



ANALISI DEL CAPELLO: COME E A CHE SCOPI

Con il miglioramento della sensibilità analitica, l'analisi chimica del capello ha acquistato notevole interesse tossicologico e clinico, sia perché il campionamento non è invasivo, sia per la ricchezza informativa che fornisce su intervalli temporali più ampi rispetto a sangue e urina. Sono illustrati i meccanismi biologici, i metodi analitici e i relativi rischi, le applicazioni principali.

Premesse

Gli esseri umani sono animali essenzialmente glabri, fatta eccezione per il capo, che è assai ricco di formazioni pilifere, le quali concorrono sostanzialmente a definire l'aspetto esteriore degli individui. A causa della loro rilevanza estetica, tali formazioni pilifere sono assoggettate a modellamento, cura e trattamenti cosmetici e alterativi, e hanno acquistato denominazione specifica, a seconda della loro localizzazione (capelli, barba, baffi, ciglia, sopracciglia). Tutte le altre formazioni pilifere non posseggono denominazione specifica (sono tutti definiti "peli"), se non attraverso aggettivazione, e, nell'alterna evoluzione culturale ed estetica degli esseri umani, hanno spesso sviluppato una connotazione negativa. Nella terminologia commerciale vengono spesso qualifi-

cati come "peli superflui" per evidenziare l'esigenza della loro rimozione, ai fini del miglioramento estetico. Un secondo importante elemento di premessa è che, benché la struttura interna di tutte le formazioni pilifere sia assai simile, la loro morfologia e, soprattutto, la loro cinetica di crescita ed evoluzione può essere assai differenziata. In tal senso, i capelli godono di una fase di crescita regolare (anagen) nel tempo (80-90%), rispetto alle fasi di stasi (telogen, 10-20%) e di regressione (catagen, 1-2%), mentre le altre formazioni pilifere hanno generalmente fasi di stasi molto più prolungate nel tempo, oltre che densità per unità di superficie minore [1]. Questi due fattori rendono i capelli la formazione pilifera privilegiata per svolgere le indagini analitiche su matrice cheratinica. In particolare, la crescita regolare dei capelli (circa 1 cm/

