



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA "TOR VERGATA"

FACOLTA' DI SCIENZE MM.FF.NN.

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE CHIMICHE

XXI CICLO DEL CORSO DI DOTTORATO

**TECNICHE SPETTROMETRICHE APPLICATE ALLA
VALUTAZIONE DELL'ESPOSIZIONE DELLA POPOLAZIONE AD
ELEMENTI IN TRACCIA**

Daniela Mattei

A.A. 2007/2008

Docente Guida: Prof. Giuseppe Palleschi
Tutor: Dr. Alessandro Alimonti

Coordinatore: Prof. Bruno Crociani

1. INTRODUZIONE	7
1.1. ATTIVITÀ DI RICERCA	8
1.1.1. Scopo del lavoro di ricerca	8
1.1.2. Articolazione della ricerca	8
Tossicità e metabolismo del piombo	15
Esposizione a piombo e deficit cognitivi nei bambini	17
1.2. IL MONITORAGGIO BIOLOGICO E I VALORI DI RIFERIMENTO PER GLI ELEMENTI IN TRACCIA	18
1.2.1. Il monitoraggio dell'esposizione	18
1.2.2. L'interesse per il biomonitoraggio	19
1.2.3. Bioindicatori e limiti ambientali	21
1.2.4. Valori di Riferimento per gli elementi in traccia	27
2. PARTE SPERIMENTALE	39
2.1. BIOMONITORAGGIO DEI LIVELLI URINARI DI PLATINO, RODIO E PALLADIO MEDIANTE SF-ICP-MS IN UNA POPOLAZIONE PROFESSIONALMENTE ESPOSTA	40
2.1.1. Soggetti	40
2.1.2. Raccolta e trattamento dei campioni	41
2.1.3. Analisi chimica	42
2.1.4. Analisi statistica	44
2.2. SVILUPPO E APPLICAZIONE DI UN METODO SF-ICP-MS AD ELEVATA PRODUTTIVITÀ PER LA DETERMINAZIONE SIMULTANEA DI 20 ELEMENTI IN TRACCIA NEL SANGUE	45
2.2.1. Reagenti e soluzioni standard	45
2.2.2. Tecnica strumentale	45
2.2.3. Reclutamento dei soggetti	47
2.2.4. Campionamento	48
2.2.5. Preparazione dei campioni e calibrazione	48

2.3.	ESTENSIONE DEL CAMPO DI APPLICAZIONE DEL METODO SF-ICP-MS A TESSUTI BIOPTICI PER LO SCREENING PRECOCE DEL TUMORE DEL COLON RETTO	50
2.3.1.	Reclutamento dei pazienti, campionamento, conservazione e trattamento dei campioni	50
2.3.2.	Reagenti e strumentazione	51
2.3.3.	Trattamento dei campioni e analisi dei dati	53
2.4.	DETERMINAZIONE DI PIOMBO NEL LATTE MATERNO MEDIANTE SF-ICP-MS E SENSORI ELETTROCHIMICI	55
2.4.1.	Campioni e materiali di riferimento	55
2.4.2.	SF-ICP-MS	56
2.4.3.	Voltammetria di stripping anodico ad onda quadra	57
3.	RISULTATI E DISCUSSIONE	66
3.1.	BIOMONITORAGGIO DEI LIVELLI URINARI DI PLATINO, RODIO E PALLADIO MEDIANTE SF-ICP-MS IN UNA POPOLAZIONE PROFESSIONALMENTE ESPOSTA.....	69
3.1.1.	Prestazioni analitiche	69
3.1.2.	Contenuto di EGP nelle urine	70
3.1.3.	Discussione	72
3.2.	SVILUPPO DI UN METODO SF-ICP-MS, AD ELEVATA PRODUTTIVITÀ, PER LA DETERMINAZIONE SIMULTANEA DI 20 ELEMENTI IN TRACCIA NEL SANGUE	74
3.2.1.	Prestazioni analitiche	74
3.2.2.	Contenuto dei 20 elementi nella popolazione di riferimento.....	76
3.2.3.	Discussione	76
3.3.	ESTENSIONE DEL CAMPO DI APPLICAZIONE DEL METODO SF-ICP-MS A TESSUTI BIOPTICI PER LO SCREENING PRECOCE DEL TUMORE DEL COLON RETTO	79
3.3.1.	Prestazioni analitiche	79
3.3.2.	Contenuto degli elementi chimici in tessuti bioptici	80
3.4.	DETERMINAZIONE DI PIOMBO NEL LATTE MATERNO MEDIANTE SENSORI ELETTROCHIMICI E SF-ICP-MS	85
3.4.1.	SF-ICP-MS	85
3.4.2.	Voltammetria di stripping anodico ad onda quadra (SWASV).....	85
3.4.3.	Discussione	86

4. CONCLUSIONI	88
----------------	----

5. BIBLIOGRAFIA	92
-----------------	----

APPENDICE A

La spettrometria di massa nelle analisi delle matrici complesse
Analisi di matrici complesse: potenzialità e problemi analitici
Eliminazione delle interferenze spettrali

APPENDICE B

Voltammetria: i principi
Voltammetria di ridissoluzione (o di stripping)

APPENDICE C

Elenco delle pubblicazioni scientifiche prodotte nell'attività di tesi

ABSTRACT

Le attività sono state finalizzate, nelle loro diverse articolazioni, all'implementazione di nuovi criteri e metodologie di biomonitoraggio per la valutazione dell'esposizione ad elementi in traccia di diversi gruppi di popolazione.

È stata valutata l'esposizione professionale ad elementi del gruppo del platino (palladio, platino e rodio) mediante un approccio innovativo ICP-MS, basato su un rivelatore ad alta risoluzione (SF-ICP-MS), proposti come efficaci biomarcatori di esposizione per popolazioni professionalmente esposte a traffico veicolare.

È stato inoltre sviluppato e validato un metodo analitico multielementare SF-ICP-MS altamente sensibile e specifico ad elevata produttività per la determinazione di oltre venti elementi in traccia nel sangue; il metodo è stato applicato alla definizione di valori di riferimento della popolazione generale per il biomonitoraggio per i metalli.

Parallelamente, sono state condotte indagini sperimentali nell'ambito dello screening di patologie neoplastiche, in particolare approfondendo il valore predittivo di elementi chimici tossicologicamente significativi nella diagnosi precoce del tumore del colon-retto. I risultati hanno evidenziato una probabile correlazione inversa tra livelli di Ba, Cd e Hg ed insorgenza di lesioni, e confermato la tendenza ad accumulo di Fe e Se nei tessuti patologici.

L'ultima fase delle ricerche, attualmente in corso, ha per oggetto l'elaborazione di metodi di screening e conferma, rispettivamente mediante sensori elettrochimici e SF-ICP-MS, applicati allo studio dell'esposizione - attraverso il latte materno - di gruppi sensibili di popolazione (neonati) ad un elemento neurotossico come il piombo.

I modelli sperimentali, verificati in settori differenti e complessi nel corso delle ricerche di tesi, hanno dimostrato notevoli potenzialità applicative e particolare versatilità. Possono essere pertanto proposti come approccio innovativo per l'implementazione di programmi di biomonitoraggio e per la definizione di strategie di prevenzione primaria del rischio correlato ad elementi in traccia a tutela della salute umana.

1. INTRODUZIONE

1.1. ATTIVITÀ DI RICERCA

1.1.1. Scopo del lavoro di ricerca

Lo scopo del lavoro di ricerca, svolto presso il reparto di Bioelementi e Salute, del Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria dell'Istituto Superiore di Sanità, è consistito fondamentalmente nello sviluppo e applicazione di metodi SF-ICP-MS per la determinazione di elementi chimici essenziali o tossici in matrici biologiche in diversi gruppi di popolazione (generale, professionalmente esposta e patologica).

Infine, in fase ancora preliminare, si sta procedendo a sviluppare metodi di screening basati sull'utilizzo di sensori elettrochimici per la rilevazione del piombo nel latte materno.

1.1.2. Articolazione della ricerca

In particolare, le attività di ricerca svolte, sono consistite in 4 successive fasi applicative tra loro interconnesse:

- 1) Biomonitoraggio dei livelli urinari di Pt, Rh e Pd mediante SF-ICP-MS in una popolazione professionalmente esposta;
- 2) Sviluppo di un metodo SF-ICP-MS, ad elevata produttività, per la determinazione simultanea di 20 elementi in traccia nel sangue ed applicazione per la definizione di valori di riferimento;
- 3) Estensione del campo di applicazione del metodo SF-ICP-MS a tessuti biotici per lo screening precoce del tumore del colon retto;
- 4) Determinazione di Pb nel latte materno mediante sensori elettrochimici e SF-ICP-MS.

1.1.2.1. Biomonitoraggio dei livelli urinari di Platino, Rodio e Palladio mediante SF-ICP-MS in una popolazione professionalmente esposta

Quest'attività di ricerca è inserita in uno studio sulla determinazione dei livelli di Platino (Pt), Rodio (Rh) e Palladio (Pd) (EGP – Elementi del Gruppo del Platino) nelle urine di un gruppo di feretrotramvieri della città di Roma, come esempio di una popolazione notevolmente esposta all'ambiente urbano.

L'interesse per il biomonitoraggio di tali elementi, i cui effetti dannosi per la salute sono ben noti, deriva dal fatto che dal 1993 in tutti i Paesi dell'Unione Europea è diventato obbligatorio l'uso delle marmitte catalitiche per le nuove autovetture, secondo la Direttiva Europea 91/441/EEC e che proprio da tali dispositivi è stata riscontrata un'emissione consistente degli EGP che va dai ng km^{-1} ai $\mu\text{g km}^{-1}$.

In particolare, nei catalizzatori di nuova generazione, detti "a tre vie", uno strato sottile di Pd, Pt e Rh viene depositato su un substrato di γ -allumina, dispersa a sua volta su una struttura a nido d'ape di ordierite (silicati di alluminio-magnesio e/o alluminio-calcio). Tali elementi rappresentano i componenti attivi nella idrogenazione degli idrocarburi, nella ossidazione del CO e nella riduzione dei composti NOx. Il catalizzatore "a tre vie" necessita di una temperatura di oltre 250 °C per entrare in funzione, con una efficienza che aumenta fino al raggiungimento dei 400 °C e poi resta costante. Oltre gli 800 °C la perdita dei metalli è significativa e l'efficienza del catalizzatore viene notevolmente ridotta. La disattivazione chimica e il deterioramento termico e meccanico modificano la struttura del catalizzatore favorendo il rilascio di EGP dalla superficie del catalizzatore all'ambiente. In questi ultimi anni si è osservato un incremento della contaminazione ambientale da parte degli EGP proporzionale all'aumento del numero di nuove autovetture equipaggiate con tali catalizzatori; infatti, in ambiente urbano, le marmitte catalitiche sono ormai considerate la fonte primaria di emissione di EGP. Tali metalli sono emessi su particelle di allumina aventi un

diametro di 5-10 μm e l'emissione stimata ad una velocità di 50-100 km h^{-1} è compresa nell'intervallo che va dai ng km^{-1} ai $\mu\text{g km}^{-1}$. Gli EGP sono stati ritrovati in vari comparti ambientali quali particolato atmosferico, polvere stradale, suoli, vegetali cresciuti in prossimità di strade e sedimenti fluviali. La contaminazione ambientale e i possibili risvolti di sanità pubblica associati all'uso di EGP nei catalizzatori sono ancora oggi oggetto di studi. Sono ben noti sia gli effetti allergici di alcuni EGP - rinite, dermatite e asma - riscontrati in lavoratori esposti a sali di platino, sia gli effetti cancerogeni e mutageni legati all'uso di cis-platino e carbo-platino nella chemioterapia. Anche per il Pd e il Rh sono stati osservati alcuni effetti mutageni e citotossici, seppur di minore entità rispetto a quelli osservati per alcuni composti del Pt. D'altra parte, l'utilizzo delle marmitte catalitiche è ancora piuttosto recente, perciò relativamente scarsi sono le informazioni sul contenuto di questi elementi nei fluidi biologici di popolazione urbana. Alcuni recenti studi riportano livelli di Pt nelle urine di una popolazione urbana compresi tra 0,5 e 10 ng l^{-1} , mentre per il Pd tra 0,71 e 17,0 ng l^{-1} .

1.1.2.2. Sviluppo di un metodo SF-ICP-MS, ad elevata produttività, per la determinazione simultanea di 20 elementi in traccia nel sangue

L'esperienza acquisita nell'ambito degli studi di biomonitoraggio ha sottolineato la necessità di estendere il campo di applicazione ad altre matrici e ad altri elementi in traccia. Infatti, anche dallo studio della letteratura emerge come il settore analitico degli elementi in traccia è quello che, più di altri, ha permesso di tradurre la considerevole evoluzione tecnica e strumentale in una semplificazione dei metodi, a vantaggio della velocità, dei costi di analisi e dell'accuratezza del risultato finale.

A tal fine, per effettuare studi di biomonitoraggio una fase particolarmente importante e delicata è rappresentata dalla programmazione del pre-trattamento dei campioni; fase per la quale è opportuno prevedere di effettuare soltanto quelle manipolazioni che si ritengono effettivamente

indispensabili. La semplice diluizione di fluidi biologici come siero od urina (come nel caso della determinazione degli EGP nelle urine) può essere considerato un trattamento sufficiente purché non sia di ostacolo per la successiva analisi strumentale. Infatti, una lunga serie di determinazioni di siero o di urina soltanto diluiti può comportare l'otturazione del nebulizzatore e/o dell'iniettore della torcia dello spettrometro, compromettendo la qualità dell'analisi finale. Sarà pertanto opportuno valutare il giusto compromesso tra qualità della mineralizzazione e rischio di diminuire le prestazioni strumentali, tenendo anche conto che un pre-trattamento più spinto (maggior numero di fasi e di quantità di reagenti aggiunti) aumenta il rischio di possibili contaminazioni. Questo significa che le differenti procedure riportate in letteratura e/o proposte nei manuali, hanno bisogno di una convalida sul campo e di eventuali adattamenti alla situazione analitica reale.

Diverse sono le tipologie di pre-trattamento di un campione biologico per la determinazione di elementi in traccia riportate nella letteratura più recente; esse comprendono diluizione con acqua pura, con NH_4OH (per la distruzione dei globuli rossi), diluizione con acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) (per prevenire la perdita di elementi per precipitazione o adsorbimento), diluizione con Triton X-100 (per ridurre i problemi di intasamento del sistema nebulizzatore/iniettore/torcia), fotolisi UV, dissoluzione con tetrametilammonio idrossido (TBOH), utilizzo delle microonde (MW) in sistemi aperti o chiusi a bassa o elevata pressione previa diluizione acida dei campioni. In particolare, le MW sono particolarmente idonee per la dissoluzione di matrici più complesse rispetto a siero e urine, come sangue intero e tessuti.

In quest'ambito, nel nostro caso, è stato sviluppato un metodo di digestione acida con MW per la matrice sangue intero per la determinazione simultanea mediante SF-ICP-MS di 20 elementi in traccia quali Al, Ba, Be, Bi, Cd, Co, Cr, Hg, Li, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Sn, Sr, Tl, V, W e Zr in campioni reali. Inoltre, la determinazione dei livelli ematici dei suddetti elementi in un gruppo

di popolazione opportunamente selezionato e con caratteristiche specifiche ha anche consentito la definizione dei corrispettivi Valori di Riferimento (VR) per i 20 elementi per la popolazione oggetto di indagine nella matrice esaminata.

1.1.2.3. Estensione del campo di applicazione del metodo SF-ICP-MS a tessuti biotici per lo screening precoce del tumore del colon- retto

Le attività di ricerca sono proseguite con l'intento sia di verificare l'applicabilità del metodo di digestione acida con MW e rivelazione tramite SF-ICP-MS - sviluppato per la matrice sangue - anche per tessuti biotici, sia di ampliare il metodo per la determinazione fino a 30 elementi in traccia in un'unica sequenza analitica.

L'applicabilità del metodo è stata verificata in tessuti biotici del colon prelevati da soggetti sani (n= 10) per la determinazione di 30 elementi in traccia mediante SF-ICP-MS. Il metodo è stato successivamente applicato per la determinazione di 15 elementi tossicologicamente rilevanti in biopsie prelevate da soggetti sani (n=17) e patologici (polipi adenomatosi) (n= 15) con lo scopo di rilevare eventuali differenze nel profilo elementare dei soggetti sani e in quello dei soggetti con polipi, vista la correlazione tra presenza di polipi adenomatosi e rischio di sviluppare il cancro del colon retto (CCR).

E' da sottolineare che le indagini nei soggetti polipotici sono state effettuate prelevando biopsie sia da polipi presenti nella mucosa del colon-retto sia da mucosa sana ubicata a circa 10 cm dal polipo. In questo modo è stato effettuato un confronto, oltre che tra mucosa di soggetti sani (H) e con polipi (P), anche tra mucosa di soggetti sani (H) e mucosa sana di soggetti con polipi (N). In più è stato effettuato, per la prima volta in letteratura, anche un confronto "interno" cioè tra mucosa sana (N) e polipo (P) proveniente dallo stesso soggetto.

L'interesse per il CCR deriva dal fatto che in Italia rappresenta la seconda causa di morte per tumore. La prevenzione secondaria è attualmente in grado di diagnosticare poco più del 50% dei casi agli stadi più precoci a causa delle limitazioni dei metodi di screening al momento disponibili che sono affetti da false positività, insufficienti sensibilità e specificità, esplorazione parziale, limitata accettabilità e possibili complicanze. Non esistono, quindi, i presupposti per proporre un unico modello di screening. In questo contesto è di fondamentale importanza anche la valutazione dei fattori di rischio del paziente. Oltre ad età, anamnesi familiare positiva, presenza di poliposi, di malattie croniche infiammatorie del colon e pregressi tumori, esistono fattori di rischio legati agli stili di vita, quali elevato apporto calorico, dieta povera di fibre, fumo ed alcol. L'esposizione a sostanze nocive – per qualità e/o quantità – sia attraverso l'ambiente che la dieta rappresenta un'esposizione “chimica” tuttora non ben considerata nel CCR. L'eziologia multifattoriale del CCR fa interagire, infatti, in modo non del tutto chiaro, parametri quali suscettibilità biologica, invecchiamento e fattori “ambientali”. Tra questi ultimi, sono da considerare alcuni elementi chimici sia per intrinseca tossicità/cancerogenicità che per coinvolgimento nella cascata di eventi che porta al danno ossidativo (DO). Ad esempio, alcuni elementi (As, Cr) aumentano, in modelli animali, l'induzione del cancro provocata da altri agenti tumorali attraverso un incremento del DO e della velocità di proliferazione e una diminuzione dell'apoptosi. Il Cr(V) - intermedio nella riduzione intracellulare di Cr(VI) a Cr(III) - catalizza reazioni simili a quella di Fenton con formazione del radicale OH[•]. E' stato riportato che anche il Cd interferisce con l'attività di enzimi antiossidanti (superossidodismutasi (SOD) e catalasi) e causa la formazione di radicali liberi (RL). Il mercurio induce la generazione di RL e inibisce enzimi detossificanti (glutathione perossidasi (GPO) e SOD) con un meccanismo che prevede la formazione di coniugati con composti tiolici (glutathione). E' inoltre noto che l'esposizione cronica a Pb, Cd, Co e Ni interferisce con i canali

ionici del Ca calmodulina-dipendenti con effetti citotossici attraverso lipoperossidazione delle membrane. Anche l'alluminio, sebbene non partecipi a reazioni redox è, comunque, in grado di rafforzare il DO indotto da Fe; sali di Al, infatti, in combinazione con Fe provocano lipoperossidazione; mentre la coppia Al^{3+}/Fe favorisce la produzione del radicale $\text{OH}^{\bullet}$. Nonostante il Cu svolga un ruolo fisiologico anti-ossidante, può sostituire il Fe nella reazione di Fenton. In presenza di $\text{O}_2^{\bullet-}$ o di specie riducenti, Cu^{2+} può essere ridotto a Cu^+ , catalizzando la formazione del $\text{OH}^{\bullet}$ da H_2O_2 nella reazione di Haber-Weiss. Infine, altri elementi, come ad es. Be, sono esplicitamente considerati potenziali cancerogeni per l'uomo.

Da quanto accennato si evince che esposizioni croniche ad elementi chimici, anche a basse dosi, possano assumere rilevanza per la salute di quei soggetti per i quali il micro-accumulo continuato si combini con una modificazione del tessuto interessato (infiammazione e DO) e una diminuita capacità di difesa (diminuzione delle difese antiossidanti). Sembra, infatti, dimostrato che l'incremento dell'incidenza tumorale nell'infiammazione cronica non sia organo-specifica ma dipenda dal processo infiammatorio stesso, anche se con meccanismo non ben conosciuto.

1.1.2.4. Determinazione del Piombo nel latte materno mediante sensori elettrochimici e SF-ICP-MS

L'ultima fase delle ricerche, che sono ancora in corso e per le quali sono disponibili risultati ancora preliminari, riguarda la rilevazione del Piombo (Pb) nel latte materno con sensori elettrochimici come metodo di screening e conferma mediante SF-ICP-MS.

L'interesse per questo contaminante si correla alla sua presenza ubiquitaria e all'elevata tossicità che si esplica soprattutto a livello di gruppi di popolazione particolarmente sensibili come i neonati. Per questi ultimi, il latte materno può rappresentare in molti casi, la principale fonte di esposizione al contaminante e pertanto tale matrice è oggetto di indagine specifica.

Sotto il profilo metodologico è da rilevare l'importanza di disporre di metodi basati sull'utilizzo di sensori elettrochimici che rappresentano una valida alternativa in termini di costi, rapidità di risposta e campo di applicazione rispetto ai tradizionali metodi di conferma quali l'SF-ICP-MS.

Le prerogative di tali metodi in termini di velocità, economicità, possibilità di miniaturizzazione ne denotano una spiccata idoneità per effettuare analisi sul campo nell'ambito di studi di biomonitoraggio.

Lo stato delle conoscenze sulla tossicità del piombo e il rischio connesso con l'esposizione al piombo da parte di una categoria particolarmente sensibile quale i bambini sono riportati di seguito.

Tossicità e metabolismo del piombo

Il piombo metallico e i suoi composti inorganici sono classificati dalla IARC in classe 2B, ossia come possibili cancerogeni per l'uomo, sulla base di evidenza di cancerogenesi sufficiente su animali ma inadeguata sull'uomo; i composti organici del piombo sono invece considerati dall'Agenzia non classificabili come cancerogeni (classe 3).

L'esposizione umana è essenzialmente associata ad usi industriali (fonderie, fabbriche di ceramica, batterie, pigmenti); l'esposizione ambientale, da cibo o contatto con tinture, è meno rilevante.

L'assunzione del piombo avviene per via inalatoria, attraverso il tratto gastro-intestinale o attraverso la cute. L'esposizione a Pb ha una maggiore rilevanza per i bambini rispetto agli adulti, dovuto essenzialmente al maggior assorbimento gastro-intestinale nei bambini (assorbimento medio del 40%) rispetto agli adulti (assorbimento 5-15%). Dopo l'assorbimento il piombo entra nel circolo sanguigno e si deposita nei tessuti molli quali cervello, fegato, reni, midollo osseo, sangue (dove più del 90% del Pb si trova nei globuli rossi associato alla membrana e all'emoglobina) e nelle ossa.

L'escrezione è prevalentemente renale, con emivita di circa 30 giorni, ma l'emivita, nel tessuto osseo, può arrivare a decenni, che rappresenta fino al 94% del carico corporeo.

La tossicità del piombo si esplica prevalentemente al livello del sistema nervoso, ematopoietico e renale. In particolare nei bambini il Pb può alterare lo sviluppo cerebrale e determinare ritardi nello sviluppo mentale e deficit cognitivi permanenti. Negli adulti, dopo esposizione prolungata a dosi elevate, può svilupparsi encefalopatia e neuropatia periferica caratterizzata da demielinizzazione.

Esposizioni a Pb ($80-100 \mu\text{g dl}^{-1}$ in bambini ed adulti) può determinare comparsa di anemia dovuta sia all'accorciamento della vita dei globuli rossi, per maggiore fragilità della membrana cellulare, che all'alterata sintesi del gruppo eme a più livelli.

Il piombo, inoltre, può produrre danno ossidativo attraverso almeno due distinti meccanismi: la deplezione di antiossidanti cellulari, come il glutathione; l'inibizione dell'acido δ -aminolevulinico deidratasi, enzima della via biosintetica dell'eme, con conseguente aumento dell'acido δ -aminolevulinico libero (precursore dell'eme), che può generare direttamente radicali liberi. Inoltre il piombo può sostituire lo zinco negli *zinc finger* e interferire con la funzione di diverse proteine, tra cui alcuni regolatori trascrizionali.

Solo *in vitro* e a concentrazioni molto elevate è stata anche descritta la formazione di legami crociati con DNA e proteine e l'alterazione della conformazione del DNA conseguente a legame con i gruppi fosforici; non è quindi chiaro se il fenomeno abbia rilevanza tossicologica. In cellule V79 di Hamster cinese è stato osservato aumento di mutagenesi indotta da UV e dall'agente metilante metil nitro nistrosoguanidina, il che fa supporre che il piombo possa interferire con diversi sistemi di riparazione del DNA.

Esposizione a piombo e deficit cognitivi nei bambini

Il piombo agisce sul sistema nervoso a vari livelli: sostituisce il calcio nel legame con la calmodulina, provoca un aumento della permeabilità al potassio, induce modificazioni nei recettori dei neurotrasmettitori, danneggia a bassi livelli d'esposizione la molecola N-CAM (*Neural-Cell-Adhesion Molecule*) legata allo sviluppo del sistema nervoso. Da uno studio condotto negli Stati Uniti emerge che circa 3-4 milioni di bambini in età prescolare hanno un aumentato assorbimento di piombo.

Su 375 bambini australiani nati nelle vicinanze di un'industria metallurgica è stato effettuato un dosaggio della piombemia dalla nascita fino ai 7 anni di età. I risultati di questo studio mostrano che il quoziente di intelligenza a 13 anni si riduce mediamente di 3 punti per un incremento medio di piombemia nel corso della vita da 10 a 20 $\mu\text{g } 100 \text{ ml}^{-1}$.

Altri studi mostrano che il livello di Pb contenuto nei denti (indicatore di pregressa esposizione) ($6,84 \pm 3,47 \mu\text{g g}^{-1}$) influenza alcune funzioni nervose (capacità attentiva e visuo-motoria) superiori dei bambini con un'età compresa tra 7 e i 9 anni.

La valutazione dell'esposizione al piombo associata allo sviluppo cognitivo dei bambini resta comunque un tema difficile da analizzare se si pensa che l'esposizione al piombo può essere in relazione con le basse condizioni socio-economiche e la malnutrizione. Sulla base della letteratura disponibile si è stabilito un limite di sicurezza per piombemia nei bambini pari a 10 $\mu\text{g } 100 \text{ ml}^{-1}$. Il piombo agisce anche sul sistema nervoso periferico e induce una neuropatia prevalentemente motoria a livelli di piombemia compresi tra 30 e 60 $\mu\text{g } 100 \text{ ml}^{-1}$.

1.2. IL MONITORAGGIO BIOLOGICO E I VALORI DI RIFERIMENTO PER GLI ELEMENTI IN TRACCIA

1.2.1. Il monitoraggio dell'esposizione

L'esposizione della popolazione generale a sostanze pericolose, attraverso l'ambiente o gli alimenti, rappresenta una delle maggiori preoccupazioni di sanità pubblica. Sostanze inquinanti, o potenzialmente tali, vengono continuamente rilasciate nell'ambiente in seguito a molteplici attività antropiche e si distribuiscono in differente misura – per via della loro origine e natura - in tutti i comparti ambientali (aria, acque superficiali e di falda, suoli e sedimenti). Il “monitoraggio ambientale” (MA) valuta il rischio sanitario derivante dalla presenza di un contaminante attraverso la misura della sua concentrazione “ambientale”. I dati ambientali, sebbene indispensabili, non sono in grado, però, di fornire da soli una completa caratterizzazione del rischio per l'uomo. In primo luogo perché, nonostante le proprietà tossicologiche e/o cancerogene di molti inquinanti - compresi i metalli - siano documentate, ad oggi non è ancora disponibile una esaustiva conoscenza delle differenti vie di esposizione, delle diverse capacità di assorbimento e delle suscettibilità individuali (genetiche e non). Inoltre gli esiti delle campagne di MA possono essere influenzati dalle caratteristiche dei luoghi di prelievo, in termini, ad esempio, di quantità e qualità di traffico veicolare, di vicinanza a tale traffico, di possibili effetti “canyon” provocati da palazzi od altre strutture, etc. Ben pochi sono, inoltre, i dati disponibili sulla qualità dell'aria in ambienti confinati (esposizione *indoor*) e meno ancora dati ottenuti attraverso dosimetri personali. Questi ed altri aspetti non permettono corrette generalizzazioni e, in definitiva, adeguate stime dell'esposizione della popolazione a un determinato inquinante. Simili difficoltà nella gestione dei dati ottenuti sono rilevate anche per l'esposizione derivante dagli alimenti. Aldilà della comprensibile variabilità della dieta per la popolazione - correlata

ad età, stili di vita, religione, condizioni di salute, livello sociale, etc. – la corretta interpretazione di questo tipo di esposizione è ostacolata dalla incertezza della contaminazione del singolo alimento in funzione della provenienza, del trattamento, della distribuzione sul mercato, etc.

Appare pertanto evidente che la valutazione del rischio sanitario legata all'esposizione ad inquinanti diventa maggiormente realistica e puntuale attraverso la misura della quantità del contaminante - o di un suo specifico metabolita - effettivamente presente all'interno dell'organismo potenzialmente esposto. Si parla in questo caso di monitoraggio biologico (MB), che consiste in un insieme di procedure attuate per avere informazioni sull'effettivo grado di esposizione dell'individuo o di un gruppo di popolazione. Il MB ha il vantaggio di essere relativamente indipendente da effetti sinergici/antagonisti dei diversi inquinanti e di poter tenere conto dell'azione combinata di tutte le possibili fonti di esposizione (aria, acqua, suolo, polveri, alimenti). Il monitoraggio della popolazione, infatti, non "stima" la parte di contaminante che, misurata nell'ambiente, "potrebbe penetrare" nell'organismo umano, ma "dosa" direttamente il contaminante (o i suoi metaboliti) nell'organismo bersaglio; si passa quindi da una valutazione "esterna" dell'esposizione (MA) ad una misura quantitativa della sua "dose interna".

