

## Il monitoraggio biologico dell'esposizione professionale e non ad antiparassitari

Cristina APREA, Gianfranco SCIARRA, Liana LUNGHINI e Nanda BOZZI

Unità Funzionale Igiene e Tossicologia, ASL 7, Siena

**Riassunto.** - L'esposizione a fitofarmaci interessa la gran parte della popolazione comprendendo soggetti professionalmente esposti e popolazione generale. Per ottenere informazioni sui livelli di esposizione, il monitoraggio biologico è spesso la scelta migliore in quanto consente di disporre di dati che riflettono la dose assunta dall'organismo attraverso tutte le vie di penetrazione. Tali misure sono state applicate per valutare l'esposizione in ambito agricolo e industriale, su soggetti avvelenati per contatto accidentale o volontario, in volontari per studi di farmacocinetica e nella popolazione generale. Questo lavoro, basato su 100 studi pubblicati, si propone di fare una rassegna degli indici di esposizione disponibili per le classi di fitofarmaci più rappresentative. In maniera del tutto generale vengono presentate le modalità di raccolta e conservazione dei campioni e le procedure analitiche impiegate. Per alcuni gruppi di composti (insetticidi organofosforici e piretroidi, anticrittogamici del gruppo degli etilenbisditiocarbammati, erbicidi fenossiacetici) vengono presentati i risultati di alcuni studi sulla popolazione generale e su soggetti professionalmente esposti.

*Parole chiave:* monitoraggio biologico, lavoratori esposti, popolazione generale, valori di riferimento, campioni biologici.

**Summary** (*Biological monitoring of pesticide exposure: occupationally exposed workers and general population*). - Occupationally or otherwise, much of the population is exposed to pesticides. To obtain information on exposure levels, biological monitoring is often the best choice because it provides data that reflects total exposure by all routes. Biological monitoring has been used to evaluate exposure in agricultural and industrial environments, in subjects poisoned by accidental or voluntary contact, in volunteers for pharmacokinetic studies and in the general population. This paper is based on 100 studies published on this topic and reviews exposure indices for the main classes of pesticides. Methods of sampling and conservation of samples are outlined, together with the analytical procedures used. For compounds such as organophosphate and pyrethroid insecticides, ethylenebisdithiocarbamate fungicides, and phenoxyacetic herbicides, the results of studies on the general population and groups of occupationally exposed workers are reported.

*Key words:* biological monitoring, exposed workers, general population, reference values, biological samples.

### Introduzione

L'esposizione a fitofarmaci interessa la gran parte della popolazione comprendendo soggetti professionalmente esposti e popolazione generale, che può venire in contatto attraverso l'uso domestico, attraverso il consumo di cibi o bevande contaminate o vivendo in prossimità di zone agricole o di aree trattate a causa di interventi per la salute pubblica.

Dal punto di vista occupazionale, l'esposizione a fitofarmaci riguarda il settore industriale (lavoratori che effettuano la produzione o la formulazione), il settore agricolo (distribuzione in campo aperto e in ambiente confinato, rientro in coltura) ed il settore della salute pubblica (trattamenti di disinfestazione, derattizzazione, ecc.). E' inoltre da ricordare l'uso veterinario di alcuni principi attivi.

Le modalità di esposizione possono essere notevolmente diverse nei vari settori occupazionali. A livello di produzione industriale i lavoratori sono, di solito, espo-

sti a pochi principi attivi per prolungati periodi di tempo e l'esposizione è relativamente costante. A livello agricolo i lavoratori sono esposti a numerose sostanze per brevi periodi di tempo e i livelli di esposizione possono essere molto variabili in dipendenza del tipo di coltura, del clima o del microclima, del tipo di mansione svolta, dei mezzi impiegati per la distribuzione, ecc.

L'attività agricola svolta in ambiente confinato (serre e tunnels di agricoltura industrializzata) e la formulazione di prodotti commerciali (miscelamento dei principi attivi con i coformulanti) hanno caratteristiche intermedie tra il lavoro agricolo e quello industriale, il primo perché viene svolto in ambiente confinato con microclima costantemente controllato, il secondo perché gli operatori vengono in contatto con molti differenti prodotti in campagne cicliche di formulazione.

Durante l'esposizione occupazionale, i fitofarmaci vengono assorbiti prevalentemente per via inalatoria e cutanea. L'assorbimento attraverso l'apparato gastroenterico è di norma ridotto ed è causato dalla deglutizione

di particelle che, in virtù delle loro dimensioni, si depositano a livello delle prime vie aeree. I diversi autori che hanno studiato l'esposizione professionale a fitofarmaci in ambito agricolo concordano nell'attribuire alla quota inalatoria (aerosol o vapori) un'importanza sensibilmente inferiore rispetto a quella cutanea (con l'eccezione dei fumiganti che sono composti estremamente volatili) [1-3]. La contaminazione delle mani e di altre parti di cute scoperta o non adeguatamente protetta da indumenti, può rappresentare quote significative della quantità assorbita, pari a oltre il 50% della dose totale [4]. L'esposizione per inalazione assume un ruolo non trascurabile nelle attività industriali [5].

Per monitoraggio biologico si intende la valutazione dell'esposizione attraverso la misura di una sostanza (xenobiotico) o dei suoi prodotti di trasformazione metabolica in compartimenti biologici eticamente raggiungibili o attraverso la misura di effetti biologici riferibili alla sostanza stessa.

Il principale vantaggio del monitoraggio biologico rispetto al monitoraggio ambientale è rappresentato dalla possibilità di disporre di dati che riflettono la dose assunta dall'organismo attraverso tutte le vie di penetrazione (dermica, inalatoria e digestiva). Il monitoraggio biologico è particolarmente importante per i fitofarmaci a causa delle varie vie attraverso le quali si può verificare l'esposizione e perché consente di valutare in maniera congiunta sia l'esposizione occupazionale che extralavorativa.

Il monitoraggio biologico assume un valore particolarmente elevato quando sono ben note le relazioni tra dosi esterne, dosi interne ed effetti sulla salute. Se sono note soltanto le relazioni tra dosi esterne e interne il parametro biologico può essere usato solo come indice di esposizione. La stima corretta delle dosi assorbite necessita di conoscenze adeguate sul metabolismo e sulla farmacocinetica della sostanza, sull'uomo e/o sugli animali da esperimento. Tali dati risultano utili per la scelta della matrice biologica e delle modalità di campionamento.

Il monitoraggio biologico non risulta un mezzo di indagine appropriato se il fitofarmaco viene metabolizzato in un numero elevato di metaboliti minori. Idealmente, un metabolita è utilizzabile se rappresenta almeno il 30% della dose di fitofarmaco assorbita [6], tuttavia non si può escludere la possibilità che, in dipendenza dalla natura del rischio da valutare, un metabolita minore sia utilizzabile come indicatore biologico di esposizione in assenza di markers biologici più rilevanti.

Come già detto, una delle caratteristiche peculiari del lavoro agricolo è rappresentata dall'impiego contemporaneo di più sostanze anche con caratteristiche tossicologiche molto diverse tra loro. Le conoscenze sulle interazioni tra diversi principi attivi nel corso di esposizioni combinate sono però inadeguate. Un esempio al riguardo può essere fornito dagli insetticidi organofosforici che sembrano inibire l'idrolisi e quindi la

detossificazione dei piretroidi. Alcuni autori [7] hanno rilevato una escrezione urinaria più elevata di fenvalerate e deltamethrin in soggetti che effettuavano la distribuzione di tali composti insieme al metamidophos, rispetto ai soggetti che eseguivano trattamenti soltanto con piretroidi.

### **Indicatori biologici disponibili e loro scelta negli studi di monitoraggio biologico**

Attualmente sono noti più di 1000 principi attivi utilizzati in circa 10 000 tipi di preparazioni commerciali ad attività antiparassitaria. I dati di monitoraggio biologico disponibili sono invece limitati a circa 50 composti [8].

Gli indici biologici disponibili includono indicatori di dose e/o esposizione, indicatori di dose biologicamente efficace e indicatori di effetto. Tali misure sono state applicate per valutare l'esposizione in ambito agricolo e industriale, su soggetti avvelenati per contatto accidentale o volontario, in volontari per studi di farmacocinetica e nella popolazione generale [9]. Nella Tab. 1 si riportano le principali sostanze per le quali è stato proposto e utilizzato il monitoraggio biologico.

Gli indicatori biologici di dose e/o esposizione includono la determinazione di fitofarmaci e loro metaboliti in campioni di urina e sangue e rappresentano la prevalenza degli indici biologici disponibili. Gli antiparassitari che presentano una biotrasformazione ridotta o assente possono essere determinati come sostanza immo modificata nei liquidi biologici. Queste misure offrono il vantaggio di una elevata specificità e sono praticabili per i composti organoclorati ciclopentadienici (aldrin, dieldrin) [10], per i cicloparaffinici (lindano) [11] e fenilparaffinici (DDT) [12], per i derivati dipiridilici (paraquat e diquat) [13], per i derivati degli acidi fenossicarbossilici (2,4-D ed MCPA) [2, 3, 14-16].

La misura di insetticidi organofosforici e carbammati non metabolizzati nel sangue e/o nell'urina oltre che nel contenuto gastrico è stata spesso effettuata per confermare l'esposizione in casi di avvelenamento [17-19]. In casi di morte la determinazione dei composti immo modificati viene anche effettuata in *humor vitreo*, liquido cerebrospinale e vari organi (fegato, rene, milza, cervello, ecc.) [17, 19].

Per la valutazione dell'esposizione occupazionale della maggior parte degli altri composti gli indicatori di dose o di esposizione sono rappresentati da metaboliti più o meno specifici [1, 5-7, 12, 20-35].

