

L'ESPOSIZIONE UMANA AL TALLIO ATTRAVERSO L'ACQUA POTABILE:

IL CASO DI VALDICASTELLO CARDUCCI E PIETRASANTA (LUCCA)

Beatrice Campanella^{a,b}, Massimo Onor^a, Marco Carlo Mascherpa^a, Alessandro D'Ulivo^a, Roberto Giannecchini^c, Massimo D'Orazio^c, Riccardo Petrini^c, Emilia Bramanti^a

^aCNR - Istituto di Chimica dei Composti Organometallici, UOS di Pisa

^bUniversità di Pisa, Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale

^cUniversità di Pisa, Dipartimento di Scienze della Terra

bramanti@pi.iccom.cnr.it



DOI: <http://dx.medra.org/10.17374/CI.2016.98.4.38>

Uno studio geologico ha evidenziato la presenza di tallio (Tl) in concentrazioni preoccupanti nelle acque sotterranee nella zona di Valdicastello Carducci (Comune di Pietrasanta, Toscana nord-occidentale). La sorgente di Tl è principalmente associata alla presenza di pirite tallifera nelle gallerie di locali siti minerari abbandonati. Nel settembre 2014 il Tl è stato rinvenuto anche nell'acqua ad uso idropotabile distribuita nella stessa area (2-10 µg/L) e successivamente anche in quella di Pietrasanta. Qui riportiamo i risultati dello studio di esposizione effettuato utilizzando ICP-MS volto a quantificare i livelli Tl in 150 campioni di urina e 318 campioni di capelli nella popolazione di Valdicastello-Pietrasanta.

Human Exposure To Thallium Through Tap Water

A geological study evidenced the presence of thallium (Tl) at concentrations of concern in groundwaters near Valdicastello (Tuscany) due to Tl-bearing pyrite ores occurring in the abandoned mining sites of the area. In September 2014 Tl contamination was also found in the tap water distributed in the same area (from 2 to 10 µg/L). Here we report the results of the exposure study carried out using ICP-MS aimed at quantifying Tl levels in 150 urine and 318 hair samples from the population of Valdicastello-Pietrasanta.

Dalla letteratura scientifica internazionale [1, 2] è noto che il tallio (Tl, numero atomico 81) è un elemento altamente tossico che, come piombo e mercurio ed altri metalli pesanti, viene assorbito rapidamente in seguito ad ingestione, inalazione e, in misura minore, contatto cutaneo. Il Tl si accumula nelle cellule e nei tessuti degli esseri viventi (piante ed animali) interferendo con i meccanismi fondamentali del metabolismo cellulare. Essendo simile al potassio per dimensioni e carica tende a sostituirsi ad esso alterando attività enzimatiche di vitale importanza. In particolare, il Tl si sostituisce al potassio nel funzionamento della Na⁺/K⁺ ATPasi (detta pompa sodio/potassio, EC 3.6.3.9) che si trova nella membrana delle cellule. La pompa sodio/potassio è ubiquitaria ed è coinvolta nel controllo del volume cellulare, nel conferimento alle cellule nervose e muscolari della proprietà di eccitabilità, ed è coinvolta nel trasporto attivo di glucidi ed amminoacidi. È riportato che il Tl influenza anche l'attività di altri enzimi come la piruvato kinasi (EC 2.7.1.40), deputata al processo di fosforilazione nelle cellule [3]. La U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA) ha incluso il Tl nella lista dei 13 inquinanti tossici prioritari [2].

Nonostante il suo limitato uso nell'industria, il Tl è stato causa di avvelenamenti acuti accidentali descritti in alcuni lavori [4-10].

Sono meno documentati gli episodi di esposizione e contaminazione a lungo termine come risultato del rilascio naturale di questo metallo da zone minerarie o da industrie o da centrali a carbone [11-15]. È interessante ricordare il caso di esposizione cronica a Tl su 21 soggetti in Cina, nella zona rurale SW Guizhou (2007) [11, 15] e lo studio su 113 soggetti esposti occupazionalmente a Tl [12]. Nella provincia cinese SW Guizhou i residenti mostravano problemi di salute con concentrazioni di Tl urinario >4,5-6 µg/L e situazioni di forte intossicazione con concentrazioni >500 µg/L [11]. I soggetti esposti occupazionalmente presentavano valori di Tl urinario pari a 0,41 µg/L contro 0,17 µg/L dei non esposti.

La contaminazione da Tl è nota anche in altre zone: nella zona estuarina del Rio Tinto nel sud est della Spagna [14], nel sud della Francia [16] ed in Canada [17]. In letteratura è riportato anche un caso di inquinamento dell'acqua potabile nello Utah [18].

La Environmental Protection Agency degli Stati Uniti (US-EPA) ha fissato il livello di contaminazione massima (*maximum concentration level*, MCL) del Tl nell'acqua potabile a 2 µg/L, con l'obiettivo di abbassarlo a 0,5 µg/L [2]. Il MCL del Tl nell'acqua potabile è regolata in Cina (con una soglia di 0,1 µg/L [19]), Canada [20], Messico e America Latina [21] e Russia [22]. Tuttavia, in Europa il MCL nell'acqua potabile non è regolamentato e viene indicato come livello di contaminazione massima il valore US-EPA di 2 µg/L. In Italia, la concentrazione di Tl non è regolata nell'acqua potabile (D. Lgs. 31/2001), ma, paradossalmente, è regolata nelle acque di scarico (MCL=1 µg/L) [23] e nelle acque sotterranee (MCL=2 µg/L) (D. Lgs. 152/2006) [24]. Inoltre, il Tl ha una concentrazione soglia rispettivamente di 1 e 10 mg/kg nei suoli ad uso residenziale ed industriale (D.Lgs. 152/2006). Recentemente l'Unione Europea ha finanziato un progetto COST (Cooperation in Science and Technology) per migliorare la comprensione dei processi ambientali e le possibili minacce per la salute causate da questo tipo di elementi "esotici", Tl incluso.

Biocinetica del Tl

La Fig. 1 mostra la biocinetica del Tl nel corpo umano a seconda del tipo di esposizione. Questa può avvenire attraverso l'inalazione, il cibo e l'acqua, il contatto con la pelle. Il Tl attraversa le membrane biologiche per diffusione, viene quindi distribuito nel corpo attraverso l'apparato circolatorio ed escreto attraverso i fluidi (urine, sudore, latte), capelli, unghie, feci. Una parte di Tl si accumula negli organi e nei tessuti e può gradualmente rientrare nel flusso sanguigno [25].

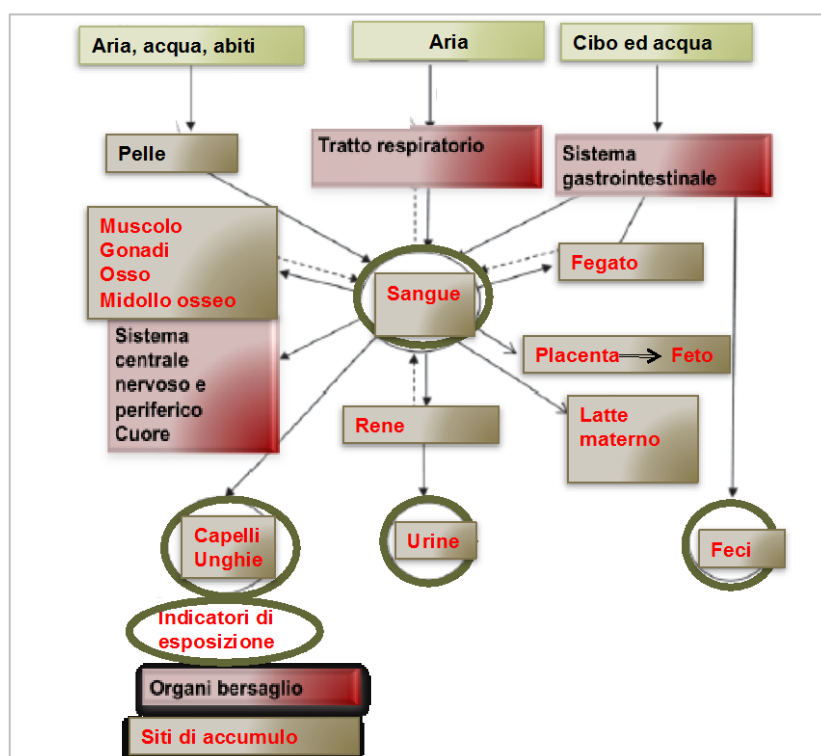


Fig. 1 - Biocinetica del Tl nel corpo umano

L'emivita del TI nelle urine nell'uomo è stimata essere tra i 10 ed i 30 giorni [26]. Tuttavia alcuni autori riportano un'emivita di 3-8 giorni [27] o 12,5 giorni [28].

Tossicità del TI

Intossicazione acuta

Sono ben noti gli effetti provocati dall'intossicazione acuta da TI sulla salute umana e su animali (cani, cavie e piccoli animali) [29-53]. La dose letale di TI nell'uomo è pari a 0,5-1 g, ovvero 15-20 mg/kg di peso corporeo. I sintomi dell'intossicazione acuta sono disturbi gastro-intestinali (dolori addominali intensi, nausea, vomito, diarrea con sangue, necrosi del fegato), cardiaci (ipotensione e bradicardia, seguita da ipertensione e tachicardia, necrosi miocardica, aritmie, infarto), neurologici (neuropatie del sistema nervoso periferico, formicolii, paralisi ascendente, arresto respiratorio), renali e dermatologici (perdita dei capelli). Patologie del feto umano nell'intossicazione acuta sono sconosciute ma è noto che ratti esposti per alcune settimane ad elevate concentrazioni di TI provocano effetti avversi allo sviluppo fetale. Una raccolta bibliografica sulla tossicità del TI in tutte le sue accezioni è riportata nel TOXNET, Toxicology Data Network del National Institute of Health (NIH, USA)[54].

Intossicazione cronica

È riportato un numero significativo di studi sugli effetti provocati dall'intossicazione cronica su piante, animali e piccoli animali [17, 30-34, 36, 40, 45-47, 49, 50, 52, 53, 55-73], dove, con intossicazione cronica, si intende l'esposizione dei soggetti a basse concentrazioni di TI per lungo tempo. È noto che nei ratti l'apparato riproduttore maschile può essere danneggiato anche da basse concentrazioni di TI [54].

Nello studio canadese viene esplorata la concentrazione di TI in alcuni ecosistemi. Nelle nevi dell'Artico la concentrazione di TI è molto bassa (<LOD fino al massimo a 8,4 ng/L). Nelle acque dei Grandi Laghi la concentrazione di TI raggiunge 0,9-48 ng/L e nelle acque di poro 0,1-213 ng/L. Nei siti adiacenti a centrali a carbone e miniere il TI raggiunge valori pari a 0,1-1326 ng/L a ovest, 1,2-175 ng/L nel centro, 0,2-23605 ng/L ad est. È stata anche studiata la sua tossicità sul crostaceo *Hyaella azteca* [17].

Sono pochi gli studi condotti sull'intossicazione cronica da TI negli esseri umani [11, 12, 15, 65], proprio perché è presente come contaminante solo in particolari zone minerarie o vicino a cementifici o lavorazioni particolari (elettronica, superconduttori, vetro).

