

G. De Palma¹, D. Poli^{2,3}, P. Manini², R. Andreoli³, P. Mozzoni^{2,3}, P. Apostoli¹, A. Mutti²

Monitoraggio ambientale e biologico dell'esposizione ad idrocarburi mono-aromatici ed a metil tert-butil etere in un gruppo di lavoratori addetti all'erogazione di carburanti

¹ Dipartimento di Medicina Sperimentale ed Applicata, Sezione di Medicina del Lavoro ed Igiene Industriale, Università di Brescia, Piazzale Spedali Civili 1, 25123 Brescia

² Laboratorio di Tossicologia Industriale, Dipartimento di Clinica Medica, Nefrologia e Scienze della Prevenzione, Università di Parma, via Gramsci 14, 43126 Parma

³ Centro Ricerche INAIL presso l'Università di Parma, via Gramsci 14, 43126 Parma

RIASSUNTO. Lo studio è stato condotto per valutare gli indicatori biologici di esposizione a vapori di benzina in lavoratori addetti all'erogazione di carburante tramite un approccio combinato di monitoraggio ambientale e biologico. L'esposizione personale a benzene, toluene, etilbenzene e xilene (BTEX) e l'escrezione urinaria di BTEX, metil tert-butil etere (MTBE-U), degli acidi *trans,trans*-muconico (*t,t*-MA) ed *S*-fenilmercapturico (S-PMA) e della cotinina sono stati valutati con tecniche cromatografiche accoppiate alla spettrometria di massa. I livelli di MTBE-U erano influenzati dalla sola esposizione professionale a vapori di benzina, mentre quelli di B-U ed S-PMA dipendevano da abitudine tabagica ed esposizione professionale.

ABSTRACT. ENVIRONMENTAL AND BIOLOGICAL MONITORING OF EXPOSURE TO MONOAROMATIC HYDROCARBONS AND TO METHYL TERT-BUTYL ETHER IN A GROUP OF PETROL STATION WORKERS. The aim of the study was to evaluate biomarkers of exposure to gasoline in petrol station workers by a combined approach of environmental and biological monitoring. The personal exposure to benzene, toluene, ethylbenzene and xylene (BTEX) and the urinary levels of BTEX, methyl tert-butyl ether (U-MTBE), *trans,trans*-muconic (*t,t*-MA) and *S*-phenylmercapturic acids (S-PMA) and cotinine were determined by mass spectrometry coupled chromatographic techniques. U-MTBE levels were strictly influenced by occupational exposure to gasoline, whereas both U-B and S-PMA levels depended from smoking habits and occupational exposure.

Key words: benzene; gasoline; petrol station attendants.

Introduzione

Il metil *tert*-butil etere (MTBE) è aggiunto alla miscela della benzina, allo scopo di aumentarne il numero di ottani e migliorarne i processi di combustione. Nella benzina venduta in Italia, il contenuto medio di eteri ossigenati come composti individuali è passato dal 3.5% nel 2004 al 9.1% nel 2006 (1). L'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) classifica la benzina come possibile cancerogeno umano (Gruppo 2B) (2), per il suo contenuto in composti cancerogeni certi (Gruppo 1: benzene) e possibili (1,3-butadiene), mentre l'MTBE è classificato come non cancerogeno per l'uomo (Gruppo 3) (3). La tossicità dell'MTBE riguarda fegato, rene e sistema nervoso centrale; a seguito di esposizione professionale sono noti effetti a breve termine come nausea, cefalea ed irritazione oculare (4). L'esposizione professionale a benzene negli addetti a distribuzione carburanti si è notevolmente ridotta nelle ultime due decadi per l'adozione di misure preventive come la riduzione delle sue concentrazioni nella benzina (<1%, vol/vol.) (5) e l'installazione di sistemi di recupero vapori sulle autocisterne e sulle pompe erogatrici. Queste ultime misure hanno determinato anche una riduzione dei livelli di esposizione ad MTBE da 15.3 a 3.4 mg/m³ (6). Numerosi studi sono stati recentemente condotti su addetti all'erogazione di carburanti per monitorare l'esposizione professionale a benzene (7-10) e ad MTBE (11). Quest'ultimo è stato dosato su sangue e/o urina di guidatori di autocisterne (12-14), e recentemente è stato utilizzato come indicatore biologico di esposizione a traffico urbano (15, 16).

