



## **SOMMARIO**

### **CAPITOLO I: Aspetti generali del doping**

- 1.1 Definizione e cenni generali.....pag 3.
- 1.2 Lista delle sostanze proibite.....pag 4.
- 1.3 Diuretici e il loro uso nel doping.....pag 7.
- 1.4 Inibitori dell'anidraasi carbonica.....pag 9.

### **CAPITOLO II: La cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa tandem**

- 2.1 Generalità..... pag 15.

### **CAPITOLO III: Studio sperimentale**

- 3.1 Obiettivi della Tesi.....pag 30.
- 3.2 Materiali e metodi.....pag 31.
- 3.3 Risultati dello studio.....pag 38.
- 3.4 Discussione..... pag 52.
- 3.5 Conclusioni .....pag 55.

- BIBLIOGRAFIA.....pag 56.**

# CAPITOLO 1: Aspetti generali del Doping

## 1.1 Definizione e cenni generali

La definizione scientifica più precisa e completa di doping è attualmente quella prevista dal **Codice WADA** (*World Anti-Doping Agency*), che lo definisce come la violazione di una o più delle seguenti regole antidoping: i) la presenza di una sostanza proibita o di suoi metaboliti o markers nel campione biologico di un atleta; ii) l'uso o il tentato uso di una sostanza vietata o di un metodo proibito da parte di un Atleta; iii) eludere, rifiutarsi od omettere di sottoporsi senza valida giustificazione al prelievo dei campioni biologici in seguito a notifica conforme alla normativa antidoping; iv) la mancata reperibilità; v) la manomissione o tentata manomissione in relazione a qualsiasi fase dei Controlli Antidoping; vi) il possesso di sostanze vietate e ricorso a metodi proibiti; vii) il traffico illegale o tentato traffico illegale di sostanze vietate o metodi proibiti; viii) la somministrazione o tentata somministrazione ad un Atleta durante le competizioni, di una qualsiasi sostanza vietata o metodo proibito, oppure la somministrazione o tentata somministrazione ad un Atleta, fuori competizione, di una sostanza o di un metodo che siano proibiti fuori competizione; ix) la complicità, intesa come fornire assistenza, incoraggiamento e aiuto, istigare, dissimulare o assicurare ogni altro tipo di complicità intenzionale nella violazione o nel tentativo di violazione di una regola antidoping; x) il divieto di associazione. (Articolo 2.1-2.10 del Codice Sportivo Antidoping NSA) (1-2).

La WADA o **AMA** (Agenzia Mondiale Antidoping) è una organizzazione istituita per volontà del Comitato Internazionale Olimpico (**CIO**) il 10 novembre 1999 a Losanna, con lo scopo di promuovere e coordinare la lotta contro il doping in tutto il mondo. Tuttavia,

l'impegno più importante è sicuramente quello di redigere ogni anno la **Lista delle Sostanze e dei Metodi Proibiti**, conosciuta semplicemente come "*Lista Proibita*": un elenco esaustivo e costantemente aggiornato di tutte le molecole e di tutti quei metodi che sono incompatibili con l'etica sportiva e con la trasparenza della competizione atletica. La Lista entra in vigore, salvo diverse indicazioni nella stessa contenute, tre mesi dopo la sua pubblicazione da parte della WADA.

In Italia, tramite un accordo tra CONI e governo italiano è stata istituita la **NADO** Italia (Organizzazione Nazionale Antidoping), alle cui dipendenze vi è il Tribunale Nazionale Antidoping e la Procura Nazionale Antidoping. L'attività operativa di NADO Italia si svolge in condizioni di piena autonomia e indipendenza, ma viene sottoposta a puntuale vigilanza e verifica da parte della WADA. La NADO si occupa dell'esecuzione di controlli antidoping in competizione e fuori competizione, avvalendosi di ispettori medici qualificati della FMSI (Federazione Medico Sportiva Italiana) e del laboratorio antidoping di Roma, unico esistente in Italia accreditato dalla WADA.

## **1.2 Lista delle sostanze proibite**

La più recente revisione della *Lista Proibita WADA* è entrata in vigore il 1° gennaio 2021 e, analogamente alle precedenti edizioni, prevede tre grandi categorie:

1. Sostanze e metodi sempre proibiti (in e fuori competizione);
2. Sostanze e metodi proibiti in competizione;
3. Sostanze proibite in particolari discipline sportive.

All'interno dei tre gruppi le sostanze sono suddivise per classi farmacologiche (3-6).

**1. SOSTANZE E METODI SEMPRE PROIBITI (IN E FUORI  
COMPETIZIONE)**

S0 SOSTANZE NON APPROVATE
S1 AGENTI ANABOLIZZANTI  1. Steroidi anabolizzanti androgeni (AAS)  a) Esogeni  b) Endogeni  1. Altri agenti anabolizzanti
S2 ORMONI PEPTIDICI, FATTORI DI CRESCITA, SOSTANZE CORRELATE E MIMETICI  1. Eritropoietine (EPO) e agenti che hanno un effetto sull'eritropoiesi  2. Ormoni peptidici e loro fattori di rilascio  3. Fattori di crescita e Modulatori del fattore di crescita
S3 BETA-2 AGONISTI
S4 MODULATORI ORMONALI E METABOLICI  1. Inibitori dell'aromatasi  2. Modulatori selettivi del recettore degli estrogeni (SERMs)  3. Agenti che prevengono l'attivazione del recettore dell'activina di tipo IIb  4. Modulatori metabolici
S5 DIURETICI ED AGENTI MASCHERANTI

**Fanno eccezione:**

- Drospirenone, pamabromo e inibitori dell'anidrasi carbonica per uso oftalmico (dorzolamide, brinzolamide);
- Somministrazione locale di felipressina in anestesia odontoiatrica

M1 MANIPOLAZIONE DEL SANGUE E DEI COMPONENTI DEL SANGUE

M2 MANIPOLAZIONE FISICA E CHIMICA

M3 DOPING GENETICO E CELLULARE

**2. SOSTANZE E METODI PROIBITI IN COMPETIZIONE**

S6 STIMOLANTI

- a) Stimolanti non specificati
- b) Stimolanti specificati

S7 NARCOTICI

S8 CANNABINOIDI

S9 GLUCOCORTICOSTEROIDI

**3. SOSTANZE E METODI PROIBITI IN PARTICOLARI SPORT**

P1 BETA-BLOCCANTI

### 1.3 Diuretici e il loro uso nel doping

I diuretici sono farmaci che incrementano il volume urinario e favoriscono l'eliminazione di sodio, pertanto sono impiegati nella pratica clinica come terapia di tutte quelle condizioni patologiche in cui vi sia la necessità di eliminare liquidi ed elettroliti in eccesso dall'organismo, come l'ipertensione, edemi di varia natura, scompensi elettrolitici ed insufficienza cardiaca. Vengono classificati sulla base della loro struttura chimica ovvero della loro sede di azione. Le principali classi sono:

- 1) Diuretici osmotici (mannitolo, glicerolo, urea, isosorbide), i quali agiscono sul tratto discendente dell'ansa di Henle e sul tubulo contorto prossimale provocando aumento dell'osmolarità e aumento dell'escrezione di tutti gli elettroliti. Hanno efficacia intermedia;
- 2) Inibitori dell'anidrasi carbonica (**IAC**): (acetazolamide, dorzolamide, brinzolamide, diclorfenamide, metazolamide), v. paragrafo seguente;
- 3) Diuretici dell'ansa (furosemide, bumetanide, torasemide, acido etacrinico), che agiscono sul tratto ascendente spesso dell'ansa di Henle inibendo il simporto  $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$  e sono caratterizzati da una forte efficacia;
- 4) Diuretici tiazidici ed analoghi delle tiazidi (idrocortiazide, idroflumetiazide, politiazide, clortalidone, indapamide, metolazone), che agiscono a livello del primo tratto del tubulo contorto distale inibendo il cotrasporto  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  e sono caratterizzati da una efficacia intermedia;
- 5) Diuretici risparmiatori di potassio (spironolattone, canrenone e canreonato di potassio) sono antagonisti recettoriali dell'aldosterone a livello del dotto collettore, mentre triamterene e amiloride inibiscono direttamente il trasporto di  $\text{Na}^+$  attraverso

i canali ionici della membrana luminale), capaci di ridurre l'escrezione di potassio e caratterizzati da bassa efficacia;

6) Acidificanti urinari (cloruro d'ammonio, acido ascorbico);

7) Alcalinizzanti urinari (bicarbonato di sodio).

I diuretici in ambito di doping sono definiti “**agenti mascheranti**”, in quanto, proprio per la loro intrinseca capacità di aumentare la produzione di urina e quindi di diluirla, è diffuso il loro uso tra gli sportivi allo scopo di ridurre le concentrazioni di altre sostanze dopanti e dei loro metaboliti al di sotto dei limiti imposti dalla WADA o delle soglie di sensibilità delle metodiche di dosaggio. Alcuni diuretici, e in particolare gli inibitori dell'anidrasi carbonica (IAC, approfonditi nel paragrafo seguente) sono in grado di alcalinizzare le urine: questo favorisce il riassorbimento tubulare di sostanze di natura basica come ad esempio amfetamine e cocaina, riducendo in tal modo le loro concentrazioni urinarie. Per i diuretici, come per gli altri farmaci delle classi proibite, è possibile presentare una Esenzione per Uso Terapeutico (TUE), ma tale legittima giustificazione viene invalidata se nelle urine dell'atleta in associazione al diuretico viene rinvenuta una traccia anche sotto soglia di un'altra sostanza esogena proibita. In tale evenienza si presume infatti che il diuretico sia stato usato in qualità di agente mascherante e non a scopo terapeutico (7-9).

Tra gli altri usi impropri dei farmaci diuretici è doveroso ricordare che essi vengono assunti anche per ottenere un rapido e consistente calo ponderale in tutti quegli sport dove esistono categorie di peso (pugilato, altri sport di combattimento, sollevamento pesi, canottaggio), ma anche in altre discipline come la danza, la ginnastica e l'atletica leggera, dove il controllo del peso assume un valore estremamente importante ai fini delle prestazioni. Si calcola che eliminando liquidi in maniera rapida si determina una riduzione del peso corporeo che può essere intorno al 2-4%. Infine, molto spesso i diuretici vengono usati anche per contrastare la ritenzione idrica indotta dall'abuso di steroidi anabolizzanti androgeni, e quindi per



raggiungere una migliore definizione della muscolatura nei cultori del bodybuilding che si dopano con tali sostanze.

Utilizzare questi farmaci in modo inappropriato potrebbe essere estremamente rischioso, infatti numerosi sono i loro effetti collaterali. Una eccessiva perdita di liquidi corporei porta rapidamente alla disidratazione ed allo squilibrio elettrolitico, la cui progressione può provocare crampi muscolari, nausea, ipotensione, confusione mentale, difficoltà motorie, insufficienza cardiaca, alterazioni anche gravi della funzionalità renale, edemi cerebrali e polmonari, trombosi, fino a raggiungere il coma e addirittura la morte nei casi più estremi di disordini elettrolitici prolungati (9).

#### **1.4 Inibitori dell'anidrasi carbonica**

Gli inibitori dell'anidrasi carbonica sono una categoria di diuretici in grado di ridurre l'escrezione di altre sostanze dopanti di carattere basico attraverso un aumento del pH delle urine. L'effetto è tale che la concentrazione urinaria di queste altre sostanze può scendere al di sotto della sensibilità dei metodi utilizzati per la loro determinazione, rendendo a tutti gli effetti inutile il controllo antidoping. Per tale motivo anche essi, come tutti i diuretici, sono proibiti dalla Lista WADA. Sono menzionati infatti nella classe S5, fatta eccezione per due molecole: la dorzolamide e la brinzolamide, le quali vengono impiegate esclusivamente ad uso oftalmico per la riduzione della pressione intraoculare (10-11).

Per la WADA quindi la dorzolamide e la brinzolamide ad uso oftalmico non sono da considerarsi sostanze dopanti di per sé, purché ci sia una necessità terapeutica; in caso contrario l'uso del farmaco costituisce doping, e la presenza di quantità anche esigue di tali farmaci nelle urine viene comunque segnalata alle autorità competenti come “evento avverso”.

L'anidrasi carbonica (CA) è un enzima che svolge la sua azione sia a livello del tubulo contorto prossimale che a livello delle cellule intercalate del dotto collettore. Questo enzima è appunto il bersaglio degli IAC come acetazolamide, diclorfenamide e metazolamide, diuretici blandi forse meglio utilizzati in altri ambiti clinici come il glaucoma, l'epilessia, la malattia d'alta quota e la prevenzione della calcolosi renale. Dal punto di vista della struttura chimica si tratta di derivati della sulfonamide che esplicano la loro funzione grazie alla presenza di un gruppo sulfamilico  $\text{SO}_2\text{NH}_2$ . A livello del tubulo contorto prossimale l'anidrasi carbonica esiste in due forme: anidrasi carbonica di tipo IV sulle membrane luminali e anidrasi carbonica di tipo II nel citosol. Partner della anidrasi carbonica sono lo scambiatore sodio/idrogeno (NHE), particolarmente espresso a livello della membrana apicale, e la pompa Na/K ATPasi, la quale garantisce i gradienti per il trasporto dei soluti attraverso la membrana ed è dislocata a livello della membrana basolaterale. L'anidrasi carbonica funge da catalizzatore di una reazione che avverrebbe naturalmente anche in sua assenza, ma con cinetiche molto più lente: promuove sia la trasformazione di acido carbonico in acqua che l'idratazione dell'anidride carbonica ad acido carbonico, il tutto in modo reversibile (12).

