UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Molecolare e Applicata

ALCOL ETILICO IN SANGUE CADAVERICO CENTRALE E PERIFERICO

ETHYL ALCOHOL IN CENTRAL AND PERIPHERAL CADAVERIC BLOOD

Tesi di Laurea Magistrale di:

Giulia Ricchezze

Relatore:

Chiar.ma Prof.ssa

Elisabetta Damiani

Sessione estiva

Anno Accademico 2022/2023

INDICE

1. INTRODUZIONE 4

1.1 *Risvolti sanitari, sociali ed economici del consumo di alcol etilico* 4

1.2 *Alcol etilico* 9

1.2.1 *Cos'è?* 9

1.2.2 *Metabolismo* 12

1.2.3 *Tecniche di analisi e matrici* 17

1.3 *Post-mortem* 19

1.4 *Legislazione* 20

2. OBIETTIVI DELLA TESI 22

3. MATERIALI E METODI 24

3.1 Reagenti 24

3.2 Preparazione dei calibratori, degli standard analitici e dei campioni 24

3.3 Analisi in HS-GC-FID 26

3.4 Quantificazione 27

3.5 Validazione del metodo 27

3.5.1 Modello di calibrazione e limiti 27

3.5.2 Bias, precisione e studi d'interferenza 28

4. RISULTATI E DISCUSSIONI 30

4.1 *Validazione del metodo* 30

4.1.1 *Modello di calibrazione e limiti* 30

4.1.2 *Bias, precisione e studi d'interferenza* 31

4.1.3 *Prova di applicabilità* 32

4.2 Campioni di sangue cadaverico 32

5. CONCLUSIONI 40

6. BIBLIOGRAFIA 42

1. INTRODUZIONE

1.1 Risvolti sanitari, sociali ed economici del consumo di alcol etilico

L'alcol etilico (o etanolo) è la sostanza psicoattiva più comunemente utilizzata al mondo. Il suo consumo è un importante problema di salute pubblica: si sta osservando un aumento significativo non solo delle patologie alcol correlate, ma anche di gravi eventi, quali comportamenti violenti, incidenti stradali, suicidi e omicidi, che sono una conseguenza diretta dell'assunzione di alcol. A tal proposito, si stima che a livello globale il consumo di alcol causi circa tre milioni di morti ogni anno e che sia responsabile del 5.1% del carico globale di malattie. Secondo i dati raccolti dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (World Health Organization, WHO) l'Europa ha la più alta percentuale di bevitori e il più alto consumo di alcol nel mondo. In questa regione nel 2016 si è registrato che il 59.9% della popolazione con più di 15 anni abbia consumato bevande alcoliche almeno una volta nel corso dell'anno (WHO, 2018). Nello stesso anno, il 5.5% di tutti i decessi nei 30 Paesi dell'Unione Europea è stato causato dall'alcol etilico: si tratta di 291100 persone morte. La principale causa di morte dovuta all'alcol è stata il cancro (29% dei decessi attribuibili all'alcol), seguito da cirrosi epatica (20%), malattie cardiovascolari (19%), incidenti stradali e atti di autolesionismo e violenza interpersonale (18%) (WHO, 2018). Per questo motivo l'alcol viene classificato in Europa come terzo fattore di rischio di malattia e morte prematura dopo il fumo e l'ipertensione arteriosa (Scafato E et al. 2022). Da tempo la Comunità Scientifica Internazionale ha dimostrato ampiamente che sia il consumo regolare e continuativo di alcol che quello occasionale, ma in quantità eccessive (binge drinking), non solo possono causare problemi di salute o

aggravare quelli già esistenti, ma possono provocare danni particolarmente rilevanti anche a livello sociale. Inoltre, l'uso continuativo di alcol in quantità eccessive produce effetti simili a quelli di altre sostanze psicotrope illegali, con induzione di dipendenza fisica e psichica, assuefazione, craving, compulsività ed altri disturbi del comportamento. Come già riportato, il consumo dannoso di alcol è la causa principale di molte malattie considerate totalmente alcol correlate, fra cui, in particolare, la cirrosi epatica alcolica, ma è anche causa concomitante di varie altre patologie vascolari, gastroenteriche, neuropsichiatriche, immunologiche, tumorali, di infertilità e di problemi prenatali (Ministro della Salute, 2021). Un altro aspetto importante da considerare è che una percentuale relativamente alta di danni causati dal consumo di alcol si verifica in età giovanile: nei ragazzi di età compresa tra 20 e 24 anni una morte su quattro è causata dall'alcol. Nel 2020 in Italia il 49.4% dei ragazzi e il 44.4% delle ragazze di età compresa tra 11 e 25 anni ha consumato almeno una bevanda alcolica nel corso dell'anno (Scafato E et al. 2022).

Al problema del consumo di alcol etilico se ne collega irrimediabilmente un altro: la correlazione fra consumo di alcol e incidenti stradali. Il Comando Generale dell'Arma dei Carabinieri e il Servizio della Polizia Stradale del Ministero dell'Interno rilevano complessivamente circa un terzo degli incidenti stradali con lesioni. Da queste due fonti risulta che nel 2020 su un totale di 40310 incidenti con lesioni osservati sono stati 3692 quelli con almeno uno dei conducenti dei veicoli coinvolti in stato di ebbrezza. Dunque, il 9.2% degli incidenti rilevati da Carabinieri e Polizia Stradale è correlato all'alcol. Si tratta di un dato in aumento rispetto a quello rilevato nel 2019 (8.7%). Inoltre, dai

dati della Polizia Stradale che forniscono ulteriori dettagli sulla classe di età, sulla fascia oraria e sul tipo di veicolo coinvolto emerge che sono multati per guida in stato di ebbrezza soprattutto i giovani conducenti di autovetture tra i 25 e 32 anni, nella fascia oraria notturna, durante la quale è stato rilevato circa il 70% delle sanzioni (Ministro della Salute, 2021).

Un altro ambito fortemente interessato dal consumo di alcol etilico è quello lavorativo. In questo contesto, infatti, il consumo di etanolo è associato ad un aumentato rischio di infortuni, che, secondo i dati dell'Organizzazione Mondiale della Sanità e del National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism, varia dal 10 al 30% del totale, ad un incremento del numero di assenze dal lavoro, che è 3-4 volte superiore rispetto agli altri lavoratori, ad una maggiore precarietà (l'alcolismo è causa del 40% dei cambiamenti dei posti di lavoro) con una conseguente aumentata possibilità di licenziamento, alla possibile interazione e/o potenziamento degli effetti di altri tossici presenti nel ciclo produttivo, alla riduzione progressiva della capacità lavorativa (Riboldi L et al. 2008).

Nella Tabella 1 vengono riportati i principali sintomi correlati al consumo di diverse concentrazioni di alcol etilico.

Tabella 1. *Tabella descrittiva dei principali sintomi correlati ai diversi livelli di concentrazione alcolemica (Art. 6 del decreto-legge 3 agosto 2007 n. 117 convertito in legge, con modificazioni, dall'art. 1, della legge 2 ottobre 2007, n. 160).*

Concentrazione di alcol nel sangue (g/L)	**Sensazioni più frequenti (*)**	**Effetti progressivi e abilità compromesse (*)**
0 g/L	Nessuna	Nessuna
0.1 - 0.2 g/L	Iniziale sensazione di ebbrezza Iniziale riduzione delle inibizioni e del controllo	Affievolimento della vigilanza, attenzione e controllo Iniziale riduzione del coordinamento motorio Iniziale riduzione della visione laterale Nausea
0.3 - 0.4 g/L	Sensazione di ebbrezza. Riduzione delle inibizioni, del controllo e della percezione del rischio	Riduzione delle capacità di vigilanza, attenzione e controllo Riduzione del coordinamento motorio e dei riflessi Riduzione della visione laterale Vomito
0.5 g/L: LIMITE LEGALE DEL TASSO ALCOLEMICO PER LA GUIDA		
0.5 - 0.8 g/L	Cambiamenti dell'umore Nausea, sonnolenza Stato di	Riduzione della capacità di giudizio Riduzione della capacità di individuare oggetti in movimento e della visione

	eccitazione emotiva	laterale Riflessi alterati Alterazione delle capacità di reazione agli stimoli sonori e luminosi Vomito
0.9 - 1.5 g/L	Alterazione dell'umore Rabbia Tristezza Confusione mentale, disorientamento	Compromissione della capacità di giudizio e di autocontrollo Comportamenti socialmente inadeguati Linguaggio mal articolato Alterazione dell'equilibrio Compromissione della visione, della percezione di forme, colori, dimensioni Vomito
1.6 - 3.0 g/L	Stordimento Aggressività Stato depressivo Apatia Letargia	Compromissione grave dello stato psicofisico Comportamenti aggressivi e violenti Difficoltà marcata a stare in piedi o camminare Stato di inerzia generale Ipotermia Vomito

3.1 - 4.0 g/L	Stato di incoscienza	Allucinazioni Cessazione dei riflessi Incontinenza Vomito Coma con possibilità di morte per soffocamento da vomito

(*) A parità di quantità di alcol assunto, sensazioni ed effetti sono estremamente variabili da soggetto a soggetto, con possibilità di manifestazioni anche opposte tra di loro; in tabella sono riportati sensazioni ed effetti più frequentemente rilevati.

