.057

voratori esposti professionalmente a concentrazioni rispettivamente basse (autisti+benzinai) o molto basse (benzinai) di benzene, i cui risultati sono riportati in due precedenti pubblicazioni del nostro gruppo di ricerca, con lo scopo di verificare l'applicabilità del benzene urinario quale indicatore di dose interna per esposizioni molto basse al tossico. È stata inoltre valutata come si modifica, al ridursi dei livelli di esposizione occupazionale a benzene, l'influenza del fumo di sigaretta e della co-esposizione a toluene sugli indicatori biologici studiati.

L'esposizione occupazionale a benzene è risultata in tutti i lavoratori sempre inferiore al TLV-TWA dell'ACGIH, sebbene, a livello di gruppo, di un ordine di grandezza più alta negli autisti (valore mediano $246.6 \mu\text{g}/\text{m}^3$) rispetto ai benzinai (valore mediano $20.9 \mu\text{g}/\text{m}^3$) (tabella I) (2). Gli autisti di autocisterne di carburanti, pertanto, continuano a rappresentare la categoria a più alta esposizione nella catena di distribuzione dei carburanti, nonostante le misure preventive realizzate volte a ridurre il contenuto di benzene nella benzina e la sua emissione durante le operazioni di carico e scarico delle cisterne con l'introduzione di sistemi a ciclo chiuso. Inoltre, nei paesi occidentali, l'esposizione occupazionale degli autisti sembra essere sovrapponibile a quella osservata negli operatori delle raffinerie e delle industrie petrolchimiche (16, 17).

Anche l'esposizione occupazionale a toluene è risultata essere complessivamente bassa, sia negli autisti che nei benzinai, ben al di sotto del valore limite proposto dallo SCOEL di $192000 \mu\text{g}/\text{m}^3$ e dall'ACGIH di $75400 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (2, 18). Le concentrazioni di toluene e benzene aerodisperso, inoltre, sono risultate fortemente correlate tra loro, considerando sia tutti i soggetti esaminati come unico gruppo sia solo gli esposti, indipendentemente se si includevano o meno gli autisti nell'analisi (in tutti i casi $\rho=0.94$, $p<0.001$). Questo conferma come per autisti e benzinai l'esposizione occupazionale rappresenti la principale fonte di esposizione sia a benzene che a toluene, creando così una condizione di co-esposizione a basse concentrazioni dei due tossici.

Il monitoraggio biologico dell'esposizione occupazionale a benzene si avvale, come indicato anche dall'ACGIH, del *t,t*-MA e dell'SPMA, indicatori biologici ritenuti validi per esposizione a concentrazioni del tossico nell'ordine del TLV-TWA (2). Il benzene urinario, invece, rappresenta un nuovo indicatore biologico per monitorare l'esposizione occupazionale a benzene che, nonostante la sua buona sensibilità ed assoluta specificità, trova ancora limitazioni nel suo utilizzo routinario, anche a causa della sua elevata variabilità intra-individuale (19).

Il *t,t*-MA ha evidenziato nei due diversi studi considerati un comportamento sostanzialmente differente quando si riduceva la concentrazione ambientale di esposizione a benzene. Infatti, mentre nel primo studio, dove sono stati considerati come esposti autisti e benzinai insieme, è stata osservata una relazione di dipendenza del *t,t*-MA sia dal benzene aerodisperso che dal fumo di sigaretta, nel secondo studio, quando sono stati esclusi dall'analisi gli autisti, il *t,t*-MA è risultato essere un indicatore poco utile per esposizione a concentrazioni molto basse di benzene. Al riguardo, come ampiamente dimostrato in letteratura, il

t,t-MA è nell'uomo un metabolita che oltre a derivare dal benzene origina anche dall'acido sorbico, un comune conservante anti-micotico presente in molti alimenti e nei cosmetici (20). L'apporto dell'acido sorbico con la dieta è considerato uno dei principali determinanti non occupazionali della concentrazione urinaria di *t,t*-MA. In particolare, è stato stimato che l'assunzione di 6-30 mg/die di acido sorbico, quantità media calcolata sulla base di una comune dieta europea, può spiegare dal 10 al 50% dei livelli urinari background di *t,t*-MA nei non fumatori, percentuali che si riducono alla metà nei fumatori (21). Pezzagno *et al.* (20), inoltre, hanno stimato che solo il 25% del *t,t*-MA urinario può essere attribuito alla biotrasformazione del benzene, valore in linea con l' R^2 di 0.19 risultato nell'analisi di regressione effettuata analizzando insieme autisti, benzinai e controlli. Hoet *et al.* (16), invece, hanno mostrato, in lavoratori esposti prevalentemente a concentrazioni di benzene inferiori a $325 \mu\text{g}/\text{m}^3$, come la concentrazione di acido sorbico urinario spieghi ben il 37% della variabilità del *t,t*-MA. Il consumo di acido sorbico con la dieta, pertanto, tenderebbe ad acquisire una rilevanza proporzionalmente sempre maggiore al ridursi dell'esposizione occupazionale a benzene, spiegando così la scomparsa della relazione di dipendenza con il benzene aerodisperso osservata nel secondo studio, per esposizione a concentrazioni molto basse di benzene.

