

VALUTAZIONE DELL'ESPOSIZIONE PROFESSIONALE AL BROMURO DI METILE NELLE ATTIVITÀ DI FUMIGAZIONE

G. Genovese*, A. Acampora**, N. Miraglia* **, N. Sannolo*

* Dipartimento di Medicina Sperimentale - Sezione di Medicina del Lavoro, Igiene e Tossicologia Industriale - Seconda Università degli Studi di Napoli,

** Dipartimento di Medicina Pubblica e della Sicurezza Sociale - Università degli Studi di Napoli "Federico II"

RIASSUNTO

Sono state messe a punto procedure analitiche originali per il monitoraggio biologico di lavoratori esposti a bromuro di metile, eseguito mediante determinazione di indicatori di esposizione, quali i bromuri sierici, e di indicatori di dose biologicamente efficace, quali gli addotti emoglobinici. L'utilizzazione delle metodiche sviluppate ai fini del monitoraggio biologico è stata verificata mediante l'analisi di campioni di sangue di fumigatori di terreni agricoli.

SUMMARY

Innovative procedures were developed for the biological monitoring of workers exposed to methyl bromide, through the determination of biomarkers of exposure, such as bromide in serum, and of biomarkers of biologically effective dose, such as haemoglobin adducts. The effectiveness of the developed techniques for the biological monitoring was tested through the analysis of blood samples from workers employed in soil fumigation.

1. INTRODUZIONE

Il bromuro di metile (MeBr) è un gas altamente tossico (U.S. EPA, 1999), utilizzato principalmente per la disinfestazione del suolo prima di passare alla fase della coltivazione; trova impiego, inoltre, nella disinfestazione delle coltivazioni in serra, nella conservazione degli alimenti nei depositi e nella profilassi connessa con gli scambi internazionali delle merci.

Le proprietà chimico-fisiche di tale sostanza assicurano azioni capillari in qualsiasi struttura, in tempi brevi e senza la necessità di adoperare attrezzature particolari per l'applicazione del gas. Tuttavia l'impiego del MeBr è stato messo in discussione per motivi di natura tossicologica ed ambientale. Il bromuro di metile è, infatti, un potente elettrofilo, in grado di reagire con i siti nucleofili di DNA, RNA e proteine, risultando mutageno in esperimenti condotti *in vitro* (IARC, 1999). Inoltre, l'accumulo dei residui di bromuro nel terreno e nelle falde acquifere si è rivelato nocivo per tutti gli organismi acquatici e per l'uomo. Infine, il MeBr è tra i responsabili della distruzione dello strato di ozono atmosferico e del conseguente assottigliamento della fascia protettiva stratosferica.

Sulla base di queste considerazioni sono state promulgate normative internazionali volte a regolamentare l'utilizzo del MeBr, prima tra tutte il protocollo di Montreal del 1997, che sancisce la graduale riduzione nei paesi industrializzati dell'uso di tale pesticida rispetto alle quan-

tità usate nel 1991, fino ad una completa messa al bando del prodotto prevista entro la fine del 2005.

Lo strumento legislativo di riferimento per gli stati membri dell'Unione Europea è rappresentato dal Regolamento CE 2037/2000, che recepisce le ultime modifiche applicate al protocollo di Montreal e aggiorna il calendario di riduzione del Mebr.

Dopo il 2005 l'uso del fumigante sarà consentito solo per situazioni critiche (mancanza di alternative applicabili e accettabili dal punto di vista ambientale e sanitario) e di emergenza (diffusione imprevista di particolari parassiti o malattie), per applicazioni di quarantena su merci in ingresso e trattamenti anteriori all'imbarco su merci da esportare (QPS).

Il destino di tale fumigante, però, non è ancora certo. L'amministrazione Bush, infatti, ha sottoposto all'EPA e all'ONU una richiesta di autorizzazione all'uso del bromuro di metile per diverse compagnie e gruppi commerciali che ritengono non esistere, al momento, valide alternative. Le richieste americane, già approvate dall'EPA, avrebbero l'effetto di provocare addirittura un aumento dell'uso del pesticida rispetto ai livelli di riferimento del 1991.