Gli indicatori di dose biologicamente efficace sono rappresentati dagli addotti molecolari la cui misura risulta ancora poco diffusa per quanto riguarda i fitofarmaci. Tra gli studi effettuati si ricordano quelli di Pastorelli *et al.* sull'addotto di etilentiourea con emoglobina [36] e

Tabella 1. - Monitoraggio biologico dell'esposizione umana a fitofarmaci

Composto	Matrice	Sostanze analizzate	Rif. Bibl.
<b>Insetticidi</b>			
Organofosforici inibitori ChE	sangue	AChE	[12, 28, 34]
Alchilfosfati	urina	DMP, DMTP, DMPTh, DMDTP, DEP, DETP, DEPTH, DEDTP	[5, 12, 20-23, 34]
Chlorpyrifos e CPM	urina	3,5,6-tricloro-2-piridinolo	[1, 23]
Chlorpyrifos e DEF	sangue/linfociti	esterasi neurotossiche (NTE)	[88, 89]
Acephate	urina	acephate, methamidophos	[46]
Malathion	urina	acidi mono e dicarbossilico	[12, 33, 34]
Fenitrothion	urina	3-metil-4-nitro fenolo	[90]
Parathion e PM	urina	p-nitrofenolo	[91]
<b>Carbammati</b>			
Inibitori ChE	sangue	AChE	[12, 28]
Benomyl	urina	benomyl, carbendazim, MHBC	[92]
Carbaril	sangue/urina	$\alpha$ -naftolo	[33]
Carbofuran	urina	3-idrossicarbofuran	[28]
Pirimicarb	urina	M1 e M2	[31]
Propoxur	urina	2-isopropossifenolo	[24]
<b>Piretroidi sintetici</b>			
Cipermetrina	urina	DCVA, 3-PBA, 4-OH-3PBA	[25]
Deltametrina	urina	deltametrina, DBVA	[7, 27]
Fenvalerate	urina	fenvalerate, 3-PBA, CPBA	[7, 27, 42, 66]
Permetrina	urina	permetrina, DCVA, 3-PBA	[30]
<b>Idrocarburi clorurati</b>			
Aldrin, Dieldrin	sangue	aldrin, dieldrin	[25]
Clordano	sangue	trans-nonacloro, eptacloro epossido, ossiclordano	[94]
DDT	sangue/urina	DDT/acido 2,2-bis(4-clorofenil)-acetico	[12]
1,3-dicloropropene	urina	cis e trans-DCP-MA	[31, 95]
Endin	urina	anti-12-hydroxyendrin	[91]
Heptachlor	sangue	eptacloro epossido	[96]
Lindano, HCH	sangue	r-HCH, isomeri dell'HCH	[11, 12]
<b>Erbicidi</b>			
2,4-D	sangue/urina	2,4-D	[15, 16]
MCPA	urina	MCPA	[2, 3]
2,4,5-T	urina	2,4,5-T	[99]
Alachlor	urina	dietilanilina, idrossietilanilina	[6]
Fluazifop-butile	urina	fluazifop	[6]
Glyphosate	urina	glyphosate	[97]
Diquat e Paraquat	sangue/urina	diquat o paraquat	[13]
Atrazina	urina	atrazina e composti dealchilati	[100]
<b>Fungicidi</b>			
Captan	urina	tetraidrotalimide	[26]
Maneb/Zineb/Mancozeb	urina	etilentiourea	[29, 34]
<b>Miscellanea</b>			
Chlordimeform	urina	4-chloro-o-toluidine	[32]
Chlorobenzilate	urina	p-p'-diclorobenzofenone	[98]
Dinitro-o-cresolo	sangue	dinitro-o-cresolo	[11, 12]
Pentachlorophenol	sangue/urina	pentachlorophenol	[11, 12]

DMP: dimetilfosfato; DMTP: dimetiliosfosfato; DMPTh: dimetilfosforotioato; DMDTP: dimetilditiofosfato; DEP: dietilfosfato; DETP: dietiliosfosfato; DEPTH: dietilfosforotioato; DEDTP: dietilditiofosfato; DEF: s,s,s-tributil fosforotritioato; M1: 2-metilammino 4-idrossi-5,6-dimetilpirimidina; M2: 2-dimetilammino 4-idrossi-5,6-dimetilpirimidina; DCVA: [acido 3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetil ciclopropanoico]; 3-PBA (acido 3-fenossibenzoico); 4-OH-3-PBA: acido 4-idrossi-3-fenossibenzoico; DBVA: [acido 3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetil ciclopropanoico]; DDT: diclorodifeniltricloroetano; HCH: esaclorocicloesano; CPBA: [acido 2-(4-clorofenil)-3-metil-1 butanoico]; CPM: chlorpyrifos-methyl; PM: parathion-methyl; MHBC: [methyl (4-hydroxy-1H-benzimidazol-2yl) carbamate]; DCP-MA: [N-acethyl-S-(3-chloroprop-2-enil)-cysteine]; 2,4-D (acido 2,4-diclorofenossiacetico; MCPA: acido 2-metil-4-clorofenossiacetico); 2,4,5-T (acido 2,4,5-triclorofenossiacetico).

di Lambert *et al.* sugli addotti di alachlor e dei suoi maggiori metaboliti con emoglobina e proteine seriche [37].

Gli indici di effetto misurano l'effetto biochimico indotto dall'assorbimento del fitofarmaco. Indicatori di questo tipo sono disponibili in numero molto limitato, si può citare ad es. l'acetilcolinesterasi, la cui inibizione è indicatore di effetto degli insetticidi organofosforici e dei carbammati [12, 28, 34].

### **Modalità di raccolta dei campioni per il monitoraggio biologico**

#### *Sangue*

In soggetti con esposizioni occupazionali, la raccolta di campioni di sangue per il dosaggio degli indicatori biologici dovrebbe essere effettuata al termine dell'esposizione. Visto che diversi composti (ad es. gli organoclorurati) sono presenti nell'organismo di soggetti non professionalmente esposti, è auspicabile l'effettuazione di prelievi in pre-esposizione con i quali comparare i risultati ottenuti dopo l'esposizione. L'American Conference of Governmental Industrial Hygienist (ACGIH) [38] la World Health Organization (WHO) [11] consigliano la raccolta del campione di sangue alla fine del turno di lavoro rispettivamente per pentachlorophenol e dinitro o-cresolo.

In casi di intossicazione acuta il prelievo dovrebbe essere eseguito prima possibile dopo il contatto con il fitofarmaco.

Considerazioni aggiuntive possono essere fatte riguardo alla misura dell'attività colinesterasica. I livelli di colinesterasi variano considerabilmente da un individuo ad un altro, è consigliabile pertanto che ogni soggetto abbia almeno un dato di valutazione di entrambe, la pseudo e la colinesterasi vera, prima di venire in contatto con composti organofosforici o con carbammati. Tali valori rappresentano un livello basale con il quale ogni valore post-esposizione può essere comparato per valutare la significatività della eventuale riduzione. La WHO raccomanda l'effettuazione di tre campioni basali sequenziali [39]. La raccolta dei campioni post-esposizione dovrebbe essere fatta entro due ore dal termine dell'esposizione per gli insetticidi organofosforici e prima possibile dopo il termine dell'esposizione per i carbammati, a causa della rapida reversibilità dell'inibizione enzimatica.

Per la stima dell'attività colinesterasica con l'impiego di tecniche di monitoraggio sul campo, il campione di sangue è normalmente ottenuto dal dito. Può anche essere usato il lobo dell'orecchio per evitare contaminazioni del campione da parte del pesticida presente nelle mani. Se sono necessari volumi più grandi di campione per l'analisi in laboratorio, il prelievo viene effettuato

nella vena del braccio tramite siringa, quindi trasferito in una provetta, preferibilmente sotto vuoto (*Vacutainer*), contenente anticoagulante (EDTA o eparina) [9].

#### *Urina*

In linea generale, si ritiene che il campione delle 24 h (in unico contenitore o mediante raccolta frazionata nei vari periodi della giornata) sia da preferire se l'obiettivo è la stima della dose di fitofarmaco assorbita. La strategia alternativa è la raccolta di campioni estemporanei al termine del turno di lavoro. Questa strategia serve per determinare i *trend* di assorbimento su base di gruppo ma è difficilmente utilizzabile per la stima delle dosi assorbite.

Più in particolare, nel caso di esposizioni in attività industriali di produzione e formulazione la raccolta dell'urina viene di solito effettuata a fine turno in un unico campione estemporaneo [5]. Nel monitoraggio biologico di composti caratterizzati da assorbimento ed escrezione lenti può essere necessaria la raccolta dell'urina delle 24-48 h dall'inizio dell'esposizione (azinphos-methyl, chlorpyrifos, phorate, etilentiurea, insetticidi piretroidi) o, in alcuni casi la raccolta di un campione estemporaneo di urina prima del turno di lavoro del giorno successivo all'esposizione.

Nel caso degli operatori agricoli, l'esposizione è principalmente cutanea pertanto l'assorbimento può essere lento e protratto nel tempo. In questi casi la raccolta di un solo campione di urina al termine del turno di lavoro può non essere indicativa della dose assorbita. La raccolta dell'urina delle 24 h eventualmente frazionata in più campioni (durante il turno di lavoro e dopo il turno fino all'inizio del lavoro del giorno successivo) è stata adottata in diversi studi [21, 23]. Se l'esposizione si protrae per più giorni consecutivi la raccolta può proseguire per tutti i giorni di lavoro della settimana ed eventualmente per le 24-48 h successive all'ultimo giorno di lavoro [20, 21]. E' consigliabile che la raccolta dell'urina prosegua sullo stesso soggetto per un certo periodo dopo l'esposizione, pari ad almeno 4 volte l'emivita della sostanza. Ciò si rende utile per valutare la cinetica di eliminazione e, quando possibile, le dosi assorbite.

Il numero di campionamenti da effettuare deve essere stabilito in base all'uso previsto per i dati, al livello di confidenza statistica richiesto, ecc. La variabilità dell'esposizione sul campo può essere valutata in modo più accurato, incrementando il numero di soggetti piuttosto che ripetendo il monitoraggio più volte sugli stessi lavoratori.

In ogni caso, ma in particolar modo se il monitoraggio biologico non inizia il primo giorno di esposizione, è auspicabile la raccolta di un campione estemporaneo di urina prima dell'inizio del turno di lavoro (campione basale) [20, 21, 23]. La raccolta di campioni basali risulta importante per almeno tre ordini di motivi: l'ope-

ratore, anche se non svolge la mansione lavorativa per la quale si attua il monitoraggio biologico, lavora presso l'azienda agricola ed ha quindi occasioni di contatto con fitofarmaci di vario tipo; gli indicatori biologici utilizzati sono spesso presenti nell'urina di soggetti non professionalmente esposti; in casi particolari, quali quelli di alcuni metalli (rame, manganese, arsenico), l'analita è normalmente presente nell'organismo.

Nel caso di soggetti intossicati accidentalmente o volontariamente la raccolta dell'urina delle 24 h dovrebbe proseguire per più giorni o comunque fino a che i livelli urinari dei metaboliti non ritornano ai valori della popolazione generale.

Quando si utilizzano campioni estemporanei di urina, sullo stesso campione dovrebbe essere determinata la creatinuria o il peso specifico in modo da normalizzare i risultati ottenuti e da scartare i campioni troppo diluiti o troppo concentrati. Nel caso di raccolta di campioni delle 24 h, oppure di campioni frazionati nell'arco della giornata corrispondenti a definiti intervalli di tempo, dovrebbe essere determinato il volume di urina escreto in modo da definire le quantità assolute di metaboliti presenti nel campione.

L'ACGIH [38] prevede il prelievo dell'urina alla fine del turno di lavoro per il dosaggio del p-nitro fenolo e prima dell'ultimo turno di lavoro della settimana per il dinitro o-cresolo.