1.2.2. L'interesse per il biomonitoraggio

La medicina occupazionale ha avuto un ruolo pionieristico nell'utilizzo del MB, considerato per il medico del lavoro uno strumento essenziale, insieme alla sorveglianza sanitaria, per la valutazione del rischio. I primi esempi di MB occupazionale risalgono alla fine dell'800, quando i lavoratori erano esaminati per i livelli di piombo nel sangue e nelle urine nel tentativo di proteggerli da episodi di intossicazione acuta da piombo. Più recente è, invece, il ruolo del MB in medicina ambientale. Da poco più di dieci anni un grande impegno tecnico-organizzativo è profuso negli USA per valutare

l'esposizione della popolazione generale a sostanze chimiche di origine industriale. All'interno di programmi di sorveglianza realizzati dai *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) sono state realizzate campagne per caratterizzare l'entità dell'esposizione ad inquinanti, rilevare differenze nella suscettibilità a particolari agenti, aumentare la sicurezza nei luoghi di vita, etc. Tra i paesi comunitari la Germania è stata tra le prime a riconoscere l'efficacia del MB, introducendo i primi valori limite per l'esposizione interna a xenobiotici. Dal 1996 in Germania è presente una commissione (*Kommission Human-Biomonitoring des Umweltbundesamtes*) per la valutazione dei valori limite e dei valori di riferimento per l'esposizione a sostanze pericolose, inclusi alcuni metalli, per la popolazione generale. I vantaggi offerti dal MB sono stati riconosciuti molto presto anche in sede di Unione Europea (UE), le cui linee-guida e normative in ambito occupazionale ed ambientale prevedevano l'implementazione e la valutazione del MB già dagli anni 80 (linea guida 82/605/EG sul biomonitoraggio del piombo). Nel 1998 l'UE ha emanato una linea-guida che riassume i vari aspetti della protezione preventiva della salute dagli effetti di sostanze pericolose (98/24/EG) nella quale è ribadita la centralità della sorveglianza sanitaria. Inoltre, nel libro bianco "*A Strategy for a Future Chemicals Policy*" (2003) l'UE ammetteva che l'inadeguata conoscenza dell'esposizione l'aveva "costretta" a graduare il numero di test eco-tossicologici richiesti per l'immissione sul mercato, soltanto sulla base delle quantità prodotte di una particolare sostanza chimica piuttosto che sulla base dei dati di esposizione. Con la *European Environment and Health Strategy* - adottata nel 2003 (COM (2003) 338) – l'UE pone di nuovo la "salute" al centro della sua politica ambientale in una visione che affronta in modo integrato i problemi ambientali e di sanità pubblica. Sempre nel 2003 ha lanciato un'iniziativa europea per migliorare l'ambiente e la salute dei bambini chiamata "*Scientific evidence, focused on Children, meant to raise Awareness, improve the situation by use of Legal instruments and ensure a continual Evaluation of the progress made,*

SCALE). In questo campo operano anche il *Conseil Européen de l'Industrie Chimique* (CEFIC) che sostiene l'uso del MB come strumento per ottenere informazioni aggiuntive sull'esposizione e l'*Action 3*, un programma di azione comunitario (all'interno dell'*Environment and Health Action Plan 2004-2010*) che ribadisce l'assoluta necessità di sviluppare piani di MB delle popolazioni in Europa, in stretta e coerente collaborazione fra tutti gli Stati Membri. Sulla base dell'*Action 3*, l'UE ha lanciato il progetto ESBIO (Expert team to Support BIo monitoring) con l'obiettivo di sviluppare un approccio coordinato per il MB e lo sviluppo di strategie per l'integrazione tra i dati del MB e del MA e per la comunicazione del rischio. D'altra parte sull'utilità del biomonitoraggio concordano ormai anche le industrie chimiche, ad esempio la ICCA (*International Council of Chemical Associations*) promuove, anche finanziariamente, lo sviluppo di metodologie per inserire il MB nel processo di valutazione del rischio per la salute.

1.2.3. Bioindicatori e limiti ambientali

Il MB rappresenta, quindi, la tecnica di sorveglianza in grado di fornire una misura diretta dell'esposizione sia di singoli individui che di interi gruppi di popolazione. Tiene conto di una serie di variabili che altrimenti sarebbe difficoltoso prendere in considerazione. In particolare:

- considera tutte le potenziali vie di esposizione
(un vantaggio soprattutto per le sostanze che hanno effetti sistemici);
- considera sia l'esposizione passata che quella presente
(importante per quegli inquinanti ad alto potenziale di bioaccumulo, come molti metalli: esposizioni croniche anche al di sotto dei limiti ambientali stabiliti possono raggiungere nel tempo dosi interne tossicologicamente rilevanti);
- tiene conto della diversa suscettibilità individuale
(in base all'età - bambini, adulti, anziani - e a particolari condizioni fisiologiche - donne in gravidanza - o genetiche).

Il MB, quindi consiste nella misura singola o ripetuta di una “sostanza esogena”, di un suo metabolita o del prodotto dell’interazione tra la sostanza esogena e una molecola o cellula bersaglio, misurata all’interno di un compartimento dell’organismo (*National Research Council*, 1987). Tale sostanza viene definita Indicatore Biologico di Esposizione (IBE). In altre parole, il MB quantifica il contenuto di agente chimico assorbito, trasformato, o accumulato in un organo, tessuto o cellula bersaglio come conseguenza dell’esposizione a tale agente. Gli IBE, quindi, caratterizzano singoli individui (o gruppi di individui) in base al tipo ed entità dell’esposizione. Esempi classici di biomarcatori di esposizione per i metalli sono: il piombo e il cadmio nel sangue, l’alluminio, il cromo, il cobalto, il nichel e il selenio in urina e siero, il mercurio nel sangue e urina, l’arsenico, il manganese, il tallio e il vanadio in urina, etc.

Quando è applicato alla sorveglianza della popolazione generale il MB permette di stabilire i livelli o valori di riferimento (VR), cioè quei valori misurati in una popolazione di controllo adeguatamente selezionata (detta, appunto, di riferimento) e non professionalmente esposta, che rappresentano i valori su cui basare il confronto per valutare altri individui potenzialmente esposti (professionalmente e non).

E’ inoltre da sottolineare che la maggiore applicazione pratica degli IBE utilizzati dal MB è stata sviluppata in medicina occupazionale al fine di verificare l’accordo e la correlazione con gli standard di igiene ambientale industriale. Gli IBE misurati nei lavoratori sono, infatti, confrontati con i valori limite ammessi di esposizione, quali ad esempio i *Biological Exposure Indices* (BEI) dell’ACGIH (*The American Conference of Governmental Industrial Hygienists*) o gli *Occupational Exposure Limits* (OEL) dell’UE, al fine di decidere l’eventuale allontanamento del lavoratore dal posto di lavoro contaminato. Sia i BEI che gli OEL, però, non rappresentano una linea di demarcazione netta fra esposizioni “pericolose e non pericolose”.

Conclusioni operative di approfondimento, quindi, possono essere prese solo sulla base di risultati costantemente in eccesso rispetto a tali limiti. Di contro, risultati inferiori al BEI non necessariamente indicano assenza di rischio. Tali limiti sono utilizzati come guida nella pratica dell'igiene industriale ma non possono essere applicati per la popolazione generale né per esposizioni non professionali, anche perché la maggior parte dei BEI è basata sulla correlazione diretta con il corrispondente TLV (*Threshold Limit Values*), ovvero con la concentrazione "ambientale" media ponderata del contaminante (calcolata su una giornata lavorativa di 8 ore e su 40 ore lavorative settimanali) cui quasi tutti i lavoratori possono essere esposti senza effetti negativi. In Tabella 1 sono riportati i BEI suggeriti dall'ACGIH per alcuni metalli. Per altri metalli l'ACGIH, a causa dell'insufficienza di studi sul rapporto fra IBE, rischi per la salute ed esposizione ambientale, non ha attualmente definito un BEI, ma ha individuato i metalli per i quali sarà necessario un approfondimento per il futuro: l'antimonio, il berillio, il manganese, il nickel, il selenio e l'uranio

Tabella 1. Limiti biologici di esposizione (BEI) per i metalli (fonte ACGIH, 2001)

IBE (Indicatore biologico di esposizione)	Matrice	Prelievo*	BEI (<i>Biological exposure index</i>)
arsenico inorganico e metaboliti metilati	urine	fsl	35 µg/l
cadmio	urine	non critico	5 µg/g creatinina
cadmio	sangue	non critico	5 µg/l
cobalto	urine	ft, fsl	15 µg/l
cobalto	sangue	ft, fsl	1 µg/l
cromo totale		ft, fsl	30 µg/g creatinina
mercurio inorganico totale	urine	pt	35 µg/g creatinina
mercurio inorganico totale	sangue	ft, fsl	15 µg/l
piombo	sangue	non critico	30 µg/100 ml
vanadio	urine	ft, fsl	50 µg/g creatinina

* **Prelievo:** ft, a fine turno; fsl, a fine settimana lavorativa; dt, durante il turno; pt, prima del turno

Il MB può limitarsi alla misura della dose interna della sostanza in esame (attraverso gli IBE) ma può anche essere applicato alla valutazione

della risposta dell'organismo o della predisposizione di alcuni individui al danno risultante dall'esposizione ad un contaminante. Nel primo caso si quantificano gli Indicatori Biologici di Risposta (o di effetto, IBR), nel secondo gli Indicatori Biologici di Suscettibilità (IBS). Gli IBR indicano un'alterazione biochimica, fisiologica o di altro tipo misurabile in un organismo a seguito di una esposizione e un danno effettivo o potenziale alla salute o una vera e propria malattia. Evidenziano effetti dell'esposizione sull'organismo, in termini di variazioni di attività enzimatiche, di parametri della funzionalità renale, polmonare, dell'efficienza del sistema nervoso, etc., ma anche dell'integrità della struttura cromosomica. Gli IBR possono risultare dei marker aspecifici e, quindi, possono essere di minore utilità per individuare popolazioni non professionalmente esposte. In ambito occupazionale, invece, laddove è possibile escludere altri fattori confondenti, gli IBR rappresentano una categoria di marker molto utile: il prelievo di campioni appaiati prima e dopo una specifica esposizione occupazionale (prima e dopo il turno di lavoro ad esempio) riduce la fonte di errore dovuta ad altre cause. Il piombo, per esempio, inibisce vari enzimi eritrocitari coinvolti nella sintesi dell'eme in una maniera dose-dipendente. La variazione della loro concentrazione può indicare, quindi, un'esposizione a tale metallo. Concentrazioni ematiche di piombo (cioè l'IBE) pari a 100-600 $\mu\text{g l}^{-1}$, infatti, influenzano i relativi IBR: ALAD (acido δ -aminolevulinico deidratasi) e P5N (pirimidina-5-nucleotidasi) vengono inibite, mentre aumentano significativamente coproporfirina urinaria e zinco-protoporfirina eritrocitaria. Elevati livelli di quest'ultima proteina, però, si riscontrano anche in presenza di anemia da carenza di ferro, che, quindi, dovrebbe essere esclusa come con-causa.

Più di recente sono state esplorate le relazioni dose-risposta in soggetti individuati come "suscettibili", ovvero in grado di biotrasformare la sostanza assorbita (anche in seguito ad esposizioni a basse dosi) in una dose a rischio, a differenza di quanto accade nella maggior parte della popolazione che, a parità di esposizione, non subisce alcun effetto. In

seguito a queste osservazioni sono stati identificati particolari Indicatori Biologici di Suscettibilità (IBS), cioè “intrinseche o acquisite diminuzioni della capacità dell’organismo di rispondere agli effetti conseguenti all’esposizione ad uno xenobiotico”. Gli IBS sono, quindi, un indice di predisposizione (ereditaria o acquisita) di un individuo a subire gli effetti del tossico. Comprendono principalmente dei marcatori tossicogenetici o farmacogenetici che appropriatamente identificano i tratti genetici responsabili delle fasi di biotrasformazione o di altre fasi come, ad esempio, i meccanismi di riparazione. Un esempio di IBS per esposizione a cadmio ed al conseguente danno renale è rappresentato dall’espressione genica delle metallothioneine nei linfociti nel comparto ematico. Nel caso di esposizione professionale a cromo esavalente è stato suggerito che varianti del gene del sistema “Proteina Surfattante” possono essere indicatori di suscettibilità per cancro polmonare. Nella valutazione di causa (presenza del contaminante) ed effetto (patologia derivante) del rischio sanitario ambientale l’importanza degli indicatori biologici sopra descritti aumenta passando dagli IBE, agli IBR e, infine, agli IBS, anche se gli indicatori di esposizione (IBE) sono i marker maggiormente consolidati ed utilizzati per quanto riguarda gli elementi in traccia.

Poiché il MB è in grado di evidenziare la presenza di xenobiotici nell’organismo in un determinato momento, minore è il tempo di emivita del contaminante nell’organismo, minore sarà la possibilità di “catturare l’attimo” di maggiore esposizione, di evidenziare, cioè, il momento di massima concentrazione della sostanza nell’organismo. Infatti, in un organismo l’emivita di uno xenobiotico varia in funzione di diversi fattori, innanzitutto in funzione delle caratteristiche della sostanza stessa. Per il cadmio, ad esempio, l’emivita può superare i 50 anni, per il mercurio è nell’ordine dei 60 giorni, per altri è dell’ordine di pochi ore o giorni. In generale, con tempi di emivita inferiori alle 2 ore il MB non è uno strumento idoneo, mentre per tempi di vita dalle 2 alle 10 ore, per valutare esposizioni professionali, un

campionamento effettuato alla fine del giorno di lavoro, riflette l'esposizione dell'intera giornata.

Nella pratica, quindi, l'efficienza del MB nella definizione del rischio per la salute diventa massima quando:

1) si è in presenza di contaminanti con emivita sufficientemente lunga;

2) si studiano esposizioni prolungate e relativamente costanti;

3) si dispone di una approfondita conoscenza della tossico-cinetica e tossicodinamica della sostanza in esame. La conoscenza del metabolismo dell'indicatore in termini di distribuzione, biotrasformazione, accumulo ed escrezione rende possibile la scelta della matrice biologica più idonea su cui eseguire la misura (urina, siero, sangue, fluido cerebrospinale, saliva, sudore, aria espirata, alcuni tessuti come capelli, peli, unghie, cute, etc.);

4) si hanno adeguate informazioni sulle differenti suscettibilità individuali. Fattori quali differenti stili ed abitudini di vita (dieta, alcool e fumo, etc.), condizioni fisiologiche, etnie, etc. influenzano l'assorbimento ed il metabolismo dello xenobiotico: il fumo, ad esempio, aumenta i livelli di piombo e cadmio nel sangue e nelle urine. L'applicazione di rigidi criteri di inclusione/esclusione dei soggetti inclusi nell'indagine ed un numero di casi sufficientemente elevato permette di ridurre l'influenza delle possibili variabili confondenti;

5) si dispone di tecniche analitiche sensibili e specifiche (capaci di rilevare quantità minime della sostanza e nello stesso tempo di dosare esclusivamente la sostanza chimica che si desidera quantificare). Le attuali tecnologie strumentali di analisi (ad esempio, la spettrometria di massa) permettono di rilevare anche nano-concentrazioni dei singoli metalli in fluidi e tessuti umani;

6) si attuano adeguate procedure per evitare o, almeno, tenere sotto controllo possibili contaminazioni o perdite di analita durante la fase precedente l'analisi chimica (prelievo, conservazione e pretrattamento dei campioni).

In sintesi, per una campagna di biomonitoraggio va scelto un biomarcatore specifico e selettivo per il livello di esposizione al quale emerge un rischio per la salute, la raccolta dei campioni deve essere ineccepibile e la variabilità pre-analitica ed analitica il più possibile ridotta utilizzando anche procedure analitiche ben standardizzate e regolari controlli di qualità.

In questo modo il MB relativo a sostanze inquinanti - compresi i metalli - permette di identificare situazioni di esposizione anomale e devianti rispetto all'esposizione basale generale. Da ciò emerge l'importanza di produrre valori di riferimento (VR) relativi alla "popolazione generale" non professionalmente esposta come primo termine di confronto nella sorveglianza di altri gruppi di popolazione. Per i metalli, i valori di concentrazione riscontrati nella popolazione risultano ancora chiaramente più bassi di quelli trovati in individui esposti professionalmente. Dai dati del MB, però, risulta anche che l'esposizione ambientale a metalli pesanti, tranne rare eccezioni come il piombo, è in continuo aumento e che in alcuni casi tende ad avvicinarsi a quella professionale. Da qui emerge la necessità di poter disporre dei risultati di campagne di biomonitoraggio accurate, affidabili e ripetute nel tempo in modo da ottenere precise informazioni sul rischio sanitario "da inquinamento" di specifici gruppi di popolazione. Ciò permetterebbe l'adozione di più efficaci strategie di prevenzione dei possibili effetti avversi, soprattutto per quelle classi di individui più suscettibili e vulnerabili.

1.2.4. Valori di Riferimento per gli elementi in traccia

Per Valore di Riferimento (VR) per un metallo si intende la concentrazione del metallo stesso nella popolazione generale non esposta con lo scopo ultimo di fornire una valutazione del rischio per la salute dell'uomo. In generale, al VR ci si "riferisce" per comparare i dati ottenuti attraverso il monitoraggio biologico in individui o gruppi di individui che si

presume siano esposti attraverso qualsiasi via (ambientale, occupazionale, dieta ecc.) ad un metallo. Al concetto di VR sottende quindi il principio della comparazione, quello per cui il valore biologico osservato (l'incognito) per essere interpretato deve essere comparato con un valore di riferimento (VR) usato per interpretare. I VR rappresentano quindi, utili strumenti per:

- 1) “mettere in osservazione” chi presenta livelli di metallo superiori al VR;
- 2) individuare fonti e modalità di assorbimento del metallo;
- 3) monitorare la comparsa di eventuali effetti sulla salute umana.

Per stabilire VR, è importante che le quantità biologiche misurate vengano ottenute da una popolazione omogenea di individui, selezionati in accordo a ben definiti criteri di inclusione/esclusione e ben definiti criteri di partizione. I limiti e gli intervalli di riferimento - questi ultimi sono in effetti i dati che comunemente chiamiamo VR - sono valutati tramite approcci statistici in accordo a metodi parametrici e non parametrici.

L'International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) ha definito la terminologia utilizzabile per una non ambigua descrizione ed interpretazione dei VR al fine ultimo di produrre VR confrontabili internazionalmente (Box 1 e 2).

I metalli per i quali è importante disporre di VR possono essere suddivisi in gruppi. Nel primo gruppo rientrano alcuni elementi chimici contemporaneamente sia essenziali che tossici (arsenico, cromo, ferro, nickel, zinco, etc) ed alcuni indicatori non specifici di effetto (acido δ -amminolevulinico urinario, zincoprotoporfirina ematica, β 2-microglobulina, etc.) di metalli pesanti dosabili, anche quando non vi è esposizione, per esempio, a Pb o Cd. In questo caso i VR sono da intendere o come la “concentrazione di fondo” determinata dai soli processi fisiologici, o come risultante della “concentrazione di fondo” e della quota ascrivibile ad un'esposizione di tipo professionale o ambientale (atmosfera, alimentare o voluttuaria). Nel secondo gruppo rientrano invece i metalli, composti e/o sostanze di esclusiva natura ed interesse tossicologico che non dovrebbero

essere presenti e misurabili in matrici biologiche e per i quali, in linea di principio, i VR dovrebbero essere pari a zero (“controllo negativo”). In realtà, il fenomeno dell’eco-dispersione di un elevato numero di elementi e/o xenobiotici ha portato a misurare, quando le tecniche analitiche lo hanno permesso, gli stessi metalli e/o loro metaboliti nelle matrici biologiche di gruppi sempre più ampi di popolazione, anche in aree remote. A questo proposito, è noto come livelli, anche elevati, di Pb e Hg, si possano riscontrare in abitanti o animali di zone anche molto distanti dal punto di origine della contaminazione.

Box 1. Terminologia e definizioni

Individuo di riferimento: soggetto per il confronto selezionato secondo criteri stabiliti.

Popolazione di riferimento: insieme formato da tutti i possibili individui di riferimento.

Gruppo campione di riferimento: adeguato numero di individui selezionati in modo da essere rappresentativo della popolazione di riferimento.

Valore di riferimento: valore di un determinato indicatore ottenuto dalla elaborazione statistica dei risultati del suo dosaggio in campioni biologici prelevati da una popolazione o da un gruppo di riferimento.

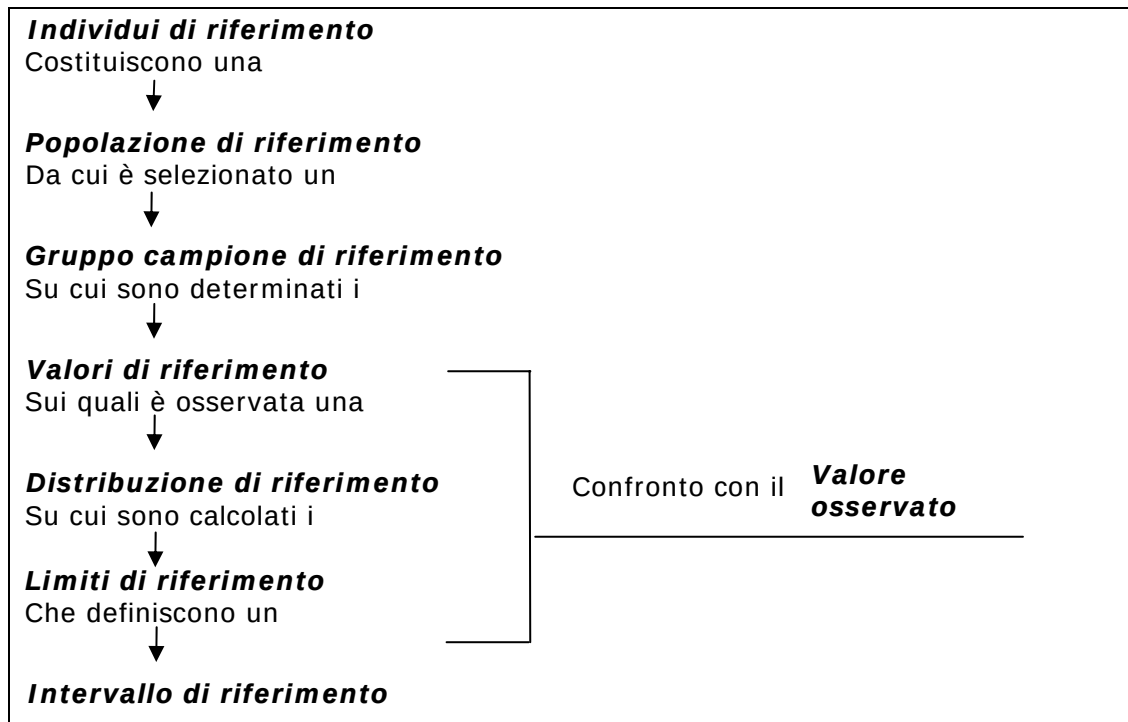
Distribuzione di riferimento: distribuzione statistica del valore di riferimento; è caratterizzata da una forma geometrica (normale o non-normale) e dai corrispondenti parametri.

Limiti di riferimento: valori estremi della distribuzione di riferimento che definiscono l'intervallo di riferimento.

Intervallo di riferimento: intervallo di valori che include e comprende i due limiti di riferimento.

Valore osservato: valore osservato o misurato di una particolare tipo di quantità e prodotto per prendere una decisione medico-sanitaria. Possono essere comparati con i valori di riferimento, la distribuzione di riferimento, i limiti di riferimento o gli intervalli di riferimento

Box 2. Relazione tra termini



1.2.4.1. Elaborazione dei VR

I principali aspetti di cui si deve tener conto nella definizione dei VR per gli elementi in traccia riguardano la selezione del campione di popolazione (popolazione di riferimento), il controllo dei fattori pre-analitici e analitici e l'elaborazione non appropriata dei dati.

In generale, la popolazione di riferimento dovrebbe essere sufficientemente larga da coprire una parte rappresentativa della popolazione generale e da permettere una valutazione dell'effetto di fattori confondenti sul livello del metallo (ad esempio età, sesso, fumo, abitudini nutrizionali particolari, ecc.). Può essere utile produrre VR per gruppi specifici della popolazione generale qualora il livello del metallo differisca tra questi gruppi (bambini vs. adulti, femmine vs. maschi, fumatori vs. non fumatori) o produrre VR per gruppi particolari di età laddove il livello del metallo differisca significativamente in funzione dell'età. Esempi di VR differenti prodotti per

sottogruppi della popolazione generale sono: 1) VR per il piombo nel sangue di bambini, femmine e maschi (perché è dimostrato che i livelli di piombo sono più bassi nelle femmine che non nei maschi e nei bambini rispetto agli adulti); 2) VR per il cadmio nel sangue e urine di bambini e adulti; 3) VR per il cadmio nel sangue di soggetti non fumatori (perché il livello di cadmio è più alto nei fumatori); 4) VR per il mercurio nelle urine di soggetti con otturazioni dentarie (il mercurio è più alto tanto maggiore è il numero di otturazioni); 5) VR per il mercurio nel sangue in funzione del consumo di pesce (popoli che consumano molto pesce presentano valori più alti di mercurio).

Inoltre, i VR devono essere costantemente aggiornati per tenere conto dei continui cambiamenti nell'esposizione di fondo della popolazione generale ai metalli. Si pensi per esempio alla diminuzione dell'esposizione dell'uomo a piombo in seguito all'eliminazione dal commercio delle benzine piombate. E' evidente che i VR saranno significativi ed utili solo se gli individui selezionati e la procedura seguita per la loro definizione saranno ben caratterizzati e adeguatamente descritti. In particolare, è essenziale che nella produzione dei VR siano ben definiti:

1) i criteri di inclusione (definiscono gli individui che possono essere selezionati) e i criteri di esclusione (definiscono le caratteristiche che non permettono la selezione) utilizzati per definire la popolazione di riferimento; 2) i criteri di partizione utilizzati per caratterizzare i soggetti della popolazione di riferimento in sotto-gruppi in funzione di età, sesso, gruppo etnico, fattori socio-economici, genetici, ecc.;

3) le condizioni fisiologiche e ambientali del gruppo di riferimento (per esempio, assunzione di alimenti e farmaci, fumo, grado di obesità, stato di gravidanza ecc.);

4) la procedura di raccolta e preparazione del campione;

5) il metodo analitico impiegato incluse le informazioni sul limite di rivelabilità, la specificità, la precisione e l'accuratezza;

6) il metodo statistico utilizzato per la stima dei limiti di riferimento.

1.2.4.2. Scelta della popolazione di riferimento

Secondo la definizione di Solberg e Grasbeck (1989) per popolazione di riferimento si intende: “soggetti non necessariamente “sani” o appartenenti “all’intera popolazione” ma soggetti che siano in un “ben definito stato di salute” e le cui “caratteristiche siano ben precisate”. Quando si seleziona la popolazione di riferimento bisogna, innanzitutto, considerare lo scopo per il quale i VR vengono prodotti e successivamente individuare ed applicare solo quei criteri di inclusione ed esclusione effettivamente rilevanti per la definizione dello stato di salute della popolazione di riferimento (ovvero non esistono criteri univoci di selezione). Tali criteri non devono essere troppo restrittivi dal momento che non è necessario avere una popolazione “ideale”. In alcuni casi, come già detto, è auspicabile applicare criteri di partizione e cioè suddividere il gruppo campione in sotto-gruppi in base a età, sesso, genotipo, condizioni socio-economiche, abitudini alimentari, residenza, stili di vita, ecc. La distinzione tra criteri di partizione e criteri di selezione è, quindi, funzione dello scopo dei VR. Per esempio sia l’età che il sesso sono criteri di selezione se si necessita di un gruppo di maschi di controllo dai 21 ai 40 anni; altrimenti età e sesso sono criteri comunemente di partizione.

I soggetti, inoltre, possono essere selezionati *a priori* o *a posteriori*. La selezione *a priori* è l’approccio più conveniente e consiste nell’applicare direttamente alla popolazione gli adeguati criteri di selezione; quella *a posteriori* prevede la disponibilità di un largo numero di dati sugli individui in esame, inclusi i risultati di laboratorio, e la selezione viene fatta dopo opportuna elaborazione di tali informazioni. Il metodo *a posteriori* sarebbe il più idoneo per identificare i migliori criteri di esclusione, ma viene applicato raramente a causa dei costi troppo elevati, dei tempi lunghi di elaborazione e, soprattutto, a causa del rischio di introdurre errori di valutazione.

1.2.4.3. Raccolta e trattamento dei campioni

Durante la produzione dei VR è pratica irrinunciabile tenere sotto controllo i fattori pre-analitici che possono influenzare il risultato finale. Per raggiungere tale obiettivo è necessario, fin dalla fase di pianificazione dell'analisi, considerare i possibili fattori di variabilità biologica e tecnica lungo la catena analitica e sviluppare procedure idonee a contenerli. In generale le fasi di campionamento, conservazione e trattamento dei campioni dovrebbero essere effettuate tenendo conto che:

- 1) il rischio di alterazione dell'informazione analitica è potenzialmente tanto maggiore quanto minori sono le concentrazioni attese del metallo;
- 2) il campionamento di piccoli quantità di campione (es. i prelievi ematici capillari) può aumentare l'effetto dell'inquinamento;
- 3) meno numerose e complesse sono le operazioni pre-analitiche che si effettuano e minore diventa il rischio di alterare l'informazione analitica del campione;
- 4) la durata del periodo di conservazione è proporzionale al rischio di influenzare negativamente l'accuratezza delle determinazioni finali.

I fattori di variabilità pre-analitica possono avere origine biologica o metodologica (Box 3).

L'IFCC indica una serie di fattori che devono essere annotati e riportati quando si raccolgono e trattano i campioni per la produzione dei VR. Come esempio di seguito è riportata una lista di quesiti e di condizioni da rispettare durante la raccolta di campioni di sangue (Box 4).

Box 3. Fattori di variabilità pre-analitica

Fattori biologici

Questi fattori possono essere divisi in due gruppi, quelli che non possono essere eliminati e quelli che possono essere controllati. Tra i primi vi sono l'età, il sesso, l'etnia che ovviamente non possono essere modificati e che rientrano normalmente nei criteri di inclusione/esclusione e di partizione. Tra i fattori che sono controllabili vi sono: 1) digiuno e diete particolari (la vegetariana, per esempio) che influenzano direttamente la concentrazione del metallo; 2) l'assunzione di sostanze farmacologicamente attive (inclusi l'etanolo, la caffeina, il tabacco); 3) terapie di supplementazione ormonale, uso di farmaci contraccettivi e stress che hanno un effetto sullo stato metabolico dell'individuo; 4) fattori emo-dinamici inclusa la postura; 4) danno cellulare e tissutale dovuto ad esercizio fisico, massaggio muscolare ecc...

Fattori metodologici

Tra questi fattori vi sono: 1) l'ambiente in cui si esegue il prelievo (per esempio, nel caso della determinazione di metalli a livello di ultratraccia, è consigliabile dotarsi di un laboratorio 'pulito' (per esempio, di Classe 100); 2) le tecniche di raccolta (nel caso di prelievi ematici evitare l'uso del laccio emostatico); 3) gli strumenti di raccolta (aghi, siringhe); 4) l'uso di additivi (anticoagulanti, promotori di separazione del siero dal plasma, ecc...); 5) l'uso di reagenti (non devono apportare metalli); 6) la natura e la temperatura del contenitore; è importante che il contenitore non assorba o rilasci il metallo e che sia inerte chimicamente nei confronti del campione analitico e dei reagenti; 7) le condizioni di conservazione e la durata del periodo di conservazione. A temperatura ambiente il materiale biologico va incontro a rapide trasformazioni chimiche, microbiologiche ed enzimatiche. Ad una temperatura di + 4°C il campione può essere conservato al massimo una settimana, per periodi più lunghi va conservato tra – 5°C e – 25°C; 8) la velocità di centrifugazione del sangue; 9) le tecniche usate per refrigerare, agitare, miscelare il campione.

