

## MONITORAGGIO BIOLOGICO DELL'ESPOSIZIONE OCCUPAZIONALE A BENZENE E RELATIVO VALORE LIMITE BIOLOGICO, ALLA LUCE DELLA NUOVA DIRETTIVA CANCEROGENI UE 431/22

### INTRODUZIONE

Il benzene è un idrocarburo aromatico, molto volatile (temperatura di ebollizione 80,1 °C), inquinante ubiquitario (in quanto prodotto dalla combustione di sostanze organiche), presente anche nel petrolio e suoi derivati, come la benzina, e nel fumo di tabacco. Le sue qualità di ottimo solvente ne hanno determinato, nel secolo scorso, una grande diffusione di utilizzo per molti processi industriali, fino a quando la sua tossicità e cancerogenicità sono state accertate riducendone fortemente l'impiego attraverso normative sempre più stringenti e riducendo di conseguenza sempre di più i possibili livelli di esposizione. Il benzene viene assorbito prevalentemente per inalazione e per contatto cutaneo e metabolizzato dal fegato. Alla luce della nuova, più stringente, normativa europea sulla protezione dei lavoratori (ad esempio settore petrolchimico, addetti alle pompe di carburante, vigili urbani) dai rischi di esposizione a cancerogeni (direttiva (UE) 2022/431), in recepimento in Italia nel 2024, che riduce i valori limite di esposizione occupazionale al benzene, assume particolare importanza, ai fini della valutazione del rischio espositivo, la scelta della corretta metodica per la determinazione della dose assorbita e quindi dell'indicatore biologico di esposizione e della tecnica analitica utilizzata, che dovrà avere una sensibilità adeguata al nuovo valore limite di esposizione, e specifica, per minimizzare i rischi di interferenze e fattori di confondimento.

### NORMATIVA

Il benzene risponde ai criteri di classificazione come sostanza cancerogena (categoria 1 A) ed è pertanto un agente cancerogeno ai sensi della direttiva 2004/37/CE sulla protezione dei lavoratori contro i rischi derivanti dall'esposizione occupazionale a cancerogeni e mutageni; il regolamento REACH vieta l'utilizzo del benzene in prodotti commerciali in concentrazione superiore allo 0,1%; nelle benzine ne è tuttora consentita una percentuale dell'1% v/v (direttiva 1998/70/CE). Nell'aria urbana la concentrazione media annuale di 5 µg/m<sup>3</sup> è il valore massimo auspicabile in base alla direttiva 2008/50/CE sulla qualità dell'aria per l'Europa.

In ambito occupazionale la direttiva (UE) 2022/431 riporta che 'in casi specifici possono essere necessari valori limite biologici per proteggere i lavoratori dall'esposizione ad alcuni agenti cancerogeni, mutageni o sostanze tossiche per la riproduzione', e quindi modifica la direttiva 2004/37/CE introducendo i valori limite biologici e le relative disposizioni pertinenti.

Alla luce dei dati scientifici più recenti, si è reso necessario rivedere per il benzene il valore limite di cui all'Allegato III della direttiva 2004/37/CE e mantenere la nota relativa alla penetrazione cutanea. Il Ccss (Comitato consultivo per la sicurezza e la salute sul luogo di lavoro) europeo, sulla base del parere del Rac (Risk Assessment Committee) dell'Agenzia europea per le sostanze chimiche Echa (European Chemicals Agency) ha riconosciuto l'utilità del monitoraggio biologico per il benzene. Il valore limite occupazionale di esposizione (OELV) per il benzene sarà a breve abbassato in molti Paesi: in Europa la direttiva 2022/431 fissa l'OELV a 0,2 ppm, mentre l'Acgih (American Conference of Governmental Industrial Hygienists) propone addirittura un TLV-TWA di 0,02 ppm; poiché potrebbe essere difficile rispettare il valore limite di 0,2 ppm (0,66 mg/m<sup>3</sup>) in alcuni settori nel breve termine, come misura transitoria, il valore limite di 1 ppm (3,25 mg/m<sup>3</sup>) dovrebbe continuare ad applicarsi fino al 5 aprile 2024, mentre dal 5 aprile 2024 e fino al 5 aprile 2026, dovrebbe applicarsi un valore limite transitorio di 0,5 ppm (1,65 mg/m<sup>3</sup>). Questa riduzione avrà un notevole impatto sul monitoraggio biologico dell'esposizione, sia dal punto di vista dei metodi di analisi utilizzati sia dei fattori di confondimento.

