

A. Mutti^{1,3}, G. De Palma², M. Goldoni³

Nuove prospettive nel monitoraggio biologico degli elementi metallici: l'esempio del cromo esavalente

¹ Dipartimento di Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi di Parma, Parma² Dipartimento di Medicina Sperimentale ed Applicata, Sezione di Medicina del Lavoro ed Igiene Industriale, Università degli Studi di Brescia, Brescia³ CERT (Centro di Collaborazione con INAIL, ex-ISPEL, presso l'Università di Parma), Parma

RIASSUNTO. L'industria galvanica è un settore importante su tutto il territorio nazionale, poiché i processi che la caratterizzano riguardano un gran numero di fabbricazioni industriali ed artigianali. Nella cromatura galvanica esiste un rischio chimico specifico dovuto all'esposizione a composti contenenti Cromo esavalente [Cr(VI)]. Il condensato dell'aria espirata (CAE) è stato usato per studiare l'esposizione acuta e a lungo termine a Cr(VI) in lavoratori addetti alla cromatura a spessore. Cr-CAE correla con specifici biomarcatori di stress ossidativo ed è possibile misurarne anche la frazione non ancora ridotta a Cr(III). Il CAE è quindi un fluido biologico promettente per il monitoraggio della dose assorbita a livello dell'organo bersaglio, della cinetica di riduzione polmonare di Cr(VI) e più in generale dei suoi effetti locali pneumotossici nelle lavorazioni galvaniche, con la possibilità di affiancare la sua raccolta e la sua analisi alle misure tradizionalmente fatte durante il monitoraggio biologico.

Parole chiave: industria galvanica, cromo esavalente, condensato dell'aria espirata.

ABSTRACT. NEW PERSPECTIVES IN BIOMONITORING OF METALLIC ELEMENTS: THE EXAMPLE OF HEXAVALENT CHROMIUM.

Plating industry is an important productive sector in all the national territory, because of its contribution to a high number of industrial products and crafts. In the chrome plating sector there is a specific chemical risk due to the exposure to compounds containing hexavalent Chromium [Cr(VI)]. Exhaled breath condensate (EBC) has been used to study both acute and long term exposure to Cr(VI) in chrome plating workers. Cr-EBC correlates with specific oxidative stress biomarkers. Moreover, both total Cr and its hexavalent fraction can be measured in EBC, which therefore is a promising biological fluid to assess the absorbed dose at the target organ level, the pulmonary reduction kinetics of Cr(VI) and in general its local pneumotoxic effects. EBC collection and analysis could give additional information to the traditional measures performed during biomonitoring.

Key words: plating industry, hexavalent chromium, exhaled breath condensate.

Introduzione: il ciclo produttivo e l'individuazione dei rischi

L'industria galvanica è oggi in Italia un settore di grande importanza e diffusione su tutto il territorio nazionale, in quanto i processi che la caratterizzano, primari od ausiliari, riguardano un gran numero di fabbricazioni industriali ed artigianali. In particolare, risulta particolarmente utile la definizione di "trattamento galvanico" presentata nel Decreto n. 3357 del 13/4/2011 della regione Lombardia: "nel variegato settore dei rivestimenti superficiali, si riferisce a numerosi processi industriali, generalmente di supporto all'industria di trasformazione dei metalli, tutti accomunati dalla presenza di una procedura di elettrodeposizione galvanica. In particolare i processi di cromatura galvanica, che garantiscono ai manufatti metallici una resistenza di superficie agli agenti atmosferici duratura o sono utilizzati a scopo decorativo, hanno larga diffusione dell'industria automobilistica, aerea, elettronica e metalmeccanica in genere" (1). Sui rischi della cromatura per la salute e la sicurezza è disponibile anche un recente opuscolo edito dall'INAIL nel 2005 (2). Riassumiamo brevemente i passaggi fondamentali del ciclo produttivo, richiamando i processi chimici fondamentali della lavorazione. Per "elettrodeposizione metallica" si intende il passaggio di corrente elettrica generata da due elettrodi in una soluzione contenente ioni del metallo che servirà per il rivestimento dei pezzi metallici. A contatto con gli elettrodi avverranno quindi reazioni di ossidazione (catodo) e di riduzione (anodo) degli ioni in soluzione, con conseguente trasferimento di elettroni (elettrolisi). I pezzi da rivestire vengono usati come catodo; d'altra parte, gli anodi sono costituiti dal metallo che rivestirà l'oggetto. Per "galvanostegia" si intende l'insieme dei processi con i quali un oggetto può essere rivestito con metalli o leghe a mezzo di processi elettrolitici. Tale processo previene la corrosione ma è anche usato a scopi decorativi.