Box 4. Informazioni raccolte per il prelievo di sangue

Preparazione del paziente

Digiuno (tipo, durata)
Farmaci (tipo, quantità, durata della somministrazione)
Ritmo biologico (sonno, pasti)
Periodo di riposo prima della raccolta

Raccolta del campione

Tempo (ora del giorno, stagione)
Postura (postura generale e posizione del braccio)
Tipologia (sangue venoso, arterioso)
Sito di raccolta e sua preparazione (disinfezione)
Strumenti (siringhe, aghi, recipienti)
Additivi (anticoagulanti, conservanti, promotori di separazione)
Tecnica (puntura, flusso libero)

Trattamento del campione

Trasporto (contenitore, temperatura, durata)
Coagulazione (tempo, temperatura)
Separazione del siero dal plasma (forza e tempo di centrifugazione, T)
Conservazione (contenitore, conservanti, temperatura, durata)
Preparazione per l'analisi (scongellamento, miscelazione)

1.2.4.4. Metodi analitici utilizzati per definire i VR

I metodi analitici usati per la produzione dei VR e quelli utilizzati per definire il valore osservato dovrebbero essere comparabili nelle loro prestazioni (idealmente dovrebbero essere identici). Se non lo sono, i VR dovrebbero essere almeno trasferibili. In ogni caso, il metodo analitico usato per la quantificazione dei metalli, inclusi i reagenti e la strumentazione, deve essere descritto dettagliatamente per permettere al personale di laboratorio di procedere secondo un protocollo standardizzato al fine di ottenere risultati riproducibili. La descrizione del metodo è quindi una parte essenziale della documentazione relativa ai VR prodotti. Il metodo dovrà essere descritto tramite valutazione della sua accuratezza, specificità, sensibilità, ripetibilità, precisione e praticabilità. La determinazione di metalli a concentrazioni molto basse fa sì che sia indispensabile disporre di tecniche analitiche molto sensibili. Con il passare degli anni, in concomitanza con il miglioramento

delle tecniche strumentali e con l'aumentata attenzione rivolta dagli operatori al problema della contaminazione, si è assistito ad una progressiva diminuzione del livello dei VR per alcuni elementi in traccia. Attualmente sono disponibili varie tecniche analitiche per la misura degli elementi chimici sia a livello di traccia che ultratraccia, come la spettrometria atomica (assorbimento ed emissione) e la spettrometria di massa (quadrupolare e ad alta risoluzione). La scelta della tecnica analitica da utilizzare dipenderà dalla natura dei metalli e dalle loro concentrazioni nello specifico fluido biologico. La validità del metodo analitico, le sue prestazioni in generale ed il rispetto dei requisiti sopra citati possono essere verificate partecipando a circuiti di prova inter-laboratoriali, in cui più laboratori analizzano tramite tecniche differenti aliquote dello stesso campione e ne confrontano i risultati.

In particolare la spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS) (Cfr. Appendice A) ha guadagnato popolarità per la possibilità, tra l'altro, di effettuare analisi multielementari. Tuttavia, anche l'ICP-MS presenta alcuni problemi (interferenze spettrali e non-spettrali) che in alcuni casi costituiscono la limitazione principale della tecnica. Queste interferenze appaiono particolarmente serie nell'analisi di matrici complesse come i fluidi e tessuti biologici contenenti elevate quantità di componenti organiche ed inorganiche. Alcune di queste interferenze spettrali possono oggi essere più o meno efficientemente risolte mediante strumenti che possono operare sia in bassa (LR, 400 $m/\Delta m$) che media (MR, 3000 $m/\Delta m$) che alta risoluzione (HR, > 9000 $m/\Delta m$). Già la bassa risoluzione è in grado di separare il segnale dell'analita da molte delle più comuni interferenze spettrali dovute a specie poliatomiche o a doppie cariche.

Nell'ambito del biomonitoraggio, con particolare riferimento all'analisi degli elementi in traccia nei fluidi biologici, l'accoppiamento della spettrometria di massa ad alta/bassa risoluzione con tecniche di introduzione/preparazione del campione, diversificate in funzione dell'analita e della matrice considerata, consentono in molti casi, il raggiungimento di

limiti di rivelabilità adeguati alla definizione dei VR non solo per la concentrazione totale, ma anche per le differenti forme chimiche dell'elemento eventualmente presenti.

1.2.4.5. Elaborazione statistica per definire VR

La procedura raccomandata dall'IFCC per il calcolo dei limiti di riferimento prevede la verifica della distribuzione (Gaussiana o non Gaussiana) e delle eventuali presenze di asimmetrie e dati aberranti (mediante il test di Kolmogorov-Smirnov o quello di Anderson-Darling). In caso di eccessiva asimmetria della distribuzione potrebbe essere utile riconsiderare i criteri di esclusione e partizione usati per definire la popolazione di riferimento. Infine segue il calcolo dei percentili (generalmente si usano il 2.5° - 97.5° o il 5° - 95° intervallo percentili) qualora i dati non siano distribuiti normalmente. Se si ottiene una distribuzione normale, è possibile applicare i metodi parametrici basati sulla media e sulla sua deviazione. La IFCC, a seguito di uno studio sui due approcci e considerando le distribuzioni usualmente ottenute in chimica-clinica e in tossicologia, ha stabilito che entrambi i metodi sopra citati danno prestazioni e stime molto simili.

Ottenuti i VR in accordo con le procedure descritte, si può procedere, se necessario, alla partizione in sottogruppi per ridurre la variabilità intra-gruppo ed ottenere VR più stretti e più accurati. I test statistici (il *t* di Student, l'analisi della varianza, il test F di Fischer, il test di Bartlett, ecc...) potrebbero, infatti, evidenziare la necessità di stratificare il gruppo di dati. Se i VR vengono stratificati, ogni sotto-gruppo dovrà essere trattato statisticamente come se fosse l'intero campione di popolazione.

Da quanto detto appare evidente che la definizione dei VR per i metalli sia un'attività sperimentale di non facile attuazione. Le ragioni sono diverse e comprendono: le concentrazioni dei metalli da determinare spesso prossime ai limiti di rivelabilità delle tecniche impiegate; l'attenzione che deve essere

posta nel controllare i fattori pre-analitici al fine di minimizzare le contaminazioni esogene e le perdite del metallo; la difficile reperibilità di materiali di riferimento certificati con livelli di metalli paragonabili con quelli dei campioni reali. Pertanto la regolare e continua attività di messa a punto di metodi per il monitoraggio biologico, di promozione e controllo della qualità del dato analitico, di revisione dei VR che vengono periodicamente stabiliti rappresenta una vera e propria necessità. Risulta, infatti, chiara l'importanza dei VR in diversi ambiti:

- 1) in tossicologia ambientale consentono di stimare la quantità di tossico introdotta nell'organismo a causa dell'inquinamento o della dieta (se valutati in tempi diversi consentono anche di seguire l'evoluzione dell'esposizione della popolazione ad un metallo in conseguenza di variazioni dell'inquinamento);
- 2) nell'ambito della medicina del lavoro e dell'igiene industriale, i VR consentono di stimare l'entità dell'esposizione di una popolazione professionalmente esposta ad un metallo e/o a fornire elementi essenziali per la valutazione del rischio chimico.

Sarebbe, infine, interessante confrontare VR in ambito nazionale ed internazionale, per evidenziare differenze che potrebbero rispecchiare lo specifico contributo dato dalla dieta o potrebbero identificare gruppi di soggetti esposti per motivi ambientali e l'eventuale fonte di contaminazione.

2. PARTE SPERIMENTALE

Lo studio ha previsto diverse fasi, nell'ambito delle quali sono stati elaborati criteri di selezione/partizione delle popolazioni oggetto di indagine, sviluppati metodi analitici basati su SF-ICP-MS e, in via preliminare, su sensori elettrochimici per la conduzione di studi di biomonitoraggio, e infine sono stati elaborati e definiti Valori di Riferimento per alcuni elementi in traccia in diverse matrici biologiche per le popolazioni oggetto di indagine.

Nelle successive sezioni sono descritti i materiali e metodi utilizzati nel corso delle diverse fasi dello studio, specificamente consistenti in:

- 1) Biomonitoraggio dei livelli urinari di Pt, Rh e Pd mediante SF-ICP-MS in una popolazione professionalmente esposta;
- 2) Sviluppo di un metodo SF-ICP-MS, ad elevata produttività, per la determinazione simultanea di 20 elementi in traccia nel sangue ed applicazione per la definizione di valori di riferimento;
- 3) Estensione del campo di applicazione del metodo SF-ICP-MS a tessuti biotici per lo screening precoce del tumore del colon retto;
- 4) Determinazione di Pb nel latte materno mediante sensori elettrochimici e SF-ICP-MS

2.1. BIOMONITORAGGIO DEI LIVELLI URINARI DI PLATINO, RODIO E PALLADIO MEDIANTE SF-ICP-MS IN UNA POPOLAZIONE PROFESSIONALMENTE ESPOSTA

2.1.1. Soggetti

Il gruppo studiato è costituito da 58 maschi non professionalmente esposti agli EGP (controllo) (età: $45,3 \pm 9,9$, intervallo: 23-64) e 64 ferrotramvieri di sesso maschile (età: $47,9 \pm 8,1$, intervallo: 29-59) che operano sulle 6 linee del tram della città di Roma (Figura 1).

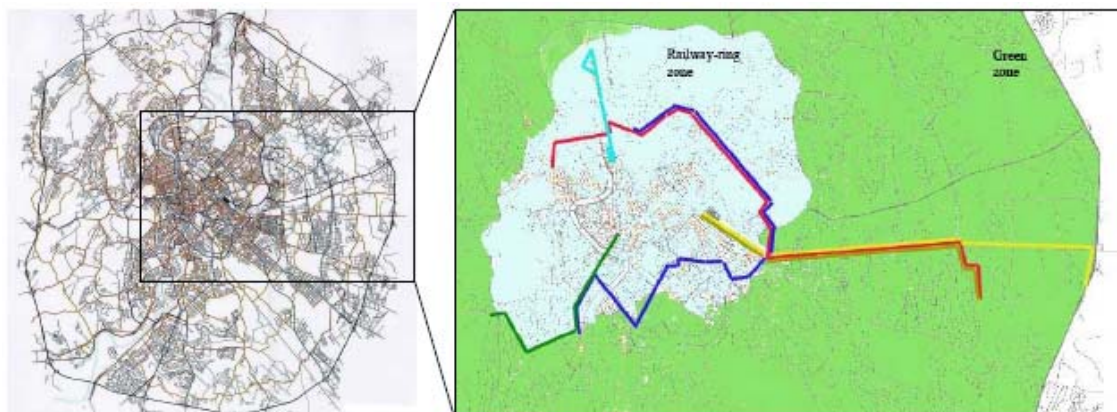


Figura 1. Linee trambus della città di Roma, oggetto dello studio

I soggetti sono stati reclutati utilizzando un questionario opportunamente elaborato ed indirizzato ad avere informazioni personali riguardanti età, peso, altezza, presenza di metalli nobili nelle amalgame dentali e più estensivamente in ogni tipo di protesi, stato di salute generale, uso abituale di farmaci, consumo di alcool e caffè, abitudini alimentari ed esercizio fisico. Tutti i soggetti arruolati nello studio, ai quali erano stati illustrati gli obiettivi della ricerca, hanno fornito il loro consenso informato.

2.1.2. Raccolta e trattamento dei campioni

I campioni di urina, sono stati raccolti in contenitori di polietilene da 50 ml (Kartell, Milano, Italia). Le urine dei ferotramvieri sono state prelevate al termine del turno di lavoro della durata di 6 ore, per gli individui di controllo sono state raccolte le urine del mattino a digiuno.

I contenitori sono stati precedentemente decontaminati con una soluzione al 10% v/v di HNO_3 (Grado suprapuro, Merck, Darmstadt, Germania) risciacquati più volte con acqua deionizzata ad elevata purezza (EASY-pure, PBI, Milano, Italia). Le urine sono state poste a -20°C , entro due ore dal prelievo, e conservate alla stessa temperatura fino al momento dell'analisi. Lo scongelamento dei campioni è avvenuto a temperatura ambiente e da ciascun campione, dopo agitazione meccanica, è stata

prelevata un'aliquota da 1 ml, a cui sono stati aggiunti 20 μ l di HNO_3 e successivamente diluita 1 + 4 (v+v) con acqua deionizzata ad elevata purezza. Tutte le operazioni sono state effettuate all'interno di un laboratorio a contaminazione controllata di Classe-100 (Tamco, Roma, Italia) (Figura 2) al fine di preservare minimizzare il rischio di contaminazione.



Figura 2. Laboratorio di Classe-100

2.1.3. Analisi chimica

La concentrazione degli EGP nei campioni di urina è stata ottenuta mediante la tecnica analitica del plasma induttivo con rivelazione di massa a settore magnetico (SF-ICP-MS; Element 2, Thermo-Finnigan, Brema, Germania). Tra i vantaggi di questa tecnica ci sono la capacità di rilevare concentrazioni molto basse degli analiti, di effettuare analisi multielementari in modo simultaneo e soprattutto la capacità, con opportune risoluzioni ed attenzioni, di separare il segnale degli analiti di interesse da quelli provenienti da specie interferenti. Le condizioni operative dello strumento sono riportate in Tabella 2. I valori urinari degli EGP sono stati corretti per la creatinina. La determinazione della creatinina nell'urina è stata eseguita utilizzando il metodo di Jaffe (1986).

Tabella 2. Condizioni strumentali

Spectrometer	ELEMENT-2 (Thermo-Finnigan, Bremen, Germany)
Geometry	Double focusing reverse Nier–Johnson
Resolution (m/Δm)	Low, 300; medium, 4000
Interface	Sampler and skimmer cones in Ni
Data acquisition	Electric scan; 5 runs; 5 passes
RF power (kW)	1.2-1.3
Argon flows (l/min)	Plasma: 14; auxiliary: 1.0; sample: 1.1
Analytical masses (amu)	^{106}Pd , ^{195}Pt , ^{103}Rh , ^{115}In (as Internal Standard)
Interfering masses (amu)	$^{106}\text{Pd}^+$: $^{40}\text{Ar}^{66}\text{Zn}^+$, $^{90}\text{Zr}^{16}\text{O}^+$, $^{88}\text{Sr}^{18}\text{O}^+$, $^{89}\text{Y}^{17}\text{O}^+$ and $^{106}\text{Cd}^+$ $^{195}\text{Pt}^+$: $^{179}\text{Hf}^{16}\text{O}^+$ $^{103}\text{Rh}^+$: $^{206}\text{Pb}^{2+}$, $^{87}\text{Rb}^{16}\text{O}^+$, $^{87}\text{Sr}^{16}\text{O}^+$, $^{40}\text{Ar}^{63}\text{Cu}^+$

Nella quantificazione degli EGP, per tenere sotto controllo sia l'effetto matrice che le eventuali variazioni di segnale dovute a variazioni strumentali, è stato utilizzato il metodo di calibrazione delle aggiunte standard (aggiunta di quantità crescenti degli elementi da analizzare nei campioni) e la standardizzazione interna con ^{115}In .

Inoltre, sempre per correggere la possibile variazione strumentale del segnale durante la sequenza analitica, un campione di controllo (di solito il punto più basso della curva di calibrazione) è stato misurato ad intervalli regolari.

Il ^{195}Pt è stato analizzato utilizzando la bassa risoluzione per via delle interferenze trascurabili da parte di $^{179}\text{Hf}^{16}\text{O}^+$, invece, per ^{106}Pd e ^{103}Rh è stata scelta la media risoluzione, per ridurre il numero di specie interferenti (vedi tabella 2).

E' stato anche effettuato uno studio per stimare l'influenza delle specie interferenti mediante l'aggiunta crescente di ogni elemento potenzialmente interferente. In questo caso gli elementi aggiunti ad un pool di campioni sono stati Cd, Mo, Pb, Rb, Sr, Y e Zr. Inoltre, un'attenta regolazione dei flussi dei gas è stata effettuata in modo tale da limitare la formazione di ossidi e di ioni a doppia carica.

2.1.4. Analisi statistica

L'analisi statistica dei risultati è stata effettuata usando il pacchetto statistico SPSS versione 12,01 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Per verificare la distribuzione normale delle osservazioni è stato effettuato il test di Kolmogorov-Smirnov, mentre il test di Mann-Whitney è stato usato per evidenziare differenze statisticamente significative tra le mediane dei valori di EGP ottenuti. Il test di Grubbs è stato utilizzato per escludere eventuali outliers.

2.2. SVILUPPO E APPLICAZIONE DI UN METODO SF-ICP-MS AD ELEVATA PRODUTTIVITÀ PER LA DETERMINAZIONE SIMULTANEA DI 20 ELEMENTI IN TRACCIA NEL SANGUE

2.2.1. Reagenti e soluzioni standard

Per la diluizione dei campioni e degli standards è stata usata acqua deionizzata (EASY-pure, PBI, Milano, Italia) e HNO_3 di grado ultra-puro (Carlo Erba, Milano, Italia) per la digestione. Soluzioni standard di ogni singolo elemento (SPEX, Edison, NJ, USA) alla concentrazione di 1 mg ml^{-1} sono state usate per preparare i calibranti e gli standards interni (SI).

Sono stati usati due SI in LR: ^{115}In per Ba, Be, Cd, Li, Mo, Sb, Sn, Sr e Zr, e ^{195}Pt per Bi, Hg, Pb, Tl e W. In MR, invece per gli elementi Al, Co, Cr, Mn, Ni e V è stato scelto come SI lo ^{45}Sc . La concentrazione in soluzione analitica di tutti gli SI adottati è stata di 1 ng ml^{-1} .

Lo studio dell'accuratezza è stato effettuato usando il Materiale Certificato di Riferimento (CRM) Clinchek Control (Recipe, Monaco, Germania) (sangue liofilizzato).

2.2.2. Tecnica strumentale

Il forno a MW utilizzato per il processo di mineralizzazione (Milestone ETHOS MEGA II, FKV, Bergamo, Italia) (Figura 3) è munito di un rotore (Milestone MultiPREP 80) che consente la digestione simultanea fino a 80 campioni con un unico ciclo in provette chiuse. La digestione, svolta in condizioni di pressione atmosferica e a temperature inferiori a 100°C , permette il raggiungimento di eccellenti risultati in termini di omogeneità della

soluzione analitica finale, limitando le eventuali cessioni/adsorbimenti da parte delle provette utilizzate.



Figura 3. Forno ETHOS Mega II

La tecnica spettrometrica impiegata per la quantificazione degli elementi in traccia ed ultratraccia nel sangue è SF-ICP-MS (ELEMENT 2, Thermo-Finnigan, Brema, Germania) con le seguenti caratteristiche: radiofrequenza di 1,2 kW - in bassa risoluzione (LR, $m/\Delta m = 300$) e in media (MR, $m/\Delta m = 3000$) – munito di *guard electrode* di Pt, nebulizzatore in vetro tipo Meinhard, camera di espansione raffreddata di tipo Scott e coni di Pt, i flussi di Argon (in l min^{-1}) plasma, 14; ausiliario, 0,9 e nebulizzatore, 0,85.

La tecnica è stata applicata per la rilevazione di 20 elementi in traccia; gli isotopi scelti per la quantificazione, le maggiori interferenze sulle masse e le risoluzioni scelte per ogni elemento sono riportate in Tabella 3.

Tabella 3. Elenco degli isotopi quantificati, masse scelte, loro abbondanza percentuale, risoluzione, principali interferenze spettrali e standard interno (SI)

Elemento	m/z	Abbond.%	Risoluz.	Interferenze	SI
Al	27	100	3000	$^{11}\text{B}^{16}\text{O}, ^{13}\text{C}^{14}\text{N}, ^{54}\text{Fe}^{++}$	Sc
Ba	138	71,7	300	<i>T</i>	In
Be	9	100	300	<i>T</i>	In
Bi	209	100	300	<i>T</i>	Pt
Cd	111	12,8	300	$^{98}\text{Mo}^{16}\text{O}, ^{114}\text{Sn}$	In
Co	59	100	3000	$^{40}\text{Ar}^{19}\text{F}, ^{43}\text{Ca}^{16}\text{O}, ^{41}\text{K}^{18}\text{O}, ^{42}\text{Ca}^{16}\text{O}^1\text{H}$	Sc
Cr	52	83,8	3000	$^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}, ^{36}\text{Ar}^{16}\text{O}, ^{38}\text{Ar}^{14}\text{N}, ^{35}\text{Cl}^{17}\text{O}, ^{37}\text{Cl}^{15}\text{N}, ^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^1\text{H}$	Sc
Hg	202	29,8	300	<i>T</i>	Pt
Li	7	92,5	300	<i>T</i>	In
Mn	55	100	3000	$^{37}\text{Cl}^{18}\text{O}, ^{40}\text{Ar}^{15}\text{N}, ^{39}\text{K}^{16}\text{O}, ^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}^1\text{H}$	Sc
Mo	100	9,63	300	<i>T</i>	In
Ni	60	26,1	3000	$^{44}\text{Ca}^{16}\text{O}, ^{23}\text{Na}^{37}\text{Cl}, ^{36}\text{Ar}^{24}\text{Mg}, ^{120}\text{Sn}^{++}$	Sc
Pb	208	52,4	300	<i>T</i>	Pt
Sb	121	57,3	300	<i>T</i>	In
Sn	120	32,6	300	<i>T</i>	In
Sr	88	82,6	300	<i>T</i>	In
Tl	205	70,5	300	<i>T</i>	Pt
V	51	99,8	3000	$^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}, ^{37}\text{Cl}^{14}\text{N}, ^{40}\text{Ar}^{11}\text{B}, ^{36}\text{Ar}^{14}\text{N}^1\text{H}$	Sc
W	184	30,7	300	<i>T</i>	Pt
Zr	90	51,5	300	<i>T</i>	In

T = interferenze rilevatesi trascurabili

2.2.3. Reclutamento dei soggetti

Volontari (donatori di sangue, residenti nella città di Roma), sono stati reclutati mediante un questionario elaborato *ad hoc* riguardante età, peso, abitudini alimentari, esercizio fisico, uso di farmaci, patologie, fumo, consumo di alcol, ecc. Il questionario, consente di individuare i soggetti idonei allo studio, dotati di caratteristiche specifiche tali da costituire un gruppo di popolazione omogeneo. I criteri di esclusione, trattandosi di individui in

buona salute documentata dalle abituali analisi bio-cliniche, comprendono infezioni in atto, assunzione di ormoni tiroidei o farmaci contenenti litio, assunzione di sostanze psicoattive, vitamine o integratori alimentari, presenza di protesi metalliche. I soggetti con parametri clinici comunque al di fuori della norma sono stati esclusi dallo studio.

Sono stati arruolati per lo studio 110 donatori con un'età compresa tra i 20 e i 61 anni (media 42 ± 10 anni), di cui 37 donne (media 39 ± 10 anni) e 73 uomini (media 44 ± 9 anni).

2.2.4. Campionamento

Il prelievo di sangue è stato eseguito su soggetti a digiuno da 12 ore. Per controllare la cessione di elementi chimici dall'ago di prelievo, che avrebbero potuto influenzare la successiva determinazione degli analiti, il prelievo per le analisi è stato effettuato alla fine della donazione. Provette in polistirene della capacità di 15 ml Falcon® (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA) sono state usate per raccogliere 10 ml di sangue da cui sono state separate 2 aliquote da 1 ml immediatamente conservate a -20°C fino al momento della mineralizzazione. Nessun tipo di anticoagulante è stato usato per evitare un'altra possibile fonte di contaminazione. I contenitori usati erano stati preventivamente lavati con HNO_3 al 10% e successivamente risciacquati con acqua deionizzata, al fine di limitare cessioni da parte delle pareti delle provette.

2.2.5. Preparazione dei campioni e calibrazione

Un'aliquota di 1 ml di sangue, previa aggiunta di 2 ml di HNO_3 , è stata sottoposta al seguente trattamento nel forno a MW. La mineralizzazione è stata svolta a pressione atmosferica secondo la seguente procedura: a) pre-digestione della durata di una notte a temperatura (T) ambiente, b) innalzamento della T fino a 80°C in un'ora, c) digestione a 80°C per 5 ore.

Per controllare le condizioni di svolgimento della digestione, è stata posta una sonda a fibre ottiche per il controllo della temperatura in uno dei contenitori riempiti con la stessa soluzione di reazione. Dopo la digestione, i campioni, raffreddati a T ambiente, sono stati diluiti fino a 15 ml. I bianchi e il CRM, sono stati sottoposti alle stesse fasi di trattamento dei campioni. Per quegli elementi non certificati, l'accuratezza è stata valutata con prove di recupero su campioni fortificati. La precisione è stata valutata misurando 10 replicati di un pool di campioni reali.

Per tenere sotto controllo sia l'effetto matrice che le eventuali variazioni di segnale, è stato utilizzato il metodo di calibrazione delle aggiunte standard e la standardizzazione con SI.

Per ridurre al minimo qualsiasi rischio di contaminazione esogena, tutta la fase preparativa è stata condotta in camera pulita di Classe 100 e sono stati utilizzati acidi di grado Suprapuro e acqua deionizzata.

2.3. ESTENSIONE DEL CAMPO DI APPLICAZIONE DEL METODO SF-ICP-MS A TESSUTI BIOPTICI PER LO SCREENING PRECOCE DEL TUMORE DEL COLON RETTO

2.3.1. Reclutamento dei pazienti, campionamento, conservazione e trattamento dei campioni

Sono stati elaborati questionari idonei per la selezione dei soggetti. L'anamnesi è stata effettuata considerando gli aspetti del soggetto che possono aver avuto influenzato il carico corporeo dei metalli (esposizioni, abitudini di vita, etc.) oltre a quelli di natura specificatamente medica (particolari patologie). Le interviste ai soggetti eleggibili sono state effettuate presso gli ospedali di Roma San Carlo di Nancy e Policlinico Umberto I. Prelievi di tessuti bioptici del colon sono stati effettuati in pazienti sani (H) (n= 27) e patologici (P e N) (polipi tubulo-villoso con vario tipo di displasia e adenocarcinoma) (n=15) per la definizione del corrispettivo profilo elementare.

Le modalità di prelievo e di conservazione del campione hanno seguito i criteri riconosciuti indispensabili in campo internazionale per una corretta analisi degli elementi in traccia, al fine di non alterare l'informazione analitica.

I prelievi bioptici (2-10 mg) sono stati effettuati con pinze da biopsia preventivamente saggiate per escludere eventuali contaminazioni. I tessuti bioptici sono stati raccolti in provette di polistirene (Necton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA) e sono state successivamente trasportate in laboratorio e conservate a -20°C fino al momento della mineralizzazione.

Tutti i materiali per campionamento e conservazione sono stati preventivamente controllati e decontaminati. I contenitori usati sono stati

preventivamente lavati con HNO_3 al 10% e successivamente risciacquati con acqua deionizzata.

Tutte le operazioni sono state svolte in modo tale da minimizzare la manipolazione dei campioni al fine di ridurre contaminazioni dei campioni o perdita di analiti. Ogni fase del trattamento o manipolazione del campione è stato eseguito in laboratorio pulito di Classe 100.

2.3.2. Reagenti e strumentazione

Per la diluizione dei campioni e degli standards è stata usata acqua deionizzata (EASY-pure, PBI, Milano, Italia) e HNO_3 di grado ultra-puro (Carlo Erba, Milano, Italia) per la digestione. Soluzioni standard di ogni singolo elemento (SPEX, Edison, Nj, USA) alla concentrazione di 1 mg/ml sono state usate per preparare la retta di taratura e gli standards interni (SI).

Per la digestione è stato impiegato il forno a microonde (MW) (Milestone ETHOS MEGA II, FKV, Bergamo, Italy) le cui caratteristiche sono state precedentemente illustrate.

Tra gli elementi investigati (30) ce ne sono alcuni presenti nei tessuti a basse concentrazioni quali Ag, As, Au, Be, Bi, Co, Li, Sb, Ti, V, W, Zr, altri presenti a concentrazioni maggiori quali Al, Ba, Cd, Cr, Cs, Hg, Mo, Mn, Ni, Pb, Se e Sn ed altri ancora a concentrazione elevate come Ca, Cu, Fe, Mg, Sr, Zn. Le condizioni sperimentali sono riportate in Tabella 4.

Per la media (MR) ed alta risoluzione (HR) gli isotopi scelti per la quantificazione, le maggiori interferenze sulle masse e le risoluzioni per ogni elemento sono riportati in Tabella 5. Per gli isotopi quantificati in bassa risoluzione (LR) sono stati scelte le masse più abbondanti, eccezion fatta per Ag, Cd e Sn. Per Ag è stato scelto l'isotopo con massa 109 anziché 107 a causa dell'interferenza data da $^{40}\text{Ar}^{67}\text{Zn}$. Per il Cd il 111 anziché il 114 per l'interferenza data da ^{114}Sn . E infine per Sn è stato scelto il 118 anziché il 120 per l'interferenza $^{40}\text{Ar}^{80}\text{Se}$. In MR, invece, è stato scelto Ni

60 anziché 58 a causa del segnale fortemente interferito da ^{58}Fe . Infine, in HR, è stato scelto il Ca 44 anziché 40 e il Se 82 anziché il 76,78,80 o 77 a causa di ^{40}Ar e $^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}$ e $^{38}\text{Ar}^{39}\text{K}$, rispettivamente.

Per tenere sotto controllo sia l'effetto matrice che le eventuali variazioni di segnale, è stato utilizzato il metodo di calibrazione delle aggiunte standard e la standardizzazione con SI. In particolare sono stati utilizzati tre SI: per la bassa risoluzione (LR) è stato impiegato ^{115}In per Ag, Au, Ba, Be, Cd, Cs, Li, Mo, Sb, Sn, Sr, Zr e ^{195}Pt per Bi, Hg, Pb, Tl, W; per la media risoluzione (MR) è stato impiegato ^{45}Sc per Al, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, V; per la alta risoluzione (HR) è stato impiegato ^{115}In per As, Ca, Fe, Mg, Se e Zn. La concentrazione in soluzione analitica di tutti gli standard è stata di 1 ng ml^{-1} .

L'ottimizzazione è stata realizzata grazie all'impiego di materiali di riferimento certificati (CRM), in particolare è stato usato il BCR184 (muscolo di bovino) (IRMM, Belgio). Per gli elementi non certificati l'accuratezza è stata valutata con prove di recupero su campioni fortificati. La precisione è stata valutata misurando un pool di 10 campioni reali.

Tabella 4. Modalità di mineralizzazione e setting strumentale

Digestion		
Sample weight	2,0-10 mg	
Reagent added	0,5 ml HNO ₃	
MW program (step)	Temperature (°C)	Time (min)
1	25-70	15
2	70	15
3	70-80	10
4	80	90
Samples processed	up to 80	
Final volume	2 ml	
Analysis		
Geometry	Double focusing reverse Nier-Johnson	
RF power	1.2 KW	
Argon flows (L min ⁻¹)	Plasma, 14,0; auxiliary, 0,9; nebulizer, 0,85	
Nebulization	Meinhard-type glass, water-cooled Scott spray chamber	
Interface	Pt sampler and skimmer cones	
Measurements	Electric scan, 2 runs and 2 passes for each resolution	

Per la definizione delle differenze del profilo elementare tra soggetti sani e soggetti con polipi gli elementi analizzati, sulla base dei dati di letteratura esistenti, sono stati presi in considerazione 15 elementi chimici, in particolare , in LR ^{138}Ba , ^{114}Cd , ^{202}Hg , ^{208}Pb , ^{88}Sr , in MR ^{27}Al , ^{59}Co , ^{52}Cr , ^{63}Cu , ^{55}Mn e in HR ^{44}Ca , ^{56}Fe , ^{24}Mg , ^{82}Se , ^{64}Zn . Gli SI utilizzati in concentrazione di 1 ng ml^{-1} in soluzione analitica sono stati in LR ^{115}In per Ba, Cd, Sr, ^{195}Pt per Hg, Pb; in MR ^{45}Sc per Al, Co, Cr, Cu, Mn e ^{115}In per Ca, Fe, Mg, Se, Zn.