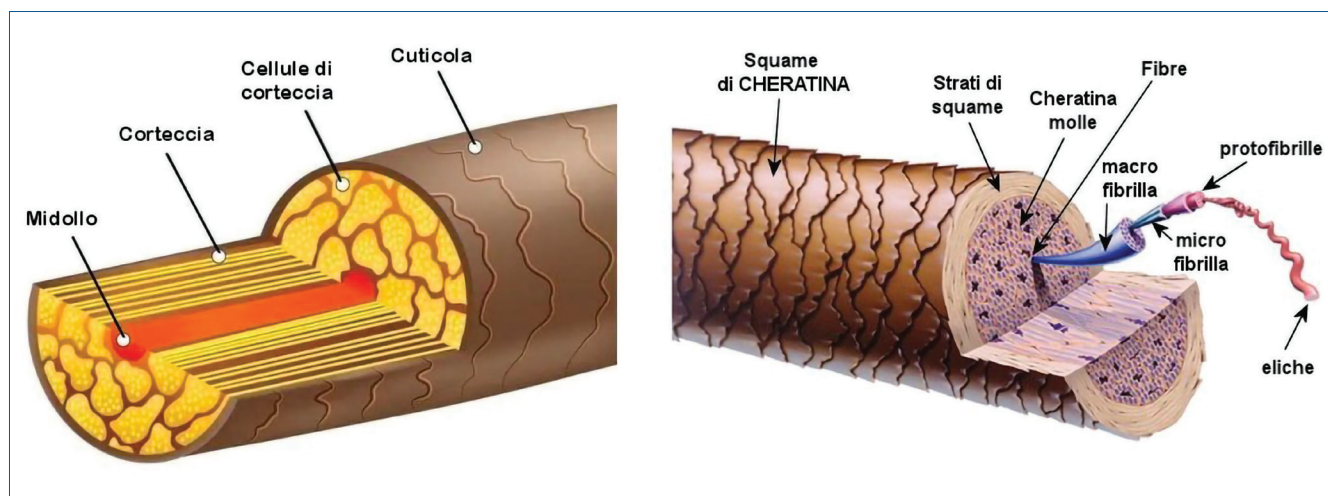


Fig. 1 - Struttura interna del capello



mese) consente di associare l'indagine analitica ad un intervallo temporale circoscritto, definito a partire dalla base di crescita dei capelli. Per esempio, l'analisi dei 3 cm di capelli più prossimi alla superficie del cranio corrisponde ad indagare eventi occorsi negli ultimi 3 mesi rispetto alla data del campionamento, mentre un'analisi "segmentale" svolta separatamente su segmenti di 0,5-1,0 cm consente di definire una cronologia approssimata dei suddetti eventi.

La struttura morfologica del capello

I capelli sono formati da una porzione interna, definita "follicolo pilifero", che ha sede nel derma, e una porzione esterna che spunta dal cuoio capelluto, chiamato "fusto". Il fusto consiste di cellule totalmente cheratinizzate e strettamente impacchettate a formare micro- e macro-fibrille, di cui la cuticola squamosa forma lo strato protettivo esterno [2] (Fig. 1).

Meccanismi di incorporazione

Per quanto ad un giudizio affrettato possa apparire inverosimile, è accertato che i capelli conservano al proprio interno una frazione infinitesima, ma ben determinabile, delle sostanze che sono circolate nel nostro organismo, purché esse non siano particolarmente volatili, né di grandi dimensioni. La grande maggioranza dei farmaci, degli inquinanti, delle sostanze ormonali e dei prodotti comuni di metabolizzazione degli alimenti rientrano nella categoria delle sostanze che vengono incorporate nei capelli, in piccola misura. In altre parole, i capelli "conservano la memoria" delle sostanze che sono state presenti in circolo nel corpo, a seguito di assunzione per qualunque via o di metabolizzazione.

I meccanismi attraverso i quali le molecole vengano incorporate all'interno della struttura cheratinica del capello, per rimanervi fissate per un tempo indeterminato (persino centinaia o migliaia di anni [3]), non sono chiari, ma attualmente viene accettata l'ipotesi che siano molteplici e che investano in proporzione variabile differenti matrici di distribuzione delle suddette sostanze. In particolare, si pensa che le proprietà chimico-fisiche delle molecole determinino il meccanismo prevalente di incorporazione, a partire dal sangue capillare, o dal sebo, o dal sudore. Data la diversa collocazione dei capillari, dei dotti delle ghiandole sebacee e sudoripare (Fig. 2), nei tre casi

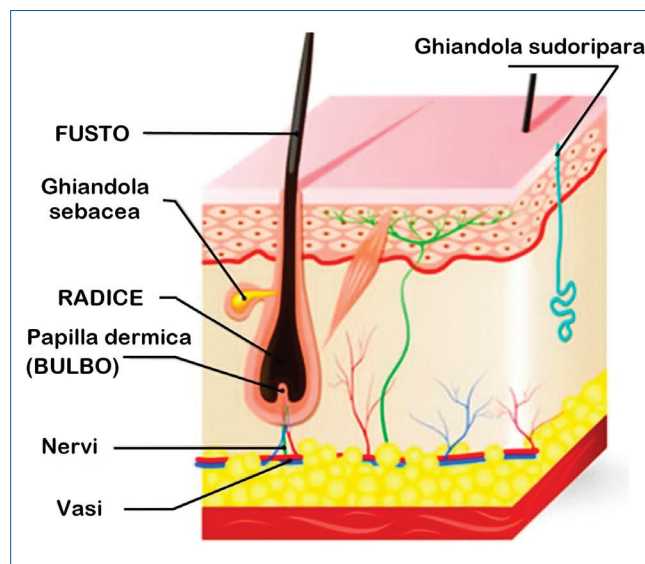
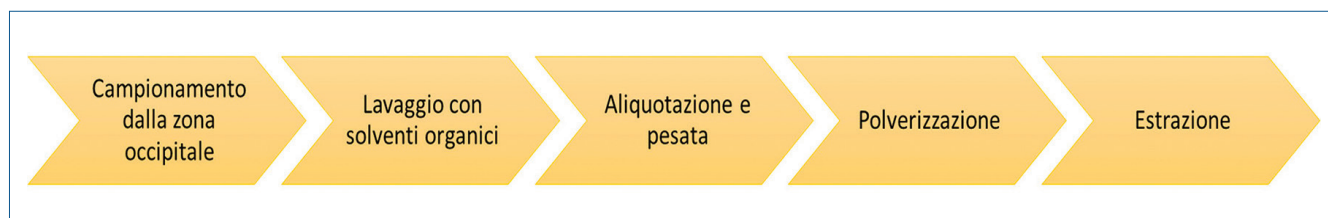