### MONITORAGGIO BIOLOGICO

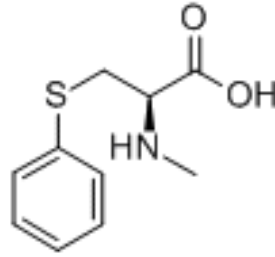
Per monitoraggio biologico si intende la valutazione dell'esposizione a sostanze pericolose attraverso la misura di biomarcatori, cioè la misura della concentrazione di una sostanza o dei suoi prodotti di trasformazione metabolica in compartimenti biologici eticamente raggiungibili o la misura di effetti biologici, precoci e reversibili, riferibili alla sostanza stessa. Il monitoraggio biologico può aiutare a valutare l'entità dell'esposizione ma anche lo stato di salute in gruppi di popolazione generale o in contesti occupazionali, in modo complementare al monitoraggio ambientale. È necessario considerare vie di assorbimento diverse da quella inalatoria, come quella cutanea, per garantire il miglior livello di protezione possibile, per cui è utile il monitoraggio biologico delle sostanze per i cui valori limite di esposizione è riportata la notazione cute, come per il benzene. I laboratori dovranno definire procedure di analisi che includano la scelta dell'indicatore e della matrice più adeguata.

### INDICATORI DI ESPOSIZIONE PER IL BENZENE

Il monitoraggio biologico dell'esposizione a benzene può essere effettuato misurando diversi biomarcatori urinari, come l'acido S-fenilmercapturico (SPMA), l'acido trans,trans-muconico (t,t-MA) o il benzene immodificato.

Figura 1

SPMA (acido S-fenilmercapturico)



(Paci E et al. Determination of free and total S-phenylmercapturic acid in the biologic monitoring of exposure to benzene. G Ital Med Lav Ergon 2006 Apr-Jun;28(2):203-5)

### Monitoraggio dell'SPMA urinario

Per l'analisi dell'SPMA è stato ampiamente usato il metodo ELISA (*chemiluminescence enzyme-linked immunosorbent assay*), basato su una reazione immunoenzimatica e su lettura automatica in UV/Vis. Tuttavia il metodo ELISA tende alla sovrastima, mentre il metodo HPLC/MS/MS con diluizione isotopica consente di ottenere la massima specificità e accuratezza. L'SPMA (Figura 1) è l'indicatore più sensibile e specifico per il benzene, tuttavia risente di fonti di variabilità per cui è importante standardizzare la metodica per ottenere risultati affidabili e comparabili fra loro.

Le principali fonti di variabilità sono:

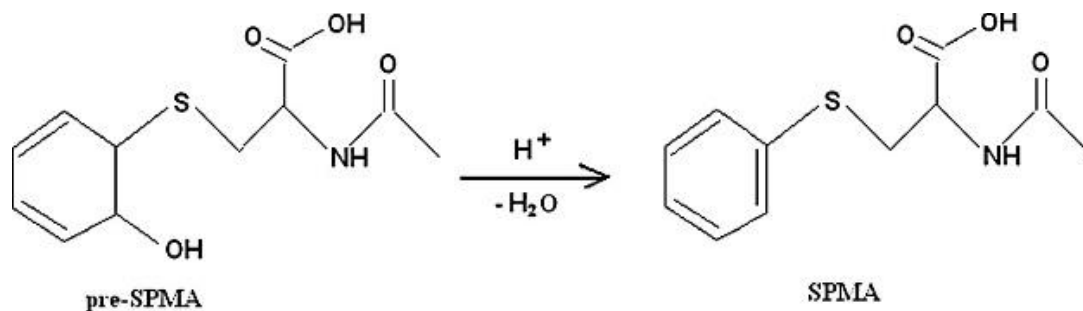
- 1) l'esistenza di un precursore che deve essere idrolizzato in ambiente acido prima dell'analisi;
- 2) l'interferenza dell'esposizione a fumo di tabacco, che contiene benzene e produce SPMA da esposizione non professionale;
- 3) la variabilità genetica.

### Il problema dell'idrolisi acida

Una parte del benzene assorbito dall'organismo, in urina è eliminato come N-acetil-S(1,2-diidro-2-idrossifenil)-L-cisteina che, attraverso eliminazione di acqua, produce SPMA: tale reazione chimica è favorita in ambiente acido, è quantitativa solo in ambiente fortemente acido ed è irreversibile (Figura 2).

Figura 2

Meccanismo di idrolisi acida del precursore dell'SPMA



(Paci E et al. Determination of free and total S-phenylmercapturic acid in the biologic monitoring of exposure to benzene. G Ital Med Lav Ergon 2006 Apr-Jun;28(2):203-5)