Nel lume tubulare il bicarbonato di sodio presente non può essere riassorbito tale e quale, ma si dissocia in  $\text{Na}^+$  e  $\text{HCO}_3^-$ , poi il bicarbonato viene convertito in acido carbonico che attraverso l'AC viene scisso in acqua e anidride carbonica: la  $\text{CO}_2$  è abbastanza lipofila da attraversare per semplice diffusione la membrana cellulare. All'interno della cellula avviene la reazione inversa, quindi  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CO}_2$  si combinano a formare  $\text{H}_2\text{CO}_3$ , ma l'acido carbonico è un acido debole, quindi tende a rilasciare protoni in ambiente acquoso e si formano  $\text{H}^+$  e ione bicarbonato  $\text{HCO}_3^-$ . Questa conversione tenderebbe ad acidificare l'ambiente intracellulare, ma l'aumento di protoni viene tamponato da NHE, che espelle un protone nel

lume tubulare, dove può riassociarsi al bicarbonato a formare di nuovo acido carbonico così che il ciclo ricomincia, e importa sodio.

Tutto questo avviene grazie a due meccanismi: la pompa Na/K (conditio sine qua non) e la presenza dell'anidrasi carbonica.

L'anidrasi carbonica partecipa anche a livello del dotto collettore alla regolazione acido/base perché all'interno delle cellule intercalari di tipo A determina la produzione di protoni che vengono secreti a livello tubulare da un'ATPasi protonica.

Quindi, bloccando la CA aumenta l'eliminazione di sodio, sotto forma di bicarbonato di sodio, e viene ridotta la secrezione di protoni nel lume tubulare; la perdita di  $\text{NaHCO}_3$  e la ridotta secrezione di  $\text{H}^+$  conducono ad una condizione di **acidosi metabolica**.

Riassumendo, gli effetti sull'escrezione urinaria sono:

- Rapido aumento di secrezione di  $\text{HCO}_3^-$  (urine alcaline fino a pH 8);
- Inibizione della secrezione di acidi;
- Modesta perdita complessiva di sodio;
- Aumento significativo della perdita di potassio in quanto il ridotto assorbimento di sodio induce una aumentata secrezione di potassio più a valle.

Gli effetti degli inibitori dell'anidrasi carbonica sulla diuresi e sulla natriuresi sono in ultima analisi blandi e tendono ad autolimitarsi nel tempo perché lo stato di acidosi metabolica indotto dagli stessi ne riduce l'escrezione renale e potrebbe modificare tramite protonazione la stessa anidrasi carbonica, inducendone un cambiamento di stato conformazionale tale da rendere l'enzima insensibile all'inibizione da parte dei diuretici. La perdita di bicarbonati con le urine riduce la concentrazione plasmatica di questi e quindi la loro secrezione tubulare.

Questo spiega la rapida scomparsa dell'effetto diuretico degli inibitori dell'anidrasi carbonica che si verifica nell'arco di alcuni giorni.

**Effetti collaterali e tossicità:** Differiscono in base alla modalità di somministrazione: i colliri possono provocare lievi disturbi irritativi e possono spesso dare disgeusia. Gli effetti collaterali degli inibitori dell'anidrasi carbonica ad uso sistemico sono in parte legati alla struttura sulfonamidica di tali composti: cefalea, nausea, vomito, parestesie, allergie, depressione midollare fino a quadri più gravi di anemia aplastica, tossicità renale e cutanea (prurito e orticaria), iperammoniemia, precipitazione di sali di calciofosfato con formazione di calcoli, peggioramento di una acidosi metabolica o respiratoria, iperuricemia, perdita di potassio renale e ridotta escrezione di basi organiche deboli (2).

**Farmacocinetica:** Questi composti sono somministrati per os (la via im deve essere evitata perché causa importante dolore al sito di iniezione) e hanno una emivita che va da 6 a 9 ore per l'acetazolamide e da 12 a 14 ore per la metazolamide, mentre non sono ancora disponibili dati per la diclorfenamide. Le prime due hanno biodisponibilità orale pari al 100%. L'acetazolamide è escreta per via renale in forma immodificata, mentre la metazolamide viene escreta sempre per via renale ma metabolizzata per il 75%. Il periodo di *wash-out* è di 5-7 giorni.

Per quanto riguarda gli usi terapeutici di questa classe di farmaci, degna di nota è l'attività dell'anidrasi carbonica a livello dei processi ciliari dell'occhio, dove promuove la produzione di umor acqueo. Andando a diminuire la velocità di formazione di umor acqueo attraverso gli inibitori dell'anidrasi carbonica si ottengono effetti benefici sull'ipertono oculare e sul glaucoma ad angolo aperto.

Nella somministrazione per via topica (instillazione oculare di collirio), la dorzolamide viene utilizzata a dosaggi molto bassi agendo direttamente sull'occhio e raggiungendo il picco di concentrazione dopo circa 2 ore. Successivamente raggiunge il circolo sistemico e si

accumula nei globuli rossi. La dorzolamide viene metabolizzata a N-desetil metabolita, anche esso farmacologicamente attivo. L'eliminazione del farmaco dall'organismo avviene principalmente attraverso l'emuntorio renale in forma immodificata; la medesima via di eliminazione interessa l'N-desetil metabolita (11-13). Anche la brinzolamide viene eliminata principalmente attraverso l'escrezione renale e circa il 20% della dose viene contabilizzato nelle urine come metabolita. Brinzolamide e N-desetil-brinzolamide sono i componenti predominanti nell'urina insieme ai metaboliti N-desmetossipropil e O-desmetile che vengono ritrovati in tracce. Per quanto riguarda la somministrazione sistemica di dorzolamide e brinzolamide come diuretico a fini di doping, non esistono dati su nessuna matrice, né indicazioni su eventuali posologie da utilizzare e di fatto non è presente letteratura internazionale su questa tematica. Solamente uno studio di Pecori Giraldi (14) ha dimostrato che la somministrazione topica di collirio con dorzolamide a pazienti con glaucoma, 2 volte al giorno per 7 giorni consecutivi risulta in concentrazioni urinarie tra 210 e 2470 ng/ml. Non esistono invece dati di concentrazioni urinarie di brinzolamide e/o metaboliti in assuntori del farmaco.

Per nessuno dei due farmaci esistono valori di range urinari popolazionali, né è stato mai verificato se l'uso cronico a fini medici o non medici (es. a fini di doping) sia riscontrabile con l'analisi di tali sostanze matrice cheratinica (15-17).

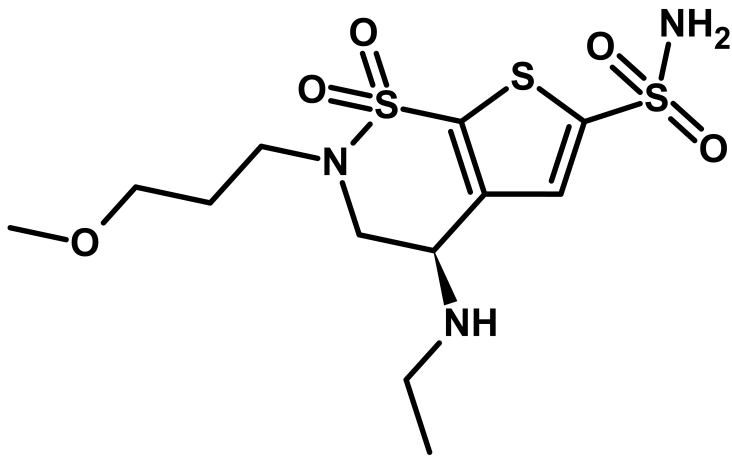


Fig. 1 Brinzolamide

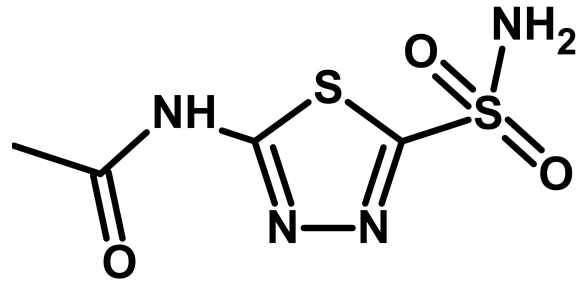


Fig. 2 Acetazolamide

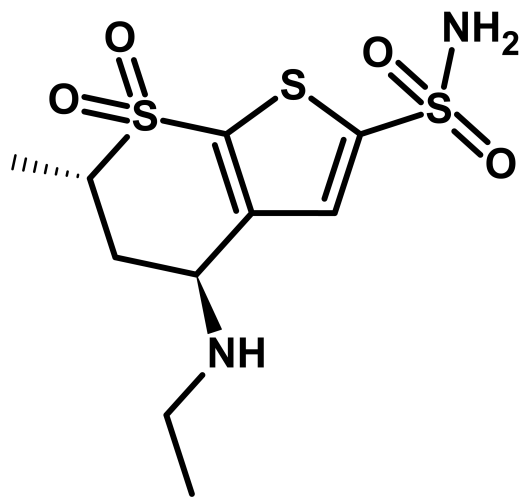


Fig. 3 Dorzolamide

## **CAPITOLO 2: La cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa tandem.**

### **2.1 Generalità**

La cromatografia è una tecnica analitica utilizzata in ambito chimico-analitico per i) purificare, ii) separare, iii) identificare e iv) quantificare singoli composti all'interno di una miscela complessa (sangue, urina, capelli, etc.), sfruttando la diversa affinità delle molecole o degli ioni per due fasi immiscibili tra loro: a) la **fase fissa**, chiamata anche fase stazionaria (FS), che può essere un solido o un liquido immobilizzato su di un supporto; b) la **fase mobile** (FM), gassosa o liquida, che fluisce in modo continuo sulla fase stazionaria. In base alla diversa affinità dei componenti della miscela per l'una e/o per l'altra fase, questi si spostano lungo la colonna con velocità diverse: ciò fa sì che essi fuoriescano dall'estremità della colonna cromatografica in tempi diversi e, quindi, risultino separati. Il tempo impiegato da ciascuna sostanza per eluire (**tempo di ritenzione**) è tanto maggiore quanto più elevata è l'affinità (coefficiente di distribuzione,  $K_d$ ) della sostanza per la fase stazionaria e può essere sfruttato per identificare il componente. L'invenzione della cromatografia viene attribuita al botanico russo M.S. Tswett, il quale, nel 1906, riuscì a separare la clorofilla da un estratto vegetale. Dal primo esperimento di Tswett la tecnica si è estremamente evoluta. Oggi esistono vari tipi di cromatografie, generalmente classificate in funzione della natura delle fasi stazionaria e mobile (eluente). In base all'eluente, la suddivisione può essere in:

- Fase mobile liquida:
  - a. Cromatografia su carta (PC)
  - b. Cromatografia su strato sottile (TLC)

- c. Cromatografia su colonna (LC)
  - d. Cromatografia liquida ad alta prestazione o ad alta pressione (HPLC)
- Fase mobile gassosa
- a. Gas-cromatografia (GC).

Tra queste, la cromatografia liquida ad alta prestazione (*High Performance Liquid Chromatography*) o cromatografia liquida ad alta pressione (*High Pressure Liquid Chromatography*) rappresenta uno dei più potenti e utilizzati strumenti di analisi (18).

Questa tecnica si avvale di una strumentazione sofisticata che consente di ottenere separazioni impossibili nella cromatografia tradizionale su colonna.

La fase mobile solitamente è un liquido a bassa viscosità (tipicamente una miscela di solventi organici, ad esempio acqua, acetonitrile, metanolo, esano, toluene, con diversa polarità che agiscono come antagonisti dell'analita nei confronti dei siti attivi) e la fase stazionaria (ad es. silice, polimeri etc) è costituita da particelle porose eventualmente rivestite da una fase liquida.

Quest'ultima è impaccata in una colonna di lunghezza variabile tra 3 e 50 cm e di diametro interno (ID) di pochi mm. Poiché le particelle del riempimento (assorbente) hanno una granulometria molto piccola (tra 2 e 50 micrometri), il flusso dell'eluente può essere ottenuto solo esercitando una pressione relativamente elevata mediante apposite pompe.

