



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CAGLIARI
DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA SPERIMENTALE
SEZIONE DI SCIENZE ANTROPOLOGICHE

Dottorato di Ricerca in Biologia animale, molecolare e dell'uomo
XX Ciclo

Sangue, urina e capelli: bioindicatori per il
monitoraggio di esposizione umana all'As,
Pb e U nei bambini dei Comuni di
Perdasdefogu e Jerzu

Candidato:
Dott.ssa Elisabetta Vallasca

Relatore:
Prof. Emanuele Sanna

1. Introduzione	pag 3
2. Metalli e Matrici esaminate	pag 5
• 2.1. Piombo	pag 5
• 2.2. Arsenico	pag 10
• 2.3. Uranio	pag 12
3. Inquadramento dei due Comuni studiati	pag 14
• 3.1. Perdasdefogu	pag 14
• 3.2. Jerzu	pag 15
4. Obiettivi della Ricerca	pag 17
5. Effetti tossici dei metalli pesanti	pag 18
• 5.1. Piombo	pag 18
• 5.2. Arsenico	pag 35
• 5.3. Uranio	pag 42
6. Materiali e metodi	pag 51
• 6.1. Composizione del campione	pag 51
• 6.2. Metodologia per l'analisi dei metalli contenuti nel sangue e nelle urine	pag 51
• 6.3. Metodologia per l'analisi dei metalli contenuti nei capelli	pag 51
• 6.4. Determinazione strumentale	pag 52
7. Tecnica di spettrometria di massa accoppiata al plasma induttivo (ICP-MS)	pag 53
• 7.1. Aspetti metodologici	pag 54
• 7.2. Calibrazione	pag 57
• 7.3. Limiti di rilevabilità (MDL) e quantificazione (MQL) strumentali	pag 57
• 7.4. Standards	pag 57
8. Analisi statistica	pag 58
9. Risultati	pag 59
10. Conclusioni	pag 62
11. Tabelle	pag 65
12. Figure	pag 82
13. Bibliografia	pag 92

1. INTRODUZIONE

Il continuo incremento del carico inquinante sulle popolazioni non esposte, sia nelle società avanzate sia nelle società in via di sviluppo, è diventato un problema rilevante per quanto concerne la salvaguardia dello stato di salute. Per tali ragioni sono stati effettuati numerosi studi volti a determinare quali siano le metodiche e le metodologie più appropriate per la determinazione dei livelli dei metalli pesanti nelle popolazioni umane.

È noto che un eccessivo livello di elementi tossici con un contemporaneo deficit di metalli essenziali, quali Mg, Zn, Cu, Ca ed altri bioelementi, possa determinare dei disordini metabolici, una diminuita efficienza dell'organismo, un declino dei processi immunologici e quindi la comparsa di varie malattie e persino la morte dell'individuo (Lech, 2002).

Gli effetti tossici dei metalli pesanti risultano particolarmente dannosi per i soggetti in accrescimento. I bambini costituiscono la parte della popolazione maggiormente a rischio, rispetto agli adulti, per gli effetti dei metalli pesanti in quanto hanno maggiori probabilità di essere esposti all'inquinamento non-occupazionale e di ingerire sostanze non commestibili contenenti metalli pesanti. Infatti, la polvere contenente gli inquinanti ricade dall'atmosfera sui giocattoli, sui mobili e su altre superfici di zone destinate al gioco, da cui può, facilmente, essere ingerita (Schell, 1991a).

I bambini inoltre assorbono, in genere, una maggiore quantità di metalli pesanti rispetto agli adulti, in quanto presentano oltre che una maggiore attività metabolica e fisica, anche un maggiore assorbimento e ritenzione nel tratto gastrointestinale (Annest et al., 1982; Chilsom, 1987; Schell, 1991a; Fitzgerald et al., 1998; Al-Saleh et al., 1999).

È ancora oggetto di dibattito se anche dei moderati livelli di alcuni metalli pesanti nei bambini possano causare loro delle patologie (Pirkle et al., 1985; Fulton et al., 1987; Cavalleri, 1988; McMichel et al., 1988; Abbritti et al., 1989; Morisi et al., 1989; Factor-Litvak et al., 1999; Canfield et al., 2003; CDC, 2004), oltre che influire negativamente sulla crescita (Schwartz et al., 1986; Frisancho e Ryan, 1991; Ballow et al., 1999; Factor-Litvak et al., 1999; Rahman et al., 2002) e causare una riduzione del QI (Schwartz, 1994; Factor-Litvak et al., 1999; Campbell et al., 2000; Rahman et al., 2002); risulta pertanto necessario un monitoraggio continuo dell'accrescimento e dunque dello stato di salute nelle popolazioni potenzialmente esposte all'inquinamento da metalli pesanti.

2. Metalli e matrici esaminate

2.1. Piombo (Pb)

Il piombo è tossico per la maggior parte degli organismi viventi e non ha un accertato ruolo fisiologico. La fascia di popolazione più sensibile è costituita dai bambini, soprattutto se ancora piccoli o nel periodo neonatale o fetale (NAS, 1972; Goyer e Rhyne, 1973; WHO, 1977b; Mahaffey, 1985; EPA, 1986, 1989a; Landrigan, 1989; Gulson et al., 1997a; Manton et al., 2003).

La principale via di esposizione è il cibo ma, di solito, l'assunzione eccessiva con conseguenze tossiche deriva da fonti ambientali e, presumibilmente, controllabili. Queste comprendono gli intonaci delle vecchie abitazioni, a base di piombo, il piombo presente nell'atmosfera, prodotto dalla combustione e presente nei gas di scarico delle automobili o delle emissioni industriali, le vernici a base di piombo, e, infine, gli smalti usati per la ceramica.

La quantità totale di piombo corporeo può essere suddivisa almeno in due comparti cinetici caratterizzati da due differenti velocità metaboliche. Il più ampio e, dal punto di vista cinetico, il più lento, è il sistema osseo, caratterizzato da un'emivita superiore ai 20 anni; un comparto molto più labile è costituito dai tessuti molli. Globalmente, il piombo che si può accumulare nell'arco della vita, è all'incirca 200 mg e più di 500 mg in una persona che vi è esposta per motivi occupazionali.

Gli effetti biologici del piombo sono dovuti alle seguenti proprietà biochimiche:

- è un metallo elettropositivo dotato di grande affinità per i gruppi sulfidrilici che hanno carica negativa, da ciò deriva la sua influenza in numerose attività enzimatiche;
- nella sua forma bivalente presenta notevoli analogie con il calcio ed esercita un'azione competitiva con esso in vari distretti organici;
- nella sua forma ionica può interagire con strutture importanti quali DNA e RNA.

L'esposizione a questo metallo è particolarmente dannosa per lo sviluppo dei bambini, poiché esso interviene in numerose vie metaboliche in cui è coinvolta la cisteina (gluconeogenesi, sintesi degli acidi grassi); infatti questo amminoacido ha un ruolo molto importante nella struttura di alcune proteine (ormoni, anticorpi, enzimi).

Il piombo inibisce inoltre lo sviluppo delle ossa lunghe e delle ossa piatte tramite l'attivazione di una infiammazione condrocitica che rallenta o inibisce la replicazione cellulare (Gerber et al., 1980; Little et al., 1990; Lehninger et al., 1993). La sua affinità per il tessuto osseo è particolarmente elevata e molti degli ioni circolanti si depositano in questo distretto, soprattutto nelle epifisi delle ossa lunghe, interferendo così con l'accrescimento.

Durante le ultime cinque decadi, il sangue è stato il liquido biologico primario usato per la valutazione dell'esposizione al Pb, sia per lo screening sia per la diagnostica sia per il bio-monitoraggio a lungo termine. Però, per differenziare più efficacemente il Pb immagazzinato nel corpo durante gli anni dal Pb accumulato in un'esposizione più recente, possono essere utili le informazioni fornite da altri biomarkers, quali i livelli di piombo nell'urina (PbU) e nei capelli (PbH).

Tuttavia, nessuno dei biomarkers in uso corrente dovrebbe essere considerato come sostitutivo al PbB (Barbosa et al., 2005).

2.1.2. Piombo nel sangue (PbB)

Il Centro degli Stati Uniti per il controllo della salute e della prevenzione (CDC) e l'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) definiscono un valore di PbB di 10 µg/dL come la soglia di preoccupazione nei bambini (Barbosa et al., 2005). Tuttavia, gli studi recenti hanno segnalato la possibilità di svariati effetti negativi sulla salute, compreso il danno a carico del Q.I. nei bambini, a livelli di PbB <10 µg/dL. Questi dati ci suggeriscono che non esista un valore soglia sicuro di esposizione (Canfield et al., 2003). Dall'indagine ambientale tedesca effettuata nel 2001-2002 (GerES IV) sono stati indicati nuovi valori di riferimento per il piombo nel sangue, i livelli di PbB sono stati abbassati fino a un valore pari a 5 µg/dL (Wilhelm et al., 2006).

La difficoltà nel valutare la natura esatta di esposizione al Pb dipende non così tanto dai problemi derivanti dalle metodologie analitiche correnti, ma piuttosto dalla tossicocinetica complessa del Pb all'interno del corpo, infatti i livelli di PbB rilevati possono essere la conseguenza dell'accumulo di Pb nelle ossa che viene nuovamente riversato nel sangue (Gulson et al., 1996). Nei soggetti che non hanno avuto eccessiva esposizione al Pb, si valuta che il 45–75% del Pb nel sangue possa derivare dal piombo assorbito dalle ossa (Gulson et al., 1995; Smith et al., 1996). In bambini esposti, invece, è stato segnalato che il contributo del Pb delle ossa al sangue possa essere del 90% o più (Gwiazda et al., 2005). Alcuni ricercatori hanno suggerito che, per monitorare i soggetti con alti livelli di PbB, bisognerebbe effettuare i prelievi in periodi di tempo relativamente lunghi affinché si abbia una forte riduzione del contributo del Pb delle ossa sui livelli di PbB (Lowry et al., 2004; Gwiazda et al., 2005).

2.1.3. Piombo nell'urina (PbU)

I livelli del Pb nell'urina (PbU) sono considerati come il riflesso dei livelli del Pb plasmatico che viene espulso attraverso i reni. La determinazione del Pb dall'analisi dell'urina viene considerata una tecnica vantaggiosa in quanto si tratta di una metodica non invasiva e viene indicata soprattutto per il biomonitoraggio di lunga durata.

Il piombo nell'urina proviene dal piombo plasmatico che viene filtrato a livello glomerulare; quindi, secondo alcuni autori (Tsaih et al., 1999), i livelli del PbU che sono ottenuti attraverso il grado di filtrazione glomerulare possono essere utili per conoscere i livelli del piombo nel plasma. Hirata et al. (1995) hanno trovato una correlazione migliore fra la concentrazione di piombo nel plasma ed il piombo nell'urina che fra piombo nel sangue e piombo nell'urina. Manton et al. (2000), hanno trovato che la concentrazione del piombo urinario equivale a circa il 10% rispetto a quella del sangue in toto.

L'esattezza dei risultati analitici è garantita dalla disponibilità di materiali certificati di qualità-controllo del piombo nell'urina. Tuttavia, la tendenza che mostrano i sali di urato a precipitare dall'urina durante il transito e l'immagazzinamento, può essere un fattore complicante l'analisi.

Inoltre, poichè soltanto alcuni studi hanno esaminato le associazioni fra PbU ed altri biomarkers, l'uso delle misure del PbU viene essenzialmente limitato ai programmi di controllo professionali di lunga durata (Barbosa et al., 2005).

2.1.4. Piombo nei capelli (PbH)

I capelli sono dei campioni biologici che vengono raccolti facilmente, con una metodica non invasiva, costo minimo e facilmente trasportabili in laboratorio; queste caratteristiche rendono i capelli un substrato di bio-monitoraggio attraente.

Tuttavia, è ancora aperto un vasto dibattito sulle limitazioni dei capelli come biomarker di esposizione del metallo (ASTDR, 2001, Morton et al., 2002), anche perchè è stata riscontrata una variazione significativa nelle concentrazioni di piombo fra le varie sottopopolazioni secondo l'età, il sesso ed il colore dei capelli (Wolfsperger et al., 1994).

La capacità di distinguere il Pb endogeno, vale a dire, assorbito nel sangue e incorporato nella matrice dei capelli, dal Pb esogeno, vale a dire, derivato dalla contaminazione esterna, è una problematica tutt'ora aperta. Infatti, durante la fase di lavaggio si presuppone che il Pb esogeno sia completamente rimosso, mentre il Pb endogeno no. Tuttavia, non esiste nessuna metodica su come si effettui al meglio l'eliminazione del Pb esogeno. Svariate pubblicazioni, che riportano l'uso dei capelli per valutare il grado di esposizione al Pb, hanno utilizzato come metodica di lavaggio quella proposta, nel 1978, dall'Agenzia Internazionale per l'Energia Atomica (IAEA), anche se, recentemente, uno studio (Morton et al., 2002) ha dimostrato che il metodo dello IAEA non è riuscito a rimuovere il Pb esogeno dai capelli.

2.2. Arsenico (As)

L'esposizione umana ai contaminanti dell'arsenico nell'acqua potabile può causare anemia, neuropatie, iperpigmentazione, irritazione della pelle, delle membrane mucose e del tratto gastrointestinale.

Le esposizioni croniche a questo metallo possono portare alla ipercheratosi, alla perdita della pigmentazione della pelle e al cancro della pelle, della vescica e del polmone (IARC, 1980; WHO, 1983; Chen et al., 1985; NRC, 1999; Kile et al., 2005; Marcos et al., 2006).

Come conseguenza degli effetti tossici dell'arsenico sulla salute umana, molte nazioni hanno adottato degli standard regolatori per limitare la quantità di arsenico nell'acqua potabile. Negli USA la legge in vigore concede 5 µg/dL, ma i nuovi dati sui rischi del cancro hanno condotto il Consiglio di Ricerca Nazionale degli Stati Uniti a rivedere i dati e a suggerire all' EPA di adottare un valore soglia inferiore (NRC, 1999, 2000).

Una delle domande che ci si pone ultimamente riguarda la possibile esistenza di alcuni sottogruppi nelle popolazioni che siano più suscettibili agli effetti tossici dell'arsenico e che quindi non siano protetti adeguatamente dagli attuali standard per l'acqua potabile (Loffredo et al., 2003). Un recente studio riporta che la condizione familiare fosse un determinante importante nel metabolismo dell'arsenico (Chung et al., 2002).

2.2.1. Arsenico nel sangue (AsB)

Il dosaggio dell'arsenico nel sangue (AsB), in genere, non viene utilizzato sia per la "clearance" rapidissima sia perché le concentrazioni di questo metallo nel sangue sarebbero fortemente influenzate dal consumo di pesci e/o crostacei. Il limite superiore di riferimento viene indicato in 1,8 µg/dL (Casula et al., 1993).

2.2.2. Arsenico nell'urina (AsU)

Il 45-85% dell'As ingerito viene escreto nell'urina in 1-3 giorni dall'esposizione, rendendo così le concentrazioni di AsU un biomarker utile per rilevare l'esposizione recente al metallo ma una povera misura delle esposizioni di lungo periodo (Kile et al., 2005).

Sui livelli dell'arsenico urinario può interferire l'alimentazione, e più specificamente il consumo di pesci e crostacei, a causa dell'elevato contenuto in essi di composti organo arsenicati; per cui è necessario prescrivere l'astensione del consumo di cibi marini per i 2-3 giorni precedenti l'esame.

Inoltre, per riuscire a stabilire l'origine dell'assorbimento (alimentare o industriale) è opportuno distinguere nell'arsenico urinario totale le frazioni di MMA e DMA e cioè quelle frazioni che provengono dall'introduzione di As inorganico (origine professionale).

Dall'indagine ambientale tedesca (GerES IV) condotta nel 2001-2002 è derivato un nuovo valore di riferimento per i bambini relativo al contenuto di As nell'urina pari a 1,5 µg/dL (Wilhelm et al., 2004).

2.2.3. Arsenico nei capelli (AsH)

La concentrazione di arsenico nei capelli (AsH) dovrebbe essere considerata come un indice di accumulo. La misura può risultare utile per il controllo di popolazioni generali, ma non è utilizzabile in medicina del lavoro o per il controllo soggettivo, per la difficoltà di distinguere tra arsenico derivato da inquinamento esterno e quello accumulatosi nel capello dopo l'assorbimento e il metabolismo del metallo da parte dell'organismo.

2.3. Uranio (U)

L'esposizione umana all'uranio deriva sia dall'estrazione mineraria sia dall'ingestione di acqua freatica contaminata. L'ingestione e l'inalazione sono, dunque, le principali vie di ingresso nel corpo. La dose stabilita dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) per il consumo quotidiano di acqua potabile è pari a 2 µg/L (Brugge et al., 2005) mentre la quantità di uranio giornaliera, tollerabile per l'organismo umano, è di 0,6 µg per kg di peso corporeo (WHO, 1998).

L'assorbimento di uranio dai polmoni o dalla via digestiva è in genere basso ma può variare a seconda della solubilità specifica del composto. Circa il 75% dell'uranio ingerito o inalato viene eliminato dopo 5 minuti e il 95% nelle prime 5 ore. I risultati primari di preoccupazione per la salute riguardano lo sviluppo renale, lo sviluppo riproduttivo, il diminuito accrescimento delle ossa, inoltre sono stati riscontrati danni al DNA (Brugge et al., 2005).

2.3.1. Uranio nel sangue (UB)

Il sangue è una delle matrici da tempo utilizzate per la determinazione quantitativa dei livelli di uranio (Carpenter e Cheek, 1970; Hamilton, 1970), anche se è noto che le concentrazioni di uranio, come del resto di tutti i radioelementi, in suddetta matrice siano estremamente bassi (Fiesenne e Perry, 1985).

I livelli massimi consigliati in letteratura per la salvaguardia della salute variano tra 5 ng/dL (Byrne et al., 1990) e 10 ng/dL (Vidaud et al., 2005).

2.3.2. Uranio nelle urine (UU)

Il biomarker più utilizzato per la valutazione dei livelli di esposizione umana all'uranio è l'urina, anche se diversi studi riportano anche l'uso di altre matrici, come sangue, capelli, unghie e feci (Byrne et al., 1990; Karpas, 2001; Kurttio et al., 2006).

I valori di riferimento consigliati in letteratura sono di 10 ng/dL (Byrne et al., 1990; Karpas et al., 1996; 2001).

2.3.3. Uranio nei capelli (UH)

I capelli dovrebbero riflettere il grado di inquinamento a cui viene esposto un soggetto. Tuttavia, tale tecnica, viene messa in discussione da diversi autori (Morton et al., 2002; Barbosa et al., 2005) sia per la difficoltà a discernere i livelli del metallo endogeno, presente nel capello, da quelli del metallo esogeno, sia per la difficoltà a riscontrare dei dati di riferimento univoci e universali (ATSDR, 2001; Seidel et al., 2001).

I livelli di riferimento riportati in letteratura variano tra 1-6 ng/g (Byrne et al., 1990; Karpas, 2001).

3. Inquadramento generale dei due Comuni studiati

3.1. Perdasdefogu

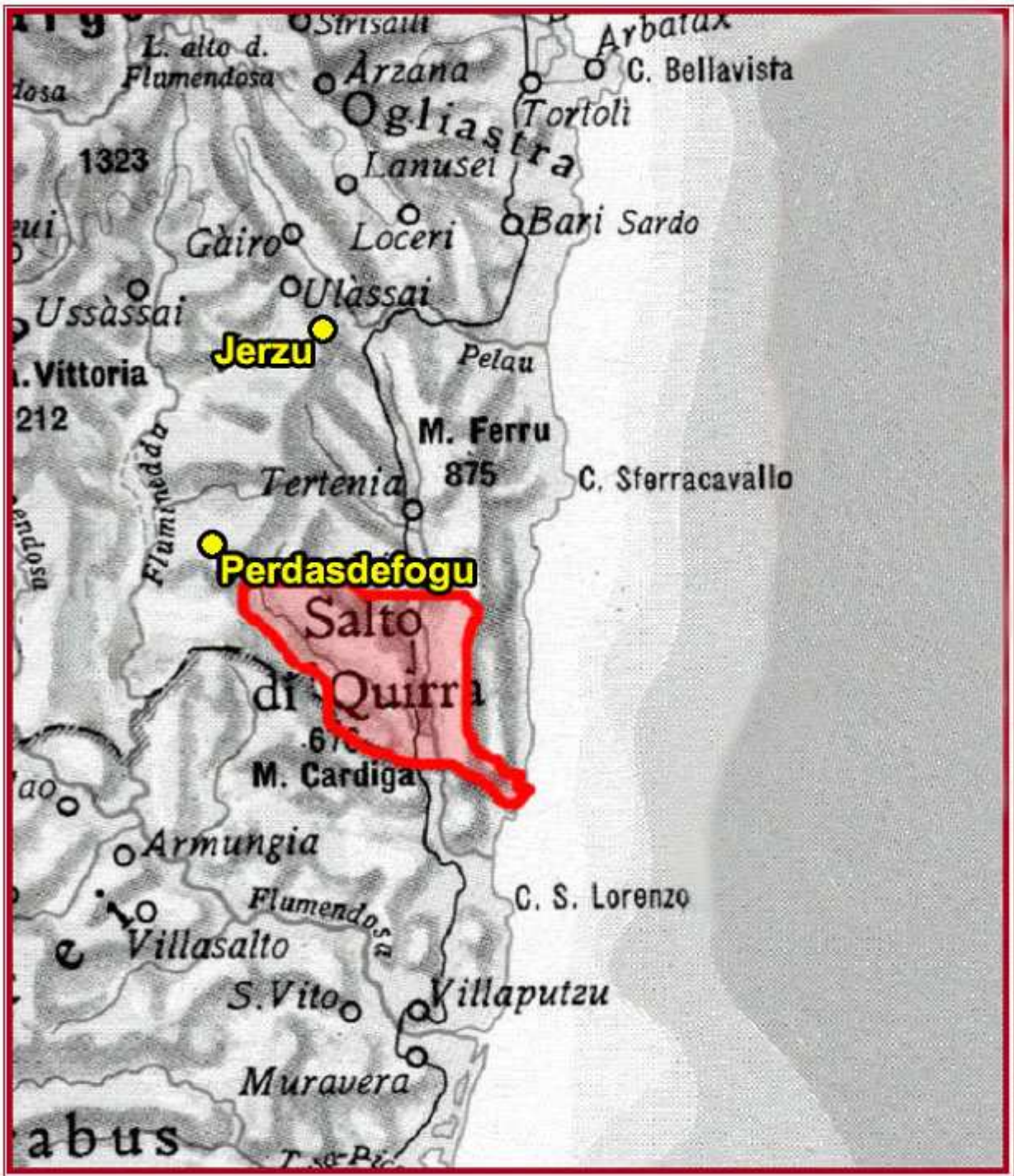
Il Comune di Perdasdefogu si trova nella parte meridionale dell'Ogliastra. L'origine dell'abitato secondo alcuni studiosi esisterebbe dal VII-VIII secolo d.C. , secondo altri invece la sua origine è di gran lunga più recente, dato che non viene registrato dalle imposte della repubblica di Pisa. Il territorio confina a nord con Ulassai, ad Ovest con Escalaplano, Ballao e Villaputzu, a est ancora con Ulassai. Il Comune conta 2.331 abitanti (censimento 2001), ha una superficie di 77,7 chilometri quadrati per una densità abitativa di 30 abitanti per chilometro quadrato. Sorge a 599 metri sopra il livello del mare: il territorio del comune risulta compreso tra i 137 e i 771 metri sul livello del mare, l'escursione altimetrica complessiva risulta essere pari a 634 metri.

Il Comune di Perdasdefogu è stato proposto come Comune oggetto di studio in quanto potrebbe essere soggetto ad effetti di inquinamento ambientale (Uranio impoverito e metalli pesanti) conseguenti alla vicinanza al proprio insediamento abitativo del poligono militare interforze di Quirra e di alcune miniere dimesse (es. Baccu Locci).