### Metodi di analisi e conservazione dei campioni

Le procedure analitiche utilizzate per il monitoraggio biologico dell'esposizione ad antiparassitari sono spesso complesse e prevedono una laboriosa fase di preparazione del campione seguita da un'analisi strumentale, in genere effettuata mediante procedure gas cromatografiche con colonne capillari e rivelatori specifici o di massa [1, 25, 40-47]. La cromatografia liquida è un'ulteriore tecnica utilizzata in questo tipo di analisi [41, 48-50].

Una delle principali limitazioni analitiche evidenziate per la determinazione di fitofarmaci e/o loro metaboliti in liquidi biologici è rappresentata dalla mancanza di standard commerciali puri del metabolita da dosare, di composti simili da impiegare come standard interni, di forme marcate da impiegare per tecniche di diluizione isotopica nell'analisi in HRGC-MS (gas cromatografia ad elevata risoluzione abbinata alla spettrometria di massa) e di forme coniugate.

Il limite di rivelabilità (LR) delle procedure di analisi impiegate varia in un ampio intervallo di concentrazione, anche per lo stesso metabolita. L'applicazione di un metodo di analisi è condizionata dal LR: per determinazioni nella popolazione generale è richiesto un LR prossimo o inferiore a 1 µg/l [40-44, 48, 49, 51]. Valori di LR di un ordine di grandezza superiore sono considerati

adeguati per il monitoraggio biologico di soggetti con esposizione professionale [1, 45, 46, 52]. Per l'analisi di liquidi biologici ottenuti da soggetti con intossicazione acuta o da animali o volontari trattati a scopo sperimentale con antiparassitari è invece sufficiente un LR intorno a 100 µg/l [53, 54].

Per i metodi di analisi impiegati dovrebbe sempre essere determinato il livello di accuratezza e precisione. Nelle procedure complesse, che prevedono fasi di estrazione, derivatizzazione e purificazione, la imprecisione, valutata tramite il coefficiente di variazione percentuale (CV%) è di solito superiore al 10% [40]. Metodi di analisi con una fase preparativa più semplice mostrano in genere CV% nell'intervallo 5-10% [1, 41, 42, 46-48, 52].

La raccolta dei campioni di urina viene in linea di massima effettuata in contenitori in plastica schermati dalla luce tramite film di carta stagnola. La schermatura dalla luce è conseguente in alcuni casi ad una nota degradazione del metabolita: l'etilentiourea, ad esempio, subisce una trasformazione in etileneurea in presenza di luce e di particolari attivatori quali le clorofille e i solventi organici [9]. In tutti gli altri casi la protezione del campione con film di alluminio viene eseguita a scopo precauzionale.

Normalmente non vengono impiegati conservativi o stabilizzanti i quali potrebbero interferire con la determinazione analitica. Alcuni autori [55] riportano l'aggiunta di acido cloridrico (1 ml in 100 ml di urina) nei campioni di urina raccolti per il dosaggio dell'acido 3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetil ciclopropanoico (DBVA).

I campioni dopo la raccolta vengono di solito congelati a -18 °C e mantenuti tali fino al momento dell'analisi [9].

Considerando che l'analisi dei campioni difficilmente viene effettuata in tempi brevi dalla raccolta, è opportuno prevedere studi di stabilità dei campioni biologici. Studi di stabilità del 3,5,6-tricloro-2-piridinolo (TCP) effettuati su campioni di urina non hanno evidenziato degradazioni dopo 40 giorni di conservazione a -18 °C [51]. Analogamente, in una prova effettuata per l'acido 3-fenossibenzoico (3-PBA) urinario, la concentrazione dell'analita non variava apprezzabilmente durante 3 mesi di conservazione a -18 °C [42]. Con le stesse modalità di conservazione non si è verificata alcuna significativa degradazione di etilentiourea (ETU) in urina dopo 350 giorni [48]. Gli alchilfosfati risultano stabili in urina congelata per almeno 20 settimane [56]. Uno studio di stabilità ha mostrato che il 2-isopropossifenolo in forma coniugata è stabile in urina per almeno 6 mesi se la conservazione avviene a -20 °C [45]. Per il dosaggio delle colinesterasi in seguito ad una esposizione a insetticidi organofosforici, non sono richiesti speciali additivi né una particolare refrigerazione del campione. Normalmente non dovrebbero trascorrere più di 24 h tra il prelievo di sangue e il ricevimento da parte del labora-

torio per l'analisi. Se la conservazione degli eritrociti lavati viene fatta a -20 °C, il campione è stabile fino a 2 anni. Quando viene utilizzato il metodo di Ellman *et al.* [57] la conservazione degli eritrociti lisati in saponina a 4 °C provoca una riduzione giornaliera di attività enzimatica del 10%. Se la conservazione avviene a -18°C non si verifica perdita di attività per almeno 2 mesi di conservazione. Nel caso di esposizione a carbammati l'analisi dovrebbe essere eseguita appena dopo il prelievo a causa della rapida reversibilità dell'inibizione enzimatica.

### Monitoraggio biologico dell'esposizione ad esteri fosforici (OP)

L'eliminazione degli esteri organofosforici e dei loro metaboliti avviene principalmente attraverso l'urina, minori quantità vengono escrete attraverso le feci e l'aria espirata. L'escrezione urinaria e fecale è usualmente rapida e di solito l'80-90% della dose è eliminata entro le 48 h sebbene piccole quantità possano essere recuperate nell'urina per alcuni giorni probabilmente a causa dell'accumulo nei grassi e dei legami covalenti che coinvolgono la fosforilazione di proteine [34]. Una porzione piccolissima di organofosforici e dei loro analoghi ossigenati è eliminata imm modificata con l'urina. La gran parte dei composti escreti è rappresentata dai prodotti di idrolisi costituiti da alchilfosfati e da gruppi specifici attaccati al fosforo (metaboliti fenolici specifici) [58].

Nell'urina di soggetti professionalmente esposti [12, 34] o della popolazione generale [22] sono identificabili 8 alchilfosfati: gli OP dimetilati producono metaboliti dimetilati [dimetilfosfato (DMP), dimetiltiofosfato (DMTP), dimetilditiofosfato (DMDTP), dimetilfosforotioato (DMPTh)] mentre gli OP dietilati danno luogo alla formazione di metaboliti dietilati [dietilfosfato (DEP), dietiltiofosfato (DETP), dietilditiofosfato (DEDTP), dietilfosforotioato (DEPTh)].

Gli alchilfosfati urinari possono essere rilevati a livelli di esposizione molto inferiori rispetto a quelli che determinano la riduzione dell'attività colinesterasica [12].

La Tab. 2 riporta i livelli di alchilfosfati in urina riscontrati nella popolazione generale residente nella Toscana meridionale. Dai due studi, effettuati rispettivamente sulla popolazione adulta (124 soggetti) [22] e su quella infantile (195 bambini di età compresa tra 6 e 7 anni) [59], si rileva una elevata percentuale di campioni in cui la concentrazione dei sei analiti risulta superiore al limite di rivelabilità dell'analisi (% pos). La positività inferiore riscontrata per i due metaboliti disolforati (DMDTP e DEDTP) è attribuibile al fatto che tali composti, una volta formati nell'organismo, rapidamente degradano ai corrispondenti metaboliti monosolforati (DMTP e DETP) e ossigenati (DMP e DEP) [59].

I valori relativi ai bambini sono significativamente maggiori di quelli degli adulti per tutti i metaboliti analizzati. Sui motivi di tali differenze si possono fare alcune considerazioni. L'esposizione ai residui di pesticidi presenti negli alimenti può risultare superiore per i bambini rispetto agli adulti in quanto i primi, relativamente al minore peso corporeo, ingeriscono quantità maggiori di prodotti freschi, acqua, latte e succhi di frutta. Inoltre, l'esposizione dei bambini ai residui di pesticidi presenti nelle abitazioni può essere superiore a causa del fatto che essi giocano spesso sul pavimento e si portano frequentemente le mani alla bocca inducendo una maggiore esposizione sia orale non dietaria, che cutanea. I pesticidi possono essere presenti all'interno delle abitazioni sulle polveri domestiche (ad esempio a causa dell'uso indoor dei pesticidi), su residui di terreno trasportati con le scarpe o da animali domestici, su fiori recisi e piante ornamentali. I risultati dello studio [59] confermano che l'impiego di antiparassitari all'interno o all'esterno dell'abitazione e la presenza di orti o giardini vicini alle abitazioni influenzano significativamente l'escrezione urinaria di alchilfosfati.

**Tabella 2.** - Escrezione urinaria di alchilfosfati (nmoli/g creat) nella popolazione generale italiana

Metabolita	Adulti (n. = 124) [22]		Bambini (n. = 195) [59]	
	% pos	MG (DSG)	% pos	MG (DSG)
DMP	87	62,8 (2,5)	96	125,4 (2,4)
DMTP	99	70,7 (2,7)	94	118,1 (2,4)
DMDTP	48	21,1 (2,3)	34	46,7 (2,3)
DEP	82	27,4 (2,5)	75	46,5 (2,0)
DETP	73	22,8 (2,2)	48	36,9 (2,2)
DEDTP	7	13,7 (1,9)	12	33,0 (2,0)

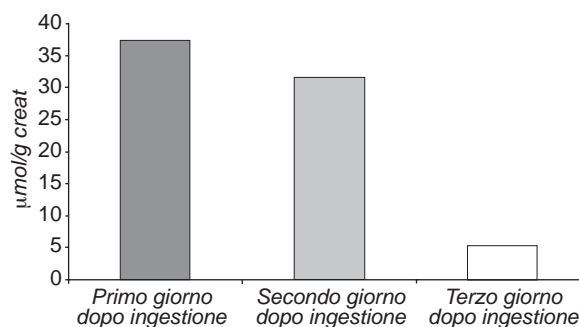
% pos: percentuale di positività; MG: media geometrica; DSG: deviazione standard geometrica; DMP: dimetilfosfato; DMTP: dimetiltiofosfato; DMDTP: dimetilditiofosfato; DEP: dietilfosfato; DETP: dietiltiofosfato; DEDTP: dietilditiofosfato.

La Tab. 3 mostra l'escrezione urinaria di alchilfosfati in diverse situazioni lavorative, per le quali non erano state evidenziate diminuzioni significative dell'attività colinesterasica. Durante la manipolazione di piante ornamentali precedentemente trattate con omethoate e fenitrothion in serra, le mansioni di posizionamento, spaziatura, scelta e bagnatura [60] non inducono una escrezione di metaboliti significativamente superiore rispetto alla popolazione generale. Al contrario durante la spillatura (fissaggio dei tralci di *Scindapsus* al tutore muschiato) [61] si evidenziano escrezioni significativamente maggiori, con livelli circa tripli rispetto alla popolazione generale.