Il processo produttivo può essere schematizzato in tre fasi principali: pulizia superficiale dell'oggetto da rivestire; deposizione elettrolitica vera e propria; finitura (3). In cromatura galvanica si utilizzano bagni contenenti percentuali variabili di anidride cromica (CrO₃) e acido solforico, a seconda dello spessore di deposizione (circa 400 g/l nella cromatura a spessore; circa 250 g/l nella cromatura a strato sottile o decorativa) e con aggiunta di tensioattivi e

additivi vari (brillantanti, splendogeni, antipuntinanti) a seconda della resa finale che si intende ottenere. In cromatura si utilizzano anodi insolubili, di solito di piombo, necessari per riossidare il cromo trivalente (Cr(III)), che in concentrazioni eccessive pregiudica la brillantezza del deposito, a cromo esavalente (Cr(VI)). La cromatura "decorativa" è utilizzata per migliorare l'estetica del prodotto finale per deposizione di un sottile strato di cromo, mentre la cromatura "a spessore" o "dura" conferisce al prodotto finale importanti qualità quali la resistenza all'abrasione, alla corrosione, alle temperature. Oltre alla cromatura, la galvanica comprende anche: nichelatura a base di solfato di nichel, cloruro di nichel e acido boric; ramatura con bagni al cianuro ed al solfato; zincatura con bagni al cianuro doppio di sodio e zinco, oppure quello di potassio; cadmiatura, con bagni al cianuro; stagnatura, con bagni al solfato e allo stannato; argentatura, con bagni a base di cianuri; doratura, con bagni di aurocianuro potassico; piombatura, con bagni acidi.

Concentrandosi sul rischio chimico, diverse sono le fonti di pericolo: oltre a tutti i composti contenenti metalli, c'è un rischio specifico per la manipolazione di acidi e di tutti i prodotti intermedi che si formano durante la produzione, alcuni assai tossici. L'attenzione viene però in particolare rivolta ai composti metallici contenenti Cr(VI), della cui tossicità ci occuperemo nel paragrafo successivo. L'anidride cromica è una sostanza tossica e cancerogena ai sensi dell'attuale legislazione dell'Unione Europea, che attribuisce tra l'altro la frase di rischio R49 (H350 sec. CLP) "Può provocare il cancro per inalazione". In ottemperanza a quanto previsto dal Titolo IX, Capo II del DLgs 81/08, Protezione da agenti cancerogeni e mutageni, Art. 236, la valutazione del rischio deve essere effettuata tramite attività di monitoraggio ambientale e biologico, utilizzando metodi tradizionalmente accettati (4). Questa rassegna ha lo scopo di offrire una panoramica su nuove metodologie non invasive utilizzate per il momento solo a scopo di ricerca con lo scopo di valutare l'effetto locale a livello delle vie aeree dell'inalazione di Cr(VI) nell'industria galvanica in assenza di effetti visibili per la salute, ossia in presenza di esami spirometrici nella norma.

Il Cromo Esavalente

Il Cromo (Cr) è un metallo presente in natura prevalentemente in due differenti stati di ossidazione: trivalente [Cr(III)] ed esavalente [Cr(VI)] (5). Mentre Cr(III) è scarsamente tossico, non essendo in grado di attraversare le membrane cellulari (6,7) e svolge un ruolo fisiologico sull'omeostasi glicemica che lo rende un elemento essenziale, il Cr(VI), prevalentemente sotto forma di ione cromoato, passa con facilità la membrana cellulare attraverso canali anionici. La sua riduzione per opera di alcune molecole intracellulari (glutazione, ascorbato e cisteina, per esempio) porta alla formazione di intermedi instabili [Cr(V) e Cr(IV)] e stabili [Cr(III)] in grado di formare complessi con DNA, peptidi e generare stress ossidativo (8-9). Sulla base di queste considerazioni e di evidenze sperimentali ed epidemiologiche, il Cr(VI) è stato classifi-

cato dall'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) come cancerogeno per l'uomo (6). L'apparato respiratorio rappresenta il principale organo bersaglio dell'azione tossica e cancerogena del Cr(VI), in quanto l'esposizione ambientale e professionale avviene soprattutto per inalazione (10). Se da un lato è nota l'associazione tra esposizione a Cr(VI) e cancro del polmone (11), l'esposizione acuta a Cr(VI) può provocare diversi sintomi respiratori, oltre che ulcere e perforazioni del setto nasale (5).