1.2 Alcol etilico

1.2.1 Cos'è?

L'alcol etilico, la cui formula chimica è CH_3CH_2OH, è una piccola molecola (MW = 46.07 g/mol) solubile in acqua (Baselt RC, 2020). A temperatura ambiente è un composto liquido e incolore, volatile ed estremamente infiammabile. È presente in molte bevande in percentuali variabili e ha un valore calorico di circa 7 kcal/g. Tuttavia, a differenza, ad esempio, dei carboidrati che possono essere immagazzinati e utilizzati nei momenti di necessità, l'alcol non viene immagazzinato e rimane nei distretti corporei più ricchi d'acqua fino alla sua completa eliminazione (Savini F et al. 2020, Kelly AT et al. 2012; Cederbaum A 2012). Inoltre, c'è pochissima regolazione ormonale a controllare il tasso di eliminazione dell'alcol a differenza di quanto accade, invece, per il metabolismo dei principali nutrienti (insulina, glucagone, leptina).

Gli esperimenti condotti da Widmark nel 1932 (Widmark E 1932) hanno mostrato che la BAC (Blood Alcohol Concentration) cresce abbastanza rapidamente nella fase di assorbimento nell'intestino e raggiunge un massimo 30-60 minuti dopo l'assunzione (Fig. 1). Raggiunta la fase post-assorbimento, la BAC diminuisce con un tasso più o meno costante nell'unità di tempo, il che ha portato a pensare per lungo tempo che l'eliminazione seguisse una cinetica di ordine zero e, cioè, che l'alcol venisse eliminato dal corpo ad un tasso costante, indipendentemente dalla sua concentrazione. In realtà, la cinetica è di ordine zero se la quantità di alcol etilico ingerita è superiore a 0.2 g/L, concentrazione alla quale gli enzimi epatici sono saturati con il substrato. A concentrazioni inferiori, invece, il tasso di eliminazione diminuisce (Moffat AC et al. 2011) e, di conseguenza, si considera generalmente che l'etanolo è metabolizzato da cinetiche di saturazione piuttosto che da cinetiche di ordine zero. Dunque, tutta la porzione post-assorbimento della curva è meglio descritta dall'equazione di Michaelis-Menten (Moffat AC et al. 2011; Cederbaum A 2012).

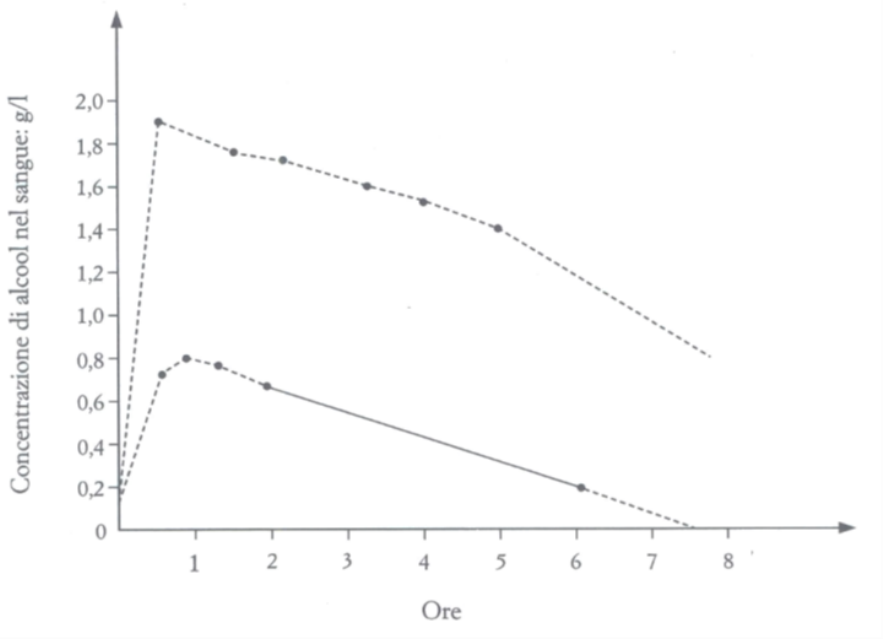

Figura 1. *Curva alcolemica di due soggetti che hanno assunto quantità diverse di alcol etilico (Froldi, Lezioni di Tossicologia)*

Dopo l'ingestione di una singola dose di etanolo, dunque, il tempo necessario al completamento dei processi di assorbimento va dalle 2 alle 6 ore, a seconda di diversi fattori, come la quantità assunta, la presenza di cibo o di altri liquidi nel sistema gastrointestinale, la funzionalità epatica e la variabilità biologica. Circa il 2-8% dell'etanolo ingerito viene eliminato attraverso le urine, il sudore o il respiro, mentre il restante 92-98% viene metabolizzato nel fegato da differenti sistemi enzimatici (Savini F et al. 2020). Da questi dati emerge chiaramente il carico importante che grava sul fegato per ossidare tutto l'alcol ingerito in modo da rimuoverlo dal corpo.

1.2.2 Metabolismo

Il 10-20% circa dell'alcol ingerito viene assorbito dallo stomaco (Kelly AT et al. 2012; Perry PJ et al. 2017) e passa al sangue per diffusione passiva secondo gradiente di concentrazione. La restante parte viene assorbita principalmente nella porzione prossimale dell'intestino tenue e si riversa nel circolo sanguigno (Kelly AT et al. 2012, Perry PJ et al. 2017), da dove, attraverso la vena porta, arriva al fegato (Zakhari S 2006). Da quest'organo, attraverso la vena epatica, raggiunge il cuore e viene distribuito in tutti i fluidi corporei e nei tessuti (Moffat AC et al. 2011). L'alcol etilico riesce, infatti, ad attraversare facilmente le membrane biologiche e, una volta penetrato nella circolazione sistemica, si distribuisce nei distretti corporei in base al loro contenuto d'acqua. A differenza di altre sostanze non si lega alle proteine plasmatiche (Moffat AC et al. 2011).

Per quanto riguarda la velocità di assorbimento, l'etanolo viene assorbito più lentamente nello stomaco e più velocemente nell'intestino tenue (Cederbaum A 2012): la superficie di assorbimento dello stomaco è inferiore rispetto a quella del digiuno e del duodeno, le cui cellule epiteliali sono ricoperte di microvilli (Moffat AC et al. 2011). Ne consegue che la velocità dello svuotamento gastrico è un importante determinante della velocità di assorbimento (Cederbaum A 2012; Perry PJ et al. 2017): la presenza di cibo nello stomaco ne ritarda lo svuotamento e, di conseguenza, ritarda anche l'assorbimento dell'alcol.

La fase successiva all'assorbimento è quella dell'eliminazione, che avviene principalmente nel fegato (Kelly AT et al. 2012). Diversi sono i fattori che ne possono modificare il tasso: il sesso, l'età, l'esercizio fisico e, di nuovo,

la presenza di cibo nello stomaco. Infatti, il metabolismo dell'alcol è maggiore "a stomaco pieno" piuttosto che a digiuno perché i livelli di enzimi epatici sono maggiori e la capacità dei meccanismi di shuttle del substrato di trasportare gli equivalenti riducenti nei mitocondri è elevata. Inoltre, il cibo può anche aumentare il flusso sanguigno al fegato (Cederbaum A 2012).

Il metabolismo dell'etanolo può essere di tipo ossidativo e non ossidativo. Il primo, a cui va incontro il 95% dell'alcol ingerito, si verifica principalmente nel tessuto epatico, dove sono presenti l'alcol deidrogenasi (ADH), che è l'enzima principale, il citocromo P450 e la catalasi. Tutti questi enzimi producono acetaldeide (Wilson DF et al. 2020; Zakhari S 2006).

Il primo step del metabolismo epatico è catalizzato dall'alcol deidrogenasi, enzima presente nel citoplasma o nella frazione solubile degli epatociti (Moffat AC et al. 2011). Per questa prima reazione è necessario anche il NAD^+ per accettare gli equivalenti riducenti dell'alcol, cioè atomi di idrogeno ed elettroni. L'alcol viene ossidato, dunque, ad acetaldeide, mentre il NAD^+ viene ridotto a $NADH + H^+$. Questa reazione è reversibile.

$$\text{Etanolo} + NAD^+ \underset{}{\overset{ADH}{\rightleftharpoons}} \text{Acetaldeide} + NADH + H^+$$

Per mantenere efficienti i tassi di ossidazione dell'alcol da parte dell'ADH è importante rigenerare il NAD^+ dal NADH prodotto dalla reazione. Il sistema principale per riossidare il NADH è il sistema di trasferimento degli elettroni mitocondriale (Cederbaum A 2012). Dal momento che il NADH non può oltrepassare la membrana mitocondriale, gli equivalenti riducenti sono trasportati all'interno dei mitocondri dallo shuttle malato-aspartato (Crabb DW et al. 1987). Una volta nei mitocondri, il sistema di trasporto degli elettroni

determina il trasferimento degli elettroni all'ossigeno molecolare (O_2), che poi lega i protoni (H^+) per generare acqua (H_2O). Per avere ossigeno sufficiente ad accettare gli elettroni gli epatociti devono prendere più ossigeno del solito dal sangue (Zakhari S 2006). Un'altra conseguenza diretta dell'ossidazione dell'alcol è che questa genera un ambiente citosolico altamente ridotto nelle cellule epatiche. In altre parole, questa reazione lascia le cellule del fegato in uno stato particolarmente vulnerabile ai danni causati dai sottoprodotti del metabolismo dell'etanolo (Zakhari S 2006).