Il campione da analizzare è, quindi, iniettato all'inizio della colonna cromatografica dove è "spinto" verso la fine dalla fase mobile applicando pressioni dell'ordine delle centinaia di atmosfere (50-650 atmosfere),

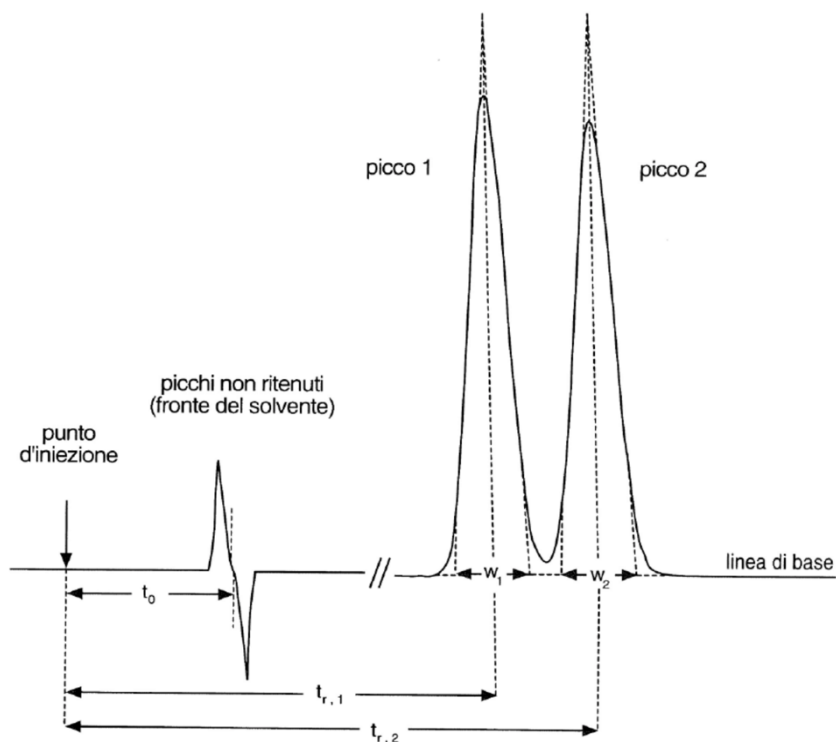
A loro volta, le tecniche HPLC possono essere classificate in funzione di:

- Polarità delle fasi



- i. Cromatografia a fasi normali (NPC): FS polare e FM apolare
- ii. Cromatografia a fasi inverse (RPC): FS apolare e FM polare
- Meccanismo di separazione
  - i. Cromatografia di adsorbimento (LSC)
  - ii. Cromatografia di ripartizione (LLC)
  - iii. Cromatografia di esclusione (SEC)
  - iv. Cromatografia di scambio ionico (IEC)
  - v. Cromatografia di affinità (AFC)
  - vi. Cromatografia di coppia ionica (IPC)
- Caratteristiche della fase stazionaria
  - i. Cromatografia su fase legata (BPC)
  - ii. Cromatografia su fase chirale (CPC)

Da ognuna di queste analisi si ottiene un grafico, detto **cromatogramma (fig 4)**, che correla la risposta del rivelatore dello strumento al tempo. Esso consiste in una serie di picchi che rappresentano l'eluizione dei singoli analiti, separati dal processo cromatografico .



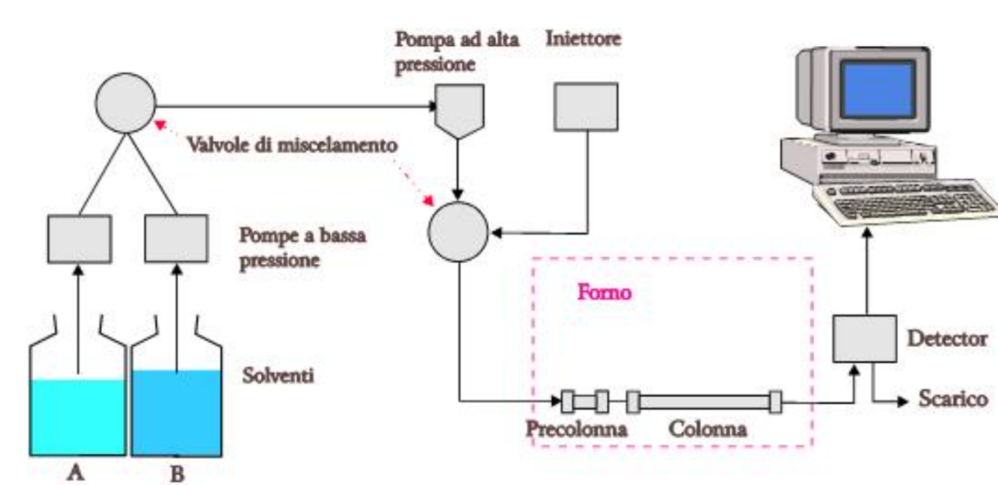
**Fig 4: cromatogramma**

Il successo di una separazione cromatografica è giudicato in base alla capacità del sistema di separare il picco di ogni analita presente nel campione dagli altri. Per interpretare correttamente il cromatogramma, è importante definire alcuni parametri:

- Coefficiente di distribuzione ( $K_d$ ): la percentuale, all'equilibrio, del numero di molecole nella FS sul numero di molecole nella FM.
- Tempo di ritenzione ( $t_r$ ): è il tempo richiesto ad una sostanza ad essere eluita
- Fattore di ritenzione o fattore di capacità ( $K'$ ): la ritenzione è spesso espressa in termini di fattore di ritenzione o fattore di capacità, definito come  $K' = (t_r - t_0) / t_0$ , dove  $t_0$  è il tempo morto o tempo richiesto per eluire una sostanza non trattenuta dalla fase stazionaria ( $K_d = 0$ ).

- Volume di ritenzione ( $V_r$ ): è il volume di eluente passato in colonna al tempo di ritenzione.
- Efficienza: ampiezza dei picchi. Una colonna efficiente dà picchi stretti. Si misura in numero di piatti teorici ( $N = t_r / w$ )<sup>2</sup>.
- Selettività ( $\alpha$ ): distanza tra i picchi. Dipende dalla composizione di FS e FM, dal pH e dalla temperatura.
- Risoluzione ( $R_s$ ): differenza tra i tempi di ritenzione diviso la media dell'ampiezza dei picchi alla linea di base:  $R_s = (t_{r2} - t_{r1}) / 0,5(w_1 + w_2)$ .

I componenti principali dell'apparecchiatura per HPLC (cromatografo) sono (fig 5):



**fig. 5: componenti di un cromatografo liquido (HPLC)**

- **Riserva della fase mobile:** sono contenitori di materiale inerte (vetro, acciaio inox o PTFE) per non inquinare il solvente, con una capacità tale da assicurare l'esecuzione di un certo numero di analisi. Il solvente passa alla pompa attraverso un tubo pescante che contiene in genere un filtro per trattenere eventuali impurità grossolane.

L'eluizione può essere in isocratica (la composizione della fase mobile rimane invariata) o in gradiente (la composizione della fase mobile cambia).

- **Valvole di miscelamento:** spesso l'eluente è una miscela di due o più solventi.
- **Pompe:** servono per fornire elevate pressioni in ingresso, mantenere il flusso di eluente il più costante e riproducibile possibile, smorzando eventuali pulsazioni. Ormai si usano solo pompe a doppio effetto (reciprocanti a due pistoni).
- **Sistemi di introduzione del campione:** il campione può essere inserito mediante una microsiringa (sistema oramai abbandonato) o mediante una apposita valvola azionata manualmente o meccanicamente.
- **Colonna:** Le colonne sono in acciaio o in vetro borosilicato con pareti molto spesse. Si usano di preferenza colonne corte che eventualmente possono essere collegate in serie. Per proteggere la colonna vera e propria talvolta si usano delle precolonne con la stessa fase stazionaria ma di granulometria più grande.
- **Termostato:** per assicurare la riproducibilità dell'analisi, la variazione di temperatura deve essere molto inferiore all'1%.
- **Raccoglitori di frazioni:** nelle separazioni preparative si utilizzano sistemi automatici altrimenti si sostituisce il contenitore di raccolta manualmente utilizzando un corto tubicino flessibile di uscita.
- **Rivelatori:** la funzione di un rivelatore è di produrre un segnale elettrico proporzionale alla concentrazione della sostanza analizzata. Controllano in continuo una caratteristica dell'eluato della colonna in una cella a flusso connessa all'uscita della colonna. Sono accoppiati ad un computer che supporta un apposito programma, il quale provvede a gestire uno o più cromatografi, ad acquisire il segnale proveniente dal rivelatore e a elaborarlo (19).

I rivelatori più utilizzati sono riportati in tabella sottostante e si dividono in:

**Tabella 1: Rivelatori**

<b>Rivelatore</b>	<b>Limite di rilevazione (ng)</b>	<b>Selettività</b>	<b>Utilizzabile in gradiente</b>
<b>Assorbimento UV</b>	0.1-1	selettivo	SI
<b>Indice di rifrazione</b>	100-1000	selettivo	NO
<b>Fluorescenza</b>	0.001-0.01	selettivo	SI
<b>Elettrochimico</b>	0.01-1	selettivo	NO
<b>Conduttimetro</b>	0.5-1	selettivo	NO
<b>Assorbimento IR</b>	1000	selettivo	SI
<b>Spettrometro di massa</b>	0.0001-1	generale	SI

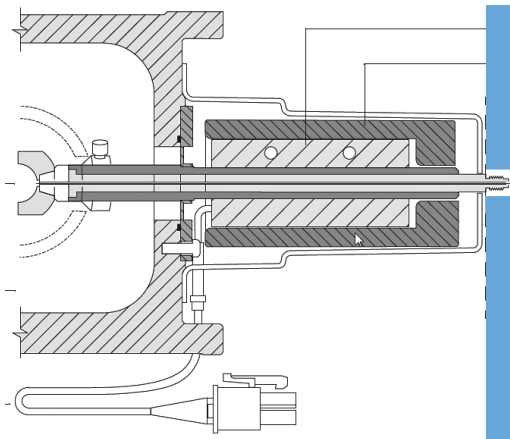
I rivelatori più ampiamente utilizzati per la cromatografia liquida e che trovano molte applicazioni in ambito sia clinico che forense sono gli **spettrometri di massa e massa tandem**. L'utilizzo di tale tecnologia (che si basa sull'analisi di ioni che si muovono nel vuoto), offre numerosi vantaggi quali: la determinazione diretta dei composti oggetto di ricerca mediante la frammentazione molecolare e il successivo riconoscimento in base al rapporto massa/carica degli ioni generati dalla frammentazione stessa e l'identificazione di sostanze sconosciute.

Una molecola prima di poter essere analizzata deve essere prima volatilizzata e ionizzata a livello della sorgente di ionizzazione. Questo presuppone che si vadano a produrre degli ioni (desorbimento e ionizzazione) in fase gassosa che verranno poi accelerati, mediante un campo elettrico, e poi proiettati in un analizzatore che li separa in funzione del loro rapporto

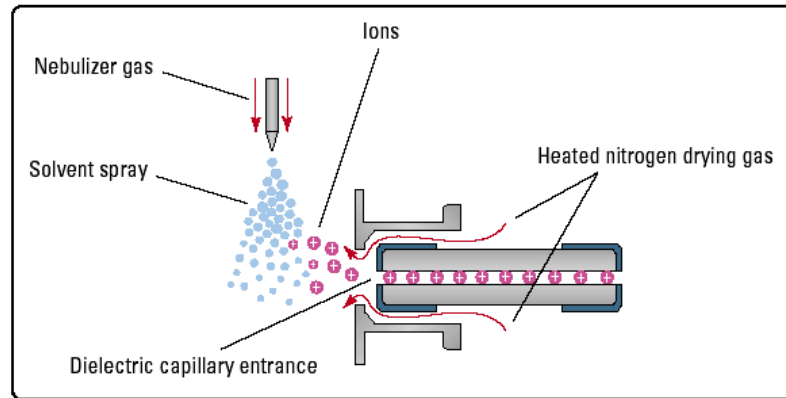
m/z. Infine un rivelatore andrà a determinare gli ioni prodotti e vi sarà quindi una conversione dell'energia ionica in segnale elettrico con generazione di uno spettro di massa. La sorgente di ionizzazione svolge un ruolo essenziale prima dell'analisi in spettrometria. Le modalità di introduzione del campione nella sorgente dipendono dal tipo di strumento: inserimento diretto del campione (sonde, piastre o supporti speciali), infusione diretta o accoppiamento con sistemi cromatografici (richiede un'interfaccia) (20).

Le tecniche utilizzate per la ionizzazione sono numerose:

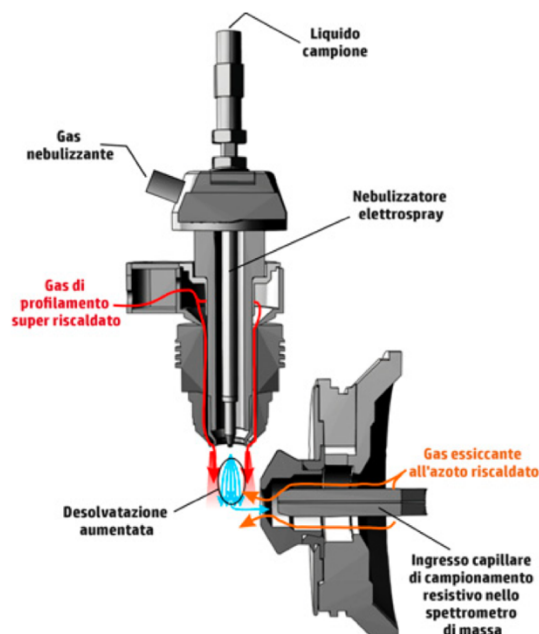
1. **Ionizzazione elettronica (EI):** tipicamente produce ioni frammento e ioni molecolari a carica singola.



