



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MACERATA

**CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN
DIRITTO E INNOVAZIONE
CURRICULUM DIRITTO E INNOVAZIONE SOCIALE**

CICLO XXXV

TITOLO DELLA TESI

“Studio di matrici alternative nell’analisi tossicologica forense”

SUPERVISORE DI TESI

Chiar.mo Prof. Mariano Cingolani

DOTTORANDA

Dott.sa Erika Buratti

COORDINATORE

Chiar.mo Prof. Massimo Meccarelli

ANNO 2023



Indice

Abstract	4
1. Introduzione	6
1.1 Tossicologia forense	6
1.2 Ricerca di stupefacenti, le applicazioni giuridiche	8
1.3 Matrici biologiche convenzionali e alternative nell'analisi tossicologica	12
1.4 Capelli	14
1.5 Unghie	16
1.5.1 Anatomia	17
1.5.2 Biologia e fisiologia	19
1.5.3 Nell'analisi tossicologica forense	21
2. Scopo del progetto di tesi	24
3. Materiali e metodi	26
3.1. Materiali	26
3.1.1. Raccolta dei campioni	26
3.1.2. Reagenti	27
3.2 Metodo	28
3.2.1 Preparazione dei campioni	28
3.2.2 Analisi post mortem	28
3.2.3 Analisi su vivente	32
3.2.4 Quantificazione	33
4. Risultati e discussione	35
4.1 Post mortem	35
4.2 Vivente	48
5. Conclusioni	57
6. Riferimenti bibliografici	59

Abstract

Forensic toxicology is a discipline that originated in the field of forensic medicine because of the need for investigation of cadaveric material for poisons. Currently, it has greatly expanded its field of interest and has become more and more established. Thus, it can be considered that the specific task of forensic toxicology is to study the relationship between man and toxic agent through the identification of toxic substances in any substrate, biological or otherwise, with reference to legal cases.

Research can be carried out on different biological matrices depending on the ultimate purpose of the analysis.

In cases of extreme putrefaction or charring of remains, when soft tissues and body fluids are not available, hair, bones, teeth, and nails also defined as alternative or unconventional matrices may be useful.

These matrices are the most resistant to decomposition. They can be an additional source of comparison data, can provide retrospective temporal information, and their preservation requires no special precautions. In particular nails share a common cellular origin with hair, but have specific differences when analyzed in their mature state.

In order to exploit the new matrices in the search for exogenous substances, it is necessary to develop analytical technologies capable of achieving high levels of sensitivity. In this thesis work, some narcotic (basic) substances were searched for by analysis in HPLC, a highly sensitive chromatographic technique that has been gaining popularity in recent years, which requires less sample pretreatment due to its characteristics.

Based also on other previous work on hair matrices, in this thesis I wanted to add to the extraction method for basic substances in HPLC a second extraction specifically for acidic substances, such as

cannabinoids, which were then analyzed in gas chromatography. The extraction method used on samples taken from cadaveric and living material proved to be effective and efficient, as all the substances sought were detected and quantified. The method of accumulation of substances within the nail matrix is still not well understood, and further investigation in the near future should be undertaken to shed light on the remaining grey areas in this area.

1. Introduzione

1.1 Tossicologia forense

La tossicologia è una disciplina nata nell'ambito della medicina a seguito di una necessità di indagine finalizzata alla ricerca di veleni e più in generale, sostanze esogene. Essa, infatti, può essere definita come la scienza dei veleni. Quando applicata a procedure medico legali viene utilizzato il termine tossicologia forense.

Il compito del tossicologo forense è quello di riuscire ad individuare farmaci, veleni, o altre sostanze esogene all'interno dell'organismo o di campioni principalmente di origine biologica e di difendere i risultati ottenuti dalle analisi condotte in laboratorio, in un'aula di tribunale.

Questa disciplina trova le sue origini nel XIX secolo a seguito della necessità di indagare su materiale cadaverico per la ricerca dei veleni.

M. J. Orfila, Professore di medicina legale alla Sorbona di Parigi, considerato il padre della tossicologia forense, riprende infatti la definizione di veleno di Paracelso (XIV sec.), la perfeziona, e definisce un veleno come "qualsiasi sostanza che assunta in piccole dosi o tramite specifiche vie di somministrazione cagiona in un essere vivente, problemi di salute o addirittura la morte". Il tossicologo forense secondo Orfila "deve mirare a perfezionare il processo necessario a stabilire l'avvelenamento, al fine di rivelare il crimine e di aiutare il magistrato a punire i colpevoli". È interessante notare che già egli si rese conto della necessità di un'adeguata prova di identificazione, sottolineando l'importanza di ciò che oggi chiamiamo garanzia di qualità (purezza degli standard, ecc.)¹. Nel 1814, Orfila pubblica il "Trattato dei veleni e tossicologia generale", un'opera in cui per la prima volta viene proposta una ricerca

¹ Moffat, A. C., Osselton, D. M., & Widdop, B. (2011). *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. London: Pharmaceutical Press, p. 160

sistematica delle sostanze tossiche nel materiale cadaverico suddivise in sei classi in base alla loro azione lesiva. Con questo trattato si vede impostato il primo esempio di ricerca generica di sostanze esogene, definendo in maniera scientifica l'analisi chimica tossicologica nei reperti autoptici². In questo modo vengono fornite al patologo forense importanti informazioni sulle sostanze che potrebbero aver avvelenato e quindi condotto alla morte un determinato soggetto come l'identità della sostanza e la quantità riscontrata nel campione analizzato, rendendo possibile una valutazione per determinare se la concentrazione dell'esogeno riscontrato era tale da poter cagionare la morte del soggetto.

Determinare quanto una sostanza sia tossica per un organismo vivente non è qualcosa che si può asserire in maniera semplice. Secondo alcune scuole medico-legali, qualsiasi sostanza nella giusta concentrazione e tramite un'appropriata via di somministrazione potrebbe rivelarsi tossica e causare morte o alterare lo stato di salute di una persona³. Le analisi chimiche sono volte a rilevare la presenza della sostanza, a misurarne la concentrazione e metterla in relazione con la tossicità nota e con le specifiche caratteristiche individuali della persona coinvolta⁴.

Dal XIX secolo ad oggi la tossicologia forense ha ampliato di molto il suo campo di interesse, andando a toccare in maniera sempre più trasversale nel corso degli anni, nuove realtà sociali e legali e intrecciandosi con l'applicazione di specifici disposti di legge, dal penale al civile, all'amministrativo. Anche in Italia si è affermata sempre di più, in risposta allo sviluppo di nuove tecniche analitiche e alla necessità della società odierna di regolamentare un utilizzo sempre crescente di sostanze a scopo voluttuario.

² Frolidi R., Lezioni di tossicologia forense, Torino: G.Ciappichelli, 2011, p.10-11

³ Frolidi R., Lezioni di tossicologia forense, Torino: G.Ciappichelli, 2011, p.13

⁴ Moffat, A. C., Osselton, D. M., & Widdop, B. (2011). *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. London: Pharmaceutical Press, p. 160

Ad oggi le analisi tossicologiche svolgono un importante ruolo anche quando condotte su vivente, per molteplici scopi. Le analisi che vengono eseguite hanno caratteristiche e metodiche specifiche a seconda della finalità dell'indagine in applicazione a specifici disposti di legge. Quindi verranno fatte delle valutazioni e delle scelte sul tipo di materiale biologico da utilizzare e sul tipo di analisi da condurre a seconda della situazione. Generalmente le matrici più utilizzate per le analisi su campioni prelevati da vivente sono urine, sangue e capelli, anche se altre matrici sono di sempre più crescente interesse come unghie, saliva, sudore. Questo perché durante il prelievo è molto importante andare a prediligere la matrice che richieda la minor invasività di prelievo e disponibilità sufficiente ad effettuare le analisi.

1.2 Ricerca di stupefacenti, le applicazioni giuridiche

Si può ritenere che il compito specifico del tossicologo forense sia quello di studiare il rapporto tra uomo e agente tossico attraverso l'identificazione delle sostanze in qualsiasi substrato, biologico o meno, in riferimento a fattispecie giuridiche.

In Italia vigono specifiche linee guida sui campioni da prelevare, le metodiche e le analisi raccomandate per la lavorazione dei campioni messe appunto dal Gruppo Tossicologi Forensi Italiani⁵, per quanto riguarda sia il vivente che il cadavere. Ad ogni modo per l'analisi post-mortem, a causa delle alte possibilità che il materiale da prelevare sia scarso, non idoneo o inutilizzabile, spesso ci si rifà all'esperienza dei tossicologi stessi, alle necessità specifiche di ogni caso e alle ampie fonti presenti in letteratura.

Sul piano legale, diverse norme cercano di regolamentare i prelievi da vivente e su materiale cadaverico per la ricerca di sostanze stupefacenti. Tra queste ricordiamo l'art. 78 del T.U.,

⁵ Linee guida per la determinazione di sostanze stupefacenti e psicotrope su campioni biologici con finalità tossicologico-forensi e medico-legali

D.P.R. n. 309/1990 per accertare l'abuso di sostanze stupefacenti o psicotrope ai fini dell'applicazione degli articoli 75 e 75-bis, sulla detenzione, acquisto, ricezione, importazione, esportazione di sostanze stupefacenti per uso personale. Le matrici biologiche su cui è consentito effettuare i prelievi sono le urine e i capelli. Attraverso tali analisi si può determinare lo stato di tossicodipendenza certificato da Centri pubblici per le tossicodipendenze o dalle Strutture private accreditate attraverso il quale il soggetto potrà sottoporsi ad un programma di recupero.

Riguardo gli accertamenti sui lavoratori, l'art. 125 del T.U., D.P.R. n. 309/1990 prevede l'accertamento obbligatorio di "assenza di tossicodipendenza" da effettuarsi prima dell'assunzione e successivamente in maniera periodica per i lavoratori destinati a mansioni che potrebbero comportare un rischio per la sicurezza, l'incolumità e la salute di terzi.

Gli accertamenti per la guida sotto l'effetto di sostanze stupefacenti dell'art. 187, aggiornato dalla legge 120 del 29 luglio 2010, "*Disposizioni in materia di sicurezza stradale*", si basano su un esame preliminare eseguito sul posto al quale, in caso di esito positivo, seguirà una conferma definitiva. Anche qui il prelievo deve essere condotto in maniera da risultare il meno invasivo possibile nel rispetto delle garanzie difensive previste dal codice di procedura penale. Per quanto riguarda la scelta delle matrici biologiche per effettuare gli accertamenti presso le strutture sanitarie incaricate, la norma indica "campioni di liquidi biologici" non meglio definiti. Va ricordato che anche in questo caso, come in materia di alcol, l'art. 187 non consente il prelievo di sangue per eseguire tali controlli. Al momento si è in attesa di un decreto attuativo per meglio definire le modalità di prelievo, nel frattempo si fa riferimento al D.M. 12 luglio 1990, n. 186.

Per quanto riguarda i "*Requisiti fisici e psichici per il conseguimento della patente di guida*", anche l'art. 119 è stato aggiornato dalla legge 120 del 29 luglio 2010. L'accertamenti dei

requisiti fisici e psichici per il conseguimento della patente di guida sono effettuati dall'Unità sanitaria locale competente la quale, svolge mansioni medico legali. Sono previste delle specifiche Commissioni Mediche Locali che appunto accertano le condizioni fisiche e patologiche che possano compromettere conduzione in sicurezza di veicoli a motore. Questi accertamenti sono lasciati alla discrezionalità delle Commissioni mediche locali, di conseguenza non è insolito riscontrare delle differenze nei tipi di campioni scelti per l'analisi e nel tipo di analisi da condurre tra le diverse Commissioni locali.

Nei casi di violenza a sfondo sessuale sono previste specifiche circostanze aggravanti *“uso di armi o sostanze alcoliche, narcotiche o stupefacenti o di altri strumenti o sostanze gravemente lesivi della salute della persona offesa”* che impongono una ricerca per sostanze esogene stupefacenti o narcotici che potrebbero essere stati somministrati alla vittima (n.2 art.4 della legge del 15 febbraio 1996, n. 66 *“Norme contro la violenza sessuale”*).

La ricerca di stupefacenti su materiale cadaverico trova finalità in due settori differenti.

Da un lato riguarda i casi in cui l'intossicazione non è riconosciuta come la causa del decesso, ma gli effetti degli stupefacenti possono aver inciso sul comportamento della persona in relazione all'evento. Trovano posto in questo settore i casi di incidenti stradali, infortuni sul lavoro, aggressioni.

L'altro campo di indagine, in genere più frequentemente affrontato, si riferisce alle morti in cui la sostanza esogena svolge un ruolo determinante⁶. Purtroppo, non è semplice distinguere se una certa sostanza è stata somministrata a una persona in concentrazioni terapeutiche, tossiche o fatali. Come caso esemplare si può prendere in considerazione la morfina. Qualsiasi concentrazione di morfina assunta da un individuo può essere pericolosa se somministrata nella giusta concentrazione e nelle giuste circostanze. Questo perché la morfina come altre

⁶ Frolidi R., Lezioni di tossicologia forense, Torino: G.Ciappichelli, 2011, p.110-125

sostanze stupefacenti porta ad un adattamento del soggetto all'assunzione della sostanza stessa. In questi casi, la persona che abitualmente utilizza la droga o il farmaco sviluppa una tolleranza ad esso tale per cui per ottenere l'effetto stupefacente o terapeutico è necessario aumentarne la dose. Lo stesso vale per la cocaina, anche se un abuso di questa sostanza raramente si rivela essere la causa della morte, ma piuttosto comporta delle complicazioni a livello cardiaco per cui il decesso è dovuto ad attacchi di cuore che possono derivare da un prolungato abuso della cocaina. Anche le condizioni cliniche dell'individuo sono importanti per stabilire la tossicità di una sostanza, poiché l'organismo reagirà in maniera differente se ci si trova in uno stato di salute o se sono presenti delle patologie o anormali condizioni cliniche. Per questo è molto importante riuscire a delineare un quadro storico e clinico della persona che potrebbe aver fatto uso di sostanze in maniera cronica o saltuaria. Ne consegue quindi, che la dose tossica o letale di ogni sostanza esogena va cercata considerando caso per caso le specifiche caratteristiche della persona in esame^{7 8}. A questo scopo, alcune matrici biologiche giocano un ruolo fondamentale.

Nei casi in cui bisogna stabilire se la concentrazione di una o più sostanze hanno portato alla morte della persona in aggiunta alle considerazioni appena descritte, va preso in esame anche il fattore di redistribuzione post mortale.

Per una gran quantità di sostanze si è osservata una redistribuzione della sostanza nei distretti del corpo e un aumento della concentrazione dopo la morte. Altre, sono instabili e subiscono una bioconversione post-mortem.

Il modo più comune per capire se la concentrazione di una sostanza può cambiare dopo la morte è prelevare campioni di una stessa matrice da distretti del corpo differenti (sangue dal

⁷ O. H. Drummer, "Post-mortem toxicology," *Forensic Science International, Volume 165, Issues 2-3*, pp. 199-203, 2007

⁸ F. R., *Lezioni di tossicologia forense*, Torino: G.Ciappichelli, 2011, p.13-14

muscolo cardiaco, dall'arteria femorale, dall'arteria succlavia ecc.) e comparare i risultati ottenuti. Se le concentrazioni trovate sono superiori nel cuore rispetto che ai siti periferici, ad esempio c'è la possibilità che sia avvenuta una redistribuzione. Rimane comunque difficile determinare l'esito della redistribuzione post-mortale di una certa sostanza nel corpo umano⁹.