In addetti che operano in una azienda di formulazione di dimethoate [5], l'escrezione risulta notevolmente superiore: durante la mansione di formulazione si raggiungono livelli medi (media geometrica) circa 20 volte superiori della popolazione generale, mentre durante il confezionamento (imbottigliamento e inscatolamento) e la manutenzione degli impianti le concentrazioni urinarie si mostrano rispettivamente 6 e 8 volte superiori della popolazione generale.

Nella Fig. 1 è possibile osservare l'escrezione urinaria di alchilfosfati in un soggetto che aveva ingerito volontariamente parathion e parathion-methyl (dati non pubblicati). I livelli di escrezione si mostrano 200, 150 e 25 volte superiori della popolazione generale rispettivamente il primo, il secondo e il terzo giorno dopo l'assunzione. Il soggetto mostrava sintomi di avvelenamento da OP e l'attività colinesterasica risultava fortemente ridotta rispetto ai livelli normali.

La Fig. 2 mette in evidenza l'importanza del monitoraggio biologico per la valutazione della reale efficacia sul campo dei dispositivi di protezione individuale (DPI). I livelli di alchilfosfati urinari riportati nel grafico sono relativi ad operazioni di diradamento dei frutticini sulla coltura del pesco precedentemente trattata con azinphos-methyl e chlorpyrifos-methyl [21]. I vari gruppi di soggetti monitorati differivano per il tipo di dispositivi impiegati per la protezione cutanea e/o respiratoria. In ogni caso i livelli di escrezione dei metaboliti risultavano significativamente superiori al gruppo di controllo, ma i soggetti che impiegavano guanti di cotone e mascherina semifacciale mostravano i livelli di escrezione più bassi probabilmente perché gli altri tipi di guanti risultavano meno confortevoli all'uso e gli operatori tendevano a sfilarli frequentemente dalle mani.

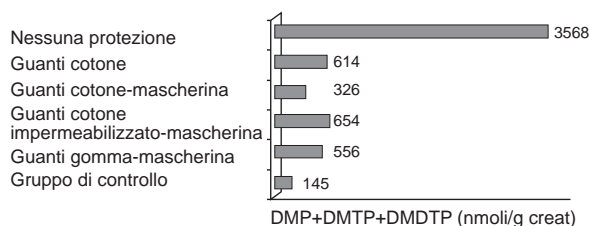


**Fig. 1.** - Escrezione urinaria di alchilfosfati (DMP+DMTP+DMDTP+DEP+DETP+DEDTP) dopo ingestione volontaria di parathion e parathion-methyl.

**Tabella 3** - Escrezione urinaria di alchilfosfati (nmoli/g creat) durante varie attività lavorative

Operazioni manuali su piante ornamentali trattate con omethoate e/o fenitrothion in serra		
Rif. Bibl.	Mansione	DMP+DMTP MG (DSG)
[60]	Posizionamento e spaziatura	102,5 (1,4)
	Scelta	144,5 (1,8)
	Bagnatura	217,4 (1,3)
[61]	Spillatura (fissaggio tralci al tutore muschiato)	354,4 (1,6)
	Popolazione generale	126,9 (2,7)
Formulazione di dimethoate		
		DMP+DMTP+DMDTP MG (DSG)
[5]	Formulazione	2545,4 (3,9)
	Imbottigliamento e inscatolamento	871,7 (3,3)
	Manutenzione impianti	1022,4 (3,0)
	Popolazione generale	134,7 (2,8)

DMP: dimetilfosfato; DMTP: dimetiltiofosfato; MG: media geometrica; DSG: deviazione standard geometrica; DMTP: dimetilfosforotioato; DMDTP: dimetilditiofosfato.



**Fig. 2.** - Alchilfosfati urinari (media geometrica) durante il diradamento dei frutticini sulla cultura del pesco precedentemente trattata con chlorpyrifos-methyl e anzinphos-methyl [21].

Gli studi sopra riportati dimostrano che gli alchilfosfati sono metaboliti degli esteri fosforici che si possono rilevare nell'urina senza che si abbiano riduzioni significative dell'attività colinesterasica. Essi rappresentano quindi indicatori di esposizione molto sensibili, ma le conoscenze delle relazioni tra le dosi di esposizione e i livelli urinari di tali metaboliti sono scarse nell'uomo pertanto essi non possono essere considerati, al momento, indicatori di dose. Visto che tali composti sono presenti nell'urina della popolazione non professionalmente esposta, i risultati degli studi di monitoraggio biologico dell'esposizione lavorativa dovrebbero essere confrontati con quelli della popolazione generale o con adeguati gruppi di controllo.

Gli alchilfosfati sono da considerare metaboliti specifici, che possono derivare dalla scissione idrolitica di numerosi insetticidi organofosforici [58]. I livelli determinati in urina si limitano a fornire indicazioni sull'esposizione a un composto dietilato o dimetilato. L'analisi dell'urina per alcuni metaboliti specifici può invece essere utilizzata per identificare il tipo di estere fosforico. Ad es. per chlorpyrifos e chlorpyrifos-methyl, insetticidi organofosforici a largo spettro d'azione che agiscono come inibitori attivi delle colinesterasi [62], il metabolita fenolico specifico è rappresentato dal 3,5,6-tricloro-2-piridinolo (TCP).

In uno studio effettuato su 42 soggetti adulti della popolazione generale italiana [51] il TCP è stato rilevato in concentrazione superiore al limite analitico di rivelabilità nell'88% dei campioni analizzati con valori compresi nell'intervallo 3,5-68,0 nmoli/g creat; i valori medi [MG(DSG)] risultavano 14,2(1,9). Dall'analisi statistica dei dati risulta poco probabile che l'escrezione urinaria del metabolita sia ascrivibile ad esposizioni diverse da quelle derivanti dalla ingestione di cibi e bevande contenenti residui di chlorpyrifos e chlorpyrifos-methyl dal momento che erano esclusi dalla casistica tutti i soggetti che, anche per motivi extra-lavorativi, erano venuti in contatto diretto con antiparassitari negli ultimi 12 mesi. L'analisi statistica sembra invece confermare che il consumo di vino e l'assunzione di una

dieta prevalentemente vegetale risultano variabili significative nel determinare incrementi dell'escrezione urinaria di TCP.

In un ulteriore lavoro [23] l'escrezione urinaria di TCP è stata determinata in soggetti esposti a chlorpyrifos-methyl nella coltura della vite. I risultati dimostrano che durante la sfogliatura i livelli medi di escrezione [MG(DSG)] risultavano 44,0(3,3) nmoli/g creat e quindi di circa 3 volte superiori rispetto ad un gruppo di controllo, opportunamente selezionato, costituito da soggetti non professionalmente esposti a esteri fosforici nel quale l'escrezione di TCP si attestava su valori di 13,1(1,9) nmoli/g creat. Durante operazioni di preparazione della miscela e di distribuzione in coltura invece i livelli di escrezione dello stesso metabolita risultavano 234,0(4,5) nmoli/g creat e quindi circa 18 volte superiori rispetto al gruppo di controllo. L'elevata variabilità dei dati, osservata in particolar modo per quest'ultimo gruppo di addetti, è probabilmente ascrivibile al diverso quantitativo di insetticida manipolato giornalmente e alla differente tipologia di indumenti protettivi indossati durante il lavoro. I picchi di eliminazione del metabolita si evidenziavano prevalentemente entro le 16 h dalla fine dell'esposizione.

Dai risultati degli studi riportati si può concludere che il TCP urinario è un indicatore molto sensibile per valutare l'esposizione a chlorpyrifos e chlorpyrifos-methyl a livelli inferiori rispetto a quelli che causano una inibizione significativa dell'attività colinesterasica. Il composto mostra una escrezione prolungata pertanto non è possibile utilizzarlo per la stima della dose assorbita se il prelievo dell'urina non viene effettuato per almeno 24 ore dopo una singola esposizione. Visto che il TCP è presente nell'urina della popolazione non professionalmente esposta, i risultati degli studi di monitoraggio biologico dell'esposizione lavorativa dovrebbero essere confrontati con quelli della popolazione generale o con adeguati gruppi di controllo.

#### Monitoraggio biologico dell'esposizione ad insetticidi piretroidi

Gli insetticidi piretroidi possono essere assorbiti per via inalatoria, cutanea e digestiva. Una stima dell'assorbimento cutaneo sull'uomo *in vivo* suggerisce che generalmente meno del 5% della dose applicata viene assorbita [47].

La principale via di metabolizzazione per permethrin, cipermethrin, deltamethrin e fenvalerate prevede l'idrolisi del legame estereo per formare un metabolita acido e l'alcol 3-fenossi benzilico. Il metabolita acido è variabile a seconda del pesticida di partenza: permethrin e cipermethrin danno luogo alla formazione degli isomeri cis e trans dell'acido 3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetil ciclopropanoico (DCVA), deltamethrin forma gli isomeri

cis e trans dell'acido 3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropanoico (DBVA), mentre per fenvalerate si ha la formazione dell'acido 2-(4-clorofenil)-3-metil-1-butanoico (CPBA) [63-67]. Le forme coniugate di questi metaboliti con acido glucuronico, solforico e amminoacidi possono essere riscontrate nell'urina di mammiferi (metaboliti ciclopropanici). La parte alcolica della molecola, acido 3-fenossibenzenzoico, che risulta comune ai citati pesticidi, subisce ulteriori processi metabolici per formare acido 3-fenossibenzoico (3-PBA). In aggiunta l'ossidazione nella posizione 4' del gruppo fenossil può dar luogo alla formazione di acido 4-idrossi-3-fenossibenzoico (4OH-3PBA). La coniugazione del 3-PBA e del 4OH-3PBA (metaboliti fenossibenzoici) mostra una notevole variabilità nelle specie animali studiate. Generalmente soltanto una piccola percentuale della dose assorbita è eliminata come composto tal quale pertanto il dosaggio dei composti tal quali in urina può essere utilizzato soltanto per forti esposizioni [7, 27, 55].

Sia i composti tal quali che i metaboliti ciclopropanici (DCVA, DBVA), e fenossicarbossilici (3-PBA, 4OH-3PBA) sono stati rilevati in urina di soggetti esposti a insetticidi piretroidi [7, 25, 27, 30, 42, 55]. Un solo lavoro è stato riportato per il dosaggio del CPBA [66].