2. **Ionizzazione chimica (CI):** è un processo indiretto che impiega un agente chimico intermedio. Nel caso della ionizzazione chimica positiva (PCI), la sorgente ionica è riempita con un gas reagente che viene ionizzato per creare ioni reagenti che reagiscono con l'analita.
3. **Ionizzazione elettrospray (ESI):** è una tecnica di ionizzazione soft (ione molecolare). Si generano ioni multicarica. L'eluente è nebulizzato in una camera a pressione atmosferica in presenza di un forte campo elettrico (2-5 kVolts) ed di un gas di solvatazione (N2) riscaldato.



4. **Ionizzazione Jet Stream:** è stata sviluppata per aumentare significativamente la sensibilità in ESI-MS. Questa accresce la desolvatazione dell'analita collimando il nebulizzatore spray e generando un "segnale notevolmente più luminoso". L'aggiunta di un gas di profilamento (azoto) super riscaldato, co-lineare, concentrico nel gruppo degli iniettori aumenta significativamente l'essiccazione degli ioni dal cono di nebulizzazione dell'elettrospray, con aumento del rapporto segnale-rumore dello spettrometro di massa, consentendo così al triplo quadrupolo di superare il limite di rilevazione dei femtogrammi.

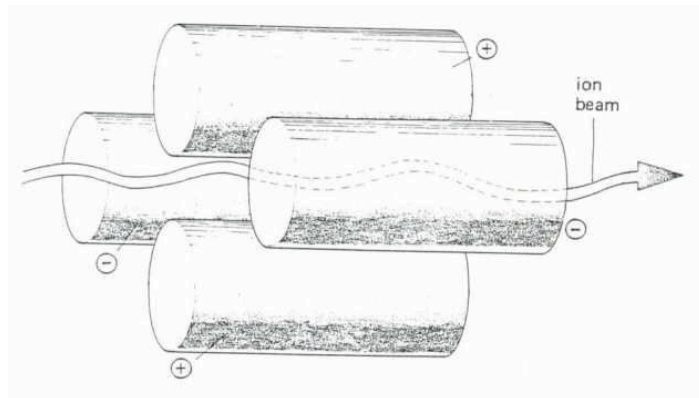


5. **Desorbimento con laser (MALDI):** è una tecnica di ionizzazione soft. Si basa sull'eccitazione delle molecole del campione con un raggio laser per produrne la vaporizzazione e a ionizzazione.

La polarità degli analiti determinerà il tipo di sorgente di ionizzazione. Le diverse tecniche permettono di coprire esigenze diverse inoltre le sorgenti sono interconnettibili.

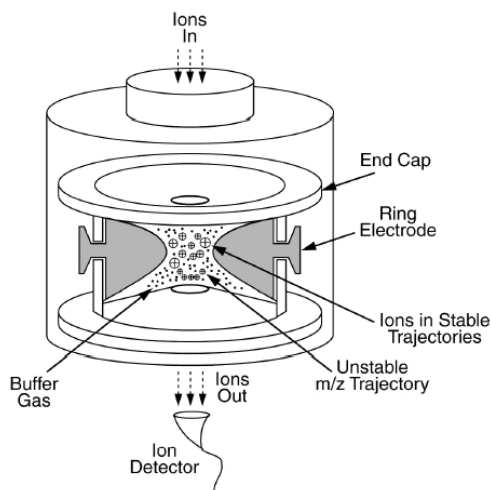
Il nostro ione formato passa a questo punto a livello dell'analizzatore. questo è la parte dello strumento preposto alla separazione sulla base del rapporto  $m/z$ . Anche in questo caso si sono sviluppati diversi tipi di analizzatori con caratteristiche differenti e performance maggiori. Sono classificati in base al modo in cui si effettua la selezione ionica:

1. **Analizzatori a quadrupolo.** Costituiti da quattro barre metalliche parallele a cui è applicata una tensione alternata e una tensione continua. Per un determinato rapporto di TA e TC solamente gli ioni di un certo rapporto  $m/z$  raggiungono il rivelatore (traiettoria stabile) mentre gli altri vengono espulsi (traiettoria instabile).

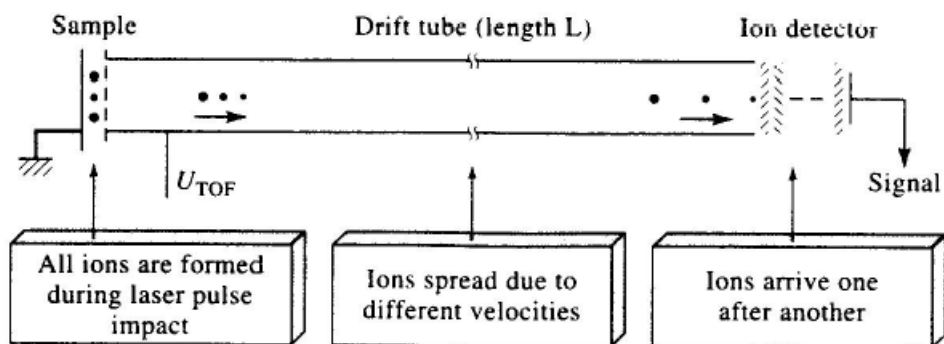




2. **Analizzatori a trappola ionica.** Le barre del filtro di massa presentano una disposizione sferica. Tutti gli ioni vengono temporaneamente intrappolati nello spazio tra gli elettrodi con un certo rapporto  $m/z$  e, a secondo del potenziale applicato vengono espulsi dalla trappola sequenzialmente in ordine di  $m/z$  crescente.



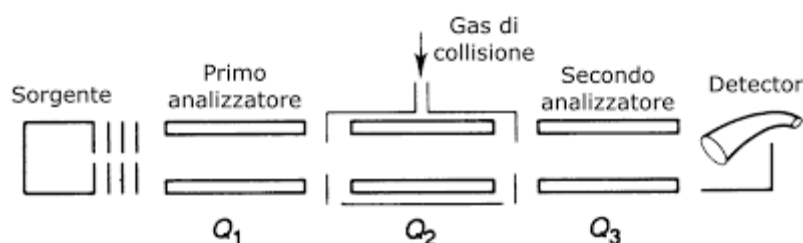
3. **Analizzatori a deflessione magnetica.** Porta gli ioni a percorrere traiettorie circolari, il cui raggio dipende dal rapporto massa/carica dello ione. Cambiando le traiettorie degli ioni mediante variazioni del campo magnetico applicato, ioni con diverso rapporto  $m/z$  possono essere focalizzati sul rivelatore.
4. **Analizzatori a tempo di volo (TOF).** Separano gli ioni in virtù del tempo impiegato nel percorrere una certa distanza nota: minore è la massa dello ione, maggiore è la sua velocità. Il tempo impiegato dallo ione a percorrere il tubo viene trasformato nel valore della massa (analisi di biomolecole con PM elevato).



5. **Analizzatori a risonanza ciclotronica ionica (FT ICR).** Basato sul principio che uno ione eccitato con radiofrequenze emette energia. In una cella cubica immersa in un campo magnetico si applica un potenziale opportuno così che gli ioni rimangano intrappolati. Si irradiano gli ioni con radiofrequenze che portano ad un aumento della propria energia cinetica che viene rilasciata sempre nel campo delle radiofrequenze e raccolta dallo strumento.

Nella spettrometria di massa tandem vi sono due analizzatori disposti in serie. Questa tecnica è stata messa a punto per la limitata frammentazione dello ione molecolare nelle tecniche di ionizzazione “soft” come MALDI o ESI perché costituisce uno svantaggio quando si vogliono avere informazioni più precise sulla struttura della molecola al fine di un riconoscimento univoco.

Il primo analizzatore (MS1) ha la funzione di selezionare (filtrare) tra i vari ioni presenti in uno spettro, lo ione desiderato. Lo ione selezionato ( detto ione parente o precursore) viene successivamente fatto collidere con un opportuno gas di collisione (He, Ar) in una cella di collisione, e i frammenti (ioni figli o prodotto), generati dalla dissociazione dello ione molecolare a causa degli urti con il gas di collisione introdotto nella camera, vengono separati dal secondo analizzatore (MS2) in base al loro rapporto  $m/z$ . Gli strumenti dotati di questo sistema tandem MS sono i tripli quadrupoli e le trappole ioniche.



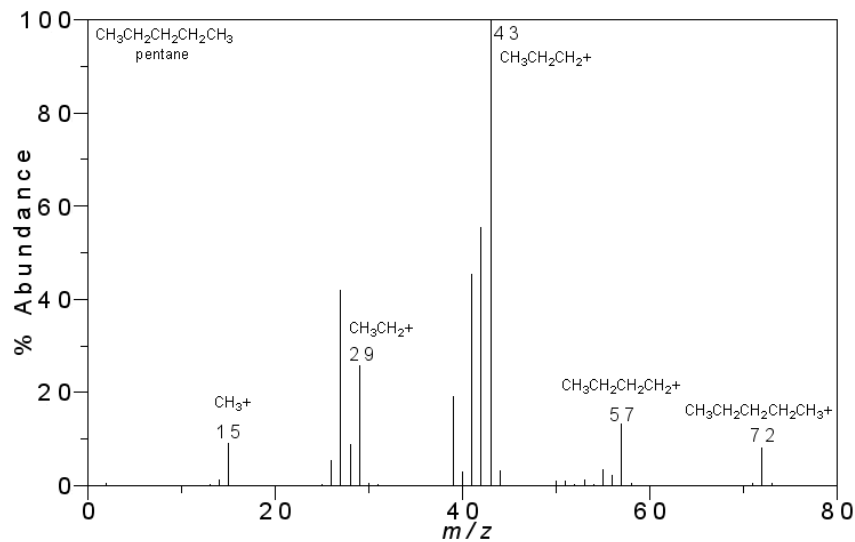
In realtà in questi due tipi diversi di analizzatori si esegue un esperimento spettrometrico Tandem “nello spazio” o “nel tempo” (10).

**Progressione nello spazio:** la selezione dello ione, la sua dissociazione indotta e l'analisi dei frammenti generati avvengono in spazi diversi (cioè in diversi settori dello spettrometro) come si verifica nel triplo quadrupolo.

**Progressione nel tempo:** significa che queste operazioni sono fatte nello stesso spazio (l'analizzatore a trappola ionica) ma in tempi successivi. Infatti, nella trappola ionica è possibile inizialmente intrappolare tutti gli ioni presenti nello spettro primario e in seguito isolare lo ione desiderato (espellendo gli altri dalla trappola), poi indurre la dissociazione dello ione isolato, e infine analizzare i frammenti generati all'interno della stessa trappola. Con un analizzatore a trappola ionica, con lo stesso schema, si può pensare di isolare uno ione figlio e dissociarlo ulteriormente per studiarne la frammentazione. Si ottengono così ioni di seconda generazione che possono essere frammentati a loro volta. Il processo di frammentazione può essere ripetuto n volte e in questi casi si parla di MS<sub>n</sub>. Gli spettrometri tandem si dicono a geometria ibrida o non ibrida, a seconda che accoppiano due analizzatori diversi o meno. I più frequenti appaiamenti sono:

- Quadrupolo accoppiato con TOF (Q-TOF)
- Magnetico/TOF
- TOF/TOF
- Quadrupolo accoppiato con trappola ionica (Q-trap)

Alla fine della nostra analisi avremo come segnale uno spettro di massa il quale è un grafico che riporta sull'asse delle ascisse i valori di  $m/z$  e su quello delle ordinate l'intensità ionica, o più frequentemente l'abbondanza relativa.



Per quanto riguarda le applicazioni della spettrometria di massa sono sempre più numerose e in diversi campi di azione.

In diagnostica clinica viene ad esempio utilizzata per lo screening di biomarcatori specifici o la rivelazione ad esempio di un profilo di fosfolipidi nei tessuti, nelle cellule e nei fluidi corporei che riflette la condizione generale dell'intero organismo e può indicare l'esistenza di patologie oncologiche e altre malattie. Questa tecnica analitica ci propone nuove prospettive per valutare la malattia e fornire una base per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche (20).