Cr(VI): i valori limite professionali e il monitoraggio biologico tradizionale

Il valore limite di soglia ponderato sulle otto ore lavorative (TLV-TWA[®]) fissato dalla Conferenza Americana degli Igienisti Industriali Governativi (ACGIH) è 0.05 mg/m³, 0.01 mg/m³ per i composti insolubili di Cr(VI). Il limite di esposizione tecnico (TRK) fissato dalla *Deutsche ForschungsGemeinschaft* (DFG) è lo stesso. L'Occupational Safety & Health Administration (OSHA) ha posto recentemente i seguenti limiti per esposizione industriale: 0.0025 mg/m³ come *action level* e 0.005 mg/m³ come *permissible exposure limit* (PEL), calcolati come concentrazioni medie pesate in un turno lavorativo di 8 ore (12). Il monitoraggio biologico viene usualmente effettuato mediante dosaggio dell'eliminazione urinaria del cromo (Cr-U). Il 95° percentile dell'intervallo di riferimento per la popolazione Italiana non professionalmente esposta è pari a 0.35 µg/l (13). L'ACGIH fissa un valore BEI[®] su campioni raccolti a fine turno, fine settimana lavorativa pari a 25 µg/l, ed un valore BEI[®] per la differenza tra inizio turno e fine turno lavorativo pari 10 µg/l. Il valore guida per il monitoraggio biologico (BMGV) fissato dall'HSE inglese è pari a 10 micromol/mol creatinina (1 µmol/mol = 0.46 µg/g). Si tratta in questo caso di un valore guida per l'igiene industriale e non di un limite *health-based*. Poiché il Cr-U è completamente ridotto a Cr(III), per la valutazione dell'esposizione a Cr(VI) è necessario ricorrere al dosaggio del Cr sui globuli rossi isolati. Per tale indicatore, è disponibile il valore equivalente di esposizione EKA della DFG (riportati in 14).

Nuove Metodologie nel monitoraggio dell'esposizione e del rischio nell'industria galvanica: il Condensato dell'aria Esalata (CAE)

Se il Cr-U fornisce importanti informazioni sull'esposizione sistemica a Cr(VI), non ci fornisce dati sulla dose assorbita e depositata a livello polmonare, sul potere riducente delle vie aeree e sugli effetti a livello locale del metallo in tale stato di ossidazione. Per questa ragione, i livelli di Cr sono stati misurati su campioni autoptici di tessuto polmonare di soggetti professionalmente esposti. In generale, i soggetti esposti a Cr(VI) durante la loro vita lavorativa mostravano livelli di Cr nel tessuto polmonare 100 volte più elevati rispetto a soggetti di controllo (15).

Negli ultimi anni, l'analisi dell'aria esalata ha fornito risultati interessanti nell'identificazione di nuovi biomarcatori di processi fisiopatologici ed infiammatori polmo-

nari, sia utilizzando l'aria esalata in fase di vapore che condensandola a basse temperature, ottenendo un condensato dell'aria esalata (CAE) (16,17). La raccolta del CAE ha il vantaggio che è estremamente facile da fare, non è invasiva, soprattutto per soggetti con malattie polmonari, e permette la raccolta di campioni ripetuti nel tempo, non provocando fenomeni infiammatori secondari (17). Il CAE dall'altro è un fluido ancora relativamente poco studiato in campo ambientale ed occupazionale (18), ma sono stati fatti diversi studi sull'esposizione a metalli, in particolare a Cr(VI) nella galvanica. Per le sue caratteristiche e per il basso effetto-matrice, il CAE è il fluido ideale per la misurazione di elementi in tracce, in particolare degli elementi di transizione. Per questo motivo, il CAE può essere utile nella valutazione dei livelli di metalli pneumotossici ed essenziali a livello dell'organo bersaglio.