Il secondo step è catalizzato dell'enzima aldeide deidrogenasi (ALDH) che determina l'ossidazione dell'acetaldeide ad acetato, mentre il cofattore NAD^+ è ridotto a NADH. Questa reazione è irreversibile.

$$\text{Acetaldeide} + NAD^+ \xrightarrow{\text{ALDH}} \text{Acetato} + NADH + H^+$$

L'acetaldeide è chimicamente reattiva e può reagire in modo non enzimatico con altri componenti cellulari per formare prodotti che sono metabolicamente attivi e/o citotossici (Wilson DF et al. 2020), come le specie reattive all'ossigeno (ROS), e che possono anche modificare lo stato redox delle cellule epatiche (Zakhari S 2006). L'acetaldeide ha anche la capacità di legare le proteine, come enzimi, proteine microsomiali, e i microtubuli. La formazione di questi addotti proteici negli epatociti impedisce la secrezione proteica: si pensa che questo processo possa avere un ruolo nell'epatomegalia (Zakhari S 2006). L'acetaldeide, inoltre, forma degli addotti con il neurotrasmettitore dopamina per formare il salsolinolo, che potrebbe contribuire alla dipendenza da alcol, e con il DNA per formare prodotti carcinogeni, come l'1,N2-propanodeossiguanosina. Infine, un buon numero di effetti dell'etanolo sul

sistema nervoso centrale è mediato proprio dall'acetaldeide (Cederbaum A 2012).

$$\text{Acetato} + \text{CoASH} + \text{ATP} \xrightarrow[\text{SINTASI}]{\text{ACETILCOA}} \text{AcetilCoA} + \text{AMP} + \text{pirofosfato}$$

La maggior parte dell'acetato prodotto lascia il fegato e, tramite il sangue venoso, raggiunge i tessuti periferici dove è convertito in AcetilCoA dall'Acetil CoA sintasi (Wilson DF et al. 2020; Moffat AC et al. 2011). L'AcetilCoA è il metabolita chiave prodotto da tutti i nutrienti principali (Cederbaum A 2012) e nei mitocondri entra essenzialmente nel ciclo dell'acido citrico e viene ossidato, ma a livello cellulare viene anche usato per acetilare le proteine, alterando l'attività dei singoli enzimi (Wilson DF et al. 2020) e, attraverso l'acetilazione degli istoni, l'espressione genica (Mews P et al. 2019).

La restante parte dell'acetato prodotto è ossidato a diossido di carbonio (CO_2) nelle cellule cardiache, muscolari scheletriche e cerebrali. L'acetato non è un prodotto inerte: aumenta il flusso sanguigno, deprime il sistema nervoso centrale e colpisce svariati processi metabolici (Zakhari S 2006).

$$\text{Etanolo} + O_2 + \text{NADPH} \xrightarrow{\text{CYP2E1}} \text{NADP}^+ + \text{Acetaldeide} + \text{Acetato}$$

Un altro importante enzima, localizzato nella frazione microsomiale degli epatociti, appartiene alla famiglia del citocromo P450: è il CYP2E1. La K_m o costante di Michaelis-Menten indica quantitativamente l'affinità tra un enzima e il suo substrato. Quella del CYP2E1 per l'ossidazione dell'etanolo è dieci volte più alta di quella dell'ADH. A basse concentrazioni il CYP2E1 può rappresentare circa il 10% della capacità totale di ossidazione dell'alcol del

fegato. Tuttavia, proprio a causa della sua alta K_m, la sua rilevanza nell'ossidazione aumenta all'aumentare delle concentrazioni nel sangue (Cederbaum A 2012). Questo lo rende più importante nell'eliminare l'etanolo dal sangue dopo un periodo di intenso bere. Un'altra importante caratteristica del CYP2E1 è il fenomeno dell'induzione enzimatica, che è la proprietà di metabolizzare il substrato più efficientemente dopo una continua esposizione (Moffat AC et al. 2011). Dunque, CYP2E1 potrebbe svolgere un ruolo importante nel metabolismo dell'alcol dopo il consumo cronico di etanolo, cioè negli alcolisti (Cederbaum A 2012).

$$\text{Etanolo} + H_2O_2 \xrightarrow{\text{CATALASI}} \text{Acetaldeide} + 2H_2O$$

La catalasi si trova nei perossisomi (Cederbaum A 2012). Quest'enzima può ossidare l'etanolo ad acetaldeide in presenza di perossido d'idrogeno.

Tuttavia, dal momento che la sua attività è limitata *in vivo* proprio dalla disponibilità del perossido d'idrogeno, probabilmente non svolge un ruolo significativo nel metabolismo dell'etanolo (Crabb DW et al. 1987; Zakhari S 2006).

Una piccola parte di etanolo (< 0.1%) (Fig. 2) viene rimossa tramite il metabolismo non ossidativo che coinvolge reazioni di coniugazione epatica per produrre etilglucuronide ed etilsolfato. Questi metaboliti sono solubili in acqua e vengono trasportati ai reni dai quali vengono escreti nelle urine. Altri metaboliti non ossidativi includono gli esteri etilici degli acidi grassi, che si formano per reazione dell'etanolo con acidi grassi a catena corta, e il fosfatidiletanolo, che si produce in una reazione enzimatica con certi fosfolipidi (Moffat AC et al. 2011).

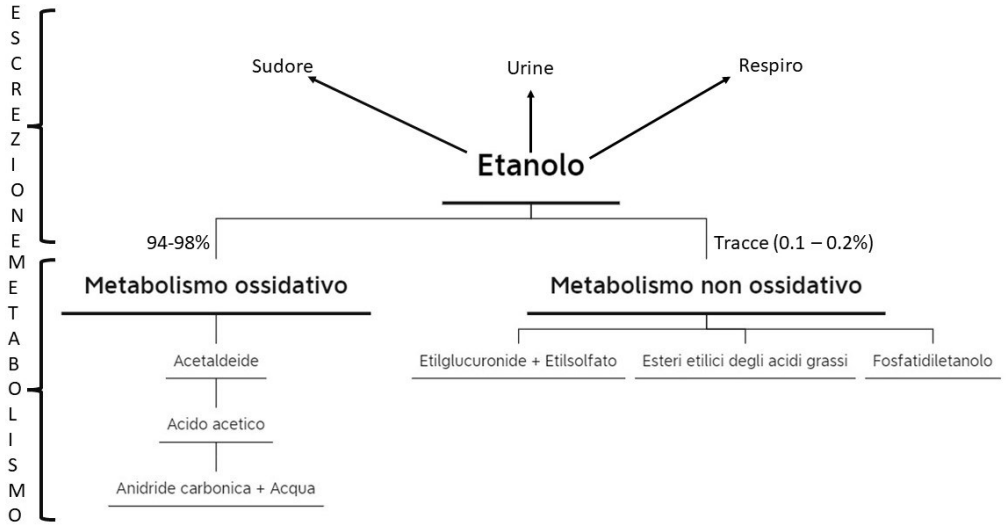

Figura 2. *Schema dell'escrezione e del metabolismo dell'etanolo (tradotto da Moffat AC et al. 2011)*

1.2.3 Tecniche di analisi e matrici

La ricerca dell'alcol etilico e dei suoi metaboliti può essere eseguita su diverse matrici (sangue, urine, capelli, saliva, umor vitreo, bile, fegato, milza), le più comuni delle quali sono sangue, urine, capelli e umor vitreo.

La tecnica più utilizzata per la determinazione dell'alcolemia, cioè della concentrazione ematica di etanolo, è sicuramente la gas cromatografia con rivelatore a ionizzazione di fiamma (GC-FID) che permette di separare diversi composti volatili, inclusi etanolo, metanolo, acetone e isopropanolo, e di determinarne la concentrazione. In particolare, si utilizza la tecnica dell'headspace (HS), o spazio di testa, che sfrutta il principio della legge di Henry: a una certa temperatura, la quantità di un volatile contenuto nell'aria sopra il campione è proporzionale alla concentrazione del volatile nel campione. Scaldando, dunque, il campione in una vial sigillata, i composti

volatili si separano dalle matrici e diffondono nello spazio di testa fino a che non viene raggiunto un equilibrio. Successivamente, una piccola quantità dello spazio di testa viene iniettato nel gascromatografo. Si tratta di un approccio sensibile, preciso e in grado di quantificare livelli di etanolo fino a 0.01 g/L (Kelly AT et al. 2012).

È necessario, però, precisare che non in tutte le matrici viene rilevato l'alcol etilico. Questo viene, infatti, individuato come tale nel sangue, nelle urine e nell'umor vitreo. In particolare, è stata ampiamente dimostrata la correlazione che c'è fra la concentrazione rilevata nel sangue e quella nell'umor vitreo (Savini F. et al. 2020). Tuttavia, esiste anche la possibilità di rilevare altri prodotti metabolici per determinare se un individuo ha consumato alcol in tempi recenti. Infatti, come già riportato, meno dello 0.1% dell'alcol etilico ingerito è coniugato con l'acido glucuronico nel corpo e forma l'etilglucuronide (EtG), che viene escreto nelle urine e che può essere rilevato anche nei capelli. Dal momento che i capelli sono una matrice di accumulo, la rilevazione dell'etilglucuronide costituisce un importante marcatore diretto del consumo di etanolo (Jones AW, 2010) e, pertanto, viene utilizzato per monitorare individui sottoposti a riabilitazione o cure mediche per l'alcolismo e nella medicina occupazionale (Fredrik C et al. 2006).