3.2. Jerzu

Situato sul fianco di una collina che si incunea fra i territori di mare e montagna, sorge il paese di Jerzu, antico borgo agricolo. A cinquecento metri sul livello del mare, l'abitato appare contornato degli imponenti tacchi calcarei di Porcu 'e Ludu e di Triscu cui si affiancano i picchi e i tonneri di Mammillara negli ampi anfiteatri di Gedili e S. Antonio. Il paese è un'ampia terrazza che guarda il mare al quale si avvicina con le sue propaggini di pianure, nella zona del Pelau, dove si collocano i famosi impianti a vigneto del Cannonau di Jerzu. La ricchezza archeologica del territorio con i suoi villaggi nuragici e le domus de janas suscita crescente interesse da parte degli studiosi ed esperti. Conta 3.352 abitanti (censimento 2001) e ha una superficie di 102,6 chilometri quadrati per una densità abitativa di 32,8 abitanti per chilometro quadrato. Sorge a 422 metri sopra il livello del mare: il territorio del comune risulta compreso tra i 26 e i 1.009 metri sul livello del mare, l'escursione altimetrica complessiva risulta essere pari a 983 metri.

Il Comune di Jerzu è stato scelto come Comune di confronto in base alla specifica posizione geografica, in quanto ubicato in un'area limitrofa, presumibilmente non esposta all'inquinamento da uranio.



4. Gli obiettivi della ricerca

Il progetto di ricerca si prefigge lo scopo di:

- raccogliere la quantità di sangue, urine e capelli necessaria per effettuare l'analisi dei metalli pesanti nei 129 bambini campionati nelle Scuole Medie inferiori dei Comuni di Perdasdefogu e Jerzu;
- determinare i livelli dei metalli (As, Pb, U) presenti nel sangue, nelle urine e nei capelli, tramite la tecnica di spettrometria di massa accoppiata al plasma induttivo (ICP-MS), per verificare se esista una differenza statisticamente significativa fra le concentrazioni dei metalli nei bambini dei due Comuni campionati;
- verificare se esista una correlazione tra i livelli di As, Pb e U nelle tre matrici esaminate, al fine di individuare dei biomarker meno invasivi rispetto al sangue ma altrettanto validi.

5. Effetti tossici dei metalli pesanti

5.1. Piombo (Pb)

Il piombo, il metallo tossico più diffuso, è praticamente rilevabile in tutte le fasi dell'ambiente inorganico ed in tutti i sistemi biologici. Dal momento che è tossico per la maggior parte degli organismi viventi ad alte dosi di esposizione e che non ha un accertato ruolo fisiologico, la questione principale a proposito del piombo è a quale livello diventi tossico. I problemi specifici variano con l'età e le circostanze che dipendono dall'ospite; il pericolo più significativo è infine verso il sistema nervoso.

La fascia di popolazione più sensibile è costituita dai bambini, soprattutto se ancora piccoli o nel periodo neonatale o fetale. Sono disponibili parecchie rassegne e libri scritti da diversi autori sulla tossicologia del piombo (NAS, 1972; Goyer e Rhyne, 1973; WHO, 1977b; Mahaffey, 1985; EPA, 1986, 1989a; Landrigan, 1989).

Fonti

La principale via di esposizione è il cibo ma, di solito, l'assunzione eccessiva con conseguenze tossiche deriva da fonti ambientali e, presumibilmente, controllabili. Queste comprendono gli intonaci delle vecchie abitazioni, a base di piombo, il piombo presente nell'atmosfera, prodotto dalla combustione e presente nei gas di scarico delle automobili o delle emissioni industriali, le vernici a base di piombo, e, infine, gli smalti usati per la ceramica. Si ritiene che l'assunzione dietetica sia diminuita dal 1940, quando era stata stimata tra i 400 e i 500 µg/die per la popolazione degli U.S.A.. I livelli attuali sono inferiori a 100 µg/die negli adulti (EPA, 1986). Sono state effettuate misurazioni, nelle acque municipali, a livello dei rubinetti e si è visto che, nella maggior parte dei casi, le concentrazioni sono inferiori a 0,05 µg/mL. Quindi, l'assunzione giornaliera attribuibile all'acqua, è solitamente attorno ai 10 µg ed è improbabile che superi i 20 µg. Gli adulti assorbono dal 5 al 15% del piombo ingerito e, di norma, accumulano meno del 5% di quello che è stato assorbito. E' certo che i bambini ne assorbono molto di più rispetto agli adulti; uno

studio a questo proposito ha riscontrato, in bambini che seguivano un'alimentazione regolare, un assorbimento netto medio del 41,5% ed un accumulo netto del 31,8%.

Questo metallo è presente nell'atmosfera sia in forma solida, cioè polvere o particelle di diossido di piombo sia in fase gassosa, soprattutto alchilpiombo, proveniente dalla combustione del carburante delle automobili. L'assorbimento del piombo da parte dei polmoni dipende anche da altri fattori, oltre che dalla sua concentrazione. Tra questi, il volume di aria respirata in una giornata, la forma in cui è il metallo, cioè polvere o gas, e l'intervallo di dimensioni delle particelle che lo contengono. Solo una frazione molto piccola delle particelle con diametro esterno medio superiore ai 0,5 μm viene trattenuta nei polmoni, la maggior parte viene eliminata dalle vie respiratorie e deglutita. Però, se il diametro è inferiore ai 0,5 μm , la percentuale che arriva al polmone aumenta proporzionalmente alla riduzione delle dimensioni. Circa il 90% delle particelle di piombo che sono presenti nell'aria e che si accumulano nei polmoni sono sufficientemente piccole per essere trattenute. L'assorbimento del piombo attraverso gli alveoli è relativamente efficiente e completo. Le concentrazioni di piombo atmosferico variano molto e possono essere inferiori a 1,0 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ in alcune aree urbane. Attualmente, il piombo presente nell'aria nelle città statunitensi, contribuisce in minima parte all'esposizione giornaliera globale. Più del 90% del piombo ematico si trova nei globuli rossi e, sembra, almeno in due compartimenti fondamentali, uno associato alla membrana e l'altro all'emoglobina. Piccole frazioni possono essere legate ad altre componenti di queste cellule. I ligandi plasmatici non sono stati ben identificati, ma si è supposto che il plasma ed il siero possano contenerne quantità in grado di diffondere, in equilibrio con i tessuti molli ed i siti di legame presenti negli organi bersaglio. E' difficile misurare accuratamente questa frazione, ma c'è un equilibrio tra il piombo nei globuli rossi e quello plasmatico. Stime nazionali sull'attuale grado e sulla gravità dell'esposizione a questo metallo per l'uomo, si basano sulle misure dei livelli ematici, ottenuti dal secondo "National Health and Nutrition Examination Survey" del periodo 1976-1980. Questi dati forniscono delle valutazioni sulla distribuzione delle concentrazioni di piombo nel sangue nella popolazione degli Stati Uniti compresa tra i 6 mesi e i 74

anni di età. Esse variano sia con l'età che con il sesso. I bambini in età prescolare compresa tra 6 mesi e 5 anni e gli adulti da 25 a 54 anni mostravano i più alti livelli di piombo, tendenzialmente decrescenti all'aumentare dell'età, a partire da 6 mesi fino alla tarda adolescenza. I valori medi andavano da 16,3 $\mu\text{g}/\text{dL}$, per i bambini dai 6 mesi ai 2 anni, a 12,1 $\mu\text{g}/\text{dL}$, per ragazzi da 15 a 17 anni. Tra gli adulti tra i 18 e i 74 anni, le concentrazioni ematiche aumentavano in modo significativo nei successivi gruppi di età, raggiungendo il valore massimo di 15,3 $\mu\text{g}/\text{dL}$ a 45-54 anni, quindi diminuendo lentamente per le classi di individui più vecchi. I valori medi delle concentrazioni ematiche di piombo hanno una tendenza simile negli uomini e nelle donne. Tuttavia, in queste ultime, i livelli medi sono significativamente inferiori (11,9 e 16,1 $\mu\text{g}/\text{dL}$, rispettivamente). La quantità totale di piombo corporeo può essere suddivisa almeno in due compartimenti cinetici caratterizzati da due differenti velocità metaboliche. Il più ampio e, dal punto di vista cinetico, il più lento è il sistema osseo, caratterizzato da un'emivita superiore ai 20 anni; un comparto molto più labile è costituito dai tessuti molli. Globalmente, il piombo che si può accumulare nell'arco della vita, è all'incirca 200 mg e più di 500 mg in una persona che vi è esposta per motivi occupazionali. Nel rene il metallo si accumula con l'eme e nei polmoni non cambia. Nel sistema nervoso centrale tende a concentrarsi nella materia grigia ed in alcuni nuclei. Le concentrazioni maggiori sono state riscontrate nell'ippocampo, seguito dal cervelletto, dalla corteccia cerebrale e dal midollo allungato. Sembra che la materia bianca della corteccia ne contenga la minor quantità, ma queste considerazioni sono basate solo su pochi dati riferiti all'uomo e agli animali. Di solito l'escrezione renale del piombo avviene attraverso filtrazione glomerulare mentre, a livello tubulare, si verifica un certo riassorbimento. Se le concentrazioni ematiche del piombo sono alte, l'escrezione può essere aumentata per trasporto transtubulare.

Trasporto del piombo attraverso la placenta

Non esistono barriere nei confronti del trasporto transplacentare del piombo. Generalmente i livelli del sangue nel cordone ombelicale sono correlati a quelli del sangue materno, anche se risultano leggermente inferiori. Nella madre i livelli ematici

di piombo diminuiscono lievemente durante la gravidanza, suggerendo il trasferimento del metallo al feto. I tessuti fetali, incluso il cervello, mantengono una concentrazione stazionaria del metallo, indipendentemente dal loro aumento di dimensioni.

Tossicità

Non c'è interruzione di continuità tra gli effetti tossici clinici o manifesti e quelli più sottili o biochimici. Ne sono coinvolti parecchi sistemi di organi e attività biochimiche. Nei neonati e nei bambini i più critici e sensibili sono a carico del sistema nervoso (Rutter e Jones, 1983; ASTDR, 1989; EPA, 1989b; Needleman et al., 1990). Per gli adulti, sia eccessivamente esposti sul luogo di lavoro, sia esposti accidentalmente al metallo, c'è il rischio di neuropatie periferiche e/o nefropatie croniche. Comunque, negli adulti, l'effetto critico o più sensibile può essere generalmente l'ipertensione (EPA, 1989b). Anche quando non vi siano altre alterazioni misurabili chimicamente, quelle sul metabolismo dell'eme forniscono indicatori biologici di esposizione al piombo, tuttavia, l'anemia causata da questo metallo si accompagna, solitamente, ad altri effetti misurabili o altri fattori sinergici. Anche i sistemi gastrointestinale e riproduttivo sono organi bersaglio dove si manifesta la tossicità del piombo. Quasi tutte le esposizioni ambientali al piombo sono dovute a composti inorganici, persino il piombo presente negli alimenti. Quelle a composti organici, incluso il piombo tetraetile, hanno un profilo tossicologico particolare (Grandjean e Grandjean, 1984).

Effetti neurologici, neurocomportamentali e sullo sviluppo dei bambini

Da un punto di vista clinico, le encefalopatie si possono manifestare in bambini che sono stati esposti per lunghi periodi al piombo e che, probabilmente, hanno livelli ematici di 80 µg/dL o più. I sintomi di queste encefalopatie iniziano con letargia, vomito, irritabilità, perdita d'appetito, vertigini e continuano con atassia, diminuzione dello stato di coscienza fino ad arrivare anche al coma e alla morte. Dal punto di vista patologico, nelle autopsie, sono stati riscontrati gravi edemi cerebrali dovuti al

travasamento di fluidi dai capillari nel tessuto cerebrale. Ciò si accompagna alla perdita di neuroni e all'aumento di cellule della glia. Durante il recupero si presentano in successione fenomeni di epilessia, ritardo mentale, neuropatie che coinvolgono il nervo ottico e, in alcuni casi, cecità (Perlstein e Attala, 1966). Nel 1970 sono state condotte ricerche su bambini i cui livelli ematici di piombo erano compresi tra 50 e 70 μg ma che non presentavano sintomi clinici d'avvelenamento; le loro capacità intellettive potevano diminuire di 5 o più punti di Q.I. (Rutter e Jones, 1983). Nel 1979, Needleman e collaboratori riferirono che bambini al primo ed al secondo anno di scuola, senza sintomi d'avvelenamento da piombo, ma con elevate concentrazioni nella dentina, presentavano carenze nell'intelligenza psicometrica, nel processo di articolazione della parola e del discorso, nell'attenzione e nelle prestazioni scolastiche. Nel quinto anno, i bambini con livelli di piombo più elevati nella dentina, avevano un punteggio, valutato come Q.I., inferiore e richiedevano particolari servizi accademici (Bellinger et al., 1986). Uno studio epidemiologico su 122 di questi bambini, durato 10 anni, rivelò che gli scompensi neurocomportamentali persistevano (Needleman et al., 1990). Questi effetti sono stati definiti "tossicità da piombo a bassi livelli" e oggi si pensa che siano associati a concentrazioni ematiche pari a circa 30-50 mg/dL o anche inferiori. Sono anche stati chiamati "tossicità da piombo a livello subclinico", perché possono essere rivelati solo da alterazioni neuropsicologiche, come l'iperattività o un rendimento scolastico piuttosto basso (scarsa capacità di attenzione). Non c'è omogeneità di risultati circa una diminuzione di Q.I., per concentrazioni ematiche inferiori a 30 $\mu\text{g/dl}$ e, a questi livelli, alcuni studi non mostrano carenze se tutte le variabili sono controllate (M.A. Smith et al., 1983; McMichael et al., 1988). Le conseguenze di un'esposizione a basse dosi di piombo (piombo ematico da 30 a 50 g/dL) sulla funzionalità del SNC sono state ulteriormente avvalorate dalla scoperta di variazioni nel profilo dell'EEG e dalle risposte dei potenziali evocati nel SNC, in bambini che presentavano scompensi neuropsicologici (Burchfiel et al, 1980). Ad una prima analisi, uno studio su larga scala, condotto da M.A.Smith et al., (1983) sui livelli di piombo nel sangue e nei denti, sul comportamento, sull'intelligenza e su altre abilità psicologiche in una

popolazione di 4.000 bambini di età compresa tra 6 e 7 anni, abitanti in 3 sobborghi di Londra, ha dimostrato che non c'è una correlazione statisticamente significativa tra i livelli ematici del metallo ed il Q.I. o le capacità scolastiche. Tuttavia, analisi successive di questi dati, effettuate da Pocock et al. (1985), misero in evidenza che il Q.I. del gruppo con livelli ematici compresi tra 12 e 15 g/dL era di 2 punti inferiore alla media del gruppo di controllo. Uno studio prospettico su neonati di Boston, non solo conferma il rischio associato a concentrazioni di piombo nel sangue comprese tra 10 e 15 g/dL, ma suggerisce anche che vi possano essere scompensi nello sviluppo mentale quando le concentrazioni del metallo nel cordone ombelicale di bambini appartenenti alle classi sociali inferiori è di 6-7 g/dL (Bellinger et al., 1988). Poiché questi studi coinvolgevano gli effetti di rischio connesso alle concentrazioni ematiche di donne in gravidanza, dei cordoni ombelicali e dei bambini fino a 2 anni, non è chiaro se le concentrazioni siano state riferite solo ai feti, ai neonati o ai bambini in età prescolare. Perciò, le donne in gravidanza dovrebbero evitare i livelli di 10-15 µg/dL e anche inferiori, sebbene esse non rappresentino di per sé una categoria a rischio.

Significato di una riduzione di 4 punti nel Q.I.

L'importanza biologica di una riduzione di 4-7 punti nel Q.I. può sembrare poco importante, a prima vista, ma ulteriori analisi suggeriscono che piccole variazioni rivestano un considerevole significato, quando si rappresentano graficamente e si paragonano tra loro le distribuzioni delle frequenze cumulative reali del Q.I. di soggetti poco e molto esposti al piombo. Il numero di bambini con gravi carenze, cioè con i livelli di Q.I. inferiori ad 80, è quasi quadruplicato. Inoltre, lo stesso spostamento si verifica nella parte finale della curva, dove si osserva una diminuzione del 5% nel numero di bambini con capacità superiori alla norma (Q.I. > 125). Attualmente, non vi sono stime di costo di questi effetti nella zona terminale della curva, ma ciò può essere di notevole importanza per la società (Needleman, 1989).

Meccanismi di neurotossicità

Studi sperimentali hanno dimostrato che, quando non vi sono cambiamenti morfologici, il piombo causa scompensi nella trasmissione neuronale, attraverso l'inibizione della funzione colinergica, probabilmente determinata dalla riduzione del calcio extracellulare. Altri cambiamenti nella neurotrasmissione coinvolgono un peggioramento nella captazione della dopamina da parte dei sinapsosomi e nella funzione del neurotrasmettitore inibitorio acido δ -aminobutirrico (Rossouw et al., 1987). Inoltre, la tossicità del piombo si può manifestare in modo più spiccato nel cervello di un feto che nel cervello di un individuo adulto. Studi sui capillari dei cervelli di bambini, avvelenati da piombo, e ricerche sperimentali, indicano che le cellule endoteliali immature, che costituiscono i capillari dei cervelli in via di sviluppo, sono meno resistenti agli effetti di questo metallo, rispetto ai capillari dei cervelli di individui adulti. Pertanto, esse consentono ai fluidi ed ai cationi, incluso il piombo, di raggiungere le componenti cerebrali che si sono appena formate, soprattutto gli astroцитi ed i neuroni. In seguito, Markovac e Godstein (1988), hanno scoperto che il piombo può sostituire il calcio nell'attivazione della proteinchinasi fosfolipide-dipendente (proteinchinasi C) nei microcapillari cerebrali. I dati sull'uomo, riferiti agli effetti del piombo sul metabolismo dell'eme e alla sua neurotossicità sono limitati. Il documento dell'EPA sul piombo (1986) conclude che la D-ALA può essere neurotossica quando, interagendo con i recettori presinaptici, interferisce con le funzioni dell'acido γ -aminobutirrico (GABA). L'esposizione al piombo provoca una diminuzione dei livelli epatici dell'eme, che, a sua volta, può causare l'inibizione della triptofano pirrolasi. La conseguenza è un aumento delle concentrazioni di triptofano, serotonina e acido 5-idrossindolacetico nel cervello. Inoltre, a causa dell'incompleto sviluppo della barriera emato-encefalica, il cervello del feto può essere molto più sensibile nei confronti del piombo rispetto al cervello di un soggetto adulto.

Neuropatia periferica

La neuropatia periferica è una classica manifestazione della tossicità del piombo, in particolare la debolezza del piede e del polso che ricorreva, più di mezzo secolo fa, tra imbianchini e altre categorie di lavoratori eccessivamente esposti al metallo. La demielinizzazione segmentale e, probabilmente, la degenerazione degli assoni sono conseguenti alla degenerazione delle cellule di Schwann, sempre indotta dal piombo. E' possibile una degenerazione walleriana delle radici posteriori dei nervi sciatico e tibiale, ma i nervi sensoriali sono meno sensibili al piombo di quelli motori, colpiti nella loro struttura e funzionalità. Si è constatato che la disfunzione dei nervi motori, diagnosticata mediante misure elettrofisiologiche delle velocità di conduzione neuronale, è concomitante a livelli ematici del metallo pari a 40 µg/dL (EPA, 1986).

Effetti ematologici

Il piombo ha molte conseguenze ematologiche. Tra le quali vi è un tipo di anemia caratterizzata da globuli rossi microcitici ed ipocromici, come nelle carenze di ferro e, di solito, da un aumento del numero di reticolociti che presentano una colorazione punteggiata basofila. Ciò dipende dall'inibizione dell'enzima pirimidina-5-nucleotidasi (Py-5-N) (Paglia et al., 1975). Esiste una proporzionalità inversa tra l'inibizione di questo enzima e la concentrazione ematica del piombo. Si è scoperto che 44 µg/dl, o anche quantità superiori, corrispondono alla soglia di inibizione della Py-5-N, ma, uno studio condotto su 21 bambini di età compresa tra i 2 ed i 5 anni, non ha trovato alcuna soglia relativa agli effetti del metallo sull'attività di questo enzima o sui contenuti cellulari del nucleotide, anche per valori inferiori a 10 µg/dl. E' significativa la proporzionalità diretta tra l'accumulo di pirimidina e quello di zinco protoporfina (ZPP). L'inibizione dell'attività della Py-5-N e l'accumulo del nucleotide, associati all'esposizione al piombo, influenzano la stabilità e la sopravvivenza della membrana eritrocitaria, mediante un'alterazione del metabolismo energetico della cellula. L'anemia che fa seguito agli avvelenamenti da piombo dipende fondamentalmente da due difetti: l'accorciamento della vita degli eritrociti e il peggioramento della sintesi dell'eme. Si pensa che il primo sia dovuto alla

maggior fragilità meccanica delle membrane cellulari. Non sono conosciute le basi biochimiche di questo effetto, è noto però essere accompagnato dall'inibizione delle ATPasi sodio e potassio-dipendenti (EPA, 1986). Probabilmente l'effetto critico è l'inibizione dell'acido δ -aminolevulinico deidratasi (ALA-D), che comporta una relazione esponenziale negativa tra l'ALA-D e i livelli di piombo nel sangue. Anche l'attività della coproporfirinogeno ossidasi risulta diminuita e così quella della ferrochetalasi. Quest'ultimo enzima catalizza l'incorporazione degli ioni ferrosi nella struttura ad anello della porfina. Bessis e Jensen (1965) hanno dimostrato che, in ratti avvelenati da piombo, il ferro, nella forma di apoferritina e delle micelle ferruginose, si può accumulare nei mitocondri dei reticoli del midollo osseo. Il suo mancato inserimento nella protoporfirina determina una diminuzione nella sintesi dell'eme. La protoporfirina in eccesso sostituisce l'eme nella molecola dell'emoglobina e, non appena i globuli rossi contenenti la protoporfirina entrano in circolo, lo zinco viene chelato al centro della molecola, nel sito solitamente occupato dal ferro. Le emazie contenenti la zincoprotoporfirina sono fortemente fluorescenti e possono essere utilizzate per diagnosticare l'intossicazione da piombo. Nella sintesi dell'eme, il primo passaggio è controllato dall'enzima acido δ -aminolevulinico sintetasi; per un controllo a "feedback", la velocità di questo enzima subisce un aumento quando vi sia una diminuita sintesi dell'eme. Il conseguente incremento nella produzione dell'acido δ -aminolevulinico e la diminuzione di attività dell'ALA-D provocano, a loro volta, un aumento nelle concentrazioni ematiche della δ -ALA e della sua escrezione urinaria. Una prealimentazione con piombo degli animali da esperimento innalza anche l'attività dell'eme ossigenasi, che porta ad un certo aumento nella formazione di bilirubina. Il cambiamento di velocità nell'attività di questi enzimi, causato da piombo, provoca un'alterazione dose-dipendente nell'attività degli enzimi interessati, ma l'anemia si verifica solo in casi di tossicità molto marcata. Le suddette variazioni, particolarmente quella relativa all'ALA-D nel sangue periferico e nell'escrezione urinaria dell'ALA, sono intimamente collegate ai livelli ematici reali del piombo e sono utili come indici biochimici precoci dell'esposizione al metallo (EPA, 1986). La sensibilità di ogni singolo individuo agli effetti tossici del piombo sul metabolismo

dell'eme, può essere messa in relazione al polimorfismo genetico dell'eme, diffuso nella popolazione (EPA, 1986). Il gene per l'ALA-D ha due alleli comuni, ALA-D¹ e ALA-D², che danno origine a un sistema enzimatico polimorfico, costituito da tre diversi fenotipi isoenzimatici, identificati come ALA-D1-1, ALA-D1-2, ALA-D2-2. Le frequenze dei fenotipi isoenzimatici, determinate in una popolazione italiana, sono 1-1, 81%; 2-1, 17%; 2-2, 2%, mentre l'espressione dell'ALA-D² non è stata osservata presso la popolazione nera della Liberia. Non sono state riferite differenze nella riattivazione degli isoenzimi, a livello biochimico. Si è ipotizzato che gli individui con fenotipo 2-2 possano andare incontro ad un maggior accumulo di piombo e, quindi, agli effetti fisiologici associati (Ziensen et al., 1986). L'allele D² può spiegare l'aumentata sensibilità nei confronti del piombo (Astrin et al., 1987).