Tabella 5. Isotopi quantificati in MR (4000 $m/\Delta m$) e HR (10000 $m/\Delta m$)

Element	m / z	Abundance (%)	Resolution	Interferences separated with the selected resolution
Al	27	100	MR	$^{11}\text{B}^{16}\text{O}$, $^{13}\text{C}^{14}\text{N}$, $^{12}\text{C}^{14}\text{NH}$, $^{54}\text{Fe}^{++}$
As	75	100	HR	$^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$, $^{36}\text{Ar}^{39}\text{K}$, $^{36}\text{Ar}^{38}\text{ArH}$,
Ca	44	2,1	HR	$^{28}\text{Si}^{16}\text{O}$, $^{27}\text{Al}^{16}\text{O}^1\text{H}$, $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$, $^{14}\text{N}^{14}\text{N}^{16}\text{O}$
Co	59	100	MR	$^{40}\text{Ar}^{19}\text{F}$, $^{43}\text{Ca}^{16}\text{O}$, $^{41}\text{K}^{18}\text{O}$, $^{36}\text{Ar}^{23}\text{Na}$, $^{40}\text{Ar}^{18}\text{OH}$, $^{42}\text{Ca}^{16}\text{O}^1\text{H}$
Cr	52	83,8	MR	$^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}$, $^{36}\text{Ar}^{16}\text{O}$, $^{38}\text{Ar}^{14}\text{N}$, $^{35}\text{Cl}^{17}\text{O}$, $^{37}\text{Cl}^{15}\text{N}$, $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^1\text{H}$
Cu	63	69,2	MR	$^{40}\text{Ar}^{23}\text{Na}$, $^{44}\text{Ca}^{19}\text{F}$
Fe	56	91,7	HR	$^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$, $^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}$
Mg	24	79	HR	$^{12}\text{C}^{12}\text{C}$, $^{48}\text{Ca}^{++}$
Mn	55	100	MR	$^{37}\text{Cl}^{18}\text{O}$, $^{40}\text{Ar}^{15}\text{N}$, $^{39}\text{K}^{16}\text{O}$, $^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}^1\text{H}$
Ni	60	26,1	MR	$^{44}\text{Ca}^{16}\text{O}$, $^{23}\text{Na}^{37}\text{Cl}$, $^{36}\text{Ar}^{24}\text{Mg}$
Se	82	9,20	HR	$^{66}\text{Zn}^{16}\text{O}$, $^{40}\text{Ar}^{42}\text{Ca}$, $^{65}\text{Cu}^{16}\text{O}^1\text{H}$, $^{64}\text{Zn}^{17}\text{O}^1\text{H}$
V	51	99,8	MR	$^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}$, $^{37}\text{Cl}^{14}\text{N}$, $^{40}\text{Ar}^{11}\text{B}$, $^{36}\text{Ar}^{14}\text{N}^1\text{H}$
Zn	64	48,6	HR	$^{40}\text{Ar}^{24}\text{Mg}$, $^{48}\text{Ca}^{16}\text{O}$, $^{36}\text{Ar}^{28}\text{Si}$

2.3.3. Trattamento dei campioni e analisi dei dati

I campioni di biopsie (da 2 a 10 mg) di 10 individui sani (7 uomini e 3 donne) ($58,3 \pm 14,9$ anni) e, successivamente, campioni di biopsie di 17 soggetti sani (6 uomini e 11 donne, $55,6 \pm 13$ anni) e 15 biopsie di soggetti interessati da polipi adenomatosi (9 uomini e 6 donne, $63,5 \pm 6$ anni) sono stati prelevati e conservati in provette in polistirene ad una temperatura di -

20 °C. Al momento dell'analisi, sono stati scongelati a T ambiente, pesati e lasciati in stufa per 12 ore a 105 °C (contenuto in H₂O compreso tra 59 e 84%). Ad ogni campione sono stati aggiunti 0,5 ml di HNO₃ e sono stati mineralizzati in forno a MW per un tempo totale di digestione di circa 2 ore secondo il seguente schema: 1) innalzamento della T fino a 70 °C in 15 minuti, 2) digestione a 70 °C per 15 minuti, 3) innalzamento della T a 80 °C in 10 minuti e 4) digestione a 80 °C per 90 minuti (Tabella 8).

Per la verifica del metodo sono stati pesati 20 mg di BCR 184 (10 repliche da 20 mg ciascuna) e processati come i campioni. Successivamente è stato aggiunto 1 ml di HNO₃ a ciascuna replica e le 10 repliche di BCR184 sono state mineralizzate in MW insieme ai campioni e a 10 bianchi. Dopo la mineralizzazione, i campioni i CRM e i bianchi, raffreddati a T ambiente, sono stati diluiti con H₂O fino a un volume finale di 2 ml e analizzati tramite SF-ICP-MS.

Per confronto sani vs. malati polipotici i campioni mineralizzati sono stati diluiti con H₂O fino a un volume finale di 2 ml e analizzati tramite SF-ICP-MS.

Ai dati ottenuti è stata applicata un'analisi statistica per determinare il set di variabili in grado di differenziare tra i gruppi di popolazione in esame, in particolare i tests U Mann-Whitney (H vs. P e H vs. N) e Wilcoxon (N vs. P); dove H= mucosa di soggetti sani, P= mucosa di soggetti con polipi ed N= mucosa sana di soggetti con polipi.

2.4. DETERMINAZIONE DI PIOMBO NEL LATTE MATERNO MEDIANTE SF-ICP-MS E SENSORI ELETTROCHIMICI

2.4.1. Campioni e materiali di riferimento

Aliquote di latte materno sono state raccolte in contenitori di polistirene da 50 ml Falcon® (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA) e conservate ad una temperatura di -20°C fino al momento dell'analisi. Le aliquote, scongelate a T ambiente, sono state riunite a formare un pool in una bottiglia di polietilene. Tutti i contenitori sono stati precedentemente decontaminati con una soluzione al 10% di HNO_3 (Grado suprapuro, Merck, Darmstadt, Germania) risciacquate più volte con acqua deionizzata ad elevata purezza (EASY-pure, PBI, Milano, Italia). Dalla bottiglia di polietilene in agitazione meccanica, sono state prelevate e pesate 3 aliquote: una di latte tal quale (campione A) e altre due che sono state fortificate con 20 ng ml^{-1} (campione B) e 40 ng ml^{-1} (campione C) di piombo.

Per lo studio dell'accuratezza, sono stati sottoposti ad analisi anche i seguenti materiali di riferimento certificati (CRM): BCR 63R (latte materno) e BCR 150 (latte bovino) (IRMM, Belgio).

Ciascun campione e materiale di riferimento, è stato analizzato mediante la tecnica della voltammetria di stripping anodico ad onda quadra con elettrodi *screen-printed* al fine di verificare l'applicabilità a campioni reali di un metodo sviluppato ed ottimizzato dal gruppo di ricerca del laboratorio di Chimica Analitica dell'Università di Roma "Tor Vergata" per la determinazione del piombo. Aliquote dei campioni e dei CRM sono stati anche analizzati mediante SF-ICP-MS per la verifica delle prestazioni del metodo elettrochimico.

2.4.2. SF-ICP-MS

2.4.2.1 Preparazione dei campioni e calibrazione

Per la diluizione dei campioni e degli standard è stata usata acqua deionizzata (EASY-pure, PBI, Milano, Italia) e HNO_3 e H_2O_2 di grado ultra-puro (Carlo Erba, Milano, Italia) per la digestione. Soluzioni standard (SPEX, Edison, NJ, USA) alla concentrazione di 1 mg ml^{-1} sono state usate per preparare soluzioni standard, calibranti e standard interno (SI).

In vessel di teflon sono stati pesate repliche di 2 g di ciascun campione (A, B e C) e di ciascun CRM e sono stati aggiunti 4 ml di HNO_3 e 0,5 ml di H_2O_2 . I campioni, i CRM e i bianchi sono stati sottoposti ad un ciclo di digestione a pressione elevata con forno a MW (Milestone ETHOS MEGA II, FKV, Bergamo, Italia) secondo il seguente schema:

- 5 minuti a 250 W
- 5 minuti a 0 W
- 5 minuti a 400 W
- 2 minuti a 600 W

I campioni mineralizzati sono stati ripresi e diluiti con acqua deionizzata fino ad un volume finale di 10 ml. Per tenere sotto controllo sia l'effetto matrice che le eventuali variazioni di segnale dovute a variazioni strumentali, è stato utilizzato il metodo di calibrazione delle aggiunte standard e la standardizzazione interna con ^{115}In a concentrazione in soluzione analitica di 1 ng ml^{-1} .

Inoltre, sempre per correggere la possibile variazione strumentale del segnale durante la sequenza analitica, un campione di controllo è stato misurato ad intervalli regolari. Per la quantificazione, tra gli isotopi di Pb, è stato utilizzato quello con massa più abbondante, cioè il ^{208}Pb (52,40 % di abbondanza). La quantificazione è stata eseguita utilizzando la bassa

risoluzione per via delle interferenze trascurabili da parte di $^{192}\text{Pt}^{16}\text{O}$ e $^{192}\text{Os}^{16}\text{O}$ nei campioni considerati.

2.4.2.2. Analisi SF-ICP-MS

La determinazione del Pb nei campioni di latte materno tal quale e fortificato, nei materiali certificati di riferimento e nei bianchi è stata eseguita mediante SF-ICP-MS (Element 2, Thermo-Finnigan, Bremen, Germania) secondo le condizioni sperimentali riportate in Tabella 6. La precisione è stata valutata misurando 20 replicati dello stesso pool di campioni reali.

Tabella 6. Condizioni strumentali

Spectrometer	ELEMENT-2 Thermo Finnigan, Bremen, Germany
<i>Geometry</i>	Double focusing reverse Nier-Johnson
<i>Resolution (m/Δm)</i>	Low, 300
<i>Interface</i>	Sampler and skimmer cones in Ni
<i>Data acquisition</i>	Electric scan, 3 runs; 3 passes
<i>RF power (kW)</i>	1,2-1,3
<i>Argon flows (l min⁻¹)</i>	Plasma: 14,0, auxiliary: 0,98; sample 1,09
<i>Analytical mass (amu)</i>	^{208}Pb
<i>Interfering mass (amu)</i>	$^{192}\text{Pt}^{16}\text{O}$ $^{192}\text{Os}^{16}\text{O}$ *

* Interferenze trascurabili

2.4.3. Voltammetria di stripping anodico ad onda quadra

(cfr. appendice B)

2.4.3.1. Strumentazione e reagenti

I campioni A, B e C, i CRM sono stati anche analizzati utilizzando un sensore elettrochimico sviluppato dal gruppo di ricerca dell'Università di Roma Tor Vergata, basato su elettrodi *screen-printed* (SPE) modificati “*in situ*” con un film di bismuto. Le misure sono state effettuate mediante un potenziostato portatile PalmSens (Palm Instrument BV, Houten, Olanda), con

GPES software (Eco-Chemie, Utrecht, Olanda), collegato ad un'unità esterna di controllo (Figura 4).

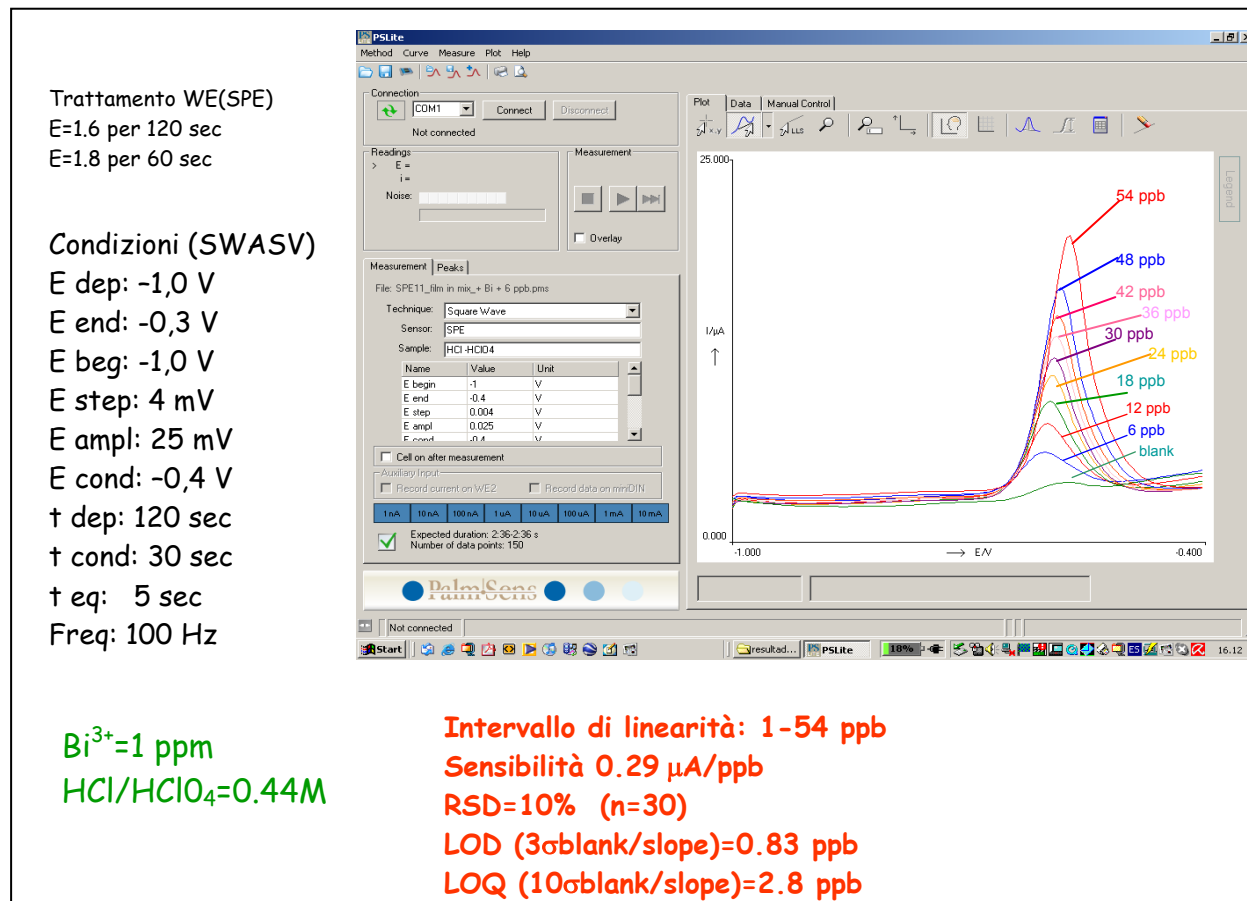
Le prestazioni e le caratteristiche del metodo sviluppato per soluzioni standard, sono riportate nel box 5.



Figura 4. Potenziostato portatile PalmSens

Per le analisi sono stati utilizzati i seguenti reagenti: soluzioni standard di bismuto e piombo ad elevata purezza alla concentrazione di 1000 ppm (Aldrich St. Louis MO, USA), Nafion 5 wt % (Fluka), perossido di idrogeno al 30% (Riedel-de Haen), acido perclorico (Fluka), acido cloridrico (Fluka), idrossido di sodio (Fluka), ferrocianuro decaidrato (Riedel-de Haen) e acqua ultrapura Millipore Milli-Q (resistività 18.2 M Ω /cm, TOC < 5 ppb), ottenuta da un sistema Gradient A10, collegato ad un sistema Elix per la produzione di acqua deionizzata.

Box 5. Prestazioni del sensore utilizzando la SWASV per la determinazione del piombo



2.4.2.2. Elettrodi screen-printed

Negli ultimi anni si è affermata la tecnologia a film spesso (Thick Film Technology) come tecnologia valida ed efficace nella produzione su larga scala di sensori miniaturizzati a basso costo, di elevata riproducibilità e adatti a misure sul campo. Tali caratteristiche rendono questi elettrodi utilizzabili come monouso. Gli elettrodi sono prodotti utilizzando diversi materiali come inchiostri a base di polimeri, argento, carbonio e altri composti comunque dotati di una buona conduttività. La tecnica usata è detta *screen-printed*. (Figura 5) che prevede tre fasi principali:

- 1) deposizione
- 2) asciugatura
- 3) sinterizzazione degli inchiostri stampati

Lo screen è composto da una maglia di seta sintetica strettamente tesa e posta su un telaio che determinerà la forma, le dimensioni di stampa e la quantità di inchiostro che viene depositata.

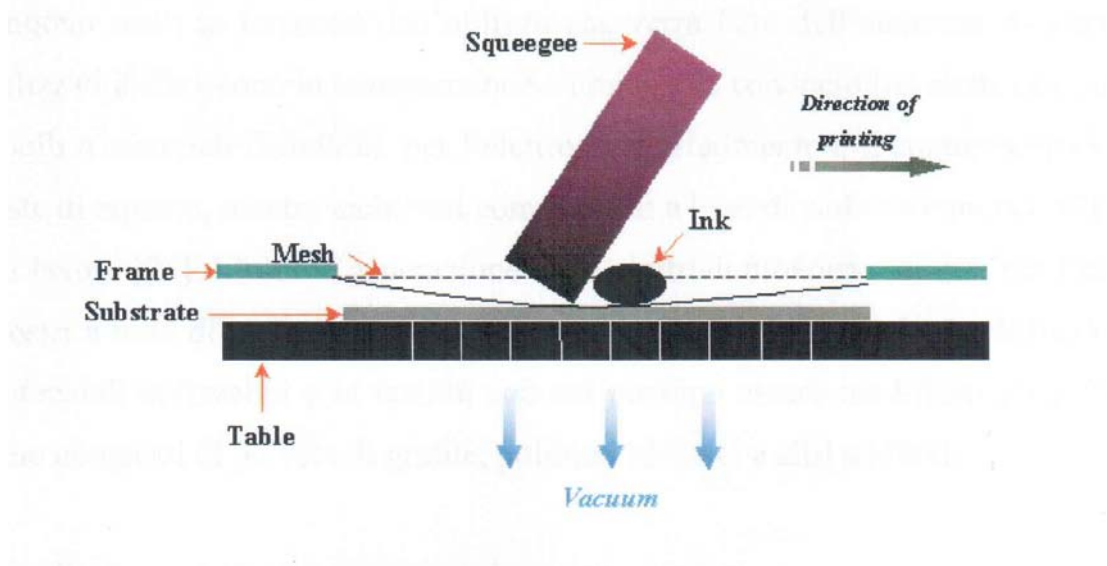


Figura 5. Meccanismo di stampa SPE

I pori della seta sono tali da essere il più aperti possibile quando la seta viene posta sul telaio e l'inchiostro viene pressato sul supporto da un apposito stampo. Il passaggio successivo, l'asciugatura, prevede che lo strato stampato sia posto in stufa (T compresa tra 100 e 1200 °C) in modo tale che le paste depositate vengano stabilizzate e polimerizzate. La scelta dei possibili supporti è condizionata dalle temperature raggiunte durante il processo di stabilizzazione. Quando queste raggiungono valori compresi tra 300 e 1200 °C il materiale usato sarà di tipo ceramico (allumina, magnesia), quando come, in questo caso gli inchiostri usati polimerizzano a T tra 100 e 300° C, si utilizzano materiali plastici (Figura 6).

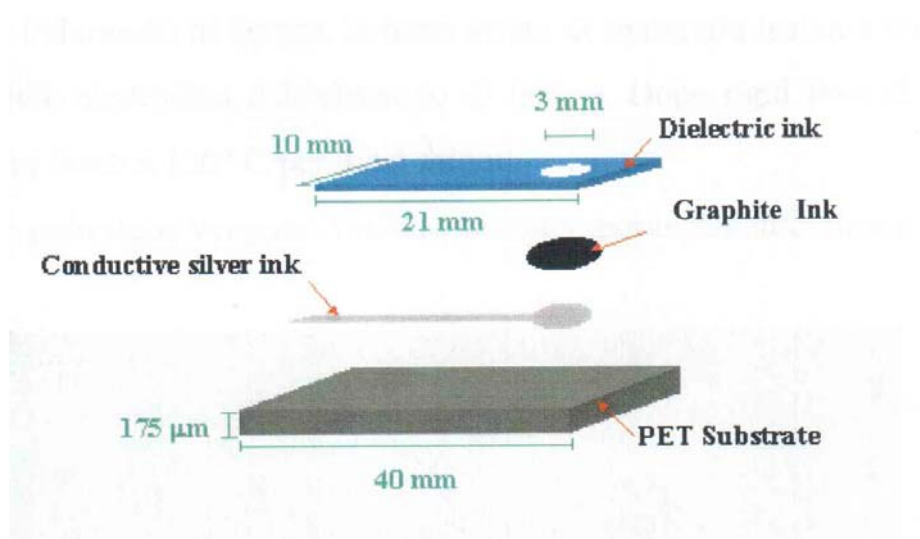


Figura 6. Fasi di assemblaggio SPE

Gli inchiostri utilizzati vengono scelti in funzione dell'elettrodo da stampare; ad esempio per l'elettrodo di riferimento e il contro elettrodo vengono utilizzate paste d'argento, mentre inchiostri commerciali a base di carbone e metalli (Pt e Au) per l'elettrodo di lavoro. L'ultima generazione degli elettrodi monouso utilizza per l'elettrodo di lavoro inchiostri a base di carbone dato il loro basso costo, la bassa corrente di fondo, l'ampio spettro di potenziali utilizzabili e la facilità con cui possono essere modificati. Questi inchiostri sono composti di polvere di grafite, polimeri sintetici e altri additivi.

Gli elettrodi utilizzati sono stati prodotti nel laboratorio di Chimica Analitica dell'Università di Roma "Tor Vergata". La macchina per serigrafia utilizzata è una DEK 245 (DEK, Weymouth, UK) (Figura 7).



Figura 7. DEK 245

Nello studio condotto i supporti utilizzati per la stampa degli elettrodi consistono in film di poliestere AUTOSTAT HT5 (0,175 mm) dalla AUTOTYPE (Milano, Italia) e gli inchiostri Acheson (Acheson Colloiden Italiana, Milano, Italia) usati sono: Electrodag 477 SS RFU con un contenuto in solidi del 74-76% per lo strato d'argento, un inchiostro di grafite Electrodag 423 SS RFU con un contenuto in solidi del 35-37% ed un inchiostro isolante Electrodag 6010 SS.

Inoltre, nel sistema a tre elettrodi il primo strato depositato è stato quello d'argento per l'elettrodo di riferimento, quello ausiliario ed i contatti elettrici, mentre il secondo strato depositato è stato quello di grafite per l'elettrodo di lavoro. Il terzo strato di materiale isolante è stato applicato per delimitare la superficie elettrodica dell'elettrodo di lavoro. Dopo ogni fase di deposizione è seguita una fase di asciugatura in stufa a T e tempi diversi; in particolare a 100 °C per 10 minuti per i primi due strati e a 70 °C per 20 minuti per l'ultimo strato. In ciascun foglio di poliestere sono stati stampati contemporaneamente fino a 80 sistemi a tre elettrodi (Figure 8 e 9).

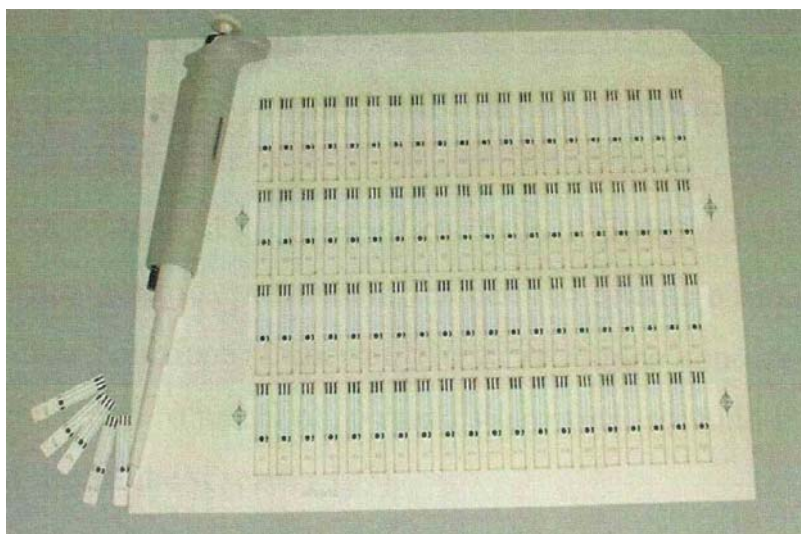


Figura 8. Foglio di poliestere stampato con tecnica screen-printed

Ciascun sistema veniva quindi isolato dal foglio per poi essere incollato su un supporto rigido di policarbonato.

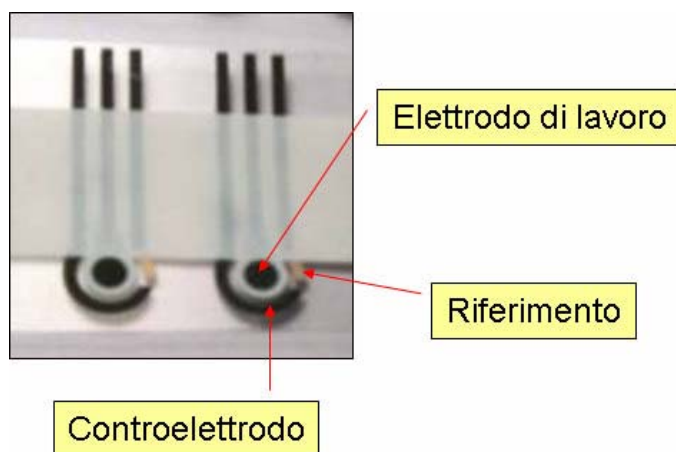


Figura 9. Elettrodi screen-printed

2.4.2.3. Trattamento ossidativo degli elettrodi e modifica con Nafion

Gli elettrodi sono stati successivamente trattati per 2 minuti a 1,6 V (vs Ag/AgCl) e per 1 minuto a 1,8 V in una soluzione tampone acetato 50 mM di

acetato/cloruro di potassio a pH 4,6. L'elettrodo è stato mantenuto in posizione orizzontale e sulla superficie dell'elettrodo di lavoro è stata depositata una goccia di 5 μ l di una soluzione di Nafion 0,5% w/v per formare la membrana permoselettiva indispensabile per eseguire le misure. Successivamente gli elettrodi così trattati sono stati posti in stufa per la fase di asciugatura per 30 minuti a 37 °C.

2.4.2.4. Preparazione dei campioni e analisi

I campioni sono stati preparati ed analizzati secondo le procedure previste da un metodo precedentemente sviluppato dal gruppo di ricerca del laboratorio di chimica analitica dell'Università di Roma di "Tor Vergata" ed ottimizzato in soluzioni di HCl/HClO₄ 0,44 M a pH 2 per la determinazione del piombo.

Tre repliche da 20 ml di ciascun campione (A, B e C) e da 1 g di ciascun CRM diluito fino a 20 ml con acqua deionizzata, sono stati trattati secondo il seguente schema sperimentale:

- aggiunta di 10 ml di HClO₄ 2,2 M (per l'ossidazione del campione);
- sonicazione (Falc Vetro Scientifica, Roma) per 1 ora a T ambiente;
- aggiunta di 4 ml HCl 5,5 M (per la precipitazione delle proteine del latte)
- sonicazione (Falc Vetro Scientifica, Roma) per 1 ora a T ambiente;
- centrifugazione (ALC PK 120) 6000 giri per 20 minuti;
- pH 2 con NaOH.

Un'aliquota di 5 ml di campione o CRM (preparato secondo la procedura sopra descritta) è stata sottoposta ad un ulteriore trattamento con ultrasuoni (30 minuti a T ambiente) previa aggiunta di 100 μ l di H₂O₂ a concentrazione di 2 mM. Inoltre è stata aggiunta una soluzione standard di ferrocianuro 10 mM in soluzione analitica per la complessazione con rame, elemento normalmente presente ad elevate concentrazioni nella matrice oggetto di indagine e in grado di interferire con le misure SWASV.

Infine, una soluzione standard di Bi(III) ad una concentrazione di 1000 ng ml⁻¹ in soluzione analitica è stata direttamente aggiunta al campione da analizzare (deposizione *in situ*) realizzando una deposizione simultanea del metallo analita (Pb nel nostro caso) e del bismuto.

La determinazione del piombo è correlata alla misura dell'ampiezza del picco voltammetrico ed è stata eseguita mediante il metodo delle aggiunte standard.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

Gli studi condotti nell'ambito dell'attività di tesi sono stati finalizzati al biomonitoraggio e alla valutazione dell'esposizione ad elementi in traccia di diversi gruppi di popolazione mediante tecniche spettrometriche ad elevato grado di innovazione.

Per conseguire tali obiettivi sono stati identificati in fase progettuale, alcuni campi di indagine di particolare interesse dal punto di vista del rischio sanitario e di multidisciplinarietà di approccio che potessero costituire dei modelli sperimentali applicabili in differenti contesti.

In particolare i settori di interesse hanno riguardato quattro fondamentali linee di ricerca.

Un primo settore di indagine è stato focalizzato sul rischio correlato all'esposizioni professionale ad elementi chimici, approfondito mediante un caso-studio sui livelli urinari di Pt, Rh e Pd in una popolazione di ferrotramvieri. Una seconda linea di ricerca ha investigato il potenziale ruolo di alcuni elementi tossicologicamente significativi quali biomarcatori di patologie neoplastiche, mediante uno studio condotto su soggetti sani e pazienti affetti da polipi adenomatosi del colon-retto. Un'indagine specifica di particolare estensione ha poi riguardato la definizione di valori di riferimento, indispensabili nella realizzazione di campagne di biomonitoraggio; a tal fine, previo sviluppo e validazione di un metodo analitico multielementare altamente sensibile e specifico, ad elevata produttività, sono stati determinati i livelli di oltre venti elementi in traccia nel tessuto ematico della popolazione generale e proposti i relativi valori di riferimento. Un più recente settore di studio, per cui sono disponibili soltanto alcuni dati preliminari, ha considerato il rischio di esposizione di un gruppo sensibile di popolazione ad elementi tossici, focalizzando l'attenzione sui livelli di piombo nel latte materno; in tale contesto è stato avviato lo sviluppo di metodologie di screening basate su sensori elettrochimici e metodi di conferma SF-ICP-MS.

L'articolazione delle ricerche, estese a differenti ambiti del biomonitoraggio, considerando diverse matrici e gruppi di popolazione, ha

richiesto la progettazione e conduzione di una serie di attività concertate e sinergiche per il raggiungimento degli obiettivi.

Tali attività hanno in primo luogo riguardato lo sviluppo e validazione di metodi analitici di screening e conferma, inclusa l'implementazione di sistemi innovativi di preparazione del campione e metodi di rivelazione multielementare ad elevata produttività. Sotto il profilo della selezione del campione di popolazione di riferimento sono stati elaborati nuovi criteri e sviluppati modelli informatici *ad hoc* riferibili alla popolazione generale, a gruppi di popolazione specifici quali soggetti professionalmente esposti, gruppi sensibili e soggetti in stato patologico. La raccolta, elaborazione e gestione dei dati, effettuate mediante approcci statistici convenzionalmente adottati in studi di biomonitoraggio, hanno verificato l'applicabilità di tali modelli nei differenti contesti considerati.