L'SPMA ha mostrato un comportamento simile nei due studi, risultando una sua dipendenza dal benzene aerodisperso e dal fumo di sigaretta per concentrazioni ambientali occupazionali sia basse che molto basse del tossico. Il benzene urinario, invece, ha evidenziato risultati differenti al ridursi dei livelli di esposizione occupazionale a benzene. Infatti esso, mentre nel primo studio per esposizione a basse concentrazioni di benzene ha presentato una validità sovrapponibile a quella dell'SPMA, per esposizione a concentrazioni molto basse, quali quelle considerate nel secondo studio, ha presentato una relazione di dipendenza solo dal fumo di sigaretta, con una validità come indicatore di dose interna del benzene nettamente inferiore rispetto a quella dell'SPMA.

SPMA e benzene urinario sono indicatori biologici entrambi altamente specifici per il benzene, le cui concentrazioni urinarie sono risultate essere chiaramente influenzate dal fumo di sigaretta, considerato la principale fonte non occupazionale di esposizione a questo tossico (7, 22). Nonostante l'elevato contenuto di benzene nel fumo di sigaretta, i dati di letteratura evidenziano come il campionamento personale passivo effettuato con campionatori diffusivi a simmetria radiale (Radiello®) non sia in grado di misurare l'esposizione a benzene che deriva dal fumo, come confermato dall'assenza di differenze significative nei livelli di benzene aerodisperso tra fumatori e non fumatori da noi osservata indipendentemente dai livelli di esposizione al tossico (tabella III) (7, 23). Nei fumatori, pertanto, in particolare in condizioni di esposizione occupazionale a concentrazioni molto basse di benzene, si può creare una discrepanza tra le concentrazioni di benzene aerodisperso rilevate con il campionamento ambientale e le concentrazioni urinarie degli indicatori biologici, tutti fortemente influenzati dall'abitudine al fumo di sigaretta (7, 24).

In accordo con tali osservazioni, la perdita di validità del benzene urinario rispetto all'SPMA al ridursi dell'esposizione occupazionale a benzene potrebbe essere spiegata ipotizzando una differente influenza del fumo di sigaretta sul benzene urinario e sui metaboliti del benzene. L'analisi dei rapporti tra benzene urinario e rispettivamente SPMA e *t,t*-MA, infatti, mentre non ha mostrato alcuna influenza della co-esposizione a toluene sul metabolismo del benzene sia in condizioni di esposizione a concentrazioni basse che molto basse del tossico, ha evidenziato rapporti sempre più alti nei fumatori rispetto ai non fumatori, che hanno raggiunto la significatività per quanto riguarda il rapporto *t,t*-MA/benzene urinario. Il fumo di sigaretta, quindi, sembrerebbe determinare un'inibizione competitiva del metabolismo del benzene, causata dalla presenza nel fumo di numerose sostanze chimiche in gran parte metabolizzate attraverso le stesse vie di biotrasformazione del benzene e in particolare dalla via ossidativa del citocromo P450 2E1 (25). Il fumo di sigaretta, quindi, determinerebbe un complessivo incremento dell'escrezione sia dei due metaboliti del benzene che della sua forma immodificata, ma con un'escrezione proporzionalmente maggiore della forma immodificata rispetto a quella di *t,t*-MA ed SPMA. Per esposizioni a concentrazioni molto basse di benzene aerodisperso quali quelle osservate esaminando benzinai e controlli, il benzene contenuto nel fumo di sigaretta acquisirebbe un ruolo preminente rispetto all'esposizione occupazionale nel condizionare le concentrazioni urinarie degli indicatori biologici, e l'ipotesizzato diverso effetto sul benzene urinario potrebbe contribuire a spiegare il venir meno della relazione di dipendenza di questo dalle concentrazioni di benzene aerodisperso che, come detto precedentemente, non sono influenzate dal fumo di sigaretta.