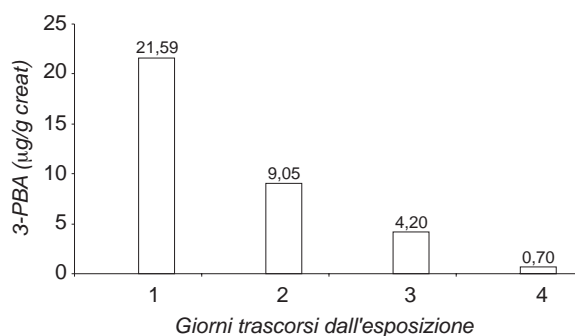
Il 3-PBA è stato rilevato nell'urina di un agricoltore esposto a fenvalerate durante la preparazione della miscela. I livelli di escrezione risultavano decrescenti ma sempre rilevabili, fino a quattro giorni dal termine dell'esposizione [42]. In Fig. 3 si riporta il grafico dei dati ottenuti. Il soggetto mostrava i segni tipici di intossicazione da piretroidi sintetici reversibili in circa 24 h.

In generale per gli insetticidi piretroidi sia i metaboliti che i composti tal quali sono buoni indicatori di esposizione ma vista la prolungata escrezione, soprattutto in caso di esposizione cutanea, la raccolta dell'urina dovrebbe proseguire per 24 h dopo l'esposizione.

#### Monitoraggio biologico dell'esposizione ad etilenbisditiocarbammati (anticrittogamici)

Gli etilenbisditiocarbammati (EBDC) (mancozeb, zineb, maneb, nabam, ecc.) presentano una notevole importanza tossicologica soprattutto a causa della presenza di etilentiourea (ETU) come contaminante delle formulazioni, come metabolita ambientale e come uno dei prodotti del metabolismo animale ed umano degli EBDC [68, 69].

L'ETU, utilizzata anche tal quale come acceleratore nel processo di vulcanizzazione della gomma, mostra effetti a lungo termine caratterizzati principalmente da una attività antitiroidea [35]. Il NIOSH considera l'ETU un cancerogeno per l'uomo, l'OSHA la considera un sospetto cancerogeno mentre la International Agency for Research on Cancer (IARC) la classifica nel gruppo 2B



**Fig. 3.** - Escrezione urinaria di acido 3-fenossibenzoico in un operatore che effettuava la preparazione della miscela di esfenvalerate per il trattamento (modificata da [42]).

per la sua sufficiente evidenza di cancerogenicità negli animali e per la inadeguata evidenza di cancerogenicità in studi effettuati sull'uomo [70, 71].

In generale gli EBDC possono essere scarsamente assorbiti per via cutanea e digestiva [35]. La loro biotrasformazione sembra progredire, dopo l'eliminazione del metallo e la trasformazione in etilentiouram disolfuro e, successivamente monosolfuro, verso la formazione di etilen-bis-isotiocianato e/o ETU. In diverse fasi di tale degradazione metabolica è possibile la formazione di solfuro di carbonio [72]. L'ETU rappresenta il principale metabolita urinario e fecale evidenziabile in animali da esperimento dopo la somministrazione per via orale di EBDC [53].

Diversi autori hanno determinato l'ETU urinaria in soggetti esposti a mancozeb e zineb [5, 29, 73, 74] e in gruppi di popolazione generale [75, 76].

Nella Tab. 4 è riportata l'escrezione urinaria di ETU nella popolazione generale italiana [75] e durante la formulazione di mancozeb [5].

Lo studio sulla popolazione generale [75], condotto nell'ambito delle attività scientifiche della Società Italiana Valori di Riferimento (SIVR), ha dimostrato che, per il gruppo dei 167 soggetti della popolazione residente in zona urbana (campionamenti effettuati nelle città di Pavia, Torino, Trento e Verona), il 24% dei campioni analizzati presentava concentrazioni urinarie di tale composto superiori al limite di rivelabilità dell'analisi (% pos). L'abitudine al fumo e il consumo di vino sono risultati in grado di condizionare significativamente la percentuale di campioni biologici con concentrazione di ETU "dosabile"; quest'ultima risulta più elevata nei soggetti fumatori e bevitori e progressivamente ridotta nei consumatori di vino non fumatori, nei fumatori non bevitori e nei soggetti non fumatori né bevitori. Nella casistica di popolazione rurale (97 soggetti residenti in una cittadina collinare situata nei pressi di Pavia per i quali al momento della raccolta dei campioni di urina, era in corso sul territorio circostante una irrorazione di

**Tabella 4.** - Escrezione urinaria di etilentiourea ( $\mu\text{g/g creat}$ ) durante la formulazione di mancozeb [5] e nella popolazione generale italiana [75]

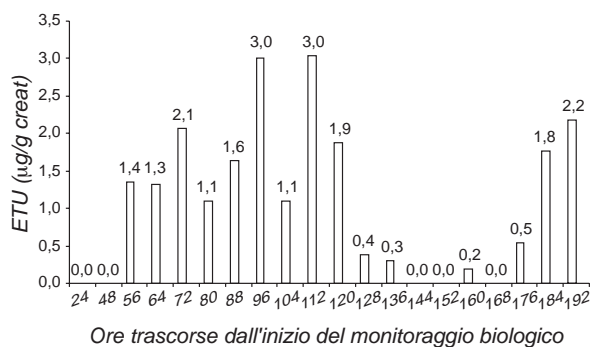
Popolazione generale				Formulazione di mancozeb	
n.	% pos	MG (DSG)	Range	Mansione	MG (DSG)
167 <sup>(a)</sup>	24	2,1 (2,0)	0,8-8,3	Formulazione (impianto 1) <sup>(c)</sup>	65,3 (4,8)
97 <sup>(b)</sup>	37	5,3 (2,6)	0,9-61,4	Formulazione (impianto 2) <sup>(d)</sup>	36,6 (1,9)
				Inscatolamento	10,3 (4,2)
				Manutenzione impianti	9,5 (6,1)
				Popolazione generale	2,1 (2,0)

% pos: percentuale di positività; MG: media geometrica; DSG: deviazione standard geometrica; <sup>(a)</sup> popolazione urbana; <sup>(b)</sup> popolazione rurale (il mancozeb era distribuito sulle colture tramite elicottero); <sup>(c)</sup> Il preparato commerciale conteneva l'80% di mancozeb; <sup>(d)</sup> il preparato commerciale conteneva il 45% di mancozeb.

EBDC tramite elicottero), la % pos (37%) è significativamente maggiore che nelle altre città e l'intervallo dei valori positivi è molto più ampio raggiungendo la concentrazione massima di  $61,4 \mu\text{g/g creat}$ , valore circa 7 volte maggiore rispetto a quanto riscontrato nella casistica urbana.

Un successivo studio [76], sempre condotto nell'ambito delle attività scientifiche della SIVR, aveva come scopo principale quello di monitorare, nell'arco di otto giorni, l'escrezione urinaria di ETU in un gruppo di cinque volontari maschi non fumatori che ingerivano alimenti e bevande nei quali era stato dosato il contenuto di ETU. I cinque volontari consumavano insieme, nel corso degli otto giorni di esperimento, i tre pasti giornalieri ingerendo la stessa quantità degli stessi alimenti. Nei primi due giorni è stata somministrata una dieta priva di vino e di alimenti vegetali, nei tre giorni successivi i soggetti hanno ingerito vino e alimenti comprendenti frutta e verdura. Nei giorni 6 e 7 ai volontari è stata somministrata nuovamente una dieta priva di vino e di alimenti vegetali. Nell'ultimo giorno i soggetti hanno ingerito di nuovo vegetali e vino. La Fig. 4 mostra l'andamento dell'escrezione in funzione delle ore trascorse dall'inizio del monitoraggio biologico. Dalla figura sembra di poter dedurre che l'eliminazione di ETU risulta praticamente completa dopo 24 h dall'assunzione di eventuali residui di ETU e di EBDC tramite gli alimenti e le bevande. Infatti già nell'urina escreta il sesto giorno dell'esperimento (primo giorno in cui non venivano somministrati vegetali e vino dopo tre giorni di somministrazione) la concentrazione del metabolita risultava molto prossima al limite analitico di rivelabilità per tutti i campioni analizzati. L'andamento dell'escrezione sembra anche evidenziare che nei giorni in cui non vengono somministrati vegetali e vino l'introduzione alimentare di ETU e di EBDC risulta essere estremamente ridotta.

La Tab. 4 mostra anche i valori di ETU urinaria riscontrati in campioni prelevati a fine turno e al termine della settimana lavorativa in un'azienda di formulazione

**Fig. 4.** - Escrezione urinaria di etilentiourea (media geometrica) in cinque volontari sottoposti a dieta controllata (modificata da [76]).

industriale di mancozeb. L'escrezione urinaria media del metabolita risulta 15-30 e 5 volte superiore rispetto alla popolazione generale, rispettivamente durante la formulazione vera e propria e durante le mansioni di inscatolamento e manutenzione impianti [5].

La Tab. 5 mette in evidenza i livelli urinari di ETU durante trattamenti della vite con mancozeb effettuati con diversi dispositivi di protezione individuale [77]. L'uso della sola tuta di cotone comporta livelli di escrezione circa 80 volte superiori dei gruppi di controllo. L'impiego di guanti e di maschera o casco con filtro combinato per polveri e per vapori, riduce l'escrezione di circa 40 volte fino a livelli medi circa doppi dei soggetti di controllo. La Fig. 5 conferma quanto già detto a commento della Tab. 5: l'impiego dei guanti durante trattamenti della vite effettuati con mancozeb consente di non avere incrementi sostanziali di ETU urinaria dal primo al quarto giorno di trattamento e nelle 24 ore successive. Il mancato impiego di tale indumento protettivo provoca un trend di escrezione crescente probabilmente a causa del fatto che l'assorbimento tramite la via cutanea si mostra lento e protratto nel tempo [78].

**Tabella 5.** - Escrezione urinaria di etilentiourea ( $\mu\text{g/l}$ ) durante trattamenti della vite con mancozeb [77]

Dispositivi indossati dagli operatori	MG (DSG)
Tuta di cotone	232,4 (2,0)
Tuta di cotone, guanti, maschera semifacciale o casco con filtro per polveri e vapori	6,1 (2,3)
Tuta di cotone, guanti di gomma, stivali, casco con filtro per polveri e vapori	5,8 (1,8)
<b>Gruppo di controllo</b>	
Soggetti residenti nell'area di trattamento (primavera-estate)	3,3 (1,6)
Soggetti residenti nell'area di trattamento (autunno)	2,9 (1,3)

MG: media geometrica; DSG: deviazione standard geometrica.

Si può concludere che l'etilentiourea è un indicatore molto sensibile per valutare l'esposizione a etilendisiditiocarbammati ma la raccolta dell'urina dovrebbe avvenire per almeno 24 h dall'inizio dell'esposizione. Visto che l'ETU è presente nell'urina della popolazione non professionalmente esposta a EBDC, i risultati degli studi di monitoraggio biologico dell'esposizione lavorativa dovrebbero essere confrontati con quelli della popolazione generale o con adeguati gruppi di controllo.