Effetti sul rene

Due sono i rischi fondamentali dovuti agli effetti tossici del piombo sul rene:

- 1) una disfunzione tubulare reversibile, che si verifica principalmente nei bambini, dopo un'esposizione acuta e, di solito, associata ad effetti palesi sul sistema nervoso centrale;
- 2) una nefropatia interstiziale cronica reversibile caratterizzata da sclerosi dei vasi, atrofia delle cellule tubulari, fibrosi interstiziale e sclerosi glomerulare (Goyer, 1971a).

Tutto ciò è stato osservato prevalentemente in lavoratori che sono stati esposti per anni al piombo. Nella fase iniziale dell'esposizione eccessiva al metallo, cambiamenti morfologici e funzionali del rene sono limitati ai tubuli e sono più pronunciati nelle cellule del tubulo prossimale. I mitocondri ottenuti dal rene di ratti esposti al piombo mostrano un peggioramento nell'ossidazione e nella fosforilazione, che può essere responsabile della diminuzione nella funzione di riassorbimento delle cellule del tubulo prossimale. Una caratteristica patognomonica dell'avvelenamento da piombo è la presenza di tipiche inclusioni nucleari. Al microscopio ottico tali inclusioni appaiono come corpi densi, omogenei ed eosinofili. Se colorati con carbolfucsina, danno una reazione acida veloce. A livello ultrastrutturale presentano un core centrale

denso e una regione più esterna fibrillare. I corpi sono costituiti da un complesso piombo-proteina (Moore et al., 1973). La proteina è acida e contiene grosse quantità di acido aspartico e glutammico e piccole quantità di cistina. Si pensa che il piombo si leghi, in modo piuttosto blando, al gruppo carbossilico degli aminoacidi acidi. La maggior parte del piombo presente nelle cellule tubulari si trova associato a queste inclusioni. Probabilmente, questi complessi, sequestrando il metallo proteggono gli orfanelli più suscettibili, come i mitocondri ed il reticolo endoplasmatico (Goyer, 1971b). Studi sperimentali hanno dimostrato che tali inclusioni nucleari sono la prima evidenza dell'esposizione al metallo e possono essere osservate prima che si possa mettere in evidenza una qualsiasi delle modificazioni funzionali. La patogenesi di questi corpi può essere associata al trasporto e all'escrezione del piombo attraverso le cellule tubulari. Il trattamento di animali da esperimento, esposti al metallo, con agenti chelanti quali l'EDTA è seguito immediatamente da un picco di escrezione urinaria, che raggiunge il massimo nelle 12-24 ore successive al trattamento (Goyer e Wilson, 1975). Inoltre, all'esame morfologico di cellule tubulari dopo una terapia con EDTA, non è possibile riscontrare corpi inclusi. Questi possono essere rinvenuti infatti nel sedimento urinario di lavoratori che sono stati a contatto con il piombo in modo abbastanza pesante (Schumann et al., 1980). I corpi inclusi costituiscono la frazione preponderante del piombo intracellulare e la loro perdita mediante le urine può rappresentare la via principale di escrezione del piombo. L'origine della proteina che lega il piombo all'interno delle inclusioni è incerta. Egle e Shelton (1986) hanno dimostrato che una proteina della matrice nucleare, chiamata p³²/6.3, è il costituente proteico principale dei corpi inclusi. Questa proteina è normalmente presente nel tessuto neurale, ma non si conosce il meccanismo metabolico che porta al suo accumulo in queste inclusioni. Si è constatato che il piombo induce la loro formazione nel citoplasma di cellule renali cresciute in coltura. In seguito, i corpi tendono a spostarsi verso i nuclei delle cellule esposte al piombo (J.R. McLaughlin et al., 1980). Se l'esposizione prosegue si verifica un graduale cambiamento nella morfologia, che incomincia con la comparsa di fibrosi peritubulari e periglomerulari, soprattutto nella zona corticale più profonda e/o in quella juxta- midollare (Goyer,

1971a). A ciò, si accompagna un'atrofia di alcuni tubuli e un'iperplasia di altri. Nella fase più avanzata di questa nefrosclerosi, è presente anche un numero inferiore di corpi inclusi o è addirittura impossibile trovarli. Perciò, non è possibile distinguere morfologicamente la fibrosi interstiziale indotta dal piombo da una qualsiasi altra fibrosi interstiziale, ma il riconoscimento deve essere effettuato sulla base delle conoscenze anamnestiche e dello sviluppo della malattia, se sono disponibili. La più importante caratteristica dei cambiamenti associati alle nefropatie acute da piombo è la reversibilità, sia mediante una riduzione dell'esposizione, sia attraverso la terapia con agenti chelanti, ma la fibrosi interstiziale delle nefropatie causate da contatto cronico al metallo non è reversibile. Pertanto è importante diagnosticare questa malattia il prima possibile, per interrompere l'esposizione e bloccare la perdita di funzionalità dell'organo. Attualmente non esiste un unico esame diagnostico in grado di riconoscere le nefropatie interstiziali indotte dal piombo, ad eccezione della biopsia renale, ma questa misura non è praticabile. Negli ultimi anni parecchi studi clinici si sono interessati alla funzionalità renale di lavoratori che erano stati esposti per lungo tempo al piombo sul posto di lavoro. Considerati assieme, essi consentono di trarre una conclusione: l'iniziale fibrosi interstiziale conduce ad una riduzione della velocità di filtrazione glomerulare (Goyer, 1982). Dopo aver effettuato studi sperimentali sul ratto, è sorta l'idea che il piombo determinasse le tipiche nefropatie ad un livello soglia, che corrisponderebbe a livelli ematici di circa 45 µg/dl (Goyer et al., 1971a) e questo valore è coerente con gli standard attualmente prestabiliti per i livelli occupazionali e con le osservazioni cliniche. Più di un secolo fa, il medico inglese Farrod indicò l'esistenza di una relazione tra esposizione cronico al piombo e nefropatia provocata dalla gotta; recentemente, questa ipotesi è stata avvalorata da studi su pazienti gottosi e affetti da disturbi renali, nei quali era più consistente l'escrezione del piombo provocata da agenti chelanti, rispetto a quanto accadeva in pazienti sempre affetti da problemi renali, ma non da gotta.. Il piombo riduce l'escrezione di acido urico. Ratti in cui il metallo ha provocato nefropatie croniche, presentano elevate concentrazioni di acido urico (Goyer, 1971a).

Effetto sulla pressione sanguigna

Nella popolazione adulta, l'aumento della pressione sanguigna è probabilmente la conseguenza negativa che si verifica più facilmente, in seguito all'esposizione al piombo. La parte aggiunta al documento EPA del 1986 che si intitola "*Air Quality Criteria for Lead*" (1989b) faceva notare che un certo numero di ricerche epidemiologiche forniva, in generale, prove consistenti sul legame tra l'aumento della pressione sanguigna e un'elevata quantità di piombo nell'organismo adulto. I più consistenti studi sulle popolazioni sono stati il secondo "National Health and Nutrition Examination Survey" (N-HANES II), condotto sulla popolazione statunitense durante gli anni 1976-1980 e il "British Regional Heart Study", una valutazione ancora in corso su individui di età compresa tra 40 e 59 anni di 24 città inglesi. Le prove fornite dall'insieme dei risultati sono molto convincenti e confermano, negli uomini adulti, un'associazione piccola, ma statisticamente significativa, tra concentrazioni ematiche di piombo ed aumentata pressione sanguigna; per gli individui maschi tra i 40-59 anni si può parlare di un'associazione più stretta, che mostra un incremento della pressione sistolica in parte superiore rispetto a quella diastolica. Sempre per questo gruppo di persone, tutte le analisi dimostrano praticamente l'esistenza di una relazione positiva, che resta o che diviene significativa ($p < 0,05$) quando si apportano le dovute correzioni per la posizione geografica. Quantitativamente, la relazione sembra sussistere in un ampio intervallo di valori relativi alle concentrazioni ematiche del piombo, fino a quelle più basse di $7 \mu\text{g/dL}$ nei soggetti di età media. Un aumento stimato di circa 1,5-3,0 mmHg nella pressione sanguigna sistolica di uomini adulti si verifica ogni volta che le concentrazioni ematiche del metallo raddoppiano; per le donne invece è inferiore a 1,0-2,0 mmHg (Tyroler, 1988). Il piombo è in grado di influire sulla pressione sanguigna alterando la sensibilità della muscolatura liscia vascolare nei confronti degli stimoli vasoattivi o, indirettamente, alterando il segnale neuroendocrino diretto alla stessa muscolatura. I soggetti esposti al piombo possono presentare un'attività della renina plasmatica superiore rispetto alla norma, durante i periodi di esposizione moderata, ma questa attività torna alla norma o risulta depressa in caso di pesanti esposizioni croniche (Vander, 1988). Boscolo et al.(1981) hanno

riscontrato un legame debole ma significativo tra la renina del plasma e la callicreina delle urine in uomini esposti al piombo per lavoro. L'esposizione può alterare le funzioni delle fibre del muscolo liscio vascolare attivate dal calcio, inclusa la capacità contrattile, mediante una riduzione dell'attività della ATPasi Na^+/K^+ sia dello stimolo della pompa di scambio Na^+/K^+ .

Cancerogenicità

Il piombo è stato classificato tra i composti cancerogeni 2B della IARC (1987). Le prove sono evidenti negli animali ma non nell'uomo. Molti anni fa era stato effettuato uno studio su lavoratori inglesi esposti al piombo, che non dimostrò un aumento dell'incidenza del cancro (Dingwall-Fordyce e Lane, 1963). Tra le cause di mortalità di 7000 uomini che lavoravano a contatto con il piombo, negli U.S.A., l'incidenza di cancro era lievemente superiore (Cooper e Gaffey, 1975) ma la significatività statistica di questi risultati è stata messa in discussione (Cooper, 1980; Kang et al., 1980). Il tumore più diffuso interessava l'apparato respiratorio ed il sistema digerente, non il rene. Tuttavia si sono verificati casi di adenocarcinoma renale in persone che avevano lavorato per lungo tempo a contatto con il piombo (Baker et al., 1980; Lilis, 1981). La proliferazione delle cellule epiteliali tubulari, stimolata dai composti del piombo (Choie e Richter, 1980) ed altri effetti simili, sono stati osservati nel fegato dei ratti (Columbano et al., 1983). Queste sostanze inducono la trasformazione delle cellule embrionali dei criceti "Syrian" (Di Paolo e Casto, 1979; Zelikoff et al., 1988). L'induzione da piombo dell'adenocarcinoma renale nei ratti e nei topi dipende dalla dose e non è stata osservata a livelli inferiori a quelli che causano nefrotossicità (EPA, 1989a). La patogenesi dei tumori renali dovuti al piombo può essere associata ad un effetto genetico diretto sulle cellule tubulari, ma può anche essere una risposta non specifica all'iperplasia epiteliale, come è stato osservato in altri tipi di nefropatie indotte sperimentalmente ed in disturbi che colpiscono gli uomini, caratterizzate da cisti e iperplasia tubulari (Bernstein et al., 1987).

Altri effetti

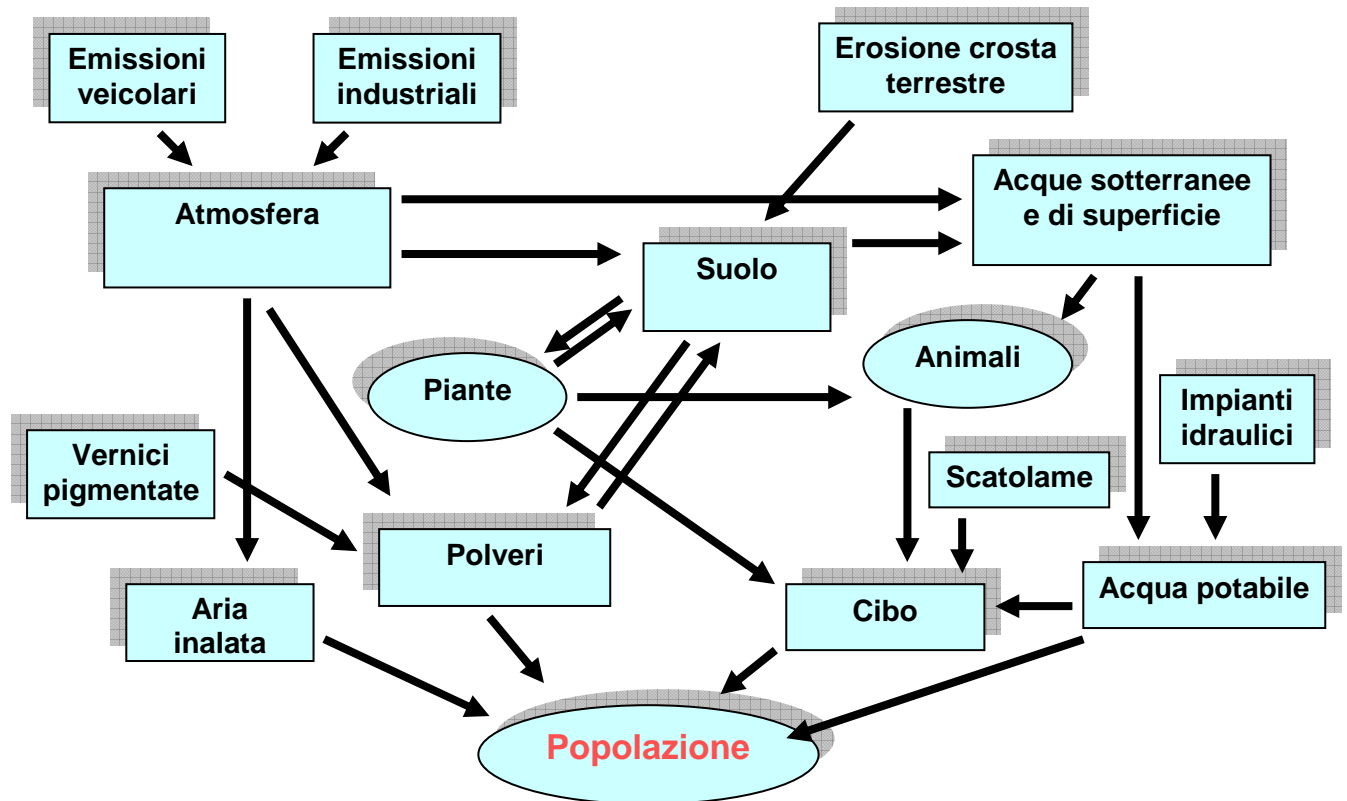
E' noto che una grave intossicazione da piombo provoca sterilità, aborto ed elevata mortalità e morbilità infantile. Alcune ricerche condotte sugli animali, hanno dimostrato che sia i gameti maschili che quelli femminili vengono colpiti dagli effetti tossici. Comunque, nella società moderna, l'impatto dell'esposizione al piombo sul sistema riproduttivo non è ancora stato definito. Durante la vita intrauterina il feto corre il rischio maggiore. I livelli ematici del cordone ombelicale e del sangue materno sono identici ma, dal momento che la sensibilità del feto è notevole, si deve considerare che, durante la gravidanza, la predisposizione agli effetti tossici del piombo è maggiore. In operai che avevano livelli ematici di piombo superiori a 60 µg/dl pochi studi clinici hanno dimostrato un incremento nei difetti cromosomici. Studi sperimentali indicano che il piombo altera il sistema immunitario umorale e che, a basse dosi, induce immunosoppressione in animali da laboratorio, che non manifestano altro segno di tossicità. Le linee prodotte dal piombo (linee di Burton) o la colorazione anomala blu-porpora delle gengive è una caratteristica classica delle intossicazioni gravi dei bambini in cui questo metallo ha già indotto delle encefalopatie. Tuttavia, oggi, non sono più così frequenti i casi da intossicazione da piombo e la presenza di linee sui margini delle epifisi delle ossa lunghe che sono state osservate ai raggi X in bambini molto esposti.

Trattamento

Il trattamento sintomatico negli operai e nei bambini viene di solito effettuato mediante agenti chelanti. Probabilmente tale terapia è necessaria negli operai che hanno livelli ematici di piombo superiori a 60 µg/100 ml, ma questa scelta deve essere eseguita dopo la valutazione dei fattori di esposizione, tra cui le stime biologiche dei parametri clinici e biochimici di tossicità. Per i bambini sono stati stabiliti criteri che possono servire come linee guida nella valutazione di ogni singolo caso (Chisolm e O'Hara, 1982). Tra questi criteri sono compresi i tassi ematici di piombo che vanno dai 30 µg/dL a 60 µg/dL, dipendenti dai livelli dell'eritroporfirina libera (FEP) e i risultati dal test di mobilizzazione del piombo. Inoltre sono state

proposte misure precauzionali per l'uso sicuro degli agenti chelanti, in particolare per il Ca-EDTA (Lilis e Fischbein, 1976). L'azoto urico del siero e la creatinina vengono misurati per controllare la funzionalità renale ed il calcio sierico per monitorare gli effetti dell'EDTA. Quando la terapia d'intervento sui bambini colpiti da encefalopatia per un grave avvelenamento da piombo prevede l'impiego separato di EDTA o BAL, il tasso di mortalità può raggiungere il 25-38%; la loro combinazione è più efficace nel ridurre la mortalità.

RELAZIONE TRA SORGENTI DI METALLI PESANTI E COMUNI VIE DI ESPOSIZIONE UMANA AI METALLI



5.2. Arsenico (As)

L'arsenico (As) è un elemento assai diffuso, anche se non molto abbondante in natura. Allo stato nativo è presente in piccole quantità (spesso in masse compatte microcristalline di colorito giallastro) nei filoni metalliferi di minerali di argento e cobalto; in Italia è stato rinvenuto in Valtellina e in Sardegna (Sarrabus). Più di frequente è presente in natura combinato come solfuro o arseniuro. Tra i solfuri ricordiamo: l'arsenopirite o "Mispickel" ($\text{FeS}_2 \cdot \text{FeAs}_2$) che è il più comune e il più importante tra i minerali di arsenico, il solfuro giallo o rosso "Realgar" (As_4S_4), il solfuro giallo o "Orpimento" (As_2S_3). Tra gli arseniuri i più diffusi sono quelli di cobalto e di nichel (smaltite CoAs_2 , niccolite NiAs). Da ricordare ancora l'ossido di arsenico (As_2O_3) che si rinviene nelle due varietà: arsenolite ("fiori di arsenico") e la claudetite. Per l'industria la principale fonte di arsenico è però rappresentata dai solfuri di diversi metalli (blenda, pirite, galena, etc.) in cui si ritrova in percentuali variabili tra il 2-3% (minerali di rame e di piombo) ed il 7-11% (piriti aurifere). L'arsenico metallico abitualmente si ottiene per riscaldamento, "arrostitimento", a circa 700 °C dell'arsenopirite in assenza di aria; si libera così l'arsenico che sublima. Per quanto riguarda alcune caratteristiche chimiche esso è stabile all'aria secca a temperatura ambiente; in presenza di umidità, sia a caldo che a freddo si ossida in superficie formando una patina color bronzo (trattasi di anidride arseniosa che è un composto arsenicato assai tossico); se riscaldato alla fiamma brucia producendo l'ossido (As_4O_6) che emana un tipico odore agliaceo; reagisce facilmente con lo zolfo con cui forma i solfuri, con molti metalli formando gli arseniuri, con gli alogeni dando gli alogenuri.

Fonti di rischio

Nella metallurgia del rame, piombo zinco, l'arsenico è presente come impurità nei minerali, si libera come anidride arseniosa. L'arsenico metallico trova impiego in diverse leghe per aumentare la fluidità, la lucentezza e la durezza; nella fabbricazione dei piombini da caccia, aggiunto al piombo, facilita l'ottenimento dei pallini con la sfericità richiesta; addizionato al piombo nelle griglie degli accumulatori e per la

copertura di cavi, ne migliora la durezza; cementificato superficialmente sulle lamiere di acciaio le protegge dalla ruggine; aggiunto in piccole al rame ne migliora la resistenza alla corrosione. Nel passato i composti arsenicati sono stati ampiamente utilizzati nell'agricoltura (l'arseniato di calcio come insetticida, l'acido dimetilarsenico e l'arseniato di sodio come diserbanti, l'anidride arsenica gli arsenicati di piombo e di calcio come fungicidi); oggi tale impiego si è notevolmente ridotto visto la tossicità dei prodotti, anche se alcuni continuano ad essere utilizzati, soprattutto gli erbicidi. Arsenico è contenuto anche nelle sigarette, in particolare se il tabacco è stato coltivato in terreni trattati con erbicidi arsenicati. Nell'industria vetraia si utilizza l'ossido di arsenico come chiarificante. I solfuri (realgar e orpimento) si impiegano come pigmenti nei fuochi d'artificio. L'anidride arseniosa è usata per l'imbalsamazione degli animali (protegge le piume e i peli) e per la conservazione delle pelli; i solfuri trovano impiego nelle concerie come depilanti.

Rischio di intossicazione da arsina si può avere nelle operazioni che prevedono l'impiego di acidi per il decapaggio di metalli (quali piombo, zinco, rame ed argento, ecc.) e il trattamento di metalli che contengano arsenico come impurità. Composti organici derivati dall'arsina (vinilarsina o lewsite; difenilammincloroarsina o adamsite; etil e metildicloroarsina; difenildicloroarsina) sono stati prodotti dall'industria bellica e utilizzati come aggressivi chimici. Nell'industria elettronica la trimetilarsina viene impiegata per la produzione di semiconduttori. Nell'industria dei coloranti venivano usati in passato come pigmenti composti arsenicati (es. acetoarsenite di rame o "verde Parigi").

Anche l'impiego di prodotti arsenicati per scopi terapeutici è ormai estremamente limitato; diversi derivati, soprattutto organici, sono stati utilizzati nella terapia di parassitosi, della lue e della psoriasi.

L'uomo inoltre può assumere una notevole quantità di arsenico con l'alimentazione (cibi e acque contaminate); anche alcuni organismi marini possono contenere elevati livelli di arsenico organico, peraltro dotato di scarsa tossicità.

Metabolismo

In campo professionale l'arsenico inorganico (l'esposizione riguarda soprattutto l'anidride arseniosa) viene introdotto nell'organismo prevalentemente per inalazione come polveri e vapori. L'assorbimento nel tratto respiratorio dipende dalle dimensioni e dalla solubilità delle particelle inalate; negli esposti è possibile la ritenzione nei polmoni anche per diversi anni. È possibile, anche se non frequente, l'introduzione attraverso la cute, soprattutto se questa non è integra. L'introduzione per via digestiva si verifica, oltre che con l'alimentazione (acqua e/o cibi contaminati), a scopo suicida o omicida interessando in questo caso la medicina forense. In ambiente di lavoro l'introduzione per via orale è possibile per la mancata osservanza delle comuni norme igieniche (es. mani sporche). La maggior parte dell'arsenico organico ingerito viene assorbito dal tratto gastroenterico in poche ore; nel caso del triossido di arsenico, poco solubile in acqua, l'assorbimento è più lento e dipende dalla dimensione delle particelle e dal pH gastrico; i composti organici sono assorbiti rapidamente. Da notare che per la diffusione di arsenico in natura l'uomo ne ingerisce regolarmente una piccola quantità (valutabile in circa 0,01-0,02 mg al giorno nei soggetti che consumano pesci e crostacei).

Una volta assorbito l'arsenico passa rapidamente nel sangue (dove in parte si fissa alle proteine plasmatiche), quindi si distribuisce nei vari organi e specialmente nel fegato, reni, ossa, cute e annessi (tende ad accumularsi particolarmente nelle unghie e nei capelli).

Nel caso di assorbimento di arsenico inorganico, l'organismo mette in atto un processo di detossificazione che consiste nella mutilazione sia dell'arsenico trivalente, sia di quello pentavalente (probabilmente dopo riduzione alla forma trivalente); la biotrasformazione avviene a livello epatico e dà luogo alla formazione di acido monometilarsonico (MMA) e dimetilarsinico (DMA) che come tali vengono escreti. L'efficienza della mutilazione si riduce con l'aumento della dose di esposizione.