1.3 Matrici biologiche convenzionali e alternative nell'analisi tossicologica

La scelta dei campioni da analizzare per un'analisi tossicologica è determinata, nella maggior parte delle volte, dalle circostanze del singolo caso, anche se i campioni che andrebbero sempre prelevati per un'analisi tossicologica sono sangue e urine. Nel caso di analisi su materiale cadaverico altre matrici possono essere prelevate a seconda dello scopo dell'indagine, delle informazioni circostanziali e della disponibilità dei reperti. Le più comuni sono bile e fegato. I risultati delle analisi condotte sulle matrici biologiche appena elencate sono ampiamente accettati e sorretti da solide evidenze scientifiche che li rendono affidabili nei casi giuridici assumendo importanza probatoria in ambito forense. Per comodità queste matrici vengono definite "convenzionali".

Possono capitare però delle situazioni particolari, per cui i prelievi delle matrici convenzionali non sono sempre possibili. Nel caso di prelievo su vivente ad esempio possono verificarsi situazioni in cui un soggetto non abbia a disposizione capelli o altre produzioni pilifere, magari a causa di una situazione patologica (alopecia). In casi come questo la raccolta di materiale biologico può essere compromessa. Ne consegue che deve esserci una ricerca volta a trovare nuove matrici che possano svolgere un ruolo il più simile possibile a quelle convenzionali e che siano quindi in grado di fornire informazioni addizionali sull'utilizzo degli esogeni.

⁹ O. H. Drummer, "Post-mortem toxicology," *Forensic Science International*, Volume 165, Issues 2–3, pp. 199-203, 2007

Una situazione analoga si presenta nei casi di analisi post mortem in cui un corpo si presenti in avanzato stato di decomposizione, o abbia subito delle condizioni o eventi estremi, sia stato bruciato, o mummificato. Nel caso di un corpo che abbia subito un'esposizione a temperature molto elevate, in caso di tessuti decomposti e mummificati, l'assenza di matrici disponibili, o la presenza di alte concentrazioni di lipidi e ammine putrefattive può oscurare o interferire con la rilevazione o la quantificazione accurata degli analiti target. In situazioni di avanzato stato di decomposizione, come nel caso di un'esumazione, la raccolta dei fluidi biologici potrebbe essere irrimediabilmente compromessa, i tessuti potrebbero essersi liquefatti, e quindi anche in questo caso altre matrici devono essere scelte per poter effettuare le indagini. Queste situazioni potrebbero causare un effetto matrice sufficiente a influenzare negativamente tanto l'identificazione della sostanza¹⁰, quanto la misurazione quantitativa. Superare gli ostacoli derivanti dalla decomposizione dei campioni è molto difficile e spesso ha un successo limitato, come anche trovare un campione corrispondente alla matrice che funga da bianco per la preparazione di calibratori o controlli è difficile, perché i campioni variano enormemente nella natura o nell'entità della decomposizione¹¹.

Trovano un importante ruolo in queste circostanze le cosiddette matrici biologiche alternative. Nell'ultimo ventennio la tossicologia si è avvicinata a queste matrici con il duplice scopo di rendere meno invasivi i prelievi, e ottenere un maggior numero di informazioni relative all'uso/abuso di sostanze psicotrope. Lo studio approfondito di tali campioni ne ha evidenziato pregi e difetti, sottolineando la loro utilità nell'affiancare le matrici biologiche tradizionali in ambito medico legale, in grado di fornire dati che aiutano a delineare in maniera più definita il quadro circostanziale tossicologico della persona che si sospetta abbia assunto

¹⁰ Richardson, T. (2000). Pitfalls in forensic toxicology. *Ann Clin Biochem*, 37 (Pt 1), 20-44

¹¹ Moffat, A. C., Osselton, D. M., & Widdop, B. (2011). *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. London: Pharmaceutical Press, p. 185

o abusi di una determinata sostanza. Tuttavia alcune problematiche non sono state completamente chiarite e sono ancora oggetto di sperimentazione.

Tra queste matrici ricordiamo capelli, unghie delle mani e dei piedi, denti, muscolo, ossa, encefalo, contenuto gastrico, umor vitreo. Alcune di queste matrici sono già ben note alla comunità scientifica e giuridica, e vengono regolarmente utilizzate come matrici di supporto in casi forensi a seconda della necessità e delle circostanze. Tra queste troviamo contenuto gastrico, capelli, umor vitreo. Le altre matrici elencate sono state analizzate per la ricerca di diverse sostanze nel corso degli anni, ma la mancanza di una letteratura esaustiva e di un ampio numero di studi al riguardo, rende difficile l'interpretazione quantitativa dei risultati e di conseguenza l'ammissione dei dati come prova nei casi giuridici. Unghie, ossa, denti, produzioni pilifere, sono le matrici più resistenti alla decomposizione. Soprattutto nel caso dell'analisi post mortem possono essere le uniche matrici disponibili. Inoltre la loro struttura biologica rende questi tessuti in grado di accumulare sostanze esogene al loro interno e di conservarle, rendendo possibile come per i capelli la ricostruzione di una cronistoria per quanto riguarda l'assunzione di una determinata sostanza. Per di più la loro conservazione non necessita di particolari accorgimenti. Infatti a differenza di fluidi corporei e tessuti molli, che vanno conservati in contenitori sigillati e mantenuti a temperature dai 4°C ai -20°C per evitare che gli enzimi litici e il processo di putrefazione portino avanti la decomposizione, unghie, denti, ossa e capelli per le loro caratteristiche possono essere conservate a temperatura ambiente.

1.4 Capelli

Le produzioni pilifere (capelli, peli pubici, peli ascellari, peli toracici) sono le matrici alternative meglio conosciute e più utilizzate. Possono fornire informazioni utili per la valutazione dell'uso abituale o comunque dell'uso pregresso di molte sostanze o per l'esposizione a sostanze

tossiche presenti nell'ambiente perché le molecole e i loro metaboliti si fissano nelle strutture cheratiniche nella fase di accrescimento del capello. Poiché i capelli crescono mediamente a una velocità di 1 cm/mese¹², è possibile determinare dal punto di vista cronologico l'accumulo degli esogeni al loro interno e quindi, l'assunzione di sostanze.

I capelli sono costituiti da strutture cilindriche o fusti formati da cellule strettamente compattate che crescono da piccoli organi simili a sacche chiamati follicoli. Sono in larga parte composti da una famiglia di proteine ricche di zolfo: la cheratina (dal termine greco *keras*, che significa corno). Nel fusto del capello, la cheratina forma lunghe fibre che si legano strettamente tra loro. Il risultato è una struttura molto resistente e altamente stabile¹³.

La crescita dei capelli non avviene in maniera continua, ma a cicli, alternando periodi di crescita e di quiescenza. Le fasi del ciclo di crescita delle produzioni pilifere sono tre: anagen, catagen e telogen. L'inizio della fase di crescita, anagen, è accompagnato da un aumento dell'attività metabolica delle cellule della matrice situate nella parte inferiore del follicolo. I follicoli piliferi sono inseriti nell'epitelio epidermico della pelle e sono circondati da fitte reti capillari. Si pensa che farmaci e oligoelementi vengano incorporati nei capelli (forse complessati con le proteine) in questo periodo di intensa attività metabolica¹⁴. Ciò suggerisce che il follicolo pilifero può ricevere sostanze nutritive dai vasi che circondano il bulbo, ma altre sostanze chimiche vengono incorporate nei capelli a livello della zona cheratogena (livello soprabulbare) e non risalgono dal bulbo. Pertanto, il fusto del capello finale può contenere non solo i farmaci presenti nei capillari che nutrono il bulbo, ma anche quelli presenti nei tessuti circostanti, nella linfa o nei fluidi intercellulari che circondano la parte inferiore del follicolo¹⁵.

¹² Harkey, M. R. (1992 vol 63). Anatomy and physiology of hair. *Forensic Science International*

¹³ Harkey, M. R. (1992 vol 63). Anatomy and physiology of hair. *Forensic Science International*

¹⁴ Ryder, M. L. (1958). *The Biology of Hair Growth*. New York: Academic Press, p.305-334

¹⁵ Harkey, M. R. (1992 vol 63). Anatomy and physiology of hair. *Forensic Science International*, 9-18

Dopo un periodo di crescita attiva del capello, la cui durata varia a seconda del tipo di capelli, il follicolo entra in una breve fase di transizione chiamata catagen. Durante questa fase di transizione, la divisione cellulare si arresta e la base del fusto del capello diventa completamente cheratinizzata e forma il nodo secco e bianco caratteristico dei capelli "a clava". Il bulbo inizia a degenerare e il follicolo si accorcia notevolmente.

Dopo la fase di transizione, il follicolo pilifero entra in un periodo di riposo o di quiescenza, in cui il fusto del capello smette di crescere completamente: fase telogen.

Il fusto del capello viene trattenuto nella parte superiore del canale follicolare, dove può essere facilmente rimosso tirandolo. La durata del periodo di quiescenza dei follicoli dipende dalla zona del corpo e dall'età dell'individuo. Per i capelli del cuoio capelluto, la fase di riposo è relativamente breve, circa 10 settimane, mentre per la superficie corporea in generale è di circa 2-6 anni¹⁶. La durata del periodo di quiescenza aumenta gradualmente con l'età. Nell'uomo, si dice che i capelli crescano a mosaico, cioè che ogni follicolo abbia un proprio ciclo di crescita indipendente dagli altri.

Sul cuoio capelluto di un uomo adulto, circa il 15% dei capelli è in fase di riposo e il restante 85% è in fase di crescita. Questi schemi normali possono essere complicati da stati patologici, carenze nutrizionali e persino da farmaci¹⁷.

1.5 Unghie

Le unghie hanno un'origine cellulare comune a quella dei capelli, sebbene allo stato maturo presentino importanti differenze fisiologiche e biochimiche.

¹⁶ Valkovic, V. (1989). *Human Hair: Fundamentals and Methods for Measurement of Elemental Composition, Vol. I*. Boca Raton: CRC Press

¹⁷ Harkey, M. R. (1992 vol 63). Anatomy and physiology of hair. *Forensic Science International*, 9-18

1.5.1 Anatomia

L'unghia è un complesso apparato formato da 4 tessuti epiteliali e da un prodotto corneo finale, la lamina ungueale. La lamina ungueale è una struttura dura e trasparente costituita da cellule cheratinizzate, prive di nucleo, strettamente aderenti. La lamina, di forma più o meno rettangolare, poggia sul letto ungueale, ed è circondata dalle pieghe ungueali (prossimale e laterali) che la delimitano prossimalmente e lateralmente. L'unghia appare di colorito roseo in quanto la lamina, trasparente, permette di visualizzare il letto riccamente vascolarizzato. La lamina ungueale è prodotta dalla matrice ungueale che rappresenta la parte germinativa dell'unghia ed è situata al di sotto della piega ungueale prossimale. In sezione longitudinale l'unghia è formata da 4 tessuti epiteliali cheratinizzanti: piega ungueale prossimale, matrice, letto, iponichio (Fig. 1).

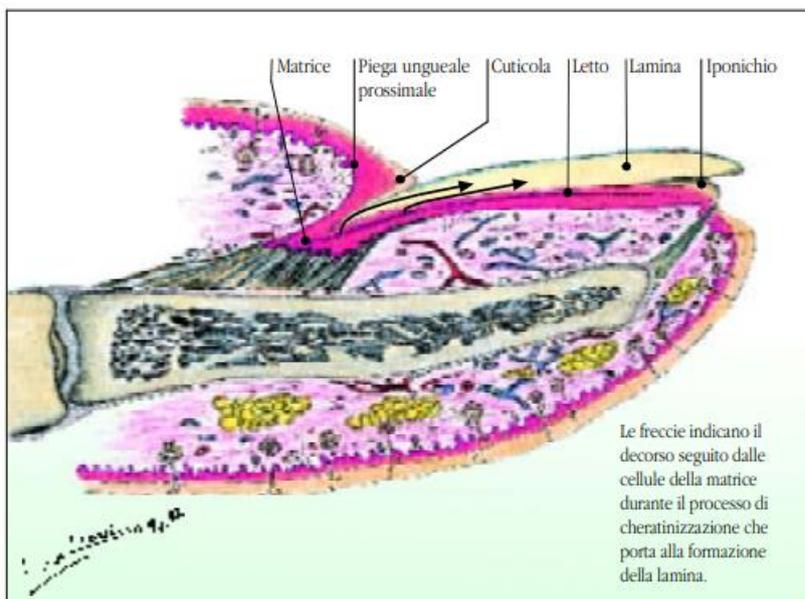


FIGURA 1: RAPPRESENTAZIONE SCHEMATICA DELL'ANATOMIA DELL'APPARATO UNGUEALE IN SEZIONE LONGITUDINALE

La piega ungueale prossimale è una piega cutanea costituita da una porzione dorsale, in continuazione con la cute del dorso delle dita, e da una porzione ventrale che aderisce

inferiormente alla lamina, si continua con la matrice ungueale. Il punto di passaggio fra piega ungueale dorsale e piega ungueale ventrale delimita la base dell'unghia.

In questa zona lo strato corneo della piega ungueale prossimale forma la cuticola, che aderisce strettamente alla superficie della lamina.

La matrice ungueale è costituita da una porzione prossimale che produce i due terzi superiori della lamina e da una porzione distale che ne produce il terzo inferiore. L'epitelio della matrice distale contiene numerosi melanociti.

La matrice si continua anteriormente con il letto ungueale, le cui cellule si differenziano e maturano migrando in direzione distale. In condizioni normali l'epitelio del letto produce uno strato corneo molto sottile che aderisce strettamente alla superficie ventrale della lamina. A livello del letto ungueale la giunzione dermo-epidermica è organizzata in creste longitudinali che seguono l'asse maggiore del dito e mediano la connessione con l'osso¹⁸. I capillari del letto ungueale hanno per questo un andamento longitudinale.

Il letto continua distalmente con l'iponichio, che rappresenta un'espansione della cute del polpastrello, della quale ha le stesse caratteristiche¹⁹. L'epitelio del letto ungueale è un epitelio squamoso relativamente stretto, le cui cellule diventano leggermente più grandi verso l'alto e difficilmente si appiattiscono. Le cellule più in alto hanno una struttura a dente di sega che può essere vista appena al microscopio ottico, che è ovviamente responsabile del fortissimo legame con l'unghia²⁰.

¹⁸ Morgan, A. M., Baran, R., & Haneke, E. (2001). *Anatomy of the nail unit in relation to the distal digit*. In: *Nailsurgery: a text and atlas*. Philadelphia: LippincottWilliams &Wilkins, p.1-28

¹⁹ Tosti, A., Piraccini, B. M., & Peluso, A. M. (1996). *LE UNGHIE guida pratica alle più comuni affezioni*. Bologna: Editrice Delle Rose s.a.s. p. 9-11

²⁰ Haneke, E. (2014). Anatomie, Biologie, Physiologie und Grundzüge der Pathologie des Nagelorgans. *Hautarzt* 65, 282–290

1.5.2 Biologia e fisiologia

L'unghia è un foglio di cheratina a crescita continua e permanente, biochimicamente identico al fusto del capello. Sono essenzialmente costituite da cheratina indurita e compatta, lipidi, acqua e alcuni microelementi tra i quali i più abbondanti sono ferro e zinco²¹.

Come per i capelli, sono in grado di accumulare xenobiotici e i loro metaboliti all'interno della loro struttura anche per mesi, ma presentano specifiche differenze se analizzate allo stato maturo.

Un'importante differenza tra le unghie e i capelli è il modo di crescita: le unghie crescono in maniera continua a una velocità costante, e non hanno come per i capelli un ciclo di crescita che prevede anche un periodo di riposo.