L'etilsolfato (EtS) è un altro metabolita dell'etanolo che si forma per coniugazione con il solfato in una reazione catalizzata dalla solfotransferasi.

EtG e EtS offrono un esteso periodo di tempo per lo svolgimento dell'analisi perché non vengono eliminati dal corpo tanto velocemente quanto l'etanolo. La rilevazione nelle urine è possibile da 24 ore fino a 5 giorni dopo l'ingestione di grandi e ripetute dosi di alcol etilico (Kelly AT et al. 2012).

1.3 POST-MORTEM

La tossicologia forense è la branca delle scienze medico legali che studia la correlazione fra la presenza di sostanze esogene e i danni alla salute dell'organismo esposto, tenendo in considerazione l'applicazione di specifici disposti di legge. In questo particolare ambito la determinazione della concentrazione dell'alcol etilico, soprattutto nel sangue, può essere determinante.

Di tutte le matrici che possono essere prelevate nel corso di autopsie giudiziarie quella considerata più importante è sicuramente il sangue. La ragione è semplice: le sostanze trovate nel sangue prelevato post-mortem sono quelle che stavano agendo al momento della morte. Questo implica che la determinazione dell'eventuale presenza di etanolo e la sua concentrazione forniscano importanti informazioni circa le cause della morte. Due sono, infatti, le tipologie di decessi imputabili al consumo di etanolo: decessi totalmente attribuibili all'alcol etilico e decessi alcol-correlati. All'interno della prima categoria ricade l'intossicazione acuta da etanolo, mentre nella seconda sono presenti più casistiche. Ad esempio, l'uso simultaneo di etanolo e di altre sostanze che agiscono sul cervello, come gli oppioidi e gli antidepressivi, può aumentare la tossicità dell'etanolo e viceversa. Altri effetti dell'alcol, come lo stato d'incoscienza, possono portare alla morte come conseguenza di soffocamento per asfissia posizionale. Ancora, le morti correlate al consumo di alcol possono essere il risultato di incidenti che avvengono proprio in conseguenza del consumo di alcol etilico, come il coinvolgimento in incidenti stradali o gli omicidi. L'associazione fra alcol e lesioni è conosciuta da molto

tempo: è, infatti, noto che l'intossicazione da alcol aumenta il rischio di tutti i tipi di trauma (Kelly AT et al. 2012).

1.4 LEGISLAZIONE

Come già riportato, la percentuale di incidenti stradali correlati al consumo di alcol etilico è elevata. La violazione degli Artt. 186 e 186bis del Codice della Strada, "*Guida sotto l'influenza dell'alcol*", comporta diverse pene a seconda della gravità. L'articolo 186 stabilisce che "*è vietato guidare in stato di ebbrezza in conseguenza dell'uso di bevande alcoliche*". Il tasso alcolemico massimo consentito per legge è di 0.5 g/L. La sanzione amministrativa è prevista nel caso in cui il tasso alcolemico sia compreso tra 0.5 g/L e 0.8 g/L. L'inizio di un procedimento penale, oltre alla sanzione amministrativa, è previsto nel caso in cui il tasso alcolemico rilevato sia compreso tra 0.8 g/L e 1.5 g/L e oltre 1.5 g/L. Con tasso alcolemico superiore a 1.5 g/L è sempre disposta la sospensione della patente fino all'esito della visita medica. Inoltre, è stato introdotto l'art. 186bis, che prevede sanzioni amministrative e revoca della patente nei casi di alcolemia compresa tra 0 e 0.5 g/L per i neopatentati (minori di 21 anni o con patente da meno di tre anni) e i conducenti di mezzi per il trasporto di cose o persone (Ministro della Salute, 2021).

Per quanto riguarda la legislazione in ambito lavorativo, la legge n. 125 del 30 marzo 2001, "*Legge quadro in materia di alcool e problemi alcool correlati*", in particolare all'art. 15, si propone di tutelare la salute del lavoratore vietando l'assunzione e la somministrazione di bevande alcoliche negli ambienti lavorativi. Successivamente, con provvedimento del 16 marzo 2006, è stato emanato un decreto attuativo che individua in modo dettagliato

quali siano le categorie di lavoratori a cui si riferisce la precedente norma. Tuttavia, la normativa non ha proposto un regolamento attuativo, rendendone, quindi, difficile la realizzazione pratica: ad esempio, non è stato fissato un limite di concentrazione ematica di alcol sul posto di lavoro e non è neppure stato stabilito lo stato di dipendenza da alcol per questi soggetti.

2. OBIETTIVI DELLA TESI

Il primo scopo di questo progetto di tesi è stato quello di validare un metodo che consentisse di rilevare la concentrazione di alcol etilico in piccoli volumi di sangue (100 µL). Lavorare con matrici cadaveriche presenta, infatti, diverse problematiche. Una delle principali è che non sempre tutte le matrici sono disponibili. Tuttavia, anche nel caso in cui lo siano, potrebbero non esserlo in quantità sufficienti allo svolgimento delle opportune analisi. Infatti, a causa del processo di decomposizione che si innesca subito dopo la morte e poiché alcune morti traumatiche comportano consistenti perdite di sangue, la tempestività nel ritrovare il cadavere e nell'eseguire l'autopsia può influenzare in modo significativo lo stato dei fluidi biologici. È, dunque, facile capire l'importanza di potersi affidare a dei metodi che permettano di svolgere delle analisi sensibili a partire da piccoli volumi di campione.

Una volta validato, questo metodo è stato utilizzato per raggiungere il secondo obiettivo del progetto di tesi: verificare se ci fossero delle differenze fra le concentrazioni di alcol rilevate nel sangue centrale e in quello periferico in modo da considerare se avvenisse il fenomeno della ridistribuzione. Non esistendo dei protocolli condivisi su quali siano le matrici da prelevare nel corso di un'autopsia e su quali siano i tipi di analisi da svolgere su ogni matrice, nel caso di un'alcolemia è importante sapere di quanto, eventualmente, si discostano i valori ottenuti dal sangue periferico e da quello centrale in modo da poterli interpretare in modo opportuno. Per anni è stato, infatti, dibattuto se il sangue centrale prelevato post-mortem potesse essere un campione adeguato alla determinazione dell'alcol etilico. Alcuni ricercatori hanno dato credito al concetto della "diffusione post-mortem" dell'etanolo. Secondo

questo modello, l'alcol etilico diffonde al di fuori dello stomaco e si riversa nelle camere cardiache nel periodo compreso fra la morte e la raccolta dei campioni. La principale e immediata conseguenza di questa diffusione sarebbe un aumento della concentrazione dell'alcol etilico nel sangue centrale, che diverrebbe, quindi, una matrice non affidabile per la determinazione dell'etanolo e per la sua interpretazione forense. Altri autori, invece, analizzando sistematicamente le concentrazioni di alcol etilico nel sangue centrale, in quello femorale e nel contenuto gastrico sono giunti alla conclusione che i loro dati non potessero supportare in alcun modo la diffusione post-mortem in quanto avevano riscontrato differenze relativamente piccole nelle concentrazioni dell'etanolo nel sangue centrale e in quello periferico (Prouty RW 1987).

3. MATERIALI E METODI

3.1 Reagenti

L'n-propanolo (standard interno), l'etanolo, l'acqua distillata, il cloruro di sodio (NaCl) sono stati acquistati da Carlo Erba (Italia). Gli standard acquosi di etanolo sono stati invece acquistati da ACQ SCIENCE (Germania).

3.2 Preparazione dei calibratori, degli standard analitici e dei campioni

Per preparare la soluzione dello standard interno, 0.3 g di n-propanolo sono stati aggiunti a 1 L di acqua distillata in modo da raggiungere una concentrazione di 0.3 g/L.

Le soluzioni acquose certificate usate per la preparazione dei calibratori e degli standard analitici erano 6 e avevano ognuna una diversa concentrazione di etanolo: 0.1 g/L, 0.2 g/L, 0.5 g/l, 0.8 g/L, 1.5 g/L e 3.0 g/L (Tabella 2). I calibratori e i campioni di standard analitico contenenti le varie concentrazione di etanolo sono stati preparati aggiungendo 100 µL delle soluzioni acquose certificate, 100 µL della soluzione di standard interno e 100 mg di NaCl in una vial di vetro da 2 mL.