Effetti tossici

L'intossicazione **acuta** è assai rara in ambiente lavorativo, per lo più è legata ad eventi accidentali che comportano l'inalazione di polveri e vapori contenenti arsenico. I primi sintomi sono dovuti ad un'azione irritativa sulle mucose, in particolare oculari (congiuntive) e laringo-bronchiali (dispnea, tosse stizzosa, dolori toracici); si ha quindi un interessamento del sistema nervoso (cefalea, vertigini, dolore alle estremità) e dell'apparato digerente (nausea, vomito, diarrea, dolori addominali). Nel caso di inalazione di arsina, dopo circa 24 ore si hanno: cefalea, vertigini, nausea, vomito, dolori addominali e lombari, grave anemia emolitica, emoglobinuria; dopo circa 24 ore, per la precipitazione dell'emoglobina a livello del tubulo renale, si ha una necrosi tubulare acuta con oliguria (iperazotemia, albuminuria, cilindruria), quindi anuria. L'exitus può intervenire per l'insufficienza renale, per collasso cardiocircolatorio ed edema polmonare. Se il soggetto sopravvive può andare incontro ad insufficienza renale cronica e si può verificare una neuropatia periferica. I derivati organici dell'arsina hanno un'azione acuta fortemente irritante sulle mucose e vescicante sulla cute, e proprio per tale ragione sono stati utilizzati per scopi bellici. Le intossicazioni acute per ingestione di composti arsenicati riguardano, come già accennato, la tossicologia generale e quella forense in particolare. La sintomatologia insorge rapidamente con predominanza del quadro gastroenterico (secchezza e bruciore delle mucose orali, vomito, diarrea imponente "coleriforme"); si ha quindi una disidratazione, collasso cardiocircolatorio, insufficienza renale acuta; nei casi più gravi la morte dell'individuo sopraggiunge in 1-2 giorni.

L'intossicazione **cronica** può aversi, oltre che in lavoratori professionalmente esposti, in popolazioni che assumono alimenti e/o bevande contaminate, oppure che sono residenti in aree industriali a rischio. L'intossicazione per prolungate terapie con farmaci arsenicati si può considerare un retaggio del passato.

La cute e annessi rappresentano organi critici nell'intossicazione da composti inorganici (l'arsenico tende ad accumularsi a livello cutaneo, probabilmente per un particolare tropismo verso i gruppi sulfidrilici della cheratina).

Il triossido di arsenico e l'arseniato di sodio nelle zone più esposte possono esercitare un'azione locale da contatto irritante che si manifesta con lesioni eritemato-vescicolose.

In rapporto all'entità e alla durata dell'esposizione, i composti arsenicati determinano una diffusa iperpigmentazione (melanodermia arsenicale) interessante soprattutto il viso e il tronco, con presenza di aree acromiche che possono assumere un aspetto detto "a goccia di pioggia". Caratteristiche delle intossicazioni croniche sono le ipercheratosi; trattasi di formazioni papulari multiple di piccole dimensioni (2-10 mm), di colorito giallastro, che possono confluire a formare placche di tipo verrucoso, preferenzialmente localizzate al palmo delle mani e alla pianta dei piedi. Le ipercheratosi arsenicati vengono considerate delle precancerosi. A carico degli annessi sono state descritte alopecia, circoscritte o diffuse; a livello delle unghie si possono osservare (anche se ormai molto di rado) strie grigio chiaro (bande di Mees) che determinano un'iperfragilità ungueale).

Le lesioni delle mucose consistono in congiuntiviti, cheratocongiuntiviti, ulcerazioni corneali, riniti con ulcerazioni che possono portare alla perforazione del setto nasale, faringotracheobronchite.

Le alterazioni del sistema nervoso periferico, assai rare da osservare in campo occupazionale, consistono in una polinevrite sensitivo motoria che, nei casi più gravi, interessa i quattro arti, progredisce verso una tetraplegia fino a dare paralisi ascendente con interessamento tronco-bulbare. Sono state riportate anche alterazioni elettromiografiche.

A carico dell'apparato cardiocircolatorio sono state descritte turbe elettrocardiografiche della conduzione e della fase di ripolarizzazione e, a livello periferico, alterazioni vasospastiche riconducibili al fenomeno di Raynaud, fino a lesioni di tipo necrotico a carico delle falangi distali. In lavoratori esposti a rischio da arsenico è stato osservato un incremento di mortalità per affezioni cardiovascolari. Il fegato può essere interessato da fenomeni degenerativi che possono evolvere in cirrosi. A carico del sangue si può avere un quadro di anemia, leucopenia, trombocitopenia.

Azione cancerogena

È ben noto da tempo che l'arsenico può indurre tumori alla cute; trattasi di epitelomi spinocellulari ed epitelomi basocellulari (meno maligni) che insorgono dopo molti anni (10-20 o più) dall'inizio dell'esposizione e che si localizzano soprattutto nelle zone cutanee con melanodermia o ipercheratosi.

Anche per quanto riguarda il cancro del polmone è stata evidenziata una relazione causa-effetto tra esposizione ad arsenico ed insorgenza del tumore in diversi studi epidemiologici riguardanti lavoratori di fonderie di rame, addetti alla produzione di pesticidi, vignaioli e anche popolazioni generali residenti in prossimità di fonderie di piombo, rame e zinco. È stato osservato che l'esposizione all'arsenico e il fumo di sigaretta avrebbero un effetto moltiplicativo sull'insorgenza di tumori del polmone.

Diagnosi

La diagnosi dell'intossicazione conclamata, sempre più rara in ambito professionale, si basa sulla valutazione dei dati clinico-anamnestici e degli esami di laboratorio. Per il monitoraggio biologico dei lavoratori esposti viene proposto il dosaggio dell'arsenico nelle urine (AsU). Il test costituisce un indicatore di esposizione in corso o comunque recente, dal momento che la cinetica di eliminazione dell'arsenico è, come già si è detto, molto rapida (emivita di 1-2 giorni). Per tale ragione il prelievo deve essere effettuato al termine del turno di lavoro (comunque entro 16 ore dalla fine dell'esposizione). Sui livelli dell'arsenico urinario può interferire l'alimentazione, e più specificamente il consumo di pesci e crostacei, per l'elevato contenuto in essi di composti organo arsenicati; per cui dovendosi valutare un'esposizione occupazionale è necessario prescrivere l'astensione del consumo di cibi marini per i 2-3 giorni precedenti l'esame. Inoltre per stabilire l'origine dell'assorbimento (alimentare o industriale) è opportuno, sull'arsenico urinario totale, differenziare le frazioni che provengono dall'introduzione dell'As inorganico (di origine professionale) e cioè MMA e DMA; nel caso di esposizione

professionale queste tre frazioni complessivamente rappresentano l'80-90% dell'arsenico totale.

Terapia

Nelle intossicazioni acute per ingestione è necessario praticare un immediato lavaggio gastrico e correggere lo squilibrio idro-elettrolitico.

È indicata quindi la somministrazione di antidoti quale il B.A.L. (British Anti Lewsite) o Dimercaptopropanolo che, per la presenza nella molecola di gruppi sulfidrilici, agisce con meccanismo competitivo in confronto ai gruppi SH dell'organismo, chelando l'arsenico. Il B.A.L. viene somministrato per via intermuscolare alla dose di 3 mg/kg ogni quattro ore per i primi due giorni, quindi ogni dodici ore, per un totale di 10 giorni. Per gli effetti collaterali che tale farmaco può indurre (reazioni di intolleranza, crisi ipertensive, aumento della concentrazione di arsenico a livello celebrale) si preferisce oggi usare altri chelanti quali l'acido 2-3 dimercaptopropansulfonico (DMPS) e soprattutto l'acido dimercaptosuccinico (DMSA) che risultano decisamente meno tossici del B.A.L. Il DMSA viene somministrato per via orale alla dose di 300 mg ogni 6 ore per una settimana. I chelanti trovano utile impiego anche nelle intossicazioni croniche per favorire l'eliminazione dell'arsenico. Nel caso di lesioni cutanee da contatto è consigliabile l'applicazione di B.A.L. al 10% in pomata. Nei soggetti con intossicazione acuta da arsina è necessario intervenire rapidamente per correggere lo squilibrio idroelettrolitico e l'acidosi metabolica; sono inoltre indicate l'ossigenoterapia, le emotrasfusioni ed il trattamento dell'eventuale blocco renale mediante dialisi. Nei casi meno gravi per prevenire i postumi dell'intossicazione, può risultare utile il trattamento con acido dimercaptosuccinico per os alla dose di 30 mg/kg al giorno (Casula et al., 1993).

5.3. Uranio (U)

È un metallo bianco-argenteo, tossico e radioattivo; appartiene alla serie degli attinidi ed il suo isotopo ^{235}U trova impiego come combustibile nei reattori nucleari e nella realizzazione di armi nucleari. Tracce di uranio sono presenti ovunque: nelle rocce, nel suolo, nelle acque, persino negli organismi viventi.

Caratteristiche

Puro, l'uranio si presenta come un metallo bianco-argenteo, lievemente radioattivo e di poco più tenero dell'acciaio. È malleabile, duttile e debolmente paramagnetico. È un metallo molto denso (65% più denso del piombo). Diviso finemente, reagisce con l'acqua a temperatura ambiente; esposto all'aria si copre superficialmente di uno strato del proprio ossido. L'uranio metallico si presenta in tre forme allotropiche:

- α - ortorombico, stabile fino a $667,7^{\circ}\text{C}$
- β - tetragonale, stabile a temperature comprese tra $667,7$ e $774,8^{\circ}\text{C}$
- γ - cubico a corpo centrato, stabile a temperature comprese tra $774,8^{\circ}\text{C}$ ed il punto di fusione, è la forma più duttile e malleabile delle tre.

L'isotopo ^{235}U è importante sia per i reattori che per le armi nucleari perché è l'unico isotopo fissile esistente in natura in quantità apprezzabili. Anche ^{238}U può trovare impiego nei reattori nucleari, dove viene convertito in ^{239}U per assorbimento di neutroni termici, il quale decade in ^{239}Pu , fissile. Anche l'isotopo ^{233}U è fissile; viene prodotto per bombardamento con neutroni di ^{232}Th . L'uranio fu il primo elemento fissile scoperto in natura; questa proprietà lo rende la principale materia prima per la bomba atomica e la costruzione e l'alimentazione di reattori nucleari. L'uranio si estrae da due minerali: la Uraninite (detta anche Pechblenda) e la Carnotite. L'uranio è importante anche per la datazione radiometrica dei fossili: l'uranio 238 si trasforma in piombo 206 in 4.510.000.000 di anni.

Isotopi

L'uranio naturale è composto da una miscela di tre isotopi, ^{234}U , ^{235}U , e ^{238}U , di cui ^{238}U è il più abbondante (99,3%). Questi tre isotopi sono radioattivi; il più stabile è ^{238}U (emivita: $4,5 \times 10^9$ anni), seguono ^{235}U (7×10^8 anni) e ^{234}U ($2,5 \times 10^5$ anni). ^{238}U emette particelle alfa decadendo in ^{206}Pb .

L'attività naturale degli isotopi ^{234}U e ^{238}U , che praticamente coincide con quella dell'uranio estratto allo stato naturale, è quantificabile in 12,4 kBq/g (1 Becquerel (Bq) rappresenta un processo di disintegrazione al secondo), classificandosi nella fascia di rischio più bassa tra gli isotopi radioattivi. L'attività dell'isotopo ^{235}U è molto inferiore, ed è pari a 0,6 kBq/g. Va necessariamente precisato, tuttavia, che il rischio indotto dalla radioattività dipende essenzialmente dalla concentrazione dell'isotopo di uranio nell'ambiente (misurata ad esempio in kBq/cm³), piuttosto che dalla sua attività intrinseca. Gli isotopi dell'uranio vengono separati per aumentare la concentrazione di ^{235}U rispetto a ^{238}U ; questo processo è chiamato *arricchimento*. L'uranio si considera "arricchito" quando la frazione di ^{235}U è considerevolmente maggiore del livello naturale (circa lo 0,7%), tipicamente su valori compresi tra il 3% ed il 7%. ^{235}U è il tipico materiale fissile per i reattori nucleari; sia ^{235}U che ^{239}Pu sono usati per la produzione di armi nucleari.

Arricchimento dell'uranio

Per ottenere un materiale fissile che sia adatto a scopi nucleari, cioè che emetta una quantità sufficiente di neutroni, è necessario aumentare la concentrazione dell'isotopo ^{235}U rispetto al più comune e meno radioattivo ^{238}U . La concentrazione di ^{235}U deve passare dallo 0,71% al 3,2% per i reattori nucleari ad acqua bollente (*BWR*) e del 3,6% per quelli ad acqua pressurizzata (*PWR*). Il processo di concentrazione dell'uranio è un compito estremamente difficile: non è possibile separarli per via chimica, e l'unico modo è sfruttare la piccolissima (meno dell'1,5%) differenza di peso. Per fare questo si fa reagire l'uranio metallico con fluoro ottenendo esafluoruro di uranio (UF_6), un composto solido bianco, che sublima in fase gassosa al di sopra di

56,4 °C. Questo composto viene usato nei due più comuni processi di arricchimento, l'arricchimento per diffusione gassosa (utilizzata soprattutto negli Stati Uniti) e quello per centrifugazione del gas (principalmente utilizzato in Europa). Allo stato attuale è in corso di sviluppo presso il Dipartimento dell'Energia americano una terza tecnologia di arricchimento chiamato a *separazione laser*, ancora in fase di studio. Un quarto metodo di arricchimento è quello della separazione termica, che però è meno efficiente delle tecnologie attuali e non viene più utilizzato. Dopo l'arricchimento l'esafluoruro viene decomposto, riottenendo uranio metallico e fluoro gassoso, dopodiché è ossidato a formare diossido di uranio UO_2 e quindi fuso in barre metalliche che andranno poi a costituire il combustibile del reattore nucleare.

Il processo di arricchimento produce enormi quantità di uranio impoverito, ossia uranio cui manca la corrispondente quantità di ^{235}U . L'uranio si considera *impoverito* quando contiene valori di ^{235}U generalmente compresi tra lo 0,2% e lo 0,3%, a seconda delle esigenze economiche e di produzione. Per dare un'idea della tipica proporzione tra la uranio arricchito e uranio impoverito, da 100 kg di uranio metallico pronto per l'arricchimento si possono ottenere al massimo 12,5 kg di uranio arricchito al 3,6% e 87,5 kg di uranio impoverito allo 0,3%. L'uranio impoverito viene generalmente stoccato come UF_6 (che, come detto sopra, è un solido cristallino) amalgamato in cilindri di acciaio che ne contengono circa 12-13 tonnellate (secondo le procedure standard degli Stati Uniti).

Applicazioni

L'uranio trova applicazione in due sue possibili forme: uranio arricchito ed uranio impoverito. Non è semplice fare una distinzione netta tra applicazioni civili e militari, in quanto esiste una permeabilità tra questi due utilizzi. Ad esempio, l'uranio arricchito può essere usato come combustibile nei reattori nucleari civili, ma anche nei reattori nucleari dei sottomarini e delle portaerei militari a propulsione nucleare.

L'uranio è un metallo molto denso e pesante. Nonostante la radioattività naturale dell'uranio, grazie al suo elevato peso specifico, trova impiego come materiale di

zavorra e contrappesi di equilibratura in aerei, elicotteri, e in alcune barche a vela da regata. A volte è impiegato anche per costruire schermature di sorgenti altamente radioattive (soprattutto nel campo della radiografia industriale per la schermatura dei raggi gamma). Il piombo è un materiale con caratteristiche simili (e non radioattivo), che tuttavia è meno utilizzato dell'uranio per questi scopi. Nel settore civile il principale impiego dell'uranio è l'alimentazione dei reattori delle centrali elettronucleari, dove viene usato un uranio arricchito al 2-3% di ^{235}U . Esistono anche reattori come il canadese CANDU che possono essere alimentati da uranio naturale non preventivamente arricchito.

Tra gli altri usi si annoverano:

- l'inclusione di sali di uranio nelle ceramiche e nei vetri, per colorare le prime e impartire una fluorescenza gialla o verde ai secondi;
- la datazione delle rocce ignee ed altri metodi di datazione geologica quali la datazione uranio-torio e uranio-piombo attraverso la misura della concentrazione di ^{238}U , la cui emivita è di circa 4,51 miliardi di anni;
- l'acetato di uranile, $\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2$, trova impiego in chimica analitica; forma con il sodio un sale insolubile;
- il nitrato di uranio è usato in fotografia;
- in chimica l'uranio è utilizzato come catalizzatore in alcune reazioni;
- i fertilizzanti fosfatici di origine minerale possono contenere quantità di uranio relativamente alte, se questo è presente come impurezza nei minerali di partenza;
- l'uranio metallico trova uso in dispositivi a guida inerziale e nelle bussole giroscopiche.

In tutte queste applicazioni (tranne che per l'uso come combustibile nelle centrali nucleari) non è importante che si utilizzi uranio naturale oppure uranio impoverito.

Ad ogni modo, il Dipartimento dell'Energia americano rileva che tutti gli impieghi civili dell'uranio non sono finora riusciti a ridurre in modo sostanziale le scorte di uranio impoverito accumulate negli ultimi decenni dalle centrali nucleari di tutto il mondo. Gran parte dell'uranio impoverito viene quindi dirottato sul settore militare oppure è stoccato in permanenza in depositi del sottosuolo.

Applicazioni militari

La principale applicazione militare dell'uranio è, nella sua forma arricchita nell'isotopo ^{235}U , come massa di reazione all'interno delle bombe atomiche o come innesco per le bombe termonucleari. Va ricordato, inoltre, che parte dell'uranio arricchito prodotto nelle nazioni nucleari più avanzate viene utilizzato come combustibile per i reattori ospitati in navi e sottomarini da guerra, rappresentando di fatto un utilizzo indiretto di questo elemento per fini bellici.

L'altra importante applicazione militare dell'uranio si basa sul cosiddetto uranio impoverito, ovvero uranio in cui la percentuale di ^{235}U è stata artificialmente ridotta (mediamente contiene lo 0,25-0,4% di ^{235}U , vedi oltre nello stesso articolo). L'uranio è un metallo molto denso e pesante, e proprio per questo viene utilizzato per rendere le corazzature dei carri armati particolarmente resistenti e per costruire munizioni anticarro (al posto del più costoso e meno efficiente tungsteno). Essendo la produzione di uranio impoverito strettamente collegata al processo di arricchimento dell'uranio naturale, del quale costituisce un sottoprodotto, solo gli Stati in grado di arricchire l'uranio possiedono notevoli quantità di uranio Impoverito. L'Italia non possiede scorte significative di questo materiale.

Un altro sottoprodotto importante con valore militare dell'uranio è il plutonio, che viene prodotto dalle reazioni nucleari che hanno luogo nella fissione del ^{235}U all'interno dei reattori nucleari. Il plutonio viene utilizzato per costruire ordigni nucleari e come combustibile nei reattori nucleari al plutonio come il francese Superphenix.

Disponibilità in natura

L'uranio è un elemento che si trova in natura, in basse concentrazioni, praticamente in tutte le rocce, in tutti i terreni e nelle acque. Viene considerato più abbondante dell'antimonio, del berillio, del cadmio, dell'oro, del mercurio, dell'argento, del tungsteno; ha circa la stessa abbondanza dell'arsenico e del molibdeno.

Si trova in molti minerali, come l'uraninite (o pechblenda, il minerale di uranio più comune), l'autunite, la carnotite, l'uranofano, la torbernite e la coffinite. Si possono riscontrare concentrazioni di uranio significative anche in alcune sostanze come depositi di rocce fosfatiche e minerali come la lignite e la sabbia di monazite in minerali madre ricchi di uranio (viene estratto commercialmente anche da queste fonti). Si ipotizza che la principale fonte del calore che mantiene liquido il nucleo della Terra e il soprastante mantello provenga dal decadimento dell'uranio e dalle sue reazioni nucleari con il torio nel nucleo della terra, generando così la tettonica a zolle.

I minerali di uranio, perché l'estrazione mineraria di uranio sia remunerativa, devono contenere una concentrazione minima di ossido di uranio U_3O_8 che va dallo 0,05% al 0,2%.

Produzione e distribuzione

L'uranio viene prodotto industrialmente per riduzione dei suoi alogenuri con metalli alcalini o alcalino-terrosi. Può anche essere prodotto per elettrolisi di KUF_5 o UF_4 sciolti in $CaCl_2$ o $NaCl$ fuso. L'uranio metallico ad alta purezza viene ottenuto per decomposizione termica di alogenuri di uranio su un filamento rovente.

Da 1 kg di ossido di uranio si ricavano circa 840 g di uranio metallico adatto al processo di arricchimento. Si stima (World Nuclear Association) che dai giacimenti dispersi in tutto il mondo si possano estrarre in totale circa 4,2 milioni di tonnellate di ossido di uranio. Allo stato attuale (Cameco, 2005), la produzione mondiale annua di uranio metallico si aggira intorno alle 41.600 tonnellate. L'uranio è distribuito sul

pianeta in maniera poco uniforme; anche se giacimenti di dimensioni minori possono essere trovati praticamente ovunque, tre soli paesi (l'Australia, il Canada e il Kazakhstan) contengono circa il 58% delle riserve note. Questi tre paesi sono anche i principali produttori di uranio (dati 2006). L'Australia possiede ampi giacimenti (formati soprattutto da carnotite), che rappresentano circa il 28% delle riserve del pianeta. La sua produzione è aumentata di quasi il 40% negli ultimi 4 anni (9519 tonnellate di uranio metallico estratte nel 2005), quasi raggiungendo il Canada. Il più grande singolo deposito di uranio del mondo è presso la *Olympic Dam Mine* nello stato dell'Australia Meridionale. In Australia si trovano anche la seconda e la terza miniera di uranio per estrazione (la miniera *Ranger*, che è la maggiore miniera di uranio a cielo aperto del mondo, e la già citata *Olympic Dam*). L'Australia ha in progetto di triplicare l'estrazione di uranio dalla *Olympic Dam* nei prossimi anni.

Il Kazakhstan ha aumentato del 55% l'estrazione di uranio negli ultimi 4 anni, passando dal quinto al terzo posto nei produttori dal 2002 al 2006 (4357 tonnellate di uranio metallico estratte nel 2005). Attualmente è in progetto l'apertura di 7 nuove miniere nel sud del paese; questa nazione aspira a diventare il primo produttore mondiale entro il 2010. Si stima che il territorio del Kazakhstan contenga riserve note di ossido di uranio per 750.000 tonnellate, il 18% del totale, e che altrettante siano ancora da scoprire nel sottosuolo di questo paese. Il Canada possiede ricchi giacimenti in Saskatchewan (formati soprattutto da pechblenda costituiscono il 12% delle riserve mondiali), dove dalle tre miniere del *McArthur River*, del *Rabbit Lake* e del *McClellan Lake* si estrae circa il 28% della produzione mondiale (11628 tonnellate nel 2005, più o meno costante negli ultimi anni). La miniera del *McArthur river* è anche la più grande miniera di uranio del mondo. Le altre due miniere sono relativamente recenti e si ritiene che la loro produzione dovrebbe aumentare significativamente nei prossimi anni. Inoltre il Canada dovrebbe aprire due nuove miniere (*Cigar Lake* e *Midwest*) nel 2007. Questa sovrapproduzione unita al controllo governativo sulla produzione ha un forte peso nel determinare il prezzo dell'uranio sui mercati internazionali. Gli altri principali paesi estrattori (dati 2005) sono la Russia (4% delle riserve mondiali e 3431 tonn. estratte nel 2005), la Namibia (6% riserve e

3147 tonn. estratte con la miniera a cielo aperto di *Rossing*, la quarta del mondo), il Niger (2% riserve e 3093 tonn.), l'Uzbekistan (4% riserve e 2300 tonn.) e gli Stati Uniti (3% riserve e 1039 tonn., concentrati negli stati del Wyoming e del Nebraska). Giacimenti importanti e poco sfruttati si trovano in Sudafrica (che ha l'8% delle riserve mondiali ed ha appena iniziato a sfruttarle con il sistema del reattore a letto di ciottoli), in Brasile (4% delle riserve) e in Mongolia (2% delle riserve). I depositi di minerali di uranio scoperti più di recente (2005) si trovano in Canada, India centrale, Nigeria e Zimbabwe. Esplorazioni e prospezioni per individuare nuovi giacimenti sono in corso in Canada, Sudafrica, Kazakistan, Mongolia e nella Repubblica Democratica del Congo. In Italia è stata scoperta negli anni '50 una piccola miniera di uranio nei pressi di Novazza (a circa 40 km a nord est di Bergamo), da cui si ritiene che si possano ricavare in tutto circa 1300 tonnellate di ossido di uranio. La miniera non è mai stata sfruttata (qualche progetto elaborato negli anni '70 non è andato a buon fine), anche se si pensa che dal 2007 dovrebbero iniziare alcune valutazioni preliminari per decidere se l'estrazione del minerale sia conveniente.