L'unghia non è sensibile agli ormoni, non perde pigmento con l'età, ma tende a diventare marrone negli individui di carnagione scura e non esiste un quadro paragonabile all'alopecia, anche se la velocità di crescita dell'unghia da l'età di circa 25-30 anni diminuisce²² e alcune malattie possono portare all'atrofia.

La crescita delle unghie delle dita delle mani è circa 3 volte più veloce di quello delle dita dei piedi (3-5 mm/mese nelle dita delle mani e 1 mm/mese nelle dita dei piedi). Il dito medio della mano dominante cresce più velocemente a circa 0,1 mm al giorno, per un totale di 3-4 mm al mese. La velocità di crescita diminuisce con la lunghezza delle dita delle mani o dei piedi.

L'unghia dell'alluce cresce di circa 0,03 mm/ giorno, cioè circa 1 mm al mese. In media, la

²¹ Tosti, A., Piraccini, B. M., & Peluso, A. M. (1996). *LE UNGHIE guida pratica alle più comuni affezioni*. Bologna: Editrice Delle Rose s.a.s. p. 12

²² Haneke, E. (2014). Anatomie, Biologie, Physiologie und Grundzüge der Pathologie des Nagelorgans. *Hautarzt* 65, 282–290

sostituzione completa della lamina richiede 4-6 mesi per le unghie delle mani e 12-18 mesi per le unghie dei piedi²³.

Vari fattori influenzano la formazione dell'unghia: il caldo e l'attività fisica la accelerano, il freddo, l'alta quota, l'inattività e l'età la rallentano. Antimicotici azolici come itraconazolo e fluconazolo a dosi elevate, bassi retinoidi possono indurre una crescita delle unghie più rapida, i citostatici la inibiscono. Alcuni studi evidenziano come anche la biotina, nota anche come vitamina per capelli e unghie, migliori la crescita e la consistenza delle unghie²⁴.

L'accumulo delle sostanze avviene durante la crescita, ma a differenza dei capelli, dove la crescita avviene dalla base del capello, le unghie hanno due percorsi di crescita complementari. La maggior parte dell'unghia (circa l'80%) viene costantemente generata dalla matrice germinale, detta anche radice ungueale. Il restante 20% della crescita avviene durante la progressiva maturazione dell'unghia nel letto ungueale. Il fatto che la cheratinizzazione dell'unghia avvenga sia in maniera dorsale che ventrale, spiegherebbe come mai l'unghia rimanga comunque attaccata al polpastrello sottostante²⁵.

Xenobiotici, antibiotici, farmaci chemioterapici e metalli pesanti si depositano nella radice attraverso il flusso ematico per poi andare a far parte del letto ungueale.

Concentrazioni più elevate di D-aminoacidi sono state trovate nel diabete²⁶; vari farmaci, sostanze dopanti, oligoelementi, metalli pesanti e tossine possono ancora essere rilevati

²³ Tosti, A., Piraccini, B. M., & Peluso, A. M. (1996). *LE UNGHIE guida pratica alle più comuni affezioni*. Bologna: Editrice Delle Rose s.a.s. p. 14

²⁴ Herpin, F., & Boué, V. (2022). Efficacia degli integratori alimentari a scopo dermatocosmetico. *EMC - Cosmetologia Medica e Medicina degli Inestetismi Cutanei Vol19-(1)*, 1-13.

²⁵ Krumbiegel, F., Hastedt, M., Westendorf, L., Niebel, A., Methling, M., Parr, M. K., & Tsokos, M. (2016). The use of nails as an alternative matrix for the long-term detection of previous drug intake: validation of sensitive UHPLC-MS/MS methods for the quantification of 76 substances and comparison of analytical results for drugs in nail and hair samples. *Forensic Sci Med Pathol*, 2(4):416-434.

²⁶ Min, J. Z., Hatanaka, S., Yu, H.-F., Higashi, T., Inagaki, S., & Toyo'oka, T. (2011). Determination of DL-amino acids, derivatized with R(-)-4-(3-isothiocyanatopyrrolidin-1-yl)-7-(N,N-dimethylaminosulfonyl)-2,1,3-benzoxadiazole, in nail of diabetic patients by UPLC-ESI-TOF-MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 879(29), 3220-3228.

nell'unghia per molti mesi fino a 1 anno^{27 28 29}; numerosi studi sono stati dedicati alla rilevazione dell'arsenico per assunzione con acqua potabile e per avvelenamento^{30 31}.

1.5.3 Nell'analisi tossicologica forense

Il prelievo di unghie può essere effettuato in tre modi: il primo metodo di raccolta del campione è tramite "clipping". La parte distale in eccesso dell'unghia viene tagliata con un tagliaunghie o delle forbicine; il secondo metodo è tramite limatura; il terzo ed ultimo modo per prelevare l'unghia è utilizzabile solo in casi di autopsia e consiste nel prelevare l'intera unghia sfilandola dal letto ungueale³².

I primi lavori in letteratura che si sono occupati dello studio di questa matrice risalgono ai primi anni del 1990³³. Nel corso dell'ultimo decennio si è potuta notare un'evoluzione negli studi sulle unghie. Sono stati condotti prevalentemente studi per identificare sostanze stupefacenti in campioni provenienti sia da vivente che da cadavere^{34 35 36}. Gli scopi sono

²⁷Daniel, C. R., Piraccini, B. M., & Tosti, A. (2004). The nail and hair in forensic science. *J Am Acad Dermatol* 50(2), 258-261

²⁸ Ohno , T., Sakamoto, M., Kurosawa, T., Dakeishi, M., Iwata, T., & Murata, K. (2006). Total mercury levels in hair, toenail, and urine among women free from occupational exposure and their relations to renal tubular function. *Environ Res*, 103(2), 191-197.

²⁹ Reddy, K., & Lowenstein, E. J. (2011). Forensics in dermatology: part I. *J Am Acad Dermatol*, 64(5), 801-808.

³⁰ Mandal, B. K., Ogar, Y., & Suzuki, K. T. (2003). Speciation of arsenic in human nail and hair from arsenic-affected area by HPLC-inductively coupled argon plasma mass spectrometry. *Toxicol Appl Pharmacol*, 189(2), 73-83.

³¹ Blakely, M. A., Hudgens, E. E., Schmitt, M. T., Calderon, R. L., & Thomas, D. J. (2006). Total arsenic concentrations in toenails quantified by two techniques provide a useful biomarker of chronic arsenic exposure in drinking water. *Environ Res*, 101(2), 213-220

³² Baumgartner, M. R. (2014). Nails: an adequate alternative matrix in forensic toxicology for drug analysis? *Bioanalysis*, 6(17), 2189-91.

³³ Lemos, N. P., Anderson, R. A., & Robertson, J. R. (1999). Nail analysis for Drug of Abuse: Extraction and Determination of Cannabis in Fingernails by RIA and GC-MS. *Journal of Analytical Toxicology*, vol 23, 147-152.

³⁴ Baumgartner, M. R. (2014). Nails: an adequate alternative matrix in forensic toxicology for drug analysis? *Bioanalysis*, 6(17), 2189-91.

³⁵ Drummer, O. H. (2004). Postmortem toxicology of drugs of abuse. *Forensic Science International*, 142, 101-113.

³⁶ Tzatzarakis, M. N., Vakonaki, E., Kovatsi, L., Belivanis, S., Mantsi, M., Alegakis, A., . . . Tsatsakis, A. M. (2015). Determination of buprenorphine, norbuprenorphine and naloxone in fingernail clippings and urine of patients under opioid substitution therapy. *J Anal Toxicol* 39(4), 313-20.

numerosi, dalla ricerca per identificare un abuso cronico di stupefacenti, al chemsex³⁷, all'analisi sull'accumulo di farmaci o di metalli pesanti, all'analisi del DNA dall'unghia³⁸. Molte droghe d'abuso e farmaci ad azione sul sistema nervoso centrale sono stati ricercati al fine di inserire l'analisi sulle unghie all'interno di diversi contesti in ambito forense. Anche la possibilità di contaminazioni esterne della matrice, tramite sudore e contatto diretto dell'unghia con la sostanza, è stata studiata per capire se possa avere un ruolo rilevante per l'analisi³⁹. Sebbene siano diverse le tecniche utilizzate per la ricerca di esogeni in materiale biologico, alcune delle quali sono state recentemente impiegate dalla tossicologia forense come l'immunoistochimica per comprendere in che modo le sostanze si accumulano nella lamina⁴⁰, il tipo di analisi più comunemente utilizzato è la gas cromatografia associata alla spettrometria di massa⁴¹. Non a caso questa tecnica viene considerata il gold standard method in tossicologia forense poiché permette di identificare e quantificare con notevole sensibilità le molecole che vengono ricercate, previa opportuna estrazione dalla matrice. Tuttavia anche la cromatografia liquida e ancora di più la cromatografia liquida ad alte prestazioni associate alla spettrometria di massa stanno via via prendendo campo e i nuovi studi vengono condotti con questa tecnica che consente una sensibilità ancora maggiore rispetto alla cromatografia gassosa, la capacità di utilizzare una piccolissima quantità di campione e un pretrattamento più blando. Tramite queste tecniche sarebbe possibile sviluppare e validare delle procedure

³⁷ Busardò, F. P., Gottardi, M., Pacifici, R., Vari, M. R., Tini, A., Volpe, A. R., . . . Pichini, S. (2019). Nails Analysis for Drugs Used in the Context of Chemsex: A Pilot Study. *Journal of Analytical Toxicology*, 44, 69-74.

³⁸ Allouche, M., Hhamdoum, M., Mangin, P., & Castella, V. (2008). Genetic identification of decomposed cadavers using nails as DNA source. *Forensic Sci Int Genet*, 3(1), 46-9.

³⁹ Hill, V. A., Stowe, N. G., Paulsen, R. B., & Schaffer, M. (2018). Nail Analysis for Drugs: A Role in Workplace Testing? *J Anal Toxicol*, 42(6), 425-436.

⁴⁰ Scendonì, R., Bury, E., Buratti, E., Frolidi, R., Cippitelli, M., Mietti, G., & Cingolani, M. (2022). Detection of Morphine and Opioids in Fingernails: Immunohistochemical Analysis and Confirmation with Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled with High-Resolution Mass Spectrometry. *Toxics*, 10(8), 420.

⁴¹ Cingolani, M., Scavella, S., Mencarelli, R., Mirtella, D., Frolidi, R., & Rodriguez, D. (2004). Simultaneous detection and quantitation of morphine, 6-acetylmorphine, and cocaine in toenails: comparison with hair analysis. *J Anal Toxicol*, 28(2), 128-31.

estrattive e di analisi che consentano la ricerca di un ampio spettro di sostanze all'interno dello stesso campione seguendo un protocollo snello e di facile ripetibilità. Viste le similitudini con i capelli, questi sono spesso stati utilizzati come matrice di riferimento, con lo scopo di valutare se esiste una correlazione tra le due matrici. Resta comunque ancora difficile riuscire a definire il meccanismo tramite il quale le sostanze vengono integrate e conservate all'interno delle unghie. Molti studi hanno provato che l'accumulo delle sostanze è maggiore nelle unghie dei piedi, probabilmente dovuto al più lento tasso di crescita.

2. Scopo del progetto di tesi

Approfondire lo studio sulle matrici alternative, e in particolar modo sulle unghie, è un argomento che ricopre un grande interesse nella tossicologia forense, non solo perché queste sono resistenti al deterioramento da parte delle condizioni ambientali e dagli agenti di decomposizione tafonomici e biologici, ma anche per la loro somiglianza biochimica con le produzioni pilifere, le quali si sono rivelate di grande aiuto in molti contesti forensi. Per questo progetto ho condotto analisi sia su campioni provenienti da materiale cadaverico prelevati in sede di autopsia, che su campioni prelevati da vivente tramite la tecnica del clipping da un gruppo di volontari, per ricercare sostanze d'abuso come oppiacei, metadone, cannabinoidi e i loro metaboliti e, farmaci ad azione sul sistema nervoso centrale (SNC) quali quetiapina, alprazolam, clonazepam.

Questa tesi si prefigge un duplice scopo. Il primo obiettivo è stato quello di sviluppare un metodo estrattivo rapido e di semplice riproduzione, per rendere possibile l'identificazione di più sostanze partendo da una singola aliquota di campione e di quantificare le sostanze, e confrontarle quando possibile, con i risultati ottenuti sui capelli. Le analisi sono state condotte principalmente in cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC), ma anche la gas cromatografia associata allo spettrometro di massa è stata impiegata. Il metodo estrattivo utilizzato per le estrazioni in matrice, applicato alla ricerca di tutte le sostanze indagate ad eccezione dei cannabinoidi, è stato adattato da uno già validato e utilizzato per l'estrazione sui capelli ⁴². Per questo motivo, prima di procedere sono stati effettuati dei test per individuare il metodo estrattivo adatto. Un protocollo già utilizzato nei capelli per la ricerca di farmaci è stato provato su un campione di unghie post mortem, risultato positivo per

⁴² Kronstrand, R., Nyström, I., Strandberg, J., & Druid, H. (2004). Screening for drugs of abuse in hair with ion spray LC-MS-MS. *Forensic Sci Int*, 145(2-3), 183-190.

benzodiazepine durante uno screening a immunoassay. Nei capelli e nelle unghie del soggetto è stato identificato il citalopram e il dismetil-citalopram, un metabolita del farmaco. Questo risultato ci ha dato la conferma che il metodo estrattivo era efficace anche sulle unghie per la ricerca di farmaci. I confronti delle analisi quantitative hanno riportato delle variazioni nella concentrazione di morfina, codeina e metadone non significative, questo mi ha permesso di procedere con le analisi anche per le unghie.

Il secondo proposito che è stato prefissato per questa tesi è cercare di fare chiarezza sulle modalità di incorporazione e accumulo delle sostanze esogene all'interno delle unghie. A questo scopo sono state condotte delle analisi su materiale prelevato da volontari, per poter valutare l'accumulo di uno o più farmaci assunti costantemente nel tempo, e analisi sull'intera unghia (prelevata post mortem), per valutare la diversa distribuzione delle sostanze nel tempo lungo il campione.

3. Materiali e metodi

3.1. Materiali

3.1.1. Raccolta dei campioni

È stato possibile lavorare sul materiale cheratinico dell'unghia collezionato da cadaveri e da viventi. Le analisi post mortem sono state eseguite su campioni di unghie provenienti da 13 autopsie forensi. Per completare questa parte della ricerca è stato fondamentale il ruolo del laboratorio For.Med.Lab nella partecipazione a casi di interesse forense. Per ogni campione sono state prese informazioni di base riguardanti i soggetti deceduti: sesso, pregressa storia di tossicodipendenza o di disintossicazione, storia clinica riguardo le specifiche terapie farmacologiche seguite.

Per l'analisi post mortem l'intera unghia della mano è stata rimossa in sede di autopsia. Quando è stato possibile l'unghia è stata divisa a metà in maniera trasversale per indagare se nel tempo ci sia stato un cambiamento nella concentrazione delle sostanze ricercate e di conseguenza, nell'assunzione. Un'aliquota di capelli o di peli pubici è stata ugualmente prelevata per poter effettuare delle analisi di confronto. Il campione di studio era composto da uomini e donne (9 uomini e 2 donne). Per ogni soggetto è stato utilizzato il codice identificativo indicato dal laboratorio For.Med.Lab che ha effettuato le analisi sulle altre matrici.