Fig. 2 - Struttura del cuoio capelluto

verrà coinvolta una differente fase della crescita del capello e struttura di esso (rispettivamente, il bulbo, la radice, il fusto). Il diverso meccanismo di incorporazione determina l'azione potenziale di eterogenei fattori di influenza e la corrispondente variabilità dei risultati quantitativi [4].

Rischi di contaminazione esterna

L'accettazione del meccanismo di incorporazione nel capello che origina dall'escrezione degli analiti attraverso le ghiandole sudoripare, i cui dotti sboccano sulla cute, implica che, in particolari condizioni di forte sudorazione e/o idratazione prolungata della base del capello, gli analiti possano essere incorporati dall'esterno, cioè dalla cute medesima. Di conseguenza, non si può escludere che, in piccola misura, gli analiti ritrovati nel capello possano derivare da contaminazione esterna, anziché dall'assunzione diretta [5]. Nel caso in cui la determinazione analitica sia rivolta all'accertamento di assunzione di sostanze di uso illecito, è perciò importante che la concentrazione riscontrata superi un valore di soglia incompatibile con la contaminazione esterna. D'altra parte, è sempre preferibile che, unitamente alla sostanza assunta, si possa accertare la presenza anche di qualche suo metabolita, che ne confermi l'assunzione. In tutti i casi, è necessario rimuovere dai capelli i potenziali contaminanti esterni, prima di procedere all'estrazione degli analiti contenuti all'interno della struttura cheratinica.



Schema 1

Trattamento pre-analitico del campione

Il campionamento e il successivo trattamento iniziale dei campioni rappresentano le fasi analitiche caratterizzate dalla maggiore criticità, sia per la variabilità campionaria, sia per la natura solida dei campioni, sia soprattutto perché gli analiti debbono essere estratti dall'interno della struttura cheratinica dei capelli, dove sono intrappolati abbastanza stabilmente e da cui è assai difficile rilasciarli in condizioni estrattive standard [6]. Prima di considerare in dettaglio le diverse fasi pre-analitiche, è opportuno definirne un quadro complessivo, riportato nello Schema 1.

Il campionamento richiede la recisione dei capelli il più vicino possibile alla cute e il mantenimento della posizione reciproca dei capelli, bloccandoli mediante alluminio e/o elastici. In genere, è sufficiente tagliare un ciuffo del diametro pari a quello di una matita.

Come accennato, è indispensabile effettuare più lavaggi dei capelli campionati al fine di eliminare eventuali contaminazioni esterne. Si utilizzano tipicamente solventi organici, come metanolo e diclorometano, più raramente solventi acquosi, per 1-2 minuti. Durante questi brevi intervalli temporali non si osserva di norma il rilascio delle sostanze contenute all'interno della struttura cheratinica, che rimane morfologicamente inalterata.