In un primo studio su lavoratori addetti alla cromatura galvanica monitorati fino a 48 ore dopo l'ultima esposizione Cr(VI), i livelli di Cr-U e di Cr-CAE erano chiaramente più alti nei lavoratori esposti rispetto ai controlli di almeno un ordine di grandezza (19). Tuttavia, le due variabili correlavano debolmente tra loro, indicando una cinetica relativamente lenta di escrezione del Cr e dalla presenza di vie di esposizione diverse da quella per inalazione (per esempio, per via dermica). Tuttavia, per via della correlazione tra Cr-CAE e Cr-U con il Cr ambientale, entrambi possono essere considerati biomarcatori di esposizione. Se da un lato Cr-U correlava solo debolmente con biomarcatori di stress ossidativo nel CAE (acqua ossigenata e malondialdeide come indicatore di perossidazione lipidica), tali correlazioni risultavano assai più significative per Cr-CAE, indicando che quest'ultimo, più di Cr-U, è rappresentativo della dose polmonare responsabile della produzione di radicali liberi dell'ossigeno a livello locale. Per approfondire le conoscenze riguardanti lo stato di ossidazione del Cr nell'aria esalata dopo esposizione a Cr(VI) e valutare il potere riducente del *lining fluid* bronco-alveolare, è stata messa a punto una metodica per misurare Cr(VI) direttamente nel CAE con sufficiente sensibilità (20). I dati sul CAE confermano che Cr(VI) viene ridotto a Cr(III) dal *lining fluid* delle vie aeree, ma non completamente. Infatti, circa il 33.5% di cromo era ancora esavalente nel CAE immediatamente dopo l'esposizione (contro un 67% nei dati ambientali), mentre si riduceva significativamente della metà (16.5%) 15 ore dopo l'ultima esposizione. La persistenza del Cr(VI) nelle vie aeree può giustificare l'aumento di diversi indicatori di stress ossidativo nel CAE, poiché il Cr(VI) può essere assorbito a livello polmonare, rivelando la sua tossicità a livel-

lo cellulare. Infine, i livelli di Cr nel CAE sono stati messi in relazione coi livelli di Cr nel plasma (rappresentativo del Cr già ridotto a trivalente) e nei globuli rossi (Cr-RC, rappresentativo invece del Cr(VI) non ancora ridotto) di lavoratori campionati ad inizio (IT) e fine turno (FT) (21). A FT, Cr-U non correlava significativamente con Cr-RC ma con Cr-plasma, mentre ad IT si osservava il contrario, ossia Cr-U correlava positivamente con Cr-RC ma non con Cr-plasma, indicando chiaramente come Cr-Plasma possa essere considerato un biomarcatore di esposizione recente, mentre il Cr(VI) che raggiunge il sangue e penetra nei globuli rossi ha una cinetica di escrezione più lenta. Infine, Cr-CAE correlava significativamente con Cr-RC a fine turno. Il passaggio di Cr(VI) dai polmoni al sangue è quindi già monitorabile a FT, quando Cr escreto per via urinaria è prevalentemente quello già ridotto presente anche nel plasma, mentre col passare delle ore, quando viene escreto per via urinaria anche il Cr-GR, il sangue non riflette più la concentrazione di Cr a livello polmonare, ossia della frazione che persiste nelle vie aeree. Alla luce di questi dati, è possibile proporre un modello complessivo comprendente tre passaggi (Figura 1).

La riduzione: Cr(VI) viene ridotto a Cr(III) direttamente nel *lining fluid*, ma con un'efficienza relativamente bassa (circa il 50% a fine turno, con persistenza di Cr(VI) anche 48 h dopo l'esposizione).

L'assorbimento: Cr(VI) non ridotto viene assorbito a livello della mucosa e può quindi superare le membrane cellulari delle cellule epiteliali del polmone, provocando effetti tossici ed infiammatori (come mostrato dai due biomarcatori di stress ossidativo considerati: H₂O₂ e MDA). La cinetica di escrezione del Cr(VI) non ridotto è più lenta di quella della frazione che arriva nel sangue in forma Cr(III), e a fine turno è correlata ai livelli di Cr nel CAE, rappresentativi della dose a livello polmonare.