In conclusione, per esposizione a basse concentrazioni di benzene aerodisperso, in accordo con quanto evidenziato in precedenti studi, benzene urinario ed SPMA sembrano essere due indicatori di dose interna del benzene con validità sostanzialmente sovrapponibile, sebbene per un utilizzo routinario del primo ulteriori studi andrebbero condotti finalizzati a definire meglio le modalità di raccolta del campione, così da poter ridurre l'elevata variabilità intraindividuale. Per esposizione a concentrazioni molto basse di benzene, invece, l'SPMA sembra essere l'indicatore di dose interna da preferire nel monitoraggio biologico dei lavoratori esposti a benzene in quanto, anche con esposizione occupazionale di 2 ordini di grandezza più bassa rispetto al TLV-TWA, la sua validità rimane praticamente invariata, a differenza di quanto si osserva per il benzene urinario. Alla luce di queste considerazioni e tenendo conto dei limiti precedentemente indicati per l'utilizzo del benzene urinario, l'SPMA si conferma essere l'indicatore di scelta nel biomonitoraggio dell'esposizione a concentrazioni basse o molto basse di benzene. Il *t,t*-MA, invece, sembra conservare una certa validità per esposizione a concentrazioni basse di benzene, mentre sembra essere scarsamente applicabile per esposizioni occupazionali prossime a quelle che si osservano negli ambienti di vita.

Si conferma che il fumo di sigaretta rappresenta il principale fattore di confondimento in grado di condizio-

nare l'escrezione di tutti gli indicatori biologici del benzene in presenza di esposizione occupazionale bassa o molto bassa al tossico, per cui si dovrebbe raccomandare l'astensione dal fumo di sigaretta almeno nelle ore immediatamente precedenti la raccolta delle urine o in alternativa che l'abitudine al fumo di sigaretta sia attentamente considerata nell'interpretazione dei risultati del monitoraggio biologico.

Ringraziamenti

Ricerca eseguita con il COFIN-PRIN 2004 MUR n. 2004062283. Questo studio è stato presentato come relazione al "72° Congresso Nazionale della Società Italiana di Medicina del Lavoro ed Igiene Industriale", tenuto a Firenze il 25-28 Novembre 2009.

Bibliografia

- 1) WHO. Environmental Health Criteria 155. Benzene. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1993.
- 2) ACGIH. Threshold limit values and biological exposure indices. Cincinnati, Ohio, USA: American Conference of Governmental Industrial Hygienists, 2009.
- 3) ATSDR. Toxicological profile for benzene. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2007.
- 4) ATSDR. Toxicological profile for toluene. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2000.
- 5) Ong CN, Kok PW, Lee BL, Shi CY, Ong HY, Chia KS, Lee CS, Luo XW. Evaluation of biomarkers for occupational exposure to benzene. *Occup Environ Med* 1995; 52: 528-533.
- 6) Melikian AA, Qu Q, Shore R, Li G, Li H, Jin X, Cohen B, Chen L, Li Y, Yin S, Mu R, Zhang X, Wang Y. Personal exposure to different levels of benzene and its relationships to the urinary metabolites S-phenylmercapturic acid and trans,trans-muconic acid. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002; 778: 211-221.
- 7) Fustinoni S, Consonni D, Campo L, Buratti M, Colombi A, Pesatori AC, Bonzini M, Bertazzi PA, Foà V, Garte S, Farmer PB, Levy LS, Pala M, Valerio F, Fontana V, Desideri A, Merlo DF. Monitoring low benzene exposure: comparative evaluation of urinary biomarkers, influence of cigarette smoking, and genetic polymorphisms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 2237-2244.
- 8) Perbellini L, Buratti M, Fiorentino ML, Fustinoni S, Pasini F, Magnaghi S. Matrix interferences in the analysis of benzene in urine. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999; 724: 257-264.
- 9) Lovreglio P, Barbieri A, Carrieri M, Sabatini L, Fracasso ME, Doria D, Drago I, Basso A, D'Errico MN, Bartolucci GB, Violante FS, Soleo L. Validity of new biomarkers of internal dose for use in the biological monitoring of occupational and environmental exposure to low concentrations of benzene and toluene. *Int Arch Occup Environ Health* 2010; 83: 341-356.
- 10) Lovreglio P, Carrieri M, Barbieri A, Sabatini L, Fracasso ME, Doria D, Iavicoli S, Drago I, D'Errico MN, Violante FS, Bartolucci GB, Soleo L. Applicability of urinary benzene to biological monitoring of occupational and environmental exposure to very low benzene concentrations. *G Ital Med Lav Ergon* 2011; 33: 41-46.
- 11) NIOSH. Hydrocarbons, aromatic: method 1501. In: Schlecht PC, O'Connor PF (eds), NIOSH Manual of Analytical Methods. 4th Ed. Cincinnati, Ohio, USA: National Institute of Occupational Safety and Health, 2003.
- 12) Aprea C, Sciarra G, Bozzi N, Pagliantini M, Perico A, Bavazzano P, Leandri A, Carrieri M, Scapellato ML, Bettinelli M, Bartolucci GB. Reference Values of Urinary Trans,trans-muconic Acid: Italian Multicentric Study. *Arch Environ Contam Toxicol* 2008; 55: 329-340.
- 13) Sabatini L, Barbieri A, Indiveri P, Mattioli S, Violante FS. Validation of an HPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of