I risultati conseguiti sono di seguito descritti, in funzione dell'articolazione dello studio nelle diverse fasi, quali, in particolare:

- 1) Biomonitoraggio dei livelli urinari di Pt, Rh e Pd mediante SF-ICP-MS in una popolazione professionalmente esposta;
- 2) Sviluppo di un metodo SF-ICP-MS, ad elevata produttività, per la determinazione simultanea di 20 elementi in traccia nel sangue ed applicazione per la definizione di valori di riferimento;
- 3) Estensione del campo di applicazione del metodo SF-ICP-MS a tessuti bioptici per lo screening precoce del tumore del colon retto;
- 4) Determinazione di Pb nel latte materno mediante sensori elettrochimici e SF-ICP-MS.

3.1. BIOMONITORAGGIO DEI LIVELLI URINARI DI PLATINO, RODIO E PALLADIO MEDIANTE SF-ICP-MS IN UNA POPOLAZIONE PROFESSIONALMENTE ESPOSTA

3.1.1. Prestazioni analitiche

Per quanto riguarda la quantificazione del ^{106}Pd , i maggiori interferenti trovati sono stati $^{40}\text{Ar}^{66}\text{Zn}^+$, $^{88}\text{Sr}^{18}\text{O}^+$, $^{90}\text{Zr}^{16}\text{O}^+$, $^{89}\text{Y}^{17}\text{O}^+$ e il ^{106}Cd isobarico. Conducendo l'analisi in media risoluzione (MR) è stato possibile eliminare l'interferenza dovuta a ArZn^+ . I contributi dovuti alle specie interferenti SrO^+ , ZrO^+ e YO^+ sono stati praticamente risolti grazie alla ottimizzazione strumentale effettuata quotidianamente per ridurre la formazione degli ossidi e grazie anche alla poca abbondanza in natura dell'isotopo ^{18}O e al basso contenuto di Zr ($< 10 \text{ ng l}^{-1}$) e Y ($< 5 \text{ ng l}^{-1}$) nelle urine. Invece, l'interferenza dovuta al ^{106}Cd , è stata tenuta in considerazione monitorando il segnale del ^{111}Cd , corretto a sua volta per l'influenza del $^{95}\text{Mo}^{16}\text{O}^+$.

Le specie $^{40}\text{Ar}^{63}\text{Cu}^+$, $^{87}\text{Rb}^{16}\text{O}^+$, $^{87}\text{Sr}^{16}\text{O}^+$ e $^{206}\text{Pb}^{2+}$ sono state considerate come possibili interferenti sulla massa ^{103}Rh . L'interferenza del $^{40}\text{Ar}^{63}\text{Cu}^+$ è stata risolta lavorando in MR, mentre le interferenze dovute a $^{87}\text{Sr}^{16}\text{O}^+$ e $^{87}\text{Rb}^{16}\text{O}^+$ sono state giudicate non rilevanti, grazie all'ottimizzazione della formazione degli ossidi. Il segnale del Pb^{++} sulla massa 103 è stato altrettanto bene superato lavorando in MR. Infine, l'influenza di $^{179}\text{Hf}^{16}\text{O}^+$ sul ^{195}Pt è stata considerato trascurabile vista la trascurabile quantità di Hf normalmente presente nelle urine ($< 5 \text{ ng l}^{-1}$).

Per quanto riguarda le prestazioni della tecnica utilizzata, il limite di rivelabilità è stato di $0,05 \text{ ng l}^{-1}$ per Pt, $0,2 \text{ ng l}^{-1}$ per Pd e Rh.

Per la verifica dell'accuratezza, sono state effettuate prove di recupero con l'aggiunta ad un pool di urine di concentrazioni note di EGP, non essendo presenti Materiali Certificati di Riferimento (CRM) per gli EGP

urinari. I recuperi ottenuti sono stati: per il Rh 102% (aggiunta di 10 ng l⁻¹), per il Pd 98,4% (aggiunta di 10 ng l⁻¹) e per il Pt 98,9% (aggiunta di 2 ng l⁻¹).

La precisione del metodo, valutata misurando 10 replicati di un pool di campioni reali è stata <5%.

3.1.2. Contenuto di EGP nelle urine

Le caratteristiche principali degli individui dei due gruppi oggetto di indagine sono riportati in Tabella 6.

Tabella 6. Caratteristiche dei due gruppi studiati

		Controls	Tram drivers
Age (yrs)	≤ 45	36	25
	> 45	22	39
Smoke	Yes	16	20
	No	42	44
Employment (yrs)	< 10	-	13
	≥ 10	-	51
Residence	Urban (within the green zone)	55	63
	Suburban	3	1
Total		58	64

La percentuale di ferrotramvieri ha un' età > 45 e la maggior parte di essi (80% circa) svolge questa attività lavorativa da più di 10 anni ed abita nell'area urbana della città di Roma. I ferrotramvieri e i controlli sono fumatori secondo le seguenti percentuali: 31,2 e 27,6%, rispettivamente. Le analisi statistiche dei risultati sono state effettuate su un numero ridotto di dati, essendo stati esclusi sia campioni con un valore di creatinina al di fuori del range 0,3 – 3,0 g l⁻¹, sia con livelli di EGP considerati outliers. La Tabella 7

riporta i dati di concentrazione per Pt, Rh e Pd nelle urine del gruppo di controllo e del gruppo di esposti, normalizzati per il contenuto di creatinina.

Il test di Mann-Whitney ha messo in evidenza differenze statisticamente significative tra ferrotramvieri e controlli nel caso del contenuto urinario sia di Pt che di Rh (valori di p pari a 0,04 e $< 0,0001$, rispettivamente); nessuna differenza statisticamente significativa è stata, invece, riscontrata tra i due gruppi per il contenuto di Pd.

Tabella 7. Livelli di EGP nelle urine (ng g^{-1} di creatinina) di ferrotramvieri e controlli

	Pt		Rh		Pd	
	Controls (n = 55)	Drivers (n = 62)	Controls (n = 55)	Drivers (n = 61)	Controls (n = 49)	Drivers (n = 55)
Minimum	0.08	0.22	0.80	2.54	2.86	2.58
Maximum	16.39	27.61	40.83	48.81	29.05	89.71
25th percentiles	0.51	0.80	5.38	15.15	5.56	4.94
50th percentiles	1.03	1.22	11.18	19.16	11.79	8.75
75th percentiles	1.84	3.69	16.47	27.30	16.75	11.47
Mean	1.86	3.55	12.21	21.73	12.40	12.34
SD	2.68	5.42	8.84	10.73	7.42	14.81
Lower 95 % CI of mean	1.14	2.17	9.82	18.98	10.26	8.33
Upper 95% CI of mean	2.59	4.93	14.60	24.47	14.53	16.34
Geometric mean (GM)	0.99	1.70	8.95	18.95	10.23	8.85
Lower 95% CI of GM	0.72	1.27	7.03	16.36	8.49	7.25
Upper 95% CI of GM	1.35	2.27	11.40	21.96	12.33	10.80

Quando tutti i soggetti in studio, vengono raggruppati in base all'età (ad esempio <45 e >45 anni) la media dei valori per il Rh sono significativamente più bassi nei controlli che nei ferrotramvieri in entrambi i

gruppi di età; ad esempio, per i soggetti di età <45 anni il contenuto di Rh nei controlli (n=36) è pari a 11,03 ng g⁻¹ di creatinina, mentre per i ferrotramvieri (n=25) il contenuto è pari a 13,5 ng g⁻¹ (p=0,0013). Invece, per il Pt, quando i soggetti vengono raggruppati in base all'età non vengono riscontrate grosse differenze di concentrazione tra controlli ed esposti, dimostrando, quindi che il contenuto di Pt nelle urine non è influenzato dall'età.

3.1.3. Discussione

I risultati mostrano una differenza significativa nel contenuto urinario di Pt tra ferrotramvieri e soggetti di controllo. Si può notare come il range dei valori di Pt nei ferrotramvieri (0,22-27,61 ng g⁻¹ creatinina) sia più ampio e maggiormente spostato verso livelli più elevati rispetto ai soggetti di controllo (0,08-16,39 ng g⁻¹ creatinina). Inoltre, è interessante notare che il valore medio per il Pt nei ferrotramvieri non normalizzato per la creatinina (4,78 ng l⁻¹) sia del tutto confrontabile con altri gruppi di popolazione professionalmente esposta della città di Roma, come ad esempio gli agenti di polizia (4,51 ng l⁻¹), mentre risulta essere superiore ad altri gruppi di popolazione professionalmente esposta come i conducenti di autobus (2,8 ng l⁻¹) e di taxi (1,3 ng l⁻¹) della città di Monaco di Baviera. Al contrario, il valore qui riportato risulta essere ben al di sotto di quello osservato in soggetti impiegati in una azienda produttrice di catalizzatori (1,86 µg l⁻¹).

Anche per quel che concerne il Rh, in questo studio sono state riscontrate differenze significative tra ferrotramvieri e controlli; nonostante ciò, i livelli medi di Rh nei ferrotramvieri non normalizzati per la creatinina (25,6 ng l⁻¹) appaiono comunque molto più bassi rispetto ad un'altra categoria di lavoratori professionalmente esposti alle polveri di EGP (lavoratori in una fabbrica di catalizzatori automobilistici) che mostrano valori di Rh fino a 270 ng l⁻¹.

Nessuna differenza significativa è stata riscontrata, invece, per il contenuto urinario di Pd tra i due gruppi esaminati. Confrontando la media geometrica non normalizzata per la creatinina del contenuto di Pd di entrambi i gruppi indagati (13,82 e 11,95 ng l⁻¹, rispettivamente per i controlli e i ferrotramvieri) con la media geometrica di uno studio condotto da Begerow e Dunemann (2000) nei lavoratori impiegati nella costruzione di strade si può osservare come i valori da noi riscontrati siano più bassi sia per il gruppo di esposti (52,2 ng l⁻¹, media geometrica), sia per il gruppo di controllo (media geometrica di 31,0 ng l⁻¹) costituito da ragazzi dell'età di 20 anni. Si può ipotizzare che l'esposizione dei ferrotramvieri sia inferiore rispetto ai costruttori di strada, dal momento che la propria attività lavorativa si svolge comunque all'interno di un mezzo di trasporto e quindi in un ambiente "più riparato".

Quindi i valori urinari di Pt e Rh possono rappresentare un utile biomarker per la popolazione professionalmente esposta a questi due metalli, essendosi dimostrati capaci di distinguere tra individui non esposti ed individui professionalmente esposti. Per quanto riguarda il Pd, lo studio non ha messo in evidenza differenze nel contenuto urinario nei due gruppi indagati, suggerendo che probabilmente la concentrazione di questo metallo non viene alterata, almeno finora, dal traffico veicolare.

Infine, i valori urinari di Pt, Rh e Pd per il gruppo di controllo rappresentano valori di riferimento "preliminari" per questi elementi, ancora poco indagati, nella popolazione non esposta professionalmente.

3.2. SVILUPPO DI UN METODO SF-ICP-MS, AD ELEVATA PRODUTTIVITÀ, PER LA DETERMINAZIONE SIMULTANEA DI 20 ELEMENTI IN TRACCIA NEL SANGUE

3.2.1. Prestazioni analitiche

Gli elementi Ba, Be, Bi, Hg, Li, Pb, Sb, Sn, Sr, Tl, W e Zr, di cui sono stati scelti gli isotopi più abbondanti, sono stati rilevati in LR e senza alcuna correzione matematica, dal momento che non destano problemi di interferenze. Per il Mo, invece, è stata scelta la massa 100, al posto della più abbondante 98, a causa della pesante interferenza di $^{40}\text{Ar}^{58}\text{Fe}$; il Fe è, infatti, presente nella matrice sangue ad elevate concentrazioni (0,5 -1,0 mg l⁻¹). Gli isotopi Al, Co, Cr, Mn, Ni e V, invece, a causa delle interferenze dovute alle specie isobariche e agli ioni a doppia carica e poliatomici che si formano nel plasma induttivo, sono stati quantificati in MR. Anche per questi elementi sono stati scelti gli isotopi più abbondanti, eccezion fatta per il Ni influenzato dall'interferenza isobarica da parte del ^{58}Fe . I Limiti di Rivelabilità (LdR), calcolati con il criterio del 3σ e tenendo conto della diluizione, sono riportati in Tabella 8.

Si può notare come per la maggior parte degli elementi i LdR siano al di sotto di 0,05 ng ml⁻¹, eccezion fatta per Al, Cr, Hg, Pb, Sn e Sr (in rosso in tabella). Di solito, si tratta di valori da 5 a 10 volte inferiori alla concentrazione rilevata nei campioni reali. Solo nel caso del Co (LdR pari a 0,01 ng ml⁻¹) i limiti sono molto vicini alle concentrazioni riscontrate nei campioni reali. I limiti trovati per Ba, Be, Bi, Hg, Sb, Sn, Sr, Tl e V sono comparabili con quelli riportati in Krachler et al. (1999), in cui viene impiegata la digestione acida con MW per i fluidi biologici.

Tabella 8. LdR (ng ml⁻¹)

Elemento	LdR	Elemento	LdR
Al	0,90	Mo	0,05
Ba	0,02	Ni	0,04
Be	0,03	Pb	0,32
Bi	0,002	Sb	0,007
Cd	0,03	Sn	0,08
Co	0,01	Sr	0,06
Cr	0,07	Tl	0,003
Hg	0,15	V	0,003
Li	0,02	W	0,003
Mn	0,05	Zr	0,006

I risultati relativi all'accuratezza del metodo sono riportati in Tabella 9. La valutazione dell'accuratezza è stata effettuata mediante l'uso del CRM Clinchek Control. Per il suddetto CRM sono disponibili valori certificati solo per 7 elementi (in rosso); per tutti gli altri, la valutazione dell'accuratezza è stata effettuata con prove di recupero su campioni fortificati.

Tabella 9. Accuratezza (media ± SD in ngml⁻¹)

Elemento	Valore certificato	Valore trovato	Elemento	Valore certificato	Valore trovato
Al	10*	9,2±0,31	Mo	1,0*	0,98±0,04
Ba	1,0*	0,87±0,04	Ni	7,5±1,8	8,1±0,6
Be	0,5*	0,48±0,03	Pb	105±24	107±5
Bi	0,05*	0,044±0,003	Sb	0,5*	0,052±0,01
Cd	1,2±0,4	1,32±0,09	Sn	1,0*	0,95±0,04
Co	1,6±0,5	1,68±0,11	Sr	10*	9,82±0,5
Cr	2,0±0,5	1,98±0,15	Tl	0,05*	0,046±0,003
Hg	2,90±1,0	2,92±0,11	V	0,05*	0,053±0,003
Li	1,0*	1,10±0,08	W	0,05*	0,044±0,002
Mn	23,8±4,7	23,7±1,5	Zr	0,5*	0,54±0,02

*= campione fortificato

L'accuratezza varia da 87% (Ba) al 110% (Cd e Li). La precisione del metodo va dal 1,2% per il Pb al 4,3% per il Ni.

Dai dati di accuratezza e precisione ottenuti è possibile affermare che il metodo di digestione impiegato accoppiato alla rilevazione con SF-CP-MS, consente il raggiungimento di buone prestazioni analitiche.

3.2.2. Contenuto dei 20 elementi nella popolazione di riferimento

In Tabella 10 sono riportati i risultati ottenuti con le procedure sviluppate su campioni reali di sangue, ossia sui 110 donatori che costituiscono, nel nostro caso, una popolazione di riferimento non professionalmente esposta. Si può osservare che quasi tutti i valori ottenuti ricadono negli intervalli riportati per ciascun elemento in letteratura (Ba, Be, Cd, Co, Cr, Hg, Li, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Sn, Sr, V, W); solo per Al e Zr, Bi e Tl, i valori riportati sono, rispettivamente, al di sopra e al di sotto degli intervalli di letteratura.

3.2.3. Discussione

Il metodo di digestione acida con MW a bassa P e T impiegato in questo studio, risulta essere particolarmente indicato per l'analisi di campioni biologici, poiché consente l'impiego di provette in polistirene che vengono usate dal prelievo fino all'analisi, passando per tutti i pre-trattamenti, compresa la digestione. In questo modo la contaminazione esterna e la perdita degli analiti è ridotta al minimo. Inoltre, è possibile preparare simultaneamente un numero elevato di campioni - a differenza del tradizionale utilizzo di vessels in Teflon, i cui rotori consentono di digerire un numero limitato di campioni per ciclo - a cui viene applicata una procedura di digestione piuttosto blanda. Inoltre, l'utilizzo di provette usa e getta consente di ovviare la successiva fase di decontaminazione, necessaria quando

vengono impiegati i tradizionali contenitori in Teflon, fase dispendiosa sia in termini di tempo che di reagenti.

Anche lo svolgimento di tutte le fasi di pre-trattamento in un laboratorio classe 100, l'utilizzo di reagenti di grado ultrapuro e di acqua deionizzata rappresentano tutti fattori che riducono ulteriormente la contaminazione esterna.

Tabella 10. Concentrazione degli elementi in traccia (ng ml^{-1}) nel sangue (n=110)

Elemento	Media $\pm$ DS	Mediana	Percentili (%)				Bibliografia*
			5	25	75	95	
Al	17,0 $\pm$ 9,37	15,3	5,93	9,68	21,2	33,3	2 – 15
Ba	1,25 $\pm$ 0,61	1,13	0,50	0,80	1,66	2,40	0,47 - 2,4
Be	0,42 $\pm$ 0,19	0,44	0,10	0,28	0,51	0,75	<0,07 - 0,28
Bi	0,03 $\pm$ 0,02	0,03	0,02	0,02	0,04	0,06	0,12 - 0,80
Cd	0,99 $\pm$ 0,51	0,95	0,25	0,59	1,32	1,97	0,1 - 1,7
Co	0,12 $\pm$ 0,08	0,11	0,03	0,06	0,15	0,24	0,04 - 0,91
Cr	0,44 $\pm$ 0,27	0,38	0,12	0,26	0,55	1,07	0,01 - 1,2
Hg	6,36 $\pm$ 4,11	4,94	1,97	3,33	8,75	14,5	1,7 - 9,9
Li	0,86 $\pm$ 0,54	0,71	0,20	0,46	1,19	1,87	1,2 - 3,4
Mn	7,70 $\pm$ 3,13	7,85	1,53	5,93	9,50	13,2	7,1 - 10,5
Mo	3,06 $\pm$ 1,57	2,88	1,02	1,83	4,11	6,03	0,21 - 5,41
Ni	0,89 $\pm$ 0,61	0,83	0,14	0,43	1,21	2,13	0,3 - 3,3
Pb	39,5 $\pm$ 20,2	35,0	12,8	25,3	50,5	79, 5	4 – 47
Sb	0,47 $\pm$ 0,26	0,41	0,07	0,29	0,66	0,94	0,3 - 3,0
Sn	1,51 $\pm$ 0,60	1,48	0,63	1,10	1,82	2,61	0,35 - 4,3
Sr	27,3 $\pm$ 11,8	25,5	10,1	19,6	34,9	50,3	7 – 36
Tl	0,07 $\pm$ 0,04	0,07	0,03	0,05	0,10	0,15	0,15 - 0,63
V	0,09 $\pm$ 0,05	0,08	0,03	0,05	0,11	0,18	0,03 - 0,28
W	0,07 $\pm$ 0,03	0,06	0,03	0,04	0,09	0,14	0,02 - 0,18
Zr	0,49 $\pm$ 0,24	0,45	0,20	0,32	0,62	0,95	0,07 - 0,44

*(Caroli et al., 1994; Minoia et al., 1990; Roduskin et al., 1999; Roduskin, 2001)

Inoltre, la distruzione della matrice organica tramite digestione acida con MW produce soluzioni limpide ed omogenee che riducono il pericolo di intasamento della torcia e del nebulizzatore e la conseguente instabilità del segnale. La digestione, svolta a temperatura inferiore agli 80°C, preserva anche l'integrità sia delle provette. Inoltre, la fase di pre-digestione a P e T ambiente durante la notte precedente ed il lento raggiungimento della temperatura di digestione prevengono il surriscaldamento della miscela - conseguenza delle massicce reazioni esotermiche. In futuro è auspicabile l'utilizzo di questa tecnica di digestione anche per altre matrici biologiche, come ad esempio i tessuti.

Infine, poichè i criteri di selezione degli individui (donatori) che hanno partecipato allo studio e le procedure seguite per la definizione dei livelli degli elementi in traccia nel tessuto ematico sono, in questo specifico caso, ben caratterizzati e adeguatamente descritti, le concentrazioni riscontrate possono essere ragionevolmente considerati dei veri e propri valori di riferimento (VR), in virtù anche dell'adeguata numerosità del campione.

3.3. ESTENSIONE DEL CAMPO DI APPLICAZIONE DEL METODO SF-ICP-MS A TESSUTI BIOPTICI PER LO SCREENING PRECOCE DEL TUMORE DEL COLON RETTO

3.3.1. Prestazioni analitiche

Le prestazioni del metodo sono riportate in Tabella 11.

Tabella 11. Prestazioni del metodo (* campione fortificato)

Elemento	LdR (ng/g)	Accuratezza (ng/g)		Precisione (%)
		Atteso	Trovato	
Ag	0,003	25*	24,2±11	4,75
Al	1,25	2500*	2568±104	5,88
As	0,50	250*	238±121	7,46
Au	0,01	25*	24,1±1,5	3,66
Ba	0,04	250*	257±10	608
Be	0,03	25*	25,5±1,7	8,12
Bi	0,03	25*	25,8±1,2	6,38
Ca	1,5	(150)	149±9,8	2,08
Cd	0,02	13±2	14,3±1,7	4,33
Co	0,01	25*	24,0±1,9	7,07
Cr	0,06	(76-153)	111±13	3,58
Cs	0,003	250*	260±18	2,07
Cu	0,80	2,36±0,06	2,42±0,15	4,26
Fe	0,50	79,0±2,0	80,9±3,3	4,88
Hg	0,10	250*	240±13	4,00
Li	0,01	25*	24,5±0,8	4,16
Mg	1,2	(1020)	1002±60	2,99
Mn	0,08	334±28	349±25	6,37
Mo	0,04	250*	242±12	4,71
Ni	0,20	(270)	265±19	5,68
Pb	0,06	239±11	223±18	2,62
Sb	0,02	25*	24,2±1,6	4,75
Se	0,30	183±12	175±12	6,38
Sn	0,30	250*	259±17	8,44
Sr	1,00	2500*	2402±158	2,53
Tl	0,033	25*	24,1±0,7	3,68
V	0,02	25*	24,2±00,6	8,27
W	0,02	25*	25,8±1,4	6,07
Zn	1,30	166±3	161±9	2,48
Zr	0,03	25*	26,2±1,2	7,83

Si può notare che i limiti di rivelabilità (LdR) sono $< 0,1 \text{ ng ml}^{-1}$ per molti elementi, compresi tra 2 e 10 ng ml^{-1} per As, Cu, Fe, Ni, Se, Sn, Sr e $> 1 \text{ ng ml}^{-1}$ per Al, Ca, Mg, Zn.

L'accuratezza indagata tramite BCR 184 (da 93,3% per Pb a 110% per Cd) e prove di recupero su BCR 184 fortificati (da 95,2% per As a 105% per Zr) mostra chiaramente che il protocollo impiegato non dà luogo né a contaminazioni né a perdite di analiti nonostante siano stati applicati fattori di diluizioni anche molto elevati (fino a 1000) per alcuni elementi. La precisione è stata sempre $< 10\%$.

3.3.2. Contenuto degli elementi chimici in tessuti biotipici

Il contenuto dei 30 elementi chimici in $n=10$ biopsie di mucosa intestinale sana riportati in Tabella 12.

Si può osservare che i risultati ottenuti possono essere suddivisi in 4 gruppi:

- 1) Ag, Au, Be, Bi, Co, Li, Sb, Tl, V, W, Zr con mediana $< 50 \text{ ng g}^{-1}$;
- 2) As, Ba, Cd, Cr, Cs, Hg, Mo, Ni, Pb, Se, Sr con mediana tra 100 e 500 ng g^{-1} ;
- 3) Al, Cu, Fe, Mn, Sr, Zn con mediana da pochi $\mu\text{g g}^{-1}$ a $100 \mu\text{g g}^{-1}$;
- 4) Ca e Mg con mediana di circa $1000 \mu\text{g g}^{-1}$.

Inoltre, paragonando i dati ottenuti con quelli di letteratura (media $\pm$ DS in ng g^{-1}) è possibile osservare che in letteratura sono riportati dati relativi solo a pochi elementi, per molti di quelli da noi indagati non esistono dati disponibili al momento. Inoltre, quasi tutti i dati non fanno riferimento a tessuti normali ma provenienti da soggetti patologici, tranne che nel caso riportato da Martin Mateo e Martin (1988). Comunque, anche se ottenuti con tecniche analitiche diverse, si può osservare un buon accordo per Al, Cd, Fe e Se. Dello stesso ordine di grandezza sono le concentrazioni di Ba, Co e Pb, mentre i valori ottenuti per Cu, Mg, Mn e Zn sono più elevati rispetto ai dati di letteratura. Per Ca, Cr e Ni i valori sono controversi.

Tabella 12. Concentrazione degli elementi chimici in ng g⁻¹ peso secco

Elemento	Media±DS	Mediana	Range
Ag	16,1±13,1	9,79	2,97-37,5
Al	2746±1449	2519	864-5191
As	<LdR (< 150 ng g ⁻¹)	-	-
Au	17,0±8,1	13,7	7,49-28,9
Ba	611±396	489	223-1477
Be	<LdR (< 12 ng g ⁻¹)	-	-
Bi	51,9±30,6	36,3	24,5-97,4
Ca	819±304*	756	358-1425
Cd	199±112	191	35,9-422
Co	35,5±28,1	30,2	11,5-89,2
Cr	445±342	343	92,4-1148
Cs	287±166	251	142-708
Cu	26,0±10*	24,1	13,3-39,6
Fe	121±75,0*	107	48,2-315
Hg	252±179	221	40,5-527
Li	12,1±7,50	8,72	7,00-27,8
Mg	1094±239*	1090	756-1602
Mn	3343±1258	2814	1969-6352
Mo	150±55,0	135	85,5-290
Ni	123±40,0	120	82,2-183
Pb	137±50,0	155	50,1-217
Sb	14,3±2,8	15,1	10,3-16,6
Se	737±359	574	420-1436
Sn	201±35,0	203	163-245
Sr	2791±2227	2051	542-7846
Tl	16,6±15,5	11,5	4,61-55,3
V	35,5±20,9	27,5	19,1-80,4
W	24,5±20,5	13,5	11,9-48,1
Zn	89,5±19,4*	86,5	59,0-123
Zr	27,8±25,9	17,2	8,52-88,0

In conclusione il protocollo sviluppato presenta notevoli vantaggi, primo tra tutti offre la possibilità di determinare un gran numero di elementi (fino a 30) in campioni biologici le cui quantità disponibili sono piuttosto limitate (pochi mg). Grazie all'utilizzo della stessa provetta a partire dal campionamento fino al momento dell'analisi sono pressoché scongiurate perdite di analiti e/o contaminazioni. Inoltre il metodo presenta livelli di bianchi molto bassi.

La quantificazione tramite SF-ICP-MS permette, grazie alla disponibilità di 3 diverse risoluzioni, di risolvere eventuali interferenze e di quantificare tutti gli elementi (sia micro che macro-elementi) in una sola sequenza analitica.

Il metodo sviluppato è stato poi applicato per la rilevazione di 15 elementi chimici in tessuti biotici di soggetti sani (H) e di soggetti con polipi adenomatosi del colon retto (P= polipo, N= tessuto sano adiacente al polipo) e i risultati dei livelli riscontrati sono riportati in Tabella 13.

Nel confronto H vs. P differenze significative si riscontrano per elementi quali Fe, Se, Ba, Cd e Hg. In particolare nei polipi si ha un maggiore contenuto in Fe (+100%) e Se (142%) e minore per Ba (-68%), Cd (-70%) e Hg (-64%).

Nel confronto N vs. P si evidenziano differenze per Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe e Hg in particolare nei polipi si ha un maggiore contenuto in Fe (+58%) e minore per gli altri elementi (da -21% per Cu a -77% per Cd).

Infine da notare che non ci sono differenze significative tra tessuti sani (H vs. N) provenienti da soggetti sani e con polipi.

In letteratura sono riportati dati in cui vengono messi in relazione con il CCR elementi quali Cu, Fe, Se e Zn mentre per gli altri elementi esistono pochi dati piuttosto controversi. Questo risultato si osserva anche in virtù delle differenti tecniche analitiche impiegate. Inoltre, generalmente i dati fanno riferimento solo a tessuti biotici provenienti da pazienti affetti da polipi o CCR a diversi stadi, mentre non esistono dati provenienti da tessuti sani di soggetti sani e/o con polipi, tranne rare eccezioni. I valori trovati nei soggetti sani sono confrontabili con quelli già definiti nella fase di sviluppo metodologico e vanno quindi ad ampliare il range dei VR precedentemente stabiliti.

Tabella 13. Concentrazione degli elementi in tessuti sani (H) di soggetti sani, tessuti sani (N) e polipi (P) di soggetti con polipi

	H		N		P		Differences (p)		
	Mean±SD	Median	Mean±SD	Median	Mean±SD	Median	H vs. N ^b	H vs. P ^b	N vs. P ^c
Al	3,726±2,099	3,396	3,254±1,425	2,743	2,817±3,201	1,279	ns	ns	ns
Ba	791±478	758	949±684	761	428±479	243	ns	0.032	0.035
Ca^a	855±246	745	732±271	753	754± 252	698	ns	ns	ns
Cd	222±97	238	298±120	310	97±66	71	ns	0.001	<0.001
Co	29.8±15.9	32	39.8±25.4	29	19±16	18	ns	ns	0.003
Cr	365±196	326	509±284	455	261±252	163	ns	ns	0.049
Cu^a	27±12	25	29±11	28	20±5	22	ns	ns	0.017
Fe^a	117±66	115	130±48	146	246±150	230	ns	0.006	0.009
Hg	433±408	283	481±422	274	113±81	102	ns	0.009	<0.001
Mg^a	1,079±244	1,045	1,105±209	1,086	1,263±318	1223	ns	ns	ns
Mn	3,724±1,938	3,591	4,950±2,500	4,944	3,558±1,091	3810	ns	ns	ns
Pb	194±145	160	156±109	161	155±145	114	ns	ns	ns
Se	611±351	514	949±377	830	1,559±527	1,243	ns	0.001	ns
Sr	3,330±2,159	3696	2,379±1,330	1970	2,192±1330	2,162	ns	ns	ns
Zn^a	94±23	101	100±22	102	93±26	89	ns	ns	ns

I valori sono in ng g⁻¹ (peso secco)

^a concentrazione in µg g⁻¹ (peso secco)

^b Mann-Whitney test

^c Wilcoxon test

ns: non significativo

E' da osservare che il profilo degli elementi tra tessuti sani (H vs. N) è assolutamente confrontabile tra loro a conferma del fatto che il contenuto in metalli della mucosa sana (N), non è influenzata dall'alterazione nel contenuto elementare che si riscontra a livello dei polipi.

Inoltre, sia H che N presentano livelli più alti rispetto a P per elementi quali Al, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Hg e Pb. Mg, Mn, Sr e Zn sono invece riscontrabili a livelli simili. Solamente il contenuto in Fe e Se è molto più alto in P rispetto ad H e leggermente rispetto a N. In diversi studi viene riportata la capacità del Fe di indurre il CCR in modelli animali e di aumentare il rischio di sviluppare il CCR nell'uomo in quanto capace di sopprimere la risposta immunitaria e indurre la formazione di radicali liberi. Anche in un lavoro di Kucharzewski (2003) viene riportato un contenuto di Fe maggiore in tessuti con CCR rispetto a quelli con polipi così come da Hornik (2006), suggerendo

che la concentrazione di Fe aumenti progressivamente dal tessuto sano a quello lesionato.