Tabella 2. *Concentrazioni dei calibratori e degli standard analitici utilizzati.*

Calibratori	Concentrazione
CAL1	0.1 g/L
CAL2	0.2 g/L
CAL3	0.5 g/L
CAL4	0.8 g/L
CAL5	1.5 g/L
CAL6	3.0 g/L
Standard analitici	**Concentrazione**
QC_{Low}	0.1 g/L
QC_{Medium}	0.8 g/L
QC_{High}	3.0 g/L

Per lo studio sono stati utilizzati 42 campioni di sangue centrale e periferico prelevati, nel corso di autopsie giudiziarie, dai medici legali delle province di Ascoli Piceno, Fermo e Macerata che collaborano con l'Università degli studi di Macerata. Per tutti i campioni era stata avanzata la richiesta di un'analisi tossicologica. In particolare, il sangue centrale è sempre stato prelevato dal cuore, mentre quello periferico dalla vena femorale. In tutti i casi il tempo intercorso fra la morte e lo svolgimento dell'autopsia è stato inferiore alle 48 ore. Per la raccolta, il trasporto e la conservazione dei campioni di sangue, sono state utilizzate quando possibile, delle provette sottovuoto in modo da evitare l'evaporazione dell'alcol etilico eventualmente presente. I campioni, una volta arrivati in laboratorio, sono stati conservati a 4 °C fino allo svolgimento dell'analisi. Solitamente, la determinazione della concentrazione dell'alcol etilico nei campioni è stata eseguita entro 48 ore dal loro arrivo. Per

l'esecuzione dell'analisi, in una vial di vetro da 2 mL sono stati aggiunti 100 µL di sangue, 100 µL di standard interno e 100 mg di NaCl.

3.3 Analisi in HS-GC-FID

Le vials contenenti i calibratori, gli standard analitici e i campioni sono state chiuse con un tappo a vite e scaldate su una piastra riscaldante per 30 minuti a 60 °C. In questo modo i composti volatili sono passati alla fase gassosa. Con una siringa riscaldata è stato forato il setto delle vials, è stato prelevato 1 mL del gas presente nello spazio di testa ed è stato iniettato nel gas cromatografo. Nello specifico, è stato usato il Thermo Scientific Trace 1300 gas cromatografo con un rivelatore FID e una colonna Rtx-BAC1 (30 m x 0,53 mm x 3,00 µm), acquistata da Restek (Germania). La corsa cromatografica è stata impostata come descritto nella Tabella 3.

Tabella 3. *Rampa di temperature della corsa cromatografica.*

Rate (°C/min)	Temperatura (°C)	Hold time (min)
	60 °C	0,3 min
20 °C/min	90 °C	4 min
20 °C/min	120 °C	4 min

La temperatura impostata per l'iniettore era di 180 °C, mentre quella per il detector di 200 °C. Il gas di trasporto utilizzato è stato l'elio. I flussi di aria e idrogeno del FID sono stati impostati, rispettivamente, a 350 mL/min e 35 mL/min. Il tempo di ritenzione dell'etanolo è di, circa, 4 minuti.

3.4 Quantificazione

Al termine di ogni corsa cromatografica è stato calcolato il rapporto fra l'area del picco dell'alcol etilico e quello dello standard interno, ottenuti dal cromatogramma. La concentrazione di etanolo presente nel campione è stata calcolata inserendo il rapporto nell'equazione della curva di calibrazione.

3.5 Validazione del metodo

Il metodo è stato validato secondo gli standard dell'American Association of Forensic Science (ANSI/ASB 2019). I parametri valutati includevano la linearità del modello di calibrazione, i limiti di rilevazione e quantificazione, il bias, la precisione e gli studi d'interferenza.

3.5.1 Modello di calibrazione e limiti

Il modello di calibrazione è il modello matematico che descrive la correlazione fra la risposta dello strumento (in questo caso il rapporto dell'area del picco dell'analita e dello standard interno) e la concentrazione dell'analita nel campione. Prima di procedere è stato individuato l'intervallo di lavoro o clinicamente significativo, ovvero l'intervallo di concentrazioni che ci si aspetta di trovare nei campioni che vengono analizzati quotidianamente. Ciascuno dei sei calibratori è stato analizzato in 5 replicati e le linee di regressione sono state generate usando Microsoft Excel.

Il limite di rilevazione (LOD, limit of detection) è la più bassa concentrazione che lo strumento riesce a rilevare. Per riuscire a determinarlo tre matrici "bianche" sono state arricchite con l'analita a tre concentrazioni

scalari, partendo dalla concentrazione del calibratore più basso. Ciascuna concentrazione è stata analizzata per tre volte.

Il limite inferiore di quantificazione (LLOQ, lower limit of quantification) è il valore del calibratore più basso diverso da zero. Ad una matrice "bianca" è stata aggiunta una concentrazione di etanolo di 0.1 g/L. Triplicati di queste matrici fortificate sono state analizzati per 3 giorni per dimostrare che tutti i criteri di rilevazione, identificazione, bias e precisione venissero soddisfatti.

3.5.2 Bias, precisione e studi d'interferenza

L'esattezza rappresenta il grado di concordanza tra il valore medio ottenuto a partire da diverse determinazioni dello stesso analita e un valore di riferimento accettato. Questa viene espressa come bias, che è lo scostamento sistematico rispetto al valore vero. Per determinare il bias sono state utilizzate tre matrici "bianche" fortificate con tre diverse concentrazioni di etanolo (0.1 g/L, 0.8 g/L e 3.0 g/L). Le concentrazioni scelte per gli standard analitici sono state una bassa (QCLow), una media (QCMedium) e una alta (QCHigh) in modo da ricoprire l'intero intervallo di calibrazione del metodo. Per ogni concentrazione sono state realizzate cinque misurazioni replicate in tre differenti sedute analitiche.

La precisione è il grado di concordanza fra misurazioni indipendenti di concentrazione di un analita. Viene espressa come coefficiente di variazione (%CV). Sono stati condotti due diversi tipi di studi di precisione: uno eseguito nella stessa seduta analitica (within-run) e uno fra sedute analitiche diverse (between-run). Per determinarla sono state analizzate 10 misurazioni

indipendenti per ogni concentrazione. Sia la precisione within-run che quella between-run sono state calcolate usando l'approccio ANOVA ad una via.

Sono stati anche condotti degli studi d'interferenza sulla matrice, sullo standard interno e su altre sostanze volatili comunemente usate nel laboratorio. Per valutare l'interferenza dovuta alla matrice, 10 campioni di matrice "bianca", costituiti da campioni reali analizzati in precedenza e risultati negativi, sono stati analizzati con il metodo sviluppato, senza l'aggiunta dello standard interno. Per valutare, invece, l'interferenza dovuta ad altre sostanze volatili, sono stati analizzati altri 10 campioni di matrice "bianca", senza l'aggiunta dello standard, ma con l'aggiunta di una miscela di sostanze comunemente usate nel laboratorio, come metanolo, acetaldeide, acetone ed esano.

4. RISULTATI E DISCUSSIONI

4.1 Validazione del metodo

4.1.1 Modello di calibrazione e limiti

La linea di regressione, generata usando Microsoft Excel, aveva un valore di R^2 superiore a 0.99, senza evidenza di dispersione casuale per ogni punto di calibrazione dei 5 replicati (Fig. 3). Nella Tabella 4 sono riportati, invece, i parametri del modello di calibrazione, realizzato con i calibratori la cui preparazione è stata precedentemente descritta.

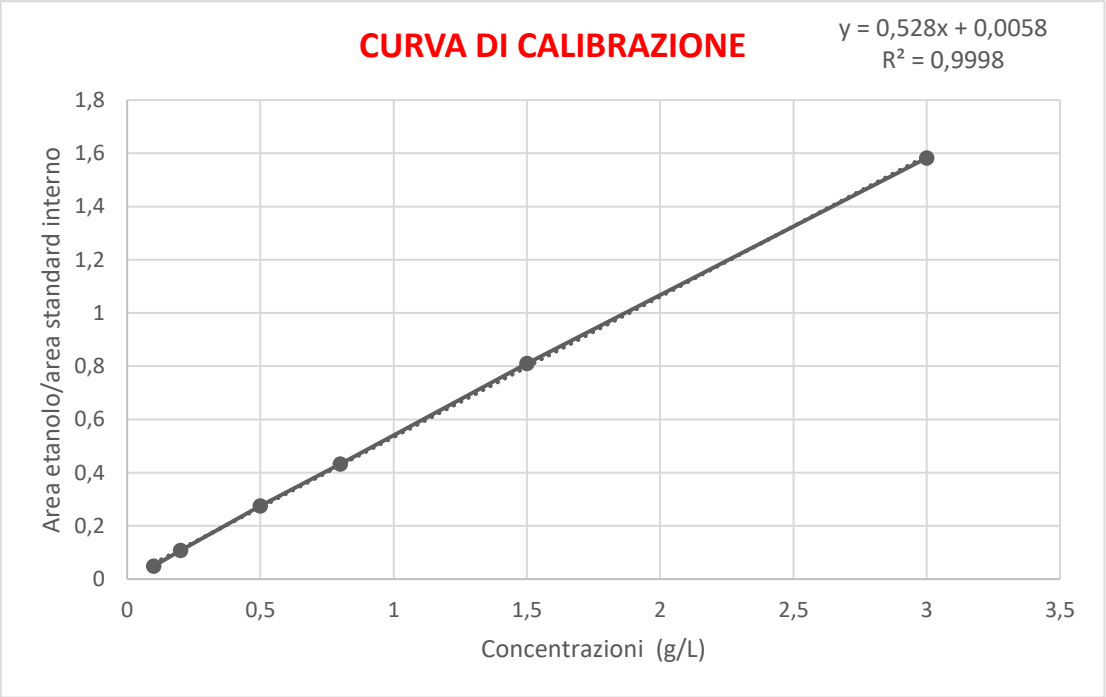

Figura 3. *Curva di calibrazione.*

Tabella 4. *Parametri del modello di calibrazione: s (deviazione standard) e R^2 (coefficiente di determinazione).*

Modello di calibrazione		
g/L	*s*	R^2
0.1	0.0431	0,999
0.2	0.0038	
0.5	0.0166	
0.8	0.0181	
1.5	0.0072	
3.0	0.0289	

Il LOD misurato è stato di 0.01 g/L, mentre il LLOQ era 0.1 g/L. Il bias e la precisione (%CV) per il LLOQ per l'etanolo sono considerate accettabili con valori in un range di ± 10%. I valori ottenuti per il bias e la precisione sono stati, rispettivamente, di -4.69% e 4.19%, come riportato nella Tabella 5. Sono, dunque, risultati pienamente accettabili.