I sintomi dell'intossicazione cronica da TI includono: disturbi neurologici (polineuropatia, formicolii e dolori mani e piedi, sensazioni di paralisi, debolezza, dolori muscolari e alle articolazioni, tremori, cefalea, insonnia), visivi (alterazione della visione dei colori, riduzione della vista, paralisi muscoli oculari), psichiatrici (depressione, apatia, ansia), dermatologici (perdita eccessiva di capelli, ciglia e sopracciglia, linee di Mees sulle unghie), gastro-intestinali (dolori addominali, diarrea) e fetali (nascita pretermine con basso peso) [74]. Albuminuria ed alopecia sono sintomi caratteristici di un eccesso di TI accumulato nell'organismo.

Ludolph *et al.* hanno riportato uno studio su 36 operai di un cementificio che presentavano deficits neurologici [75].

Uno studio pubblicato nel 2013 dal National Center for Environmental Assessment (US-EPA) effettuato nel periodo 2007-2008 su N=1587 soggetti ha evidenziato che i valori di TI urinario in un intervallo ritenuto dagli autori moderatamente elevato (mediana 0,15 µg/L; 0,11 µg/L, 25° percentile; 0,21 µg/L 75° percentile) sono associati ad una diminuzione degli ormoni tiroidei T4 e FT4 ed a disfunzioni tiroidee [76].

L'associazione specifica di livelli di TI moderatamente alti con problemi di basso peso alla nascita è recentissima (dicembre 2015-gennaio 2016) [77, 78]. Col termine basso peso alla nascita si intende un peso inferiore a 2,500 g. Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità il basso peso alla nascita è la causa principale di morbidità e mortalità nel periodo neonatale ed è uno dei fattori di rischio maggiori del carico di malattia globale (GDB, *global disease burden*) [79]. Ricerche autorevoli hanno dimostrato l'associazione tra basso peso alla nascita e una varietà di esiti negativi per la salute durante l'infanzia, alcuni dei quali possono persistere nell'adulto [80].

Hu *et al.* hanno dimostrato in 81 coppie madre/neonato che il TI ha l'effetto maggiore sulla diminuzione del peso alla nascita [77]. Xia *et al.* [78] hanno dimostrato che le donne gravide con livelli di TI urinario moderatamente elevati (media aritmetica=0,4 µg/L; mediana=0,32 µg/L e media geometrica=0,28 µg/L) se confrontati con la media della popolazione riscontrata nei paesi sviluppati (media geometrica negli

Stati Uniti=0,16 µg/L [81, 82]; mediana=0,15 µg/L [76]; media aritmetica in Germania=0,15 µg/L; media geometrica=0,07 µg/L [83]; media aritmetica in Spagna=0,09 µg/L [84]) hanno bambini con basso peso alla nascita. Lo studio è stato effettuato su 816 soggetti, 204 casi di basso peso alla nascita e 612 controlli. Uno studio precedente ha dimostrato che bambini nati in un'area industriale caratterizzata da contaminazione da Tl avevano valori più elevati di Tl urinario (mediana 5,2 µg/L), e un rischio circa 6 volte più elevato di anomalie congenite, confrontati con bambini non esposti [85]. Hoffman *et al.* [86] hanno riportato che donne gravide esposte ad elevate concentrazioni di Tl (Tl urinario >120 µg/L) avevano partorito bambini prematuri e con basso peso alla nascita.

Sebbene siano poco conosciuti i meccanismi per i quali l'esposizione della madre al Tl possa portare ad un aumentato rischio di basso peso alla nascita del bambino, un possibile meccanismo è che il Tl eserciti tossicità a livello della funzione mitocondriale [87, 88]. Il Tl attraversa la placenta [86] e potrebbe danneggiare la funzione placentare ed il tessuto fetale, con forti criticità per lo sviluppo e l'accrescimento dell'embrione e del feto [89].

Alcune evidenze suggeriscono anche il Tl induce stress ossidativo nella cellula [90-93]. Il Tl interagisce, infatti, con i tioli a basso peso molecolare (cisteina e glutatione), riducendo la loro biodisponibilità nei meccanismi di difesa contro lo stress ossidativo [94-99]. Lo stress ossidativo stesso indotto da Tl può interferire con lo sviluppo fetale. Il Tl interagisce, inoltre, con i gruppi tiolici delle proteine, alterandone la funzione e inibisce gli enzimi con siti attivi contenenti cisteina [100-103].

Un lavoro recente ha evidenziato che l'esposizione moderata, cronica, a metalli pesanti in tracce (Al, Ni, Tl, e U) provoca la diminuzione dei livelli di cromo serico e di molibdeno nel sangue. Si è dimostrato, inoltre che metalli in tracce come U, Tl, Ni ed Al, anche a concentrazioni che rientrano nei loro valori di riferimento, sono fortemente competitivi con gli elementi essenziali nei processi biochimici [104].

La tossicità cronica da Tl può avere un lungo periodo di latenza prima della comparsa dei sintomi clinici. Gli studi epidemiologici devono, pertanto, protrarsi per anni.

Mutagenicità e cancerogenicità

Effetto mutageno del Tl sul DNA è noto fin dagli anni Ottanta solo con esperimenti *in vitro* su cellule di roditori [105, 106]. Esperimenti *in vitro* dimostrano anche che il Tl interagisce con il DNA [107-111]. Non ci sono ad oggi evidenze sull'effetto mutageno e cancerogeno sull'uomo.

Tossicità del Tl(I) e del Tl(III)

È ben noto che i metalli mostrano vari livelli di tossicità a seconda del loro stato di ossidazione (per es. Cr(III) e Cr(VI)).

Il Tl esiste nelle acque principalmente in due stati di ossidazione (+1 e +3). Si ritiene che il Tl(I) sia la forma più termodinamicamente stabile in soluzioni acquose mentre il Tl(III) è più reattivo e si idrolizza in soluzioni neutre ed alcaline. Il Tl(III) può essere ridotto elettrochimicamente a Tl(I) molto velocemente ($\log K \cong 40$, $E_{red}(Tl^{3+}/Tl^+) = +1,26$ V). La sua riduzione è più veloce della sua complessazione (tipiche $\log K = 3-9$). Tuttavia, la riduzione del Tl(III) può essere limitata da reagenti quali i cloruri ($\log K = 17$), gli ossalati ($\log K = 16$), l'EDTA ($\log K = 37$) o il DTPA ($\log K = 46$). La velocità di riduzione del Tl(III) diminuisce fino al 40% in presenza di cloruri, 80% in presenza di acetato. Solo l'1-3% del Tl(III) si riduce a Tl(I) in presenza di DTPA. A pH < 7 è possibile osservare l'idrolisi del Tl(III). A pH più elevati si formano complessi degli idrossidi. Recentemente, è stato riportato che nei Grandi Laghi il Tl(III) rappresenta circa il 60% del Tl totale misurato [41]. Le costanti di stabilità dei complessi del Tl(I) con leganti inorganici od organici sono molto basse [112].

Ci sono pochi dati sulla tossicità del Tl(III) ma è ben noto che è migliaia di volte più tossico del Tl(I). Ad esempio è stato dimostrato che nelle alghe (*Chlorella*, *Daphnia magna* e *Ceriodaphnia dubia*) il Tl(III) è migliaia di volte più tossico del Tl(I) [41, 113] e che il Tl(III) è 34 mila volte più tossico degli ioni cadmio [113]. È stato dimostrato in colture cellulari di ratto che sia il Tl(I) che il Tl(III) danneggiano la funzione mitocondriale e attivano meccanismi di apoptosi cellulare [92, 93, 114].

Il "caso" della contaminazione da Tl nella zona di Valdicastello Carducci-Pietrasanta

Uno studio geologico recente [115] ha dimostrato la presenza di Tl a concentrazioni elevate (fino a 4.500 volte superiore al limite fissato dal D.Lgs. 152/2006 e dalla statunitense EPA) nelle acque di drenaggio che

fuoriescono dalle gallerie minerarie in abbandono nei pressi di Valdicastello Carducci (Fig. 2) e Pietrasanta (Provincia di Lucca). La sorgente di TI è principalmente associata alla presenza di pirite tallifera nelle gallerie dei siti minerari abbandonati stessi. Questa zona mineraria è rimasta attiva per decine e decine di anni, con estrazioni di minerali di vario tipo; nell'ultima sua fase, dalla fine della II Guerra Mondiale fino agli anni Novanta, si estraevano barite ed ossidi di ferro (ematite e magnetite). I tunnel delle miniere abbandonate, in parte crollati o precario stato di stabilità, le discariche associate e gli impianti per il trattamento dei minerali sono presenti ancora oggi e pongono una serie di problematiche ambientali e di bonifica.

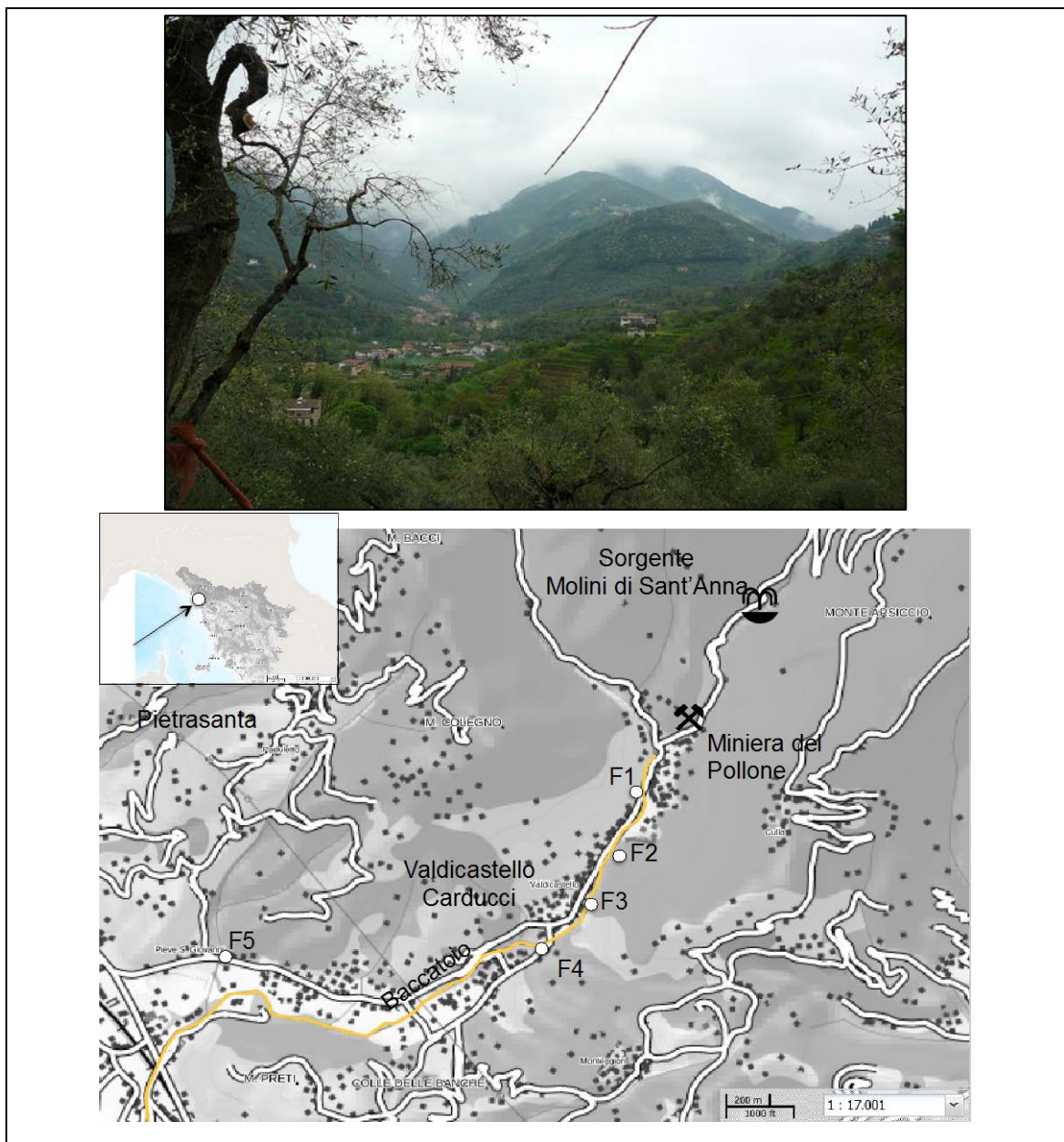


Fig. 2 - Le località citate in questo lavoro e la loro localizzazione geografica. F1-F5 sono le fontane pubbliche la cui acqua è stata analizzata per questo studio (la fontana F6 si trova vicino al cimitero di Pietrasanta, appena al di fuori della mappa)