Qualunque sia il futuro di questo agente di rischio, rimane di fondamentale importanza per la tutela dei lavoratori addetti alle attività di fumigazione o che operano in aree fumigate la valutazione dell'esposizione professionale a bromuro di metile mediante monitoraggio biologico. A tale scopo, nel presente lavoro, sono stati scelti come indicatori di esposizione i bromuri sierici e come indicatori di dose biologicamente efficace gli addotti emoglobinici, essendo stata provata la relazione quantitativa tra la reattività di molti cancerogeni chimici verso il DNA e verso l'emoglobina (CALLEMAN et al., 1978; NEUMANN, 1984). Tra gli addotti emoglobinici si è deciso di quantificare il peptide $\beta(83-95)\text{Me}$, ottenuto per idrolisi triptica delle catene globiniche. Rispetto alla porzione N-terminale delle globine, adoperata finora come biomarker di riferimento per la quantificazione degli addotti emoglobinici, il peptide $\beta(83-95)\text{Me}$ risulta più rappresentativo dell'esposizione all'agente alchilante in quanto contiene il residuo di cisteina 93, individuato, mediante esperimenti condotti in vitro, quale sito preferenziale di alchilazione e correlabile, quindi, anche a bassi livelli di esposizione a bromuro di metile (MAMONE et al., 1998; FERRANTI et al., 1996; SANNOLO et al., 1999; MIRAGLIA et al., 2002). La scelta di tale porzione globinica come biomarker permette una corretta valutazione degli addotti emoglobinici, evitando errori di sottostima del grado di alchilazione.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Determinazione dei bromuri sierici

- *Curva di calibrazione.* La curva di calibrazione è stata ottenuta analizzando campioni preparati con siero proveniente da soggetti di riferimento arricchito con bromo, in modo da avere concentrazioni di bromuro comprese tra 5 e 50mg/L. I campioni di siero sono stati diluiti con acqua distillata contenente nitrometano come standard interno (0,01%). La soluzione è stata acidificata con acido fosforico (85%), cui sono stati aggiunti potassio cianuro (1M) e potassio permanganato (1M), provocando la precipitazione del bromuro di cianogeno (ACAMPORA et al., 2002).
- *Analisi di sangue di soggetti esposti.* I campioni di sangue di fumigatori sono stati centrifugati per separare il siero, in cui sono stati determinati i bromuri. Al di siero è stato aggiunto lo standard interno e sono stati trattati in modo analogo ai campioni adoperati per la costruzione della curva di calibrazione, al fine di provocare la precipitazione del bromuro di cianogeno, che è stato quantificato.
- *Analisi GC del bromuro di cianogeno.* L'analisi dei campioni di siero è stata eseguita adoperando un gascromatografo Autosystem XL, dotato di autocampionatore di spazio di testa e rivelatore ECD.

2.2 Determinazione del peptide $\beta(83-95)\text{Me}$

- *Alchilazione dell'emoglobina con bromuro di metile (o bromuro di etile)*. Ad una sospensione di globuli rossi all'1% in sodio fosfato 10mM (pH 7.0) è stata aggiunta una soluzione etanolica di MeBr 71mM (oppure EtBr); la reazione di incubazione è stata condotta a 37°C per 16h.
- *Retta di calibrazione*. I campioni adoperati per la costruzione delle rette di calibrazione sono stati preparati aggiungendo ad 1mg di globina di soggetti non esposti quantità variabili (2.5-40ng) di globina metilata (con livello di alchilazione noto) e quantità note (1mg) globina etilata, adoperato come standard interno. Le globine sono state sciolte in ammonio bicarbonato 0.4% (pH 8) e digerite con tripsina (Hb:tripsina = 1:50 w:w, 37°C, 18h) (MIRAGLIA *et al.*, 2002).
- *Analisi di sangue di soggetti esposti*. I campioni di sangue di fumigatori sono stati centrifugati per separare il siero dai globuli rossi. Questi ultimi sono stati lisati, e le catene globiniche purificate mediante precipitazione; a queste è stato aggiunto standard interno, e i campioni così preparati sono stati sottoposti ad idrolisi triptica.
- *Analisi LC/ESI/MS dei peptidi triptici*. I peptidi triptici sono stati separati mediante HPLC in fase inversa e identificati mediante spettrometria di massa ad elettrospray, adoperando uno spettrometro di massa a trappola ionica, interfacciato con un sistema modulare HP 1100. La quantificazione del peptide $\beta(83-95)\text{Me}$ è stata eseguita mediante spettrometria di massa tandem.

3. RISULTATI

La linearità del metodo è stata verificata per i bromuri sierici in un intervallo compreso tra 5 e 50mg/L, e per il peptide $\beta(83-95)\text{-CH}_3$ tra 40 e 644pmol di addotto/g di globina.

Nel primo caso sono stati calcolati valori di inaccuratezza percentuale (Diff%) compresi tra $\pm 6\%$, il coefficiente di variazione (CV%) varia tra 0.5 e 3.1%; il coefficiente di correlazione è prossimo all'unità ($r^2=0.997$).

Per la procedura analitica messa a punto per la determinazione quantitativa degli addotti emoglobinici, i valori di Diff% sono compresi tra -4.0 e 0.2%; il CV% è compreso tra 1.3 e 22.0%; il coefficiente di correlazione, anche in questo caso, è prossimo all'unità ($r^2=0.986$).