Il presente studio è stato condotto in un gruppo di addetti a stazioni di servizio della città di Parma, con lo scopo di caratterizzarne l'esposizione a benzene, toluene, etilbenzene, xileni (BTEX) ed MTBE e di valutare il dosaggio di quest'ultimo nelle urine (MTBE-U) come indicatore biologico di esposizione a vapori di benzina.

Materiali e metodi

Soggetti. Sono stati reclutati 102 benzinai (69 maschi, 37 fumatori, età media 41.1±13.4 anni), in 22 stazioni di servizio localizzate nella città e provincia di Parma. A seconda

delle modalità di erogazione del carburante e del numero di auto personalmente rifornite con benzina nel giorno dell'indagine, i soggetti sono stati classificati in addetti a rifornimento manuale ($n = 58$, effettuanti almeno 10 rifornimenti manuali) o addetti al *self-service* ($n = 44$, addetti in stazioni con erogatori *self-service*, effettuanti meno di 10 rifornimenti manuali). Le informazioni sull'attività svolta, sulle caratteristiche socio-demografiche e sugli stili di vita sono state raccolte tramite questionario. Il protocollo di studio è stato approvato dal Comitato Etico locale; tutti i soggetti partecipanti hanno firmato un consenso informato scritto.

Monitoraggio ambientale. L'esposizione a BTEX è stata valutata tramite campionatori del tipo Radiello®, indossati dai lavoratori per l'intero turno lavorativo e desorbiti secondo le istruzioni del produttore con CS₂ a basso tenore di benzene, previa aggiunta di 20 µl di una soluzione di ¹³C₆-benzene, etilbenzene-*d*₆, toluene-*d*₆ e *p*-xylene-*d*₆ in metanolo (500 µg/l), come standard interno (S.I.). Le analisi sono state effettuate, come precedentemente descritto (17), in gas-cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS).

Monitoraggio biologico. Ciascun lavoratore ha fornito due campioni di urina, a inizio (IT) e fine turno di lavoro (FT). Le concentrazioni urinarie di BTEX (B/T/E/X-U) ed MTBE sono state determinate con microestrazione in fase solida e gas-cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (SPME GC-MS) (17). Ai campioni trasferiti in tubi per SPME contenenti NaCl (1.0 g), era aggiunta una miscela di S.I. [¹³C₆-benzene (0.5 µg/l), etilbenzene-*d*₆ (1 µg/l), toluene-*d*₆ e *p*-xylene-*d*₆ (2 µg/l), ETBE (1 µg/l)]. Gli acidi *trans,trans*-muconico (*t,t*-MA) ed *S*-fenilmercapturico (*S*-PMA) e la cotinina libera (COT) sono stati determinati in cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa *tandem* (LC-MS-MS) con diluizione isotopica (18, 19). Le concentrazioni dei metaboliti urinari sono state normalizzate per creatininuria (µg/g creat.), determinata con il metodo di Jaffe (20).

Statistica. L'analisi statistica è stata condotta con il programma PASW Statistics 18.0 per Windows™ (IBM SPSS Inc., USA), utilizzando test parametrici o non parametrici a seconda della distribuzione (log)normale o non normale delle variabili. Le concentrazioni ambientali di BTEX si distribuivano non normalmente, mentre gli indicatori biologici seguivano una distribuzione log-normale. I test parametrici comprendevano il test *t* di Student per campioni indipendenti ed appaiati e l'analisi di correlazione di Pearson (*r*). I test non parametrici comprendevano il test U di Mann-Whitney l'analisi di correlazione di Spearman (*ρ*). Modelli di regressione lineare multipla erano applicati per valutare il contributo dell'esposizione (concentrazioni ambientali di BTEX), della mansione (addetti a rifornimento manuale vs. addetti a *self-service*) e di caratteristiche personali (età, genere, creatininuria e COT di FT) alla variabilità degli indicatori biologici.