Il valore limite biologico di esposizione (BEI - *biological exposure index*) per l'SPMA di 25 µg/g di creatinina, corrispondente all'esposizione a 0,5 ppm di benzene aerodisperso, è stato stabilito nel 2013 dall'Acgih utilizzando diverse tecniche analitiche ma è auspicabile una revisione di questa relazione mediante nuovi studi di monitoraggio ambientale e biologico; infatti, ad esempio, tale valore è stato determinato senza tenere conto dell'idrolisi acida: in assenza di controllo del pH delle urine, e quindi in una situazione di idrolisi acida più o meno quantitativa del precursore, questa correlazione viene meno, ed il risultato non consente di valutare correttamente l'esposizione. Un valore limite di esposizione pari a 0,2 ppm porterebbe ad un valore limite biologico più che dimezzato, aumentando i re-

quisiti di sensibilità del metodo analitico. Sottoponendo il campione ad idrolisi acida spinta è possibile ottenere il valore massimo di SPMA eliminato con le urine. Tuttavia è sufficiente effettuare un trattamento ad un pH definito e controllato, ad esempio pH 2, in modo da aumentare la sensibilità e uniformare i risultati per tutti i laboratori.

### L'interferenza del fumo di tabacco

Il fumo di una sigaretta contiene 35 - 70 ppm di benzene. Il fumo di tabacco è la principale fonte di esposizione a benzene nei fumatori attivi ed influenza i livelli degli indicatori biologici di esposizione a benzene nei fumatori sia attivi che passivi. Il fumo è quindi un importante fattore confondente per valutare l'espo-

sizione professionale a benzene. Per i soggetti forti fumatori l'esposizione occupazionale è trascurabile rispetto a quella dovuta al fumo ed il monitoraggio è significativo solo se i risultati dei campionamenti ambientali sono elevati. Il valore del BEI (indice biologico di esposizione) per l'SPMA estrapolato linearmente per 0,2 ppm sarebbe 10 µg/g di creatinina. Poiché il 95° percentile della concentrazione urinaria di SPMA nella popolazione generale è circa 0,7 µg/g di creatinina nei non fumatori e circa 7,5 µg/g di creatinina nei fumatori, l'abitudine al fumo diventa il principale problema del monitoraggio biologico dei lavoratori esposti a benzene (Tranfo et al, 2018). La valutazione dell'esposizione occupazionale a benzene deve pertanto tenere conto di fonti di esposizione ambientali e voluttuarie: ai lavoratori deve essere distribuito un questionario per la raccolta delle informazioni sulle abitudini di vita quali l'esposizione a fumo attivo e passivo, poiché comunque tutte le combustioni di sostanza organica producono benzene. Per discriminare tale interferenza è utile effettuare in contemporanea l'analisi della cotinina urinaria, metabolita della nicotina: valori superiori a 100 µg/g di creatinina sono stati suggeriti come cut-off per distinguere fra fumatori e non fumatori.

#### La variabilità genetica

La biotrasformazione del benzene assorbito inizia con la formazione del benzene ossido, mediata dal cito-

cromo P450 CYP2E1, da cui derivano tutti i metaboliti: l'apertura dell'anello e la coniugazione con il glutathione portano rispettivamente alla formazione del t,t-MA e dell'SPMA. Gli enzimi coinvolti (GSTT1, GSTM1, GSTP1) sono polimorfici e la loro diversa espressione nei diversi individui può determinare una variabilità nella eliminazione finale dei metaboliti, che sono poi i nostri indicatori di esposizione. Pertanto, per livelli di esposizione ambientale o occupazionale molto bassi, il monitoraggio dell'SPMA può rientrare in questa variabilità: sarà il confronto con i valori ambientali ad aiutare nella corretta valutazione dell'esposizione.

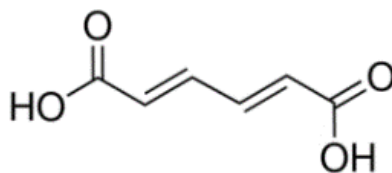
#### Benzene urinario

Essendo il benzene una sostanza volatile è possibile analizzarlo direttamente mediante gascromatografia e spazio di testa. È una tecnica analitica consolidata, che fornisce alti valori di sensibilità. Tuttavia essendo l'analita lo xenobiotico stesso, è possibile una contaminazione del campione accidentale o volontaria, o dovuta alla semplice ubiquitaria contaminazione ambientale. Inoltre risente delle criticità dovute al campionamento ed alla conservazione del campione. Questo problema non esiste nell'analisi HPLC/MS/MS di metaboliti urinari, SPMA e t,t-MA, dal momento che, mentre lo xenobiotico può essere presente nell'ambiente o contaminare il laboratorio, è virtualmente impossibile che questo avvenga con i suoi metaboliti, che si possono ritrovare solo in urina.