#### Monitoraggio biologico dell'esposizione ad erbicidi fenossiacetici

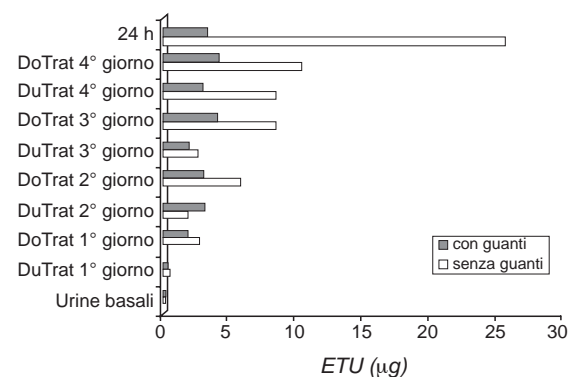
L'acido 2,4-diclorofenossiacetico (2,4-D) e l'acido 2-metil-4-clorofenossiacetico (MCPA) possono essere assorbiti per via inalatoria, cutanea e digestiva. Essi si distribuiscono nell'organismo ma non ci sono evidenze di accumulo in organi e tessuti [79, 80]. Non vengono apprezzabilmente metabolizzati e sono escreti nelle urine (solo in bassissima percentuale nelle feci) per lo più in forma libera. Dopo somministrazione in singola dose per via orale a volontari, circa l'80% di 2,4-D viene escreto immodificato nell'urina e il rimanente in forma coniugata acido-labile [79]. Altri dati sperimentali [81] dimostrano che, dopo somministrazione orale, l'uomo inizia ad eliminare 2,4-D nelle urine già dopo due ore. La massima escrezione urinaria si ha nel primo e nel secondo giorno dopo l'ingestione. Dopo applicazione cutanea [82, 83] la massima escrezione urinaria avviene il secondo o il terzo giorno dopo l'applicazione. Oltre il 90% della dose assorbita di 2,4-D è escreta per via urinaria entro 5 giorni e, con ogni probabilità, la velocità di eliminazione dipende dal pH urinario [15]. Una lenta escrezione del composto con l'urina, con emivita variabile tra 12 e 22 h, è stata evidenziata anche durante la distribuzione [14, 84].

Studi analoghi effettuati per l'MCPA [2, 3, 85], mostravano una escrezione più rapida di quanto rilevato per il 2,4-D: il 40% della dose era escreto nell'urina nelle prime 24 h e l'80% nei primi 5 giorni dopo una singola dose orale. In seguito ad applicazione cutanea di

MCPA si evidenzia un lento incremento della concentrazione plasmatica con il valore massimo dopo 24 h. Nell'urina si osserva una lenta escrezione che continua per più di 5 giorni, con il valore massimo 24-48 h dopo l'applicazione con emivita biologica compresa tra 12 e 48-72 h [2, 3].

Il 2,4-D e l'MCPA sono stati dosati nell'urina di 100 bambini di età compresa tra 6 e 7 anni e residenti nella provincia di Siena [41]. Il 2,4-D è risultato superiore al limite analitico di rivelabilità nel 20% dei campioni analizzati con livelli massimi osservati di  $2,5 \mu\text{g/l}$ , mentre l'MCPA non è risultato rivelabile in nessuno dei campioni analizzati. La bassa percentuale di positività riscontrata è probabilmente da collegare alla ridottissima presenza di residui di questi principi attivi nelle derrate alimentari.

La Tab. 6 mostra i livelli di escrezione urinaria di questi due composti durante trattamenti eseguiti sulla coltura del grano. Per il 2,4-D, la media geometrica dei valori massimi osservati negli anni '80 risulta circa doppia di quella degli anni '90, mentre per l'MCPA i dati hanno subito un decremento di circa 5 volte [14]. Visto che non possono essere addotte motivazioni diverse



**Fig. 5.** - Escrezione urinaria di etilentiourea durante trattamenti della vite con mancozeb (gli operatori hanno eseguito trattamenti per 4 giorni consecutivi [78]). DuTrat: urina escreta durante il trattamento; DoTrat: urina escreta dopo il trattamento (dalla fine del turno fino all'inizio del turno successivo).

(quantitativo di principi attivi distribuiti in coltura nel turno di lavoro), tale miglioramento è probabilmente ascrivibile all'uso o al corretto uso dei dispositivi di protezione individuale o al miglioramento delle apparecchiature di distribuzione.

2,4-D ed MCPA urinari sono indicatori di esposizione molto sensibili per questi due composti. Se la raccolta dell'urina prosegue per 24 ore dalla fine dell'esposizione o si utilizza il campione estemporaneo prelevato il mattino dopo l'esposizione, i due composti possono rappresentare indicatori di dose.

### Interpretazione dei dati

Nell'intento di valutare il rischio professionale da antiparassitari, sono stati studiati molti composti dando particolare enfasi agli effetti tossici acuti. Per la maggior parte dei principi attivi non sono però note le relazioni dose-effetto e non sono disponibili indici biologici di esposizione. Questa mancanza di conoscenze rappresenta il limite maggiore per l'applicazione con scopi routinari del monitoraggio biologico. In Tab. 7 si riportano i valori limite biologici raccomandati a livello internazionale per il monitoraggio biologico di fitofarmaci.

La misura dell'attività colinesterasica ematica è risultata utile per gli insetticidi organofosforici e per i carbammati [28, 34, 86] e dalle relazioni dose/risposta osservate sono derivati valori limite biologici stabiliti dalla ACGIH [38], dal WHO [11] e dalla DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft) [87]. Un valore limite biologico è stato determinato inoltre per dinitro o-cresolo (DNOC) [11], lindano [11, 87], parathion [38, 87] e pentaclorofenolo [38, 87]. Per tutti gli altri composti, il dosaggio degli indicatori biologici disponibili fornisce scarse informazioni sul rischio potenziale per la salute ma può essere utilizzato per la valutazione dell'esposizione o delle dosi assorbite.

In una situazione di questo tipo, specialmente nel caso di bassi livelli di esposizione, l'interpretazione dei dati viene spesso effettuata per confronto con i valori di riferimento biologici ottenuti sulla popolazione generale. Questi ultimi sono espressione del contributo che le abitudini di vita ed il contatto con i vari comparti ambientali apportano agli indicatori biologici e rappresentano il valore a cui tendere, per contenere il rischio aggiuntivo che l'attività professionale comporta rispetto alla popolazione generale. In studi mirati a valutare l'efficacia dei dispositivi di protezione individuale il confronto con i valori di riferimento permette, ad es., di

**Tabella 6.** - Escrezione urinaria di erbicidi fenossiacetici (2,4-D e MCPA) durante trattamenti sulla coltura del grano. Confronto tra i dati di due decadi: 1980 e 1990 [14]

Erbicidi fenossiacetici		n.	MG (DSG)(*)	Range(*)
<b>2,4-D (µg/l)</b>	Anni '80	73	123 (2,1)	35-400
	Anni '90	51	65 (1,8)	36-217
<b>MCPA (µg/l)</b>	Anni '80	102	158 (2,4)	48-800
	Anni '90	63	34 (1,9)	15-113

MG: media geometrica; DSG: deviazione standard geometrica; (\*) valori massimi osservati in ogni soggetto; 2,4-D: acido 2,4-diclorofenossiacetico; MCPA: acido 2-metil-4 clorofenossiacetico.

**Tabella 7.** - Valori limite raccomandati per il monitoraggio biologico di fitofarmaci

Fitofarmaco	Indicatore biologico	BEI (a)	BAT (b)	HBBL (c)
Inibitori delle colinesterasi DNOC (dinitro o-cresolo) Lindane (HCH)	AChE	70% (*)	70% (**)	70% (**)
	DNOC in sangue	-	-	20 mg/l
	HCH in sangue	-	0,02 mg/l	0,02 mg/l
Parathion	HCH in plasma/siero	-	0,025 mg/l	-
	p-nitrofenolo in urina	0,5 mg/g creat	0,5 mg/l	-
Pentachlorophenol (PCP)	AChE	70% (*)	70% (**)	-
	PCP totale in urina	2 mg/g creat	-	-
	PCP libero nel plasma	5 mg/l	-	-
Arsenico elementare e composti inorganici solubili	Arsenico inorganico più metaboliti metilati in urina	35 µg/l (come As)	-	-

(a)BEI: biological exposure index [38]; (b)BAT: biological tolerance value [87]; (c)HBBL: health-based biological limit [11]; (\*) del valore individuale basale; (\*\*) del valore di riferimento.

valutare se esista ancora un assorbimento dello xenobiotico nell'organismo [20, 21]. Per antiparassitari dei quali è conosciuta la tossicità a lungo termine (eventuali azioni mutagene, teratogene, cancerogene), o nel caso di fitofarmaci per i quali non sono ben noti gli effetti cronici ma che si ritengono potenzialmente molto tossici, è necessario ottenere il massimo contenimento dell'esposizione professionale. In questo caso sarebbe auspicabile che la concentrazione urinaria dei metaboliti o dei principi attivi non risultasse statisticamente superiore ai rispettivi valori di riferimento.

### Conclusioni

Per il monitoraggio biologico si dispone in genere di indicatori biologici di esposizione e raramente di effetto (attività colinesterasica). L'uso di tali indicatori (sostanza tal quale e/o specifici metaboliti), pur non particolarmente numerosi, può rappresentare, in molte situazioni espositive, l'unico strumento di valutazione. Non è prevedibile a breve l'utilizzo per scopi routinari di indicatori di dose biologicamente efficace (ad es. addotti con emoglobina). Permane una limitata disponibilità di valori limite biologici e di conoscenze sulla tossicocinetica dei vari fitofarmaci in funzione della dose e delle vie di assorbimento.

Dal punto di vista analitico è particolarmente avvertita la carenza di materiali di controllo per la verifica dell'accuratezza e di controlli interlaboratoriali. In queste condizioni può risultare difficoltoso il confronto dei dati ottenuti da diversi autori.

E' da rilevare come nel nostro paese un ridotto numero di laboratori sia in grado di effettuare routinariamente questo tipo di dosaggi e ciò non può essere imputato all'esigenza di disporre di tecniche strumentali sofisticate in quanto possono essere utilizzate apparecchiature facilmente disponibili quali la gas cromatografia, la cromatografia liquida ad alte prestazioni, ecc.

La determinazione di valori di riferimento per i vari indicatori biologici costituisce un supporto interpretativo utile per rendere più agevole la stima del rischio residuo anche in caso di impiego di sistemi di protezione individuale.

In conclusione, si ritiene che una fase di sviluppo successiva possa essere rappresentata dalla definizione di linee-guida per il monitoraggio biologico dell'esposizione a fitofarmaci, in modo da stabilire procedure di intervento codificate per tutti gli operatori.