L'aliquotazione comporta la scelta della lunghezza del segmento o dei segmenti da analizzare, a partire dal punto di recisione, tenendo conto che ogni centimetro corrisponde a circa un mese di crescita. Nel caso in cui si voglia effettuare un'analisi segmentale, verranno aliquotati separatamente segmenti di 0,5-1 cm, avendo cura di mantenere ben allineati e paralleli i capelli rispetto alla linea di taglio. Le aliquote vengono inserite in fiale di plastica in cui sono introdotte alcune piccole biglie di acciaio. Mantenendo le fiale in agitazione per alcuni minuti, si ottiene la polverizzazione del campione, per effetto dell'azione meccanica delle biglie.

Meccanismi di rilascio

Le squame sovrapposte di cheratina che costituiscono lo strato più esterno del capello, la cuticola, normalmente impediscono sia la permeabilità del capello alla penetrazione dei contaminanti esterni sia il rilascio delle sostanze incorporate nella corteccia del fusto. Affinché le sostanze incorporate possano essere rilasciate in un opportuno solvente è perciò necessario modificare tale struttura squamosa impermeabile, consentendo al solvente di entrare in contatto con la corteccia. Questo è il motivo per cui anche sostanze relativamente idrofobiche non vengono estratte durante i brevi lavaggi pre-analitici con solventi organici, mentre possono essere estratte successivamente in solventi meno affini, dopo che la struttura squamosa della superficie del capello sia resa permeabile, mediante il cosiddetto processo di "rigonfiamento" del capello. Nella maggior parte delle applicazioni descritte in letteratura, ciò si ottiene mediante immersione dei campioni in soluzione acquosa o metanolica per svariate ore (spesso "overnight"). L'estrazione può essere ulteriormente facilitata mediante riscaldamento, ultrasuoni, microonde e via dicendo [6]. Solo per la determinazione selettiva degli analiti stabili in condizioni di forte basicità, i capelli possono alternativamente essere trattati con idrossido di sodio, che ne provoca la dissoluzione completa.

Determinazione e quantificazione

Dal punto di vista analitico, la complessità del meccanismo di rilascio delle sostanze incorporate all'interno del fusto genera svariati problemi, alcuni dei quali caratteristici di tutti i campioni solidi. Il primo problema riguarda l'impossibilità di determinare la resa di estrazione degli analiti presenti. Spesso si supplisce a tale vincolo usando il concetto di esaustività dell'estrazione, confrontando tempi diversi di estrazione o metodi differenti: qualora la quantità estratta sia equivalente, si può immaginare che l'estrazione sia esaustiva. Per gli analiti stabili in basi forti, la quantità estratta con metodi meno aggressivi può essere



confrontata con quella ottenuta dopo dissoluzione del capello con idrossido di sodio. Un secondo problema collegato al primo è l'impossibilità di preparare idonei "bianchi fortificati", in quanto la fortificazione con quantità note degli analiti può avvenire soltanto sulla superficie esterna dei capelli, ciò che rende le condizioni di estrazione differenti rispetto agli analiti presenti all'interno del capello [7]. Lo stesso problema si pone per l'aggiunta dello standard interno rispetto al quale effettuare le determinazioni quantitative. È spesso possibile far penetrare analiti e/o standard interno all'interno della matrice cheratinica mediante "soaking" prolungato dei capelli in soluzioni standardizzate, ma anche in questo caso è difficile determinare la quantità effettivamente incorporata. In conclusione, l'effettiva accuratezza delle determinazioni quantitative risente di queste limitazioni.