- phenylmercapturic acid, benzylmercapturic acid and o-methylbenzylmercapturic acid in urine as biomarkers of exposure to benzene, toluene and xylenes. *J Chrom B* 2008; 863: 115-122.
- 14) Barbieri A, Violante FS, Graziosi F, Sabatini L, Mattioli S. Urinary biomarkers and low-level environmental benzene concentration: assessing occupational and general exposure. *Chemosphere* 2008; 74: 64-69.
 - 15) Benedict SR, Behre JA. Some application of a new color reaction for creatinine. *J Biol Chem* 1936; 114: 515-532.
 - 16) Hoet P, De Smedt E, Ferrari M, Imbriani M, Maestri L, Negri S, De Wilde P, Lison D, Haufroid V. Evaluation of urinary biomarkers of exposure to benzene: correlation with blood benzene and influence of confounding factors. *Int Arch Occup Environ Health* 2009; 82: 985-995.
 - 17) Carrieri M, Tranfo G, Pigni D, Paci E, Salamon F, Scapellato ML, Fracasso ME, Manno M, Bartolucci GB. Correlation between environmental and biological monitoring of exposure to benzene in petrochemical industry operators. *Toxicol Lett* 2010; 192: 17-21.
 - 18) Scientific Committee for Occupational Exposure Limits. Recommendation from Scientific Committee on Occupational Exposure Limits for Toluene SCOEL/SUM/18H, European Commission, 2001.
 - 19) Lovreglio P, Cancanelli G, Barbieri A, Sabatini L, D'Errico MN, Scicolone L, Ghitti R, Violante FS, Apostoli P, Soleo L. Ruolo dei fattori non occupazionali nel condizionare i livelli di indicatori di dose interna utilizzati per monitorare l'esposizione occupazionale a concentrazioni molto basse di benzene. *G Ital Med Lav Ergon* 2010; 32: 49-58.
 - 20) Pezzagno G, Maestri L, Fiorentino ML. Trans,trans-muconic acid, a biological indicator to low levels of environmental benzene: some aspects of its specificity. *Am J Ind Med* 1999; 35: 511-518.
 - 21) Ruppert T, Scherer G, Tricker AR, Adlkofer F. Trans,trans-muconic acid as a biomarker of non-occupational environmental exposure to benzene. *Int Arch Occup Environ Health* 1997; 69: 247-251.
 - 22) Johnson ES, Langård S, Lin YS. A critique of benzene exposure in the general population. *Sci Total Environ* 2007; 374: 183-198.
 - 23) Crebelli R, Tomei F, Zijno A, Ghittori S, Imbriani M, Gamberale D, Martini A, Carere A. Exposure to benzene in urban workers: environmental and biological monitoring of traffic police in Rome. *Occup Environ Med* 2001; 58: 165-171.
 - 24) Manini P, De Palma G, Andreoli R, Poli D, Petyx M, Corradi M, Mutti A, Apostoli P. Biological monitoring of low benzene exposure in Italian traffic policemen. *Toxicol Lett* 2008; 181: 25-30.
 - 25) Van Vleet TR, Bombick DW, Coulombe RA Jr. Inhibition of human cytochrome P450 2E1 by nicotine, cotinine, and aqueous cigarette tar extract in vitro. *Toxicol Sci* 2001; 64: 185-191.

Richiesta estratti: Prof. Leonardo Soleo - Dipartimento di Medicina Interna e Medicina Pubblica, Sezione di Medicina del Lavoro "E.C. Vigliani", Università di Bari, Policlinico, Piazza Giulio Cesare 11, 70124 Bari, Italy - Tel./Fax: ++390805478201, E-mail: l.soleo@medlav.uniba.it