Lavoro presentato su invito.  
Accettato il 21 marzo 2001.

### BIBLIOGRAFIA

- Fenske RA, Elkner KP. Multi-route exposure assessment and biological monitoring of urban pesticide applicators during structural control treatments with chlorpyrifos. *Toxicol Ind Health* 1990 May-Jul;6(3-4):349-71.
- Kolmodin-Hedman B, Höglund S, Åkerblom M. Studies on phenoxy acid herbicides. I. Field study. Occupational exposure to phenoxy acid herbicides (MCPA, dichlorprop, mecoprop and 2,4-D) in agriculture. *Arch Toxicol* 1983 Dec;54(4):257-65.
- Kolmodin-Hedman B, Höglund S, Swensson Å, Åkerblom M. Studies on phenoxy acid herbicides. II. Field study. Oral and dermal uptake and elimination in urine of MCPA in humans. *Arch Toxicol* 1983 Dec;54(4):267-73.
- Davis JE. Minimizing occupational exposure to pesticides: personnel monitoring. *Residue Rev* 1980;75:33-50.
- Aprea C, Sciarra G, Sartorelli P, Mancini R, Di Luca V. Environmental and biological monitoring of exposure to mancozeb, ethylenethiourea and dimethoate during industrial formulation. *J Toxicol Environ Health A* 1998 Feb 20;53(4):263-81.
- Woollen BH. Biological monitoring for pesticide absorption. *Ann Occup Hyg* 1993 Oct;37(5):525-40.
- Zhang Z, Sun J, Chen S, Wu Y, He F. Level of exposure and biological monitoring of pyrethroids in sprayman. *Br J Ind Med* 1991;48(2):82-6.
- He F. Biological monitoring of occupational pesticides exposure. *Int Arch Occup Environ Health* 1993;65(1 Suppl):S69-76.
- Aprea C, Sciarra G, Lunghini L, Bozzi N. *Environmental and biological monitoring of occupational exposure to xenobiotics*. In: Minoia C, Perbellini L (Ed.). Vol. 1 Pesticides. Como, Italy: New Press; 1999.
- World Health Organization. *Aldrin and dieldrin*. Geneva: WHO;1989. (Environmental Health Criteria, 91).
- World Health Organization. Recommended health-based limits in occupational exposure to pesticides. Geneva:WHO. *Techn Rep Ser* 1982; 677.
- Coye MJ, Lowe JA, Maddy KJ. Biological monitoring of agricultural workers exposed to pesticides: II. Monitoring of intact pesticides and their metabolites. *J Occup Med* 1986 Aug; 28(8):628-36.
- World Health Organization. *Paraquat and diquat*. Geneva, WHO; 1984. (Environmental Health Criteria, 39).
- Aprea C, Sartorelli P, Sciarra G, Palmi S, Giambattistelli S. Elements for the definition of the limit values of 2,4-D and MCPA. *Prevenzione Oggi-ISPESL* 1995;4: 81-111.
- Lavy TL, Mattice JD. Progress in pesticide exposure studies and future concerns. *Toxicol Lett* 1986 Oct;33(1-3):61-71.
- World Health Organization. *2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)*. Geneva: WHO; 1984. (Environmental Health Criteria, 29).
- Moriya F, Hashimoto Y. Comparative studies on tissue distribution of organophosphorus, carbamate and organochlorine pesticides in decedents intoxicated with these chemicals. *J Forensic Sci* 1999 Nov;44(6):1131-5.
- Driskell WJ, Groce DF, Hill RH Jr. Methomyl in the blood of a pilot who crashed during aerial spraying. *J Anal Toxicol* 1991 Nov-Dec;15(6):339-40.
- Miyazaki T, Yashiki M, Kojima T, Chikasue F, Occhiai A, Hidani Y. Fatal and non-fatal methomyl intoxication in an attempted double suicide. *Forensic Sci Int* 1989 Aug;42(3):263-70.

20. Aprea C, Sciarra G, Sartorelli P, Ceccarelli F, Maiorano M, Savelli G. Evaluation of omethoate and fenitrothion absorption in greenhouse workers using protective equipment in confined areas. *Med Lav* 1994 May-Jun;85(3):242-8.
21. Aprea C, Sciarra G, Sartorelli P, Desideri E, Amati R, Sartorelli E. Biological monitoring of exposure to organophosphorus insecticides by urinary alkylphosphates. Protective measures during manual operations with treated plants. *Int Arch Occup Environ Health* 1994;66(5):333-8.
22. Aprea C, Sciarra G, Orsi D, Boccalon P, Sartorelli P, Sartorelli E. Urinary excretion of alkylphosphates in the general population. *Sci Total Environ* 1996 Jan 5;177(1-3):37-41.
23. Aprea C, Sciarra G, Sartorelli P, Sartorelli E, Strambi F, Farina GA *et al.* Biological monitoring of exposure to chlorpyrifos-methyl by assay of urinary alkylphosphates and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol. *J Toxicol Environ Health A* 1997;50(6):581-94.
24. Brouwer R, Van Maarleveld K, Ravenssberg L, Meuling W, De Kort W, Van Hemmen JJ. Skin contamination, airborne concentrations, and urinary excretion of propoxur during harvesting of flowers in greenhouses. *Am J Ind Med* 1993 Nov;24(5):593-603.
25. Chester G, Hatfield LD, Hart BT, Leppert C, Swaine H, Tummon OJ. Worker exposure to, and absorption of, cypermethrin during aerial application of an "ultra low volume" formulation to cotton. *Arch Environ Contam Toxicol* 1987 Jan;16(1):69-78.
26. De Cock J, Heederik D, Hoek F, Boleij J, Kromhout H. Urinary excretion of tetrahydroptalimide in fruit growers with dermal exposure to captan. *Am J Ind Med* 1995 Aug;28(2):245-56.
27. He F, Sun J, Han K, Wu Y, Yao P, Liu L *et al.* Effects of pyrethroid insecticides on subjects engaged in packaging pyrethroids. *Br J Ind Med* 1988 Aug;45(8):548-51.
28. Huang J, Ding M, Zhang S, Zhou A, Zhang J, Zhang JM *et al.* Diagnostic criteria of acute carbamate insecticides poisoning. *Chi J Ind Med* 1989;2:1-4.
29. Kurttio P, Savolainen K. Ethylenethiourea in air and in urine as an indicator of exposure to ethylenebisdithiocarbamate fungicides. *Scand J Work Environ Health* 1990 Jun;16(3):203-7.
30. Llewellyn DM, Brazier A, Brown R, Cocker J, Evans ML, Hampton J *et al.* Occupational exposure to permethrin during its use as a public hygiene insecticide. *Ann Occup Hyg* 1996 Oct;40(5):499-509.
31. Verberk MM, Brouwer DH, Brouwer EJ, Bruyzeel DP, Emmen HH, Van Hemmen JJ *et al.* Health effects of pesticides in the flower-bulb culture in Holland. *Med Lav* 1990 Nov-Dec; 81(6):530-41.
32. Wang M, Zhou Z, Li H, Zhang R, Xie S, Hong Z *et al.* An occupational health survey on spraymen exposed to chlordimeform. *Chi J Ind Hyg Occup Dis* 1987;5:50-3.
33. Franklin CA, Muir NI, Moody RP. The use of biological monitoring in the estimation of exposure during the application of pesticide. *Toxicol Lett* 1986(1-3):127-36.
34. World Health Organization. *Organophosphorus insecticides: a general introduction*. WHO: Geneva; 1986. (Environmental Health Criteria, 63).
35. World Health Organization. *Environmental Health Criteria 78. Dithiocarbamate pesticides, ethylenethiourea, and propylene-thiourea: a general introduction*. Geneva: WHO; 1988.
36. Pastorelli R, Allevi R, Romagnano S, Meli G, Fanelli R, Airoldi L. Gas chromatography-mass spectrometry determination of ethylenethiourea hemoglobin adducts: a possible indicator of exposure to ethylene bis dithiocarbamate pesticides. *Arch Toxicol* 1995;69(5):306-11.
37. Lambert GR, Padgett WT, George MH, Kitchin KT, Nesnow S. Quantitative analysis of alachlor protein adducts by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem* 1999 Mar 15; 268(2): 289-96.
38. American Conference of Governmental Industrial Hygienist. *Threshold limit values and biological exposure indices*. Cincinnati, Ohio: ACGIH; 2000.
39. World Health Organization. *Field surveys of exposure to pesticides. Standard protocol: VBC/82.1*. Geneva: Division of Vector Biology and Control, WHO; 1982.
40. Aprea C, Sciarra G, Lunghini L. Analytical method for the determination of urinary alkylphosphates in subjects occupationally exposed to organophosphorus insecticides and in the general population. *J Anal Toxicol* 1996 Nov-Dec;20(7):559-63.
41. Aprea C, Sciarra G, Bozzi N. Analytical method for the determination of urinary 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid in occupationally exposed subjects and in the general population. *J Anal Toxicol* 1997 Jul-Aug; 21(4):262-7.
42. Aprea C, Stridori A, Sciarra G. Analytical method for the determination of urinary 3-phenoxybenzoic acid in subjects occupationally exposed to pyrethroid insecticides. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997 Aug 1;695(2):227-36.
43. Bartels MJ, Kastl PE. Analysis of 3,5,6-trichloropyridinol in human urine using negative-ion chemical ionization gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr* 1992 Mar 13; 575(1):69-74.
44. Hill RH Jr, Shealy DB, Head SL, Williams CC, Bailey SL, Gregg M *et al.* Determination of pesticide metabolites in human urine using an isotope dilution technique and tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 1995 Sep;19(5):323-9.
45. Leenheers LH, Breugel DG, Ravensberg JC, Meuling WJA, Jongen MJM. Determination of 2-isopropoxyphenol in urine using capillary gas chromatography and mass-selective detection. *J Chromatogr* 1992 Jul 24;578(2):189-94.
46. Maroni M, Catenacci G, Galli D, Cavallo D, Ravazzani G. Biological monitoring of human exposure to acephate. *Arch Environ Contam Toxicol* 1990 Sep-Oct;19(5):782-8.
47. Woollen BH, Marsch JR, Laird WJ, Lesser JE. The metabolism of cypermethrin in man: differences in urinary metabolite profiles following oral and dermal administration. *Xenobiotica* 1992 Aug;22(8):983-91.
48. Aprea C, Sciarra G, Lunghini L. Analysis of ethylenethiourea in urine by high-performance liquid chromatography with a spectrophotometric detector. *G Ig Ind* 1993 May;18(2):7-12.
49. Kurttio P, Vartiainen T, Savolainen K. A high pressure liquid chromatographic method for the determination of ethylenethiourea in urine and on filters. *Anal Chim Acta* 1988;212:297-301.
50. Yao PP, Li YW, Ding YZ, He F. Biological monitoring of deltamethrin in sprayers by HPLC method. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 1992;36(1):31-6.