Per quanto riguarda gli aspetti strumentali, le analisi svolte sulla matrice cheratinica non presentano difficoltà differenti da quelle tipiche delle determinazioni di analiti in traccia in miscele complesse. Nel caso dei capelli, la scarsa disponibilità di campione (pochi mg) si accompagna alla minima quantità di analita che il capello ha potuto incorporare, da cui deriva la necessità di disporre di metodi e strumenti dotati di estrema sensibilità, oltre che di elevata specificità. I più moderni spettrometri di massa, tipicamente in abbinamento con cromatografi liquidi o gassosi, presentano entrambe le caratteristiche [8], a tal punto che oggi il problema principale da risolvere è la discriminazione fra la quantità di analita riscontrata ed effettivamente presente all'interno del capello e le potenziali fonti di contaminazione esterna, sulla matrice o nell'ambiente. In funzione dello specifico problema posto, si potranno usare spettrometri di massa a bassa o ad alta risoluzione, ad uno o più stadi di massa e/o di cromatografia, a metodi operativi "targeted" o "untargeted" dello spettrometro di massa [8].

Fattori di variabilità e bias

L'insieme dei fattori che possono potenzialmente influenzare la relazione fra la quantità di sostanza assunta da un soggetto in esame e la quantità riscontrata nei suoi capelli è talmente ampio da scoraggiare teoricamente qualunque proponimento analitico [8]. Nonostante l'abbondanza dei

fattori di variabilità e di bias, l'analisi del capello si è dimostrata di indubbia utilità in una grande varietà di applicazioni pratiche. Alcuni di questi fattori sono ben noti e, in casi limitati, possono precludere l'utilità dell'analisi; per esempio, è risaputo che trattamenti cosmetici ripetuti e aggressivi (ossidanti e basi forti) deteriorano irreparabilmente la struttura squamosa della cuticola rendendo permeabile il capello sia al rilascio delle sostanze incorporate sia alla contaminazione esterna. Parimenti, lunghe e ripetute permanenze in acqua clorata (piscina) possono riprodurre in parte le condizioni di estrazione citate in precedenza. Altri, meno verificabili, fattori di variabilità si possono raggruppare nelle seguenti tipologie:

- 1) genetici e fenotipici;
- 2) personali e fisiologici;
- 3) comportamentali;
- 4) climatici e ambientali.

La Tab. 1 riporta in maggiore dettaglio, seppure non esaustivamente, un buon numero di fattori potenzialmente in grado di influire sulla quantità di analita riscontrato, a parità di assunzione o esposizione ad esso. Per esempio, è ragionevole ipotizzare che il grado di sudorazione del capo possa giocare un ruolo almeno per le sostanze veicolate principalmente attraverso il sudore, ed è influenzato sia dalle condizioni climatiche sia dall'abbigliamento.

Un fattore di influenza di particolare interesse per le implicazioni chimiche subordinate è quello relativo al colore dei capelli, che è determinato da contenuto e tipo di melanina. In particolare, è noto che la eumelanina, tipica dei capelli scuri e ricca di funzionalità acide, interagisce preferenzialmente con le molecole basiche e idrofobiche, determinandone una maggiore incorporazione nel capello dove essa è abbondante. Questa osservazione, che non manca di implicazioni etniche, è peraltro espressa in termini generici e qualitativi, di difficile utilizzo pratico. Una

Genetici e fenotipici	Processi di assimilazione, distribuzione, metabolismo, escrezione. Morfologia e colore dei capelli
Personali e fisio-patologici	Genere, età, indice di massa corporea, stress, sussistenza di patologie acute o croniche
Comportamentali	Frequenza nell'assunzione, dieta, abitudini igieniche, trattamenti cosmetici, abbigliamento (cappello, foulard)
Climatici e ambientali	Condizioni climatiche domestiche o nel luogo di lavoro, attività del tempo libero, sport, meteorologia e stagionalità

Tab. 1 - Possibili fattori di variabilità da tenere in considerazione nell'analisi del capello

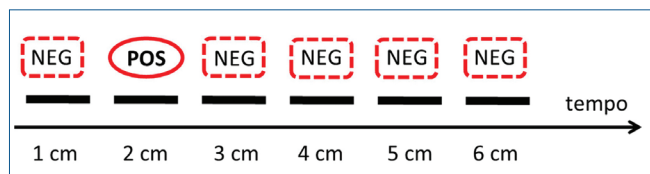


Fig. 3 - Esito dell'analisi segmentale: la positività è riscontrata solo sul segmento cronologicamente corrispondente al momento della somministrazione inconsapevole

ricerca in corso da parte degli autori del presente articolo è indirizzata a definire un modello teorico in grado di prevedere il grado di discriminazione in funzione del contenuto di melanina e dei descrittori molecolari degli analiti di interesse.