I minerali di pirite contenenti TI a livelli di concentrazione pari a 100-600 mg/kg [116] sono sottoposti a processi di ossidazione biotici (microorganismi, Fig. 3) e abiotici (ossigeno atmosferico) con conseguente rilascio di TI ed altri metalli (ad esempio Fe, As, Sb, Pb, Zn, Cd etc.) in acqua. I microorganismi coinvolti sono principalmente *Acidithiobacillus ferrivorans*, *Leptospirillum ferrooxidans* e *Sulfobacillus* s.p. I drenaggi acidi che escono dalle gallerie minerarie abbandonate in genere contengono 200-1.000 µg/L di

TI, mentre alcuni ristagni di acqua molto acida (pH=1,5-2,0) all'interno dei tunnel possono raggiungere livelli di concentrazione di TI ancora più estremi, fino a 9.000 µg/L.



*Fig. 3 - A) Drenaggi acidi provenienti dalle gallerie della miniera abbandonata;
B) colonie di microorganismi presenti nelle gallerie abbandonate*

I siti minerari sono distribuiti principalmente nel bacino idrografico del Torrente Baccatoio e molto vicino al corso d'acqua stesso. Il Baccatoio (circa 10 km di lunghezza), un classico corso d'acqua apuano a regime torrentizio alimentato da alcune sorgenti di acqua di buona qualità, ma anche da gallerie minerarie abbandonate, attraversa Valdicastello Carducci e la pianura costiera a sud di Pietrasanta, e sfocia nel Mar Ligure nella parte meridionale di Marina di Pietrasanta.

Nel settembre 2014 è stata misurata una significativa contaminazione da TI nell'acqua di rubinetto distribuita in questa zona. L'acqua contaminata da TI che alimentava l'acquedotto di Valdicastello Carducci, un paese di circa 1.000 abitanti, e parte di quello di Pietrasanta (cittadina a 3 km da Valdicastello) scaturisce da una importante sorgente naturale di acqua (10-90 L/s), denominata Molini di S. Anna, che si trova all'interno dell'area mineraria e che risulta contaminata fino ad un massimo di concentrazione ad oggi misurato di circa 37 µg/L. Sono in corso alcuni studi per valutare l'origine di questa contaminazione da TI nella sorgente e per capire come il TI (presente nell'ordine del % in peso) venga trattenuto nelle incrostazioni presenti all'interno delle tubature e quindi ulteriormente rilasciato nell'acqua potabile.

In questo contesto è stato valutato l'impatto dell'esposizione al TI presente nell'acqua potabile su una popolazione di persone che, a seguito della scoperta del TI nell'acqua potabile, ha volontariamente partecipato ad un campionamento di capelli ed urine subito dopo la comunicazione dell'ordinanza di non potabilità da parte delle autorità. Le urine sono una matrice attendibile per la valutazione dell'esposizione a breve termine [117] e sono state raccolte entro un mese dall'ordinanza e, per 38 casi, nei 12 mesi successive all'ordinanza. I capelli sono stati raccolti per valutare l'esposizione a lungo termine.

Materiali e metodi

Reclutamento dei volontari

I residenti sono stati invitati a partecipare allo studio attraverso incontri pubblici. Tutti i partecipanti hanno dato un consenso informato scritto, e per ogni partecipante sono stati raccolti tramite un questionario i dati demografici, il sesso, una breve storia residenziale, l'abitudine all'uso dell'acqua di rubinetto per cucinare e il tipo di acqua solitamente bevuta (acqua del rubinetto o acqua in bottiglia).

Un totale di 150 soggetti (114 adulti e 36 bambini) ha fornito un campione di urina. I partecipanti avevano un'età compresa tra 2 e 84 anni (media 38 anni). Il primo campionamento delle urine è stato effettuato nel mese di ottobre 2014 (novembre 2014 per Pietrasanta), entro un mese dall'ordinanza di non potabilità. Un secondo campionamento delle urine è stato condotto su 140 soggetti nel mese di novembre 2014 (dicembre 2014 per Pietrasanta), con l'obiettivo di valutare il livello di contaminazione ad una distanza di 60 giorni dopo l'ordinanza. Per 38 volontari (14 maschi, 24 femmine, età 4-77 anni, età media 38 anni) che vivono in aree selezionate (26 da Valdicastello e 12 da Pietrasanta), il campionamento delle urine è stato effettuato anche per diversi mesi fino a 1 anno dopo l'ordinanza.

Un totale di 318 soggetti (189 adulti e 129 bambini) ha fornito un campione di capelli. I partecipanti avevano un'età compresa tra 1 e 84 anni (media 31 anni). Il rapporto maschi/femmine era 90/99 negli adulti e 54/75 nei bambini. I capelli sono stati campionati nel mese di ottobre 2014 a Valdicastello e novembre a Pietrasanta, entro un mese dall'ordinanza di non potabilità imposto alla popolazione.

La popolazione è stata classificata in quattro gruppi a seconda del grado di inquinamento delle acque nei luoghi di residenza (alto, medio e basso Valdicastello, e Pietrasanta). Il grado di inquinamento è stato stabilito in base al valore di concentrazione di TI trovato nell'acqua dalle fontane pubbliche (F1-F5). Ogni abitante è stato assegnato ad un gruppo specifico sulla base della prossimità dell'abitazione di residenza alle fontane (F1-F5).

Campionamento e preparazione del campione

Acqua del rubinetto - Nell'area di studio, l'acqua potabile fornita dalla rete idrica veniva approvvigionata da una sorgente d'acqua situata molto vicina al sito minerario abbandonato. I campioni di acqua sono stati raccolti da 6 fontane pubbliche (F1-F5 a Valdicastello e F6 in periferia di Pietrasanta) che erogavano la stessa acqua distribuita nelle case dei residenti. I campioni di acqua sono stati raccolti in provette Falcon® di polipropilene da 50 ml. Prima del campionamento, l'acqua è stata lasciata scorrere dal rubinetto per almeno tre minuti. Acido nitrico concentrato suprapur è stato aggiunto a tutti i campioni in modo da ottenere un valore di pH finale <2. I campioni sono stati conservati a 4 °C.

Capelli ed urine - Ogni partecipante ha fornito la prima urina dopo la notte. I campioni di urina sono stati congelati a -20 °C fino all'analisi. Prima dell'analisi, i campioni di urina sono stati scongelati a temperatura ambiente, centrifugati (5.000 rpm per 10 min.) e diluiti 1: 10 con acido nitrico 2%.

I campioni di capelli sono stati raccolti dalla nuca e tagliati il più vicino possibile al cuoio capelluto. Sono stati raccolti solo capelli non trattati, di lunghezza compresa tra 3 e 15 cm, tagliati in pezzetti di circa 1 cm e mischiati. Non sono stati campionati capelli di lunghezza inferiore a 3 cm. La parte di capelli più lunga di 15 cm è stata scartata. Considerando che la crescita dei capelli è di circa 1-1,5 cm/mese, la quantificazione di TI nei capelli ha evidenziato un'esposizione media di 2-7 mesi. I campioni sono stati conservati in sacchetti di polietilene con chiusura. Per l'analisi sono stati pesati circa 200-300 mg di ciascun campione di capelli in provette di polietilene, lavati tre volte con miscela 1: 1 acetone/acqua ultrapure, trasferiti in contenitori in Teflon e pre-digeriti per 1 ora a temperatura ambiente con HNO₃ (6 mL, 69% w/w) e H₂O₂ (2 mL, 30% w/w). I contenitori sono stati quindi chiusi ermeticamente e posti in forno a microonde (ciclo di digestione da temperatura ambiente fino a 200 °C in 10 min., 20 min. a 200 °C e raffreddamento). Dopo raffreddamento a temperatura ambiente, i campioni sono stati quantitativamente trasferiti in flacon di polietilene e diluiti con acqua ultrapura fino a 50 mL. I campioni sono stati conservati a temperatura ambiente.

Analisi ICP-MS e validazione del metodo - Le analisi delle urine diluite e dei digeriti di capelli è stata effettuata mediante ICP-MS Agilent model 7700 (Agilent Technologies, Tokyo, Japan). I reattivi chimici, la strumentazione e le metodologie impiegate sono descritte in dettaglio in [118].

Per la validazione del metodo di analisi delle urine e dell'acqua sono stati utilizzati materiali di riferimento certificato (NIST 2670a, *lyophilized urine* e NIST 1640e, acqua). I campioni e gli standard sono stati analizzati in triplicato. Il limite di rilevabilità (LOD) per questo studio era di 2 ng/L per campioni acquosi.

La precisione dell'analisi ICP-MS è stata determinata in N=3 replicati di campioni di urina e capelli. Il recupero medio dello standard interno (iridio) era $100\pm 5\%$, indicando l'assenza di un effetto matrice significativo nella procedura adottata. La concentrazione certificata di Tl riportato per SRM 1640e è pari a $1,619\pm 0,016$ mg/L, e la concentrazione trovata $1,61\pm 0,08$ mg/L. Nel campione di urina certificato (alto contenuto NIST 2670a) la concentrazione di Tl certificata è $5,417\pm 0,064$ mg/L, la concentrazione trovata pari a $5,34\pm 0,11$ mg/L (n=6, RSD% 2,06). Il limite di rilevabilità per l'urina era di 20 ng/L.