In soggetti esposti a MeBr sono stati rilevati livelli di bromuro sierico tra 26.5 e 50.0 mg/l e livelli di addotto $\beta(83-95)\text{-CH}_3$ tra 70.5 e 624pmol di addotto/g di globine. I dati ottenuti sono comparabili con i range di concentrazione riportati in letteratura per l'analisi di campioni di fumigatori (MAMONE *et al.*, 1998; CAMPBEL *et al.*, 1986).

Tabella 1

Livelli di bromuri sierici e di peptide $\beta(83-95)\text{Me}$ ritrovati in alcuni dei campioni analizzati.

	Bromuri sierici (mg/L)	$\beta(83-95)\text{-CH}_3$ (pmol/g)
Campione A	26.5	70.5
Campione B	39.8	624
Campione C	49.6	321
Campione D	50.0	270

Nel caso dei campioni A, C e D all'aumentare dei livelli di bromuri sierici aumentano anche i livelli di peptide alchilato e concentrazioni simili di bromuro (campioni C e D) corrispondono a livelli comparabili di peptide modificato.

Nel campione B, invece, si nota una discrepanza: il livello di peptide $\beta(83-95)\text{-CH}_3$ risulta molto più elevato di quello atteso tenendo conto del livello di bromuro sierico. Ciò può essere spiegato considerando che gli addotti emoglobinici rispecchiano anche esposizioni prolungate nel tempo (la vita media dei globuli rossi è di circa quattro mesi), mentre il bromuro sierico rivela esposizioni recenti (l'emivita dei bromuri nel siero è circa 100h).

4. CONCLUSIONI

Dai risultati ottenuti si evince che il monitoraggio biologico basato sulla quantificazione del peptide $\beta(83-95)\text{Me}$ e dei bromuri sierici, scelti rispettivamente come indicatori di dose biologicamente efficace e indicatori di esposizione, permette una accurata valutazione dell'esposizione professionale sia prolungata sia occasionale a bromuro di metile.

RINGRAZIAMENTI

Questa ricerca è stata finanziata dal Ministero della Salute - I.S.P.E.S.L. (convenzione n° 37/98-A "Valutazione degli effetti precoci dell'esposizione professionale al bromuro di metile attraverso la determinazione della dose interna e della dose biologicamente efficace").

BIBLIOGRAFIA

ACAMPORA A, MOSCARIELLO C, MIRAGLIA N, DELLA CASA E, LIOTTI F, SANNOLO N.: Analisi diretta dei bromuri ematici con un nuovo metodo gas cromatografico: determinazione dei valori di riferimento normali e dei livelli nei soggetti esposti a bromuro di metile, *Folia Med.*, 2002, 73, 1-2: 43-50.

CALLEMAN CJ, EHRENBORG L, JANSSON B, OSTERMAN-GOLKAR S, STEVENSON K AND WACHTMEISTER CA: Monitoring and risk assessment by means of alkyl groups in hemoglobin in persons occupationally exposed to ethylene oxide, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, 1978, 2, 2: 427-42.

CAMPBELL C, WARD NY, PETE M J.: Increased bromide levels in serum and hair during lithium treatment, *Affect Disord.*, 1986, 11, 2: 161-4.

FERRANTI P, SANNOLO N, MAMONE G, FIUME I, CARBONE V, TORNQVIST M, BERGMAN A AND MALORNI A.: Structural characterization by mass spectrometry of hemoglobin adducts formed after in vivo exposure to methyl bromide, *Carcinogenesis*, 1996, 17, 12: 2661-71.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC): Methyl Bromide, Summary and Evaluation, 1999, 71: 721.

MAMONE G, MALORNI A, SCALONI A, SANNOLO N, BASILE A, PÖCSFALVI G, FERRANTI P.: Structural analysis and quantitative evaluation of the modifications produced in human hemoglobin by methyl bromide using mass spectrometry and Edman degradation *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1998, 12, 22: 1783-92.

MIRAGLIA N, GENOVESE G, ACAMPORA A, MALORNI L, SANNOLO N.: A novel mass spectrometric technique for the evaluation of occupational exposure to methyl bromide, *J. Mass Spectrom.*, 2002, 37, 11: 1171-4.

NEUMANN HG.: Analysis of hemoglobin as a dose monitor for alkylating and arylating agents. *Arch. Toxicol.*, 1984, 56, 1: 1-6.

SANNOLO N, MAMONE G, FERRANTI P, BASILE A AND MALORNI A.: Biomonitoring of human exposure to methyl bromide by isotope dilution mass spectrometry of peptide adducts, *J. Mass Spectrom.*, 1999, 34, 10: 1028-32.

U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (U. S. EPA): Integrated Risk Information System (IRIS) on Bromomethane (CASRN 74-83-9), 1999.