Per quanto riguarda il Se, sono note le sue proprietà antiossidanti e anticancerogene in quanto componente dell'enzima glutatione perossidasi insieme al glutatione. Inoltre il Se svolge un ruolo importante nell'inibizione di oncogeni ed è stato dimostrato che una bassa concentrazione di Se potrebbe rappresentare un rischio per lo sviluppo del CCR.

Inoltre, in alcuni lavori viene riportato un significativo aumento del contenuto in Se in diversi tessuti. Questo aumento è stato in diversi lavori giustificato come un tentativo del corpo di inibire la crescita tumorale.

In conclusione si può affermare che i dati presentati forniscono indicazioni importanti circa il profilo di elementi essenziali e non, in tessuti sani e in polipi adenomatosi, precursori del CCR. Infatti la maggior parte dei CCR sono adenocarcinomi e sono il risultato della trasformazione di un polipo adenomatoso attraverso l'evoluzione adenoma - carcinoma. In maniera ancora preliminare si può affermare che elementi quali Al, Ca, Mg, Mn, Pb, Sr, Zn sembrano non discriminare tra i diversi soggetti esaminati; i valori di Ba, Cd e Hg sono significativamente più bassi nei polipi, mentre Fe e Se sembrano accumularsi nei tessuti lesionati.

3.4. DETERMINAZIONE DI PIOMBO NEL LATTE MATERNO MEDIANTE SENSORI ELETTROCHIMICI E SF-ICP-MS

3.4.1. SF-ICP-MS

Le prove di sviluppo per il metodo SF-ICP-MS sono in fase preliminare.

I risultati sono stati ottenuti in fase di pre-validazione per le seguenti caratteristiche di prestazione:

- limite di rivelabilità strumentale (3σ /bianco), ($n=20$), è di $0,01 \text{ ng g}^{-1}$ per Pb.
- accuratezza: valutata mediante prove di recupero su campioni di latte materno, previamente analizzati fortificati a livelli di $20 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ e $40 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ e utilizzo di CRM, mediante prove in triplo è compresa tra 98 – 110%.
- precisione (RSD): risultata inferiore al 4% ($n = 15$).

La quantificazione della concentrazione di Pb in un campione di latte materno analizzato è risultato $1,2 \pm 0,05 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$.

3.4.2. Voltammetria di stripping anodico ad onda quadra (SWASV)

Anche le prove di sviluppo per il metodo SWASV basato su elettrodi *screen-printed* sono in fase preliminare.

I risultati sono stati ottenuti in fase di pre-validazione per le seguenti caratteristiche di prestazione:

- linearità: verificata nell'intervallo 4 - $100 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ con coefficienti di correlazione (R^2) superiori a 0,98
- limite di rivelazione (3σ /bianco): stimato $1 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$.

- accuratezza: valutata mediante prove di recupero su campioni di latte materno, previamente analizzati fortificati a livelli di $20 \mu\text{g l}^{-1}$ e $40 \mu\text{g l}^{-1}$ e utilizzo di CRM, mediante prove in triplo, indica un valore medio di circa 60%.
- precisione (RSD): risultata inferiore al 15% ($n = 15$).

3.4.3. Discussione

Parallelamente alle attività di sviluppo metodologico e definizione di criteri e valori di riferimento per il biomonitoraggio descritte nelle precedenti sezioni, un settore di studio di più recente approccio nell'ambito del lavoro di tesi ha considerato il rischio di esposizione di gruppi sensibili di popolazione, quali i neonati, ad elementi neurotossici, in particolare il piombo, attraverso una dieta costituita essenzialmente da latte materno.

Lo sviluppo di metodologie appropriate per lo screening e la conferma, rispettivamente mediante sensori elettrochimici e SF-ICP-MS è attualmente in corso di finalizzazione.

I risultati delle prove di prevalidazione per il metodo SWASV basato su elettrodi *screen-printed* e per il metodo SF-ICP-MS indicano, sulla base delle caratteristiche di prestazione ad oggi stimate (linearità, limite di rivelazione, accuratezza, precisione), l'idoneità dei metodi agli scopi.

Per quanto riguarda le metodologie basate su sensori elettrochimici, ricerche sono anche in corso per ridurre l'effetto di interferenza della matrice e semplificare le procedure di preparazione del campione.

La programmazione delle attività del breve periodo prevede il completamento della fase di validazione dei metodi e quindi una valutazione del metodo di screening mediante correlazione con la metodica SF-ICP-MS. Su tali basi sarà possibile disporre di strumenti di indagine appropriati per approfondire il livello di conoscenza sui contenuti di Pb nella matrice oggetto

di indagine, fornendo elementi di valutazione del rischio di particolare utilità per la prevenzione di deficit cognitivi e danni neurologici nella prima infanzia.

4. CONCLUSIONI

Le attività condotte nell'ambito del lavoro di tesi si inquadrano in un'area di ricerca di primaria rilevanza ai fini della prevenzione, che ha per oggetto l'interazione tra elementi chimici e salute umana.

Gli studi sono stati finalizzati all'implementazione di nuovi criteri e metodologie di biomonitoraggio per la valutazione dell'esposizione ad elementi in traccia di diversi gruppi di popolazione, mediante tecniche spettrometriche ad elevato grado di innovazione. Un sistema analitico alternativo per la determinazione del piombo mediante sensori elettrochimici è in corso di sperimentazione.

Più in particolare ricerche specifiche, condotte nella prima fase degli studi, hanno riguardato il rischio correlato all'esposizione professionale ad elementi del gruppo del platino. I risultati conseguiti possono costituire presupposti per la definizione dei valori di riferimento per gli stessi elementi nella popolazione generale e consentono inoltre di proporre Pt e Rh quali utili biomarcatori di esposizione per popolazioni professionalmente esposte a traffico veicolare.

Un settore di indagine di particolare estensione ha riguardato la definizione di valori di riferimento per la popolazione generale, indispensabili per la valutazione del rischio nel campo dell'esposizione ai metalli. La gestione degli elevati volumi e flussi di lavoro propri del biomonitoraggio è stata affrontata mediante lo sviluppo e la validazione di un metodo analitico multielementare SF-ICP-MS, sensibile e specifico ad elevata produttività che ha permesso la determinazione di oltre venti elementi in traccia nel sangue.

L'estensione del campo di applicazione del metodo a differenti matrici e la contestuale ottimizzazione dei parametri sperimentali di preparazione dei campioni ha consentito di disporre di un approccio analitico di notevoli

potenzialità e versatilità. Su tali presupposti sono state affrontate indagini sperimentali specifiche, quali lo screening di patologie neoplastiche. In particolare è stato esplorato il valore predittivo di elementi chimici tossicologicamente significativi nella diagnosi precoce del tumore del colon-retto. I risultati, limitatamente al campione esaminato, hanno evidenziato un ruolo marginale di Al, Ca, Mg, Mn, Pb, Sr, Zn quali indicatori in tessuti affetti da patologia pre-cancerosa ed una probabile correlazione inversa tra livelli di Ba, Cd e Hg ed insorgenza di lesioni; viene infine confermata la tendenza ad accumulo di Fe e Se nei tessuti patologici.

L'ultima fase delle ricerche, attualmente ancora in corso, ha considerato il rischio di esposizione di gruppi sensibili di popolazione (neonati) ad elementi neurotossici come il piombo attraverso la dieta (latte materno). Lo sviluppo di metodologie appropriate per lo screening e la conferma, rispettivamente mediante sensori elettrochimici e ICP-MS, è attualmente in corso di finalizzazione. Il progresso di tali ricerche consentirà di approfondire il livello di conoscenza sui contenuti di Pb nella matrice oggetto di indagine fornendo elementi di valutazione del rischio di particolare utilità per la prevenzione di deficit cognitivi e danni neurologici nella prima infanzia.

In conclusione, le ricerche condotte, estese a differenti ambiti del biomonitoraggio, hanno consentito di approfondire lo stato delle conoscenze in molteplici campi di indagine di rilevanza sotto il profilo del rischio sanitario, quali: - il ruolo di biomarcatori emergenti del gruppo del platino in popolazioni professionalmente esposte; - il significato di alcuni elementi nella diagnosi precoce di neoplasie del colon-retto; e, infine, - l'esposizione di gruppi sensibili di popolazione ad elementi neurotossici.

Un elemento trasversale nel corso delle ricerche è rappresentato dallo sviluppo e validazione di metodi analitici utilizzabili ai fini di screening e conferma, inclusa l'implementazione di sistemi innovativi di preparazione del campione e di metodi di rivelazione multielementare ad elevata produttività.

I modelli sperimentali, verificati in settori differenti e complessi nel corso delle ricerche di tesi, hanno dimostrato notevoli potenzialità applicative e versatilità e possono essere pertanto proposti come approccio innovativo per l'implementazione di programmi di biomonitoraggio e per la definizione di strategie di prevenzione e controllo degli elementi in traccia, a tutela della salute umana.

5. BIBLIOGRAFIA

Introduzione

1. Alimonti A, Petrucci F, Laurenti F, Papoff P, Caroli S. 2000. Reference values for selected trace elements in serum of term newborns from the urban area of Rome. *J Environ Monit*, 2:351-354.
2. Alimonti A, Bocca B, Mannella E, Petrucci F, Zennaro F, Cotechini R, D'Ippolito C, Agresti A, Caimi S, Forte G. 2005. Assessment of reference values for selected elements in a healthy urban population, *Ann Ist Super Sanità*, 41(2):181-187.
3. Alimonti A, Forte G, Spezia S, Gatti A, Mincione G, Ronchi A, Bavazzano P, Bocca B, Minoia C. 2005. Uncertainty of inductively coupled plasma mass spectrometry based measurements: an application to the analysis of urinary barium, cesium, antimony and tungsten. *Rapid Commun Mass Spectrom* 19:3131–3138.
4. Apostoli P, et al. 2004. Nuovi indicatori di esposizione. In: Relazioni 67° Congresso Nazionale SIMILII "Monitoraggio Biologico e ambienti confinati non industriali: Aggiornamenti e prospettive, Sorrento, 3-6 novembre 2004, *G Ital Med Lav Erg.*, 26:278-297.
5. Apostoli P, Baj A, Bavazzano P, Ganzi A, Neri A, Ronchi L, et al. 2002. Blood lead reference values: the results of an Italian polycentric study. *Sci Total Environ*, 287:1-11.
6. Apostoli P, Schaller KH. Urinary beryllium: a suitable tool for assessing occupational and environmental beryllium exposure. 2001. *Int Arch Occup Environ Health* 74:162-6.
7. Barceloux DG. 1999. Nickel. *Clinical Toxicology*, 37: 239-258.
8. Bjornberg KA, Vahter M, Petersson-Grawe K, Glynn A, Cnattingius S, Darnerud PO, et al. 2003. Methyl mercury and inorganic mercury in Swedish pregnant women and in cord blood: influence of fish consumption. *Environ Health Perspect*, 111: 637-41.
9. Centers for Disease Control and Prevention. 1991. Preventing lead poisoning in young children: a statement by the Centers for Disease Control. Atlanta (GA): CDC.
10. Centers for Disease Control and Prevention. 2003. *Surveillance for elevated blood lead levels among children – United States. 1997-2001. MMWR CDC Surveill Summ.* 52(No. SS-10):1-21.
11. Forte G, Bocca B, Ronchi A, Balducci C, Alimonti A, Minoia C. Tentative Reference Values of Nickel in Serum Samples from a Non-exposed Population Group Living in Central Italy. 2004. In: *Sixth International Symposium on Biological Monitoring in Occupational & Environmental Health*, Heidelberg (Germania), 6-8 Settembre 2004.
12. Geltman PL, Brown MJ, Cochran J. 2001. Lead poisoning among refugee children resettled in Massachusetts, 1995 to 1999. *Pediatrics*, 108, 158-62.
13. Iavicoli I, Caroli S, Alimonti A, Petrucci F, Carelli G. 2002. Biomonitoring of a worker population exposed to low antimony trioxide levels. *J Trace Elem Med Biol*, 16: 33-9.

14. Kentner M, Leinemann M, Schaller KH, Weltle D, Lenert G. 1995. External and internal antimony exposure in starter battery production. *Int Arch Occup Environ Health*, 67:119-23.
15. Kraus T, Schramel P, Schaller KH, Zobelein P, Weber A, Angerer J. 2001. Exposure assessment in the hard metal manufacturing industry with special regard to tungsten and its compounds. *Occup Environ Med* 58(10): 631-4.
16. Minoia C, Sabbioni E, Apostoli P, Pietra R, Pozzoli L, Gallorini M, et al. 1990. Trace element reference values in tissues from inhabitants of the European community I. A study of 46 elements in urine, blood, and serum of Italian subjects. *Sci Total Environ*, 95: 89-105.
17. NANHES. 2005. *Third National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals*. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention.
18. Nicolaou G, Pietra R, Sabbioni E, Mosconi G, Cassina G, Seghizzi P. 1987. Multielement determination of metals in biological specimens of hard-metal workers: a study carried out by neutron activation analysis. *J Trace Elem Electrolytes in Health and Dis*, 2: 73-7.
19. Solberg H.E., Grasbeck R. 1989. Reference values. *Adv Clin Chem*, 27:1-79.

Biomonitoraggio dei livelli urinari di PLATINO, RODIO e PALLADIO mediante SF-ICP-MS in una popolazione professionalmente esposta

20. Alt F. and Zereini F. (Ed.) 2000. Anthropogenic Platinum-Group Element Emissions and Their Impact on Man and Environment. Berlin: Springer-Verlag.
21. Begerow J, Dunemann L. 2000. Internal platinum and palladium exposure of the general population with emphasis on the exposure from automobile exhaust and dental restorative alloys. In: Alt F, Zereini F. (Ed.). Anthropogenic Platinum-Group Element Emissions and Their Impact on Man and Environment. Berlin: Springer-Verlag, p. 227.
22. Bocca B., Alimonti A., Cristaudo A., Cristallini E., Petrucci E., Caroli S. 2004. Monitoring of the exposure to platinum-group elements for two Italian population groups through urine analysis. *Anal. Chim. Acta* 512:19-25.
23. Bunger J, Stork J, Stalder K. 1996. Cyto- and genotoxic effects of coordination complexes of platinum, palladium and rhodium in vitro. *Int Arch Occup Environ Health*, 69:33.
24. Caroli S, Alimonti A, Petrucci F, Bocca B, Krachler M, Forastiere F, Sacerdote MT, Mallone S. 2001. Assessment of exposure to platinum-group metals in urban children. *Spectrochim Acta B*, 56:1241.

25. Gómez B, Gómez M, Sánchez JL, Fernández R, Palacios MA. 2001. Platinum and rhodium distribution in airborne particulate matter and road dust. *Sci Total Environ*, 269:131.
26. Gómez B, Palacios MA, Gomez M, Sánchez JL, Morrison G, Rauch S, McLeod C, Ma R, Caroli S, Petrucci F, Bocca B, Schramel P, Zischka M, Petterson C, Wass U. 2002. Levels and risk assessment for humans and ecosystems of platinum-group elements in the airborne particles and road dust of some European cities. *Sci Total Environ*, 299:1-19.
27. Iavicoli I, Bocca B, Petrucci F et al. Biomonitoring of traffic police officers exposed to airborne platinum. 2004. *Occup Environ Med*, 61:636-9.
28. Jaffe M. Ueber die Niederschlag, welchen Pikrinsaure in normalem Harn erzeugt und über eine neue Reaction des Kreatinins. Hoppe-Seylers. Z. 1886. *Physiol. Chem.*, 10:391-400.
29. Koltsakis GC, Stamatelos AM. 1997. Catalytic automotive exhaust after treatment. *Prog Energy Combust Sci*, 23:1.
30. Krachler M, Alimonti A, Petrucci F, Irgolić KJ, Forastiere F, Caroli S. 1998. Analytical problems in the determination of platinum-group metals in urine by quadrupole and magnetic sector field inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Chim Acta*, 363:1.
31. Lindell B. 1997. Platinum. DECOS and NEG basis for an occupational standard Solna: Arbetslivsinstitutet & Författarna.
32. Merget R. Occupational platinum salt allergy. Diagnosis, prognosis, prevention and therapy. 2000. In: Alt F, Zereini F. (Ed.). *Anthropogenic Platinum-Group Element Emissions and Their Impact on Man and environment*, Berlin: Springer-Verlag, p. 257.
33. Petrucci F, Bocca B, Alimonti A, Caroli S. 2000. Determination of Pd, Pt and Rh in airborne particulate and road dust by high-resolution ICP-MS: a preliminary investigation of the emission from automotive catalysts in the urban area of Rome. *J Anal Atom Spectrom*; 15:525.
34. Petrucci F, Violante N, Senofonte O et al. 2005. Biomonitoring of a worker population exposed to platinum dust in a catalyst production plant. *Occup Environ Med*, 62:27-33.
35. Rauch S, Ming L, Morrison GM. 2001. Heterogeneity of platinum group metals in airborne particles. *Environ Sci Technol*, 35:595.
36. Rauch S. 2001. *On the Environmental Relevance of Platinum Group Elements*. Göteborg, Sweden: Chalmers University of Technology.
37. Schäfer J, Hannker D. 1998. Uptake of traffic-related heavy metals and platinum group elements PGE by plants. *Sci Total Environ*, 215:59.
38. Schierl R. 2000. Environmental monitoring of platinum in air and urine. *Microchem J*, 67:245-8.
39. Senofonte O, Alimonti A, Carelli G, Catino M, Di Gregorio M, Iavicoli I, Petrucci F, Tosti B, Violante N, Caroli S. 2001. Esposizione di addetti della polizia municipale di

Roma a metalli nobili emessi da marmitte catalitiche. In: Atti del XVI Congresso Nazionale di Chimica Analitica, Portonovo, Italia, 24-28 settembre, 2001.

Sviluppo di un metodo SF-ICP-MS, ad elevata produttività, per la determinazione Simultanea di 20 elementi in traccia nel sangue

40. Benes B, Spevackova V, Smid J, Cejchanova M, Cerna M, Subrt P, Marecek J. 2000. The concentration levels of Cd, Pb, Hg, Cu, Zn and Se in blood of the population in the Czech Republic. *Cent Eur J Public Health*, 8:117-9.
41. Bocca B, Forte G, Petrucci F, Senofonte O, Violante N, Alimonti A. 2005. Development of methods for the quantification of essential and toxic elements in human biomonitoring. *Ann Ist Super Sanità*, 41(2):165-70.
42. Candela S, Piccinini R, Viappiani F, Lari U. 1991. Influence of alcohol on the behavior of dose and effect indicators in workers exposed to inorganic lead: unexpected behavior of ZPP. *Med Lav*, 82:533-41.
43. Caroli S, Alimonti A, Coni E, Petrucci F, Senofonte O, Violante N. 1994. The assessment of reference values for elements in human biological tissues and fluids: a systematic review. *Crit Rev Anal Chem*, 24:363-98.
44. Ewers U, Krause C, Schulz C, Wilhelm M. 1999. Reference values and human biological monitoring values for environmental toxins. Report on the work and recommendations of the Commission on Human Biological Monitoring of the German Federal Environmental Agency. *Int Arch Occup Environ Health*, 72:255-60.
45. Forrer R, Gautschi K, Lutz H. 2001. Simultaneous measurement of the trace elements Al, As, B, Be, Cd, Co, Cu, Fe, Li, Mn, Mo, Ni, Rb, Se, Sr and Zn in human serum and their reference ranges by ICP-MS. *Biol Trace Elem Res*, 80:77-93.
46. Gafter U, Malachi T, Barak H, Levi J. 1993. Red blood cell calcium level is elevated in women: enhanced calcium influx by estrogens. *J Lab Clin Med*, 121:486-92.
47. Grandjean P, Nielsen GD, Jorgensen PJ, Horder M. 1992. Reference intervals for trace elements in blood: significance of risk factors. *Scan J Clin Lab Invest*, 52:321-37.
48. International Federation of Clinical Chemists (IFCC). 1987. Recommendations on theory of reference values. *Clin Chim Acta*, 170:1-12.
49. International Federation of Clinical Chemists (IFCC). 1987. Recommendations on theory of reference values. *Clin Chim Acta* 1987;170:13-32.
50. Lee MG, Chun OK, Song WO. 2005. Determinants of the blood lead level of US women of reproductive age. *J Am Coll Nutr*, 24:1-9.
51. Minoia C, Sabbioni E, Apostoli P, Pietra R, Pozzoli L, Gallorini M, Nicolau G, Alessio L, Capodaglio E. 1990. Trace element reference values in tissues from inhabitants of the European Community I. A study of 46 elements in urine, blood and serum of Italian subjects. *Sci Total Environ*, 95:89-105.

52. Probst-Hensch N, Braun-Fahrlander C, Bodenmann A, Ackermann-Liebrich U. 1993. Alcohol consumption and other lifestyle factors: avoidable sources of excess lead exposure. *Soz Präventivmed*, 38:43-50.
53. Prohaska C, Pomazal K, Steffan I. 2000. Determination of Ca, Mg, Fe, Cu and Zn in blood fractions and whole blood of humans by ICP-OES. *Fresenius J Anal Chem*, 367:479-84.
54. Rodushkin I, Ödman F, Branth S. 1999. Multielement analysis of whole blood by high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry. *Fresenius J Anal Chem*, 364:338-46.
55. Roduskin I. 2001. *Determination of trace and ultratrace elements in body fluids using sector-field ICP-MS*. Bremen: ThermoFinnigan, (Application Flash Report 2001;E11,12/01).
56. Sario Muñiz C, Fernández-Martin JL, Marchante-Gayón JM, García Alonso JI, Cannata-Andía JB, Sanz-Medel A. 2001. Reference values for trace and ultratrace elements in human serum determined by double-focusing ICP-MS. *Biol Trace Elem Res*, 82:259-72.
57. Solberg HE. 1984. The theory of reference values. Part 5. Statistical treatment of collected reference values. Determination of reference limits. *Clin Chim Acta*, 37:97F-114F.
58. Vesterberg O, Alessio L, Brune D, Gerhardsson L, Herber R, Kazantzis G, Nordberg GF, Sabbioni E. 1993. International project for producing reference values for concentrations of trace elements in human blood and urine - TRACY. *Scand Work Environ Health*, 19(1):19-26.
59. Weyermann M, Brenner H. 1997. Alcohol consumption and smoking habits as determinants of blood lead levels in a national population sample from Germany. *Arch Environ Health*, 52:233-9.
60. Wilhelm M, Ewers U, Schulz C. 2004. Revised and new reference values for some trace elements in blood and urine for human biomonitoring in environmental medicine. *Int J Hyg Environ Health*, 207:69-73.
61. Yan L, Prentice A, Zhou B, Zhang H, Wang X, Stirling DM, Laidlaw A, Han Y, Laskey A. 2002. Age- and gender-related differences in bone mineral status and biochemical markers of bone metabolism in Northern Chinese men and women. *Bone*, 30:412-5.

Estensione del campo di applicazione del metodo SF-ICP-MS a tessuti biotici per lo screening precoce del tumore del colon retto

62. Arriola H., Longoria L., Quintero A., Guzman, D. 1999. INAA of trace elements in colorectal cancer patients. *Biol Trace Elem Res*, 71–72:563-568.

63. Begerow J, Turfeld M, Dunemann L. 2000. *J Anal At Spectrom*, 15: 347.
64. Choi I.S. 1990. Trace elements determinations in cancerous and non-cancerous human tissues using instrumental neutron activation analysis. *Diss Abstr Int*, 50:5853.
65. Connelly-Frost A, Poole C, Satia JA, Kupper LL, Millikan RC, Danielsen A, Steinnes E. 1970. *J Nucl Med*, 11: 260.
66. Garg A.N., Weginwar R.G., Sagdeo V. 1990. Minor and trace elemental contents of cancerous breast tissue measured by instrumental and radiochemical neutron activation analysis. *Biol Trace Elem Res*, 26-27:485-496.
67. Gregoriadis GC, Apostolidis NS, Romanos AN, Paradellis TP. 1983. *Cancer*, 52: 508.
68. Gupta AK, Shukla VK, Vaidya MP, Roy SK, Gupta S. 1983. *J Surg Oncol*, 52: 172.
69. Hornik P., Milde D., Trenz Z., Vysloužil K., Stůžka, V. 2006. Colon tissue concentrations of copper, iron, selenium and zinc in colorectal carcinoma patients. *Chem Papers*, 60:297-301.
70. Krachler M, Radner H, Irgolic KJ. 1996. *Fresenius J Anal Chem*, 355: 120.
71. Kucharzewski M., Braziewicz J., Majewska U., Gózdź, S. 2003. Selenium, copper, and zinc concentrations in intestinal cancer tissue and in colon and rectum polyps. *Biol Trace Elem Res*, 92:1-10.
72. Majewska U., Braziewicz J., Banaś D., Kubala-Kukuś A., Gózdź S., Pajek M., Smok J., Urbaniak A. 1997. An elemental correlation study in cancerous breast tissue by total reflection x-ray fluorescence. *Biol Trace Elem Res*, 760:91-100.
73. Marchante-Gayo'n JM, Sa'nchez-Uri'a JE, Sanz-Medel A.1996. *J Trace Elements Med Biol*,10: 229.
74. Margalioth E.J., Schenker J.G., Chevion M. 1983. Copper and zinc levels in normal and malignant tissues. *Cancer*, 523:868-872.
75. Martin Mateo M.C., Martín G. 1988. Influence of metallic carcinogenesis in lung and colorectal neoplasia. *Clin Physiol Biochem*, 6:321-326.
76. Martin Mateo MC, Rabadan J, Boustamante J. 1990. Comparative analysis of certain metals and tumor markers in bronchopulmonary cancer and colorectal cancers. Metals and tumor markers in the neoplastic process. *Clin Physiol Biochem*, 8(5):261–266.
77. Mikac-Dević M., Vukelić N., Kljaić K. 1992. Serum selenium level in patients with colorectal cancer. *Biol. Trace Elem. Res.*, 33:87-94.
78. Mulay I.L., Ray R., Knox B.E., Suhr N.H., Delaney W.E. 1971. Trace-metal analysis of cancerous and non-cancerous human tissue. *J. Natl. Cancer Inst.*, 47:1-13.
79. Nelson R.L., Yoo S.J., Tanure J.C., Andrianopoulos G., Misumi A. 1989. The effect of iron on experimental colorectal carcinogenesis. *Anticancer Res.*, 6:111-115.

80. Pasternak K, Przyszlak W. 1999. Magnesium Res, 12:139.
81. Raithel HJ, Henning F, Schaller KH. 1989. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 9:115.
82. Rodushkin I, Omdan F, Olofsson R, Axelsson MD. 2000. *J. Anal. At. Spectrom*, 15: 937
83. Schrauzer G.N. 2000. Anticarcinogenic effects of selenium. *Cell Mol Life Sci*, 57:1864-1873.
84. Senesse P, Meance S, Cottet V, Faivre J, Boutron-Ruault MC. 2004. *Nutr. Cancer*, 49: 66.
85. Weinberg E.D. 1996. The role of iron in cancer. *Eur J Cancer Prev*, 5:19-36.
86. Weinberg ED. 1994. *Biometals*, 7:211.

Determinazione di Piombo nel latte materno mediante sensori elettrochimici e SF-ICP-MS

87. Borella P, Sturloni N, Rovesti S, Vivoli R, Bargellini A, Vivoli G. 1998. Valutazione del rischio di dannoneuropsicologico per esposizione al piombo nell'infanzia. *Ann Ist Super Sanità*, 34:97-104.
88. Coni E, Bocca B, Galoppi B., Alimonti A., Caroli S. 2000. Identification of chemical species of some trace and minor elements in mature breast milk. *Microchem J*, 67:187-194.
89. D'ilio S., Petrucci F., D'Amato M., Di Gregorio M., Senofonte O., Violante, O. 2008. Method validation for determination of arsenic, cadmium, chromium, and lead in milk by means of dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal Chim Acta*, 624:59-67.
90. Economu E. 2005. Bismuth-film electrodes: recent developments and potentialities for electroanalysis. *Trends in Anal Chem*, 24(4): 334-340.
91. Ehal AL. 1986 Lead neuropathy and electrophysiological studies in low level lead exposure: a critical review. *Neurotoxicology*, 7:203-216.
92. Gidlow DA. 2004. Lead toxicity. *Occup Med*, 54:76-81.
93. Hermes-Lima M, Pereira B, Bechara EJ. 1991. Are free radicals involved in lead poisoning? *Xenobiotica*, 21(8):1085-90.
94. Kofman O, Berger A, Massarwa A, Friedman A, Jaffar AA. 2006. Motor inhibition and learning impairments in school-aged children following exposure to organophosphate pesticides in infancy. *Pediatr Res*, 60:88-92.
95. Kosanovic M., Adem A., Jekanovic M., Abdulrazzaq Y.M. 2008. Simultaneous Determination of Cadmium, Mercury, Lead, Arsenic, Copper, and Zinc in Human Breast Milk by ICP-MS/Microwave Digestion. *Anal Lett*, 41:406-416.

96. Perrotta DM. 1992. Surveillance of children's blood lead levels - United States, 1991. *JAMA*, 268:1654.
97. Quintanilla-Vega B, Hoover DJ, Bal W, Silbergeld EK, Waalkes MP, Anderson LD. 2000. Lead interaction with human protamine (HP2) as a mechanism of male reproductive toxicity. *Chem Res Toxicol*, 13(7):594-600.
98. Roy NK, Rossman TG. 1992. Mutagenesis and comutagenesis by lead compounds. *Mutat Res*, 298(2):97-103.
99. Tong S, Baghurst P, McMichael A, Sawyer M, Mudge J. 1996. Lifetime exposure to environmental lead and children's intelligence at 11-13 years: the Port Pirie cohort study. *BMJ*, 312:1569-75.
100. Viviani B. Metalli in: Galli CL, Corsini E., Marinovich M. (Eds) *Tossicologia* Piccin Nuova Libreria, Padova. 2004, pp. 298-303.
101. Yang C.C., Senthil Kumar A.S., Zen J.M. 2005. Precise blood lead analysis using a combined internal standard and standard addition approach with disposable screen-printed electrodes, *Anal Biochem*, 338:278-283.
102. Wedrychowski A, Schmidt WN, Hnilica LS. 1986. The *in vivo* cross-linking of proteins and DNA by heavy metals. *J Biol Chem*; 261(7):3370-6.
103. World Health Organization. 1995. Inorganic Lead. Geneva; WHO (Environmental Health Criteria, 165).

APPENDICE A

SPETTROMETRIA DI MASSA NELLE ANALISI DI ELEMENTI IN TRACCE IN MATRICI COMPLESSE

Il plasma accoppiato induttivamente con rivelatore di massa (*Inductively Coupled Plasma–Mass Spectrometry*, ICP-MS) è una delle metodologie multielementari più potenti e versatili. Consente la determinazione di elementi a bassissima concentrazione in matrici diverse coniugando un'ottima sorgente di ioni come l'ICP con uno spettrometro di massa ad elevata sensibilità e selettività. Dal 1983, anno della sua commercializzazione, l'ICP-MS è diventata la tecnica di elezione per le analisi multielementari di ultratracce in matrici ambientali, biologiche ed in settori come l'elettronica ed il nucleare. L'alto potere di rivelabilità e la capacità analitica multielementare sono le maggiori ragioni del successo di questa tecnica. In quasi 20 anni, circa 2000 ICP-MS sono stati installati in tutto il mondo. Nelle strumentazioni attuali possiamo distinguere una zona detta sorgente (dove vengono prodotti gli ioni), un'interfaccia ed un analizzatore di massa che può essere un quadrupolo o un settore magnetico (Figura 1).