Per la raccolta dei campioni su vivente, è stata fondamentale la collaborazione avviata tra il laboratorio For.Med.Lab e i residenti di una struttura privata facente parte di un'associazione ONLUS di Macerata. I prelievi sono stati eseguiti sugli ospiti della struttura per la ricerca di farmaci appartenenti alle famiglie degli antidepressivi, antipsicotici, SSRI, e antiepilettici. A

tutti i volontari aderenti al progetto, e ai rispettivi tutori legali ove necessario, è stato consegnato un modulo di consenso informato da restituire firmato dove veniva illustrato brevemente lo scopo del progetto, le modalità di prelievo e di conservazione e il sistema di classificazione dei campioni per garantire l'anonimato dei partecipanti. Ai volontari che si sono sottoposti ai prelievi è stato assegnato un codice identificativo. Anche in questo caso il gruppo di studio era eterogeneo: 12 uomini e 5 donne.

La raccolta di campioni su vivente è stata condotta con l'ausilio del personale specializzato della struttura, utilizzando la tecnica del clipping sulla parte distale delle unghie delle dita delle mani. Per ogni soggetto del gruppo di studio sono stati prelevati campioni da tutte le dita di entrambe le mani per poter assicurare una quantità di campione sufficiente per condurre le analisi e per un eventuale ripetizione delle stesse. I prelievi sono stati ripetuti a distanza di tempo. Purtroppo non è stato possibile eseguire a tutti i volontari i prelievi nelle stesse sedute di prelievo per mancanza di disponibilità di campioni o dei soggetti stessi.

3.1.2. Reagenti

Reagenti per pretrattamento, SPE, estrazione di thc.

Nalorfina [standard interno (IS) per l'analisi in GC-MS], proadifen (SKF) [standard interno (IS) per l'analisi in UHPLC e GC-MS], Δ^9 -THC-D3 [standard interno per l'analisi in GC-MS], MSTFA (N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamide), N,O-bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamide (BSTFA) con 1% di trimetilclorosilano (TMCS) sono stati acquistati da Sigma.

Gli standard di morfina, 6-monoacetilmorfina, metadone, EDDP, codeina, cocaina, Δ^9 -THC, alprazolam, clonazepam e quetiapina sono stati acquistati da Sigma. Il metanolo per l'analisi, l'acqua per l'analisi, il metanolo per HPLC e l'acqua ultra pura per HPLC, NaOH, esano e acetato

di etile sono stati acquistati da Carlo Erba. Tutti i reagenti erano di grado analitico e conservati secondo le istruzioni del produttore.

3.2 Metodo

3.2.1 Preparazione dei campioni

I campioni di unghie prelevati da vivente e post mortem, e le produzioni pilifere sono stati sottoposti al medesimo processo di lavaggio, decontaminazione e misurazione. I campioni sono stati lavati con acqua, asciugati, 60 milligrammi (mg) di campione sono stati pesati e finemente sminuzzati per permettere una più efficace estrazione delle sostanze. Dove è stato possibile l'unghia intera prelevata in sede di autopsia è stata divisa a metà trasversalmente per valutare eventuali differenze nella concentrazione delle sostanze nel tempo. Sono state divise le unghie dei soggetti 11T/21, 14/21, 3T/22, 6T/22 e nominate con le abbreviazioni pross. (prossimale) e dist. (distale) accanto al codice identificativo del soggetto.

3.2.2 Analisi post mortem

Screening immunologico

Prima di eseguire le procedure estrattive su unghie e materiale pilifero, sono stati condotti sulle urine di ciascun soggetto, dei test rapidi multi strip di screening a immunoassay cromatografico per verificare simultaneamente la presenza di amfetamine, buprenorfina, cocaina, MDMA, metanfetamine, metadone, oppiacei/morfina, marijuana e benzodiazepine.

I campioni risultati positivi per oppiacei, metadone e cocaina sono stati preparati per l'estrazione specifica in acqua e acido formico e le successive analisi in HPLC e GC-MS. I campioni risultati positivi anche ai cannabinoidi sono stati sottoposti a una seconda

estrazione, specifica per le sostanze acide, seguendo un metodo di doppia estrazione già validato per le matrici pilifere e adattato alle unghie⁴³, e sottoposti all'analisi in GC-MS.

Estrazione in acqua e acido formico

I campioni sono stati addizionati con 490 µl di acqua distillata con lo 0,1% di acido formico e 10 µl di metanolo con lo 0,1% di acido formico. Sono stati aggiunti 20 ng di standard interno Proadifen (SKF). I campioni di peli sono stati incubati per 24 ore a 55° C, mentre quelli di unghie sono stati incubati per 72 ore a 55° C.

Dopo l'incubazione, i campioni sono stati centrifugati a 14.000 giri al minuto in un'ultracentrifuga. Il surnatante è stato raccolto ed evaporato sotto flusso di azoto a 50°. Successivamente i campioni sono stati risospesi con 50 µl di fase mobile B (MeOH + 1% di acido formico) per l'iniezione cromatografica.

Analisi e identificazione di oppiacei e metadone mediante UHPLC-HR-MS:

Per l'analisi è stato utilizzato il sistema cromatografico Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 (UHPLC) accoppiato con lo spettrometro di massa Thermo Exactive Plus Orbitrap (HR-MS). Le condizioni applicate per l'analisi cromatografica sono state le seguenti: la colonna utilizzata è stata Kinetex Biphenyl 2,6 µm (50 x 2,1 mm) di Phenomenex; il flusso della colonna è stato impostato a 0,4 ml/min. Le fasi utilizzate sono state le seguenti: fase A: H₂O + 0,1% acido formico; fase B: MeOH + 0,1% acido formico. La temperatura della colonna è stata impostata a 25°C. Il gradiente di eluizione è illustrato nella Tabella 1. Per l'identificazione degli analiti sono state utilizzate la massa esatta (EM) ottenuta dalla dissociazione indotta da collisione (50

⁴³ Tassoni, G., Cippitelli, M., Ottaviani, G., Froidi, R., & Cingolani, M. (2016). Detection of Cannabinoids by ELISA and GC-MS Methods in a Hair Sample Previously Used to Detect Other Drugs of Abuse. *J Anal Toxicol*, 40(6), 408-413.

eV) (In source CID), con un intervallo di accettazione di ± 5 ppm, e la produzione di ioni (PI). I valori monitorati per gli analiti sono stati i seguenti: 286.14377 (EM) (PI: 201.09101, 229.08592, 183.08044) per morfina; 300.15942 (EM) (PI 215.10666, 243.10157, 199.07536) per codeina; 310.21654 (EM) (PI: 105.03349, 219.11683, 195.11683) per metadone; e 354.24276 (EM) (PI:167.08553, 91.05423, 105.06988) per SKF (IS).

TABELLA 1: gradiente di eluizione.

TEMPO (min)	FASE A (%)	FASE B (%)
0-0.5	98	2
0.5-10	0	100
10-12	0	100
12-13	98	2
13-15	98	2

Analisi e identificazione di cocaina mediante GC-MS

I campioni che hanno riscontrato una positività allo screening per cocaina, sono poi stati nuovamente portati a secco sotto flusso di idrogeno, derivatizzati con MSTFA e riscaldati per 30 minuti a 60°C. 1 μ L di campione derivatizzato è stato iniettato nel GC-MS singolo quadrupolo ISQ (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA). La colonna utilizzata è stata una capillare (ZB 5 MS 30 m X 0,25 mm X 0,25 μ m); l'elio come gas di trasporto a una velocità di flusso di 1,0 ml/min; il programma di temperatura è stato impostato come descritto nella tabella 2. La modalità di iniezione è stata splitless; la scansione scelta era la modalità Full Scan

e l'intervallo degli spettri di massa era 40-500. I valori degli ioni monitorati sono stati i seguenti: m/z 82, 182, 303, 94 per la cocaina, m/z 196, 82, 317, 272 per la cocaetilene, 82, 240, 105, 122 per la benzoilecgonina e 86, 99, 165 per lo standard interno Proadifen (SKF).

TABELLA 2: programma di temperatura per la ricerca di cocaina in gc-ms.

TEMPERATURA	VELOCITÀ (°C/MIN)	TEMPO DI MANTENIMENTO
100°C		1 min
220°C	40°C/min	1 min
320°C	20°C/min	6 min

Idrolisi basica e quantificazione di cannabinoidi mediante GC-MS

Per i campioni 14/21, 6T/22, 9T/22, risultati positivi anche ai cannabinoidi durante lo screening sulle urine, è stata effettuata un'analisi in GC-MS anche per la ricerca di Δ^9 -tetraidrocannabinolo e i suoi metaboliti: cannabinolo (CBN) e 11-nor-9-carbossi- Δ^9 -tetraidrocannabinolo (THC-COOH).

I campioni rimanenti dall'estrazione in H₂O+acido formico 0.1% stati addizionati con 50ng di standard interno Δ^9 -THC-D3 e sottoposti a idrolisi basica in una soluzione di 2 ml di NaOH 1 M a 95°C per 15 minuti, raffreddata a temperatura ambiente ed estratta con metodo liquido-liquido. Tre millilitri di una soluzione di estrazione di n-esano/etil acetato (9:1) è stata aggiunta ai campioni e agitata per almeno 15 minuti. Le fasi organiche sono state separate, quindi

completamente evaporate e infine sono stati aggiunti 30 μ L di N, O-bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetammide (BSTFA) con 1% di trimetilclorosilano (TMCS) come derivatizzante, riscaldato a 60°C per 30 minuti. Un microlitro di campione derivatizzato è stato iniettato in GC-MS.

Per l'analisi è stato utilizzato il GC-MS Polaris-Q. Le condizioni analitiche erano le seguenti: colonna capillare (ZB 5 MS 30 m X 0,25 mm X 0,25 μ m); elio come gas di trasporto a una velocità di flusso di 1,0 ml/min; il programma di temperatura è indicato nella tabella 3; il volume di iniezione era di 1 μ l in modalità splitless; la modalità di scansione utilizzata era la modalità Full Scan e l'intervallo degli spettri di massa era 250-500. I valori degli ioni monitorati sono stati i seguenti: m/z 386, 371, 315, 303, 330 per il Δ 9-THC-TMS, m/z 367, 368, 382, 310 per il CBN-TMS e 374, 315, 389 per lo standard interno Δ 9 -THC-D3.

TABELLA 3: programma di temperatura per la ricerca di cannabinoidi in gc-ms.

TEMPERATURA	VELOCITÀ (°C/MIN)	TEMPO DI MANTENIMENTO
100°C		1 min
250°C	40°C/min	6 min
320°C	25°C/min	6 min

3.2.3 Analisi su vivente

Anche per l'analisi su vivente sono stati selezionati i tre di farmaci maggiormente assunti tra quelli indicati come terapia dai partecipanti allo studio. I farmaci ricercati sono stati quetiapina, alprazolam e clonazepam. Il metodo estrattivo utilizzato è stato lo stesso della ricerca di sostanze su materiale cadaverico: estrazione tramite acqua con 0.1% di acido

formico e metanolo con 0.1% di acido formico con l'aggiunta di 20 ng di Standard interno (SKF).

Anche le condizioni analitiche utilizzate sul Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 (UHPLC) accoppiato con Thermo Exactive Plus Orbitrap (HR-MS) sono state le stesse descritte sopra, con l'andamento del gradiente descritto nella tabella 1. Per l'identificazione degli analiti sono state utilizzate la massa esatta (EM) ottenuta dalla dissociazione indotta da collisione (50 eV) (In source CID), con un intervallo di accettazione di ± 5 ppm, e la produzione di ioni (PI). I valori monitorati per gli analiti sono stati i seguenti: 309.09015 (EM) (PI: 281.07150, 274.12130, 241.05260) per alprazolam; 316.04835 (EM) (PI: 270.0554, 302.0453, 214.0418) per clonazepam; 384.17402 (EM) (PI: 253.07940, 279.09500, 221.10721) per quetiapina; e 354.24276 (EM) (PI:167.08553, 91.05423, 105.06988) per SKF (IS).

3.2.4 Quantificazione

Per eseguire la quantificazione delle sostanze nei campioni analizzati sono state preparate delle curve di calibrazione per ciascuna sostanza.

Per le analisi post mortem sono state preparate le curve di: morfina, con concentrazioni note di 1ng, 10 ng, 30 ng, 50 ng, 100 ng; codeina, con concentrazioni note di 1ng, 10 ng, 30 ng, 50 ng; metadone, con concentrazioni note di 1ng, 5 ng, 10 ng, 30 ng; cocaina, 100ng, 500 ng, 1000 ng, 2000 ng; Δ^9 -THC, con concentrazioni note di 0.1 ng, 0.5 ng, 1 ng, 2 ng; i metaboliti 6-monoacetilmorfina (6-MAM), EDDP, benzoilecgonina, cocaetilene, cannabinolo e 1-nor-9-carbossi- Δ^9 -tetraidrocannabinolo (THC-COOH) non sono stati quantificati. Per le curve di calibrazione preparate il coefficiente di determinazione è stato compreso tra 0.9933 e 0.9984.

Per l'analisi su vivente, le curve di calibrazione per determinare la concentrazione delle sostanze sono state scelte in base ai farmaci assunti come terapia dai soggetti partecipanti. Le curve preparate sono state: alprazolam, 0.1 ng, 0.5 ng, 1 ng, 5 ng; clonazepam, 0.1 ng, 0.5 ng, 2.5 ng, 5 ng; quetiapina, 1 ng, 3 ng, 5 ng, 10 ng. Il coefficiente di determinazione è stato compreso tra 0.9923 e 0.9964.

4. Risultati e discussione

4.1 Post mortem

I campioni che sono risultati positivi allo screening immunologico sulle urine (Tabella 4) sono stati sottoposti all'analisi per oppiacei, metadone, cocaina, THC e i loro metaboliti.

TABELLA 4: risultati dello screening immunologico sulle urine.

	Amf.	Opi	MDMA	Bup.	Mtd	Metamf	Cocaina	Cann.	Benzo.
1T/21	-	Positivo	-	-	Positivo	-	-	-	-
6T/21	-	-	-	-	-	-	-	-	Positivo
11T/21	-	-	-	-	Positivo	-	-	-	-
14/21	-	Positivo	-	-	-	-	Positivo	Positivo	-
20T/21	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21/T21	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22T/21	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24T/21	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31T/21	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3T/22	-	Positivo	-	-	Positivo	-	-	-	Positivo
6T/22	-	Positivo	-	-	-	-	Positivo	Positivo	Positivo
9T/22	-	Positivo	-	-	Positivo	-	Positivo	Positivo	-

Dei tredici campioni iniziali cinque sono risultati negativi allo screening, sono quindi stati scartati per le analisi successive, mentre otto hanno dato delle positività a una o più sostanze.

I campioni positivi hanno di conseguenza subito l'estrazione in acqua e acido formico descritta nel capitolo precedente. Le unghie e le produzioni pilifere dei soggetti che allo screening sono risultati positivi ai cannabinoidi sono stati sottoposti ad idrolisi basica a seguito della prima estrazione (tabella 5).

TABELLA 5: analisi eseguite su ciascun campione

Nome	Prima estrazione	Seconda estrazione
1T/21	H ₂ O 0.1% acido formico	-
6T/21	H ₂ O 0.1% acido formico	-
11T/21	H ₂ O 0.1% acido formico	-
14/21	H ₂ O 0.1% acido formico	Idrolisi basica
20T/21	Nessuna	-
21/T21	Nessuna	-
22T/21	Nessuna	-
24T/21	Nessuna	-
31T/21	Nessuna	-
3T/22	H ₂ O 0.1% acido formico	-
6T/22	H ₂ O 0.1% acido formico	Idrolisi basica
9T/22	H ₂ O 0.1% acido formico	Idrolisi basica

Come specificato nel capitolo precedente, il metodo estrattivo utilizzato per tutte le sostanze basiche indagate, è stato adattato per le unghie da uno già validato e utilizzato per l'estrazione sui capelli.