Tabella 5. *Parametri del LLOQ.*

LLOQ		
g/L	% Bias	%CV
0.1	-4.69	4.19

4.1.2 Bias, precisione e studi d'interferenza

I criteri per un bias e una precisione accettabili sono stati fissati a ±10%. I valori ottenuti sono riportati nella Tabella 6.

Tabella 6. *Bias e %CV.*

Bias e %CV			
g/L	%Bias	%Within-run	%Between-run
0.1	-8.39	8.04	7.65
0.8	6.32	2.23	2.23
3.0	10.67	0.97	1.34

Dagli studi d'interferenza effettuati non sono state riscontrate interferenze legate al tempo di ritenzione dell'etanolo nelle matrici bianche o relative a nessuno dei composti comunemente usati in laboratorio.

4.1.3 Prova di applicabilità

Per eseguire la prova di applicabilità sono stati utilizzati 25 campioni di sangue provenienti da autopsie giudiziarie. I campioni sono stati sottoposti alla preparazione precedentemente descritta e sono stati iniettati nell'HS-GC-FID. Dei 25 campioni analizzati, 17 sono risultati negativi (sotto il LLOQ) e 8 positivi. La concentrazione massima di etanolo era di 3.0 g/L, la minima era di 0.51 g/L con una concentrazione media di 1.63 g/L.

4.2 Campioni di sangue cadaverico

Sono state analizzate 42 coppie di sangue centrale e periferico. I dati ottenuti e la causa di morte, quando disponibile, sono riportati nella Tabella 7. È emerso che le concentrazioni di etanolo riscontrate nel sangue centrale e in quello periferico sono simili e correlate ($r = 0.804$, $p = 0.342$).

Tabella 7. *Risultati ottenuti dall'analisi dei campioni di sangue cadaverico. I campioni seguono la codifica del laboratorio For. Med. Lab.*

Campione	Sangue centrale (g/L)	Sangue periferico (g/L)	Causa morte
5T/20	0	0	Morte da oppiacei
18T/20	0	0	Morte da oppiacei
6T/21	0	0	/
7T/21	0.2	0.5	Morte da metadone
9T/21	0	0	Morte da oppiacei
10T/21	0	0	Morte da oppiacei
24T/21	0	0	Annegamento
29T/21	0	0	Morte da oppiacei
31T/21	1.59	0	Incidente stradale
33T/21	0	0	/
1T/22	0	0	Monossido di carbonio
2T/22	0	0	Monossido di carbonio
3T/22	0	0	Morte da oppiacei
6T/22	0	0	Morte da oppiacei
8T/22	0.73	0	Insufficienza cardiaca
9T/22	0	0	/
11T/22	0	0	Morte da oppiacei
12T/22	0	0	Insufficienza respiratoria
13T/22	0	0	/
14T/22	4.29	4.33	Intossicazione da alcol etilico
15T/22	2.44	2.32	Incidente stradale
17T/22	1.93	2.17	Incidente stradale
19T/22	0	0	/
26T/22	0	0	/
27T/22	0.47	0	Morte da oppiacei
28T/22	1.85	0	Morte da oppiacei
35T/22	0	0.16	Omicidio (Accoltellamento)
36T/22	0.59	0.75	Intossicazione acuta da più sostanze
37T/22	3.21	1.43	/
38T/22	0	0	/
39T/22	0	0	/
42T/22	1.35	1.47	Monossido di carbonio
45T/22	0	0	/
1T/23	0	0	/
2T/23	0	0	/
3T/23	0	0.19	Incidente stradale
4T/23	2.13	2.29	/
5T/23	0.1	0	/
6T/23	0	0	Incidente stradale
7T/23	0	0	/
8T/23	0	0	Incidente stradale
9T/13	1.31	0	Incidente stradale

I valori più alti trovati sono stati 4.29 g/L nel sangue centrale e 4.33 g/L in quello periferico. Entrambi sono stati riscontrati nello stesso soggetto (14T/22).

La concentrazione media riscontrata nel sangue centrale è stata di 0.53 g/L, mentre quella del sangue periferico di 0.37 g/L.

Nella Figura 4 è riportato l'esempio di una corsa cromatografica positiva in cui sono ben evidenti i picchi dell'etanolo e dello standard interno.

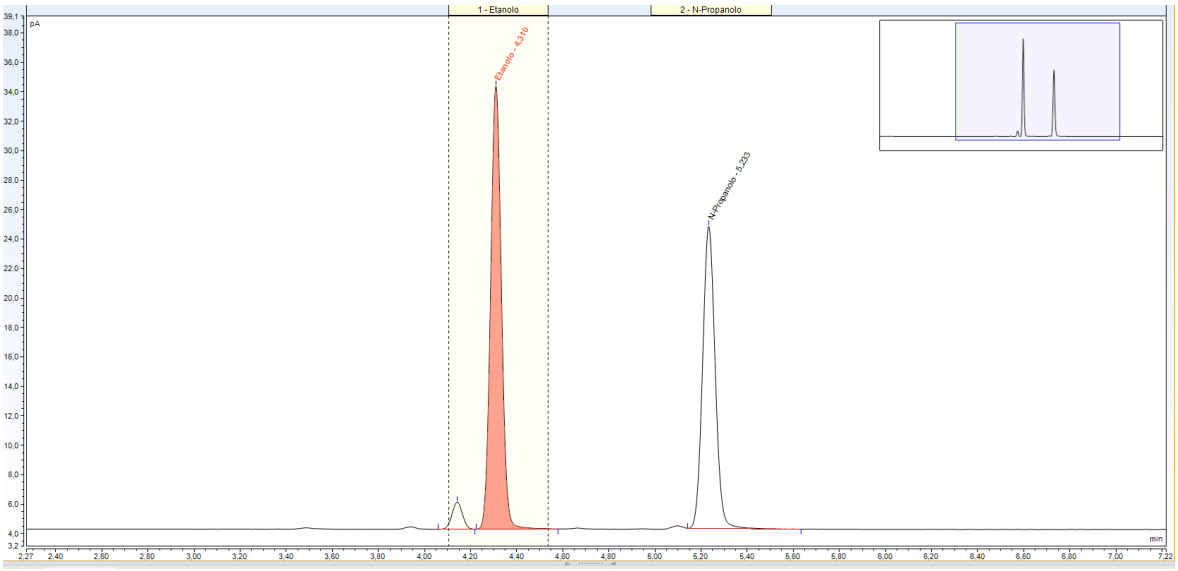

Figura 4. *Esempio di una corsa cromatografica positiva.*

Per quanto riguarda il sangue centrale, sono stati riscontrati 28 campioni negativi, cioè con una concentrazione di etanolo inferiore al LLOQ (0.1 g/L), e 14 positivi (Fig. 5). La distribuzione dei positivi nelle fasce alcolemiche è riportata nella Figura 6.

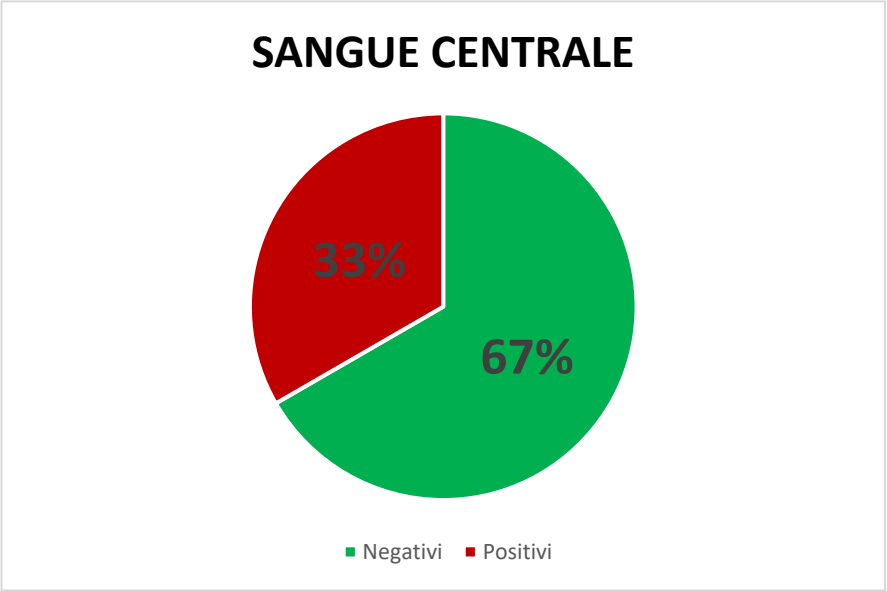

Figura 5. *Percentuali dei positivi e dei negativi riscontrati nei campioni di sangue centrale.*