Per quanto riguarda le scienze omiche domina tutti gli strumenti analitici utilizzati per l'identificazione dei metaboliti utili per la scoperta di nuovi farmaci. Ma anche per l'identificazione di peptidi, proteine, lipidi ecc (21-22). Trova sempre più applicazioni nelle scienze forensi nella determinazione di droghe d'abuso, farmaci, tossine, esplosivi, residui di sparo, inchiostri, sostanze biologiche, per lo screening, l'identificazione e la quantificazione degli agenti dopanti nelle urine e in altri campioni biologici e test antidroga nello sport ecc. Consente di rivelare e caratterizzare ampie classi di composti di interesse forense in miscele complesse in quantità estremamente basse. Alcuni dei tipi di prove forensi

più diffuse sono costituiti da (o contengono) proteine, compresi capelli, cellule della pelle e fluidi corporei (sangue, fluidi vaginali/mestruali, sperma, urina e saliva).

## CAPITOLO 3: Studio Sperimentale

### 3.1 Obiettivi della Tesi

Il primo obiettivo della presente tesi è stato quello di sviluppare e validare una metodica di analisi specifica per la determinazione e quantificazione della dorzolamide, brinzolamide ed acetazolamide ed i rispettivi metaboliti nelle matrici urinaria e cheratinica (capelli) attraverso la cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa tandem (UHPLC-MS/MS) (23).

Secondariamente, il metodo sviluppato e completamente validato è stato applicato su campioni biologici urinari e di matrice cheratinica (capelli) al fine di determinare i *ranges* di concentrazioni dei suddetti analiti in soggetti in trattamento cronico (ad esempio nella terapia del glaucoma), uso occasionale (nell'ipertono oculare o in eventi traumatici acuti) ed infine per valutare se in soggetti venuti a contatto fortuito per contiguità casuale (ad esempio correlabile ad un singolo incontro in luogo pubblico quale un ristorante o un bar) o ripetuta (contatto di parentela all'interno del nucleo familiare) con soggetti in trattamento cronico con questi inibitori dell'anidrasi carbonica, è possibile rilevare le suddette molecole.

Quest'ultima applicazione consentirà importanti ricadute in casi di doping in cui sono coinvolti gli inibitori dell'anidrasi carbonica.

## **3.2 Materiali e metodi**

### **3.2.1 Agenti chimici e reagenti**

I materiali di riferimento (brinzolamide, dorzolamide, acetazolamide, N-acetil-dorzolamide, N-deetil-dorzolamide, O-desmetil-brinzolamide, acetazolamide-d<sub>3</sub> e brinzolamide-d<sub>5</sub>) di purezza >99% sono stati acquistati dalla LGC (Queens Road, Teddington, Middlesex, UK) e conservati a -20°C fino al momento dell'utilizzo. Metanolo, acetonitrile, acido formico e acqua deionizzata ultra-pura sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich® (Milano, Italy). Il tampone di ammonio formato è stato preparato con sale di ammonio formiato al  $\geq 99\%$  di purezza (Sigma-Aldrich®) disciolto in acqua. M3® è stato acquistato dalla Comedical® s.r.l. (Trento, Italy) e la loro composizione non è nota. I solventi impiegati durante l'estrazione e nel sistema cromatografico erano di grado LC-MS.

### **3.2.2 Soluzione standard, standard di calibrazione e preparazione dei campioni di controllo qualità**

Le soluzioni di lavoro di brinzolamide, dorzolamide, acetazolamide, N-acetil-dorzolamide, N-deetil-dorzolamide, O-desmetil-brinzolamide sono state preparate tramite diluizione del materiale di riferimento (1 mg/mL) in metanolo rispettivamente ad una concentrazione di 10, 1 e 0.1 g/mL. Le soluzioni di lavoro dello standard interno con acetazolamide-d<sub>3</sub> e brinzolamide-d<sub>5</sub> sono state preparate mediante diluizione del materiale di riferimento (1 mg/mL) in metanolo a una concentrazione di 1 µg/mL per raggiungere una concentrazione di 5 ng/mL in campioni di urina e di 1 ng/mL in campioni di capelli. Tutte le soluzioni sono state conservate a -20°C fino al momento dell'analisi.

La curva di calibrazione e i campioni di controllo qualità (QC) a concentrazione nota sono stati preparati aggiungendo appropriate quantità delle soluzioni di lavoro in capelli e urine, all'inizio di ciascuna sessione analitica. Le concentrazioni dei QC sono di seguito riportati: QC basso = 31,5 ng/mL, QC medio = 87 ng/mL, QC alto = 350 ng/mL per i campioni di urina; QC basso = 0,5 ng/mg, QC medio = 3,5 ng/mg, QC alto = 7,5 ng/mg per i campioni di capelli.

### **3.2.3 Campioni biologici umani**

Per questo studio, urine umane “bianche” (appartenenti a soggetti che non assumono farmaci) e capelli sono stati ottenuti dal personale del laboratorio coinvolto in questo studio, dopo aver firmato il consenso informato. Per lo studio sono stati analizzati 20 campioni di urine e 20 campioni di matrice cheratinica (capelli) appartenenti a soggetti in trattamento cronico con dette sostanze, nonché 25 campioni di urina e 25 campioni di capelli appartenenti a soggetti ad essi conviventi. Tutti i campioni biologici sono stati forniti dalla clinica oculistica degli Ospedali Riuniti di Ancona, Ospedale Universitario dell'Università Politecnica delle Marche, (Ancona, Italy), pre-screenati e analizzati per la presenza di sostanze d'abuso e farmaci ed infine analizzati per valutare la robustezza, l'accuratezza e l'idoneità del corrente metodo. Lo studio è stato condotto nel rispetto dei principi etici della Dichiarazione di Helsinki ed ha ricevuto approvazione dal Comitato Etico Istituzionale (“CERM” n°263/2020 Azienda Ospedaliero-Universitaria Ospedali Riuniti Torrette di Ancona).



### **3.2.4 Trattamento dei campioni**

I campioni di urina, posti (100 µL) in provette di vetro di forma conica sono stati addizionati con 5 µL di standard interno e centrifugati. Dopo l'aggiunta di 5 mL fase mobile A:B 95:5 (v/v), le provette sono state chiuse, centrifugate per 15 secondi e centrifugate a 15000 giri per 3 minuti. Il surnatante è stato trasferito in *vial* di vetro autocampionanti prima di essere iniettato nel sistema cromatografico.

I campioni di capelli sono stati lavati due volte con diclorometano e asciugati sotto azoto a 45° C. Una aliquota di 25 mg è stata finemente sminuzzata in frammenti (<5 mm), e posta in provette di vetro e addizionata con 5 µL di standard interno. Dopo l'aggiunta di 100 µL di reagente M3<sup>®</sup>, le provette sono state richiuse e incubate a 100°C per un'ora in modo che ne avvenisse la completa digestione. Infine, i campioni sono stati raffreddati a temperatura ambiente e 1 mL è stato trasferito in *vial* di vetro autocampionanti prima di essere iniettati sul sistema cromatografico.

### **3.2.5 Analisi in cromatografia liquida ad ultra-performance accoppiata alla spettrometria di massa (UHPLC-MS/MS)**

Le analisi dei campioni biologici di urina e capelli umani sono state condotte su uno spettrometro di micro-massa triplo quadrupolo Waters<sup>®</sup> Xevo<sup>®</sup> TQ-S dotato di una sorgente di ionizzazione *elettrospray* in modalità ione positivo (ESI+) e interfacciato con un ACQUITY UPLC<sup>®</sup> I-Class (Waters<sup>®</sup>; Milano, Italy). I dati sono stati acquisiti con il software MassLynx<sup>®</sup> nella versione 4.1 (Waters<sup>®</sup>).

La cromatografia è stata condotta su una colonna ACQUITY UPLC<sup>®</sup> BEH C<sub>18</sub> della Waters<sup>®</sup> (lunghezza: 50 mm, diametro interno: 2,1 mm, dimensione della particella: 1,7µm). La durata della corsa è stata di 8 minuti con un gradiente di fase mobile composto dallo 0,1%

di acido formico in 5 mM di tampone di ammonio acetato (A) e 0,01% acido formico in metanolo (B) ad una velocità di flusso di 0,35 mL/min.

Le condizioni cromatografiche sono riportati nella tabella sottostante:

Tempo (min)	%B	%A
0-0,25	5	95
0,26-3	20	80
3,1- 5	95	5
5-5,05	95	5
5,06-8	5	95

Il volume di iniezione è stato di 3  $\mu$ L per i campioni di urine e di 1  $\mu$ L per quelli cheratinici. La rivelazione e la quantificazione degli analiti in esame, è avvenuta mediante spettrometria di massa a triplo quadrupolo, operando in modalità MRM (*multiple reaction-monitoring*). Tutti i parametri settati mediante infusione degli standard di riferimento in soluzione metanolica sono riportati in **Tabella 1**. Le condizioni della sorgente sono state ottimizzate come segue: tensione del capillare = 0,5 kV, temperatura della sorgente = 150°C, temperatura di desolvatazione = 650°C, flusso del cono = 20 L/h, flusso del gas di desolvatazione = 1,200 L/h.

### 3.2.6 Validazione del metodo

Il metodo è stato completamente validato in matrice urinaria e cheratinica (capelli) in accordo ai più recenti criteri internazionali di validazione della tossicologia analitica (24-26). I valori sono riportati in **Tabella 1**. La retta di taratura è stata ottenuta mediante

l'iniezione di campioni a concentrazione nota di ciascun analita, (range di concentrazione tra LOQ e 500 ng/mL per le urine e tra il LOQ e 10 ng/mg per i capelli). Linearità, sensibilità (limite di rilevazione (LOD) e LOQ), precisione, accuratezza e *carryover* sono stati calcolati iniettando cinque diverse repliche dei punti di calibrazione (cinque punti per ciascuna curva di calibrazione, compreso il LOQ come punto più basso) e cinque diverse repliche dei controlli di qualità (QC) alle seguenti concentrazioni: QC-1:31,5 ng/mL, QC-2=87 ng/mL, QC-3= 750 ng/mL nelle urine; QC-1= 0,5 ng/mg, QC-2= 3,5 ng/mg, QC-3= 7 ng/mg nei capelli.

La regressione lineare  $1/x^2$  è stata utilizzata per definire la retta di calibrazione. E' stato inoltre verificato l'effetto di tre cicli di congelamento (-20°C) e scongelamento su cinque diverse aliquote di campioni QC. La valutazione della soppressione/aumento ionico dovuto all'effetto matrice (ME), il recupero estrattivo e l'efficienza del processo di estrazione (PE), è stata effettuata mediante il disegno sperimentale proposto da Matuszewski et al (26).



**Fig. 4** Strumentazione UHPLC-MS/MS.

**Tabella 1:** Parametri della spettrometria di massa per analiti e standard interno in esame.

Velocità di scansione (il d-well time e le detection windows sono stati impostati in fase di validazione).

Analita	Tempo di ritenzione	MRM transitions					
		Quantifier MRM transition			Qualifier MRM transition		
		m/z	CV(v)	CE (eV)	m/z	CV(v)	CE (eV)
N-Deetil-dorzolamide	0.90	297.1>135.1	30.0	26.0	297.1>199.0	30.0	14.0
Dorzolamide	1.00	325.1>135.1	25.0	28.0	325.1>199.0	25.0	18.0
Dorzolamide-d <sub>5</sub> (IS)	1.02	330.1>135.1	30.0	30.0	330.1>199.0	30.0	18.0
O-Desmetil-brinzolamide	1.56	370.0>136.9	30.0	30.0	370.0>181.0	30.0	24.0
Acetazolamide-d <sub>3</sub> (IS)	2.60	226.1>73.3	30.0	34.0	226.1>165.0	30.0	22.0
Acetazolamide	2.60	223.05>73.3	30.0	34.0	223.1>163.0	30.0	22.0
Brinzolamide	4.12	384.0>217.05	30.0	22.0	384.0>281.0	30.0	16.0

N-acetil-dorzolamide	4.24	367.1>88.1	30.0	16.0	367.1>135.1	30.0	32.0
----------------------	------	------------	------	------	-------------	------	------

### 3.3 Risultati dello studio

In figg. 5-8 sono riportati i cromatogrammi ottenuti dopo l'estrazione di urina e capelli addizionati con gli analiti a concentrazioni rispettivamente pari a 250 ng/mL e 7,5 ng/mg e i cromatogrammi di campioni reali appartenenti a soggetti in terapia cronica con dorzolamide. I parametri di validazione relativi alla matrice urinaria e cheratinica sono riportati in **Tabella 2 e 3**

Il *carryover* è stato valutato iniettando campioni "bianchi" (urina e capello) dopo il calibratore più concentrato e non è stato osservato trascinamento per gli analiti in esame.

La separazione cromatografica degli analiti e IS è stata completata in 8 min, incluso il lavaggio della colonna e la fase di ri-equilibrio del sistema cromatografico. Il metodo ha mostrato una buona linearità con un coefficiente di regressione lineare ( $r^2$ ) sempre maggiore di 0.99 con una percentuale di errore relativo al di sotto del 10%. Il LOD è compreso tra 0,02 e 0,17 ng/mL nelle urine e da 0,01 e 0,05 nei capelli, il LOQ oscilla tra 0,07 e 1,16 ng/mL nelle urine e da 0,02 a 0,15 ng/mg nei capelli. Il recupero estrattivo (RE) è compreso tra l'81% e il 98,1% (deviazione standard relativa, RSD tra 1,5% e 5,6%) nelle urine e dal 96,5% al 99% (RSD tra 4% e 12%) nei capelli. L'efficienza del processo estrattivo è sempre maggiore del 73% e la soppressione ionica dovuta all'effetto matrice è al di sotto del 12%.