Il campione di controllo su cui è stata eseguita la verifica è stato il 6T/22, positivo per citalopram e dismetil-citalopram sui capelli e confermato anche sulle unghie. Questo risultato ci ha dato la conferma che il metodo estrattivo era efficace anche su questa matrice per la ricerca di farmaci.

Il secondo step è stato quindi confermare che l'utilizzo del suddetto metodo fosse efficace quanto un metodo già validato per la ricerca di sostanze stupefacenti nei capelli mediante l'estrazione in fase solida in colonnina. Per esserne sicura ho seguito di due metodi di estrazione differenti: il metodo in esame, facile e con una snella procedura estrattiva, e un secondo metodo validato per la ricerca di oppiacei e in generale sostanze basiche nei capelli tramite idrolisi acida e successiva estrazione in fase solida in colonnina.

I test di verifica sono stati condotti sui campioni di capelli dei soggetti 6T/22 e 9T/22. I confronti delle analisi quantitative hanno riportato delle variazioni nella concentrazione di morfina, codeina e metadone non significative, questo mi ha permesso di procedere con le analisi anche per le unghie. Per l'estrazione di sostanze acide quali THC e metaboliti, è stato utilizzato un metodo validato sui capelli a "doppia estrazione" descritto in precedenza.

L'analisi condotta sui campioni di unghie e capelli prelevate in sede autopsia per la ricerca di sostanze stupefacenti ha portato ai risultati illustrati di seguito.

I campioni sottoposti alla ricerca di oppioidi hanno dato i risultati espressi nelle tabelle 6 e 7.

TABELLA 6: concentrazione degli oppioidi nelle unghie.

		Morfina (ng/mg)	Codeina (ng/mg)	6-MAM
1T/21		0.51	0.17	Positivo
14/21	pross	Nd*	Nd	Nd
	dist	Nd	Nd	Nd
3T/22	pross	1.89	0.12	Positivo
	dist	5.80	0.58	Positivo
6/T22	pross	1.3	Nd	Positivo
	dist	0.7	0.11	Positivo
9T/22		Nd	Nd	Nd

TABELLA 7: concentrazione degli oppioidi nelle produzioni pilifere.

		Morfina (ng/mg)	Codeina (ng/mg)	6-MAM
1T/21	Capelli (5 cm)	6.88	5.80	Positivo
14/21	Peli pubici	2.89	0.41	Positivo
3T/22	Peli pubici	2.33	0.72	Positivo
6/T22	Capelli (5 cm)	3.50	0.81	Positivo
9T/22	Capelli (5 cm)	0.18	0.02	Positivo

La ricerca di metadone ed EDDP ha dato i risultati descritti nelle tabelle 8 e 9.

TABELLA 8: concentrazione di metadone e eddp nelle unghie.

	Metadone (ng/mg)	EDDP
1T/21	5.28	Positivo
11T/21		
pross	0.56	Positivo
dist	0.57	Positivo
3T/22		
pross	0.43	Positivo
dist	0.79	Positivo
9T/22	1.96	Positivo

TABELLA 9: concentrazione di metadone e eddp nelle produzioni pilifere

	Metadone (ng/mg)	EDDP
1T/21 Capelli (5 cm)	129	Positivo
11T/21 Peli pubici	32	Positivo
3T/22 Peli pubici	5.09	Positivo
9T/22 Capelli (5cm)	1.95	Positivo

La ricerca di cocaina, benzoilecgonina e cocaetilene ha dato i risultati descritti nelle tabelle 10 e 11.

Tabella 10: concentrazione di cocaina, benzoilecgonina e cocaetilene nelle unghie

		Cocaina	Benzoilecgonina	Cocaetilene
14/21	pross	Nd	Nd	Nd
	dist	Nd	Nd	Nd
6T/22	pross	71.11	Nd	Positivo
	dist	0.56	Nd	Positivo
9T/22		0.34	Nd	Nd

TABELLA 11: concentrazione di cocaina, benzoilecgonina e cocaetilene nelle unghie.

		Cocaina	Benzoilecgonina	Cocaetilene
14/21	Peli pubici	Nd	Nd	Nd
6T/22	Capelli (5 cm)	830.1	Nd	Positivo
9T/22	Capelli (5 cm)	0.02	Positivo	Positivo

Le analisi cromatografiche eseguite sui campioni che hanno subito la doppia estrazione per la ricerca di Δ^9 -THC e cannabinolo hanno portato ai seguenti risultati (tabelle 12 e 13).

TABELLA 12: concentrazioni di δ^9 -thc e cbn nelle unghie. * inferiore a 0.01.

		Δ^9 -THC	CBN	THC-COOH
14/21	pross	Nd	Positivo	Nd
	dist	Nd	Positivo	Nd
6T/22	pross	Nd	Nd	Nd
	dist	Nd	Nd	Nd
9T/22		Tracce*	Nd	Nd

TABELLA 13: concentrazioni di δ^9 -thc e cbn nelle produzioni pilifere

		Δ^9 -THC	CBN	THC-COOH
14/21	Peli pubici	0.12	Positivo	Nd
6T/22	Capelli (5 cm)	0.02	Positivo	Nd
9T/22	Capelli (5 cm)	0.01	Positivo	Nd

Le ricerche per le sostanze stupefacenti hanno riportato una notevole differenza tra la concentrazione rilevata nelle produzioni pilifere e quella rilevata nelle unghie (figure 2-5).

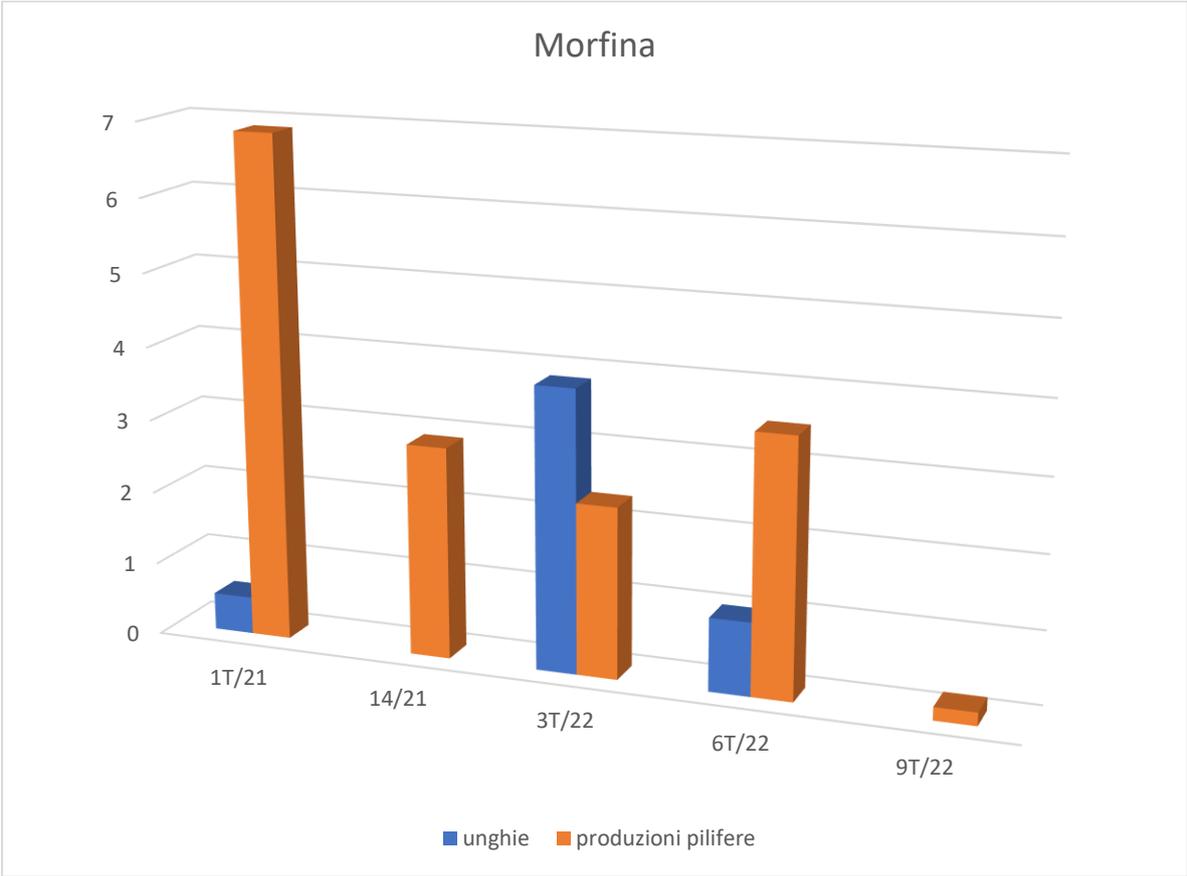


FIGURA 2: morfina.

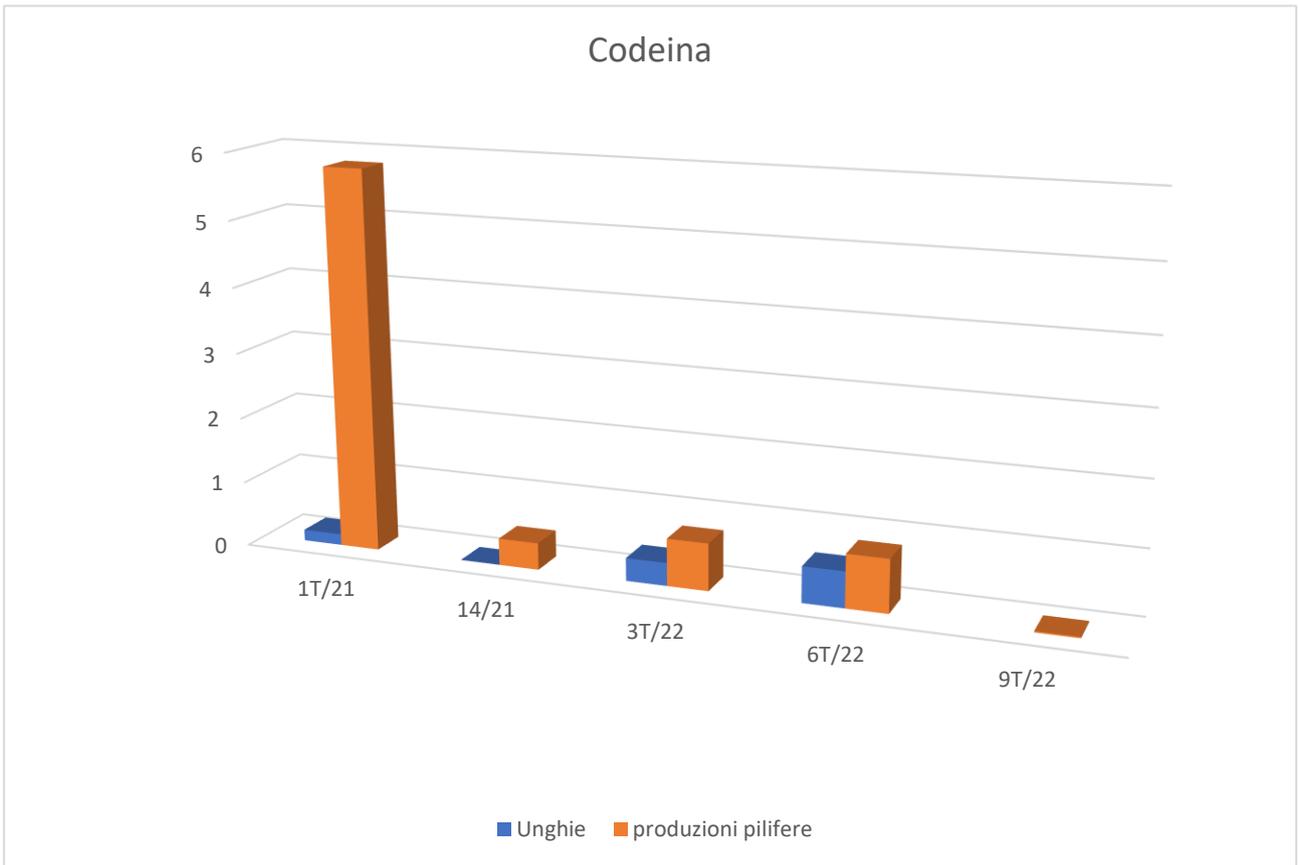


FIGURA 3: codeina.

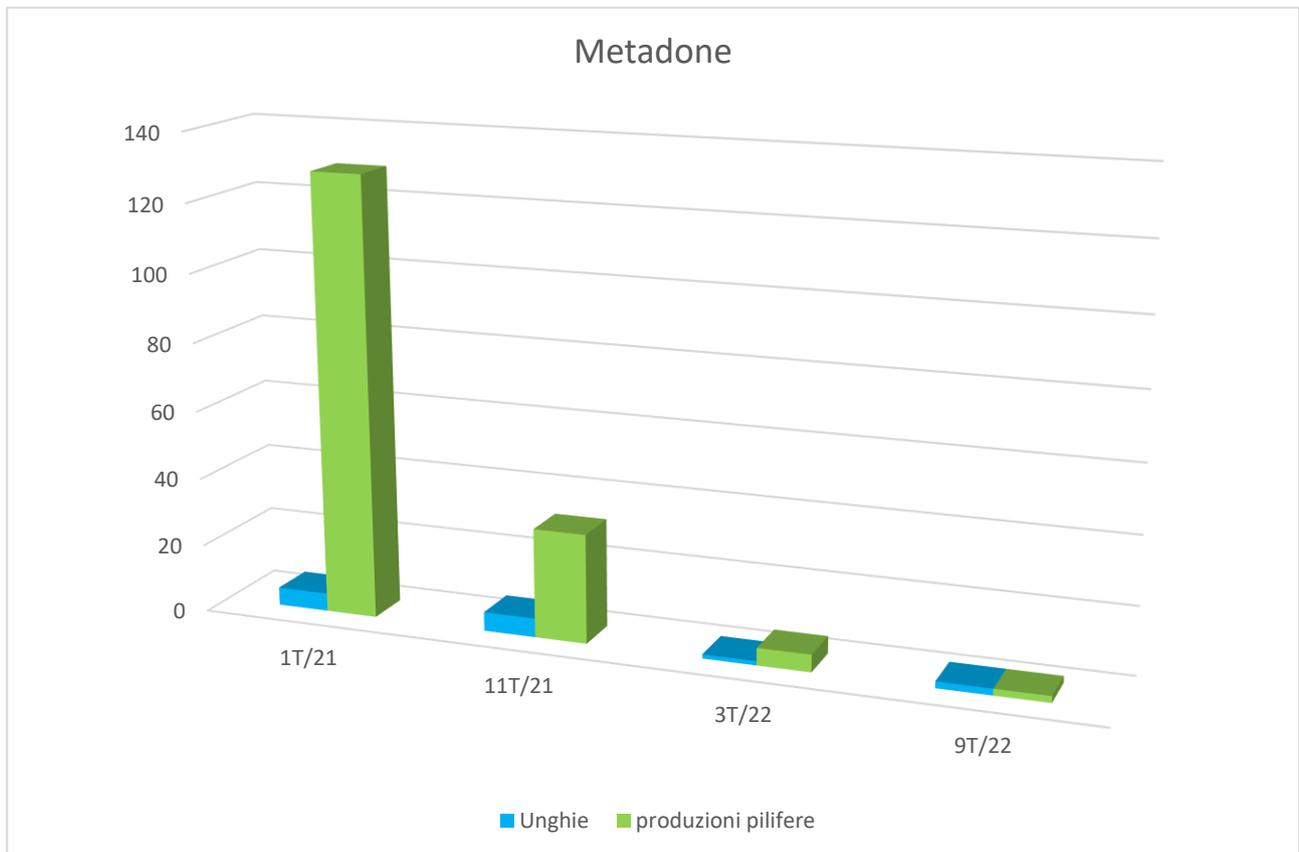


FIGURA 4: metadone.