Attualmente, non sono disponibili in commercio materiali di riferimento certificati per il Tl nei capelli. Il Materiale di riferimento Certificato ERM-DB001 (capelli, Sigma-Aldrich, Milano) è certificato per sette metalli pesanti (As, Cd, Cu, Hg, Pb, Se, Zn) e rappresenta l'unico modo per valutare l'effetto matrice per campioni di capelli. Questo campione è stato utilizzato per valutare il recupero di Tl aggiungendo 250 μ L di soluzione standard di Tl prima della procedura di digestione, in modo da ottenere una concentrazione finale di 81,0 ng/g. È stata trovata una concentrazione Tl di $79,6\pm 4$ ng/g, corrispondente ad un recupero pari al 98,3% (6 repliche, RSD% 5,5%). Il LOD nei capelli era pari a 0,6 ng/g. L'intera procedura di lavaggio dei capelli, digestione e l'analisi ICP-MS sono stati ripetuti N=3 volte per 7 campioni, per stimare la riproducibilità. La deviazione standard relativa massima ottenuta era pari a 11%.

Risultati

Il Tl nell'acqua potabile

Per il campionamento di acqua sono state selezionate 5 fontane pubbliche a Valdicastello (F1-F5) e 1 a Pietrasanta (F6), tutte collegate alla rete acquedottistica in gran parte alimentata dalla sorgente Molini di S. Anna. La Fig. 4 mostra i livelli di Tl misurati nell'acqua di rubinetto raccolta dalle fontane F1-F5 nel mese di settembre 2014.

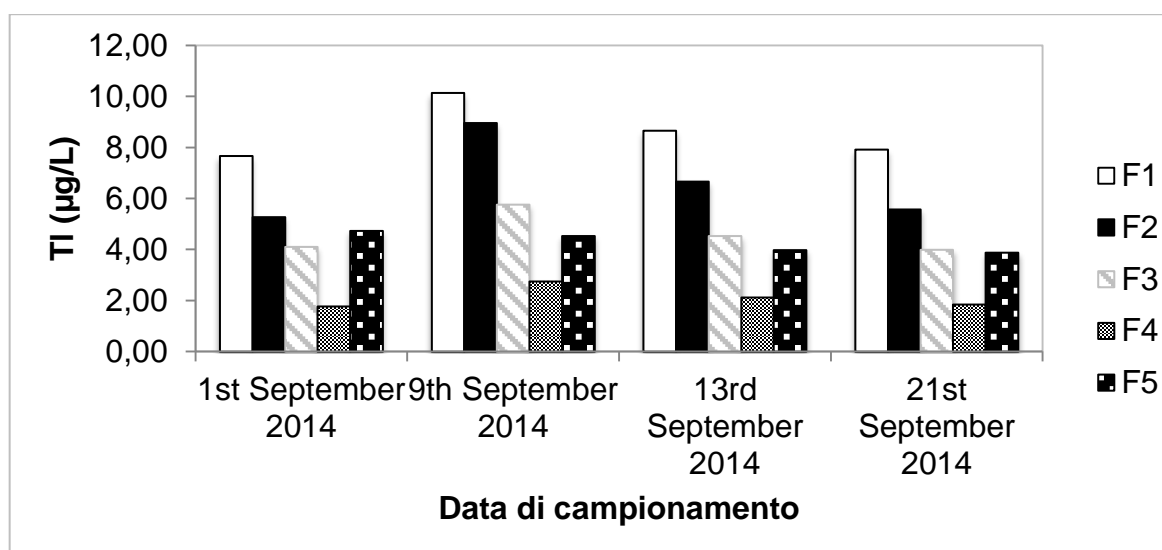


Fig. 4 - Livelli di Tl misurati nell'acqua potabile distribuita dalla rete idrica campionata da 5 fontane pubbliche di Valdicastello durante il mese di settembre 2014 (F1-F2: alto Valdicastello; F3-F4: medio Valdicastello; F5: basso Valdicastello)

Fino al settembre 2014, il sistema di distribuzione dell'acqua potabile di Valdicastello Carducci (e, quindi, anche delle fontane pubbliche F1-F5) è stato alimentato dalla sorgente Molini di S. Anna, contaminata da Tl come descritto in precedenza. L'acqua alimentava anche circa il 10% del sistema di distribuzione dell'acqua potabile di Pietrasanta (fontana pubblica F6). L'acqua campionata alle fontane pubbliche aveva concentrazioni di Tl nell'intervallo 1,77-10,1 μ g/L, valori che eccedevano il valore di concentrazione massima (CML) fissato in alcuni Paesi. Come si osserva dalla Fig. 4 i livelli di contaminazione trovati nell'acqua delle fontane pubbliche nel periodo studiato (4 campionamenti durante il mese di settembre 2014) diminuivano progressivamente passando dalle fontane localizzate nella parte alta del paese a quelle localizzate lungo la

valle; sembra fare eccezione F5, ma in realtà essa pare che fosse collegata alla parte più alta della rete mediante una condotta diversa da F1-F4). È probabile che questo decremento fosse dovuto al progressivo assorbimento delle TI sulle superfici delle incrostazioni di ossidi-idrossidi di ferro che rivestono la superficie interna dei tubi in acciaio dell'acquedotto. Attualmente sono in corso alcuni studi per confermare questa ipotesi. Il 3 ottobre 2014 le autorità locali emanarono l'ordinanza di non usare l'acqua per bere e cucinare, ed esclusero la sorgente contaminata dal sistema di distribuzione. Nel mese successivo furono rinvenuti valori di TI oltre 1 µg/L anche nell'acqua potabile del centro di Pietrasanta e l'ordinanza fu estesa anche a quella zona (3 km da Valdicastello).

Analisi dei campioni di capelli e urine

Un passo fondamentale nella valutazione degli effetti negativi e cumulativi sull'uomo di un inquinante presente dell'acqua è la misura del suo contenuto in campioni biologici. Urine e capelli rappresentano matrici adatte perché facili da campionare in quantità sufficiente, non invasive, facilmente trasportabili e conservabili. L'esposizione a concentrazioni elevate di metalli pesanti e metalloidi si riflette nei capelli, che forniscono informazioni, come già sottolineato, circa l'esposizione a lungo termine [117, 119].

Il profilo di distribuzione dei microelementi lungo la lunghezza della ciocca di capelli può essere studiato per tracciare la storia di assunzione/esposizione di oligoelementi negli individui. L'Agenzia per le sostanze tossiche e il registro delle malattie statunitense (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, ATSDR) ha esplorato l'analisi dei capelli umani come un potenziale strumento aggiuntivo per valutare l'esposizione, e l'US-EPA ha indicato i capelli come uno dei più importanti materiali biologici per il monitoraggio ambientale mondiale degli elementi [120, 121]. I capelli sono stati utilizzati anche dall'International Atomic Energy Agency (AIEA) per monitorare gli andamenti dei livelli degli elementi [122]. Tuttavia, anche se tutti sono in accordo sulla validità dei risultati qualitativi dell'analisi dei capelli, l'interpretazione dei risultati è ancora in discussione a causa di questioni irrisolte, come l'influenza di un eventuale contaminazione esterna o dei trattamenti cosmetici, o le possibili differenze genetiche [123].

La Fig. 5 mostra la distribuzione di frequenza ed i *box plots* relativi alla concentrazione di TI trovata nei capelli in ng/g [123] e nelle urine in µg/L della popolazione studiata, campionati entro un mese dall'ordinanza di non potabilità.

I valori di TI nei capelli (N=318) erano nell'intervallo 1-498 ng/g, con una media aritmetica di 41 ng/g (standard deviation 68 ng/g), media geometrica di 15 ng/g e 95° percentile 157 ng/g. I valori di TI urinario (N=150) erano nell'intervallo 0,046-5,44 µg/L, media aritmetica 0,74 µg/L (deviazione standard 0,67 µg/L), media geometrica 0,55 µg/L e 95° percentile 1,88 µg/L.

In quasi il 40% della popolazione esaminata livelli di TI nei capelli superavano i 30 ng/g. Batista *et al.* riportano concentrazioni comprese tra 0,1 e 6 ng/g come valori di riferimento per il TI nei capelli di popolazioni non esposte [124]. Nel loro lavoro Violante *et al.* hanno trovato nei capelli di 92 bambini (9-10 anni) che vivono nelle vicinanze di una centrale termoelettrica di Montalto di Castro valori di concentrazione media di TI pari a 1 ng/g [125].

I soggetti giovani sono considerati più vulnerabili degli adulti agli effetti associati alla contaminazione da metalli e c'è un'attenzione crescente sul rischio al quale tali soggetti possono essere esposti [126]. Nella popolazione studiata il 44% dei soggetti con meno di 14 anni (59%) è fortemente contaminato con valori di TI nei capelli che vanno da 5 a 150 volte il valore dei soggetti non esposti (0,1-1 ng/g).

Poiché gli elementi in tracce nei capelli non sempre riflettono i livelli derivanti solo dalla captazione endogena, a causa della possibile contaminazione da materiali esogeni come suolo, polvere e acqua che potrebbero aderire ad essi, i campioni esaminati in questo studio sono stati trattati con una procedura di lavaggio prima dell'analisi, come riportato nella parte sperimentale. Per validare ulteriormente i nostri risultati, N=7 campioni sono stati analizzati prima e dopo la procedura di lavaggio, trovando differenze non significative nel contenuto di TI.

Mentre i capelli sono una matrice adatta alla valutazione dell'esposizione cronica o continua, l'escrezione urinaria di metalli rappresenta la quantità rimossa dal corpo a seguito di un'esposizione recente. L'urina è infatti poco adatta per valutare l'esposizione cronica a elementi metallici a meno che tali metalli non presentino una lunga emivita (come per es. il cadmio) [117]. Nel caso del TI, considerata la sua emivita di 3-15 giorni, è ragionevole pensare che l'urina sia una matrice affidabile per stabilire la contaminazione avvenuta immediatamente prima dell'ordinanza.