Applicazioni in tossicologia analitica

A tutt'oggi, le più diffuse applicazioni pratiche dell'analisi del capello sono indirizzate alle problematiche di tossicologia analitica, sia forense sia igienistico-ambientale. La singola sostanza più diffusamente analizzata nei capelli è certamente l'etil-glucuronato, un metabolita minore dell'alcol etilico, che funge da biomarcatore per accertare il consumo cronico di alcol [9]. Tipicamente, la determinazione quantitativa dell'etil-glucuronato viene svolta sul segmento prossimale di 3 cm di capelli ed è correlata con il consumo medio di alcol nei 3 mesi precedenti il campionamento. Questa determinazione è utilizzata in gran parte del mondo dalle commissioni mediche incaricate di valutare l'eventuale restituzione della patente di guida ai soggetti a cui è stata revocata, a seguito di accertamento di guida sotto l'effetto di un eccesso di alcol [10].

Quasi altrettanto diffuse sono le analisi indirizzate alla ricerca delle sostanze stupefacenti, soprattutto nei contesti nei quali l'uso, anche sporadico, può risultare pericoloso per sé e per soggetti terzi (guida, mansioni professionali a rischio, ecc.) [11]. L'accertamento dell'abuso cronico di farmaci e/o di sostanze stupefacenti è altresì richiesto in molte indagini post-mortem, per verificare l'ipotesi di "overdose" [7]. Molte altre casistiche nelle quali è richiesta l'analisi del capello sono indirizzate ad accertare l'esposizione involontaria a sostanze tossiche, per esempio per accertare l'insalubrità di ambienti o postazioni di lavoro, per verificare l'esposizione a specifici inquinanti [12], per riscontrare l'esposizione a farmaci o sostanze stupefacenti di soggetti deboli (bambini, anziani, ecc.) [13].

Una fattispecie di reati al cui accertamento l'analisi del capello fornisce spesso informazione decisiva è

quella dei cosiddetti "drug-facilitated crimes", il più frequente dei quali è lo stupro dopo somministrazione inconsapevole di sostanza psicoattiva [14]. Se la vittima non denuncia prontamente il crimine, sottoponendosi a prelievo di sangue e urina prima che la sostanza sia escreta, il capello rimane l'unica matrice in grado di rilevarla a distanza di tempo. Trascorsi circa 45 giorni dal crimine, alla vittima viene prelevato un campione di capelli, su cui viene svolta l'analisi segmentale delle più comuni "droghe da stupro": la positività apparirà soltanto sul segmento cronologicamente corrispondente al momento del reato (Fig. 3), dimostrando che la vittima non è consumatrice abituale della stessa sostanza e fornendo supporto decisivo alla sua testimonianza. Occorre sottolineare l'estrema sensibilità e specificità che la moderna strumentazione di spettrometria di massa è in grado di offrire in queste analisi: la rilevazione della sostanza è possibile, nonostante la singola somministrazione e l'infinitesimale frazione incorporata nel segmento di capello.

Applicazioni in metabolomica e chimica-clinica

L'analisi del capello fornisce una rappresentazione integrata nel tempo (mesi) di sostanze e metaboliti presenti nel corpo del soggetto analizzato, a differenza delle altre matrici biologiche (sangue, urina, fluido orale), la cui composizione metabolica risente di fluttuazioni casuali ed episodiche, dovute all'alimentazione, a fattori di stress, o ad altri eventi accidentali. Da questo punto di vista, il metaboloma presente nei capelli potrebbe risultare ideale per diagnosticare patologie evolutive e/o croniche che si manifestino attraverso variazioni sistematiche di qualche cammino metabolico [15].