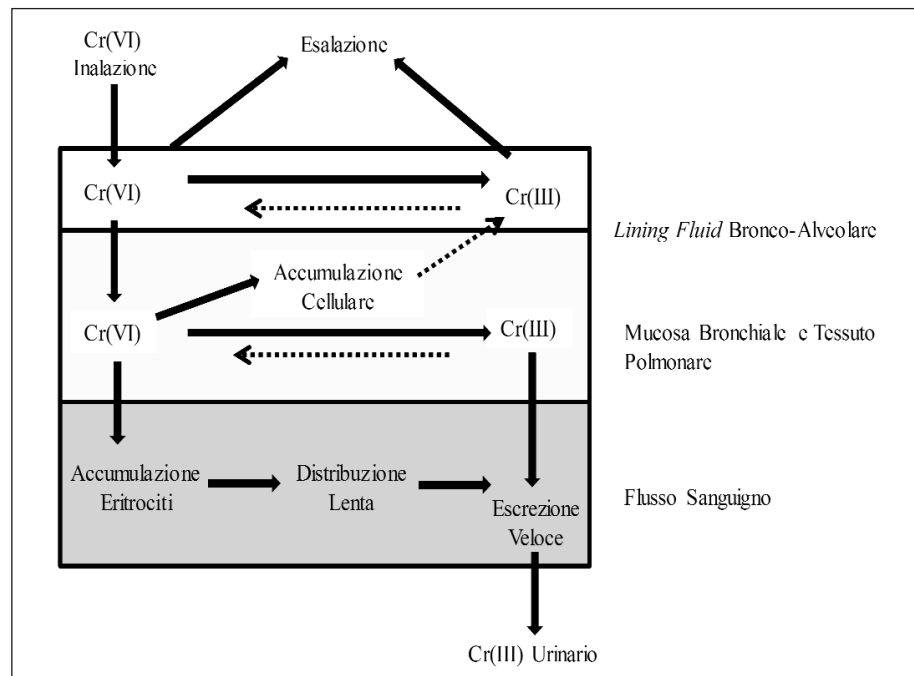


Figura 1. Il modello proposto per la tossicocinetica di Cr(VI) dopo inalazione in cromatura galvanica

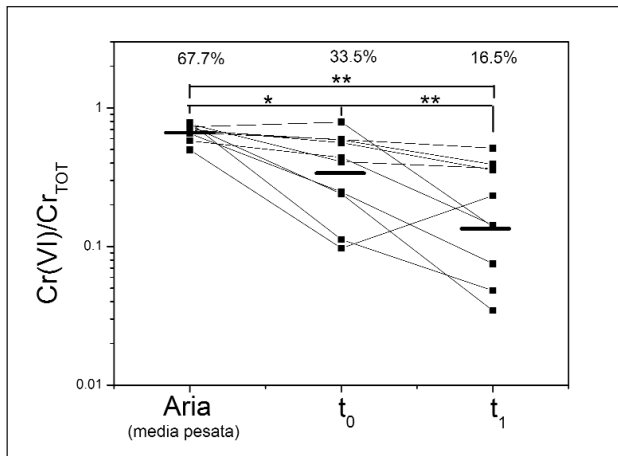


Figura 2. Frazione di Cr(VI) sul totale nell'aria inalata e nel condensato dell'aria esalata al termine dell'esposizione (t_0) e dopo 15 ore (t_1)

L'esalazione: Cr(VI) e Cr(III) derivanti dal *lining fluid* bronco-alveolare possono essere esalati. L'esalazione può quindi rappresentare una via di escrezione non trascurabile di Cr dal corpo umano, in particolare dalle vie aeree. Da questo punto di vista, dunque, Cr-CAE può essere visto come un buon indicatore di dose interna polmonare e rappresentare quindi un biomarcatore di esposizione a livello locale, aggiungendo quindi informazioni fondamentali a quelle fornite dal tradizionale monitoraggio biologico in sangue e urina. Tale idea è stata confermata anche dallo studio di Goldoni et al, (22) in cui Cr-CAE correlava coi livelli di Cr nel tessuto polmonare di pazienti affetti da tumore polmonare non a piccole cellule.

Si può notare come, pur in un piccolo gruppo di soggetti, sia evidente la variabilità interindividuale nella capacità riducente e, quindi, come sia possibile ricavare informazioni anche sulla suscettibilità individuale (Figura 2).

Ricordiamo infine lo studio di Murgia et al, 2006, (23) che hanno determinato le concentrazioni di Cr totale nello sputo indotto in lavoratori impiegati in galvanica. In tale studio, nei lavoratori esposti risultava aumentata la concentrazione di nitriti nel CAE, ma non di alcune interleuchine. Il Cr nello sputo indotto correlava con i livelli di nitriti nel CAE, ed i livelli misurati erano dello stesso ordine di grandezza di quelli misurati da noi nel CAE.