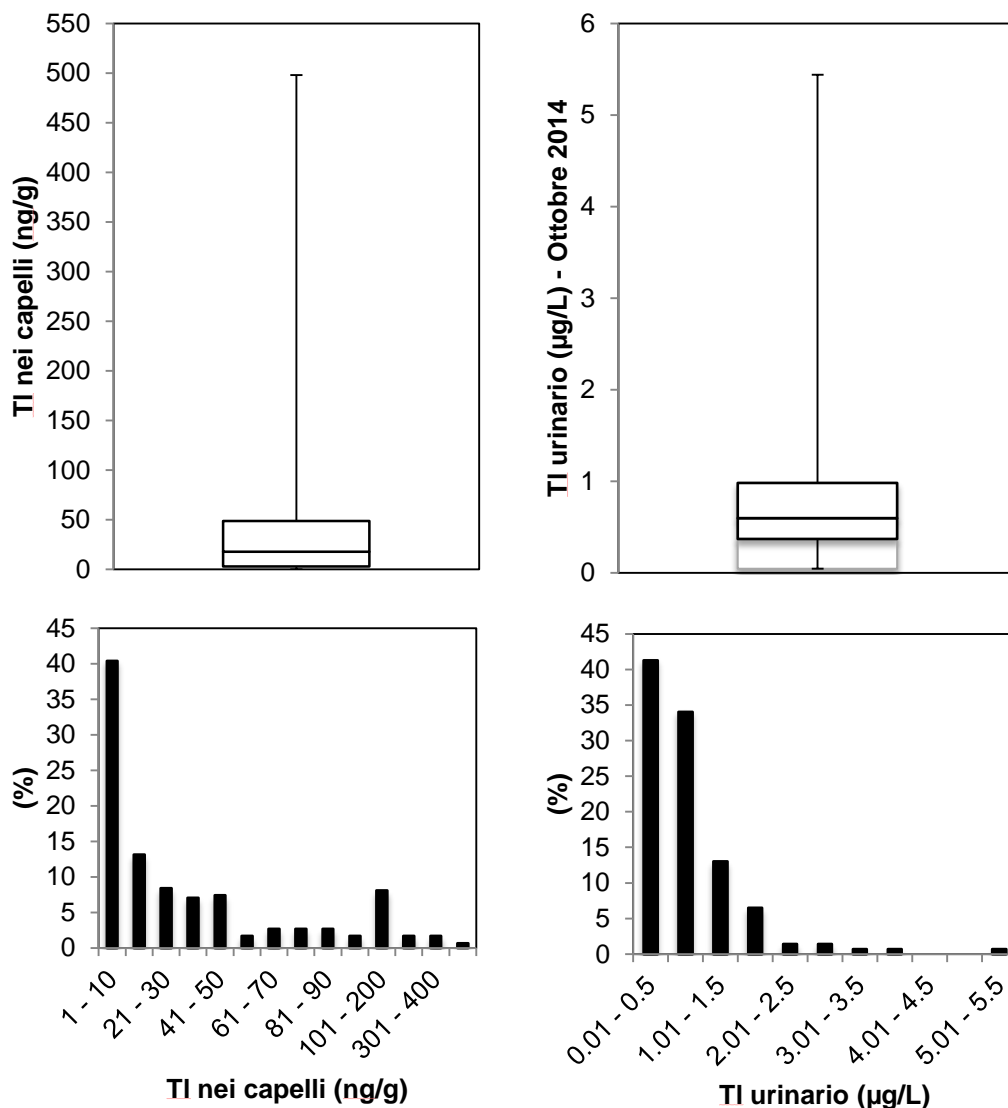


Fig. 5 - Istogrammi di frequenza e box plots del data set dei valori misurati su 318 campioni di capelli (ng/g) e 150 campioni di urine ($\mu\text{g/L}$); nel box plot è riportata la mediana, 25°, 75° percentile ed i valori estremi trovati

I valori di riferimento nelle urine coprono un ampio intervallo. Dati recenti del 2013 riportano che la concentrazione media di TI nelle urine nell'Unione europea è pari a $0,066 \mu\text{g/L}$ [127]. La World Health Organization (WHO) riporta che la concentrazione media di TI urinario nella popolazione non esposta nel 1996 era tra $0,3$ e $0,4 \mu\text{g/L}$ e tra $4,5$ - $6 \mu\text{g/L}$ nei soggetti esposti con possibili effetti sulla salute [128]. Nel loro lavoro Staff *et al.* hanno stabilito $0,40 \mu\text{g/L}$ come 95° percentile del valore di riferimento del TI nelle urine di un gruppo non occupazionalmente esposto a TI [12]. Altri lavori riportano $0,02$ - $1,0 \mu\text{g/L}$ [129], $0,4$ - $1,8 \mu\text{g/L}$ [130] o fino a $0,8 \mu\text{g/L}$ [131].

Il valore medio ed il 95° percentile di TI nella popolazione adulta US (>20 anni), monitorata nel periodo 2009-2010, era $0,142 \mu\text{g/L}$ e $0,410 \mu\text{g/L}$, rispettivamente, [2], lievemente più alta nei maschi (media geometrica $0,152 \mu\text{g/L}$) che nelle femmine (media geometrica $0,137 \mu\text{g/L}$). I valori trovati in bambini ed adolescenti erano leggermente più elevati (6-11 anni, media geometrica $0,161 \mu\text{g/L}$; 12-19 anni, media geometrica $0,150 \mu\text{g/L}$) [2].

La Società Italiana Valori di Riferimento (SIVR), nella lista di valori di riferimento pubblicata nel 2011, riporta per il TI urinario un intervallo di riferimento (5°-95° percentile) di $0,05$ - $0,5 \mu\text{g/L}$ con una media geometrica italiana pari a $0,1 \mu\text{g/L}$ [132].

I dati evidenziano chiaramente che nella popolazione esaminata in questo lavoro il 40% aveva valori di TI urinario $<0,5 \mu\text{g/L}$, il 35% valori compresi tra $0,5-1 \mu\text{g/L}$ ed il 25% $>1 \mu\text{g/L}$. La massima concentrazione di TI trovata ($5,44 \mu\text{g/L}$) è circa 600 volte più alta del valor medio riportato per l'Unione Europea.

Eliminazione del TI nelle urine

Per 140 soggetti, un secondo campionamento delle urine è stato effettuato entro 60 giorni dall'ordinanza di non potabilità. Dopo tale ordinanza con il divieto di usare l'acqua del rubinetto per bere e cucinare, cessava l'eventuale esposizione attraverso l'acqua. I valori di TI urinario trovati dopo 60 giorni erano significativamente inferiori a quelli osservati nei campioni di urina campionati entro 30 giorni. La Tabella 1 riassume i risultati analitici dei livelli TI determinati nei 140 campioni di urina raccolti durante ottobre e novembre 2014 (Valdicastello, ordinanza emanata il 3 ottobre 2014) e novembre e dicembre (Pietrasanta, ordinanza emanata il 7 novembre 2014) quindi entro 30 e 60 giorni dopo l'ordinanza, rispettivamente. I due gruppi erano significativamente differenti ($p < 0,05$) in base al test statistico non parametrico di Mann-Whitney U (valore *p two-tailed*). Tali differenze sono dovute alla escrezione del TI dal corpo.

Tab. 1 - Confronto tra le concentrazioni di TI in 140 campioni di urina raccolti entro 30 e 60 giorni dopo l'ordinanza di non potabilità

| Parametro | TI urinario 30 giorni ($\mu\text{g/L}$) | TI urinario 60 giorni ($\mu\text{g/L}$) |
|------------------|---|---|
| Intervallo | 0,046-5,4 | 0,057-2,3 |
| Media (DS) | 0,74 (0,67) | 0,47 (0,39) |
| Media geometrica | 0,55 | 0,37 |
| Mediana | 0,54 | 0,35 |
| Moda | 1,1 | 0,13 |
| P5 | 0,15 | 0,11 |
| P95 | 1,88 | 1,16 |

In $N=38$ soggetti volontari di Valdicastello e Pietrasanta è stata anche valutata l'eliminazione del TI dalle urine campionando mensilmente per un anno (Fig. 6a,b). In Fig. 6 è riportato il valore medio di TI urinario e la deviazione standard nei soggetti studiati. Tale decadimento è caratterizzato da una funzione esponenziale. La diminuzione di circa il 30% rilevata nei primi 1-2 mesi dopo la rimozione della fonte di contaminazione è probabilmente dovuto al rilascio di TI da tessuti molli (ad esempio muscoli, reni, fegato) [133], mentre il TI è verosimilmente rilasciato più lentamente dalle ossa. Dopo un anno la media del TI urinario è ancora doppia rispetto ai valori di riferimento nella popolazione italiana [134]. Il rilascio di TI dai capelli è in fase di studio.

Valutazione dell'esposizione a lungo termine

A seconda della lunghezza dei capelli, è possibile tracciare i cambiamenti dell'esposizione nel tempo. Lo studio della contaminazione lungo una ciocca di 30 cm (Fig. 7) ha permesso di ipotizzare l'esposizione cronica a TI per circa 15-20 mesi prima della scoperta di contaminazione dell'acqua di rubinetto. Considerando che le abitudini e la zona di residenza del soggetto coinvolto nell'esperimento di Fig. 7 non è cambiata negli ultimi due anni, è lecito ipotizzare che l'andamento della concentrazione di TI mostri i cambiamenti nei livelli di TI compatibili con quelli avvenuti nell'acqua di rubinetto. Di recente, l'ente che gestisce la rete idrica nella zona e le autorità hanno confermato la presenza di TI nell'acqua potabile almeno dal giugno 2011.

Correlazione dei risultati ottenuti su capelli ed urine con i valori di TI dell'acqua potabile

Nonostante i capelli non siano considerati una matrice totalmente affidabile per studiare i contaminanti metallici, in questo lavoro i risultati ottenuti sull'analisi dei capelli sono supportati da quelli ottenuti sulle urine. La popolazione è stata classificata in 4 gruppi sulla base del livello di inquinamento dell'acqua nelle fontane F1-F6 situate nei pressi della zona di residenza. Tali fontane, alimentate dalla medesima sorgente contaminata, sono state considerate rappresentative dell'acqua potabile distribuita in ciascuna casa.

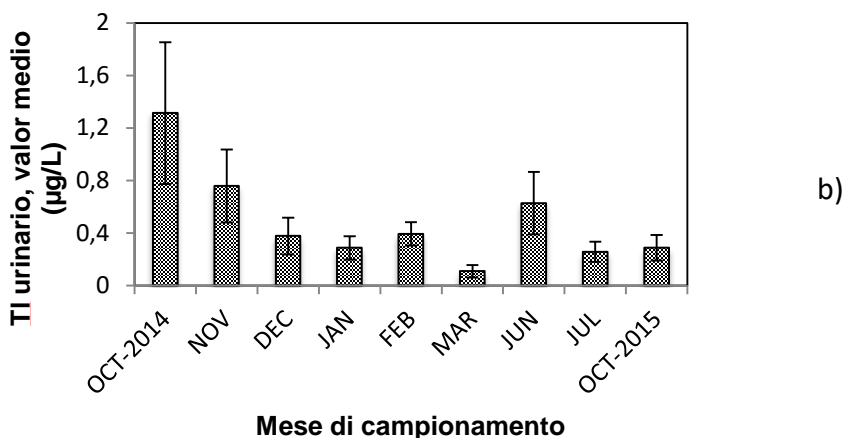
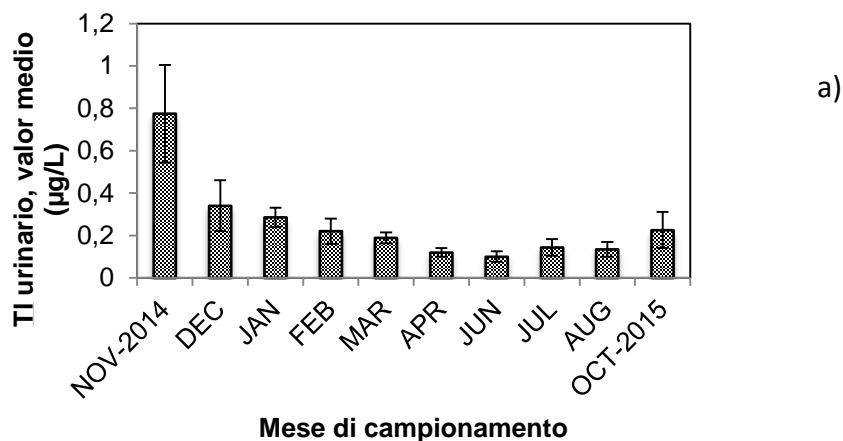


Fig. 6 - Pattern di decadimento del TI urinario nel corso di un anno per (a) 12 abitanti di Pietrasanta e (b) 26 abitanti di Valdicastello Carducci