Precauzioni

Tutti i composti e gli isotopi dell'uranio sono tossici e radioattivi ad un livello potenzialmente letale. A dosi non letali, la tossicità chimica dell'uranio può comunque produrre danni all'organismo: inalato in genere sotto forma di ossido (altamente solubile), l'uranio si discioglie nei liquidi delle mucose polmonari, ed entra rapidamente nel sangue. Nonostante gran parte dell'uranio assorbito venga espulso con le urine, la parte che non viene eliminata si accumula nelle ossa e soprattutto nei reni; le conseguenze di questo accumulo producono effetti tipici dell'avvelenamento da metalli pesanti: dermatiti, gravi degenerazioni dei reni, necrosi delle arterie.

I danni da radiazione sono permanenti; l'uranio fissato nelle ossa e nei vari organi attraversati irraggia le cellule circostanti, con effetti particolarmente gravi sul midollo osseo. Inoltre le particelle inalate che non finiscono nel sangue possono restare nelle vie respiratorie per lungo tempo. L'uranio non viene assorbito attraverso la pelle; le particelle alfa che emette non sono in grado di attraversare la pelle, ciò rende l'uranio

esterno al corpo molto meno pericoloso di quello inalato o ingerito. Una persona può essere esposta all'uranio sia inalandone le polveri nell'aria che ingerendolo con il cibo e con l'acqua; si calcola che l'assunzione media quotidiana di uranio sia compresa tra 0,7 e 1,1 microgrammi. Persone che vivono in aree vicine a poligoni nucleari o a miniere che ne lavorano i minerali possono essere esposte a livelli di radioattività più elevati per via della produzione di polveri sottili e radon che vengono trasportati dai venti nelle zone circostanti. Per la stessa ragione, senza un'adeguata ventilazione i lavoratori delle miniere sono esposti ad un elevato rischio di contrarre il cancro o altre malattie polmonari. Anche le acque usate dalle miniere per il trattamento del minerale possono diventare veicolo di contaminazione per le aree vicine. Ricerche condotte nel 2005 dall'Arizona Cancer Center su sollecitazione della Nazione Navajo, in cui sono ubicate alcune miniere di uranio, hanno scoperto capacità mutagene di questo elemento, che è in grado di penetrare nel nucleo cellulare e legarsi chimicamente al DNA, alterandolo e provocando errori nella produzione delle proteine, e portare le cellule in stato precanceroso. Gli edifici costruiti su depositi di uranio (siano essi giacimenti o depositi di scorie) rischiano una elevata esposizione al radon che da essi si libera.

6. Materiali e metodi

6.1. Composizione del campione

Il campionamento è stato effettuato tra i mesi di Aprile e Giugno 2007. Il campione è composto da 129 bambini: 56 di Perdasdefogu (31 maschi e 25 femmine), circa l'88% della popolazione scolare, e 73 di Jerzu (27 maschi e 46 femmine), circa l'80% della popolazione scolare. I soggetti campionati, previa autorizzazione scritta dei genitori, frequentavano la Scuola Media inferiore dei rispettivi Comuni. L'età dei soggetti campionati è compresa tra gli 11 ed i 14 anni.

6.2. Metodologia per l'analisi dei metalli contenuti nel sangue e nelle urine

Per la determinazione quantitativa dei livelli di Piombo, Arsenico ed Uranio presenti nel sangue e nelle urine dei bambini campionati, residenti nei Comuni di Perdasdefogu e Jerzu, è stata utilizzata la metodica suggerita dall'Environmental Protection Agency (EPA, 1998).

6.3. Metodologia per l'analisi dei metalli contenuti nei capelli

Per la determinazione quantitativa dei livelli di Piombo, Arsenico ed Uranio presenti nei capelli dei bambini campionati, residenti nei Comuni di Perdasdefogu e Jerzu, è stata utilizzata la metodica suggerita dall'Istituto Superiore di Sanità (Senofonte et al., 1989; Caroli et al., 1992; Sanna et al., 2003).

6.4. Determinazione strumentale

Nell'ambito di questo lavoro di ricerca è stato utilizzato uno spettrometro ICP-MS Hewlett Packard mod. 4500 dotato di autocampionatore da 50 posti per analisi quantitativa di un elevato numero di elementi metallici e non metallici in varie matrici di cui è riportata qui di seguito una descrizione.

Caratteristiche:

ICP Source:	27.12 MHz
Ion Focussing System:	Off-axis lens
Quadrupole Radio Frequency:	3.0 MHz
Detector:	Electron Multiplier
Mass Range:	2 amu to 260 amu
Detection Limit:	sub-ppt for most elements
Linear Dynamic Range:	8 orders of magnitude

7. Tecnica di spettrometria di massa accoppiata al plasma induttivo (ICP-MS)

L'ICP-MS (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry) è una tecnica che interfaccia una sorgente a plasma accoppiato induttivamente con uno spettrometro di massa. In questo strumento gli ioni, prodotti in una torcia ICP convenzionale, sono introdotti in uno spettrometro di massa a quadrupolo che li separa in virtù del diverso rapporto massa/carica. Gli ioni di ogni specifico rapporto massa/carica sono quindi rivelati e quantificati da un detector. Gli spettri così generati sono costituiti da una serie di picchi isotopici che possono essere impiegati sia per misure qualitative sia per misure quantitative.

La tecnica dell'ICP-MS nasce negli anni '80 specificatamente per lo studio delle terre rare (lantanidi). Ad oggi rappresenta una tecnica che offre una serie di vantaggi indiscutibili nell'analisi multielementare di elementi in traccia ed ultratraccia. La sua versatilità consente lo studio di svariate tipologie di matrici e ne permette l'utilizzo in numerose discipline e campi d'applicazione (scienze ambientali, geologia, idrologia, biologia, chimica, scienze dei materiali, archeologia, agricoltura, scienze dell'alimentazione, medicina, farmacologia, etc.).

La caratteristica peculiare dell'ICP-MS è la possibilità di analizzare in modo accurato e preciso, con un limitato consumo di campione, gran parte degli elementi della tavola periodica, raggiungendo limiti di detezione compresi tra le ppt e le ppm.

La sensibilità di questa tecnica permette di raggiungere limiti di detezione inferiori a quelli ottenuti con altre tecniche (es. ICP-OES, AAS, etc.), quanto meno equiparabili o migliori di quelli tipici della GFAA (Graphite Furnace Atomic Absorption) che è comunque una tecnica maggiormente votata all'analisi monoelementare.

Un altro vantaggio della tecnica dell'ICP-MS, che ne rafforza potenzialità e versatilità, è la possibilità di accoppiare l'ICP-MS stesso ad altre tecniche strumentali quali l'HPLC, e a vari sistemi d'introduzione e manipolazione del campione (es. Laser Ablation, generazione di idruri, etc.).

Inoltre l'ICP-MS consente la determinazione dei rapporti isotopici e l'analisi di diluizione isotopica.

Lo strumento è completamente controllato da un computer che, oltre a gestire le procedure di messa a punto strumentale e di analisi, controlla i sistemi di sicurezza che impediscono il verificarsi di eventi dannosi per lo strumento stesso (EPA, 1998; Van de Wiel H.J., 2003).

7.1. Aspetti metodologici

Gli aspetti metodologici riguardano la calibrazione, l'individuazione e la caratterizzazione delle interferenze e degli effetti matrice, le procedure di ottimizzazione dello strumento. Per la calibrazione dell'ICP-MS la più comune e diffusa tecnica è quella legata all'uso di standards esterni. Questo tipo di calibrazione, che precede la lettura dei campioni, consiste nella misura delle intensità di segnale degli elementi di interesse in un bianco (*blank*) nonché in uno o più standards artificiali e/o naturali. Di questi standards si devono conoscere i contenuti esatti degli elementi, il cui range di valori deve coprire l'intervallo di concentrazioni degli analiti nei campioni da analizzare.

Gli standards, corretti del blank, sono usati per creare curve di calibrazione per ciascun elemento, che mettono in relazione l'intensità del segnale e la concentrazione nota dell'analita. Le curve di calibrazione saranno direttamente utilizzate dal sistema di processamento dei dati per calcolare le concentrazioni degli analiti nei campioni. I migliori risultati si raggiungono con standards che hanno una matrice simile a quella dei campioni e che sono stati preparati con gli stessi metodi.

Tecniche di calibrazione alternative sono rappresentate dal metodo delle aggiunte e da quello della diluizione isotopica.

Sebbene le moderne strumentazioni forniscano dei segnali relativamente stabili anche per lunghi intervalli di lettura, con il passare del tempo dei fenomeni di *drift* strumentale possono aver luogo, in genere nella forma di una diminuzione del segnale. Per correggere eventuali variazioni nella risposta strumentale durante l'analisi si utilizza una metodica basata sull'uso di standard interni. Questa tecnica

consiste nella normalizzazione delle intensità del segnale di tutti gli analiti rispetto a quello di un isotopo, il quale è aggiunto a tutti i *blanks*, standards e campioni in concentrazioni conosciute e uguali (in genere 10 ppb). Idealmente, questi standards interni devono essere elementi chimici monoisotopici con masse che non interferiscono con l'analita/analiti della matrice. Inoltre, gli elementi degli standards interni dovrebbero essere presenti in concentrazioni molto basse nei campioni e standards di riferimento esterni. Nell'analizzare, infine, un gruppo di elementi distribuiti in un ampio range di masse dovrebbe essere utilizzato, più di uno standard interno, in modo da avere una similarità con il range delle masse e dell'efficienza di ionizzazione degli analiti.

Queste calibrazioni sono necessarie nei metodi di analisi quantitativa, caratterizzata da elevata qualità, precisione ed accuratezza. Tuttavia l'ICP-MS, mediante potenti software interpretativi, consente di eseguire buone analisi multielementari semiquantitative (*Total Quant*), con un'accuratezza all'incirca del 20%. Questo tipo di software interpreta gli spettri di massa applicando automaticamente le correzioni per interferenze ed assegnando l'intensità dei picchi agli elementi. Usando un singolo standard esterno multielementare che contiene alcuni, ma non tutti, gli elementi di interesse il software calcola ed interpola le concentrazioni di tutti gli elementi nei campioni in un determinato intervallo di masse.

Le analisi semiquantitative rappresentano, pertanto, un utile strumento per una rapida e preliminare caratterizzazione della composizione generale dei campioni.

Nell'ambito delle metodologie di calibrazione rientra in qualche modo anche la correzione mediante il bianco, che consiste nella sottrazione delle intensità di segnale del *blank* da quelle di standards e campioni. In tale ottica, il blank definisce i più bassi livelli di concentrazione degli elementi di interesse, quelli che dovrebbero accompagnare i reagenti ultrapuri e l'acqua bidistillata usati per preparare i campioni. Pertanto, il blank fornisce un'indicazione dei livelli di contaminazione durante le fasi di preparazione ed analisi dei campioni e può essere usato per determinare limiti di detezione realistici.

Un altro aspetto metodologico è rappresentato dall'individuazione e correzione delle interferenze. Nelle fasi di separazione delle masse e di rilevazione si possono avere interferenze tra le specie prodotte nel plasma. Queste interferenze, a dire il vero non frequenti e poco significative, sono per gran parte prevedibili e, quindi, facilmente correggibili e/o minimizzabili mediante appropriate correzioni effettuate dal software o ottimizzazione delle condizioni operative dello strumento. Le interferenze tra specie ioniche sono di 3 tipi: isobariche, molecolari o poliatomiche, con ioni a doppia carica. Le interferenze isobariche hanno luogo tra isotopi di eguale massa di elementi differenti (es. $^{58}\text{Fe}/^{58}\text{Ni}$, $^{48}\text{Ca}/^{48}\text{Ti}$). Esse sono facilmente corrette sulla base della conoscenza delle abbondanze naturali degli isotopi di tutti gli elementi e delle possibili interferenze attuabili. Le interferenze molecolari o poliatomiche avvengono tra gli isotopi di alcuni elementi e specie poliatomiche che si formano, nella regione fredda del plasma, tra ioni del campione, l'argon ed altre componenti della matrice. La formazione di gran parte degli ioni molecolari è prevedibile e pertanto può essere corretta mediante opportuni fattori correttivi. In molti casi la presenza di ioni molecolari può essere minimizzata o addirittura annullata utilizzando appropriati sistemi d'introduzione del campione ed ottimizzando le condizioni operative strumentali. Infine, possono aversi interferenze tra isotopi monovalenti con isotopi con massa doppia e doppia carica (es. $^{90}\text{Zr}^{++}/^{45}\text{Sc}^{+}$), aventi quindi lo stesso rapporto massa/carica degli ioni monovalenti.

Per fortuna, la formazione di specie ioniche a doppia carica è abbastanza rara e quindi ininfluyente dal punto di vista analitico. Per quanto detto, la scelta ottimale dell'isotopo su cui basare la determinazione quantitativa dell'elemento deve discendere dalla rilevanza delle potenziali interferenze esistenti. In genere, la scelta ricade sull'isotopo più abbondante dell'elemento. Tuttavia, nei casi in cui le potenziali interferenze sull'isotopo più abbondante dell'analita sono da considerarsi troppo marcate da poter essere corrette adeguatamente, la scelta si sposta sul secondo isotopo per abbondanza.

7.2. Calibrazione

Nel prospetto 1 riportiamo l'intervallo di calibrazione utilizzato per la determinazione dei metalli nei capelli (correlazione: $r > 0.999$).

Elemento ^{Massa}	1° Punto	2° Punto	3° Punto	4° Punto
As ⁷⁵	0.5µg/L	1 µg/L	5 µg/L	10µg/L
Pb ²⁰⁸	0.5µg/L	1 µg/L	5 µg/L	10µg/L
U ²³⁸	0.1µg/L	0.5 µg/L	1 µg/L	2µg/L

Nel prospetto 2 riportiamo l'intervallo di calibrazione utilizzato per la determinazione dei metalli nel sangue e nelle urine (correlazione: $r > 0.999$).

Elemento ^{Massa}	1° Punto	2° Punto	3° Punto	4° Punto
As ⁷⁵	0.5µg/L	1 µg/L	2 µg/L	5µg/L
Pb ²⁰⁸	0.5µg/L	1 µg/L	2 µg/L	5µg/L
U ²³⁸	0.5µg/L	1 µg/L	2 µg/L	5µg/L

7.3. Limiti di rilevabilità (MDL) e quantificazione (MQL) strumentali

Elemento ^{Massa}	MDL a 3 σ	MQL a 10 σ
As ⁷⁵	0.08µg/L	0.3 µg/L
Pb ²⁰⁸	0.05µg/L	0.2 µg/L
U ²³⁸	0.005µg/L	0.02 µg/L

7.4. Standards

Tutti gli standards utilizzati per la curva di calibrazione hanno certificazione di tracciabilità NIST (National Institute of Standards and Technology).

8. Analisi statistica

Per ciascun gruppo di bambini campionati, suddivisi per sesso e Comune di appartenenza, sono state calcolate le statistiche descrittive relative all'età decimale ed ai metalli pesanti: media, deviazione standard, valori minimi e massimi del campo di variazione.

Per valutare le differenti distribuzioni dell'età decimale dei campioni analizzati è stato adottato il test statistico dell'analisi della varianza ad una via (one-way ANOVA).

Il test di Shapiro-Wilks è stato applicato per valutare se i livelli dei metalli presentino o meno una distribuzione normale, nel campione di bambini suddiviso per sesso e Comune. Essendo risultati non normalmente distribuiti, in modo statisticamente significativo, i relativi valori sono stati log- trasformati.

Il confronto tra i gruppi, per ciascun metallo, è stato effettuato utilizzando l'analisi della covarianza ad una via (one-way ANCOVA) con l'età decimale in covariata e i valori dei metalli log-trasformati.

Il confronto post-hoc è stato effettuato utilizzando il test di Tukey (HSD) per campioni ineguali.

É stato infine utilizzato il coefficiente di correlazione parziale con i valori log-trasformati delle concentrazioni dei metalli per verificare se esista concordanza o meno tra i livelli di ciascun elemento nelle tre matrici.

9. Risultati

Nella Tabella 1 e nella Figura 1 vengono riportate le statistiche descrittive relative all'età decimale dei campioni di bambini suddivisi per sesso e Comune ed i risultati dell'analisi della varianza ad una via (ANOVA) relativi alla valutazione dell'esistenza di differenti distribuzioni statisticamente significative. I risultati ottenuti indicano che le distribuzioni dell'età presentano eteroscedasticità. Pertanto nelle analisi successive relative ai livelli di Pb, As e U nelle tre matrici risulta appropriato porre l'età in covariata.

La Tabella 2 e la Figura 2 mostrano le statistiche descrittive dei livelli di Piombo nel sangue del campione di bambini suddiviso per sesso e Comune, ed inoltre i risultati di one-way ANCOVA. Per quanto concerne la concentrazione di Piombo nel sangue, dai valori delle F di ANCOVA si evince che esista una differenza statisticamente significativa tra i Comuni, sia se si considera il campione a sessi uniti sia considerandolo a sessi separati. Da segnalare che i valori maggiori li hanno mostrati i soggetti residenti nel Comune di Perdasdefogu (♂: 5,38 µg/dL; ♀: 4,95 µg/dL) rispetto ai coetanei del Comune di Jerzu (♂: 2,51 µg/dL; ♀: 1,93 µg/dL).

Nelle Tabella 3 e nella Figura 3 si riportano le statistiche descrittive dei livelli di Piombo nelle urine del campione di bambini suddiviso per sesso e Comune, ed inoltre i risultati di one-way ANCOVA. I valori delle F di ANCOVA per i livelli di piombo nelle urine, mostrano una differenza statisticamente significativa tra i Comuni, unicamente se si considera il campione di sesso maschile o il campione a sessi uniti ma non vi è differenza per il campione di sesso femminile. I valori maggiori li hanno mostrati i soggetti di sesso femminile del Comune di Jerzu (1,34 µg/dL), seguiti dai maschi di Perdasdefogu (1,10 µg/dL), dalle femmine dello stesso Comune (1,02 µg/dL) e dai maschi di Jerzu (0,71 µg/dL).

La Tabella 4 e la Figura 4 mostrano le statistiche descrittive dei livelli di Piombo nei capelli del campione di bambini suddiviso per sesso e Comune, ed inoltre i risultati di one-way ANCOVA. Dai valori delle F di ANCOVA si riscontra una differenza statisticamente significativa tra i Comuni per i livelli di piombo nei capelli, solamente se si considera il campione a sessi uniti. I soggetti di sesso femminile presentano i valori medi maggiori: Perdasdefogu= 1,00 $\mu\text{g/g}$; Jerzu= 0,71 $\mu\text{g/g}$, rispetto ai soggetti di sesso maschile: Jerzu= 0,66 $\mu\text{g/g}$; Perdasdefogu= 0,51 $\mu\text{g/g}$.

Nelle Tabelle 5-7 e nelle Figure 5-7 sono riportate le statistiche descrittive dei livelli di Arsenico, rispettivamente nel sangue, nelle urine e nei capelli, del campione di bambini suddiviso per sesso e Comune, ed inoltre i risultati di one-way ANCOVA. Dai valori delle F di ANCOVA non alcuna differenza statisticamente significativa tra i Comuni, per nessuna delle matrici.

Le Tabelle 8-10 e le Figure 8-10 mostrano le statistiche descrittive dei livelli di uranio, rispettivamente nel sangue, nelle urine e nei capelli, del campione di bambini suddiviso per sesso e Comune, ed inoltre i risultati di one-way ANCOVA. Per quanto concerne la concentrazione di U nel sangue, dai valori delle F di ANCOVA si evince che esista una differenza statisticamente significativa tra i Comuni, sia se si considera il campione a sessi uniti sia a sessi separati. Da segnalare che i valori maggiori di uranio nel sangue sono propri delle femmine di Perdasdefogu (34,09 ng/dL), seguite dai maschi dello stesso Comune (31,33 ng/dL). I valori delle F di ANCOVA non mostrano significatività tra i due Comuni né per quanto riguarda le differenze tra i livelli di uranio nelle urine né per i livelli di uranio nei capelli.

Nella Tabella 11-14 sono riportati, come analisi post-hoc, i valori del test di Tukey (HSD) per campioni ineguali relativi ai livelli di Piombo nelle tre matrici e ad i livelli di Uranio nel sangue, essendo risultati statisticamente significativi i confronti fra i campioni di bambini suddivisi per Comune e sesso (Tabb. 2, 3, 4, 10). I risultati ottenuti indicano una differenza statisticamente significativa tra i due Comuni per le concentrazioni ematiche di piombo e di uranio, mentre per il livelli di piombo nell'urina la differenza statisticamente significativa si riscontra, tra i due Comuni, unicamente per i soggetti di sesso maschile. Per i livelli di piombo nei capelli i risultati del post-hoc hanno evidenziato una differenza significativa tra i due sessi all'interno del Comune di Perdasdefogu.

Nella Tabella 15-17 appaiono i valori dei coefficienti parziali tra le concentrazioni rispettivamente di Piombo, Arsenico e Uranio, nelle tre matrici. I risultati ottenuti indicano una loro relazione statisticamente non significativa ad eccezione dei valori di Arsenico nel sangue e nelle urine. Dunque, le concentrazioni dei metalli nelle tre matrici non possono essere considerate concordanti tra di loro se non per quanto riguarda l'Arsenico nel sangue e nelle urine.

10. Discussione e Conclusioni

Tra l'Aprile e il Giugno del 2007, al fine di valutare se esistesse una differente esposizione ai metalli pesanti (As, Pb e U) nei Comuni di Perdasdefogu e Jerzu, e una significativa correlazione tra i livelli dei metalli nel sangue, nelle urine e nei capelli, è stato effettuato, su 129 soggetti in accrescimento (58 maschi e 71 femmine) residenti nei due Comuni, un campionamento per determinare i livelli di piombo, arsenico ed uranio, nelle tre matrici sopra menzionate. Le metodiche utilizzate per la determinazione delle concentrazioni dei tre metalli nel sangue e nelle urine sono quelle riportate dall'EPA (1998); mentre per la valutazione dei livelli dei metalli pesanti nei capelli sono state adottate, sia per quanto concerne la raccolta sia per il successivo trattamento chimico, le procedure riportate da Senofonte et al. (1989), Caroli et al. (1992), Sanna et. al. (2003).

In sintesi, con questo lavoro si è inteso valutare se i tre biomarker considerati, sangue, urine e capelli, esprimano la medesima tendenza nella valutazione dei livelli degli inquinanti ambientali nei soggetti campionati al fine di validare un sistema di monitoraggio, per i soggetti in crescita, non intrusivo e quindi più facilmente reiterabile nel tempo.

I risultati ottenuti non hanno riscontrato alcuna correlazione significativa fra i livelli dei metalli nelle tre matrici, se non per quanto concerne i livelli di arsenico nel sangue e nelle urine. Dunque, i dati ottenuti confermerebbero per le urine l'uso preferenziale di questa matrice quando si debba valutare un'esposizione agli inquinanti prolungata nel tempo e ad alte concentrazioni (Barbosa et al., 2005); inoltre confermerebbero la discutibilità, riportata in letteratura, sull'uso dei capelli come biomarker per la determinazione dell'esposizione umana ai metalli pesanti.

Le critiche sollevate sulla tecnica di rilevazione degli inquinanti nei capelli riguardano, in particolare, degli aspetti legati alla metodica di determinazione, ovvero la difficoltà, nella fase pre-analitica di decontaminazione superficiale del capello, di distinguere i livelli del metallo endogeno, vale a dire, assorbito nel sangue e incorporato nella matrice dei capelli, dai livelli del metallo esogeno, vale a dire, derivato da contaminazione esterna (Morton et al., 2002). Un'altra limitazione di tale tecnica, ampiamente riportata in letteratura, riguarda la variazione significativa nel profilo delle concentrazioni dei metalli fra le varie sottopopolazioni a seconda dell'età, del sesso e del colore dei capelli (Wolfsperger et al., 1994; Barbosa et al., 2005). Per queste ragioni, finora, non è stato possibile stabilire una gamma certa, universalmente accettata, dei livelli di contaminazione dei metalli nei capelli umani (ATSDR, 2001; Seidel et al., 2001).