51. Aprea C, Betta A, Catenacci G, Lotti A, Magnaghi S, Barisano A, *et al.* Reference values of urinary 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in the Italian population - Validation of analytical method and preliminary results (multicentric study). *J AOAC Int* 1999 Mar-Apr; 82(2):305-12.
52. Prince JL. Analysis of ethylenethiourea in urine by high-performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem* 1985;33:93-4.
53. Camoni I, Cicero AM, Di Muccio A, Dommarco R. Monitoring urinary excretion of ethylenethiourea (ETU) in rats treated with zineb. *Med Lav* 1984 May-Jun;75(3):207-14.
54. Nolan RJ, Rich DL, Frehour NL, Saunders JH. Chlorpyrifos: pharmacokinetics in human volunteers. *Toxicol Appl Pharmacol* 1984 Mar 30;73(1):8-15.
55. He F, Deng H, Ji X, Zhang Z, Sun J, Yao P. Changes of nerve excitability and urinary deltamethrin in sprayers. *Int Arch Occup Environ Health* 1991;62(8):587-90.
56. Ito G, Kilgore WW, Seabury JJ. Effect of freezer storage on alkyl phosphate metabolites in urine. *Bull Environ Contam Toxicol* 1979 Jul;22(4-5):530-5.
57. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961;7:88-95.
58. Maroni M. Organophosphorus pesticides. In: Alessio L, Berlin A, Boni M, Roi R. *Biological indicators for the assessment of human exposure to industrial chemicals*. Lussemburgo: Commission of the European Communities; 1986.
59. Aprea C, Strambi M, Novelli MT, Lunghini L, Bozzi N. Biological monitoring of exposure to organophosphorus pesticides in 195 Italian children. *Environ Health Perspect* 2000 Jun;108(6):521-5.
60. Aprea C, Sciarra G, Lunghini L, Centi L, Ceccarelli F. Evaluation of respiratory and cutaneous doses and urinary excretion of alkylphosphates by workers in greenhouses treated with omethoate, fenitrothion and tolclofos-methyl. *Am Ind Hyg Assoc J*. In press 2001.
61. Aprea C, Sciarra G, Sartorelli P, Ceccarelli F, Centi L. Multi-route exposure assessment and urinary metabolites excretion of fenitrothion during manual operation on treated ornamental plants in greenhouses. *Arch Environ Contam Toxicol* 1999 May; 36(4):490-7.
62. Vettorazzi G. International regulatory aspects for pesticide chemicals. Vol. I. *Toxicity profiles*. Florida: CRC Press, Inc. 1979.
63. International Agency for Research on Cancer. *Occupational exposures in insecticide applications and some pesticides. Deltamethrin*. Lyon: IARC; 1991. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, 53). p. 251-66.
64. International Agency for Research on Cancer. *Occupational exposures in insecticide applications and some pesticides. Fenvalerate*. Lyon: IARC; 1991. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, 53). p. 309-328.
65. International Agency for Research on Cancer. *Occupational exposures in insecticide applications and some pesticides. Permethrin*. Lyon: IARC; 1991. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, 53). p. 329-349.
66. Lavy TL, Mattice JD, Massey JH, Skulman BW. Measurement of year-long exposure to tree nursery workers using multiple pesticides. *Arch Environ Contam Toxicol* 1993 Feb;24(2):123-44.
67. World Health Organization. Alpha-cypermethrin. 1992; Geneva:WHO. (Environmental Health Criteria, 142).
68. Bontoyan WR, Looker JB, Kaiser TE, Giang P, Olive BM. Survey of ethylenethiourea in commercial ethylenebis-dithiocarbamate formulations. *J Assoc Off Anal Chem* 1972 Sep; 55(5):923-5.
69. Jordan LW, Neal RA. Examination of the in vivo metabolism of maneb and zineb to ethylenethiourea (ETU) in mice. *Bull Environ Contam Toxicol* 1979 May;22(1-2):271-7.
70. International Agency for Research on Cancer. *Some antithyroid and related substances, nitrofurans and industrial chemicals*. Lyon: IARC; 1974. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, 7). p. 45-52.
71. International Agency for Research on Cancer. *Chemicals, industrial processes and industries associated with cancer in humans*. Lyon: IARC; 1983. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, Suppl. 4). p. 128-130.
72. Hayes WJ Jr. *Organic phosphorus pesticides. Pesticides studied in man*. Baltimore, Maryland: Williams and Wilkins ed 1982. p. 358-9.
73. Kurttio P, Vartiainen T, Savolainen K. Environmental and biological monitoring of exposure to ethylenebisdithiocarbamate fungicides and ethylenethiourea. *Br J Ind Med* 1990 Mar; 47(3):203-6.
74. Sciarra G, Aprea C, Sartorelli P. Valutazione dell'escrezione urinaria di etilentiourea in soggetti professionalmente esposti e nella popolazione generale. *G Ital Med Lav* 1994 Jan-Nov;16(1-6):49-52.
75. Aprea C, Betta A, Catenacci G, Lotti A, Minoia C, Passini W *et al.* Reference values of urinary ethylenethiourea in four regions of Italy (multicentric study). *Sci Total Environ* 1996 Dec 2; 192(2):163-82.
76. Aprea C, Betta A, Catenacci G, Colli A, Lotti A, Minoia C *et al.* Urinary excretion of ethylenethiourea in five volunteers on a controlled diet (multicentric study). *Sci Total Environ* 1997 Sep 6;203(2):167-79.
77. Aprea C, Sciarra G, Desideri E, Sartorelli E. Biological monitoring of exposure to ethylenebisdithiocarbamate fungicides in the framework of primary prevention in agriculture. In: *Atti del Seminario Antiparassitari e prevenzione*. Sondrio 1991, p. 121-5.
78. Aprea C, Sciarra G, Sartorelli P, Lunghini L, Fattorini A, Fantacci M. Biological monitoring of pesticides to evaluate the effectiveness of protective clothing. *Arch Sci Lav* 1993; 9:91-6.
79. International Agency for Research on Cancer. *Occupational Exposures to Chlorophenoxy herbicides*. Lyon: IARC; 1986. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, 41). p. 357-406.
80. World Health Organization. *Pesticide development and safe use unit. Spectrophotometric kit for measuring cholinesterase activity*. Geneva:WHO; 1984.

81. Donovan JW, Mac Lennan R, Adena N. Vietnam Service and the risk of congenital anomalies: a case-control study. *Med J Aust* 1984 Mar 31;140(7):394-7.
82. Feldman RJ, Maibach HI. Percutaneous penetration of some pesticides and herbicides in man. *Toxicol Appl Pharmacol* 1974 Apr; 28(1):126-32.
83. Feldman RJ, Maibach HI. *Systemic absorption of pesticides through the skin of man. Occupational exposure to pesticides.* Washington, DC: US Govt. Appendix B, 1974. (Report to the working group on pest management). p. 120-7.
84. Knopp D, Glass S. Biological monitoring of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-exposed workers in agriculture and forestry. *Int Arch Occup Environ Health* 1991;63(5):329-33.
85. Fjellstad P, Wannag A. Human urinary excretion of the herbicide 2-methyl-chlorophenoxyacetic acid. *Scand J Work Environ Health* 1977 Jun;3(2):100-3.
86. Coye MJ, Lowe JA, Maddy KJ. Biological monitoring of agricultural workers exposed to pesticides: I. Cholinesterase activity determinations. *J Occup Med* 1986 Aug;28(8):619-27.
87. DFG, Deutsche Forschungsgemeinschaft - Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemicals Compounds in the Work Area 1993. *List of MAK and BAT values.* Bonn: DFG; 1993. (Report n. 29).
88. Lotti M, Becker CE, Aminoff MJ, Woodrow JE, Seiber JN, Talcott RE *et al.* Occupational exposure to the cotton defoliant DEF and merphos: a rational approach to monitoring organophosphorus-induced delayed neurotoxicity. *J Occup Med* 1983 Jul;25(7):517-22.
89. Lotti M. Biological monitoring for organophosphate-induced delayed polyneuropathy. *Toxicol Lett* 1986 Oct;33(1-3):167-72.
90. Liska D, Kolesar D, Hladka A, Valkyova L, Raiskup JCH. Clinical and laboratory findings in Metation EK-50. *Czech Med* 1982;5(3):146-54.
91. Kummer R, Van Sitter NJ. Field studies on health effects from the application of two organophosphorus insecticide formulations by hand-held ULV to cotton. *Toxicol Lett* 1986 Oct;33(1-3):7-24.
92. Liesivuori J, Jääskeläinen S. *Exposure of greenhouse workers to pesticide.* Tampere, Finland: National Board of Labor Protection; 1984. (Research Report n. 46). p. VIII-IX
93. Tordoir W, Van Sitter NJ. Organochlorines. In: Tordoir W, Maroni M, He F (Ed.). Health surveillance of pesticide workers. A manual for occupational health professionals. *Toxicology* 1994;91:51-7.
94. Saito I, Kawamura N, Uno K, Hisanaga N, Takeuchi Y, Ono Y *et al.* Relationship between chlordane and its metabolites in blood of pest control operators and spraying conditions. *Int Arch Occup Environ Health* 1986;58(2):91-7.
95. van Welie RT, van Duyn P, Brouwer DH, van Hemmen JJ, Brouwer EJ, Vermeulen NP. Inhalation exposure to 1,3-dichloropropene in the Dutch flower-bulb culture. Part II. Biological monitoring by measurement of urinary excretion of two mercapturic acid metabolites. *Arch Environ Contam Toxicol* 1991 Jan;20(1):6-12.
96. Mussalo-Rauhamaa H, Pyysalo H, Antervo K. Heptachlor, heptachlor epoxide, and other compounds in Finnish plywood workers. *Arch Environ Health* 1991 Nov-Dec;46(6):340-6.
97. Lavy TL, Cowell JE, Steinmetz JR, Massey JH. Conifer seedling nursery worker to glyphosate. *Arch Environ Contam Toxicol* 1992 Jan;22(1):6-13.
98. Stamper JH, Nigg HN, Queen RM. Prediction of pesticide dermal exposure and urinary metabolite level of tree crop harvesters from field residues. *Bull Environ Contam Toxicol* 1986 May;36(5):693-700.
99. Kolmodin-Hedman B, Erne K. Estimation of occupational exposure to phenoxy acids (2,4-D and 2,4,5-T): further studies in the assessment of toxic actions. *Arch Toxicol* 1980;Suppl. 4:318-21.
100. Catenacci G, Barbieri F, Bersani M, Ferioli A, Cottica D, Maroni M. Biological monitoring of human exposure to atrazine. *Toxicol Lett* 1993 Aug;69(2):217-22.