Risultati

Monitoraggio ambientale. I livelli di BTEX erano altamente inter-correlati ($p < 0.0001$); gli addetti a riforni-

mento manuale erano esposti a concentrazioni più elevate rispetto agli addetti a *self-service* ($p < 0.005$ per T, $p < 0.0001$ per BEX). I livelli ambientali di BTEX non erano influenzati dall'abitudine tabagica.

Monitoraggio biologico. I fumatori eliminavano concentrazioni più elevate di B-U e suoi metaboliti e COT ($p < 0.0001$) e T-U a FT ($p < 0.05$), rispetto ai non fumatori. Sull'intero campione, era evidente un aumento delle concentrazioni di FT rispetto a quelle di IT per B-U ($p < 0.005$), MTBE-U ($p < 0.0001$), *S*-PMA ($p < 0.0001$) e *t,t*-MA ($p < 0.005$). L'aumento di B-U ed MTBE-U a FT era evidente sia nei fumatori ($p < 0.05$), che nei non fumatori ($p < 0.05$ e $p < 0.0001$), mentre i livelli di FT di *S*-PMA e *t,t*-MA aumentavano solo tra i non fumatori ($p < 0.0001$ e $p < 0.005$). Gli addetti a rifornimento manuale eliminavano concentrazioni maggiori di B-U ed MTBE-U, rispetto agli addetti al *self-service*, sia a IT che a FT (medie geometriche (MG) [deviazioni standard geometriche (DSG)] di 811 [4.63] vs. 418 [4.02] ng/l, $p < 0.05$, e 2841 [2.27] vs. 11056 [2.39] ng/l, $p < 0.0001$). Tra gli addetti a *self-service*, le concentrazioni di *S*-PMA e *t,t*-MA a FT erano aumentate rispetto a quelle di IT nei non fumatori (MG [DSG] di 0.64 [2.34] vs. 0.41 [2.61] µg/g creat., $p = 0.014$, e 51.65 [1.75] vs. 33.00 [1.75] µg/g creat., $p = 0.001$, rispettivamente), ma non nei fumatori. Tra gli addetti a rifornimento manuale, le concentrazioni di MTBE-U aumentavano significativamente a FT, rispetto a quelle di IT, indipendentemente dall'abitudine tabagica (MG [DSG] 3066 [2.65] vs. 1630 [2.62] ng/l, $p = 0.010$ nei fumatori; 2708 [2.18] vs. 1099 [3.08] ng/l, $p < 0.0001$, nei non fumatori); l'*S*-PMA di FT aumentava solo tra i non fumatori (MG [DSG] 0.92 [2.27] vs. 0.56 [2.07] µg/g creat., $p = 0.001$), mentre B-U e *t,t*-MA aumentavano a FT tra i fumatori (MG [DSG] 2486 [3.97] vs. 1307 [3.29] ng/l, $p = 0.021$ e 79.54 [2.18] vs. 59.24 [2.07] µg/g creat., $p = 0.024$). I livelli ambientali di benzene correlavano sia con B-U che con MTBE-U ($\rho = 0.306$, $p < 0.005$ e $\rho = 0.502$, $p < 0.0001$) di FT, ma non con i metaboliti. Il B-U a FT correlava con *S*-PMA e COT ($r = 0.512$ and 0.600 , $p < 0.0001$) e con MTBE-U e *t,t*-MA ($r = 0.329$ e 0.486 , $p < 0.005$). Alla regressione lineare multipla, il 56% della varianza del B-U FT era spiegata dai livelli urinari di COT e creatinina, dai livelli ambientali di benzene e dall'età. I valori di creatininuria e COT ed il tipo di attività lavorativa spiegavano circa il 28% della varianza dei valori di *S*-PMA. I migliori predittori dell'MTBE-U ($r^2 = 0.25$, $p < 0.0001$) erano i livelli ambientali di benzene e la mansione lavorativa. Cotinina e creatinina influenzavano significativamente la varianza dei livelli di *t,t*-MA ($r^2 = 0.230$ e 0.311 , $p < 0.0001$).