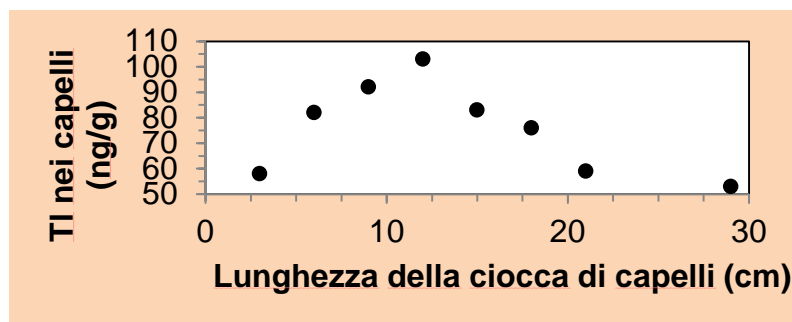


Fig. 7 - Andamento dei valori di TI (ng/g) in segmenti sequenziali di una ciocca di capelli campionata nel novembre 2014 ad un soggetto di 13 anni. La ciocca è stata segmentata in pezzi da 3 cm (ad eccezione dell'ultimo di 8 cm). L'asse x riporta la lunghezza della ciocca a partire dallo scalpo. Considerando che la velocità di crescita dei capelli nel soggetto considerato è di 1,3 centimetri/mese, la massima esposizione al TI è avvenuta intorno al dicembre 2013-gennaio 2014 e nel corso del periodo esaminato la concentrazione è sempre stata al di sopra di 25-50 volte il valore di soggetti non esposti

La Fig. 8 mostra le medie aritmetica (blu) e geometrica (rosa) dei livelli di TI nei capelli (ng/g) e nelle urine (µg/L) di soggetti divisi in base alla loro zona di residenza. Per confronto nella medesima figura sono riportati i valori medi della concentrazione di TI trovata nelle acque delle fontane (Fig. 4). Come osservato per la Fig. 4, anche nel caso di urine e capelli la zona alta di Valdicastello è risultata essere la zona principalmente esposta. Il test di correlazione di Spearman ha indicato una correlazione tra la concentrazione media di TI nelle acque e nelle urine ($r=0,989$). Il livello di contaminazione nel medio, basso Valdicastello e Pietrasanta non è risultato essere significativamente differente.

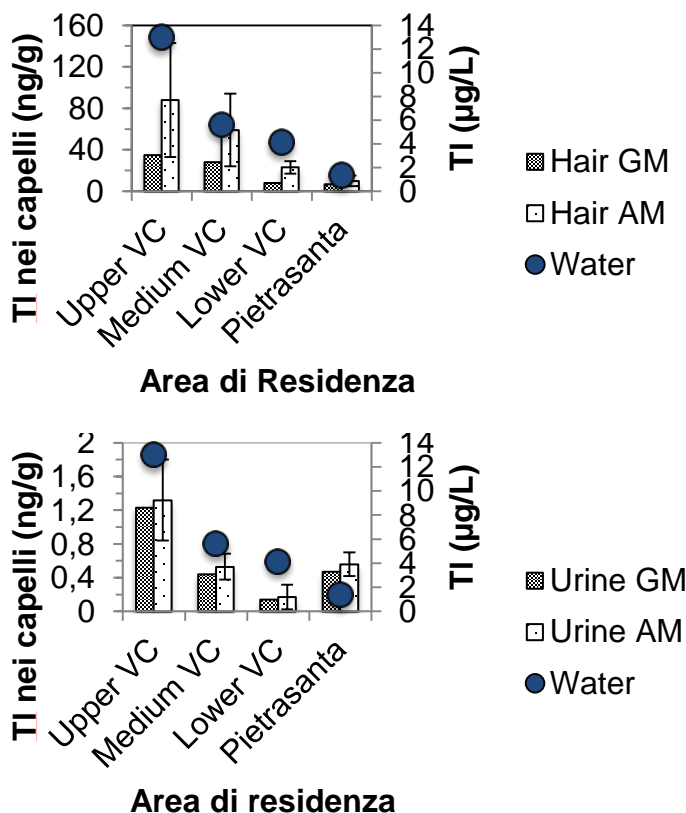


Fig. 8 - Media aritmetica (barre blu) con deviazione standard e media geometrica (barre rosa) dei livelli di TI trovati nei campioni di capelli (ng/g) e di urine (µg/L) classificati in base alla residenza dei soggetti. Per confronto è riportato il valor medio di TI (µg/L) trovato nell'acqua del rubinetto

Uso dell'acqua potabile e valori di TI nei capelli

L'analisi stratificata in base alla zona di residenza (Valdicastello o Pietrasanta) ha permesso di rilevare differenze significative nei maschi residenti in Valdicastello che hanno usato l'acqua del rubinetto per bere e cucinare o solo per cucinare (Fig. 9). Nelle donne tali differenze non sono risultate significative. Questo risultato è dovuto al fatto che i capelli contengono informazioni sulla finestra di esposizione. Nei maschi il tipo di campione è più omogeneo (lunghezza circa 3 cm nell'80% dei casi) e riflette un periodo di esposizione più breve rispetto all'ordinanza di non potabilità. Nelle donne circa il 90% ha i capelli lunghi. Pertanto, l'assenza di una differenza significativa tra soggetti che usavano l'acqua per bere e cucinare o

solo per cucinare riflette un periodo di esposizione più lungo in cui, probabilmente, il livello di contaminazione TI non era costante.

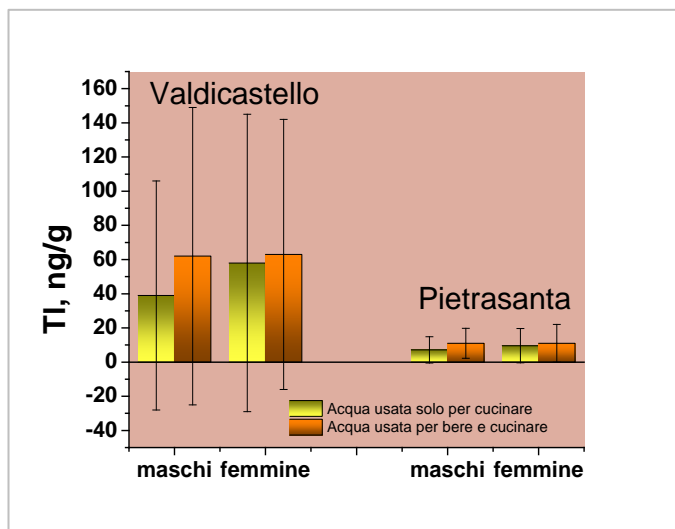


Fig. 9 - Livelli di concentrazione di TI nei capelli (ng/g) in relazione alla zona di residenza, sesso e abitudini (valor medio e deviazione standard, DS)

Correlazione della concentrazione di TI nelle urine e nei capelli

Diversi test statistici (Pearson, Spearman e Kendall) sono stati utilizzati per valutare la forza della associazione tra i livelli TI nelle urine e nei capelli. I test di Spearman e Kendall sono necessari per dati non normalmente distribuiti. Abbiamo trovato una correlazione positiva significativa ($p=0,05$) tra i valori di TI trovati in capelli ed urine (Fig. 10, N=75 dati disponibili).

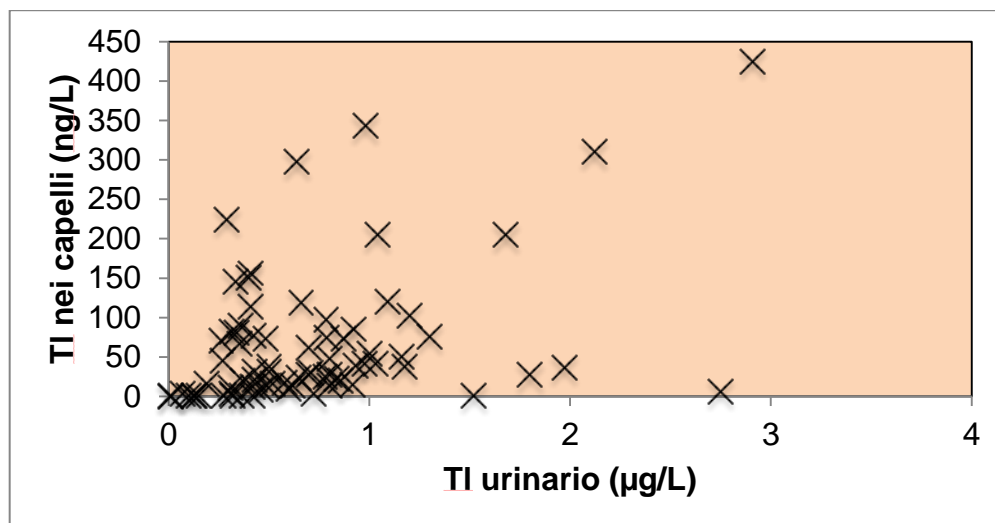


Fig. 10 - Grafico di correlazione dei livelli di concentrazione di TI in campioni di urine e capelli di 75 soggetti della popolazione studiata

Conclusioni

Nel presente studio si è analizzato il livello di contaminazione da TI su capelli ed urine di una popolazione che vive in una zona del nord-ovest della Toscana dove l'acqua potabile è stata contaminata da questo metallo. Capelli e urine sono matrici adatte, non invasive per la valutazione dell'esposizione nella popolazione umana. I risultati indicano che le persone residenti nella zona contaminata di Valdicastello Carducci e Pietrasanta hanno accumulato TI in maniera significativa nelle urine e nei capelli con valori che superano i valori di riferimento della popolazione italiana ed i valori dei non esposti. Inoltre, i livelli di TI nei capelli e nelle urine hanno dimostrato di essere positivamente correlati tra loro.

Le ricerche attualmente in corso riguardano lo studio della matrice saliva, l'interazione del TI *in vitro* con composti tiolici (glutazione, cisteina, proteine) ed i suoi effetti sulla colture cellulari. Un altro aspetto da esplorare è la speciazione del TI e la tossicità delle varie specie. A tale proposito è da sottolineare la presenza nelle tubature della rete idropotabile di micro e nano particelle di avicennite (Ti_2O_3 , ossido di TI) che possono essere rilasciate e dunque ingerite. Sono in corso esperimenti per verificare se la formazione di tale composto possa essere dovuta al processo di clorazione delle acque.

In conclusione è innegabile che il TI sia un inquinante emergente. Il TI coesiste con gli altri metalli pesanti nelle aree vicino alle miniere. L'uso diffuso di TI, e il suo successivo rilascio nell'ambiente, ha portato ad un aumento dei livelli TI in diversi ecosistemi e catene trofiche, aumentando l'esposizione degli esseri umani e di altri organismi viventi a tale elemento. Poiché attualmente la regolamentazione del TI nelle acque non è esaustiva, è auspicabile che le autorità europee affrontino la questione in maniera seria e tempestiva. All'Interrogazione Parlamentare (E-009875-15) presentata al Parlamento Europeo in data 16/06/2015 la Commissione ha risposto il 20/08/2015 che la Direttiva dell'UE concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano (Direttiva 98/83/CE del Consiglio del 3 novembre 1998 concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano) stabilisce che gli Stati membri adottino le misure necessarie affinché le acque destinate al consumo umano siano salubri e pulite e non contengano sostanze che rappresentano un potenziale pericolo per la salute umana. Risponde, inoltre, che "il TI non è esplicitamente incluso nell'elenco dei parametri allegato alla direttiva, tuttavia quest'ultima stabilisce che gli Stati membri prendano i provvedimenti correttivi necessari e impongano le opportune restrizioni, così come è stato fatto dalle autorità locali. ...(omissis)...La direttiva concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano non contiene attualmente alcun riferimento alla necessità di fissare valori di parametro specifici per il TI. Qualora le Linee guida dell'OMS vengano modificate o il progresso tecnico e

scientifico lo richieda, la Commissione valuterà attentamente le informazioni disponibili e prenderà le opportune decisioni in merito.”