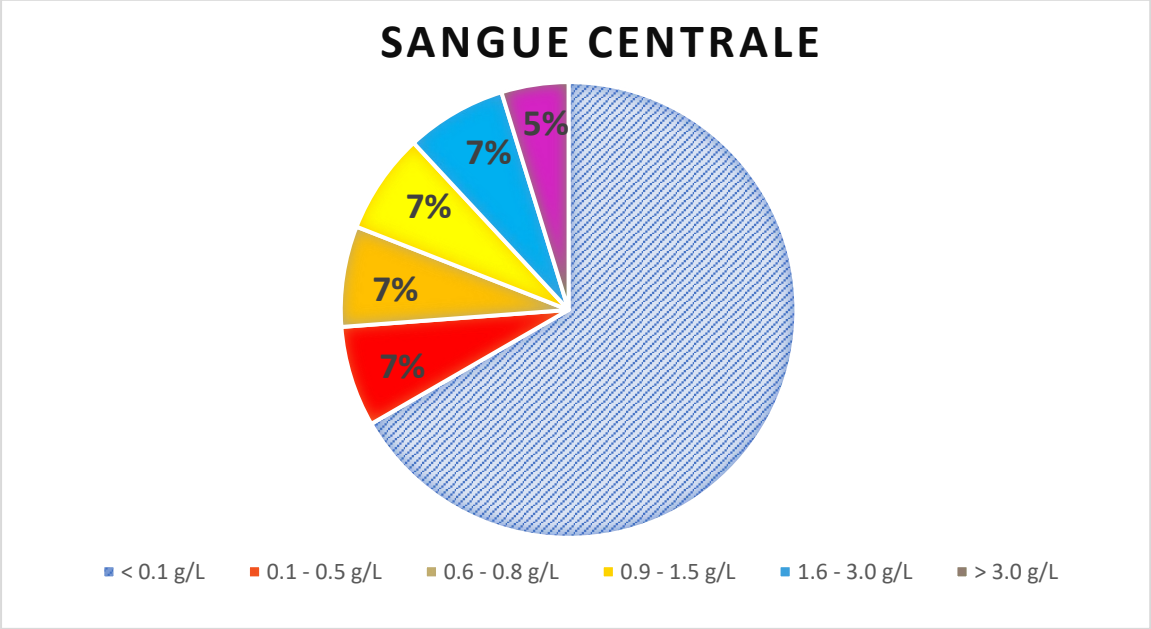

Figura 6. *Distribuzione dei positivi del sangue centrale nelle fasce alcolemiche.*

I campioni di sangue periferico risultati negativi sono stati 32, mentre i positivi 10 (Fig. 7). La distribuzione dei positivi nelle fasce alcolemiche è riportata nella Figura 8.

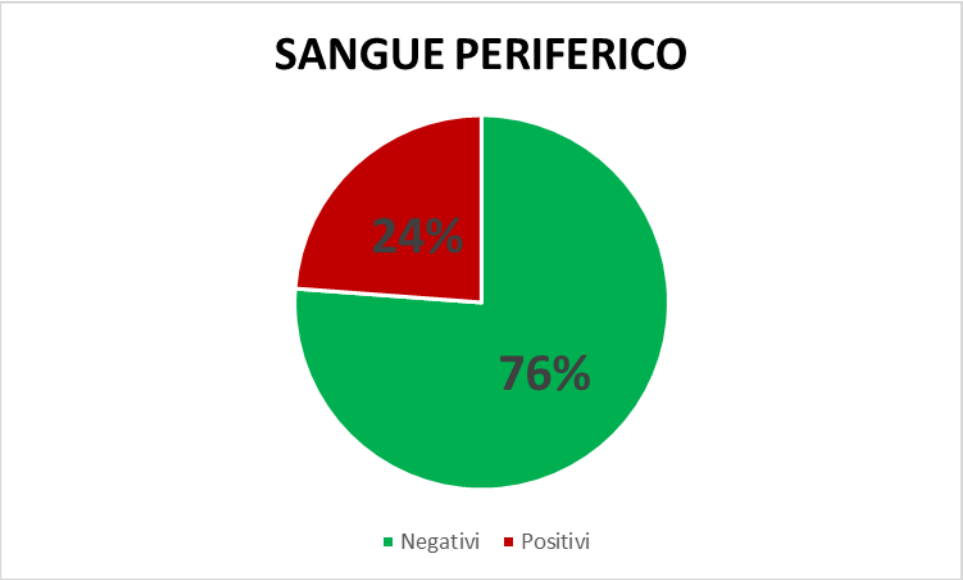

Figura 7. *Percentuali dei positivi e dei negativi riscontrati nei campioni di sangue periferico.*

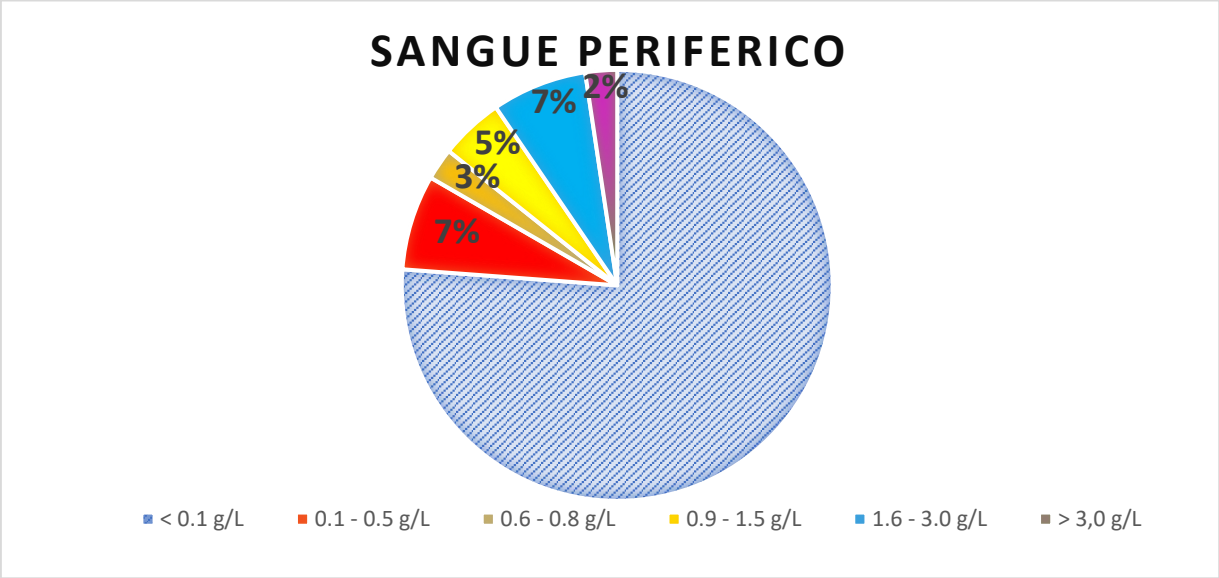

Figura 8. *Distribuzione dei positivi del sangue periferico nelle fasce alcolemiche.*

Dopo aver dimostrato che le concentrazioni rilevate nelle due tipologie di sangue sono simili e correlate, si è deciso di soffermarsi sui casi in cui si sono registrate delle differenze di quasi il doppio fra le due concentrazioni. Questi casi sono riportati nella Tabella 8.

Tabella 8. *Casi in cui sono state rilevate delle concentrazioni diverse nelle due tipologie di sangue.*

Campione	Sangue centrale (g/L)	Sangue periferico (g/L)	Causa di morte
31T/21	1.59	0	Incidente stradale
8T/22	0.73	0	Insufficienza cardiaca
27T/22	0.47	0	Morte da oppiacei
28T/22	1.85	0	Morte da oppiacei
37T/22	3.21	1.43	/
9T/13	1.31	0	Incidente stradale

Prima di provare a spiegare la discrepanza fra le due concentrazioni riscontrate con le informazioni a disposizione riguardanti la causa di morte, è necessario precisare che, nonostante questo progetto abbia proposto un protocollo di facile esecuzione con pochi passaggi preparatori e che garantisca risultati significativi e affidabili, l'interpretazione di questi risultati non è sempre così semplice e diretta. Infatti, la determinazione di qualsiasi sostanza, in questo caso dell'etanolo, in matrici provenienti da cadaveri è complicata da diversi fattori. Il problema principale è proprio che si sta lavorando con sangue cadaverico che è, inevitabilmente, diverso rispetto a quello prelevato dal vivente. Dopo la morte, infatti, anche il sangue subisce dei cambiamenti. Il pH, ad esempio, differisce significativamente rispetto ai range fisiologici, che vanno da 7.35 a 7.5, poiché i sistemi di tamponamento vengono meno. Di conseguenza, il pH scende a 5.5. Inoltre, l'ossigeno disponibile viene a mancare e le cellule diventano anaerobiche, perdendo l'energia necessaria a mantenere