Discussione

Le concentrazioni ambientali di benzene sono state utilizzate come surrogato dei livelli di MTBE, sulla base dei risultati di un precedente studio dimostrante la correlazione tra i livelli ambientali dei due solventi (11). Recentemente, i livelli di CO sono stati determinati per tracciare l'esposizione a traffico veicolare, in carenza dei livelli ambientali di MTBE (16). La correlazione tra concentrazioni

ambientali e biologiche (sangue, urine) di MTBE è stata ripetutamente dimostrata (11-14). In questo studio, i livelli ambientali di BTEX erano da 2 a 10 volte superiori a quanto già riportato in lavoratori esposti ad inquinanti urbani della città di Parma (taxisti e vigili urbani) (18, 19) ma inferiori (2-3 ordini di grandezza) ai corrispettivi limiti di esposizione professionale (21-25). I livelli aerodispersi di benzene rientravano all'interno dei valori già riportati in precedenti studi Italiani su benzinai (7-9, 11) e le differenze nei livelli di esposizione personale a BTEX e MTBE nei lavoratori classificati per mansione confermano quanto già precedentemente osservato (11). Mentre, in accordo con altri studi (7, 9, 18, 19), il monitoraggio ambientale non è influenzato dall'abitudine tabagica, questa si conferma un confondente del monitoraggio biologico dell'esposizione a bassi livelli di benzene (7, 9, 11). Nei non fumatori, tutti gli indicatori di esposizione a benzene erano aumentati a fine turno, mentre nei fumatori ciò valeva per il solo B-U. Dopo stratificazione anche per mansione, i valori di S-PMA erano significativamente aumentati a FT nei non fumatori, indipendentemente dalla mansione, confermando l'elevata sensibilità dell'indicatore, mentre i livelli di B-U a FT erano aumentati solo nel gruppo dei fumatori addetti al rifornimento manuale ed il *t,t*-MA presentava un comportamento ambiguo, conseguente probabilmente alla minore specificità dell'indicatore (26). Il comportamento di B-U ed S-PMA è probabilmente riconducibile alle diverse cinetiche dei due indicatori. Ai livelli di esposizione misurati la sintesi ed escrezione di S-PMA, metabolita con emivita maggiore (circa 9 h) rispetto al *t,t*-MA ed al B-U (27), è nei fumatori allo stato stazionario, favorendo l'escrezione di B-U, ossia della frazione di solvente non metabolizzato, in particolare tra i lavoratori addetti al rifornimento manuale. I risultati confermerebbero anche un recente studio (28) dimostrante che l'eliminazione dell'S-PMA ha una frazione molare costante in un ampio intervallo di livelli di esposizione. Nell'interpretazione dei risultati occorre tuttavia considerare anche la variabilità preanalitica associata alla misura B-U negli studi sul campo, in particolare a bassi livelli di esposizione (27). All'analisi di regressione, la cotinina era il principale predittore delle concentrazioni di FT di B-U e metaboliti del benzene, mentre solo il B-U era influenzato dai livelli aerodispersi di benzene, probabilmente sulla base delle già discusse differenze di cinetica degli indicatori biologici del benzene. D'altra parte, l'S-PMA era anch'esso influenzato dall'esposizione professionale inserita nel modello come mansione. Dunque, sia B-U che S-PMA, la cui specificità per il benzene è unica, ed i cui differenti comportamenti sono riconducibili in parte a differenti cinetiche di eliminazione, consentono un sensibile monitoraggio biologico dell'esposizione a benzene, derivante da differenti fonti, tra cui il fumo di tabacco ed i vapori di benzina. In accordo con studi precedenti (15, 16), i livelli di MTBE-U non erano influenzati dall'abitudine tabagica e riflettevano specificamente l'esposizione professionale a vapori di benzina. I livelli di MTBE-U FT erano comparabili a quelli già riportati in un precedente studio Italiano (11), mentre valori superiori sono stati misurati in lavoratori addetti al trasporto e carico carburante (12-14).