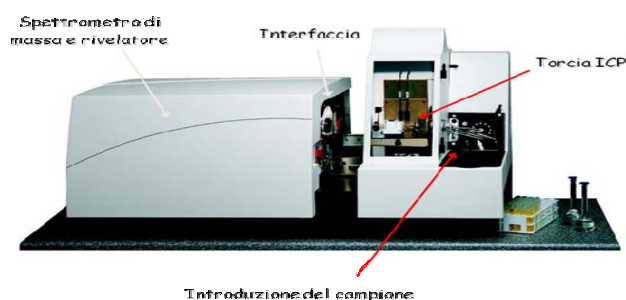


FIGURA 2. ICP-MS

La *sorgente* di ioni è rappresentata dalla torcia ICP, formata da tre tubi concentrici di quarzo nei quali è fatto fluire un gas inerte (Ar, He, N₂) e da una spirale di induzione di rame, esterna, che avvolge i tre tubi. Alla spirale è collegato un generatore di radiofrequenza (generalmente compresa tra i 20 e i 60 MHz) che ha lo scopo di generare all'interno della torcia un campo magnetico oscillante le cui linee di forza sono parallele all'asse della torcia stessa. Sotto l'azione del campo elettromagnetico gli elettroni, preventivamente seminati, sono notevolmente accelerati. Le collisioni conseguenti con gli atomi neutri del gas fanno aumentare notevolmente la presenza di elettroni, che sotto l'azione del campo magnetico sono costretti a percorrere traiettorie circolari chiuse e producono un immediato aumento della temperatura.

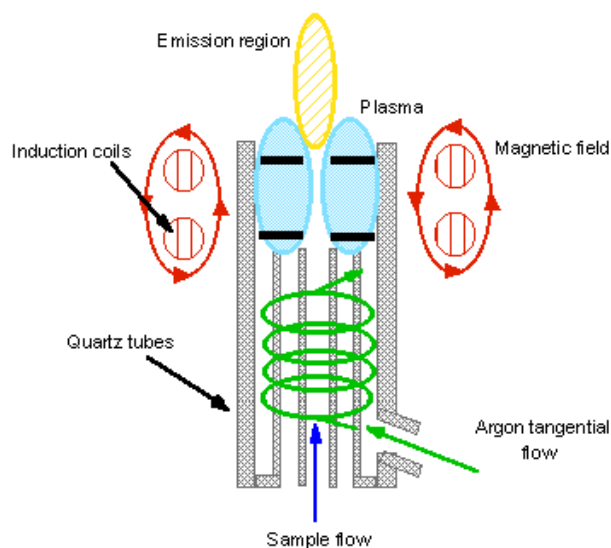


FIGURA 3. SCHEMA DI FUNZIONAMENTO DEL PLASMA

L'*interfaccia* è costituita da due coni (generalmente di Ni o di Pt-Rh) che hanno un orifizio di diametro di 0,8 mm e che mettono in comunicazione una zona a pressione atmosferica (la sorgente) con una zona a vuoto spinto (all'interno dello spettrometro generalmente la pressione varia tra 10^{-5} e 10^{-8} torr). La particolare conformazione dei due coni e l'utilizzo di appropriate lenti

ioniche dietro l'interfaccia permettono un'ottimale trasmissione degli ioni ed una loro focalizzazione.

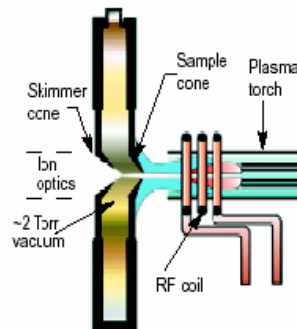


FIGURA 4. SCHEMA DELL'INTERFACCIA ICP-MS

Nell'*analizzatore* gli ioni vengono separati dal campo magnetico presente in base al loro rapporto m/q . In funzione della forza di Lorentz F abbiamo, infatti:

$$F = q \ v \ H$$

q = carica,
 v = velocità
 H = campo magnetico

Nell'analizzatore a quadrupolo la separazione degli ioni si ottiene variando opportunamente il voltaggio applicato alle barre (poli) (Figura 4).

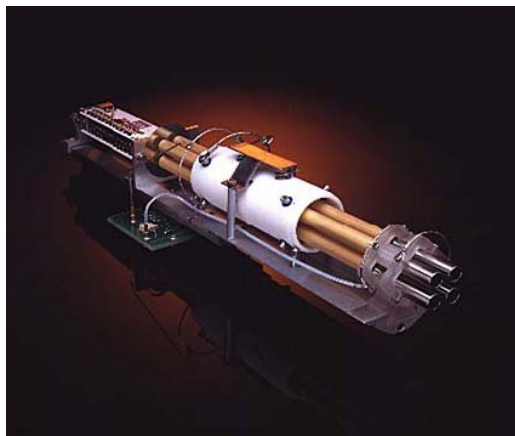


FIGURA 5. IMMAGINE DI UN ANALIZZATORE A QUADRUPOLO

Nel settore magnetico la separazione delle masse avviene in base al principio per cui nella traiettoria circolare gli ioni hanno raggi diversi a seconda della forza di Lorentz cui sono soggetti (Figura 5).

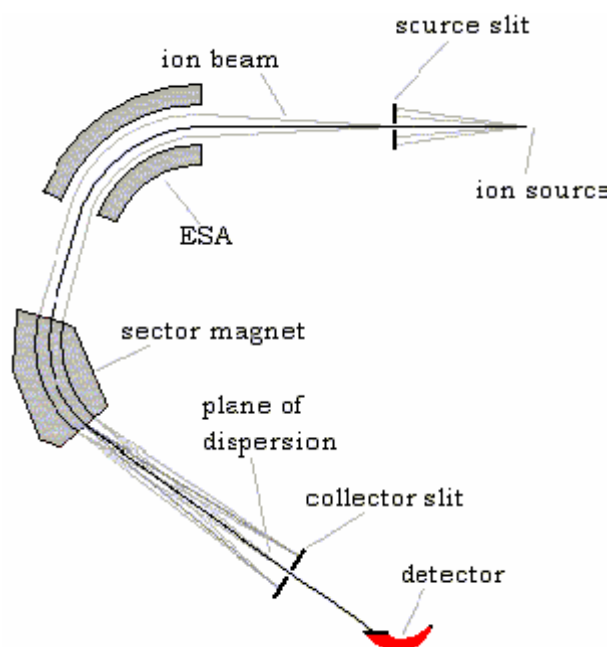


FIGURA 6. SCHEMA DI UN ANALIZZATORE A SETTORE MAGNETICO

Una volta separati gli ioni sono convogliati al rilevatore che produrrà dei segnali elettrici proporzionali al flusso ionico.

Il campione da analizzare per poter essere introdotto nella sorgente di eccitazione deve essere in forma liquida o gassosa. I campioni allo stato liquido devono prima essere nebulizzati per ottenere un aerosol (Figura 6).

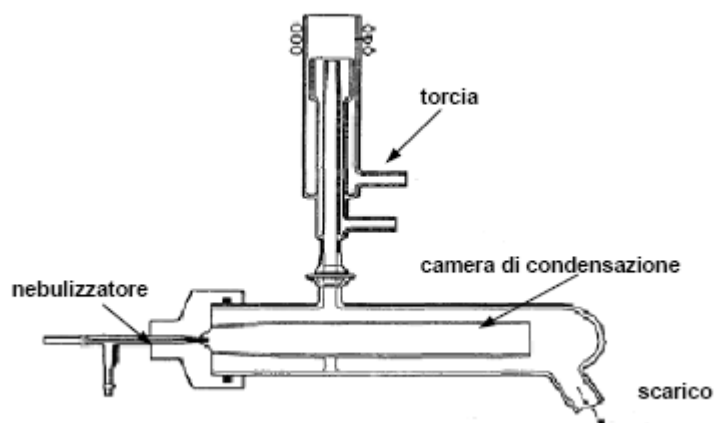


FIGURA 7. SISTEMA DI CAMPIONAMENTO DI UNO SPETTROMETRO A PLASMA

La miscelazione tra il liquido (campione) ed il gas (gas di trasporto) può essere effettuata con *nebulizzatori pneumatici* (Figura 7), che si distinguono in nebulizzatori a flusso *concentrico* ed a flusso *incrociato*. Il loro funzionamento richiede un flusso gas di trasporto di circa 1 l min^{-1} con un consumo di campione intorno a $1\text{-}2 \text{ ml min}^{-1}$. A tali velocità del gas, l'effetto vortice che si crea sulla punta è in grado di assicurare la formazione dell'aerosol. I nebulizzatori concentrici offrono una stabilità dimensionale maggiore (con particelle di circa $100 \mu\text{m}$) ed un'efficienza superiore rispetto a quelli a flusso incrociato ma, avendo orifizi estremamente ridotti, tendono ad occludersi soprattutto quando vengono aspirate soluzioni molto saline. Il plasma della torcia non tollera la presenza di particelle nebulizzate con dimensioni superiori ai $10 \mu\text{m}$. Per tale motivo il nebulizzatore è provvisto di una camera di condensazione per separare le particelle più leggere, che sono inviate in torcia, da quelle più pesanti che sono drenate via. In questo modo si calcola che solo il 5% del campione (soltanto le particelle di circa $10 \mu\text{m}$) arriva in torcia, con l'inevitabile ripercussione sui limiti di rivelabilità. Recentemente sono stati sviluppati sistemi pneumatici (nebulizzatore *microconcentrico* e ad *iniezione diretta*) che non richiedono l'utilizzo di camere di espansione-condensazione poiché le particelle formate durante la nebulizzazione sono inferiori ai $10 \mu\text{m}$. In questo caso l'efficienza di

nebulizzazione è circa il 100 % ed il consumo di campione e dell'ordine dei microlitri. Essi sono particolarmente adatti nel caso procedure di speciazione online con microcolonne.

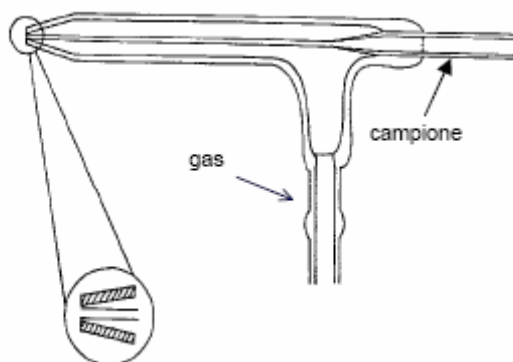


FIGURA 8. SCHEMA DI UN NEBULIZZATORE PNEUMATICO DI TIPO MEINHARD

I *nebulizzatori ad ultrasuoni* (Figura 8) rappresentano una valida alternativa a quelli pneumatici. Il campione liquido è inviato ad un trasduttore ultrasonico che riesce a formare un nebulizzato assai fine, con particelle inferiori a 10 μm . L'efficienza in questo caso si aggira intorno al 75%. Quest'alta efficienza, però, creerebbe un raffreddamento della torcia a causa della notevole quantità di campione per unità di tempo che entra nella zona analitica. Al fine di evitare questo problema che porterebbe ad perdita di sensibilità, l'aerosol passa attraverso un sistema di desolvatazione (riscaldamento e raffreddamento) che ha il compito di togliere il solvente e concentrare l'analita. In questo modo l'efficienza della torcia rimane inalterata e si ottengono così limiti di rivelabilità migliori, anche di un ordine di grandezza, rispetto a quelli ottenibili con i nebulizzatori pneumatici.

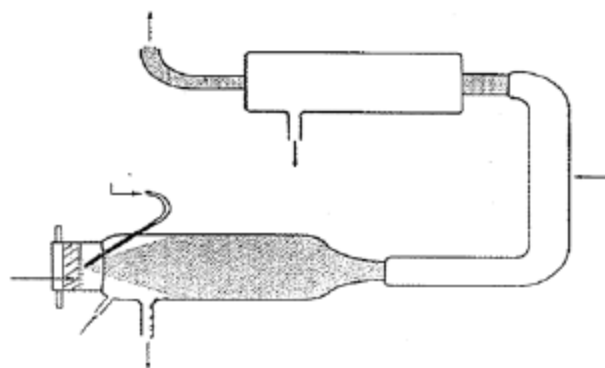


FIGURA 9. SISTEMA DI NEBULIZZATORE AD ULTRASUONI

La tecnica ICP-MS permette di analizzare anche campioni solidi come ad esempio un blocco di metallo o di una lega. Il loro strato superficiale può, infatti, essere vaporizzato per mezzo di nebulizzatori speciali che utilizzano un raggio laser (*laser ablation*) o una scarica a bassa pressione (*glow discharge*). Il vapore atomico formato è opportunamente inviato nella sorgente ionica tramite un flusso di gas. Esistono attualmente in commercio strumenti affidabili che riescono a campionare porzioni solide con estrema precisione. Tali sistemi assicurano limiti di rivelabilità molto buoni anche perché viene eliminata tutta la fase di dissoluzione del campione. È possibile vaporizzare minime quantità di campione allo stato liquido o solido utilizzando le fasi di evaporazione ed atomizzazione di un fornetto di grafite del tipo usualmente a corredo degli strumenti per l'assorbimento atomico. Questi evaporatori sono direttamente collegati al plasma. Attraverso idonei programmi termici è anche possibile controllare alcune interferenze sia spetttrali che non spetttrali.

ANALISI DI MATRICI COMPLESSE: POTENZIALITÀ E PROBLEMI ANALITICI

La spettrometria ICP-MS presenta un eccellente *intervallo di concentrazione analitica*. In altre parole, possono essere analizzate, con una sola diluizione del campione, concentrazioni che vanno dai ng l^{-1} ai mg l^{-1} , coprendo un intervallo anche di 6 ordini di grandezza. Questo è particolarmente utile in analisi multielementari di campioni con contenuto incognito di elementi. L'elevata *sensibilità* strumentale, l'ottima *riproducibilità* analitica, la possibilità di *analisi multielementari* ed il relativamente *basso consumo* del campione sono le altre proprietà positive che rendono l'ICP-MS la tecnica di elezione per l'analisi degli elementi in traccia. La caratteristica che, insieme ai costi d'acquisto e di esercizio elevati, rappresenta il vero problema della tecnica è la presenza di *interferenze spettrali*. Per il controllo delle interferenze, che possono deteriorare la sensibilità e la specificità della tecnica, diverse strategie dovranno essere considerate, soprattutto nell'analisi di matrici complesse quali possono essere i campioni ambientali o biologici.

È utile ricordare che per *sensibilità* s'intende la capacità di rilevare in maniera univoca il segnale di un dato analita, mentre la *specificità* può essere considerata come l'abilità di differenziare un segnale proveniente dall'analita da quello derivante dalla specie interferente. Elevate sensibilità e specificità insieme risulteranno indispensabili per ottenere bassi limiti di rivelabilità ed alte accuratezze. Nell'esempio della Tabella 1, si riporta il confronto tra due strumentazioni ICP-MS, una delle quali è 10 volte più sensibile dell'altra.

Tabella 1. Comparazione tra due sistemi ICP-MS con diverse sensibilità

Parametro	Sensibilità normale	Sensibilità alta
Sensibilità x 1000 (conteggi/s/ppm)	35	350
Conteggi del segnale (100 ppt)	3.500	35.000
Conteggi del fondo (25 ppt BEC *)	875	8.750
Deviazione Standard del fondo	29,6	94
Limite di Rivelabilità	2,5	0,8

* BEC, Background Equivalent Concentration

Come si può vedere la maggiore sensibilità, da sola, non si traduce direttamente in un proporzionale miglioramento del limite di rivelabilità che passa da 2,5 a 0,8, cioè soltanto 3 volte migliore, mentre la sensibilità è superiore di 10 volte. La Figura 9 mostra come varia il limite di rivelabilità (LD) in funzione dell'aumento della sola sensibilità strumentale. Dopo un netto miglioramento iniziale, il successivo incremento di sensibilità non produce quasi alcun effetto sul LD. Questo perché l'ulteriore miglioramento in termini di potere di rivelabilità dipende dalla specificità strumentale, cioè alla capacità dello strumento di eliminare gli interferenti, che, anche a bassi livelli, rappresentano il reale limite alle prestazioni strumentali. Quindi, obiettivo primario nelle analisi di elementi in matrici complesse tramite ICP-MS è il controllo delle interferenze spettrali.

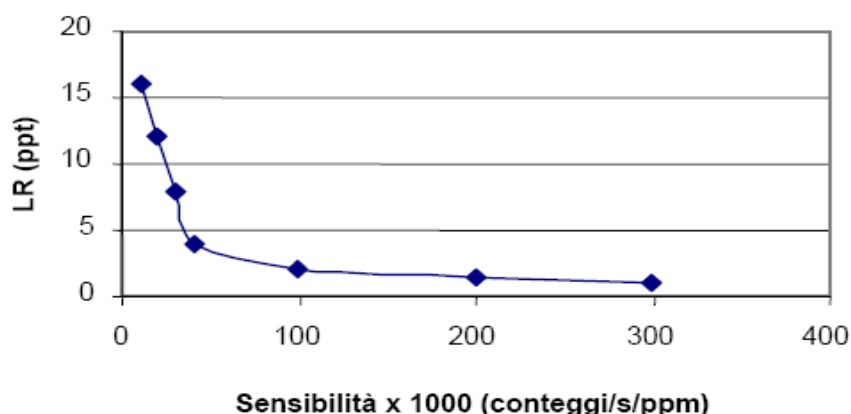


Figura 10. ANDAMENTO DEL LIMITE DI RIVELABILITÀ (LR) IN FUNZIONE DELLA SENSIBILITÀ

ELIMINAZIONE DELLE INTERFERENZE SPETTRALI

Nell'ICP-MS le interferenze spetttrali sono essenzialmente di tre tipi: ioni atomici con la stessa massa di isotopi analitici (^{40}Ar su ^{40}Ca , ^{106}Cd su ^{106}Pd), ioni con doppia carica ($^{208}\text{Pb}^{++}$ su ^{106}Pd) e ioni poliatomici ($^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}$ su ^{52}Cr) (Tabella 2).

Tabella 2. Interferenze più comuni in ICP-MS

Analita	Interferente	Risoluzione necessaria
^{24}Mg	$^{12}\text{C}_2$	1605
^{28}Si	$^{14}\text{N}_2$, $^{12}\text{C}^{16}\text{O}$	958, 1557
^{31}P	$^{15}\text{N}^{16}\text{O}_2$	1458
^{32}S	$^{16}\text{O}_2$	1801
^{39}K	^{39}ArH	5690
^{40}Ca	^{40}Ar	192498
^{44}Ca	$^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$	1281
^{51}V	$^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}$	2573
^{52}Cr	$^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}$, $^{35}\text{Cl}^{16}\text{OH}$	2376, 1672
^{48}Ti	$^{32}\text{S}^{16}\text{O}$	2519
^{55}Mn	$^{40}\text{Ar}^{15}\text{N}$	2248
^{56}Fe	$^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$	2503
^{63}Cu	$^{40}\text{Ar}^{23}\text{Na}$	2792
^{64}Zn	$^{32}\text{S}^{16}\text{O}_2$, $^{32}\text{S}_2$	1952, 4261
^{75}As	$^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$	7775
^{80}Se	$^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}$	9688
^{103}Rh	$^{87}\text{Sr}^{16}\text{O}$	60603
^{105}Pd	$^{89}\text{Y}^{16}\text{O}$	24373

Questi ultimi sono formati dalla combinazione di due o più specie atomiche che sono presenti nel gas plasmogeno, nei gas atmosferici, nell'acqua, nei reagenti e nella matrice. La formazione degli ioni molecolari può avvenire nella zona di plasma più fredda e sulle pareti dei coni. In particolare le molecole ad alta energia di dissociazione, come gli ossidi refrattari, possono rimanere indissociati nel plasma e dare luogo ad interferenze. Nella Tabella 2 sono riportate le interferenze più comuni e la risoluzione ($m/\Delta m$) necessaria per poterle risolvere. Come si può osservare negli esempi riportati, in alcuni casi le interferenze non sono risolvibili neanche con strumenti ad alta risoluzione che come è noto possono

raggiungere risoluzioni fino a circa 12.000 m/ Δ m. Per tenere sotto controllo o per eliminare le interferenze spettrali sono state sviluppate differenti strategie in funzione del tipo di interferenza, dell'analita e della matrice interessata. Per eliminare le interferenze si può intervenire:

1) in *fase preanalitica*:

- durante la preparazione del campione
- intervenendo sui sistemi di introduzione del campione in torcia

2) in *fase analitica*:

- agendo sui parametri strumentali (per esempio, tramite la tecnica del "Plasma Freddo")
- utilizzando equazioni di correzione almeno nei casi in cui il segnale dell'interferente è minore del 10 % del segnale dell'analita
- tramite strumenti dotati di celle di reazione post-ionizzazione
- tramite spettrometri ad alta risoluzione

FASE PREANALITICA

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

L'intorno chimico, ovvero la matrice in cui è presente l'elemento, rappresenta il punto cruciale nel controllo delle interferenze. La matrice di un determinato campione è costituita da un solvente e da una serie di composti organici ed inorganici. Il solvente è rappresentato essenzialmente da acqua e da altri reagenti (prevalentemente acidi minerali e acqua ossigenata) usati per la digestione e la dissoluzione del campione. I composti inorganici sono per lo più sali di metalli quali Na, K, Mg, Ca; questi cationi tendono a rappresentare la maggior fonte di interferenze e richiederebbero un continuo

allontanamento dalla matrice. Reagenti quali acidi cloridrico e solforico sono sorgenti di ioni cloro (massa 35 o 37) e zolfo (massa 32) che combinandosi con altri elementi possono dar luogo a diversi interferenti spettrali. Potrebbe essere conveniente impiegare acido nitrico e/o l'acqua ossigenata in fase di preparazione del campione. Nella fase preanalitica si possono inoltre utilizzare delle procedure di preconcentrazione su particolari resine che hanno la capacità di trattenere gli elementi di interesse analitico, lasciando passare alcuni metalli interferenti.

Ricorrendo a tecniche di *Flow Injection Analysis* (FIA) il campione viene fatto passare su una opportuna resina dove l'analita è ritenuto e, quindi, separato dalla matrice e successivamente opportunamente eluito in controcorrente e spinto nella zona di analisi. Al contrario utilizzando una separazione cromatografica su colonna con meccanismo di scambio ionico gli elementi interferenti sono ritenuti su colonna mentre gli analiti vengono eluiti. È possibile, ad esempio, determinare elementi pesantemente interferiti come As, Cr, Cu, Se, Zn e V in campioni biologici ed ambientali, trattenendo elementi interferenti come Cl e S su colonne a scambio anionico.

SISTEMI DI INTRODUZIONE DEL CAMPIONE

Tramite l'utilizzo di campionatori a vaporizzazione elettrotermica o a raggio laser, variando opportunamente parametri strumentali quali rampa di temperatura, flusso del gas e tempo di campionamento si possono inviare in torcia in modo selettivo alcune specie di interesse presenti nel campione. Si opera in tal modo una selezione preventiva del materiale che verrà ionizzato. Un'ulteriore soluzione è l'utilizzo della reazione di formazione dell'idruro metallico; ricorrendo a tale reazione viene campionato e raggiungerà la zona analitica solamente l'elemento che ha formato l'idruro volatile mentre gli interferenti rimangono all'interno della cella di reazione. Un discorso a parte merita l'eliminazione del solvente per eccellenza, cioè l'acqua, che produce

ossidi che possono interferire su quasi tutte le zone dello spettro di massa. L'eliminazione dell'acqua (desolvatazione) dai campioni può essere realizzata sia nei nebulizzatori pneumatici che ultrasonici, attraverso camere di condensazione. La Figura 10 mostra come varia la formazione degli ossidi in funzione, dell'uso di un desolvatore.

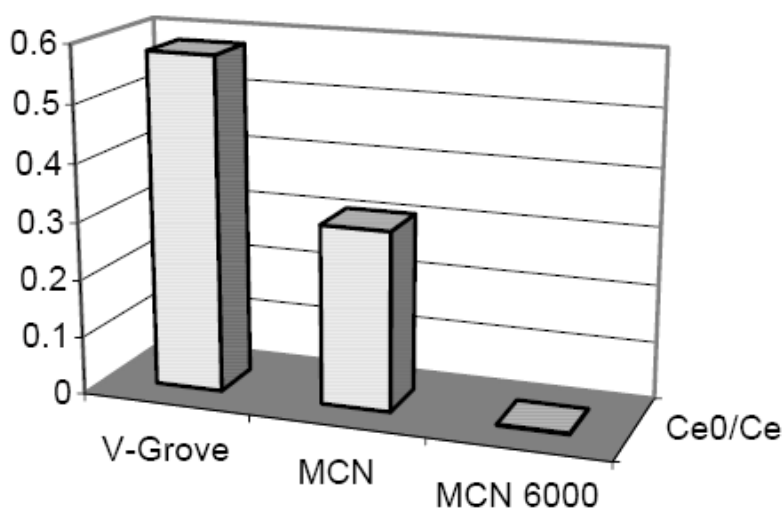


FIGURA 11. FORMAZIONE OSSIDI CON TRE DIVERSI NEBULIZZATORI: V-GROVE, MCN, MCN 6000

I tre nebulizzatori considerati sono il V-Grove (un nebulizzatore pneumatico), il MCN (un nebulizzatore microconcentrico a basso volume di campione aspirato) ed il MCN 6000 (un microconcentrico con camera di desolvatazione). Il più basso rapporto CeO/Ce, pari a 0,002, lo si ottiene con il MCN 6000.

FASE ANALITICA

PARAMETRI STRUMENTALI

Alcuni parametri strumentali come la distanza della torcia dall'interfaccia (coni), la potenza della radiofrequenza e il flusso del gas aerosol possono influenzare notevolmente la formazione di alcune specie interferenti come gli

ossidi o gli ioni a carica doppia. Nella torcia possiamo individuare zone in cui è massima la presenza di ioni singoli, zone con alta concentrazione di ioni doppi e zone con alta formazione di ossidi. Al variare della distanza della torcia dall'interfaccia si può privilegiare il campionamento di una specie sulle altre. Aumentando la potenza applicata si favorisce dapprima la dissociazione degli ossidi fino a formare specie elementari, mentre per ulteriori aumenti di potenza si facilita la formazione di ioni doppi. In Figura 11 è riportato l'andamento di formazione delle tre specie in funzione della potenza applicata.

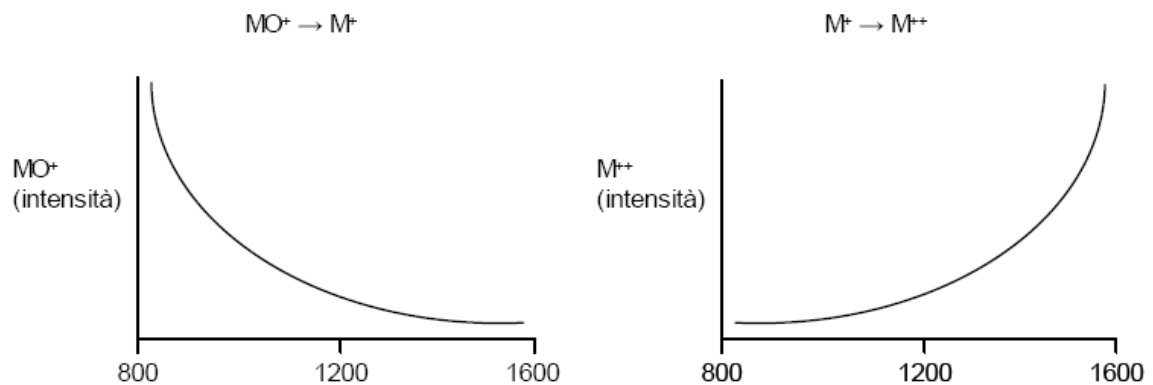


FIGURA 12. FORMAZIONE DI SPECIE M^{++} , M^+ , MO^+ IN FUNZIONE DELLA POTENZA APPLICATA

Incrementando il flusso del gas di trasporto, come mostrato in Figura 12, il plasma viene raffreddato e conseguentemente si verifica una diminuzione di M^{++} e un aumento di MO^+ .

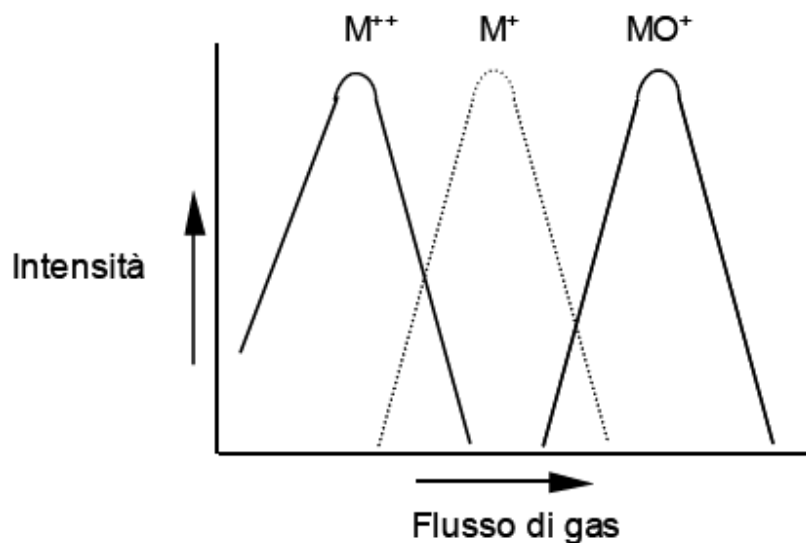


FIGURA12. ANDAMENTO DELLA FORMAZIONE M^{++} , M^+ , MO^+ IN FUNZIONE DEL FLUSSO AEROSOL

L'aumento del flusso, inoltre, spingendo tutte le specie verso gli orifizi dell'interfaccia, favorisce il campionamento nella zona del plasma dove si formano la maggior parte di ossidi (MO^+) che vengono quindi campionati in modo privilegiati rispetto alle forme M^+ . Una particolare ottimizzazione dei parametri strumentali per l'eliminazione delle interferenze è la generazione di un *plasma freddo*. Diminuendo la potenza della torcia sotto ai 1000 W e aumentando il flusso del gas aerosol si ottengono condizioni di ionizzazione più deboli simili alla "ionizzazione chimica". La quantità di specie Ar^+ e tutti gli ioni molecolari che si formano con l' Ar sono ridotti anche di un ordine di grandezza. Per poter realizzare questa condizione analitica è necessario però evitare la formazione di una scarica secondaria. A tale scopo la torcia viene schermata attraverso l'uso di un sottile foglio di platino inserito tra la torcia stessa e la spirale di induzione (Figura 13). Tale dispositivo chiamato "Guard Electrode" permette di mantenere la torcia funzionante anche con potenze di 600 W. Tra le applicazioni del plasma freddo vi è la separazione analitica dell'isotopo ^{90}Sr dall'isotopo ^{90}Zr . Tale separazione richiederebbe

una risoluzione di oltre 30.000 $m/\Delta m$ che non è possibile ottenere con le attuali strumentazioni.