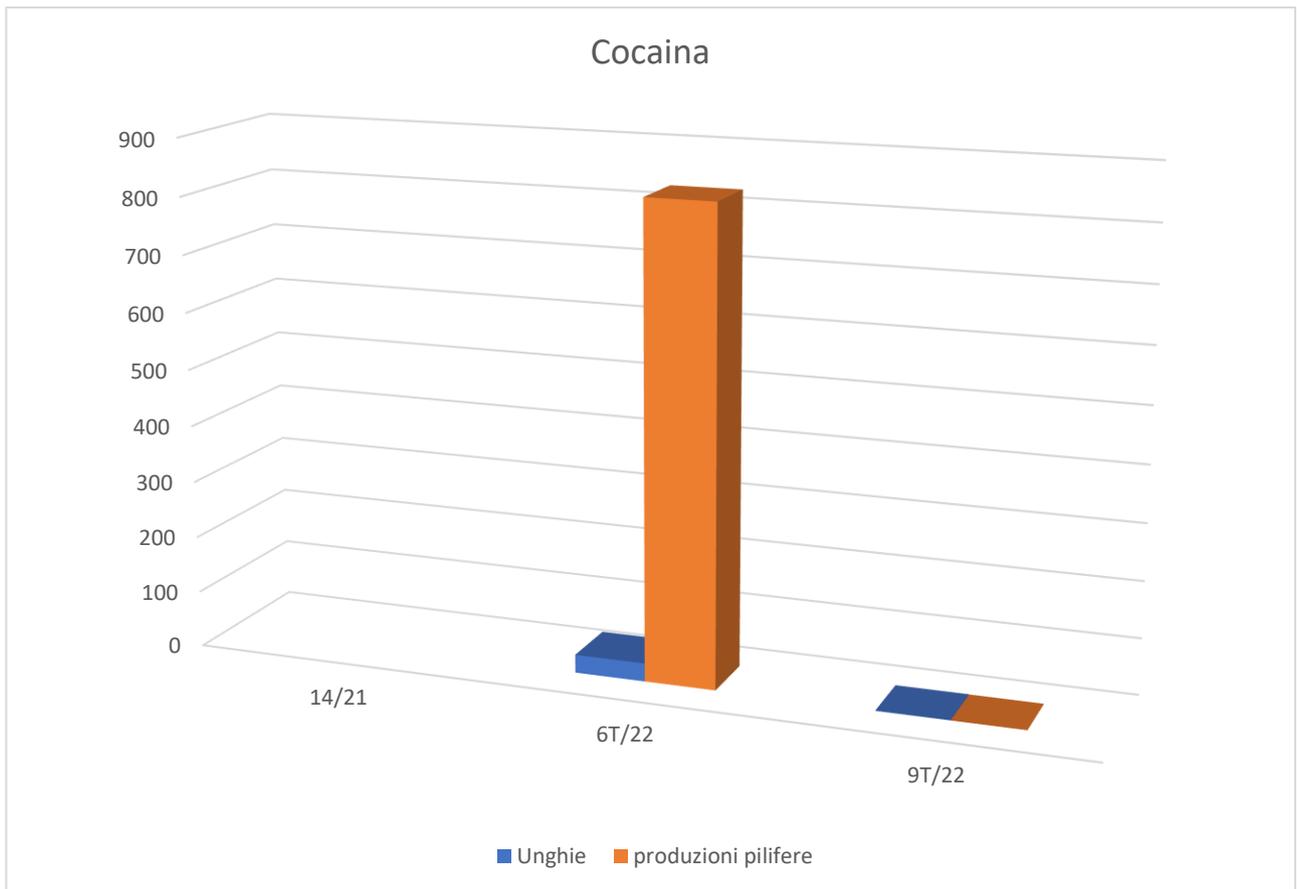
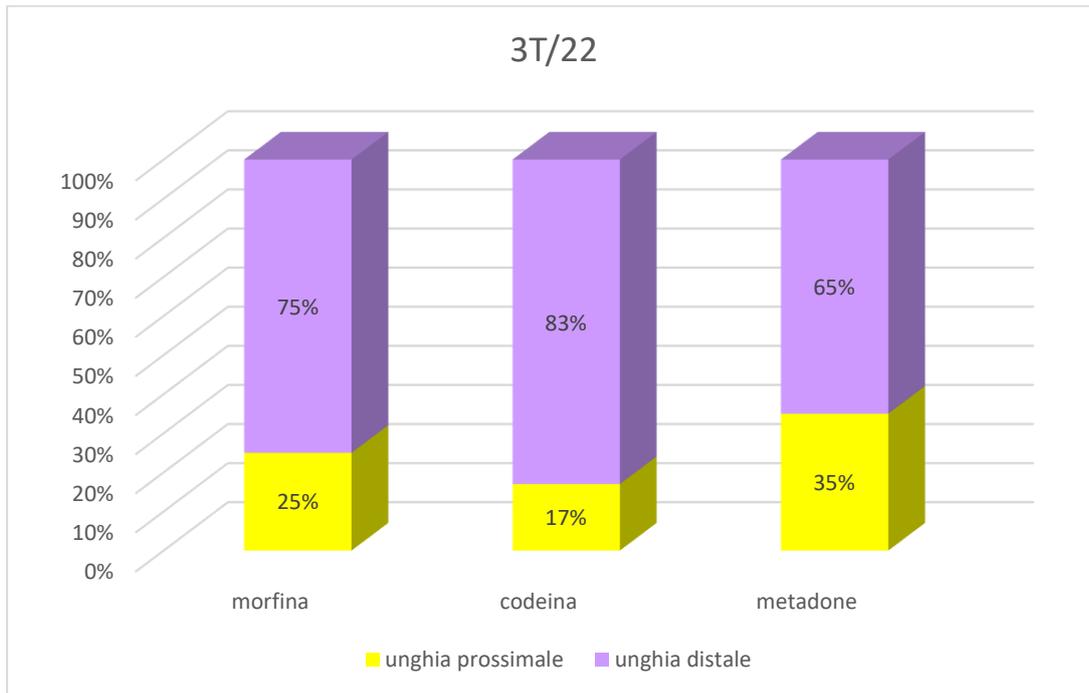


FIGURA 5: cocaina.

Dalle tabelle e dalle immagini è evidente che le sostanze esogene si accumulano all'interno delle unghie e che anche i loro metaboliti sono presenti nella matrice cheratinica. È possibile dedurre anche che la concentrazione delle sostanze avviene con un tasso notevolmente ridotto rispetto alle matrici pilifere.

Le unghie di quattro soggetti, 11T/21, 14/21, 3T/22, 6T/22, sono state tagliate a trasversalmente ed entrambe le porzioni sono state poi analizzate. In questo modo è stato possibile verificare se nel corso dei mesi ci sono state delle variazioni nelle concentrazioni di una o più sostanze da parte dei soggetti. Effettivamente in alcuni campioni si può apprezzare una differenza di accumulo tra le due metà analizzate. Il campione 3T/22 (figura 6) ci fornisce delle informazioni che potrebbero aiutarci a ricostruire le abitudini di assunzione del soggetto.

FIGURA 6: 3T/22



Come possiamo vedere dal grafico, nella parte distale dell'unghia, quindi nella parte più "vecchia", la concentrazione di morfina, codeina e metadone è maggiore rispetto alla concentrazione riscontrata nella metà prossimale dell'unghia.

Questo risultato ci porta a due considerazioni. La prima: dato il fatto che l'unghia cresce con una velocità piuttosto costante, 3-5 mm/mese per le mani e 1 mm/mese per i piedi, possiamo supporre che negli ultimi sei mesi ci sia stato un cambio nelle abitudini di assunzione di sostanze da parte della persona, riducendo il consumo di sostanze stupefacenti. D'altro canto però, la seconda ipotesi potrebbe essere che l'apporto di sostanze nell'unghia non avvenga solamente durante il processo di formazione di questa dalla matrice, ma che una piccola percentuale derivi anche dalla progressiva maturazione dell'unghia nel letto ungueale. In questo modo anche se l'assunzione di una certa sostanza è costante nel tempo, anche per lunghi periodi, nella parte distale dell'unghia ci sarà sempre una maggior quantità di accumulo

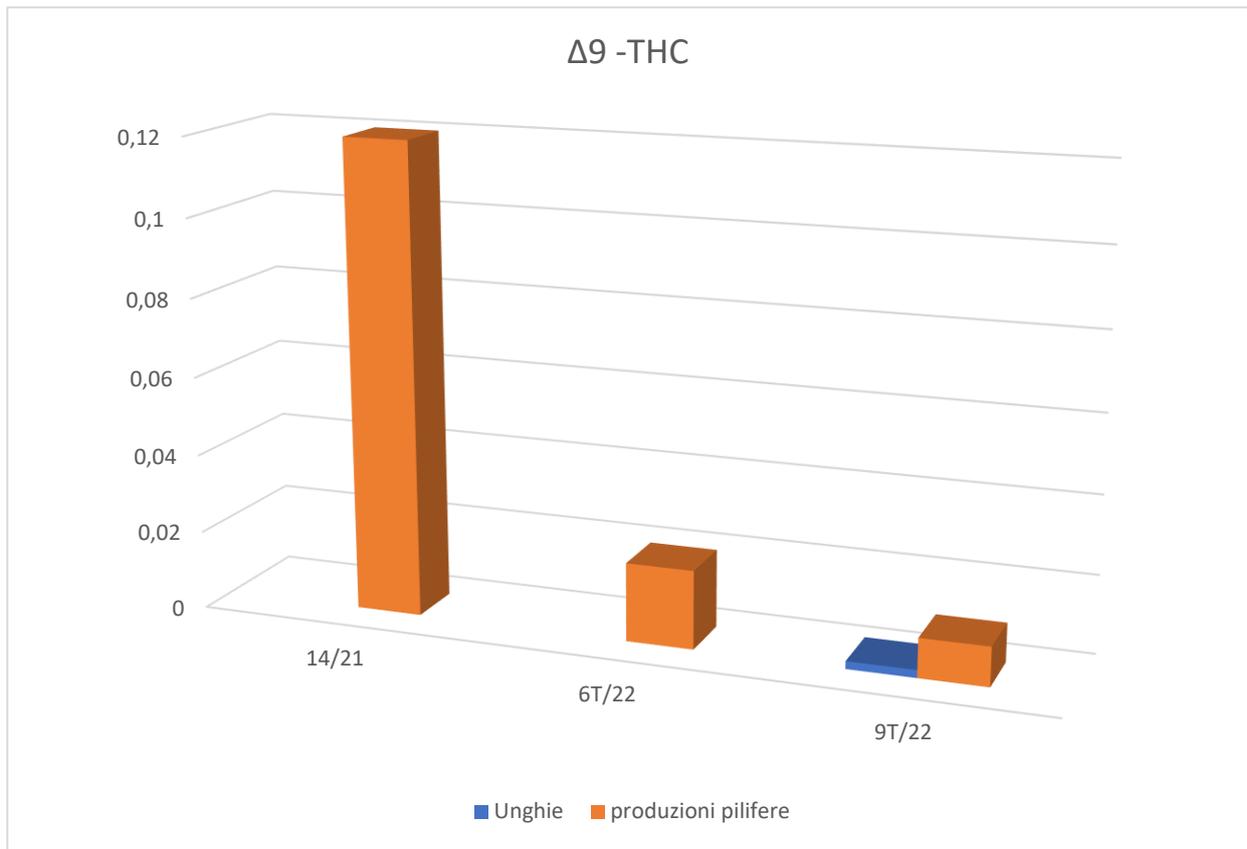
dell'esogeno dovuta alla comunicazione dell'unghia con il tessuto connettivo del letto ungueale. Ne consegue che il deposito di sostanze stupefacenti avvenga durante la cheratinizzazione dell'unghia, sia in maniera dorsale che ventrale.

Purtroppo non è stato possibile fare un confronto temporale tra unghie e produzioni pilifere sulla variazione di distribuzione delle sostanze nel tempo poiché, i capelli prelevati in sede di autopsia non erano stati campionati in maniera da poter distinguere la base del capello dalla sua estremità finale, e come specificato all'inizio di questa tesi, i peli corporei non hanno un tasso di crescita comune per tutti. Nei capelli la crescita si attesta intorno ad un centimetro al mese, con una fase di riposo che dura circa 10 settimane, mentre nei peli di altri distretti, come peli pubici, toracici o delle gambe, la fase telogen va dai due ai sei anni ⁴⁴. Non è possibile perciò effettuare alcun paragone temporale sull'accumulo di stupefacenti sulle unghie e sulle produzioni pilifere dei campioni.

Per quanto riguarda le analisi condotte per la ricerca di cannabinoidi sulle unghie, in tutti i campioni sono state riscontrate delle difficoltà nella determinazione della molecola di Δ^9 -THC (figura 7).

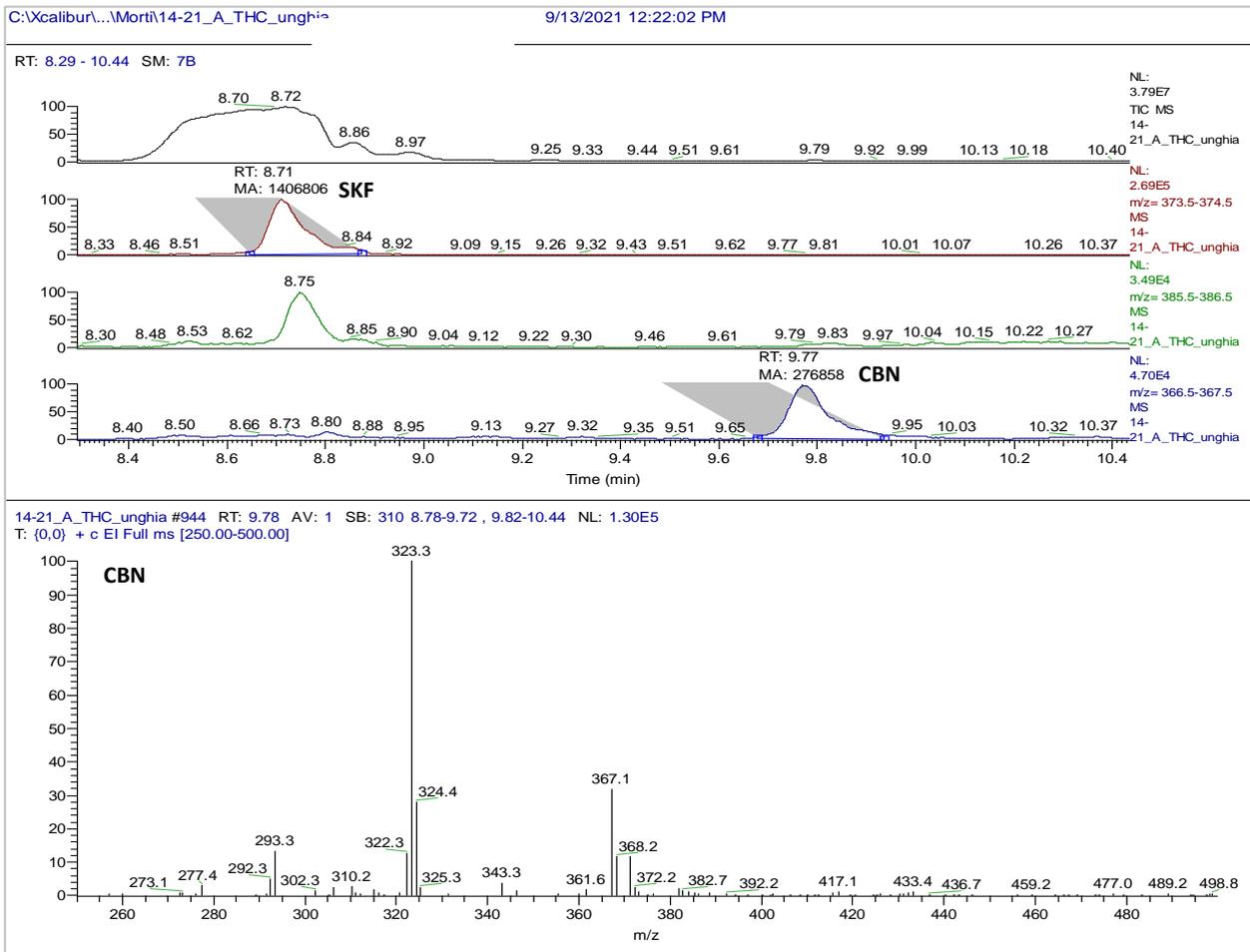
⁴⁴ Valkovic, V. (1989). *Human Hair: Fundamentals and Methods for Measurement of Elemental Composition, Vol. I.* Boca Raton: CRC Press

FIGURA 7: Δ9 -THC



Questo risultato non sarebbe imputabile ad un'inadeguatezza del metodo estrattivo o delle condizioni analitiche ma, più probabilmente dal fatto che la concentrazione della sostanza all'interno dei campioni era troppo bassa per essere rilevata dallo strumento utilizzato per le analisi, in quanto già nelle matrici pilifere, la concentrazione del principio attivo era indubbiamente bassa. A conferma di questa mia considerazione anche il fatto che nelle unghie del soggetto 14/21 è stato rilevato chiaramente il cannabinolo, un metabolita del Δ9 -THC prodotto dalla degradazione dello stesso, che non produce effetto stupefacente (figura 8).