Analogamente al B-U, un aumento significativo dei valori di MTBE-U a FT era evidente solo tra gli addetti al rifornimento manuale. Nell'analisi di regressione, i livelli ambientali di benzene sono stati utilizzati come surrogato dell'MTBE, sulla base della buona correlazione tra essi e l'MTBE-U FT ($p=0.502$, $p<0.0001$) e dei risultati di precedenti studi (11) su addetti a distribuzione carburanti. Circa il 37% della varianza del MTBE-U era spiegata da entrambe le variabili indipendenti associate all'esposizione professionale (livelli ambientali di benzene e tipo di mansione) ed ogni interferenza da parte del fumo di tabacco era esclusa.

Bibliografia

- 1) European Commission 2006. EU Fuel Quality Monitoring - 2006 Summary report. Report to the European Commission DG Environment, Nikolas Hills, Eleanor Glenn, Ferdinando Giammichele, AEA Energy & Environment, Brussels, Belgium: European Commission; 2006.
- 2) IARC 1989. Gasoline. In: Occupational exposure in petroleum refining; crude oil and major petroleum fuels. Vol. 45, Lyon, France, World Health Organisation, 9-11.
- 3) IARC 1999. Methyl *tert*-butyl ether. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans Vol. 73, Lyon, France, World Health Organisation, 339-383.
- 4) European Union Risk Assessment Report 2002. *Tert*-butyl methyl ether. European Commission - Joint Research Centre Institute for Health and Consumer Protection. European Chemicals Bureau (ECB). Series 3rd Priority List, Vol. 19.
- 5) Commissione Europea. Direttiva 98/70/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio 13 Ottobre 1998 relativa alla qualità della benzina e del combustibile diesel e recante modificazione della direttiva 93/12/CEE del Consiglio. Bruxelles, Belgio: Commissione Europea; 1998.
- 6) Hakkola MA, Saarinen LH. Customer exposure to gasoline vapors during refuelling at service stations. *Appl Occup Environ Hyg* 2000; 15, 677-680.
- 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 D. 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) Carrieri M, Bonfiglio E, Scapellato ML, Maccà I, Tranfo G, Faranda P, Paci E, Bartolucci GB. Comparison of exposure assessment methods in occupational exposure to benzene in gasoline filling-station attendants. *Toxicol Lett* 2006; 162: 146-152.
- 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) Manini P, De Palma G, Andreoli R, Mozzoni P, Poli D, Goldoni M, Petyx M, Apostoli P, Mutti A. Occupational exposure to low levels of benzene: Biomarkers of exposure and nucleic acid oxidation and their modulation by polymorphic xenobiotic metabolizing enzymes. *Toxicol Lett* 2010; 193: 229-235.
- 11) Ghittori S, Ferrari M, Maestri L, Negri S, Zadra P, Gremida C, Imbriani M. Il significato del monitoraggio ambientale e biologico in lavoratori impiegati in stazioni di Servizio dopo l'eliminazione del piombo tetraetile dalla benzina. *G Ital Med Lav Ergon*. 2005; 27: 137-153.
- 12) Vainiotalo S, Pekari K, Aitio A. Exposure to methyl *tert*-butyl ether and methyl *tert*-amyl ether from gasoline during tank lorry loading and its measurement using biological monitoring. *Int Arch Occup Environ Health* 1998; 71: 391-396.