**Tabella 2** | Parametri di validazione degli analiti in urina.

Analita	Curva di regressione e intercetta	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Accuratezza (% errore)			Precisione "intra-day" (% CV)			Precisione "inter-day" (% CV)			Recupero (%)	Effetto matrice (%)	Efficacia di processo (%)
				Low	Mid	High	Low	Mid	High	Low	Mid	High			
				QC n=15	QC n=15	QC n=15	QC n=15	QC n=15	QC n=15	QC n=15	QC n=15	QC n=15			
N-Deetil-dorzolamide	$y = 0.0085x + 0.0071$	0.07	0.24	8.6	6.6	4.0	3.0	1.8	0.8	7.7	4.9	3.5	81.0	92.9	80.0
Dorzolamide	$y = 0.0079x + 0.0237$	0.11	0.38	3.8	4.1	1.3	2.3	2.1	1.0	1.6	2.2	1.9	96.5	78.8	79.9
Acetazolamide	$y = 0.008x + 0.0307$	0.13	0.43	5.7	3.0	4.1	2.8	3.0	2.2	4.9	3.3	2.2	91.2	87.4	73.3
O-Desmetil-brinzolamide	$y = 0.0081x + 0.0193$	0.35	1.16	3.4	3.3	2.1	1.3	1.3	0.9	3.2	2.0	0.9	97.2	88.2	82.7
Brinzolamide	$y = 0.0083x + 0.028$	0.02	0.07	10.6	1.9	4.3	0.6	2.4	3.7	7.4	1.6	3.3	98.1	97.0	95.1
N-Acetil-dorzolamide	$y = 0.0092x + 0.005$	0.17	0.55	6.9	4.4	14.6	1.9	4.3	1.1	1.8	5.3	9.3	86.0	96.5	82.5

CV, coefficiente di variazione; LOD, limite di detenzione; LOQ, limite di quantificazione, QC controllo di qualità.

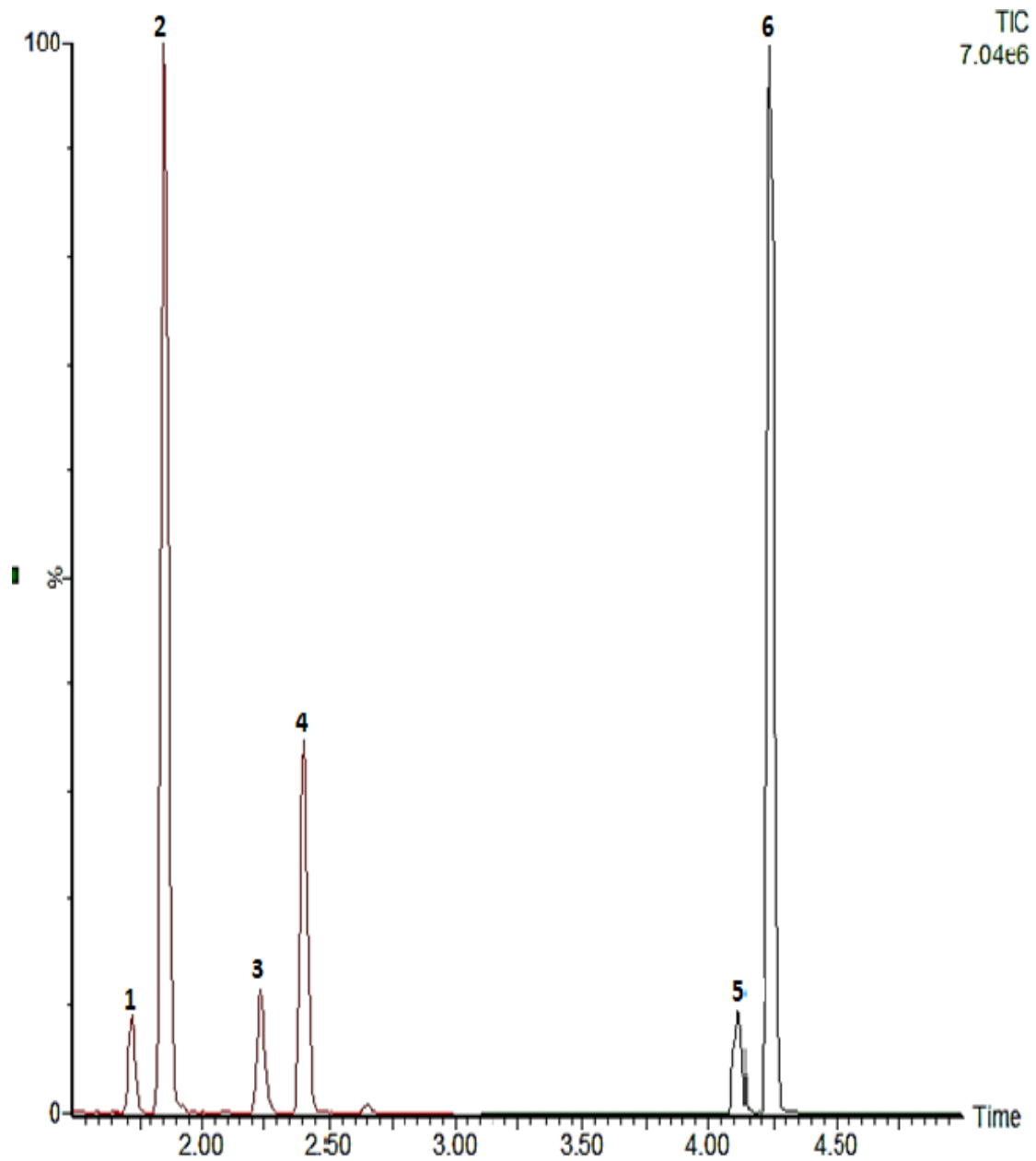
**Tabella 3** | Parametri di validazione degli analiti in matrice pilifera (capelli).

Analita	Curva di regressione intercetta	LOD (ng/mg)	LOQ (ng/mg)	Accuratezza (% errore)			Intra-assay precision (% CV)			Inter-assay precision (% CV)			Recupero (%) n = 15	Effetto matrice (%) n = 15	Processo efficiente (%) n = 15
				QC	QC	QC	QC	QC	QC	QC	QC	QC			
				basso	medio	alto	basso	medio	alto	basso	medio	alto			
				n = 15	n = 15	n = 15	n = 15	n = 15	n = 15	n = 15	n = 15	n = 15			
N-Deethyl-dorzolamide	$y=0.0067x+0.008$	0.01	0.04	14.6	5.4	5.0	2.1	5.0	1.6	14.6	5.2	6.7	96.5	78.0	75.0
Dorzolamide	$y=0.0081x+0.05$ 11	0.01	0.02	9.5	4.6	1.6	0.8	4.5	0.9	12.4	4.7	2.1	97.0	92.7	90.1
Acetazolamide	$y=0.0075x+0.01$ 17	0.01	0.03	4.6	6.4	1.4	4.6	1.2	0.9	7.2	1.5	0.9	97.9	90.5	88.7
O-Desmethyl-brinzolamide	$y=0.0069x+0.04$ 33	0.05	0.15	4.4	9.1	1.7	5.1	6.1	0.8	6.2	5.6	1.5	97.4	91.2	89.0
Brinzolamide	$y=0.008x+0.032$ 2	0.02	0.06	2.1	6.5	3.5	1.6	3.0	1.7	1.9	5.0	4.2	99.0	96.6	95.6
N-Acetyl-dorzolamide	$y=0.0098x+0.00$ 7	0.01	0.02	4.1	2.6	1.4	5.8	4.1	1.4	4.8	3.1	1.3	99.0	89.9	90.0



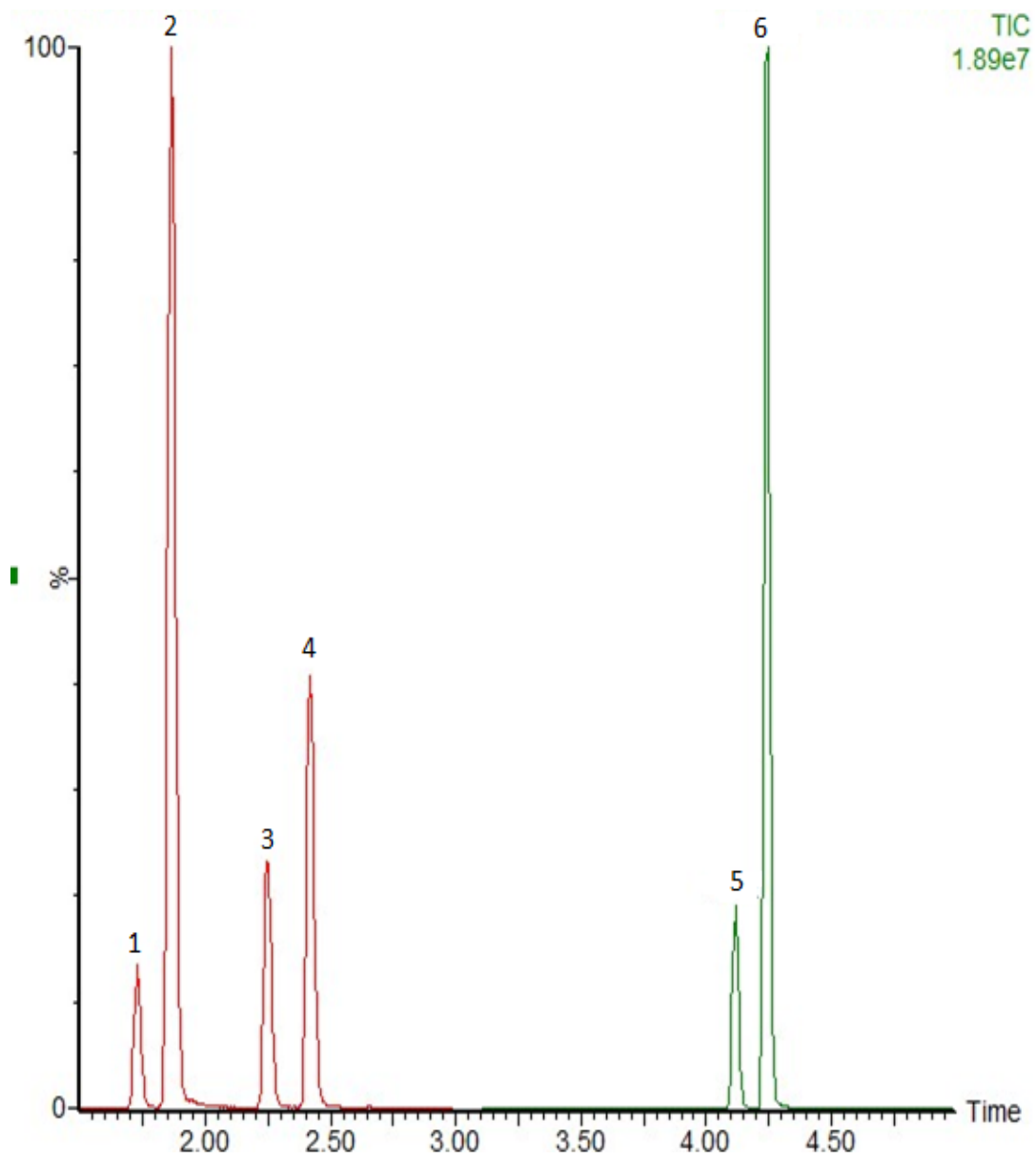
I soggetti che hanno preso parte allo studio sono stati reclutati nel Reparto di clinica oculistica degli Ospedali Riuniti di Ancona, Ospedale Universitario dell'Università Politecnica delle Marche. La numerosità campionaria totale raggiunta è di 20 soggetti e si compone di 12 soggetti di sesso maschile e 8 di sesso femminile. Da tutti è stato ottenuto un campione di urina, mentre la ciocca di capelli destinata alla analisi segmentale centimetro per centimetro è stata fornita da 19 di loro.

Tutti i pazienti assumevano in cronico una terapia antiglaucomatosa cronica per uso oftalmico: 14 di loro facevano uso di colliri con principio attivo dorzolamide e gli altri 6 facevano invece uso di colliri con principio attivo brinzolamide.