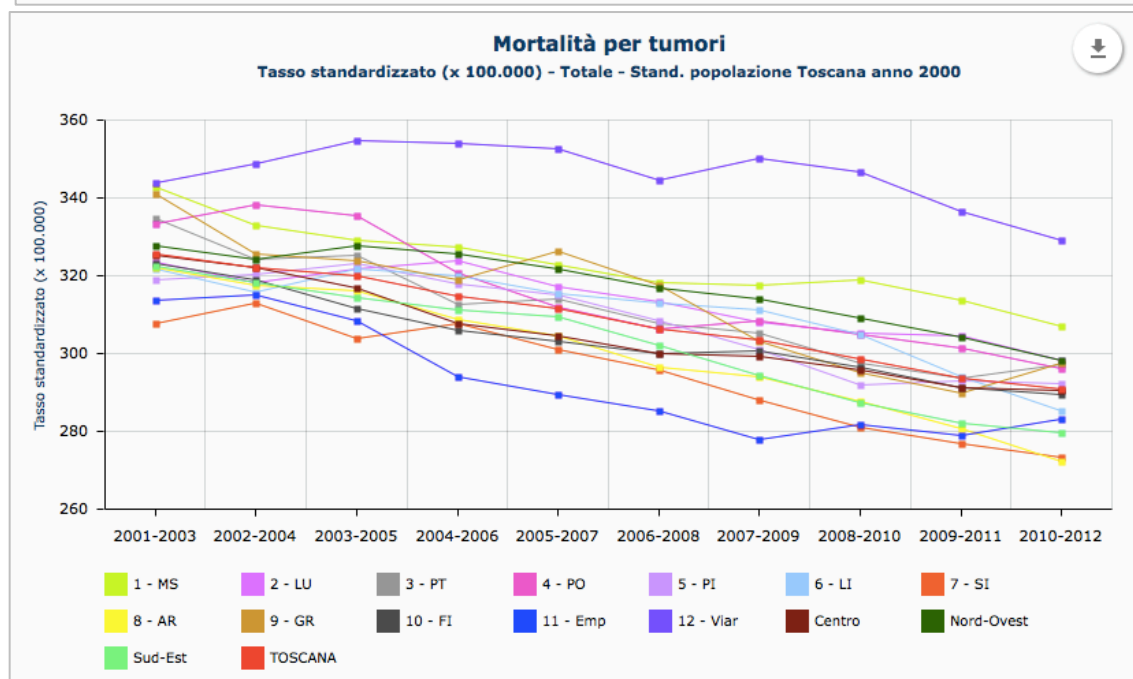
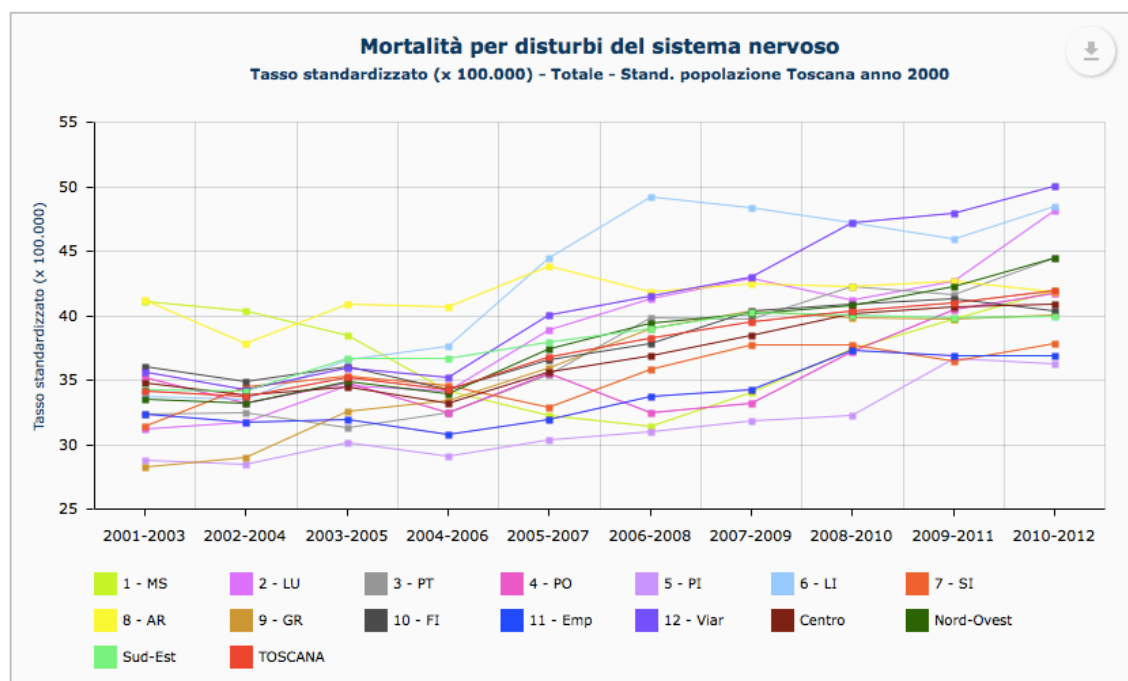


Fig. 11 - Curve di mortalità (per tumore e per disturbi del sistema nervoso) rilevate nelle varie zone della Regione Toscana, tra cui la zona di competenza della ASL 12 Viareggio

Un altro aspetto fondamentale da approfondire è l'indagine epidemiologica retrospettiva e, soprattutto, prospettica.

Sul sito dell'Agenzia Regionale per la Sanità pubblica Toscana (ARS, https://www.ars.toscana.it/it/portale-dati-marsupio-detttaglio.html?codice_asl=9000) è possibile accedere al portale pubblico mARSupio dell'Agenzia Regionale di Sanità della Toscana e prendere visione degli indicatori di salute e di qualità dell'assistenza in Toscana, sviluppati dai gruppi di lavoro in cui è coinvolta l'ARS. La Figura 11 riporta alcuni dei dati più significativi.

Risulta evidente che nella ASL12 Viareggio, in cui ricade l'area di studio, la mortalità generale, per tumori (in particolare del fegato e dotti biliari, pancreas, polmone, apparato digerente) e varie patologie (linfomi

di Hodgkin, per malattie del sistema nervoso, malattia di Alzheimer) elencate è maggiore rispetto a qualsiasi altra zona della Regione Toscana. Certamente questi dati hanno un valore retrospettivo, vanno aggiornati con i dati recenti e non possono essere correlati esclusivamente alla contaminazione da Tl. Tuttavia, non sono da ignorare e dovrebbero essere un punto di partenza per indagini approfondite, tenendo conto del fatto che nel caso di una intossicazione cronica le indagini epidemiologiche (soprattutto quella prospettica) devono necessariamente essere condotte per un numero significativo di anni (10-20) a causa dei lunghi periodi di latenza prima della comparsa dei sintomi clinici.

Ringraziamenti - Gli autori ringraziano i cittadini di Valdicastello e Pietrasanta che conferendo volontariamente i loro campioni di urine e capelli hanno permesso la realizzazione di questo studio e ringraziano i Comitati di Valdicastello e Pietrasanta, istituiti per fronteggiare questa emergenza, per le loro azioni di coordinamento.

BIBLIOGRAFIA

- [1] J.J. Rodriguez-Mercado *et al.*, *Environmental Toxicology*, 2015, **30**, 572.
- [2] United States Environmental Protection Agency, Toxicological Review Of Thallium And Compounds (CAS No. 7440-28-0), EPA/635/R-08/001F, in, <http://www.epa.gov/iris>, 2009.
- [3] K.T. Douglas *et al.*, *International Journal of Biochemistry*, 1990, **22**, 429.
- [4] A.L.J. Peter *et al.*, *Environment International*, 2005, **31**, 493.
- [5] A. Saddique *et al.*, *Vet Hum Toxicol*, 1983, **25**, 16.
- [6] D.E. Rusyniak *et al.*, *Annals of emergency medicine*, 2002, **39**, 307.
- [7] J. Atsmon *et al.*, *The American journal of the medical sciences*, 2000, **320**, 327.
- [8] L.P. Shabalina *et al.*, *Journal of hygiene, epidemiology, microbiology, and immunology*, 1978, **23**, 247.
- [9] K.H. Schaller *et al.*, *International archives of occupational and environmental health*, 1980, **47**, 223.
- [10] M. Hirata *et al.*, *Industrial health*, 1998, **36**, 300.
- [11] T. Xiao *et al.*, *Applied Geochemistry*, 2007, **22**, 919.
- [12] J.F. Staff *et al.*, *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 2014, **87**, 275.
- [13] V. Cheam, *Water Quality Research Journal of Canada*, 2001, **36**, 851.
- [14] J.A. Vatland, Analysis of As, Pb, Fe, and Co in the Rio Tinto Estuary in Southwest Spain, in, Dupont Haskell Laboratory, 1996.
- [15] T. Xiao *et al.*, *Science of the Total Environment*, 2012, **421**, 51.
- [16] E. Resongles *et al.*, *Science of the Total Environment*, 2014, **481**, 509.
- [17] V. Cheam, *Water Quality Research Journal of Canada*, 2001, **36**, 851.
- [18] Utah Department of Health, Health Consultation, Public Comment Version Traverse Mountain: Thallium In Drinking Water, Lehi, Utah County, Utah, in: U.S. Department Of Health And Human Services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry Division of Community Health Investigations Atlanta, Georgia 30333, 2014.
- [19] China National Standards, Standards for drinking water quality (GB5749-2006), in, (in Chinese), 2006.
- [20] Canadian Council of Ministers of the Environment, Canadian water quality guidelines for the protection of aquatic life: thallium, in: Canadian environmental quality guidelines, Winnipeg, Manitoba, Canada, 1999.
- [21] Organización Panamericana de la Salud, Manual de evaluación y manejo de sustancias tóxicas en aguas superficiales [Manual of evaluation and managing of toxic substances in superficial waters]. in, 2001.
- [22] R.P. Pohanish, *Sittig's handbook of toxic and hazardous chemicals and carcinogens*, Norwich, William Andrew, New York, USA, 2011.
- [23] Ministero Dell'ambiente E Della Tutela Del Territorio, Regolamento recante norme tecniche per il riutilizzo delle acque reflue in attuazione dell'articolo 26, comma 2, del D.Lgs. 11 maggio 1999, n. 152, in: Decreto Ministeriale n. 185 del 12 giugno, G.U.R.I. n. 169, 2003.
- [24] Ministero Dell'ambiente E Della Tutela Del Territorio E Del Mare, Norme in materia ambientale, in: Decreto Legislativo n. 152, 2006.
- [25] J.J. Rodríguez-Mercado *et al.*, *Drug and Chemical Toxicology*, 2013, **36**, 15.
- [26] W. Report, *IPCS (International Program on Chemical Safety)*, 1996.
- [27] A. Talas *et al.*, *Archives Toxicology*, 1983, **53**, 8.
- [28] W. Krahwinkel *et al.*, *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 1988, **29**, 1582.
- [29] R. Tyagi *et al.*, *Journal of Applied Toxicology*, 2011, **31**, 663.
- [30] A. Tremel *et al.*, *Agronomie*, 1997, **17**, 261.
- [31] P. Testoni, *Bull E Atti R Accad Med Roma*, 1933, **59**, 223.
- [32] P. Testoni, *Arch Internal Pharmacodyn Et Ther*, 1933, **44**, 328.