- 13) Saarinen L, Hakkola M, Pekari K, Lappalainen K, Aitio A. Exposure of gasoline road-tanker drivers to methyl *tert*-butyl ether and methyl *tert*-amyl ether. *Int Arch Occup Environ Health* 1998; 71: 143-147.
- 14) Hakkola M, Saarinen L, Pekari K. Exposure to gasoline vapour during offloading of tankers and railway wagons and biological multicomponent monitoring. *J Occup Health* 2001; 43: 287-290.
- 15) Fustinoni S, Rossella F, Campo L, Mercadante R, Bertazzi PA. Urinary BTEX, MTBE and naphthalene as biomarkers to gain environmental exposure profiles of the general population. *Sci Total Environ* 2010; 408: 2840-2849.
- 16) Campo L, Cattaneo A, Consonni D, Scibetta L, Costamagna P, Cavallo DM, Bertazzi PA, Fustinoni S. Urinary methyl *tert*-butyl ether and benzene as biomarkers of exposure to urban traffic. *Environ Internat* 2011; 37: 404-411.
- 17) Andreoli R, Manini P, Bergamaschi E, Brustolin A, Mutti A. Solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for the determination of monoaromatic hydrocarbons in blood and urine: application to people exposed to air pollutants. *Chromatographia* 1999; 50: 167-172.
- 18) Manini P, De Palma G, Andreoli R, Poli D, Mozzoni P, Folesani G, Mutti A, Apostoli P. Environmental and biological monitoring of benzene exposure in a cohort of Italian taxi drivers. *Toxicol Lett* 2006; 167: 142-151.
- 19) 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.
- 20) Kroll MH, Chesler R, Hagengruber C, Blank DW, Kestner J, Rawe M. Automated determination of urinary creatinine without sample dilution: theory and practice. *Clin Chem* 1986; 32: 446-452.
- 21) SCOEL (Scientific Committee for Occupational Exposure Limits) 1992. Recommendation of the Scientific Committee on Occupational Exposure Limits for Xylenes. SEG/SUM/19B. European Commission.
- 22) SCOEL (Scientific Committee for Occupational Exposure Limits) 1995. Recommendation of the Scientific Committee on Occupational Exposure Limits for Toluene. SEG/SUM/28. European Commission.
- 23) SCOEL (Scientific Committee for Occupational Exposure Limits) 2001. Recommendation of the Scientific Committee on Occupational Exposure Limits for Toluene. SCOEL/SUM/18H. European Commission.
- 24) Commissione Europea. Direttiva 2004/37/UE del Parlamento Europeo e del Consiglio 29 April 2004 contro i rischi derivanti da un'esposizione ad agenti cancerogeni o mutageni durante il lavoro (sesta direttiva particolare ai sensi dell'articolo 16, paragrafo 1, della direttiva 89/391/CEE del Consiglio). Bruxelles, Belgio: Commissione Europea 2005.
- 25) Commissione Europea. Direttiva 2009/161/UE del 17 Dicembre 2009 che definisce un terzo elenco di valori indicativi di esposizione professionale in attuazione della direttiva 98/24/CE del Consiglio e che modifica la direttiva 2000/39/CE della Commissione. Bruxelles, Belgio: Commissione Europea 2009.
- 26) Negri S, Bono R, Maestri L, Ghittori S, Imbriani M. High-pressure liquid chromatographic-mass spectrometric determination of sorbic acid in urine: Verification of formation of *trans,trans*-muconic acid. *Chem Biol Interact* 2005; 153-154: 243-246.
- 27) Dor F, Dab W, Empereur-Bissonnet P, Zmirou D. Validity of biomarkers in environmental health studies: the case of PAHs and benzene. *Crit Rev Toxicol* 1999; 29: 129-168.
- 28) Kim S, Vermeulen R, Waidyanatha S, Johnson BA, Lan Q, Smith MT, Zhang L, Li G, Shen M, Yin S, Rothman N, Rappaport SM. Modeling human metabolism of benzene following occupational and environmental exposures. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15: 2246-2252.

Richiesta estratti: Dr. Giuseppe De Palma, Dipartimento di Medicina Sperimentale ed Applicata, Sezione di Medicina del Lavoro ed Igiene Industriale, Università degli Studi di Brescia, Piazzale Spedali Civili 1, 25123 Brescia, Italy, Tel: + 39 0303996832, Fax: +39 0303996046, E-mail: depalma@med.unibs.it