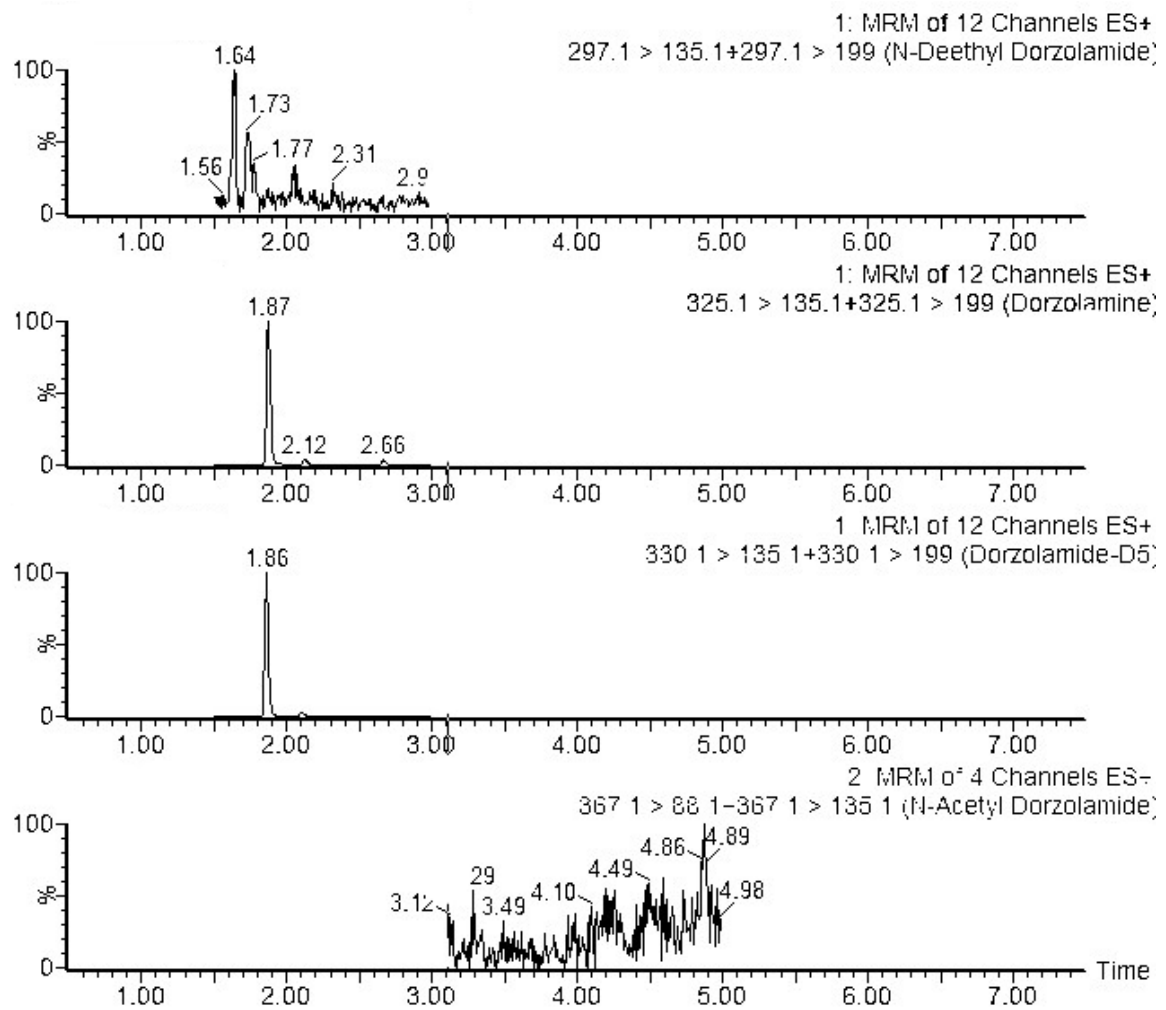
1: N-deetil-dorzolamide; 2: dorzolamide; 3: acetazolamide; 4: O-Desmetil-brinzolamide; 5: brinzolamide, 6: N-acetil-dorzolamide

**Fig. 5** Cromatogramma relativo a campione cheratinico addizionato con gli analiti a concentrazione pari a 7,5 ng/mg.

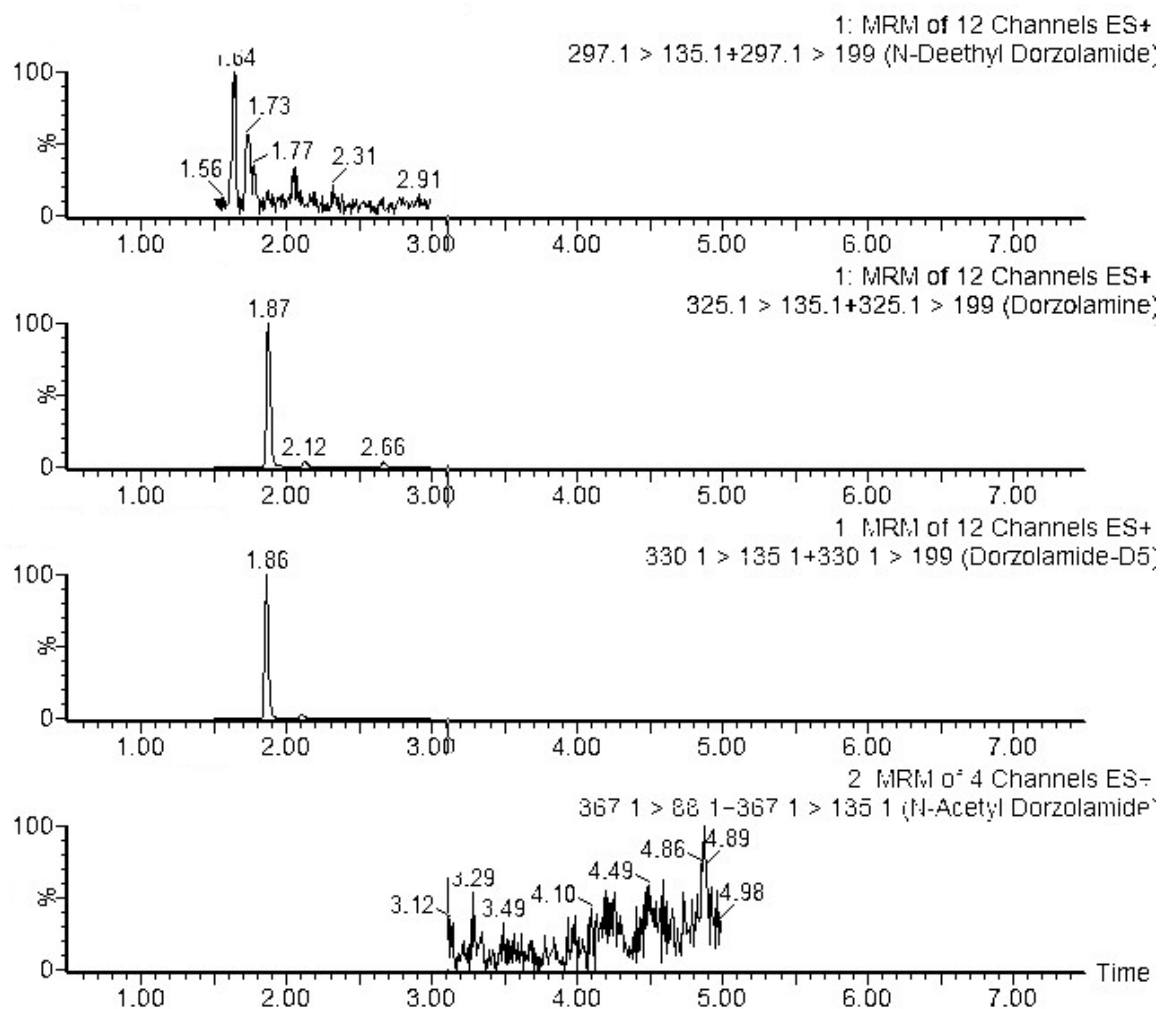


1: N-deetil-dorzolamide; 2: dorzolamide; 3: acetazolamide; 4:O-Desmetil-brinzolamide; 5: brinzolamide, 6: N-acetil-dorzolamide

**Fig. 6:** Cromatogramma relativo a campione urinario addizionato con gli analiti a concentrazione pari a 350 ng/mL.



**Fig. 7:** Cromatogramma relativo a campione cheratinico appartenente a soggetto in terapia con dorzolamide. Concentrazioni rilevate: 0,09 ng/mg di N-deetil-dorzolamide (tempo di ritenzione 1.64 min), 16,21 ng/mg di dorzolamide (tempo di ritenzione 1.87 min). N-acetil-dorzolamide NR.



**Fig 8:** Cromatogramma relativo a campione urinario appartenente a soggetto in terapia con dorzolamide. Concentrazione rilevate: 4,63 ng/mL di N-deetil-dorzolamide (tempo di ritenzione 1.64 min), 20,08 ng/mL di dorzolamide (tempo di ritenzione 1.87 min). N-acetil-dorzolamide NR.

Nella **Tabella 4** sono riportati i risultati delle analisi svolte, dove tutti i 20 soggetti esaminati sono risultati positivi. In particolare, nelle urine sono stati rilevati valori di positività con un range da 20,08 ng/mL a 777,68 ng/mL per la dorzolamide, da 36,11 ng/mL a 182,43 ng/mL per la brinzolamide, da 4,63 ng/mL a 265,99 ng/mL per il metabolita N-deetil-dorzolamide, da 0,013 ng/mL a 0,20 ng/mL per il metabolita N-acetil-dorzolamide ed infine da 0,15 ng/mL a 1,31 ng/mL per il metabolita O-desmetil-brinzolamide.

Su matrice cheratinica sono stati rilevati range da 0,082 ng/mg a 5,29 ng/mg di dorzolamide, da 0,29 ng/mg a 6,24 ng/mg di brinzolamide e da 0,016 ng/mg a 0,09 ng/mg del metabolita N-deetil-dorzolamide. I due metaboliti O-desmetil-brinzolamide ed N-acetil-dorzolamide non sono invece stati rilevati nei capelli.

**Tabella 4:** La concentrazione nelle urine (U) è indicata in ng/mL; la concentrazione nei capelli (C) è indicata in ng/mg.

ID campione	Matrice	N-Deetil-			O-Desmetil-		N-acetil-dorzolamide
#1	U	4,63	20,08	-	-	-	0,20
	C	0,09	16,21	-	-	-	-
#2	U			-	0,73	36,11	-
	C			-	-	6,24	-
#3	U	31,04	72,96	-	-	-	0,02
	C	0,03	0,65	-	-	-	-
#4	U	25,79	90,88	-	-	-	0,08

	C	0,02	0,082	-	-	-	-
#5	U	-	-	-	1,31	182	-
	C	-	-	-	-	0,29	-
#6	U	18,96	51,33	-	-	-	0,02
	C	-	0,25	-	-	-	-
#7	U	-	-	-	0,41	79,19	-
	C	-	-	-	-	2,36	-
#8	U	-	-	-	0,23	59,24	-
	C	-	-	-	-	0,51	-
#9	U	100,85	518,68	-	-	-	0,13
	C	0,025	0,23	-	-	-	-
#10	U	86,61	206,92	-	-	-	0,013
	C	0,076	3,43	-	-	-	-
#11	U	-	-	-	0,36	38,86	-
	C	-	-	-	-	0,59	-
#12	U	-	-	-	0,15	46,21	-
	C	-	-	-	-	0,70	-
#13	U	195,44	450,16	-	-	-	-
	C	0,016	0,34	-	-	-	-
#14	U	18,44	51,26	-	-	-	0,054

	C	0,064	5,29	-	-	-	-
#15	U	37,37	260,20	-	-	-	0,08
	C	0,03	1,36	-	-	-	-
#16	U	65,54	159,65	-	-	-	-
	C	-	0,45	-	-	-	-
#17	U	35,52	150,77	-	-	-	0,15
	C	-	0,36	-	-	-	-
#18	U	265,99	777,68	-	-	-	0,05
	C	0,06	1,96	-	-	-	-
#19	U	98,72	252,00	-	-	-	-
	C non disponibi li						
#20	U	15,66	31,59	-	-	-	0,67
	C	3,02	8,14	-	-	-	-

Nella **Tabella 5** sono riportati i risultati relativi al secondo gruppo di soggetti reclutati: si tratta di 25 soggetti, di cui 15 di sesso maschile e 10 di sesso femminile.

Quasi tutti avevano un legame molto stretto con gli assuntori cronici di farmaci: 16 di loro erano coniugi dei pazienti, altri 5 erano figli, 3 di loro avevano altri legami di parentela ed 1 soggetto era un convivente senza legami di parentela.

Tale gruppo di congiunti e conviventi è stato testato solo per la dorzolamide, sia su matrice urinaria che su matrice cheratinica, ed è emerso che dei 25 campioni di urine analizzati solo



due sono risultati debolmente positivi, mentre altri due erano sotto il limite di quantificazione.

In nessuno dei casi esaminati in cui si è verificata una contaminazione urinaria è stata rilevata la presenza di inibitori delle anidrasi carboniche nei capelli.