#### Acido trans,trans-muconico

Figura 3

t,t-MA (acido trans,trans-muconico)



(Tranfo G et al. Validation of an HPLC/MS/MS method with isotopic dilution for quantitative determination of trans,trans-muconic acid in urine samples of workers exposed to low benzene concentrations. 2008 May 1;867(1):26-31)

Il valore limite biologico di esposizione occupazionale per l'acido trans,trans-muconico (Figura 3), suggerito dall'Acgih è 500 µg/g creat. nelle urine di fine turno. Il vantaggio principale della sua determinazione risiede nella elevata concentrazione di analita presente nelle urine, che rende più facile la sua rilevazione analitica. Tuttavia il t,t-MA è anche prodotto dal metabolismo dell'acido sorbico, contenuto nella frutta, e conservante - innocuo - in molti prodotti alimentari, come marmellate, dolci confezionati, maionese. Di conseguenza è possibile trovare alti valori di t,t-MA in soggetti non esposti a benzene. Tuttavia dal momento che l'eliminazione dell'acido sorbico è più rapida di quella del benzene, è necessario prelevare i campioni attendendo almeno due ore dai pasti. La determinazione analitica raccomandata è l'HPLC/MS/MS con diluizione isotopica; il campione va preventivamente sottoposto a *solid*

*phase extraction* (SPE), in modo da eliminare la maggior parte delle sostanze interferenti presenti in urina, e vanno utilizzate colonnine a scambio anionico forte.

#### CONCLUSIONI

Esistono molte realtà lavorative in Italia in cui il monitoraggio biologico è utilizzato sistematicamente e con competenza per numerose sostanze, utilizzando, in assenza di valori limite biologici nella normativa italiana, i valori limite dell'Acgih, citati nei contratti di lavoro anche se in ambito europeo sono disponibili una proposta dello Scoel (Scientific committee on occupational exposure limit values) e liste di valori limite biologici di altri paesi europei.

L'analisi di concentrazioni sempre più basse di analita in considerazione dei valori limite progressivamente sempre più bassi, stabiliti per l'esposizione a benzene dalla

nuova direttiva europea cancerogeni (UE) 2022/431 in recepimento nel nostro paese, richiede però una approfondita scelta del metodo analitico e delle possibili interferenze; da questo punto di vista il miglior indicatore biologico di esposizione è l'SPMA analizzato mediante HPLC/MS/MS; è necessario promuovere studi di monitoraggio biologico nella popolazione generale per determinare i valori di riferimento per l'esposizione ambientale al benzene e monitorare quindi l'andamento dell'esposizione umana, in modo da poter correlare i dati ambientali con quelli biologici. Alla luce di quanto afferma la direttiva (UE) 2022/431. Secondo i dati scientifici più recenti, in casi specifici possono essere necessari valori limite biologici per proteggere i lavoratori

dall'esposizione ad alcuni agenti cancerogeni, mutageni o sostanze tossiche per la riproduzione. È pertanto opportuno includere nella direttiva 2004/37/CE i valori limite biologici e le relative disposizioni pertinenti, il monitoraggio biologico dovrebbe essere considerato una buona pratica, soprattutto per le sostanze con assorbimento cutaneo, come il benzene stesso. Quindi l'Allegato XXXIX del d. lgs. 81/2008 che prevede attualmente a livello nazionale il valore limite biologico solo per il Pb dovrà essere esteso con l'introduzione di valori limite biologici per l'esposizione ad altre sostanze, tra cui il benzene, a supporto di quanti già oggi utilizzano questo strumento o che decideranno di utilizzarlo, a complemento della valutazione del rischio di esposizione.

#### PER ULTERIORI INFORMAZIONI

Contatti: e.paci@inail.it

#### BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA ESSENZIALE

Paci E, Pigni D, Cialdella A, Faranda P, Tranfo G. Determination of free and total S-phenylmercapturic acid in the biologic monitoring of exposure to benzene. *G Ital Med Lav Ergon* 2006 Apr-Jun;28(2):203-5.

Tranfo G, Bertolucci GB, Pigni D, Paci E, Scapellato ML, Doria D, Manno M, Carrieri M. Comparison of hydrolysis and HPLC/MS/MS procedure with Elisa assay, for the determination of S-phenylmercapturic acid as a biomarker of benzene exposure in human urine. *Journal of chromatography B, Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 10, 878(27): 2529-33, 2010.

Mansi A, Bruni R, Capone P, Paci E, Pigni D, Simeoni C, Gnerre R, Papacchini M, Tranfo G. Low occupational exposure to benzene in a petrochemical plant: Modulating effect of genetic polymorphisms and smoking habit on the urinary t,t-MA/SPMA ratio. *Toxicology Letters*, Volume 213, Issue 1, 13 August 2012, Pages 57-62.

Tranfo G, Paci E, Sisto R, Pigni D. Validation of an HPLC/MS/MS method with isotopic dilution for quantitative determination of trans,trans-muconic acid in urine samples of workers exposed to low benzene concentrations. 2008 May 1;867(1):26-31.

#### PAROLE CHIAVE

*Benzene, Acido S-fenilmercapturico, Fumo di sigaretta, Indicatore biologico di esposizione, Polimorfismo genetico*