- [33] P. Testoni, *Bull E Atti R Accad Med Roma*, 1930, **56**, 3.
- [34] R. Sreedharan et al., *Pediatrics*, 2004, **113**, 1044.
- [35] R.P. Sharma et al., *Journal of Comparative Pathology*, 1981, **91**, 235.
- [36] T.A. Roshchina, *Moscow*, 1966, 83.
- [37] J. Pickard et al., *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2001, **66**, 94.
- [38] N. Onikura et al., *Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University*, 2008, **53**, 467.
- [39] S. Montes et al., *Archives of Toxicology*, 2007, **81**, 683.
- [40] S.J. Markich et al., *Australasian Journal of Ecotoxicology*, 2002, **8**, 1.
- [41] T.S. Lin et al., *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2005, **75**, 350.
- [42] M.S. Leloux et al., *Journal de toxicologie clinique et experimentale*, 1987, **7**, 247.
- [43] M.S. Leloux et al., *Journal De Toxicologie Clinique Et Experimentale*, 1990, **10**, 147.
- [44] C.H. Lan et al., *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2005, **61**, 432.
- [45] A. Kuhn et al., *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2000, **19**, 2364.
- [46] Q.I. Jianying et al., *Bulletin of Mineralogy Petrology and Geochemistry*, 2008, **27**, 81.
- [47] C.Y. Hsieh et al., *Science of the Total Environment*, 2004, **320**, 37.
- [48] M.M. Herman et al., *Toxicology and applied pharmacology*, 1967, **10**, 199.
- [49] H. Goldmann, *Graefe S Arch Ophthalmol*, 1929, **122**, 146.
- [50] A. Gettler et al., *Amer Jour Clin Path*, 1943, **13**, 322.
- [51] J. Feldman et al., *Pediatric Dermatology*, 1993, **10**, 29.
- [52] J. Egehoj, *Jour Amer Vet Med Assoc*, 1947, **109**, 386.
- [53] J. Atsmon et al., *American Journal of the Medical Sciences*, 2000, **320**, 327.
- [54] TOXNET system et al., *Hazardous Substances Data Bank (HSDB)*, 2016, <http://toxnet.nlm.nih.gov>.
- [55] R. Velez et al., *Veterinarski Glasnik*, 2009, **63**, 393.
- [56] N. Thyresson, *Acta Dermato Venereol [Helsingfors]*, 1950, **30**, 9.
- [57] M.L. Thomas et al., *Journal of the American Animal Hospital Association*, 1993, **29**, 211.
- [58] P. Testoni, *Arch Internat Pharmacodyn Et Ther*, 1935, **51**, 15.
- [59] J.D. Ouellet et al., *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2013, **91**, 188.
- [60] W.P. Norwood et al., *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2013, **32**, 1672.
- [61] M. Miyagawa et al., *European Journal of Nuclear Medicine*, 1991, **18**, 332.
- [62] L. Mamoli, *Sperimentale Arch*, 1926, **80**, 229.
- [63] H. Ma, *Guangdong Weiliang Yuansu Kexue*, 2005, **12**, 1.
- [64] J.T. Kielstein et al., *Kidney & Blood Pressure Research*, 2004, **27**, 197.
- [65] M. Hirata et al., *Industrial Health*, 1998, **36**, 300.
- [66] J.E. Hinck et al., *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2013, **65**, 332.
- [67] D.E. Green et al., *Journal of Wildlife Diseases*, 1997, **33**, 385.
- [68] L. Formigli et al., *Environmental Research*, 1986, **40**, 531.
- [69] K. Dammrich, *Berlin Munchen Tierarztl Wochenschr*, 1967, **80**, 373.
- [70] Y. Couillard et al., *Environmental Pollution*, 2008, **156**, 1314.
- [71] J.G. Chusid et al., *Jour Appl Physiol*, 1962, **17**, 697.
- [72] U. Borgmann et al., *Environmental Pollution*, 2004, **129**, 39.
- [73] T. Bachanek et al., *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 2000, **7**, 51.
- [74] P. Cvjetko et al., *Arhiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju*, 2010, **61**, 111.
- [75] A. Ludolph et al., *Trace Elem Med*, 1986, **3**, 121.
- [76] K.L. Yorita Christensen, *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 2013, **216**, 624.
- [77] X. Hu et al., *The Journal of reproductive medicine*, 2015, **60**, 21.
- [78] W. Xia et al., *Environmental Health Perspectives*, 2016, **124**, 164.
- [79] W.G. WHO, *The World Health Report 2002*, 2002.
- [80] P.D. Gluckman et al., *New England Journal of Medicine*, 2008, **359**, 61.
- [81] A. Navas-Acien et al., *Environ Health Perspect*, 2005, **113**, 164.
- [82] B.J. Ram, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 2013, **76**, 86.
- [83] P. Heitland et al., *Clinica Chimica Acta*, 2006, **365**, 310.
- [84] M. Fort et al., *Environmental science and pollution research international*, 2014, **21**, 9234.
- [85] R. Dolgner et al., *International Archives of Occupational and Environmental Health*, **52**, 79.
- [86] R.S. Hoffman et al., *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 2000, **38**, 767.
- [87] M. Bragadin et al., *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2003, **1010**, 283.
- [88] S.M. Korotkov et al., *Doklady Biochemistry and biophysics*, 2003, **392**, 247.
- [89] R.H. Lane et al., *Pediatr Res*, 1998, **43**, 563.
- [90] S.V. Verstraeten et al., *Society for Neuroscience Abstract Viewer and Itinerary Planner*, 2009, **39**.

- [91] S.V. Verstraeten, *Toxicology*, 2006, **222**, 95.
- [92] C.E. Hanzel *et al.*, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2006, **216**, 485.
- [93] C. Eliana Hanzel *et al.*, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2009, **236**, 59.
- [94] M.S. Villaverde *et al.*, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2003, **417**, 235.
- [95] M.S. Villaverde *et al.*, *Free Radical Biology and Medicine*, 2004, **36**, S125.
- [96] M.S. Villaverde *et al.*, *Free Radical Research*, 2004, **38**, 977.
- [97] C.E. Hanzel *et al.*, *Toxicology*, 2005, **207**, 501.
- [98] M.R. Eskandari *et al.*, *Environmental Toxicology*, 2015, **30**, 232.
- [99] D. Appenroth *et al.*, *Journal of Applied Toxicology*, 1999, **19**, 61.
- [100] I. Caracelli *et al.*, *Coordination Chemistry Reviews*, 2014, **281**, 50.
- [101] M.M. Abdel-Daim *et al.*, *Cell journal*, 2015, **17**, 379.
- [102] S. Galvan-Arzate *et al.*, *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 2005, **43**, 1037.
- [103] S.M. Korotkov *et al.*, *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 2014, **28**, 149.
- [104] L. Zeneli *et al.*, *Journal of Environmental Science and Health Part a-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 2015, **50**, 540.
- [105] G.D. Zasukhina *et al.*, *Doklady Biological Sciences*, 1980, **250**, 16.
- [106] G.D. Zasukhina *et al.*, *Mutation Research*, 1983, **124**, 163.
- [107] S. Ketabi *et al.*, *Russian Journal of Inorganic Chemistry*, 2006, **51**, 1009.
- [108] A.M. Nowicka *et al.*, *Electroanalysis*, 2014, **26**, 340.
- [109] A.A. Ouameur *et al.*, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2003, **20**, 956.
- [110] A.A. Ouameur *et al.*, *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 2003, **20**, 561.
- [111] K.T. Douglas *et al.*, *The International journal of biochemistry*, 1990, **22**, 429.
- [112] E. Biadun *et al.*, *Mikrochimica acta*, 2016, **183**, 177.
- [113] L. Ralph *et al.*, *Bull Environ Contam Toxicol*, 2002, **68**, 261.
- [114] C.E. Hanzel *et al.*, *Archives of Toxicology*, 2012, **86**, 1667.
- [115] R. Petrini *et al.*, Thallium ecosystem diseases in dismissed mine sites as a threat for public health: the Valdicastello-Pietrasanta (Italy) case history, in: Congresso SIMP-SGI-So.Ge.I-AIV, 2015; http://www.comune.pietrasanta.lu.it/allegati/44/UNIFI_Relazione_Finale_14-06-2016.pdf
- [116] C. Biagioni *et al.*, *Geology*, 2013, **41**, 747.
- [117] F. Gil *et al.*, *Food and Chemical Toxicology*, 2015, **80**, 287.
- [118] B. Campanella *et al.*, *The Science of the total environment*, 2016, **548-549**, 33.
- [119] I. Molina-Villalba *et al.*, *Chemosphere*, 2015, **124**, 83.
- [120] A. Baran *et al.*, Concentrations of heavy metals in hair as indicators of environmental pollution, in: E3S Web of Conferences, EDP Sciences, 2013, pp. 21005.
- [121] D.K. Harkins *et al.*, *Environmental health perspectives*, 2003, **111**, 576.
- [122] A. Chatt *et al.*, Health-related monitoring of trace element pollutants using nuclear techniques, in: laea-tecdoc-330, International Atomic Energy Agency Vienna, 1985, pp. 33.
- [123] D.J. Tobin, Hair in toxicology: an important bio-monitor, Royal Society of Chemistry, 2005.
- [124] B.L. Batista *et al.*, *Forensic science international*, 2009, **192**, 88.
- [125] N. Violante *et al.*, *Microchemical Journal*, 2000, **67**, 397.
- [126] L. Järup, *British medical bulletin*, 2003, **68**, 167.
- [127] M. Ćurković *et al.*, *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 2013, **64**, 385.
- [128] World Health Organization/International Program on Chemical Safety, Thallium. Environmental Health Criteria 182, in: World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1996, pp. 274 pp.
- [129] G. International Commission on Radiological Protection. Task *et al.*, Report of the task group on reference man, Pergamon Oxford:, 1975.
- [130] I.C. Smith *et al.*, Trace Metals in the Environment, Vol. 1, Thallium, Ann Arbor Science Publishers, MI, 1977.
- [131] R. Dolgner *et al.*, *International archives of occupational and environmental health*, 1983, **52**, 79.
- [132] Società Italiana Valori di Riferimento, Terza Lista Dei Valori Di Riferimento Per Elementi, Composti Organici E Loro Metaboliti, in, 2011.
- [133] J.J. Rodriguez-Mercado *et al.*, *Drug and Chemical Toxicology*, 2013, **36**, 369.
- [134] A. Alimonti *et al.*, *Ann Ist Super Sanità*, 2005, **41**, 181.