FIGURA 8: CANNABINOLO NELL'UNGHIA PARTE PROSS.DEL SOGGETTO 14/21.



4.2 Vivente

In base alle terapie seguite dai volontari che ci sono state fornite sui tre farmaci ad azione sul SNC che sono stati ricercati (alprazolam, clonazepam, quetiapina), 3 dei 17 volontari (soggetto 9, soggetto 15 e soggetto 17) sono stati esclusi dallo studio poiché non assumevano nessuno dei tre farmaci (tabella14). I campioni degli altri partecipanti sono stati prelevati da personale specializzato nel corso di sei sedute. Non tutti i volontari erano presenti ad ogni sessione di prelievo (Tabella 15).

TABELLA 14: terapie seguite dai soggetti partecipanti allo studio

	Alprazolam	Clonazepam	Quetiapina
Soggetto 1	alprazolam		quetiapina
Soggetto 2	alprazolam	clonazepam	quetiapina
Soggetto 3	alprazolam		quetiapina
Soggetto 4			quetiapina
Soggetto 5		clonazepam	quetiapina
Soggetto 6		clonazepam	quetiapina
Soggetto 7		clonazepam	
Soggetto 8		clonazepam	quetiapina
Soggetto 9			
Soggetto 10		clonazepam	quetiapina
Soggetto 11	alprazolam		quetiapina
Soggetto 12			quetiapina
Soggetto 13		clonazepam	quetiapina
Soggetto 14	alprazolam		
Soggetto 15			
Soggetto 16		clonazepam	
Soggetto 17			

TABELLA 15: calendario dei prelievi.

NOME	SESSO	08/10/2021	15/10/2021	22/11/2021	07/01/2022	11/02/2022	18/02/2022
Soggetto 1	M	✓					✓
Soggetto 2	M						✓
Soggetto 3	M	✓					
Soggetto 4	F						
Soggetto 5	M						✓
Soggetto 6	F						✓
Soggetto 7	M						✓
Soggetto 8	M						✓
Soggetto 9	M	✓	✓	✓	✓	✓	
Soggetto 10	M	✓	✓	✓		✓	
Soggetto 11	M	✓	✓	✓	✓	✓	
Soggetto 12	M	✓	✓	✓			
Soggetto 13	M	✓	✓	✓	✓	✓	
Soggetto 14	F	✓	✓	✓	✓		
Soggetto 16	M	✓	✓	✓	✓	✓	

Come si può evincere dalla tabella sopra, il Soggetto 4 non è stato presente a nessuna delle sedute di prelievo, pertanto, sebbene seguisse una terapia con quetiapina, nessuna analisi è stata eseguita. Per ogni soggetto sono quindi stati processati i campioni provenienti da ogni seduta di prelievo e sono state eseguite le rispettive analisi quantitative. I risultati sulla ricerca di alprazolam, clonazepam e quetiapina sono illustrati nelle tabelle che seguono (tabelle 16, 17, 18).

TABELLA 16

Alprazolam

Nome	Terapia (mg)	Prelievo1 (ng)	Prelievo2 (ng)	Prelievo3 (ng)	Prelievo4 (ng)
S1	0,5mg	0,016	0,044		
S2	1mg	0,01			
S3	0,5mg	0,06			
S11	0,75mg	0,06	0,01	0,11	0,078
S14	0,25mg	0,061	0,11	0,03	

TABELLA 17

Clonazepam

Nome	Terapia (mg)	Prelievo1 (ng)	Prelievo2 (ng)	Prelievo3 (ng)	Prelievo4 (ng)	Prelievo5 (ng)
S2	1mg	0,011				
S5	4,5mg	0,024	0,073			
S6	2mg	0,197				
S8	3mg	0,095				
S10	0,5mg	0,004	0,027	0,018	0,021	
S13	2mg	0,003	0,019	0,076	0,029	0,016
S16	0,5mg	0,0005	0,005	0,02	0,0005	

TABELLA 18

Quetiapina

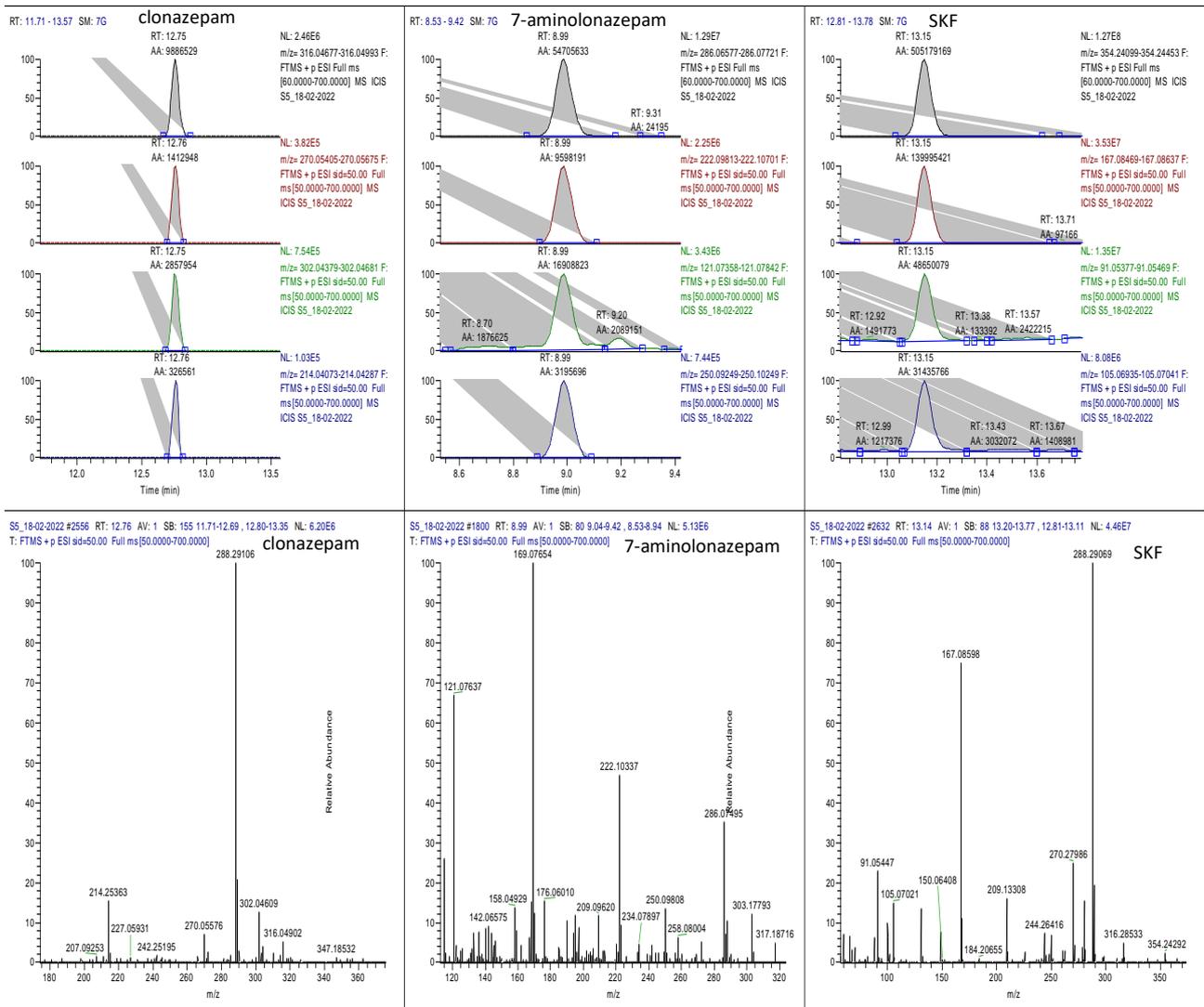
Nome	Terapia (mg)	Prelievo1 (ng)	Prelievo2 (ng)	Prelievo3 (ng)	Prelievo4 (ng)	Prelievo5 (ng)
S1	10 mg	0,071	0,232			
S2	50 mg	0,419				
S3	75 mg	6,57				
S5	10 mg	0,054				
S6	10 mg	0,189				
S8	50 mg	0,376				
S10	100mg	2,176	26,74	2,368	96,54	
S11	300mg	3,26	2,93	3,14	3,5	1,35
S12	10mg	0,07	0,04	0,05		
S13	400mg	3,001	3,53	5,377	3,9	4,35

Tutti i campioni su cui è stata effettuata la ricerca sono risultati positivi per i farmaci ricercati e su tutti è stato possibile determinarne la quantità. Durante la ricerca di clonazepam è stato anche individuato il suo metabolita 7-aminoclonazepam, che non è stato quantificato come per i metaboliti delle sostanze stupefacenti (figura 9).

FIGURA 9: 7-aminoclonazepam.

C:\TraceFinderData\...SS_18-02-2022

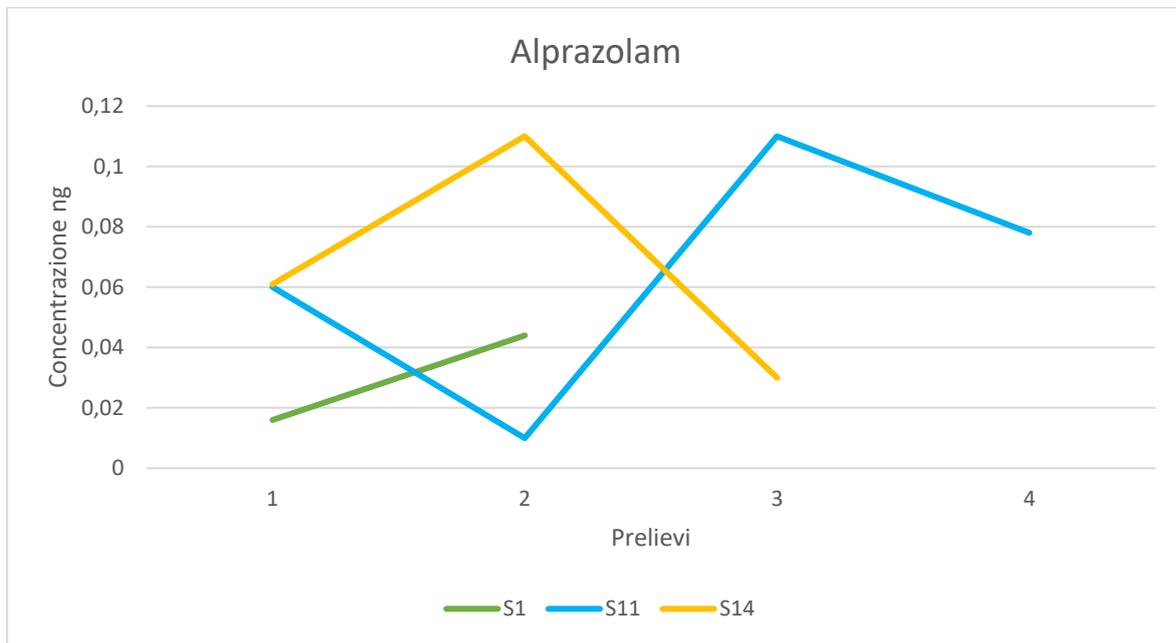
10/27/22 11:57:24



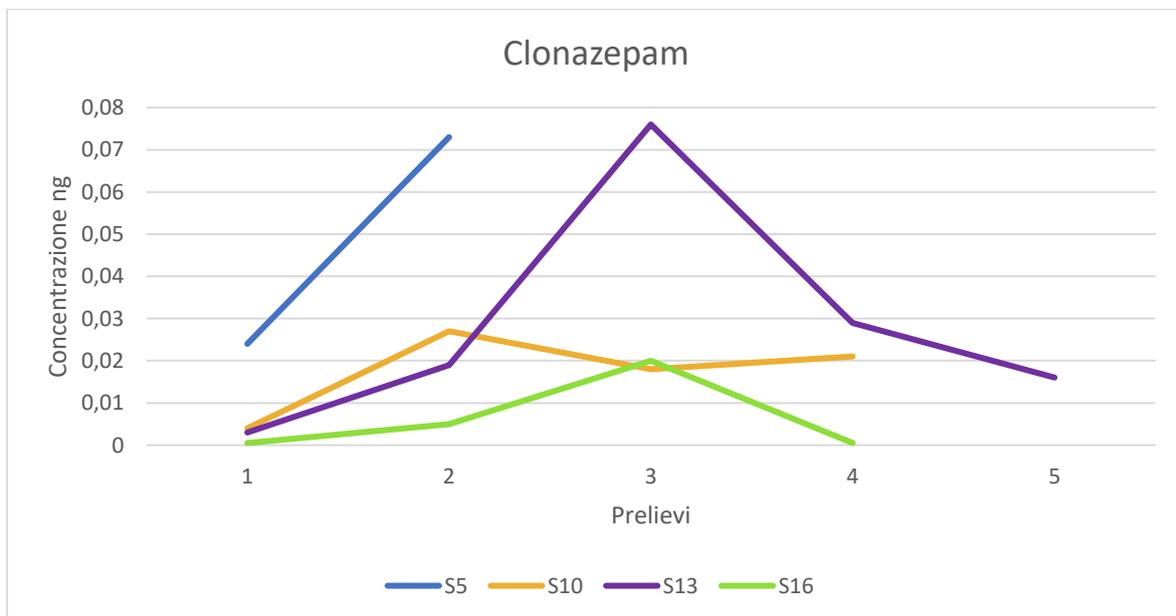
Per valutare se l'incorporazione degli esogeni nelle unghie sia avvenuta in maniera costante nel tempo sono stati presi in considerazione i soggetti che si sono sottoposti ai prelievi in almeno due sedute delle sei totali effettuate.

I grafici sottostanti riportano le variazioni in nanogrammi delle concentrazioni identificate in ciascun prelievo, per ciascun farmaco, in ogni soggetto (figure 10-12).