Infine, per quanto riguarda i livelli degli inquinanti riscontrati nei due Comuni campionati, il dato che traspare con maggior evidenza è il rischio per la salute della popolazione di entrambi i Comuni, originato dalla presenza di alti livelli di arsenico, livelli attendibilmente congruenti con la struttura geochimica del territorio. Si rileva, inoltre, che il Comune di Perdasdefogu risulta maggiormente soggetto ad inquinamento da piombo e da uranio, in quanto presenta valori superiori, statisticamente significativi, sia per quanto riguarda il piombo (sangue, urine, capelli), sia per quanto riguarda l'uranio (sangue). Tuttavia, considerando i livelli di concentrazione di piombo riscontrati, non dovrebbero presentarsi effetti tossici per la salute della popolazione, nonostante sia noto che, nei bambini, anche bassi livelli di piombo possano avere un impatto sub-clinico (Canfield et al., 2003; CDC, 2004). Quindi, per accertare la presenza di eventuali effetti connessi sarebbe opportuno svolgere anche un'estesa indagine auxologica.

In conclusione, considerando che i soggetti di Perdasdefogu presentano livelli ematici di uranio superiori non solo ai bambini di Jerzu ma anche ai livelli massimi fisiologici consigliati in letteratura (Byrne et al., 1990; Vidaud et al., 2005), per comprendere quale sia la fonte di inquinamento, ovvero se si tratti di uranio naturale, derivante da una zona di anomalia del territorio, o di uranio impoverito e quindi correlato alla vicinanza del Comune al Poligono Interforze di Quirra, sarebbe opportuno non solo analizzare i livelli dell'uranio in toto ma anche determinare il rapporto isotopico di quest'ultimo nei soggetti campionati.

Inoltre, per la salvaguardia della salute della popolazione del Comune di Perdasdefogu, sarebbe necessario creare un sistema di controllo sia dei comparti ambientali (aria, acqua e suolo) sia dell'intera popolazione.

Tabella 1. Statistiche descrittive dell'età nei bambini di Perdasdefogu e Jerzu e risultati di one-way ANOVA.

	Perdasdefogu					Jerzu				
Età	N	M	S.D.	Min	Max	N	M	S.D.	Min	Max
M	31	13,60	1,26	11,62	16,33	27	12,96	0,83	11,61	14,45
F	25	12,97	1,23	11,41	16,14	46	12,73	0,88	10,55	14,30
Total	56	13,32	1,27	11,41	16,33	73	12,82	0,86	10,55	14,45

F(3; 125)= 4,348; p≤ 0.0060

Tabella 2. Statistiche descrittive dei valori di Piombo nel sangue ($\mu\text{g/dL}$) dei bambini di Perdasdefogu e Jerzu e risultati di one-way ANCOVA (con l'età in covariata).

	Perdasdefogu					Jerzu				
PbB	N	M	S.D.	Min	Max	N	M	S.D.	Min	Max
M	30	5,38	4,06	1,00	17,30	25	2,51	1,25	0,80	5,70
F	22	4,95	3,65	0,60	12,30	45	1,93	1,12	0,50	5,80
Total	52	5,20	3,86	0,60	17,30	70	2,14	1,19	0,50	5,80

$F(3;116) = 15,520; p \leq 0,0001$

Tabella 3. Statistiche descrittive dei valori di Piombo nelle urine ($\mu\text{g/dL}$) dei bambini di Perdasdefogu e Jerzu e risultati di one-way ANCOVA (con l'età in covariata).

	Perdasdefogu					Jerzu				
PbU	N	M	S.D.	Min	Max	N	M	S.D.	Min	Max
M	31	1,10	0,57	0,20	2,90	18	0,71	0,73	0,09	2,80
F	25	1,02	0,83	0,20	4,00	30	1,34	1,46	0,09	7,20
Total	56	1,06	0,69	0,20	4,00	48	1,11	1,27	0,09	7,20

$F(3; 98) = 4,101; p \leq 0,0087$

Tabella 4. Statistiche descrittive dei valori di Piombo nei capelli ($\mu\text{g/g}$) dei bambini di Perdasdefogu e Jerzu e risultati di one-way ANCOVA (con l'età in covariata).

	Perdasdefogu					Jerzu				
PbH	N	M	S.D.	Min	Max	N	M	S.D.	Min	Max
M	29	0,51	0,76	0,09	3,69	17	0,66	0,65	0,09	2,70
F	25	1,00	1,17	0,09	4,67	45	0,71	0,97	0,10	6,50
Total	54	0,74	0,99	0,09	4,67	62	0,69	0,89	0,09	6,50

$F(3; 110) = 5,028; p \leq 0,0026$

Tabella 5. Statistiche descrittive dei valori di Arsenico nel sangue ($\mu\text{g/dL}$) dei bambini di Perdasdefogu e Jerzu e risultati di one-way ANCOVA (con l'età in covariata).

	Perdasdefogu					Jerzu				
AsB	N	M	S.D.	Min	Max	N	M	S.D.	Min	Max
M	30	8,94	7,14	0,09	25,00	25	9,18	4,92	0,09	20,00
F	22	9,81	6,88	0,09	22,00	45	9,49	4,74	0,09	18,00
Total	52	9,31	6,98	0,09	25,00	70	9,38	4,77	0,09	20,00

$F(3; 116) = 1,459; p \leq 0,2295$

Tabella 6. Statistiche descrittive dei valori di Arsenico nelle urine ($\mu\text{g/dL}$) dei bambini di Perdasdefogu e Jerzu e risultati di one-way ANCOVA (con l'età in covariata).

	Perdasdefogu					Jerzu				
AsU	N	M	S.D.	Min	Max	N	M	S.D.	Min	Max
M	31	5,23	3,22	0,09	13,40	18	5,60	4,19	0,09	11,00
F	25	3,76	3,33	0,09	9,00	30	5,90	4,76	0,09	15,80
Total	56	4,57	3,32	0,09	13,40	48	5,79	4,52	0,09	15,80

$F(3; 98) = 1,908; p \leq 0,1333$

Tabella 7. Statistiche descrittive dei valori di Arsenico nei capelli ($\mu\text{g/g}$) dei bambini di Perdasdefogu e Jerzu e risultati di one-way ANCOVA (con l'età in covariata).

	Perdasdefogu					Jerzu				
AsH	N	M	S.D.	Min	Max	N	M	S.D.	Min	Max
M	29	0,0934	0,0133	0,0900	0,1500	17	0,0912	0,0048	0,0900	0,1100
F	25	0,0916	0,0062	0,0900	0,1200	45	0,0969	0,0317	0,0900	0,2800
Total	54	0,0926	0,0105	0,0900	0,1500	62	0,0953	0,0272	0,0900	0,2800

$F(3; 110) = 0,333; p \leq 0,8017$

Tabella 8. Statistiche descrittive dei valori dell'Uranio nel sangue (ng/dL) dei bambini di Perdasdefogu e Jerzu e risultati di one-way ANCOVA (con l'età in covariata).

	Perdasdefogu					Jerzu				
UB	N	M	S.D.	Min	Max	N	M	S.D.	Min	Max
M	30	31,33	0,02	10,00	90,00	25	16,24	0,01	9,00	50,00
F	22	34,09	0,02	10,00	80,00	45	15,76	0,02	9,00	140,00
Total	52	32,50	0,02	10,00	90,00	70	15,93	0,02	9,00	140,00

F(3; 116)= 16,198; p≤ 0,0001

Tabella 9. Statistiche descrittive dei valori dell'Uranio nelle urine (ng/dL) dei bambini di Perdasdefogu e Jerzu e risultati di one-way ANCOVA (con l'età in covariata).

	Perdasdefogu					Jerzu				
UU	N	M	S.D.	Min	Max	N	M	S.D.	Min	Max
M	31	9,10	0,01	9,00	10,00	18	10,28	0,02	9,00	20,00
F	25	9,04	0,02	9,00	10,00	30	9,97	0,01	9,00	30,00
Total	56	9,07	0,02	9,00	10,00	48	10,08	0,02	9,00	30,00

F(3; 98)= 1,607; p≤ 0,1926

Tabella 10. Statistiche descrittive dei valori dell'Uranio nei capelli (ng/g) dei bambini di Perdasdefogu e Jerzu e risultati di one-way ANCOVA (con l'età in covariata).

	Perdasdefogu					Jerzu				
UH	N	M	S.D.	Min	Max	N	M	S.D.	Min	Max
M	29	9,35	0,01	9,00	15,00	17	10,00	0,02	9,00	16,00
F	25	9,96	0,02	9,00	15,00	45	11,22	0,03	9,00	23,00
Total	54	9,60	0,02	9,00	15,00	62	10,89	0,03	9,00	23,00

F(3; 110)= 2,397; $p \leq 0,0720$

Tabella 11. Risultati del test di Tukey (HSD) per campioni ineguali relativi ai livelli di Piombo nel sangue.

PbB	Perdasdefogu ♂	Perdasdefogu ♀	Jerzu ♂	Jerzu ♀
Perdasdefogu ♂		0,8837	0,0033	0,0001
Perdasdefogu ♀	0,8837		0,0439	0,0009
Jerzu ♂	0,0033	0,0439		0,5293
Jerzu ♀	0,0001	0,0009	0,5293	

Tabella 12. Risultati del test di Tukey (HSD) per campioni ineguali relativi ai livelli di Piombo nelle urine.

PbU	Perdasdefogu ♂	Perdasdefogu ♀	Jerzu ♂	Jerzu ♀
Perdasdefogu ♂		0,9102	0,0141	0,8830
Perdasdefogu ♀	0,9102		0,0610	1,0000
Jerzu ♂	0,0141	0,0610		0,0617
Jerzu ♀	0,8830	1,0000	0,0617	

Tabella 13. Risultati del test di Tukey (HSD) per campioni ineguali relativi ai livelli di Piombo nei capelli.

PbH	Perdasdefogu ♂	Perdasdefogu ♀	Jerzu ♂	Jerzu ♀
Perdasdefogu ♂		0,0107	0,4432	0,0924
Perdasdefogu ♀	0,0107		0,7282	0,7605
Jerzu ♂	0,4432	0,7282		0,9944
Jerzu ♀	0,0924	0,7605	0,9944	

Tabella 14. Risultati del test di Tukey (HSD) per campioni ineguali relativi ai livelli di Uranio nel sangue.

UB	Perdasdefogu ♂	Perdasdefogu ♀	Jerzu ♂	Jerzu ♀
Perdasdefogu ♂		0,8770	0,0026	0,0002
Perdasdefogu ♀	0,8770		0,0004	0,0002
Jerzu ♂	0,0026	0,0004		0,8992
Jerzu ♀	0,0002	0,0002	0,8992	

Tabella 15. Valori dei coefficienti delle correlazioni parziali tra i livelli di Piombo nelle tre matrici e, in parentesi, le relative probabilità.

	PbB	PbU	PbH
PbB	-	0,0399 (0,7101)	0,0613 (0,5682)
PbU	0,0399 (0,7101)	-	-0,1156 (0,2808)
PbH	0,0613 (0,5682)	-0,1156 (0,2808)	-

Tabella 16. Valori dei coefficienti delle correlazioni parziali tra i livelli di Arsenico nelle tre matrici e, in parentesi, le relative probabilità.

	AsB	AsU	AsH
AsB	-	0,2650* (0,01208)	0,1005 (0,3485)
AsU	0,2650* (0,01208)	-	0,0013 (0,9899)
AsH	0,1005 (0,3485)	0,0013 (0,9899)	-

Tabella 17. Valori dei coefficienti delle correlazioni parziali tra i livelli di Uranio nelle tre matrici e, in parentesi, le relative probabilità.

	UB	UU	UH
UB	-	-0,0672 (0,5315)	-0,1036 (0,3340)
UU	-0,0672 (0,5315)	-	0,0290 (0,7874)
UH	-0,1036 (0,3340)	0,0290 (0,7874)	-

Figura 1. Valori medi dell'età decimale relativi al campione di bambini, suddiviso per sesso, residenti nei Comuni di Perdasdefogu e Jerzu.

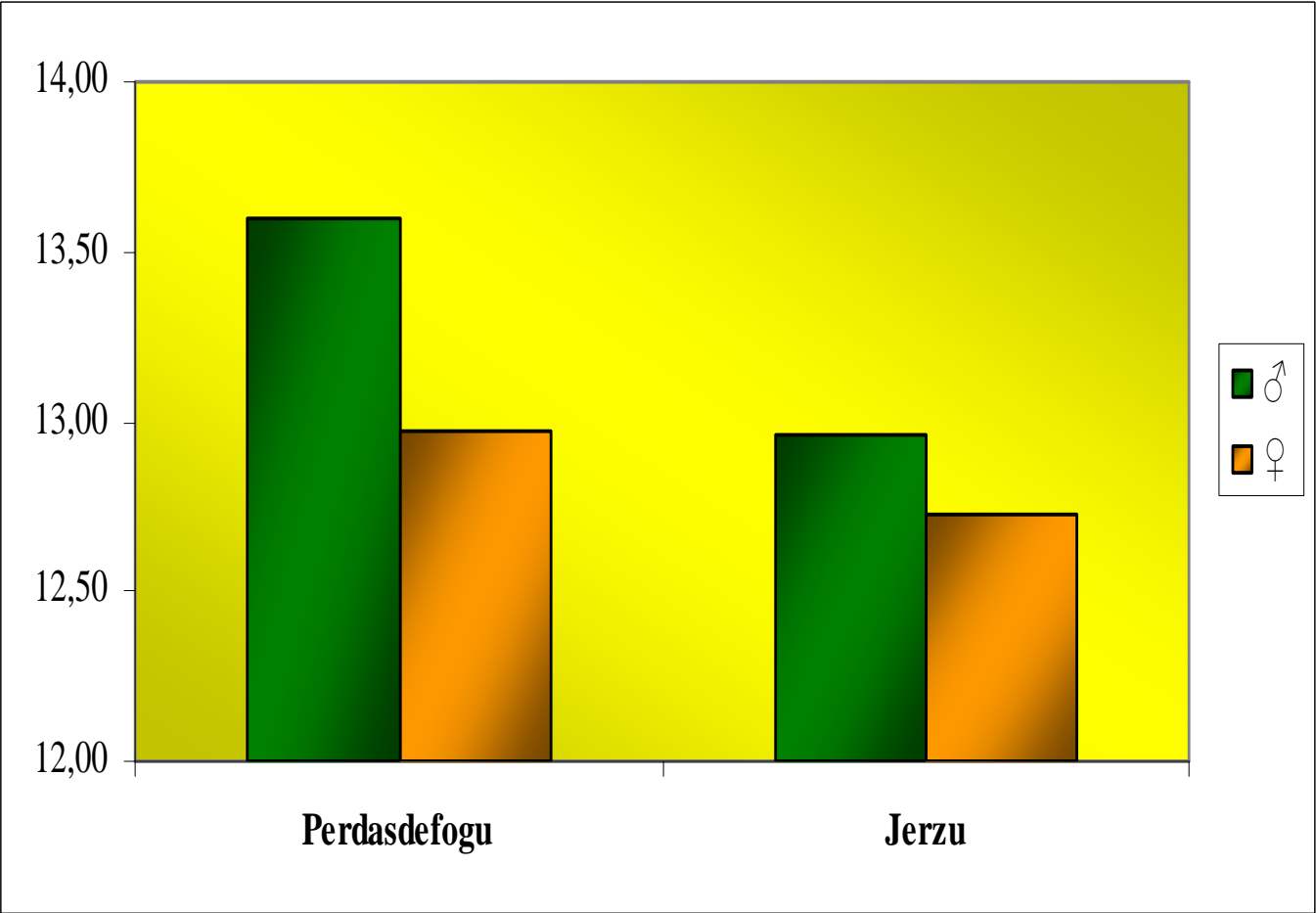


Figura 2. Livelli medi di Piombo nel sangue ($\mu\text{g}/\text{dL}$) relativi al campione di bambini, suddiviso per sesso, residenti nei Comuni di Perdasdefogu e Jerzu.

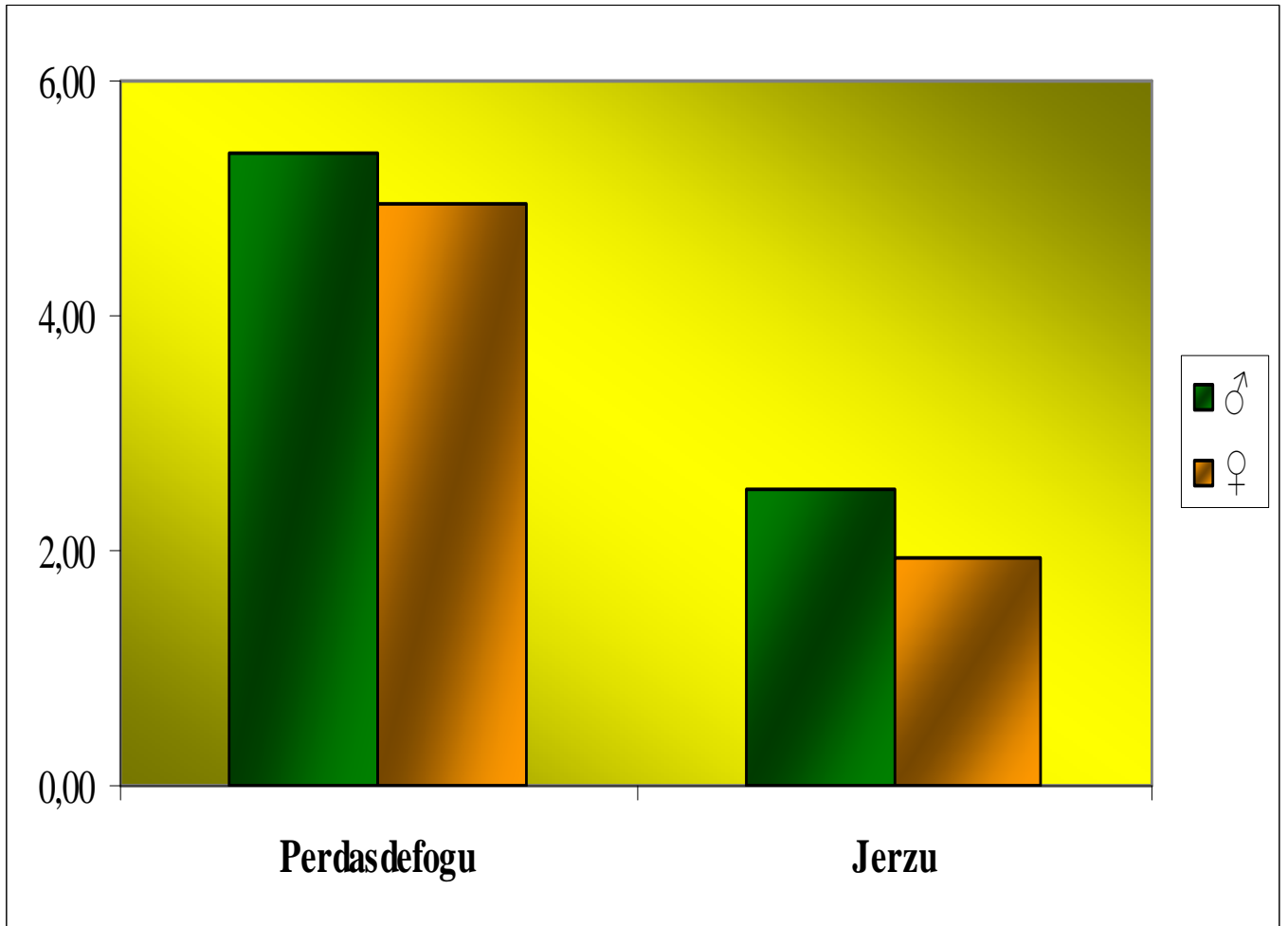


Figura 3. Livelli medi di Piombo nelle urine ($\mu\text{g}/\text{dL}$) relativi al campione di bambini, suddiviso per sesso, residenti nei Comuni di Perdasdefogu e Jerzu.

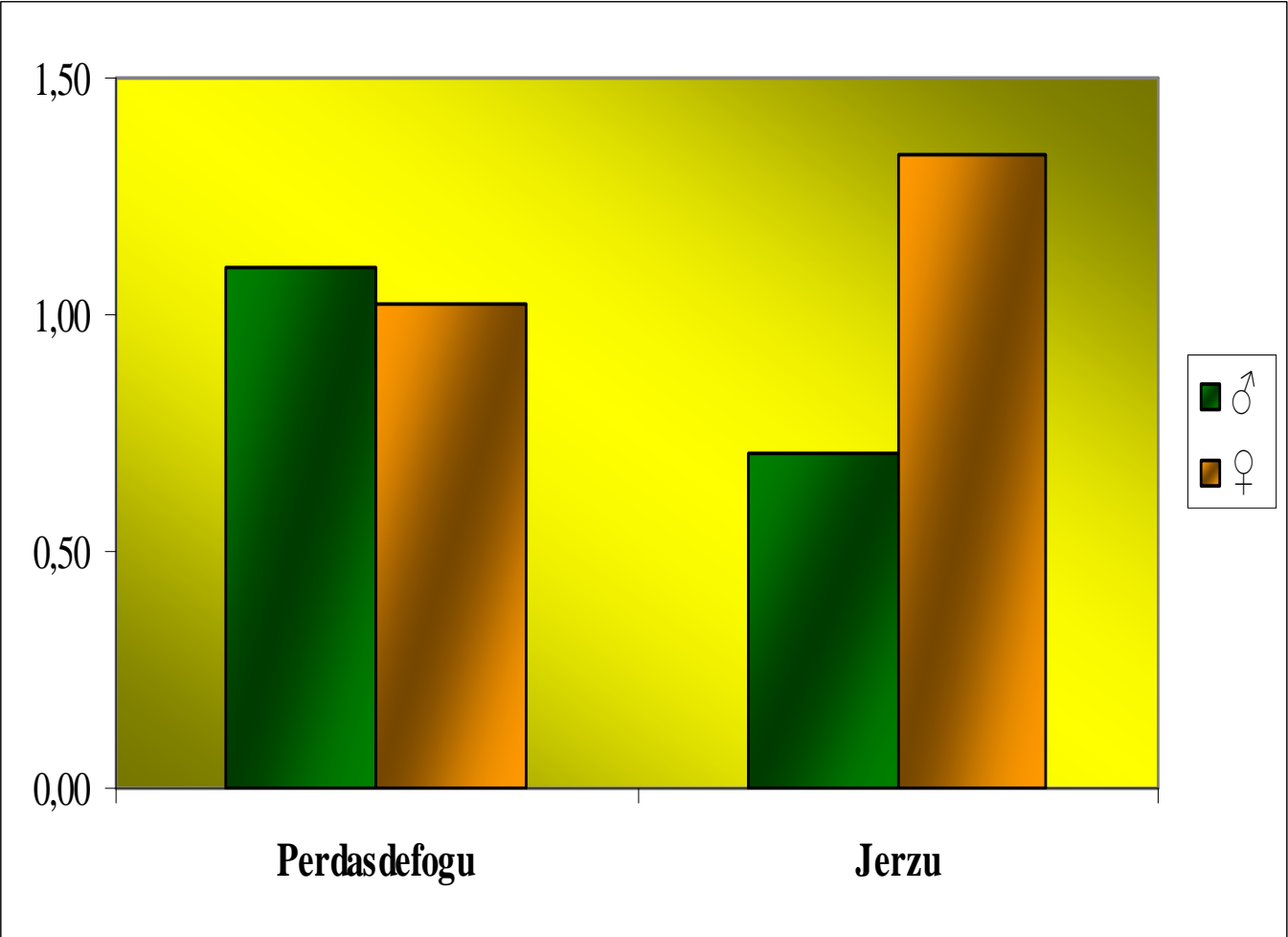


Figura 4. Livelli medi di Piombo nei capelli ($\mu\text{g/g}$) relativi al campione di bambini, suddiviso per sesso, residenti nei Comuni di Perdasdefogu e Jerzu.