Conclusioni

Il CAE è stato usato per investigare l'esposizione acuta e a lungo termine a Cr(VI) in lavoratori addetti a cromatura galvanica e per formulare ipotesi sulla dose interna assorbita a livello dell'organo bersaglio. Cr-CAE come biomarcatore di esposizione non correla solo con specifici biomarcatori di stress ossidativo in soggetti esposti con normali valori spirometrici, ma è possibile misurarne anche la frazione non ancora ridotta a Cr(III), mettendo in evidenza la grandissima potenzialità del CAE nel monito-

raggio delle dosi al bersaglio e nel possibile studio degli effetti di elementi di transizione pneumotossici inalabili nelle lavorazioni galvaniche. Ulteriori studi sono in corso su lavoratori esposti a Nichel durante operazioni di nichelatura, per fornire ulteriori elementi sulla versatilità del CAE, con la possibilità di affiancare la sua raccolta e la sua analisi alle misure tradizionalmente fatte durante il monitoraggio biologico in galvanica.

Bibliografia

- 1) Regione Lombardia. Decreto n° 3357 del 13/04/2011. Vademecum per il miglioramento della salute e sicurezza nelle galvaniche.
- 2) Cirila PE, Filippini A. Attività di Galvanica. Opuscolo Salute e Sicurezza, INAIL, Roma 2005.
- 3) Profilo di rischio nel comparto: galvaniche, accessibile in rete all'indirizzo http://www.ispesl.it/profili_di_rischio/_galvaniche/index.htm.
- 4) Scarselli A, Binazzi A, Marzio DD, et al. Hexavalent chromium compounds in the workplace: assessing the extent and magnitude of occupational exposure in Italy. *J Occup Environ Hyg* 2012; 9: 398-407.
- 5) ATSDR. Final Report of toxicological profile for chromium. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, USA, 2000.
- 6) IARC (International Agency for Research on Cancer). Chromium, Nickel and welding. *Monog Eval Carcinog Risk Hum* 1990; 49: 1-677.
- 7) De Flora S, Bagnasco M, Serra D, et al. Genotoxicity of chromium compounds. A review. *Mutat Res* 1990; 238: 99-172.
- 8) Bagchi D, Stohs SJ, Downs BW, et al. Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium. *Toxicology* 2002; 180: 5-22.
- 9) Levina A, Lay PA. Mechanistic studies of relevance to the biological activities of chromium. *Coord Chem Rev* 2005; 249: 281-298.
- 10) De Flora S. Threshold mechanisms and site specificity in chromium(VI) carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2000; 21: 533-541.
- 11) Gibb HJ, Lees PS, Pinsky PF, et al. Lung cancer among workers in chromium chemical production. *Am J Ind Med* 2000; 38: 115-126.
- 12) OSHA. Chromium (VI). Standard n° 1910.1026. OSHA, Washington, USA 2006.
- 13) Società Italiana Valori di Riferimento, SIVR, 3a lista, 2011.
- 14) Mutti A. Linee guida per il Monitoraggio Biologico. PI-ME Editrice, Pavia, Italy, pp. 128, 2006.
- 15) Tsuneta Y, Ohsaki Y, Kimura K, et al. Chromium content of lungs of chromate workers with lung cancer. *Thorax* 1980; 35: 294-297.
- 16) Corradi M, Mutti A. Exhaled Breath Analysis: from occupational to respiratory medicine. *Acta Biomed* 2005; 76: s20-s29.
- 17) Horvath I, Hunt J, Barnes PJ, et al. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J* 2005; 26: 523-548.
- 18) Mutti A, Corradi M. Recent developments in human biomonitoring: non-invasive assessment of target tissue dose and effects of pneumotoxic metals. *Med Lav* 2006; 97: 199-206.
- 19) Caglieri A, Goldoni M, Acampa O, et al. The effect of inhaled chromium on different exhaled breath condensate biomarkers among chrome-plating workers. *Environ Health Perspect* 2006; 114: 542-546.
- 20) Goldoni M., Caglieri A., Poli D., et al. Determination of hexavalent chromium in exhaled breath condensate and environmental air among chrome plating workers. *Anal Chim Acta* 2006; 562: 229-235.
- 21) Goldoni M, Caglieri A, De Palma G, et al. Chromium in exhaled breath condensate (EBC), erythrocytes, plasma and urine in the biomonitoring of chrome plating workers exposed to soluble Cr(VI). *J Environ Monit* 2010; 12: 442-447.
- 22) Goldoni M, Caglieri A, Corradi M, et al. Chromium in exhaled breath condensate and pulmonary tissue of non-small cell lung cancer patients. *Int Arch Occup Environ Health* 2008; 81: 487-493.
- 23) Murgia N, Muzi G, Dell'Omo M, et al. Induced sputum, exhaled breath condensate and nasal lavage fluid in electroplating workers exposed to chromium. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2006; 19: 67-71.