**Tabella 5:** Soggetti conviventi di assuntori di dorzolamide per uso oftalmico

<u>Soggetto n.</u>	<u>Età/Sesso</u>	<u>Rapporto di parentela</u>	<u>Dorzolamide in Capelli (ng/mg)</u>	<u>Dorzolamide in Urine (ng/mL)</u>
1	28/M	figlio di madre assuntrice	neg	neg
2	32/M	figlio di madre assuntrice	neg	<b>&lt;LOQ</b>
3	64/M	fratello di donna assuntrice	neg	neg
4	41/M	figlio di madre assuntrice	neg	neg
5	63/F	moglie di assuntore	neg	neg

6	79/M	marito di assuntrice	neg	<u>&lt;LOQ</u>
7	81/M	marito di assuntrice	neg	neg
8	24/F	figlia di assuntrice	neg	<u>0,97</u>
9	77/M	marito di assuntrice	neg	neg
10	67/F	moglie di assuntore	neg	neg
11	59/F	moglie di assuntore	neg	neg
12	59/F	moglie di assuntore	neg	neg
13	58/M	marito di assuntrice	neg	<u>0,89</u>
14	45/F	convivente di assuntrice	neg	neg
15	75/M	marito di assuntrice	neg	neg
16	61/M	marito di assuntrice	neg	neg
17	76/M	cugino di assuntrice	neg	neg

18	49/F	moglie di assuntore	neg	neg
19	82/M	marito di assuntrice	neg	neg
20	41/M	marito di assuntrice	neg	neg
21	19/M	nipote di assuntrice	neg	neg
22	68/F	moglie di assuntore	neg	neg
23	68/F	moglie di assuntore	neg	neg
24	19/M	figlio di padre assuntore	neg	neg
25	59/F	moglie di assuntore	neg	neg

LOQ: 0,38 ng/mL in urina

### 3.4 Discussione

Il metodo analitico in cromatografia liquida ad ultra-prestazione accoppiata alla spettrometria di massa tandem (UHPLC/MS/MS) è stato sviluppato e completamente validato nelle matrici urinaria e cheratinica e ha fornito interessanti risultati che possono aprire la strada a nuovi scenari di ricerca. Trattasi di un metodo analitico del tutto innovativo, che, per la prima volta, permette di includere in un'unica analisi le molecole di interesse (dorzolamide, brinzolamide ed acetazolamide) farmacologicamente attiva insieme ai rispettivi metaboliti.

Ad oggi, infatti, non esiste una metodologia dedicata che possa misurare con accuratezza e precisione quantità di sostanza parente o metaboliti nel range di nanogrammi per millilitro di urine ed è del tutto assente una metodologia su matrice cheratinica.

La scelta di una metodologia in cromatografia liquida ad ultra-prestazione accoppiata alla spettrometria di massa (UHPLC-MS/MS) è dovuta alla possibilità di avere un limite di quantificazione delle sostanze anche al di sotto del nanogrammo per millilitro di urina.

Pertanto, è possibile determinare anche quantità minime dei tre inibitori della anidrase carbonica e loro metaboliti per poter eventualmente dimostrare casi di contaminazione accidentale.

Solamente uno studio di Pecori Giraldi (14) ha dimostrato che la somministrazione topica di collirio con dorzolamide a pazienti con glaucoma, 2 volte al giorno per 7 giorni consecutivi risulta in concentrazioni urinarie tra 210 e 2470 ng/ml. Non esistono invece dati di concentrazioni urinarie di brinzolamide e/o metaboliti in assuntori del farmaco. Per nessuno dei due farmaci esistono valori di range urinari popolazionali, né è stato mai verificato se l'uso cronico a fini medici o non medici (es. a fini di doping) sia riscontrabile con l'analisi di tali sostanze in matrice cheratinica.

Questa metodica ha reso possibile rilevare una esposizione cronica ad un farmaco e farne una analisi quantitativa molto precisa nell'ordine di nanogrammi su millilitro (di urina) e nanogrammi su milligrammo (di capelli). Come riportato nella sezione precedente, tutti i soggetti assuntori cronici di farmaci in terapia cronica sono risultati positivi.

Nel caso dei contatti fortuiti, individuati nel nostro studio tra i parenti e/o conviventi dei pazienti in terapia cronica, è emerso che gli inibitori dell'anidraasi carbonica, anche se raramente, possono comunque essere rilevati nelle urine, anche se in concentrazioni di molto inferiori rispetto a quelle di un assuntore abituale; tracce di farmaco non sono invece rilevabili nei capelli.

L'assunzione accidentale ed involontaria appare difficile, ma possibile. Questa avverrebbe verosimilmente a causa dell'ingestione di alimenti manipolati da assuntori cronici e quindi contaminati da tracce di questi farmaci.

Questo ultimo dato in particolare si presta ad una interpretazione estremamente importante e significativa per il medico legale, perché qualora l'eventualità della positività urinaria si verificasse in un atleta sottoposto ad un controllo random, non si tratterebbe in maniera inequivocabile di una violazione delle norme antidoping. Si apre così un filone di ricerca interessante, volto alla implementazione del codice normativo antidoping nei riguardi degli eventi avversi riconducibili all'uso di agenti mascheranti (classe S5 della Lista Proibita WADA).

Attualmente mancano dati relativi alle singole somministrazioni occasionali, motivo per cui le future applicazioni di questo progetto prevedono l'inclusione e lo studio attraverso questa stessa metodologia analitica di campioni provenienti da soggetti che siano stati sottoposti proprio a singole somministrazioni di farmaco diuretico, in modo da simulare una assunzione illecita a fini di doping.

In conclusione, la conoscenza e lo sviluppo di questa nuova metodologia analitica rappresentano una prospettiva stimolante, in quanto possono avere importanti ripercussioni in vari ambiti:

- *In primis* in ambito clinico, dove la cromatografia liquida ad ultra-prestazione accoppiata alla spettrometria di massa tandem (UHPLC/MS/MS) potrebbe essere estremamente utile per verificare la compliance dei pazienti a terapie croniche impiegate in molteplici patologie;
- In campo tossicologico forense per poter rilevare la presenza e la concentrazione di queste ed altre molecole (farmaci, sostanze d'abuso) su campioni biologici di vario tipo;
- Infine, in ambito di doping, con lo scopo di perfezionare le misure antidoping e introdurre un sistema valido, accurato ed efficace nell'individuare le varie sostanze nei campioni appartenenti agli atleti esaminati.

### **3.5 Conclusioni**

La metodologia analitica in cromatografia liquida ad ultra-prestazione accoppiata alla spettrometria di massa tandem (UHPLC/MS/MS) è stata validata con successo nelle due matrici urinaria e cheratinica, pertanto rappresenta un approccio promettente ed innovativo nella rilevazione degli inibitori dell'anidrasi carbonica.

Occorre sottolineare che, nel caso dei diuretici ad uso topico oftalmico su cui si è incentrata la nostra esperienza, una lieve positività urinaria è stata riscontrata anche in campioni prelevati da soggetti contigui per parentela e/o convivenza ad assuntori cronici di farmaco, testimoniando il fatto che una contaminazione involontaria ed inevitabile sia rara ma possibile.

Per quanto concerne le applicazioni nell'ambito del doping sarà sicuramente necessario ampliare la casistica del presente studio, includendo analisi su ulteriori campioni che consentano una più ampia applicazione della metodica analitica qui introdotta con importanti ripercussioni medico-legali e la possibilità di impiego in ambito clinico, tossicologico-forense e doping.

## BIBLIOGRAFIA

1. *Norme sportive antidoping. Documento tecnico-attuativo del Codice Mondiale Antidoping WADA e dei relativi Standard internazionali.* NADO Italia, gennaio 2020
2. . Petrucci M, Berti B, Pleimes RM. *Normativa antidoping: storia, diritti e doveri dell'atleta. In: eds, Doping e cultura antidoping. Strumenti e considerazioni.* Fisciano: Kernel Editing Division 2019; 2: 12-21.
3. *The world anti-doping code international standard prohibited list.* WADA; January 2021
4. Reardon C, Creado S. *Drug abuse in athletes.* *Subst Abuse Rehabil* 2014; 5: 95-105.
5. Annunziato L, Di Renzo GF. *Trattato di Farmacologia.* 2. Napoli: Idelson-Gnocchi; 2015; 65: 1020-1032.
6. Bergamaschi MM, Crippa. *Why should cannabis be considered doping in sports?.* *Front Psychiatry* 2013; 4:32.
7. Gil F, de Andrade AG, Castaldelli Maia JM. *Discussing prevalence, impacts and treatment of substance use disorders in athletes.* *Int Rev Psychiatry* 2016; 28: 572-578.
8. Pigozzi F, Di Gianfrancesco A, Zorzo M, Bach N, McDonag D, Cummiske J, Di Luigi I, Pitsiladi Y, Borrione P. *Why glucocorticosteroids should remain in the list of prohibited substances: a sport medicine viewpoint.* *International Journal of Immunopathology and pharmacology* 2012; 25: 19-24.



9. Ponticello GS, Sugrue MF, Plazonnet B, Durand-Cavagna G. *Dorzolamide, a 40-year wait. From an oral to a topical carbonic anhydrase inhibitor for the treatment of glaucoma.* Pharm Biotechnol 1998; 11: 555-574.
10. Schmitz K, Banditi P, Motschmann M, Meyer FP, Behrens-Baumann W. *Population pharmacokinetics of 2% topical dorzolamide in the aqueous humor of humans.* Invest Ophthalmol Vis Sci 1999; 40: 1621-1624.
11. Supran CT. *Carbonic anhydrase inhibitors as emerging agent for treatment and imaging of hypoxic tumors.* Expert Opin Investig Drugs 2018; 27: 963-970.
12. Lomellino C, McKenna R. *Carbonic anhydrase inhibitors: a review on the progress of patent literature (2011-2016).* Expert Opin Ther Pat 2016; 26: 947-56.
13. Martens-Lobenhoffer J, Banditi P. *Clinical pharmacokinetics of dorzolamide.* Clin Pharmacokinet 2002; 41:197-205.
14. Pecori Giralardi J, Botrè F, Mazzarino M, Rossi F, Paone E. *Detection of dorzolamide and of N-desethyl-dorzolamide in urine following topical administration in glaucoma patients.* Bollettino di Oculistica 2000; 3: 325-330.
15. Kintz P ed. *Drug testing in hair.* CRC Press, Boca Raton, Florida; 1996.
16. Cirimele V, Kintz P, Doray S, Ludes B. *Determination of chronic abuse of the anaesthetic agents midazolam and propofol as demonstrated by hair analysis.* Int J Legal Med 2002; 116: 54-57.
17. Kintz P. *Testing for anabolic steroids in hair: a review.* Leg Med (Tokyo) 2003; 5: 29-33.

18. La Cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC),” Available at: <http://www.bmscience.net/blog/la-cromatografia-liquida-ad-alta-prestazione-hplc/>, n.d.
19. F. De Sio. Introduzione All’HPLC - Manuale per Corso Di Formazione “Addetti Controllo Qualità” 1997/1998, n.d.
20. Loos G, Van Schepdael A, Cabooter D. *Quantitative mass spectrometry methods for pharmaceutical analysis*. Philos Trans A Math Phys Eng Sci 2016; 28: 374-379.
21. Bandu R, Mok HJ, Kim KP. *Phospholipids as cancer biomarkers: Mass spectrometry-based analysis*. Mass Spectrom Rev 2018; 37: 107-138.
22. Politi L, Groppi A, Poletti A. *Applications of liquid chromatography-mass spectrometry in doping control*. J Anal Toxicol. 2005; 29: 1-14.
23. Lo Faro AF, Tini A, Gottardi M, Pirani F, Sirignano A, Giorgetti R, Busardò FP. *Development and validation of a fast ultra high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) method for determining carbonic anhydrase inhibitors and their metabolites in urine and hair*. Drug Test Anal 2021. Epub ahead of print.
24. S.M.R. Wille SMR, Coucke W, De Baere T, Peters FT. *Update of standard practices for new method validation in forensic toxicology*. Curr. Pharm. Des 2017; 23: 5442-5454.
25. Peters FT, Wissenbach DK, Busardò FP, Marchei E, Pichini S. *Method development in forensic toxicology*. Curr. Pharm. Des 2017; 23: 5455-5467.

26. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. *Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS*. Anal. Chem 2003; 75: 3019-3030.

## Ringraziamenti

Un sentito ringraziamento al Prof. Francesco Paolo Busardò, ancor prima che Relatore di questa tesi, mio Maestro, che in questi anni mi ha sempre sapientemente guidato facendo crescere in me la passione per la Tossicologia Forense e la curiosità scientifica.

Al Dott. Alfredo Fabrizio Lo Faro esprimo la mia più sentita gratitudine per avermi supportato nell'elaborazione della tesi e per aver condiviso l'esecuzione della parte sperimentale.

Un grazie speciale alla Dott.ssa Annagiulia Di Trana, dottoranda del laboratorio diretto dal Prof. Busardò per i suoi preziosi consigli e disponibilità.

Ringrazio la Comedical di Trento e tutto lo staff per la partnership ed il supporto analitico.

Infine, un doveroso ringraziamento sento di porgerlo alle Dottoresse Roberta Pacifici e Simona Pichini dell'Istituto Superiore di Sanità per la supervisione tecnico-scientifica della parte sperimentale della tesi nonché per avermi permesso di frequentare e collaborare con il Centro Nazionale Dipendenze e Doping dell'ISS.