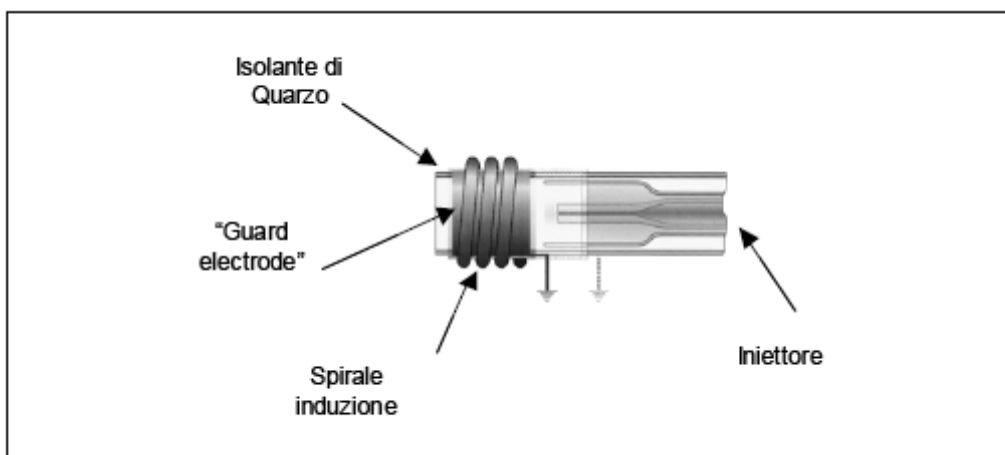


FIGURA 13. SCHEMA DEL "GUARD ELECTRODE"

Con l'applicazione di una potenza molto bassa (circa 600-800 W) il potere di ionizzazione della torcia viene ridotto e tale riduzione risulta massima per quegli elementi refrattari come lo Zr, mentre è minima per gli elementi facilmente ionizzabili come lo Sr. In questo modo il segnale generato dallo Zr si attenua considerevolmente (ad esempio, scompare completamente il segnale relativo ad $1 \mu\text{g l}^{-1}$ di Zr) mentre è ancora possibile determinare lo Sr. Un'altra applicazione del *plasma freddo* è la determinazione del Fe alla massa 56 interferito pesantemente da $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$. Le due masse sarebbe risolubili con uno strumento ad alta risoluzione ma con una conseguente perdita di sensibilità. Lavorando, invece, con basse potenze tutte le interferenze derivanti dalla combinazione della Ar^+ con altre specie vengono fortemente ridotte pur mantenendo una elevata sensibilità strumentale.

EQUAZIONI DI CORREZIONE

Nei casi in cui il segnale dell'interferente è circa il 10 % del segnale dell'analita si può ricorrere ad equazioni che, tenendo conto delle abbondanze relative, riescono a correggere matematicamente il segnale interferito. Nel caso delle interferenze isobariche è possibile calcolare il fattore di correzione tramite i rapporti delle abbondanze relative. Lo ^{120}Sn , ad esempio, è interferito dall'isotopo ^{120}Te ; l'equazione di correzione, appresso indicata, tiene conto delle intensità lette (I) alle masse 120 e 126 (quest'ultima è la massa di un altro isotopo di Te) e del fattore di correzione derivante dal rapporto delle abbondanze (a) del tellurio alle due masse:

$$I(^{120}\text{Sn}) = I(^{120}\text{Sn}) - [I(^{126}\text{Te}) \times \text{FC}]$$
$$\text{con } \text{FC} = a^{120}\text{Te} / a^{126}\text{Te}$$

L'intensità dello Sn a massa 120 è corretta per il Te andando a leggere quest'ultimo alla massa 126 e applicando il fattore di correzione **FC**.

Un ulteriore esempio è l'interferenza di $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$ su ^{75}As . L'equazione di correzione è la seguente:

$$I(^{75}\text{As}) = I(^{75}\text{As}) - [I(^{37}\text{Cl}) \times \text{FC}]$$
$$\text{FC} = a^{35}\text{Cl} / a^{37}\text{Cl}$$

In questo caso si utilizza il rapporto di abbondanze tra gli ioni Cl 35 e 37 che combinandosi con ^{40}Ar generano i segnali alle masse 75 e 77.

Nel caso che il fattore di correzione non sia conosciuto, non sia cioè semplicemente il rapporto di due abbondanze tabulate, bisogna calcolarlo sperimentalmente. Per far ciò l'elemento che causa l'interferenza viene aggiunto in quantità crescenti (ad esempio, C1 e C2) alla matrice analitica e si determina il segnale generato sia alla massa interferita che alla massa

propria di un isotopo dell'elemento interferente. Ad esempio, se si vuole correggere l'interferenza generata da $^{23}\text{Na}^{37}\text{Cl}$ sul ^{60}Ni si aggiungono quantità crescenti di NaCl al campione di interesse e si considerano i conteggi alla massa del ^{37}Cl e alla massa 60. Il fattore di correzione è così ottenuto:

$$\text{FC} = [I_1(60) - I_2(60)] / [I_1(37) - I_2(37)]$$

dove I_1 e I_2 sono le intensità dei segnali ottenuti alle concentrazioni C1 e C2.

L'equazione di correzione sarà quindi:

$$I(^{60}\text{Ni}) = I(^{60}\text{Ni}) - (\text{FC} \times I(^{37}\text{Cl}))$$

REAZIONI CHIMICHE POST-IONIZZAZIONE

Alcuni ICP-MS sono in grado di rimuovere le specie poliatomiche interferenti mediante l'impiego di celle di reazione collocate tra l'interfaccia ed il quadrupolo analizzatore, all'interno delle quali viene fatto passare un opportuno gas di reazione (prevalentemente idrogeno, ammoniaca o metano) (Figura 14).



Figura 14. ELAN DRC II (Perkin Elmer)

All'interno della cella il gas reagisce con gli ioni interferenti producendo nuove specie poliatomiche con massa diversa da quella dell'analita. In generale all'interno della cella di reazione le reazioni che avvengono sono le seguenti:

- *trasferimento di carica:* $\text{ArO}^+ + \text{NH}_3 \rightarrow \text{O} + \text{Ar} + \text{NH}_3^+$
- *trasferimento di un protone:* $\text{ArH}^+ + \text{NH}_3 \rightarrow \text{Ar} + \text{NH}_4^+$
- *trasferimento di un atomo di idrogeno:* $\text{Ar}^+ + \text{H}_2 \rightarrow \text{Ar}^+ \text{H} + \text{H}$
- *condensazione:* $\text{CeO}^+ + \text{O}_2 \rightarrow \text{CeO}_2^+ + \text{O}$
- *associazione:* $\text{Na}^+ + \text{Ar} \rightarrow \text{Na} \cdot \text{Ar}^+$

La Figura 15 mostra uno schema semplificato di ciò che avviene all'interno della cella di reazione. Esistono due tipi di celle di reazione: a) quadrupolare con banda passante; b) cella di collisione esapolare. Tra i due sistemi sopracitati esistono delle differenze sostanziali. All'interno della cella oltre alle reazioni chimiche primarie utili ad eliminare le interferenze si hanno reazioni secondarie con formazione di co-prodotti che possono, a loro volta, dar luogo a nuove interferenze sulla massa analitica di interesse. La cella di reazione quadrupolare a banda passante permette, in virtù della maggiore stabilità nella trasmissione degli ioni rispetto all'esapolo, di selezionare la porzione di spettro da inviare al quadrupolo analizzatore (banda passante). Nella cella collisionale esapolare gli interferenti secondari non possono essere eliminati causando nuove interferenze sulla determinazione di isotopi vicini alla zona analitica.

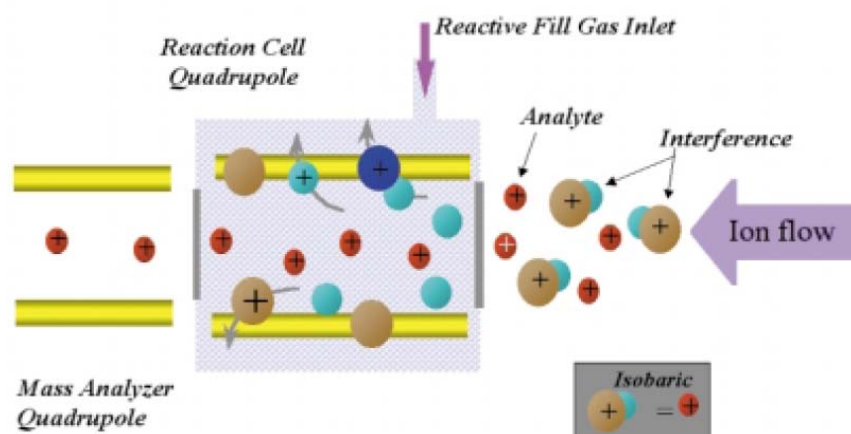


FIGURA 15. SCHEMA DI CELLA DI REAZIONE (RIPRODOTTO DA PERKIN-ELMER)

La Figura 16 mostra l'abbattimento dell'interferenza ArO^+ sulla massa 56 attraverso l'impiego della cella di reazione. Si passa sulla massa 56 dai 10 milioni di conteggi a circa 10 conteggi senza diminuzione della sensibilità strumentale. Purtroppo questa tecnica non è di alcun giovamento nel caso degli ossidi metallici o nel caso di altri interferenti che non vedano coinvolto come gas l'argon o l'idrogeno.

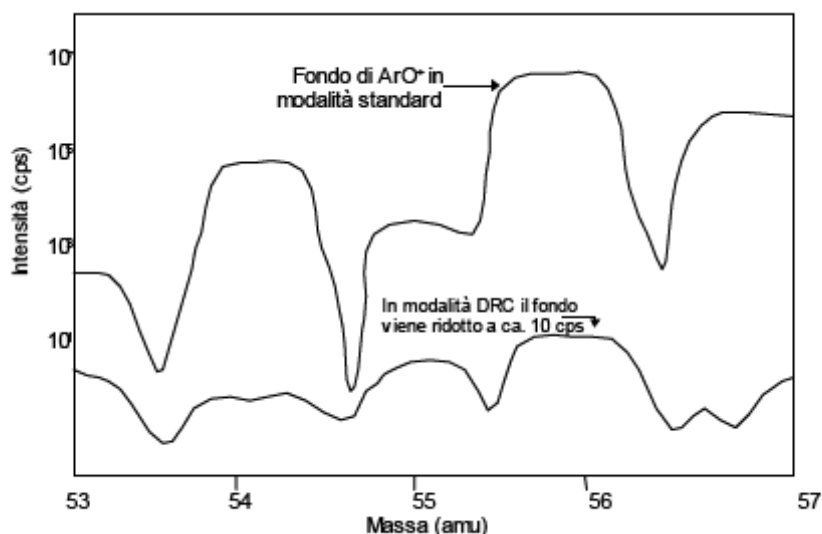


FIGURA 16. DIMINUZIONE DELL'INTERFERENZA ArO^+ CON L'USO DELLA CELLA DI REAZIONE

STRUMENTI AD ALTA RISOLUZIONE

Il recente sviluppo di nuovi sistemi a doppia focalizzazione con analizzatori a settore magnetico ha dato un grande impulso all'analisi in alta risoluzione. Lo schema di base di tali sistemi consiste in un settore magnetico nel quale gli ioni con differente rapporto massa/carica sono costretti a passare. La separazione delle masse avviene in base al principio per cui gli ioni nella traiettoria circolare hanno raggi diversi a seconda della forza di Lorenz cui sono soggetti. Gli ioni sono, inoltre, soggetti ad un secondo campo elettrico che opera una ulteriore separazione. In questo modo si possono raggiungere risoluzioni anche di 12.000. L'uso dell'alta risoluzione è indubbiamente il modo più elegante e pratico per il superamento del problema delle interferenze. Il fattore cruciale di questa tecnica è il potere risolutivo **R** che, nel caso della definizione al 10 % della valle tra i due picchi, è dato da:

$$R = (m_1 / (m_1 - m_2)) \times (a / b)$$

dove m_1 e m_2 sono le masse dei due isotopi, **a** è la distanza tra i centri dei due picchi e **b** è l'ampiezza del picco al 5 % dell'altezza (Figura 17). Ad esempio, il Se con massa 79,9165 può essere separato dall'interferente ArAr

con massa 79,924 (e quindi con un Δm di 0,008) con una risoluzione superiore a 10.000.

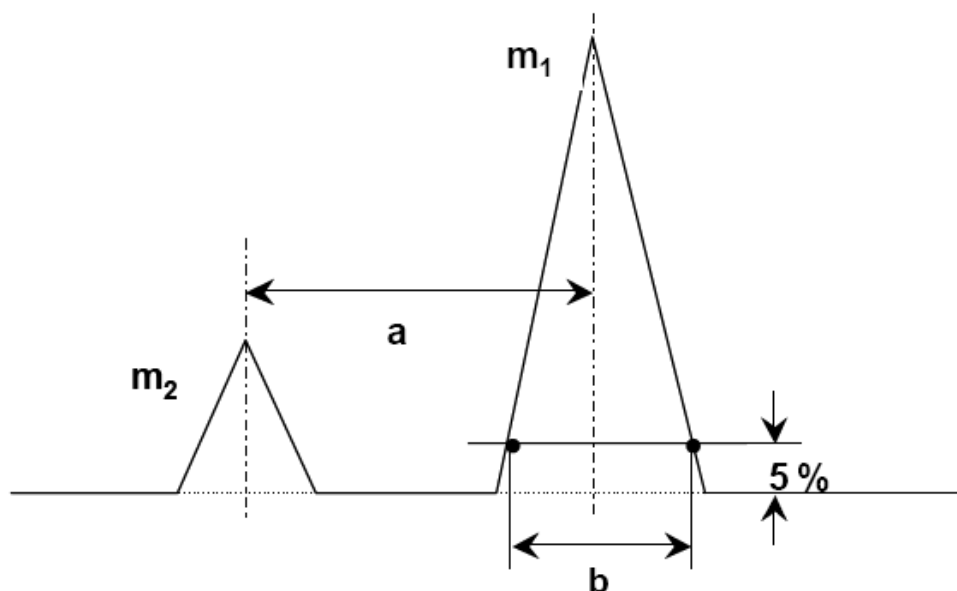


Figura 17. Definizione della risoluzione al 10% della valle

Come esempi significativi della possibilità di determinare alcuni analiti a media ed alta risoluzione si ricordano la determinazione di K a concentrazioni dell'ordine dei ng l^{-1} separando ^{39}K da $^{38}\text{Ar}^1\text{H}$ e la separazione dell'unico isotopo dell'arsenico (massa 75) dallo ione molecolare interferente $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$, utilizzando una risoluzione superiore a 10.000. Quest'ultima applicazione si è rivelata particolarmente utile nella determinazione di As in matrici ricche di Cl come ad esempio i fluidi biologici o l'acqua di mare.

APPENDICE B

VOLTAMMETRIA: I PRINCIPI

La voltammetria è una tecnica elettrochimica basata sulla misura della corrente che attraversa gli elettrodi, immersi in una soluzione contenente specie elettroattive, quando tra loro viene applicato un potenziale variabile in maniera opportuna. La cella voltammetrica è costituita da tre elettrodi: uno di lavoro, uno di riferimento e un controelettrodo. L'elettrodo di lavoro è conformato in modo da poter assumere esattamente il potenziale via via impostogli dall'esterno. Il dispositivo elettrico è completato dagli elettrodi di riferimento e ausiliario che permettono di controllare con precisione il potenziale dell'elettrodo di lavoro. La registrazione della corrente in funzione del potenziale applicato viene detta voltammogramma; il passaggio di corrente si registra quando il potenziale applicato è sufficientemente negativo o positivo affinché la specie elettroattiva possa essere ridotta o ossidata. L'intensità di corrente dipende dal numero di ioni che, nell'unità di tempo, raggiungono la superficie dell'elettrodo. Il trasporto di materia verso l'elettrodo può avvenire secondo tre meccanismi: diffusione, migrazione e convezione.

Diffusione: il processo di scarica fa sì che la soluzione nei pressi dell'elettrodo sia nettamente meno concentrata rispetto ad altre zone; nasce così un gradiente di concentrazione fra le immediate vicinanze dell'elettrodo ed il resto della soluzione. Questo provoca uno spostamento delle specie interessate dalle zone più concentrate alle più diluite.

Migrazione: è il movimento determinato dalla forza di attrazione del campo elettrico generato.

Convezione: ogni volta che nella soluzione si generano gradienti di densità o di temperatura nasce un flusso spontaneo di materia (sia specie elettrochimica che solvente) che tende a ripristinare l'equilibrio. Il fenomeno risulta particolarmente accentuato quando la soluzione viene agitata meccanicamente.

La corrente di diffusione cresce con il potenziale applicato e questo avviene finché la velocità di scarica degli ioni è bassa rispetto alla velocità con cui riescono a raggiungere l'elettrodo di lavoro per diffusione. Quando il potenziale raggiunge un certo valore, la velocità di scarica diventa uguale alla velocità di diffusione, per cui, tutti gli ioni che giungono all'elettrodo per diffusione vengono istantaneamente scaricati. Oltre questo punto il potenziale applicato non ha più alcun effetto sulla corrente che rimane costante e prende il nome di corrente di diffusione limite I_d . Poiché la diffusione dipende dalle caratteristiche dello ione, è necessario isolare la corrente di diffusione da quelle di migrazione e di convezione. Per eliminare la convezione si evita di agitare la soluzione; per eliminare la migrazione si usa il cosiddetto elettrolita di supporto (KCl), il quale ha il compito di attenuare il campo elettrico in prossimità dell'elettrodo. In pratica, si aggiungono alla soluzione in analisi, forti quantità di un elettrolita di supporto, che può essere un sale (ad es. KCl) o un acido (ac. Acetico) o una base (KOH). L'elettrolita, circondando l'elettrodo, riesce appunto a schermare il campo elettrico e perciò a ridurre al minimo l'attrazione elettrostatica.

Le principali caratteristiche di un elettrolita di supporto sono:

- non interferire con il fenomeno della diffusione consentendo anche una facile scarica sull'elettrodo da parte della specie analizzata;
- possedere una elevata conducibilità, tale da garantire una bassa resistenza di cella;

- avere un potenziale di scarica molto distante da quello della specie da misurare.

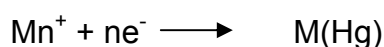
Nella pratica, la scelta dell'elettrolita di supporto più adatto, si basa su una preventiva ricerca bibliografica e non su particolari considerazioni teoriche. A queste tecniche di base si sono aggiunte tecniche più moderne che permettono di eliminare le componenti non faradiche della corrente (corrente capacitiva), quali la DPV, la cronoamperometria, la voltammetria ad onda quadra. Queste tecniche permettono quindi di determinare basse concentrazioni di analita in tempi molto più rapidi.

VOLTAMMETRIA DI RIDISSOLUZIONE (O DI STRIPPING)

I metodi voltammetrici di ridissoluzione, detti anche di stripping, comprendono diverse tecniche elettrochimiche, caratterizzate dall'avere in comune lo stesso stadio iniziale. Queste tecniche sono infatti caratterizzate da due fasi, la prima delle quali prevede l'elettrodeposizione dell'analita all'elettrodo di lavoro, generalmente da una soluzione mantenuta in agitazione. Dopo un determinato periodo di tempo si cessa l'applicazione del potenziale costante e si procede alla dissoluzione (stripping) dell'analita accumulato, andando a determinarne la concentrazione tramite un metodo voltammetrico.

Nei metodi di ridissoluzione anodica (ASV, Anodic Stripping Voltammetry) l'elettrodo di lavoro funge da catodo durante la fase di deposizione e da anodo durante la ridissoluzione, quando l'analita viene riossidato alla sua forma iniziale. Nei metodi di ridissoluzione catodica l'elettrodo di lavoro funziona invece da anodo durante la deposizione e da catodo durante la fase di ridissoluzione.

I metodi di ridissoluzione hanno un'importanza fondamentale nel campo dell'analisi in traccia perchè la fase di deposizione permette la preconcentrazione dell'analita, consentendo quindi la determinazione di quantità minime dell'analita. In ASV l'elettrodo più utilizzato è quello di mercurio (a goccia o a film) e nella prima fase si applica un potenziale talmente negativo da permettere di ridurre i cationi presenti in soluzione allo stato zerovalente, andando a scaricarli nel mercurio tramite la formazione di un amalgama:



Per quanto riguarda questa fase, i risultati quantitativi dipendono da una serie di parametri, quali il potenziale dell'elettrodo, le dimensioni dell'elettrodo, la durata della deposizione e dell'agitazione della soluzione. Il potenziale applicato all'elettrodo di lavoro è di alcuni decimi di volt più negativo rispetto al valore del potenziale di semionda dello ione da analizzare. Il tempo per cui viene depositato l'analita può andare da 60 secondi fino anche a 30 minuti, in relazione alla concentrazione dell'analita nella soluzione e alla sensibilità del metodo che si utilizza per terminare l'analisi. Successivamente i metalli amalgamati nel mercurio vengono riossidati mediante una scansione anodica. Man mano che si raggiunge il potenziale di scarica, si registra sul voltammogramma l'andamento della corrente. La posizione e l'altezza di un picco sono correlati rispettivamente alla natura e alla concentrazione dell'analita. Il voltammogramma generato è del tipo mostrato nella figura 1.

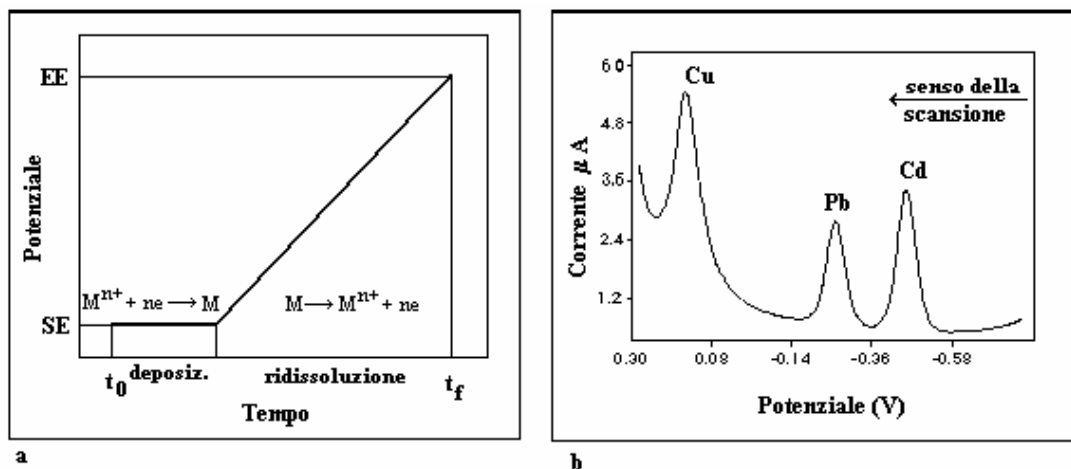


Figura 13. **VOLTAMMETRIA DI STRIPPING ANODICO IN UNA SOLUZIONE CONTENENTE PB(II), CD(II) E CU(II). A) SCANSIONE DEL POTENZIALE. B) VOLTAMMOGRAMMA**

L'elettrolita depositato sull'elettrodo può essere determinato con un qualsiasi metodo voltammetrico. Se si sceglie ad esempio di utilizzare una tecnica a scansione lineare, si interrompe l'agitazione per un certo numero di secondi alla fine della deposizione, e si aumenta, con velocità costante, il potenziale, andando a registrare la corrente risultante in funzione del potenziale applicato. Allo step di ridissoluzione sono stati applicati altri metodi voltammetrici, tra i quali quello più utilizzato è probabilmente quello a impulso differenziale. La voltammetria differenziale ad impulsi (DPV) (Figura 2) consiste nell'applicare alla scansione lineare una serie periodica di impulsi di durata e ampiezza costante. Inoltre si va a misurare la differenza di corrente che passa appena prima e negli ultimi istanti di vita dell'impulso. Si ottiene così una misura differenziale della corrente, che genera un voltammogramma a forma di picco. Questo modo di misurare la corrente permette di ottenere una misura molto meno influenzata dalla corrente capacitiva. Come si può notare dalla figura 3 la corrente capacitiva è infatti massima nel momento in cui viene imposto l'impulso e poi decresce rapidamente. Alla fine dell'impulso viene, in pratica, campionata la sola corrente faradica. Una variante di questa tecnica consiste nell'effettuare una scansione a gradini e nell'applicare a questa l'impulso differenziale. I

vantaggi introdotti da questa tecnica sono quelli di ottenere una maggior sensibilità e

picchi più stretti; ciò è un vantaggio nel caso in cui si analizzino miscele di più componenti.

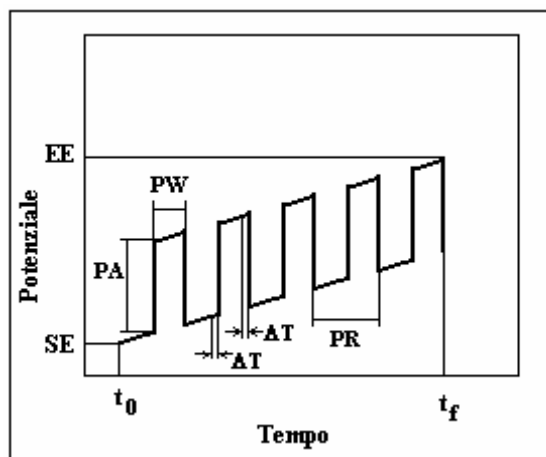


FIGURA 2. SCANSIONE ANODICA DEL POTENZIALE IN VOLTAMMETRIA DIFFERENZIALE AD IMPULSI. SE = POTENZIALE INIZIALE; EE = POTENZIALE FINALE; T0 E TF = TEMPO INIZIALE E FINALE DELLA SCANSIONE; T = TEMPO DI CAMPIONAMENTO DELLA CORRENTE DURANTE LA SCANSIONE; PA=AMPIEZZA DELL'IMPULSO DI POTENZIALE; PW = TEMPO DI DURATA DI UN IMPULSO DI POTENZIALE; PR = TEMPO DI RIPETIZIONE DELL'IMPULSO DI POTENZIALE.

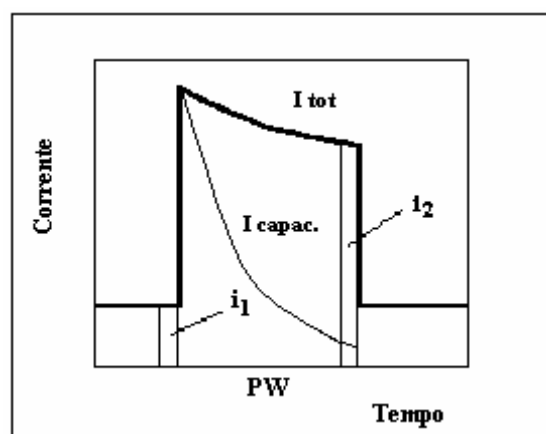


Figura 3. ANDAMENTO DELLA CORRENTE DURANTE LA VITA DI UN IMPULSO. ITOT = CORRENTE TOTALE; I1 =CORRENTE MISURATA PRIMA DELL'IMPULSO; I2 = CORRENTE MISURATA ALLA FINE DELL'IMPULSO; ICAPAC = CORRENTE CAPACITIVA.

In altri casi allo step di ridissoluzione viene applicata la voltammetria ad onda quadra (Figura 4), che costituisce un ulteriore sviluppo della DPV. All'elettrodo viene applicata una tensione che varia rapidamente a gradini, su cui viene sovrapposta un'onda quadra di elevata frequenza. La corrente viene campionata alla fine dell'impulso diretto e alla fine di quello di ritorno. Nel caso di una coppia redox reversibile, nella prima fase l'analita si scarica, ad esempio riducendosi, mentre nella seconda fase subisce il processo inverso. Le due correnti vengono poi sommate, portando ad una tecnica differenziale più sensibile della DPV.

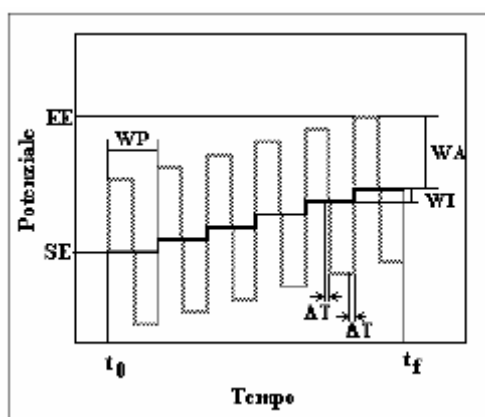


FIGURA 4. SCANSIONE ANODICA DEL POTENZIALE IN VOLTAMMETRIA AD ONDA QUADRA. SE = POTENZIALE INIZIALE; EE = POTENZIALE FINALE; T₀ E T_f = TEMPO INIZIALE E FINALE DELLA SCANSIONE; ΔT = TEMPO DI INTEGRAZIONE DELLA CORRENTE DURANTE LA SCANSIONE; WA = AMPIEZZA DELL'IMPULSO DI ONDA QUADRA; WP = TEMPO DI DURATA DI UN IMPULSO DI ONDA QUADRA; WI = INCREMENTO DI POTENZIALE PRIMA DI OGNI IMPULSO DI ONDA QUADRA.

Infine, molto simile ai metodi di ridissoluzione, anodica e catodica, è la voltammetria di ridissoluzione per adsorbimento. In questo caso la deposizione dell'analita avviene per adsorbimento sulla superficie dell'elettrodo, e non per via elettrochimica. Questa tecnica viene applicata per la determinazione di molecole organiche e di diversi cationi inorganici presenti in concentrazioni molto basse, previa complessazione dei cationi tramite un opportuno legante.

APPENDICE C

1. Bocca B., Lamazza A., Pino A., De Masi E., Iacomino M., Mattei D., Rahimi S., Fiori E., Schillaci A., Alimonti A., Forte G. 2007. Determination of 30 elements in colorectal biopsies by sector field inductively coupled plasma mass spectrometry: method development and preliminary baseline levels. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 21: 1776–1782.
2. Bocca B., Mattei D., Pino A., Alimonti A. 2007 La concentrazione dei metalli nell'organismo umano, prima parte *Sicurezza Sanitaria*, 93:2-10
3. Bocca B., Mattei D., Pino A., Alimonti A. 2007 La concentrazione dei metalli nell'organismo umano, seconda parte *Sicurezza Sanitaria*, 94:4-15
4. Bocca B, Conti ME, Pino A, Mattei D, Forte G, Alimonti A. 2007. Simple, fast, and low-contamination microwave-assisted digestion procedures for the determination of chemical elements in biological and environmental matrices by sector field ICP-MS. *International journal of environmental analytical chemistry*. 87(15):1111-1123.
5. Bocca B., Mattei D., Pino A., Alimonti A. 2007. Contenuto dei metalli nell'organismo, prima parte, *Ambiente*, 68: 56-67.
6. Bocca B., Mattei D., Pino A., Alimonti A. 2008. Contenuto dei metalli nell'organismo. *Ambiente*, 69:48-59.
7. Alimonti A, Mattei D. Biomarkers for human biomonitoring . In: Conti ME, ed. *Biological monitoring: theory & applications. Bioindicators and biomarkers for environmental quality and human exposure assessment*. Southampton: WITPress Publisher; 2008. p. 163-211.
8. Alimonti A, Bocca B, Lamazza A, Forte G, Rahimi S, Mattei D, Fiori E, Iacomino M, Schillaci A, De Masi E, Pino A. 2008. A study on metals

content in patients with colorectal polyps. Journal of toxicology and environmental health. Part A.71(5):342-347.

9. Alimonti A., Bocca B., Mattei D., Pino A., Femia S., Iacomino M., Lamazza A., Forte G. 2009. Composition in essential and non-essential elements of tissues and body fluids of healthy subjects and patients with colorectal polyps. International Journal of Environment and Health. Accettato per la pubblicazione.