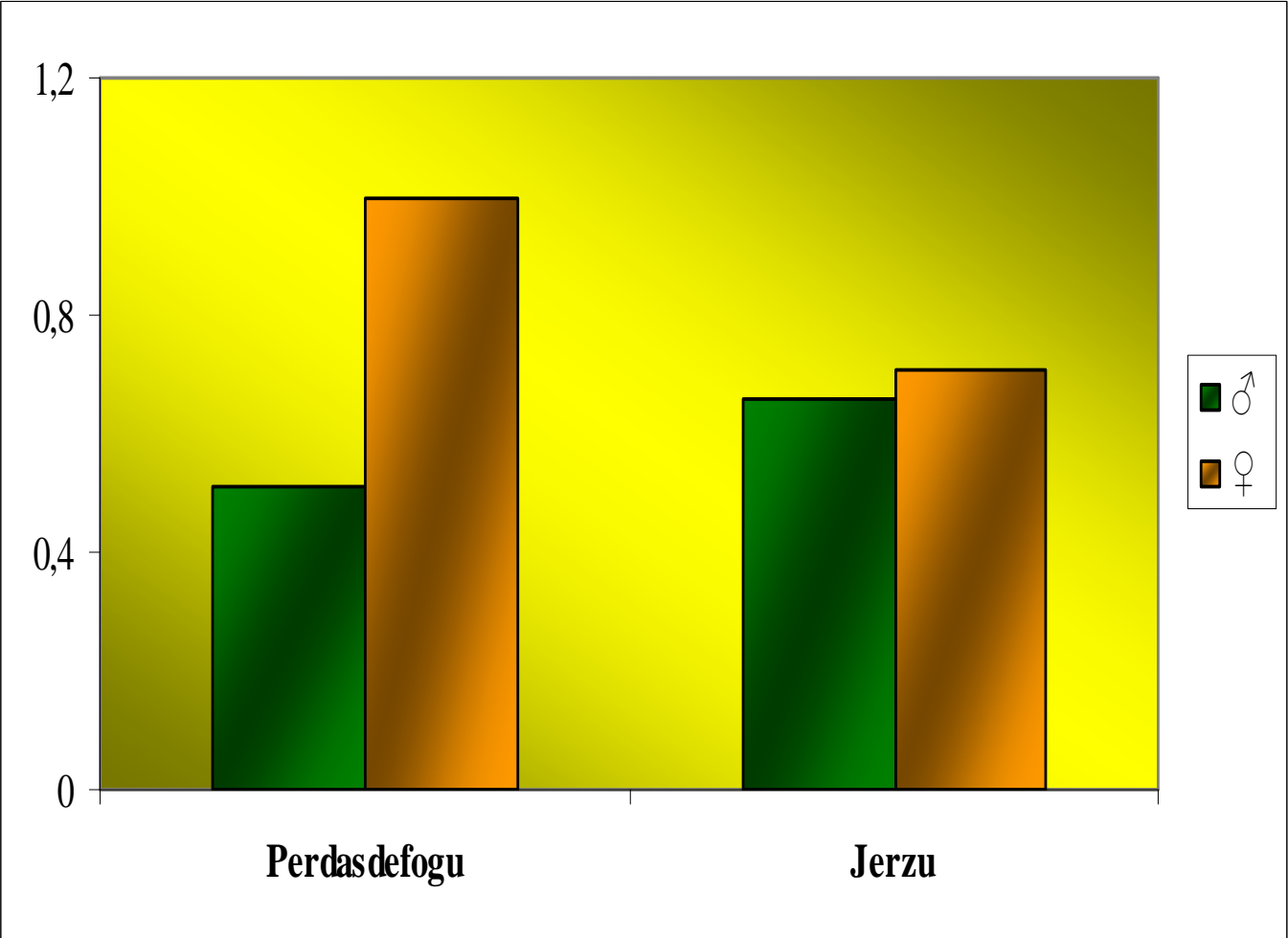


Figura 5. Livelli medi di Arsenico nel sangue ($\mu\text{g/dL}$) relativi al campione di bambini, suddiviso per sesso, residenti nei Comuni di Perdasdefogu e Jerzu.

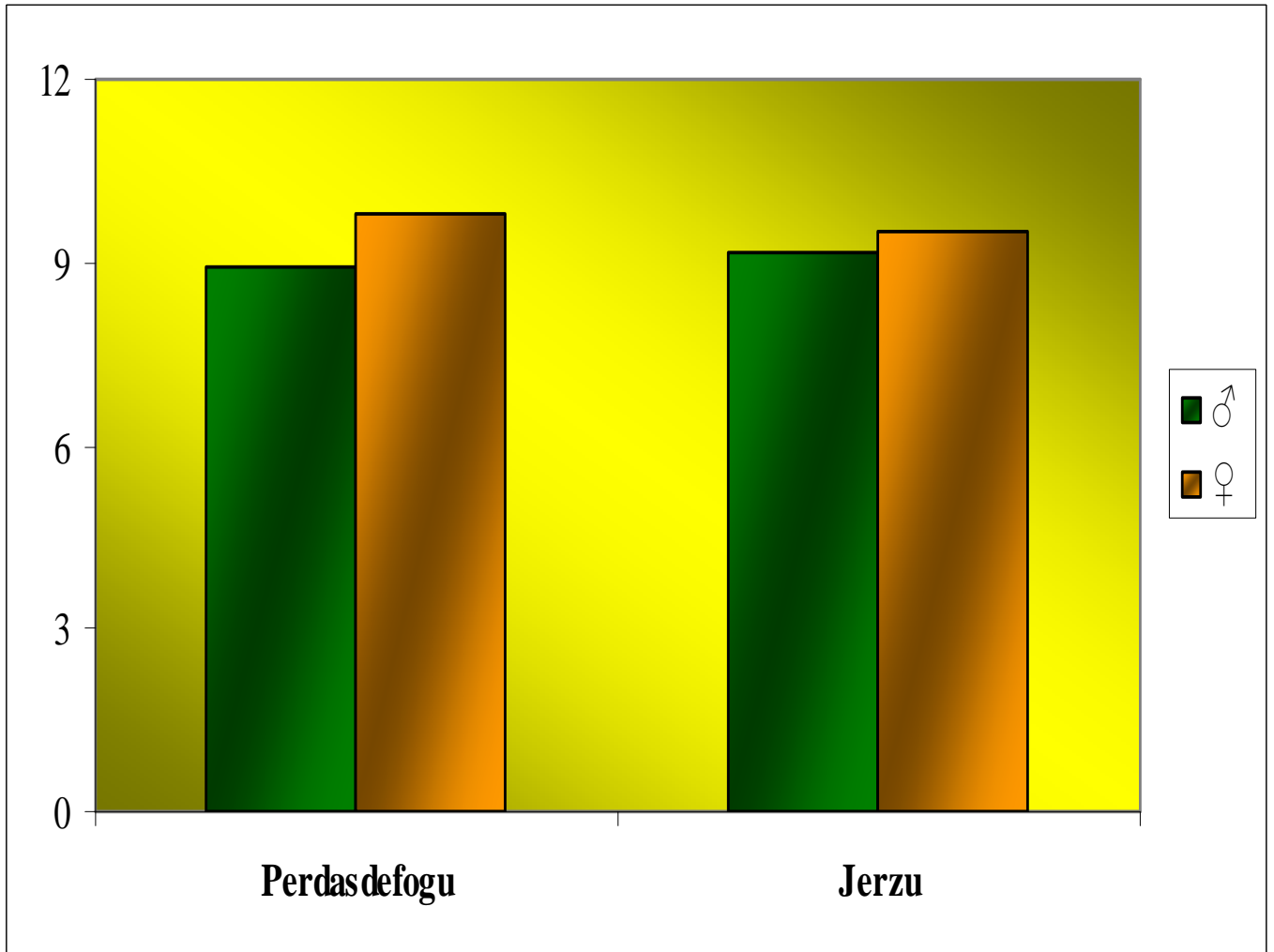


Figura 6. Livelli medi di Arsenico nelle urine ($\mu\text{g/dL}$) relativi al campione di bambini, suddiviso per sesso, residenti nei Comuni di Perdasdefogu e Jerzu.

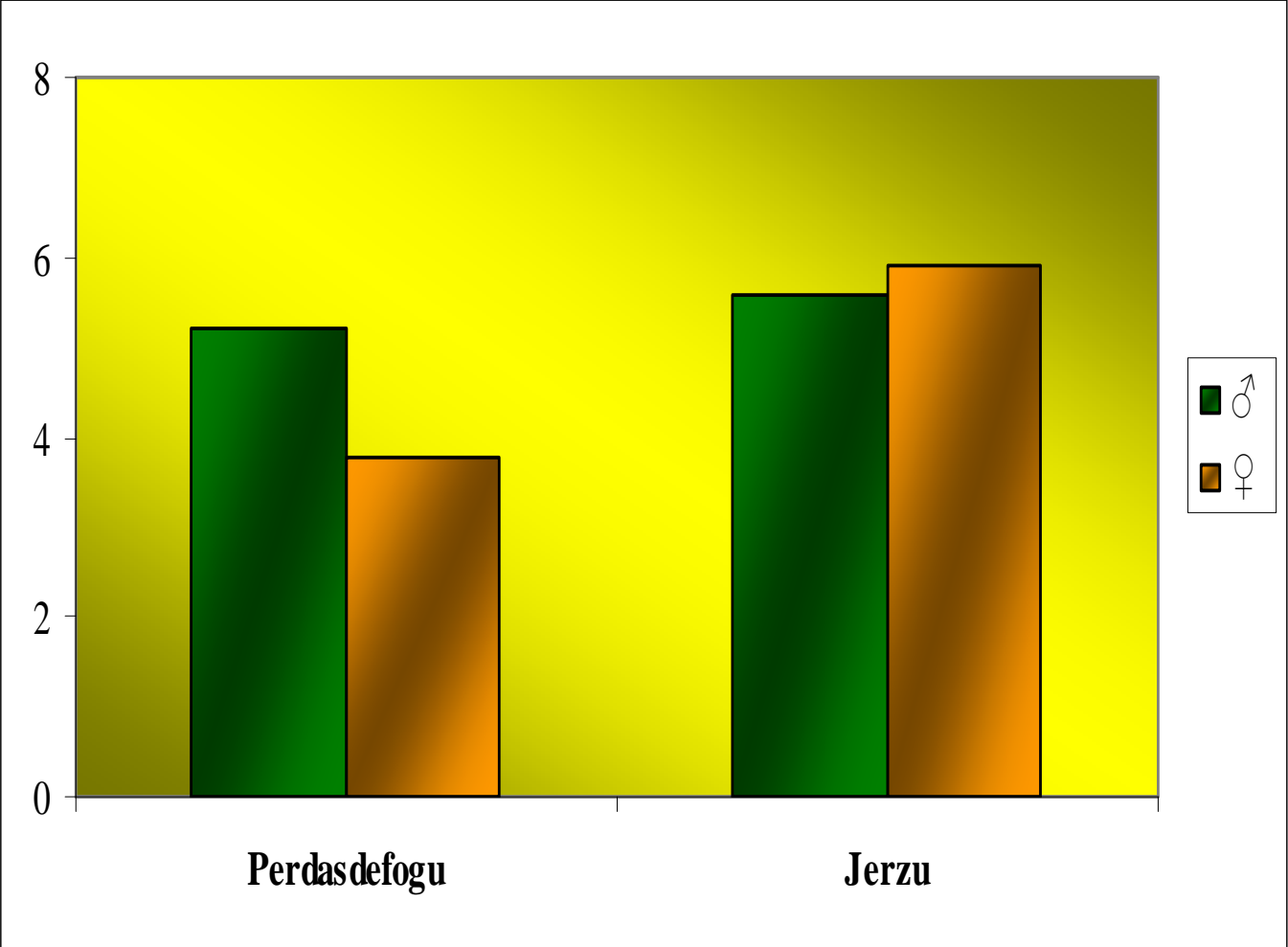


Figura 7. Livelli medi di Arsenico nei capelli ($\mu\text{g/g}$) relativi al campione di bambini, suddiviso per sesso, residenti nei Comuni di Perdasdefogu e Jerzu.

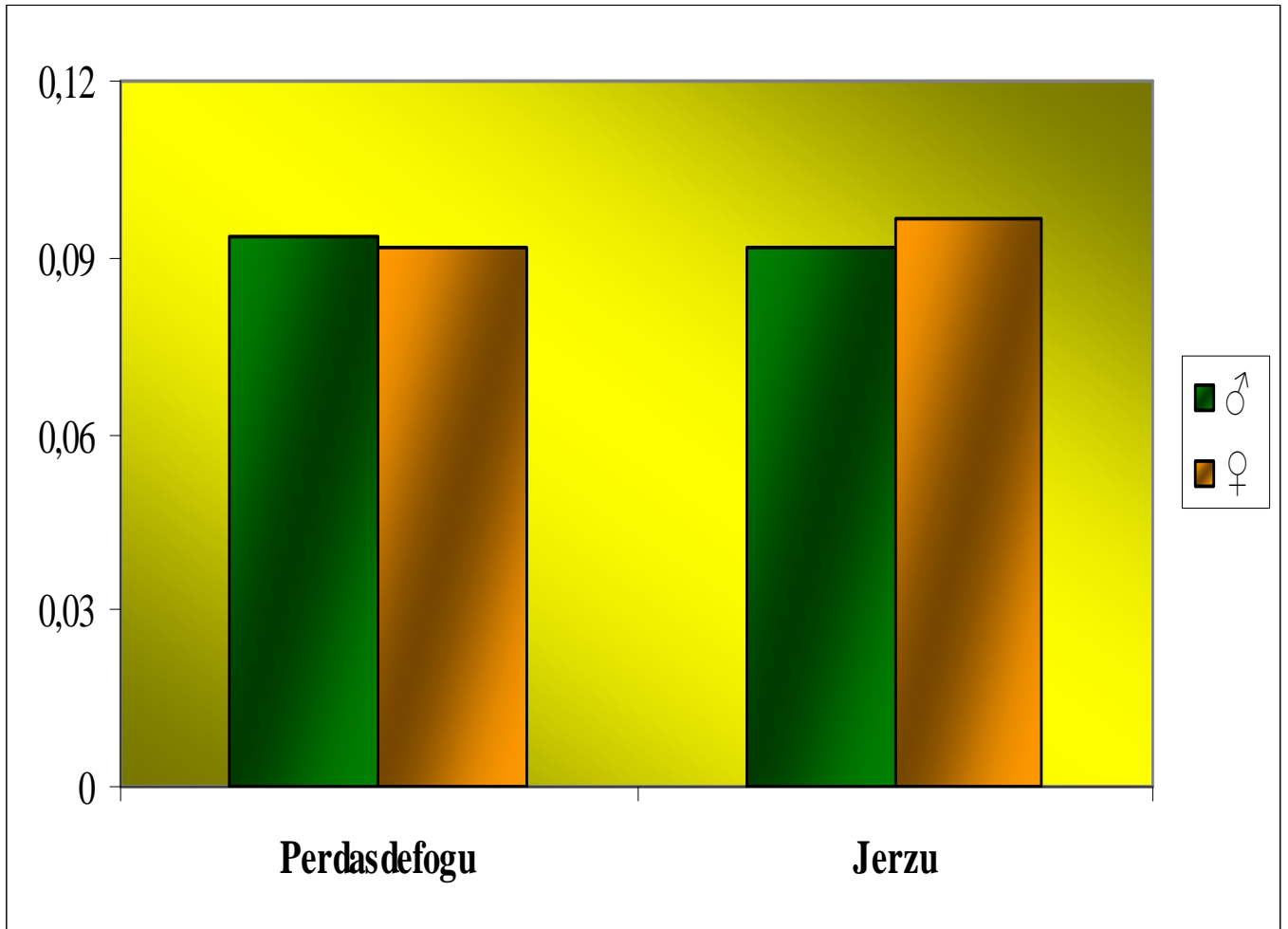


Figura 8. Livelli medi di Uranio nel sangue (ng/dL) relativi al campione di bambini, suddiviso per sesso, residenti nei Comuni di Perdasdefogu e Jerzu.

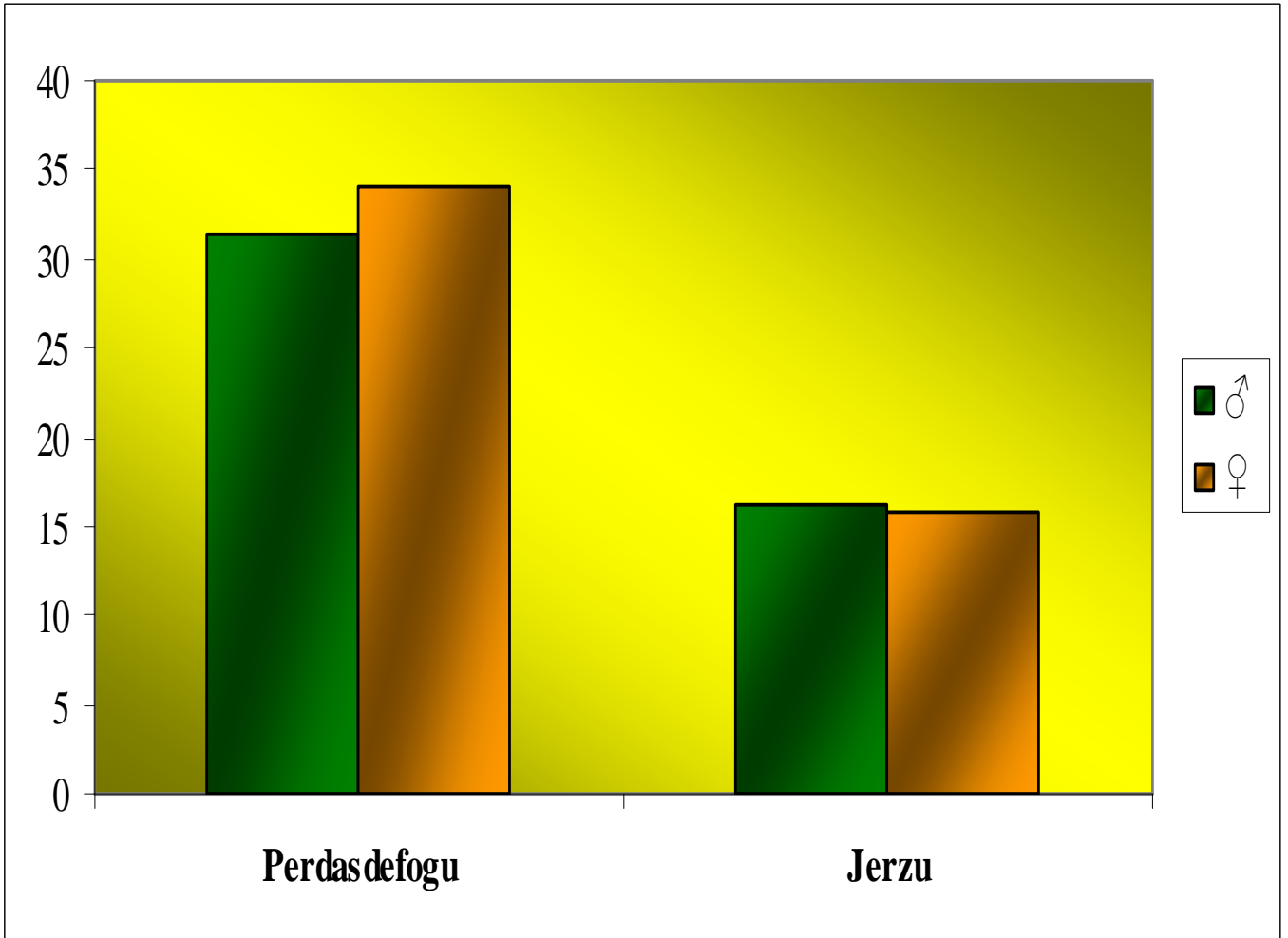


Figura 9. Livelli medi di Uranio nelle urine (ng/dL) relativi al campione di bambini, suddiviso per sesso, residenti nei Comuni di Perdasdefogu e Jerzu.

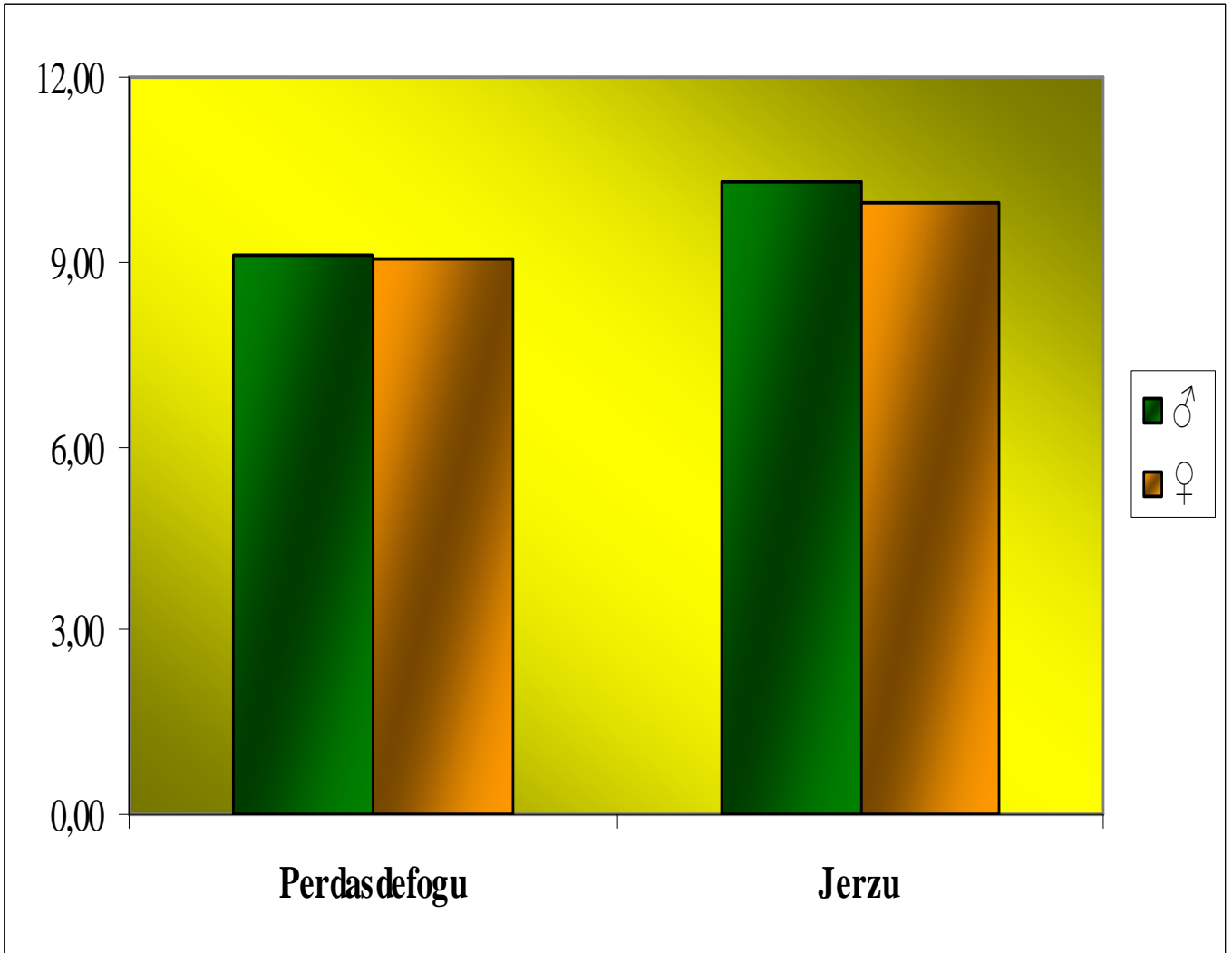
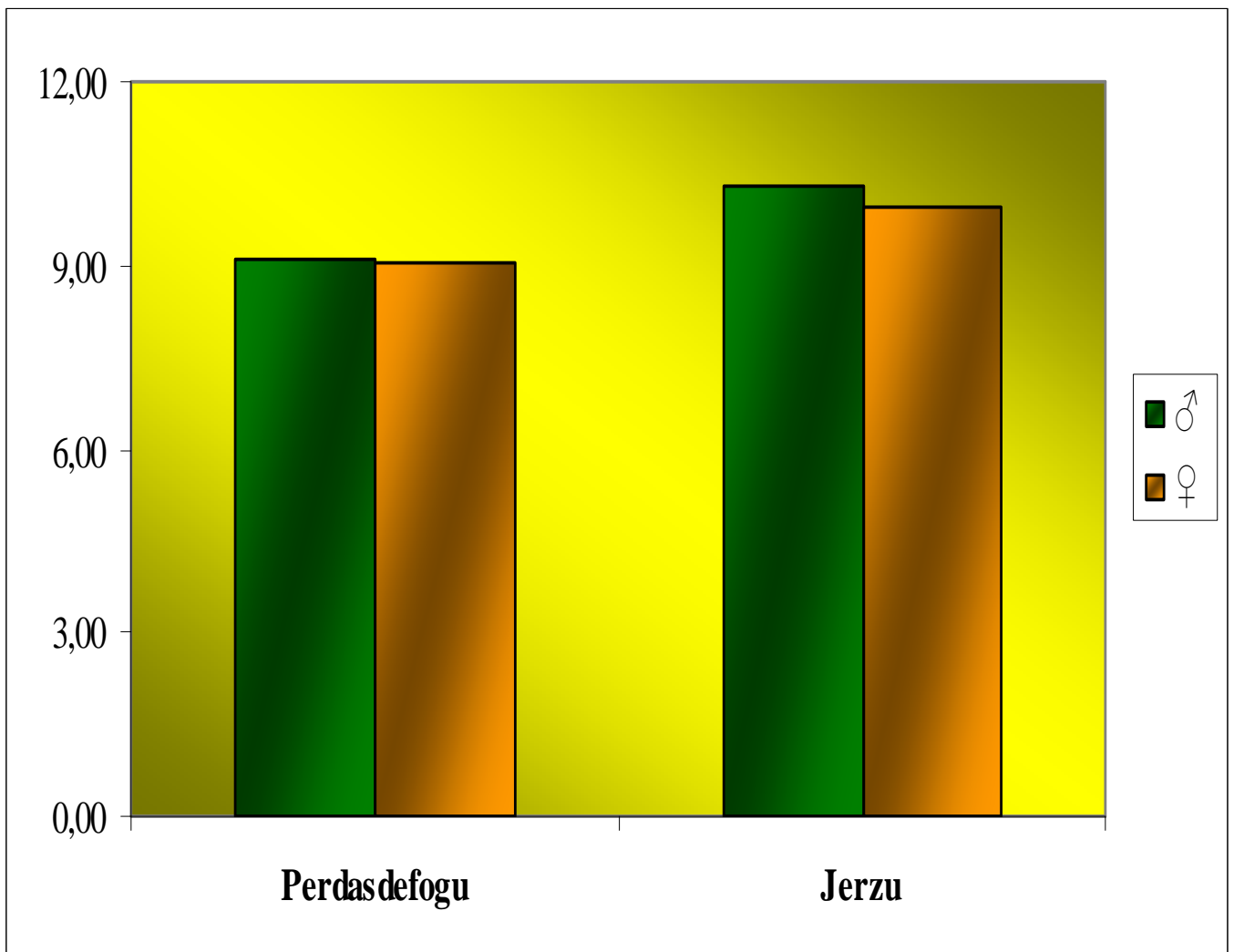


Figura 10. Livelli medi di Uranio nei capelli (ng/g) relativi al campione di bambini, suddiviso per sesso, residenti nei Comuni di Perdasdefogu e Jerzu.