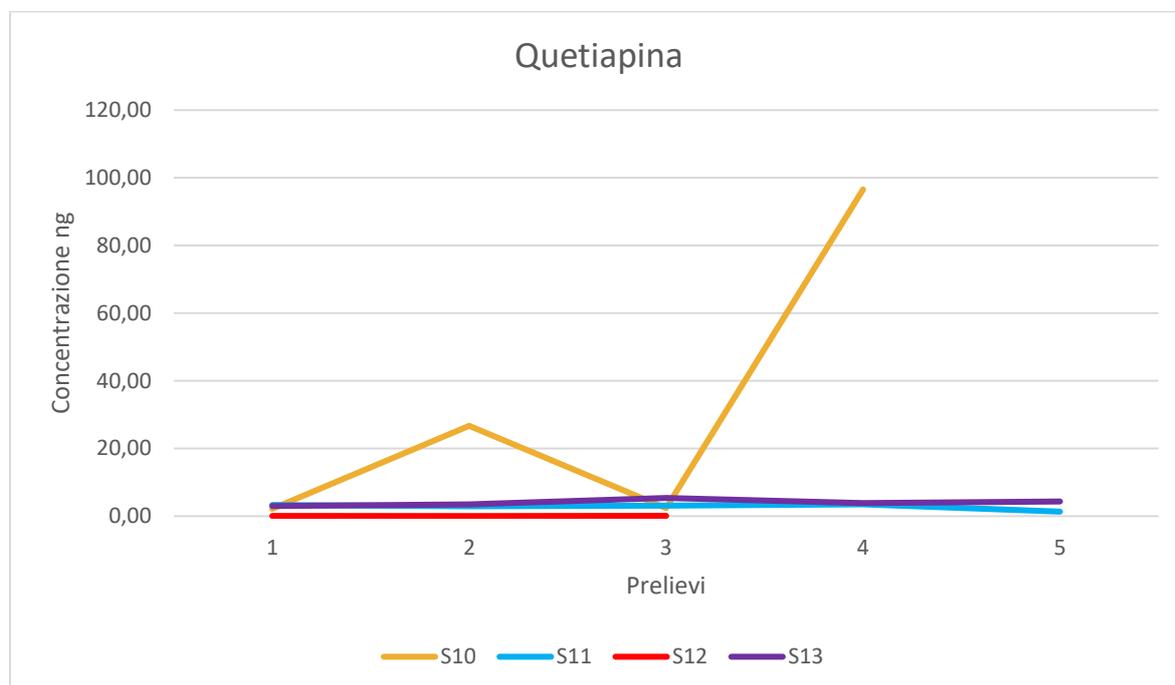
FUGURA 10: alprazolam



FUGURA 11: clonazepam



FUGURA 12: quetiapina



Come si può osservare analizzando i grafici, non si può stabilire se una correlazione lineare tra l'accumulo delle sostanze nel tempo e la quantità di principio attivo somministrata ci sia o meno. In questo caso un'ipotesi potrebbe essere che, come per i capelli, non esiste una correlazione diretta tra l'assunzione di una certa quantità di sostanza e la concentrazione della stessa nelle unghie. Le sostanze che vengono assunte potrebbero essere immagazzinate nelle unghie non solo tal quali, ma anche sotto forma di metaboliti, come riscontrato per il clonazepam e il suo metabolita 7-aminoclonazepam. Questo già di per sé porta a un'impossibilità nel determinare una correlazione lineare tra l'assunzione e l'accumulo. Va ripetuto che l'accumulo degli esogeni potrebbe non avvenire esclusivamente dalla crescita dorsale della matrice ungueale, ma considerando che la cheratinizzazione dell'unghia avviene anche in maniera ventrale durante tutta la sua fase di accrescimento e maturazione, ne consegue che le sostanze si possano accumulare, seppur in minima quantità, anche tramite

questo meccanismo. Inoltre, la crescita e composizione dell'unghia è condizionata da diversi fattori, come assunzione di specifici farmaci, condizioni di salute dell'individuo stesso, fattori ambientali esterni. I volontari che hanno partecipato a questo studio sono tutti individui che seguono costantemente delle terapie con diversi farmaci oltre a quelli ricercati. È opportuno considerare che questi farmaci uniti al quadro clinico di ogni persona possano influenzare la crescita e la composizione dell'unghia, in maniera autonoma o in seguito ad un'azione congiunta.

Ultima considerazione, ma non per questo meno importante, il gruppo analizzato non è sufficientemente numeroso per poter identificare un andamento generale sull'accumulo di una stessa sostanza o per poter fare delle considerazioni statisticamente rilevanti.

5. Conclusioni

L'analisi condotta su matrici alternative quali le unghie può rivelarsi molto utile in tossicologia forense in quanto è in grado di fornire informazioni essenziali nei casi in cui le analisi devono essere eseguite su resti umani particolarmente decomposti e quindi in assenza di fluidi corporei e tessuti molli (matrici biologiche convenzionali), o informazioni complementari sull'assunzione di una o più sostanze a sostegno dei risultati trovati nelle matrici biologiche convenzionali. L'unghia, grazie alla regolare crescita e alla sua capacità di accumulare esogeni all'interno della matrice consente di raccogliere informazioni sui tempi e periodi di assunzione di una o più sostanze. Attualmente il meccanismo di accumulo del materiale esogeno nell'organo ungueale non è completamente compreso e ulteriori studi volti in questa direzione devono essere intrapresi per meglio definire questo processo. Sono già in corso nuovi accertamenti, alcuni dei quali utilizzano in combinazione le tecniche già descritte in questa tesi e la tecnica dell'immunoistochimica⁴⁵ volte ad indagare in questa direzione. In questa tesi di dottorato si è dimostrato che da un singolo metodo estrattivo si riescono ad ottenere contemporaneamente informazioni su più sostanze assunte da una persona, anche sottoponendo il campione a doppia estrazione, come sperimentato per la ricerca di THC e dei suoi metaboliti. Questo è un importante aspetto che va considerato perché in questo modo si ha la possibilità di utilizzare una singola aliquota di campione per condurre differenti analisi, generiche e mirate, con la possibilità di conservare del materiale per analisi future o eventuali ripetizioni, e garantendo dei risultati anche quando il campione è presente in scarse quantità. Dalle analisi condotte su materiale cadaverico, dove è stato possibile condurre un diretto

⁴⁵ Scendonì, R., Bury, E., Buratti, E., Frolidi, R., Cippitelli, M., Miètti, G., & Cingolani, M. (2022). Detection of Morphine and Opioids in Fingernails: Immunohistochemical Analysis and Confirmation with Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled with High-Resolution Mass Spectrometry. *Toxics*, 10(8), 420.

confronto tra unghie e materiale pilifero, si può chiaramente dichiarare che l'accumulo di esogeni avviene in maniera molto più ridotta nelle unghie rispetto che nei capelli. Questo probabilmente dipende dalle differenze di composizione dell'unghia e del capello, dai meccanismi di formazione delle strutture cheratiniche, e dai fattori esterni, ad azione chimica e meccanica, che possono agire in maniera più importante sulle unghie. È possibile che ci sia una contaminazione esterna in alcuni casi importante, che possa determinare un minore accumulo delle sostanze nella matrice.

In futuro, maggiori sostanze dovrebbero essere analizzate e ricercate per poter avere un vasto spettro delle sostanze rilevabili dalle unghie, per ampliarne le applicazioni, anche in ambito di monitoraggio lavorativo ad esempio. La ricerca andrebbe estesa anche alle nuove sostanze psicoattive (NPS) che si stanno diffondendo tra la popolazione a ritmi sempre crescenti, suscitando sempre più interesse nella comunità scientifica. Inoltre è opportuno avanzare delle ricerche sulla valutazione della distribuzione degli esogeni nell'unghia con un gruppo di campioni più ampio di quello presentato in questo progetto di tesi e con una conoscenza molto precisa delle modalità di assunzione delle sostanze monitorate, il tempo che trascorre tra un'assunzione e l'altra, e costanza nelle date dei prelievi. In questo modo sarà possibile dissipare la nebbia su alcune delle tematiche che oggi non sono completamente chiare e rendere questa matrice ancora più utile ai fini della tossicologia forense.

6. Riferimenti bibliografici

- Allouche, M., Hhamdoum, M., Mangin, P., & Castella, V. (2008). Genetic identification of decomposed cadavers using nails as DNA source. *Forensic Sci Int Genet*, 3(1), 46-9.
- Baumgartner, M. R. (2014). Nails: an adequate alternative matrix in forensic toxicology for drug analysis? *Bioanalysis*, 6(17), 2189-91.
- Blakely, M. A., Hudgens, E. E., Schmitt, M. T., Calderon, R. L., & Thomas, D. J. (2006). Total arsenic concentrations in toenails quantified by two techniques provide a useful biomarker of chronic arsenic exposure in drinking water. *Environ Res*, 101(2), 213-220.
- Busardò, F. P., Gottardi, M., Pacifici, R., Vari, M. R., Tini, A., Volpe, A. R., . . . Pichini, S. (2019). Nails Analysis for Drugs Used in the Context of Chemsex: A Pilot Study. *Journal of Analytical Toxicology*, 44, 69-74.
- Cingolani, M., Scavella, S., Mencarelli, R., Mirtella, D., Froidi, R., & Rodriguez, D. (2004). Simultaneous detection and quantitation of morphine, 6-acetylmorphine, and cocaine in toenails: comparison with hair analysis. *J Anal Toxicol*, 28(2), 128-31.
- Daniel, C. R., Piraccini, B. M., & Tosti, A. (2004). The nail and hair in forensic science. *J Am Acad Dermatol* 50(2), 258-261.
- Drummer, O. H. (2004). Postmortem toxicology of drugs of abuse. *Forensic Science International*, 142, 101-113.
- Drummer, O. H. (2007). Post-mortem toxicology. *Forensic Science International*, Volume 165, Issues 2-3, 199-203.
- Fernández-Rodríguez, A., Iturralde, M. J., Fernández de Simón, L., Capilla, J., & Sancho, M. (2003). Genetic analysis of fingernail debris: applications to forensic casework. *International Congress Series 1239*, 921 – 924.
- Froidi, R. (2011). *Lezioni di tossicologia forense*. Torino: G. Ciappichelli Editore.
- GTFI. (2022). *Linee guida per la determinazione di sostanze stupefacenti e psicotrope su campioni biologici con finalità tossicologico-forensi e medico-legali*.
- Haneke, E. (2014). Anatomie, Biologie, Physiologie und Grundzüge der Pathologie des Nagelorgans. *Hautarzt* 65, 282-290.
- Harkey, M. R. (1992 vol 63). Anatomy and physiology of hair. *Forensic Science International*, 9-18.
- Herpin, F., & Boué, V. (2022). Efficacia degli integratori alimentari a scopo dermatocosmetico. *EMC - Cosmetologia Medica e Medicina degli Inestetismi Cutanei Vol19-(1)*, 1-13.
- Hill, V. A., Stowe, N. G., Paulsen, R. B., & Schaffer, M. (2018). Nail Analysis for Drugs: A Role in Workplace Testing? *J Anal Toxicol*, 42(6), 425-436.

- Kronstrand, R., Forsman, M., & Roman, M. (2013). A screening method for 30 drugs in hair using ultrahigh-performance liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Ther Drug Monit*, *35*(3), 288-95.
- Kronstrand, R., Nyström, I., Strandberg, J., & Druid, H. (2004). Screening for drugs of abuse in hair with ion spray LC-MS-MS. *Forensic Sci Int*, *145*(2-3), 183-190.
- Krumbiegel, F., Hastedt, M., Westendorf, L., Niebel, A., Methling, M., Parr, M. K., & Tsokos, M. (2016). The use of nails as an alternative matrix for the long-term detection of previous drug intake: validation of sensitive UHPLC-MS/MS methods for the quantification of 76 substances and comparison of analytical results for drugs in nail and hair samples. *Forensic Sci Med Pathol*, *2*(4):416-434.
- Lemos, N. P., Anderson, R. A., & Robertson, J. R. (1999). Nail analysis for Drug of Abuse: <extraction and Determination of Cannabis in Fingernails by RIA and GC-MS. *Journal of Analytical Toxicology*, vol 23, 147-152.
- Mandal, B. K., Ogar, Y., & Suzuki, K. T. (2003). Speciation of arsenic in human nail and hair from arsenic-affected area by HPLC-inductively coupled argon plasma mass spectrometry. *Toxicol Appl Pharmacol*, *189*(2), 73-83.
- Min, J. Z., Hatanaka, S., Yu, H.-F., Higashi, T., Inagaki, S., & Toyo'oka, T. (2011). Determination of DL-amino acids, derivatized with R(-)-4-(3-isothiocyanatopyrrolidin-1-yl)-7-(N,N-dimethylaminosulfonyl)-2,1,3-benzoxadiazole, in nail of diabetic patients by UPLC-ESI-TOF-MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* *879*(29), 3220-3228.
- Moffat, A. C., Osselton, D. M., & Widdop, B. (2011). *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. London: Pharmaceutical Press.
- Morgan, A. M., Baran, R., & Haneke, E. (2001). *Anatomy of the nail unit in relation to the distal digit*. In: *Nailsurgery: a text and atlas*. Philadelphia: LippincottWilliams &Wilkins.
- Nakanishi, H., Moriya, F., & Hashimoto, Y. (2003). Effects of environmental conditions to which nails are exposed on DNA analysis of them. *Leg Med (Tokyo)*, *5*(1), 194-7.
- Ohno, T., Sakamoto, M., Kurosawa, T., Dakeishi, M., Iwata, T., & Murata, K. (2006). Total mercury levels in hair, toenail, and urine among women free from occupational exposure and their relations to renal tubular function. *Environ Res*, *103*(2), 191-197.
- Ottaviani, G., Cameriere, R., Cippitelli, M., Frolidi, R., Tassoni, G., Zampi, M., & Mariano, M. (2017). Determination of Drugs of Abuse in a Single Sample of Human Teeth by a Gas Chromatography–Mass Spectrometry Method. *Journal of Analytical Toxicology*, *41*, 32–36.
- Reddy, K., & Lowenstein, E. J. (2011). Forensics in dermatology: part I. *J Am Acad Dermatol*, *64*(5), 801-808.
- Richardson, T. (2000). Pitfalls in forensic toxicology. *Ann Clin Biochem* *37* (Pt 1), 20-44.
- Ryder, M. L. (1958). *The Biology of Hair Growth*. New York: Academic Press.
- Scendoni, R., Bury, E., Buratti, E., Frolidi, R., Cippitelli, M., Mietti, G., & Cingolani, M. (2022). Detection of Morphine and Opioids in Fingernails: Immunohistochemical Analysis and Confirmation with Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled with High-Resolution Mass Spectrometry. *Toxics*, *10*(8), 420.

Tassoni, G., Cippitelli, M., Ottaviani, G., Froldi, R., & Cingolani, M. (2016). Detection of Cannabinoids by ELISA and GC-MS Methods in a Hair Sample Previously Used to Detect Other Drugs of Abuse. *J Anal Toxicol*, 40(6), 408-413.

Tosti, A., Piraccini, B. M., & Peluso, A. M. (1996). *LE UNGHIE guida pratica alle più comuni affezioni*. Bologna: Editrice Delle Rose s.a.s.

Tzatzarakis, M. N., Vakonaki, E., Kovatsi, L., Belivanis, S., Mantsi, M., Alegakis, A., . . . Tsatsakis, A. M. (2015). Determination of buprenorphine, norbuprenorphine and naloxone in fingernail clippings and urine of patients under opioid substitution therapy. *J Anal Toxicol* 39(4), 313-20.

Valkovic, V. (1989). *Human Hair: Fundamentals and Methods for Measurement of Elemental Composition, Vol. I*. Boca Raton: CRC Press.