i loro gradienti di membrana. La conseguente perdita di selettività nei canali di membrana determina il rilascio nello spazio extracellulare delle sostanze precedentemente contenute negli scomparti cellulari e la conseguente emolisi. È proprio la perdita dell'integrità delle membrane cellulari che causa la liquefazione dei tessuti. Un'altra problematica, che non sempre può essere controllata, è l'intervallo di tempo che intercorre fra la morte e il prelievo del campione ematico, la cui consistenza potrebbe cambiare con la coagulazione. La problematica della scarsità dei volumi con cui si può avere a che fare è già stata affrontata. Un altro aspetto critico riguarda le modalità di conservazione del campione. Se questo non viene correttamente conservato, la concentrazione di etanolo può subire delle variazioni in base alla temperatura e alla durata della conservazione (Sutlovic D et al. 2014). Fondamentale è anche il tipo di contenitore utilizzato per la raccolta, il trasporto e la conservazione. Sarebbe, infatti, preferibile utilizzare delle provette sottovuoto. Nei contenitori chiusi con tappo a vite il rischio è che, ad ogni apertura, l'etanolo presente evapori. Un'ulteriore problematica riguarda i temi della diffusione e della ridistribuzione post-mortem dell'etanolo che, come già detto, sono controversi. I modelli proposti per spiegarli sono essenzialmente due. Il primo prevede che l'etanolo diffonda secondo il gradiente di concentrazione dal contenuto gastrico verso il pericardio e le camere cardiache. Per il secondo, invece, la ridistribuzione avviene attraverso il pathway polmonare se il contenuto gastrico è stato aspirato nelle vie aeree durante il processo agonico (Pellisier-Alicot AL et al. 2006) o durante il rilassamento post-mortem dello sfintere esofageo (Sastre C et al. 2013). Alla

luce di quanto appena esposto è facile capire la difficoltà e l'importanza di interpretare correttamente i dati ottenuti.

Dei sei casi in cui le concentrazioni dell'etanolo nel sangue centrale e in quello periferico erano discordanti, era noto che 31T/21 e 9T/23 fossero deceduti a seguito di un incidente stradale. Il fatto che il sangue periferico sia risultato negativo, mentre quello centrale sia risultato molto positivo, rispettivamente, 1.59 g/L e 1.31 g/L, è facilmente spiegabile. La morte è avvenuta poco dopo l'ingestione di alcol, mentre era ancora in corso la fase di assorbimento a livello dello stomaco. L'importante trauma a carico del torace ha determinato la contaminazione del sangue centrale con il contenuto gastrico (Fredrik C et al. 2006). Dunque, in casi come questo, a fronte di importanti traumi toracici, viene considerato come più affidabile il dato ottenuto dal campione di sangue periferico.

Anche per quanto riguarda i campioni 8T/22, 27T/22, 28T/22 e 37T/22, la causa della diversità delle concentrazioni rilevate è facilmente spiegabile. Per la raccolta e la conservazione dei campioni di sangue centrale sono state utilizzate delle provette sottovuoto. Al contrario, per i campioni di sangue periferico sono state utilizzate delle semplici provette con un tappo a vite che non sono state completamente riempite. Dunque, si è verificata una duplice criticità: l'etanolo è evaporato e l'eccesso di spazio di testa sopra il campione ha portato alla sua ossidazione (Sutlovic D et al. 2014).

5. CONCLUSIONI

Con questo progetto si è riusciti a validare un metodo sensibile, che permette di ottenere dei valori significativi e affidabili a partire da piccoli volumi di sangue cadaverico. Con l'utilizzo di questo approccio si è anche riusciti a dimostrare che i fenomeni della diffusione e della ridistribuzione post-mortale dell'etanolo, se presenti, sono del tutto trascurabili. Il confronto fra le concentrazioni ottenute nel sangue centrale e in quello periferico dei soggetti sottoposti ad autopsia giudiziaria ha permesso di evidenziare come, nella maggior parte dei casi, i valori siano del tutto corrispondenti. Nei casi discussi, in cui queste concentrazioni differivano di quasi il doppio, è stata individuata una ragione che spiegasse tale divergenza.

Il progetto è stato svolto su un significativo, ma ristretto numero di campioni. Dunque, sono sicuramente necessari ulteriori approfondimenti, utilizzando un pool maggiore di campioni e, quando possibile, confrontando anche le concentrazioni ottenute in matrici diverse e considerate alternative, come l'umor vitreo (Savini F et al. 2020) e il sangue della succlavia (Sastre C et al. 2013).

È stata, inoltre, evidenziata l'importanza dell'utilizzo di contenitori adeguati alla conservazione dei campioni ematici di natura sia centrale che periferica. Su sei casi in cui si sono riscontrate delle concentrazioni discordanti, in quattro la ragione era totalmente attribuibile all'utilizzo di un contenitore non idoneo perché non in grado di conservare il campione sottovuoto e perché di dimensioni decisamente maggiore rispetto al volume contenuto.

Alla luce di quanto riportato, dunque, il sangue femorale deve continuare ad essere considerato il gold standard per l'esecuzione della ricerca alcolemica su cadavere.

I dati raccolti e le valutazioni fatte, anche a seguito di un'aumentata casistica, saranno oggetto di pubblicazione scientifica.

6. BIBLIOGRAFIA

Baselt RC: Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man (ed 12). Seal Beach, CA: Biomedical Publications, 2020.

Cederbaum AI. Alcohol metabolism. Clin Liver Dis. 2012 Nov;16(4):667-85.

Crabb DW, Bosron WF, Li TK. Ethanol metabolism. Pharmacol Ther. 1987;34(1):59-73.

Froldi R. Lezioni di tossicologia forense, Torino: G. Giappichelli Editore, 2011.

Guida sotto l'influenza dell'alcol, Articolo 186 del Codice della Strada.

Jones AW. Evidence-based survey of the elimination rates of ethanol from blood with applications in forensic casework. Forensic Sci Int. 2010 Jul 15;200(1-3):1-20.

Kelly AT, Mozayani A. An overview of alcohol testing and interpretation in the 21st century. J Pharm Pract. 2012 Feb;25(1):30-6.

Kugelberg FC, Jones AW. Interpreting results of ethanol analysis in postmortem specimens: a review of the literature. Forensic Sci Int. 2007 Jan 5;165(1):10-29.

Mews, P., Egervari, G., Nativio, R. et al. Alcohol metabolism contributes to brain histone acetylation, 2019; Nature 574, 717–721.

Moffat AC, Osselton MD, Widdop B. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. 4th Edition Pharmaceutical Press, Londra, 2011.

Pelissier-Alicot AL, Coste N, Bartoli C, Piercecchi-Marti MD, Sanvoisin A, Gouvernet J, Leonetti G. Comparison of ethanol concentrations in right

cardiac blood, left cardiac blood and peripheral blood in a series of 30 cases. Forensic Sci Int. 2006 Jan 6;156(1):35-9.

Perry PJ, Doroudgar S, Van Dyke P. Ethanol Forensic Toxicology. J Am Acad Psychiatry Law. 2017 Dec;45(4):429-438.

Prouty RW, Anderson WH. A comparison of postmortem heart blood and femoral blood ethyl alcohol concentrations. J Anal Toxicol. 1987 Sep-Oct;11(5):191-7.

Relazione del ministro della salute al parlamento sugli interventi realizzati ai sensi della legge 30.3.2001 n. 125 “Legge quadro in materia di alcol e problemi alcol correlati”; 2021.

Riboldi L, Bordini L. Abuso acuto e cronico di alcol e lavoro. G. Ital. Med. Lav. Erg. 2008; 30:3, Suppl, 56-66.

Sastre C, Baillif-Couniou V, Musarella F, Bartoli C, Mancini J, Piercecchi-Marti MD, Leonetti G, Pelissier-Alicot AL. Can subclavian blood be equated with a peripheral blood sample? A series of 50 cases. Int J Legal Med. 2013 Mar;127(2):379-84.

Savini F, Tartaglia A, Coccia L, Palestini D, D'Ovidio C, de Grazia U, Merone GM, Bassotti E, Locatelli M. Ethanol Determination in Post-Mortem Samples: Correlation between Blood and Vitreous Humor Concentration. Molecules. 2020 Jun 12;25(12):2724.

Scafato E, Ghirini S, Gandin C, Matone A, Vichi M, Gruppo di Lavoro CSDA (Centro Servizi Documentazione Alcol). Epidemiologia e monitoraggio alcol-correlato in Italia e nelle Regioni. Valutazione dell’Osservatorio Nazionale

Alcol sull'impatto del consumo di alcol ai fini dell'implementazione delle attività del Piano Nazionale Alcol e Salute. Rapporto 2022. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2022. (Rapporti ISTISAN 22/1).

Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology, ANSI/ASB Standard 036, First Edition 2019.

Sutlovic D, Versic-Bratincevic M, Definis-Gojanovic M. Blood alcohol stability in postmortem blood samples. Am J Forensic Med Pathol. 2014 Mar;35(1):55-8.

WHO. Fact sheet on alcohol consumption, alcohol-attributable harm and alcohol policy responses in European Union Member States, Norway and Switzerland; 2018.

WHO. Global status report on alcohol and health; 2018.

Widmark E. M. P. Die theoretischen Grundlagen und die praktische Verwendbarkeit der gerichtlich-medizinischen Alkoholbestimmung; 1932.

Wilson DF, Matschinsky FM. Ethanol metabolism: The good, the bad, and the ugly. Med Hypotheses. 2020 Feb 19;140:109638.

Zakhari S. Overview: how is alcohol metabolized by the body? Alcohol Res Health. 2006;29(4):245-54.