Bibliografia

Abbritti G., Muzi G., Cicioni C., Accattoli M.P., Fiordi T., Morucci P., 1989. Effects of low doses of lead on children's health. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, 25: 437-448.

Al-Saleh I., Nester M., Devol E., Shinwari N. & Al-Shahria S., 1999. Determinants of blood lead levels in Saudi Arabian schoolgirls. *Int. J. Occup. Environ. Health*, 5: 107-114.

Annest J.L., Mahaffey K.R., Cox D.H., Roberts J. 1982. Blood lead levels for persons 6 months-74 years of age. *Advance data*, 79: 1-23.

Astrin K.H., Bishop D.F., Wetmur J.G., Kaul B., Davidow B. E Desnick R.J., 1987. Delta-aminolevulinic acid dehydratase isozymes and lead toxicity. *Ann. N. Y. Acad Sci*, 514: 23-29.

ATSDR, 2001. Hair analysis panel discussion: exploring the state of the science. Atlanta, GA: Agency for Toxic Substances and Disease Registry. http://www.atsdr.cdc.gov/HAC/hair_analysis.

ATSDR, 1989. The Nature and Extent of Lead Poisoning in Children in the United States: A Report to Congress, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, Ga.

Barbosa F., Tanus-Santos J.E., Gerlach R.F., Parsons P.J., 2005. A critical review of biomarkers used for monitoring human exposure to lead: advantages, limitations, and future needs. *Environ. Health Perspect.*, 113: 1669-1674.

Baker E.L., Goyer R.A., Fowler B.A., Khettry U., Bernard O.B., Alder S., White R., Babayan R. e Feldman R.G., 1980. Occupational lead exposure, nephropathy and renal cancer. *Am. J. Ind. Med.*, 1: 139-148.

Ballow C., Khan L.K. Kaufmann R., Mokdad A., Miller D.T., Gunter E.W., 1999. Blood lead concentration and children's anthropometric dimensions in the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III), 1988-1994. *The Journal of Pediatrics*, 134: 623-630.

Bellinger D., Leviton A., Waternaux C., Needleman H. e Rabinowitz M., 1988. Low-level lead exposure, social class and infant development. *Neurotoxicol Teratol*, 10: 497-503.

Bellinger D., Needleman H.L., Bromfield R. e Mintz M., 1986. A follow-up study of the academic attainment and classroom behavior of children with elevated dentine lead levels. *Biol. Trace Elem. Res.*, 6: 207-223.

Bernstein J., Evan A.P. e Gardner K.D., 1987. Epithelial hyperplasia in human polycystic kidney disease. Its role in pathogenesis and risk of neoplasia. *Am. J. Pathol.*, 129: 92-101.

Bessis M.D. e Jensen W.N., 1965. Sideroblastic anemia, mitochondria and erythroblastic iron. *Br. J. Haematol.*, 11: 49-51.

Boscolo R., Galli G., Iannaccone A., Martino F. e Porcelli G., 1981. Plasma renin activity and urinary kallikrein excretion in lead-exposed workers as related to hypertension and neuropathy. *Life Sci.*, 28: 175-184.

Brugge D., De Lemos J.L., Admixon B., 2005. Exposure pathways and health effects associated with chemical and radiological toxicity of natural uranium: a review. *Rev. Environ. Health*, 20(3):177-93.

Burchfiel J.L., Duffy F.H., Bartels P.H. e Needleman H.L., 1980. The combined discriminating power of quantitative electroencephalography and neuropsychologic measures in evaluating central nervous system of effects of lead at low levels. In Needleman H.D. (ed.): *Low Level Lead Exposures*. Raven Press, New York, pp. 75-90.

Byrne A.R., Benedik L., 1990. Uranium content of blood, urine and hair of exposed and non exposed persons determined by radiochemical neutron activation analysis, with emphasis on quality control. *Sc. of Total Environ.*, 107: 143-157.

Canfield R.L., Henderson C.R., Cory-Slechta D.A., Cox C., Jusko T.A., Lanphear B.P. 2003. Intellectual impairment in children with blood lead concentrations below 10 µg per deciliter. *N. Engl. J. Med.*, 348: 1517-1526.

Campbell, T.F., Needleman, H.L., Riess, J.A., Tobin, M.J., 2000. Bone lead levels and language processing performance. *Dev. Neuropsychol.*, 18: 171-186.

Caroli S., Senofonte O., Violante N., Fornarelli L., Powar A., 1992. Assessment of reference values for elements in hair of urban normal subjects. *Microchem. J.*, 46: 174-183.

Carpenter B.S., Cheek C.H., 1970. Trace determination of uranium in biological material by fission track counting. *Ann. Chem.*, 42: 121-123.

Casula D., Abbritti G., Berlinguer G., Castellano N., Cherchi P., Farula A., et al., 1993. *Medicina del lavoro*. Monduzzi Editore.

Cavalleri A. 1988. I rischi da esposizione da piombo per la popolazione italiana alla luce delle indagini più recenti. *Rapporti ISTISAN*, 42: 130-153.

CDC. 2004. Work Group of the Advisory Committee on Childhood Lead Poisoning Prevention. A Review of the Evidence of Health Effects of Blood Lead Levels < 10 µg/dL in Children. Atlanta, GA:Centers for Disease Control and Prevention. <http://www.cdc.gov/nceh/lead/ACCLPP/meetingMinutes/lessThan10MtgMAR04.pdf>

Chen C.J., Chuang Y.C., Lin T.M., Wu H.Y., 1985. Malignant neoplasms among residents of a blackfoot disease endemic area in Taiwan: high arsenic artesian well water and cancers. *Cancer Res.*, 45: 5895-5899.

Chisolm J.J., 1987. Increased lead absorption and lead poisoning. In: Nelson Textbook of Pediatrics, 13th edition, 1507-1511. W.B. Saunders Company, Philadelphia.

Chisolm J.J., Jr., O'Hara D.M., 1982: Lead Absorption in Children. Management, Clinical and Environmental Aspects. Urban and Schwarzenberg, Baltimore.

Choi D.D., e Richter G.W., 1980. Effect of lead on the kidney. In Singhal R.O. and Thomas J.A. (eds): Lead Toxicity. Urban and Schwarzenberg.

Chung J.S., Kalman D.A. Moore L.E., Kosnett M.J., Arroyo A.P., Beeris M., et al., 2002. Family correlations of arsenic methylation patterns in children and parents exposed to high concentrations of arsenic in drinking water. *Environ. Health Perspect.*, 110: 729-733.

Columbano A., Ledda G.M., Siriqu P., Perra T., Pani P., 1983. Liver cell proliferation induced by a single dose of lead nitrate. *Am. J. Pathol.*, 110: 83-88.

Cooper W.C., Gaffey W.R., 1975. Mortality of lead workers. *J.O.M.*, 17: 100-107.

Dadea C., 2003. Mobilità dei metalli pesanti in suoli e sedimenti e loro trasferimento alla biosfera: il caso dell'arsenico nella piana di Quirra (Sardegna). Tesi di Dottorato in Scienze della Terra. Università di Cagliari.

Dadea C., Ardaù C., Frau F., Lattanzi P., 2004. Contaminazione da arsenico in acque superficiali e profonde nell'area di Baccu Locci, Quirra, Sardegna Sud-orientale. 135-140.

Dingwall-Fordyce I., Lane R.G., 1963. A follow-up study of lead workers. *Br. J. Ind. Med.*, 20: 313-315.

Di Paolo J.A., Casto B.C., 1979. Quantitative studies of in vitro morphologic transformation of Syrian hamster cells by inorganic metal salts. *Cancer Res.*, 39: 1008-1019.

Egle P.M., Shelton K.R., 1986. Chronic lead intoxication causes a brain-specific nuclear protein to accumulate in the nuclei of cells lining kidney tubules. *J. Biol. Chem.*, 261: 2294-2298.

EPA: 1986. 600/8-83-021F. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.

EPA: 1989. Evaluation of the Potential Carcinogenicity of Lead and Lead Compounds.

EPA-600/8-89/049A. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C..

EPA: 1989. Supplement to the 1986 EPA Air Quality Criteria for Lead, Vol. 1, Addendum

EPA/600/8-89/049A. Office of Health and Environmental Assessment, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C., pp. A1-A-67.

EPA/625/3-87/013, 1998. Special report on ingested inorganic arsenic-skin cancer; nutritional essentially. Environmental Protection Agency, Washington, DC.

Factor-Litvak P., Wasserman G., Kline J.K., Graziano J., 1999. The Yugoslavia prospective study on environmental lead exposure. *Environmental Health Perspectives*, 107: 9-15.

Fiesienne I.M., Perry P.M., 1985. Isotopic U concentration in human blood from New York City donors. *Health Phys.*, 49(6): 1272-1275.

Fitzgerald E.F., Schell L.M., Marshall E.G., Carpenter D.O., Suk W.A., Zejda J.E., 1998. Environmental pollution and child health in Central and Eastern Europe. *Environ. Health Perspect.*, 106: 307-311.

Frisancho R., Ryan A.S., 1991. Decreased stature associated with moderate blood lead concentrations in Mexican-American children. *American Journal of Clinical Nutrition*, 54: 516-519.

Fulton M., Thomson G., Hunter R., Raab G., Laxen D., Hepburn W., 1987. Influence of blood lead on the ability and attainment of children in Edinburgh. *Lancet*, i: 1221-1225.

Furman A., Laleli M. 2000. Semi-occupational exposure to lead: a case study of child and adolescent street vendors in Istanbul. *Environmental Research Section*, 83: 41-45.

Gerber G.B., Leonard A., Jacquet P., 1980. Toxicity, mutagenicity and teratogenicity of lead. *Mutat. Res.*, 76(2): 115-141.

Goyer R.A., 1982. The nephrotoxic effects of lead. In Bach P., Bonner F.W., Bridges J.W. e Lock E.A. (eds): Nephrotoxicity, Assessment and Pathogenesis. John Wiley and Sons, Publ., Chichester. England, pp. 338-348.

Goyer R.A., 1971a. Lead and the kidney. *Curr. Top. Pathol.*, 55: 147-176.

Goyer R.A., 1971b. Lead toxicity: a problem in environmental pathology. *Am. J. Pathol.*, 64: 167-182.

Goyer R.A., Rhyne B., 1973. Pathological effects of lead. *Int. Rev. Exp. Pathol.*, 12: 1-77.

Goyer R.A., Wilson M.H., 1975. Lead-induced inclusion bodies: results of EDTA treatment. *Lab. Invest.*, 32:149-156.

Grandjean P., Grandjean E., 1984. Effects of Organolead Compounds. CRC Press, Boca Raton, Fla..

Gulson B.L., Davis J.J., Bawden-Smith J., 1995. Paint as a source of recontamination of houses in urban environments and its role in maintaining elevated blood leads in children. *Sci Total Environ.*, 164(3): 221-235.

Gulson B.L., Mizon K.J., Korsch M.J., Howarth D., Phillips A., Hall J., 1996. Impact on blood lead in children and adults following relocation from their source of exposure and contribution of skeletal tissue to blood lead. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 56(4): 543-550.

Gwiazda R., Campbell C., Smith D., 2005. A noninvasive isotopic approach to estimate the bone lead contribution to blood in children: implications for assessing the efficacy of lead abatement. *Environ. Health Perspect.*, 113(1):104-110.

Van de Wiel H.J., 2003. Determination of elements by ICP-AES and ICP-MS. *Horizontal* 19: 11-33.

Hamilton E.I., 1970. Uranium content of normal blood. *Nature*, 227.

Hirata M., Yoshida T., Miyajima K., Kosak H., Tabuchi T., 1995. Correlation between lead in plasma and other indicators of lead exposure among lead-exposed workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.*, 68(1): 58-63.

International Agency for Research on Cancer (IARC), 1987. Monograph on the Evaluations of Carcinogenicity: An Update of IARC Monographs, Vols. 1-42, Suppl. 7. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.

International Agency for Research on Cancer (IARC), 1980. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man: some metals and metallic compounds. World Health Organization, Lyon.

Kang H.K., Infante P.F. e Carra J.S., 1980. Occupational lead exposure and cancer. *Science*, 207: 935-936.

Karpas Z., 2001. Uranium bioassay-beyond urinalysis. *Health Phys.*, 81(4): 460-463.

Kile M.L., Houseman E.A., Rodrigues E., Smith T.J., Quamruzzaman Q., Rhaman M., Mahiuddin G., Su L., Christiani D.C., 2005. Toenail arsenic concentrations, GSTT1 gene polymorphisms, and arsenic exposure from drinking water. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 10: 2419-2426.

Kurtio P., Harmonien A., Saha H., Salonen L., Karpas Z., Komulainen H., Auvinen A., 2006. Kidney toxicity of ingested uranium from drinking water. *Am. J. Kidney Dis.*, 47(6): 972-982.

Landrigan P.J., 1989. Toxicity of lead at low dose. *Br. J. Ind. Med.*, 46: 593-596.

Lech T., 2002. Lead, Copper, Zinc, and Magnesium in hair of children and young people with some neurological disease. *Biological Trace Element Research*, 85: 111-126.

Lilis R., 1981. Long-term occupational lead exposure: chronic nephropathy and renal cancer: a case report. *Am. J. Ind. Med.*, 2: 293-297.

Lilis R. e Fischbein A., 1976. Chelation therapy in workers exposed to lead a critical review. *J.A.M.A.*, 235: 2823-2824.

Loffredo C.A., Vasken Aposhian H., Cebrian M.E., Yamauchi H., Silbergeld E.K., 2003. Variability in human metabolism of arsenic. *Environ. Res.*, 92: 85-91.

Lowry L.K., Cherry D.C., Brady C.F., Huggins B., D'Sa A.M., Levin J.L., 2004. An unexplained case of elevated blood lead in a Hispanic child. *Environ. Health Perspect.*, 112(2): 222-225.

Mahaffey K.R., 1985. *Dietary and Environmental Lead: Human Health Effects*. Elsevier Scientific. New York.

Manton W.I., Angle C.R., Stanek K.L., Reese Y.R., Kuehnemann T.J., 2000. Acquisition and retention of lead by young children. *Environ Res.*, 82(1): 60-80.

Marcos R., Martinez V., Hernandez A., Creus A., Sekaran C., Tokunaga H., Quinteros D., 2006. Metabolic profile in workers occupationally exposed to arsenic : role of GST Polymorphisms. *J. Occup. Environ. Med.*, 48: 334-341.

Markovac J. e Goldstein G.W., 1988. Lead activates protein kinase C in immature rat brain microvessel. *Toxicol. Appl.Pharmacol.*, 96: 14-23.

McLaughlin J.R., Goyer R.A. e Cherin M.G., 1980. Formation of lead-induced inclusion bodies in primary rat kidney epithelial cell cultures: effect of actinomycin D and cycloheximide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 56: 418-431.

McMichael A.J., Baghurst P.A., Wigg N.R., Vimpani G.V., Robertson E.F., Roberts R.J., 1988. Port Pirie cohort study: environmental exposure to lead and children's abilities at the age of four years. *New England Journal of Medicine*, 319: 468-475.

Ministero della Difesa, 2004. Relazione finale sullo studio geochimico svolto nel Poligono di Perdasdefogu. 2(4): 22-31.

Morisi G., Patriarca M., Carrieri M.P., Fondi G., Taggi F., 1989. Lead exposure: assessment of the risk for the general Italian population. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, 25: 423-436.

Moore J.F., Goyer R.A., Wilson M., 1973. Lead-induced inclusion bodies. Solubility, amino acid content, and relationship to residual acidic nuclear proteins. *Lab. Invest.*, 29(5): 488-94.

Morton J., Carolan V.A., Gardiner P.H.E., 2002 Removal of exogenously bound elements from human hair by various washing procedures and determination by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 455: 23-34.

Nagyvary J. e Bradbury E.L., 1977. Hipocholesterolemia effects of Al^{3+} complexes. *Biochem. Res.Comm.*, 2: 592-597.

NAS, 1972. Lead: Airborne Lead in Perspective. National Academy of Sciences, Washington, D.C..

National Research Council (NRC), 2000. Arsenic in drinking water update. NAS Press, Washington, DC.

National Research Council (NRC), 1999. Arsenic in drinking water. National Academy Press, Washington, DC.

Needleman H.L., Gunnoe E.E., Leviton A., Reed R., Peresie H., Maher C., Barret P., 1979. Deficits in psychologic and classroom performance of children with elevated blood lead levels. *N. Engl. J. Med.*, 300: 689-695.

Needleman H.L., Schell A., Bellinger D., Levinton A., Allred E., 1990. Long-term effects of childhood exposure to lead at low dose; an eleven-year follow-up report. *N. Engl. J. Med.*, 322: 83-88.

National Center for Health Statistic. 1988-94. Plan and operation of the Third National Health and Nutrition Examination Survery. 1994. *Vital Health Stat 1. 32: 1-407.*

Paglia D.E., Valentine W.N. e Dahlgren J.G., 1975. Effects of low level lead exposure on pyrimidine-5'-nucleotidase and other erythrocyte enzymes. *J. Clin. Invest.*, 56: 1164-1169.

Perlstein M.A. and Attala R., 1966. Neurologic sequelae of plumbism in children. *Clin. Pediatr.*, 5: 292-298.

Pirkle J.L., Schwartz J., Landis J.R., Harlan W.R. 1985. The relationship between blood lead levels and blood pressure and its cardiovascular risk implication. *American Journal of Epidemiology*, 121: 264-318.

Rahman A., Maqbool E., Zuberi H.S., 2002. Lead-associated deficits in stature, mental ability and behaviour in children in Karachi. *Ann. Trop. Paediatr.*, 22(4): 301-311.

Rossow J., Offermeir J. and van Royen J. M., 1987. Apparent central neurotransmitter receptor changes induced by low-level lead exposure during different developmental phases in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 91: 132-139.

Rutter M. And Jones R.R. (eds), 1983. *Lead versus Health Sources and Effect of Low Level Lead Exposure.* John Wiley & Sons, New York.

Ryabukin Y.S., 1978. Activation analysis of hair as an indicator of contamination of man by Environmental Trace Element Pollutants. IAEA Report IAEA/RL/50. International Atomic Energy Agency, Vienna.

Sanna E., Liguori A., Palmas L., Soro M.R., Floris G., 2003. Blood and hair lead levels in boys and girls living in two Sardinian towns at different risk of lead pollution. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55: 293-299.

Schumann G.B., Lerner S.i., Weiss M.A., Gawronski L., Lohiva G.K., 1980. Inclusion-bearing cells in industrial workers exposed to lead. *Am. J. Clin. Pathol.*, 74(2): 192-196.

Schumacher M., Domingo J.L., Llobet J.M., e Corbella J., 1991. Lead in children's hair, as related to exposure in Tarragona Province, Spain, *Sci. Total Environ.*, 104 : 167-173.

Schwartz J., Angle C., Pitcher H., 1986. Relationship between childhood blood lead levels and stature. *Pediatrics*, 77: 281-288.

Smith DR, Osterloh JD, Flegal AR., 1996. Use of endogenous, stable lead isotopes to determine release of lead from the skeleton. *Environ Health Perspect.*, 104: 60–66.

Seidel S., Kreutzer R., Smith D., McNeel S., Gilliss D., 2001. Assessment of commercial laboratories performing hair mineral. *JAMA*, 285:67–72.

Senofonte O., Violante N., Fornarelli L., Beccaloni E., Powar A., Caroli S., 1989. Reference values for elements of toxicological, clinical and environmental interest in hair of urban subjects. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, 25: 385-392.

Shell L.M., 1991. Effect of pollutants on human prenatal and postnatal growth: noise, lead, polychlorobiphenyl compounds, and toxic wastes. *Yearbook of Physical Anthropology*, 34: 157-188.

Smith D.R., Osterloh J.D., Flegal A.R., 1996. Use of endogenous, stable lead isotopes to determine release of lead from the skeleton. *Environ. Health Perspect.*, 104: 60–66.

Tsaih S.W., Schwartz J., Lee M.L.T., Amarasiriwardena C., Aro A., Sparrow D., Hu H., 1999. The independent contribution of bone and erythrocyte lead to urinary lead among middleaged and elderly men: The normative aging study. *Environ. Health Perspect.*, 107: 391–396.

Vidaud C., Dedieu A., Basset C., Plantevin S., Dany I., Pible O., Quéméneur E., 2005. Screening of human serum proteins for uranium binding. *Chem. Res. Toxicol.*, 18: 946-953.

World Health Organization (WHO), 1983. Arsenic, criteria document for health and the environment. 18, WHO, Geneva.

World Health Organization (WHO), 1998. Guidelines for drinking water quality. Vol II : 238 WHO, Geneva.

Wilhelm M., Ewers U., Schulz C, 2004. Revised and new reference values for some trace elements in blood and urine for human biomonitoring in environmental medicine. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 207(1): 69-73.

Wilhelm M., Schulz C., Schwen K.M., 2006. Revised and new reference values for arsenic, cadmium, lead, and mercury in blood or urine of children: basis for validation of human biomonitoring data in environmental medicine. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 209(3): 301-305.

Wolfsperger M., Hauser G., Gossler W., Schlagenhafen C., 1994. Heavy metals in human hair samples from Austria and Italy—influence of sex and smoking-habits. *Sci Total Environ.*, 156: 235–242.