Questo presupposto sostiene il progressivo interesse che l'analisi del capello suscita negli ambiti della chimica-clinica e della metabolomica. Nel primo caso, si dovrebbero conoscere a priori i biomarcatori utili da determinare analiticamente per evidenziare la patologia, mentre nel caso della metabolomica è il confronto esteso del profilo metabolico dei soggetti malati in confronto a quello dei soggetti sani a fornire il quadro dei biomarcatori di patologia [16]. Se in passato la modesta quantità di campione disponibile (mg) ha scoraggiato l'uso della matrice cheratinica per gli accertamenti diagnostici, oggi giorno i miglioramenti della strumentazione, in termini di miniaturizzazione e accresciuta sensibilità, nonché la capacità di processare grandi moli di dati in breve



tempo, hanno aperto nuove e promettenti attività di ricerca sperimentale fondata sull'analisi del capello.

BIBLIOGRAFIA

- [1] B. Buffoli, F. Rinaldi *et al.*, *Int. J. Dermatol.*, 2014, **53**, 331.
- [2] M.R. Harkey, *Forensic Sci. Int.*, 1993, **63**, 9.
- [3] A.C. Springfield, L.W. Cartmell *et al.*, *Forensic Sci. Int.*, 1993, **63**, 269.
- [4] G.A.A. Cooper, in *Hair analysis in Clinical and Forensic Toxicology*, P. Kintz, A. Salomone, M. Vincenti (Eds.), Academic Press, San Diego (CA), 2015, 1.
- [5] C. Chatterton, *ibid.*, 47.
- [6] R. Kronstrand, M. Forsman *et al.*, *ibid.*, 23.
- [7] C. Jurado, *ibid.*, 241.
- [8] M. Vincenti, P. Kintz, *ibid.*, 337.
- [9] F. Pragst, *ibid.*, 71.
- [10] A. Cinquetti, C. Terranova *et al.*, *Drug Test. Anal.*, 2023, **15**, 953, DOI: [10.1002/dta.3426](https://doi.org/10.1002/dta.3426)
- [11] L. Tsanaclis, J. Nutt *et al.*, *Drug Test. Anal.*, 2023, **15**, 1027, DOI: [10.1002/dta.3434](https://doi.org/10.1002/dta.3434)
- [12] M. Ruiz-Castell, G. Le Coroller *et al.*, *Environ. Int.*, 2023, **173**, 107780.
- [13] C. García-Caballero, M.A. Martínez-González, *Drug Test. Anal.*, 2023, **15**, 941, DOI: [10.1002/dta.3478](https://doi.org/10.1002/dta.3478)
- [14] P. Xiang, M. Shen *et al.*, *J. Forensic Leg. Med.*, 2015, **36**, 126.
- [15] M. van de Lavoie, K.M. da Silva *et al.*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2023, **415**, 5589, DOI: [10.1007/s00216-023-04851-z](https://doi.org/10.1007/s00216-023-04851-z)
- [16] C.W. Chang, J.Y. Hsu *et al.*, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2023, **34**, 550.

Hair Analysis: How and for What Purpose

Following the improved analytical and instrumental sensitivity, hair analysis gained increasing toxicological and clinical interest, due to both its simple noninvasive sampling and the crucial information it provides over wider time intervals, with respect to blood and urine. The biological mechanisms, the analytical methods and their inherent risks, and the main applications are presented.



Laboratorio 4.0 con "ActiveLIMS®"

Il termine "Industria 4.0" nasce dalla cosiddetta **quarta rivoluzione industriale**, che delinea i concetti della produzione industriale interamente automatizzata ed interconnessa.

Tali concetti, applicati al Laboratori Prove, suggeriscono di disegnare **Progetti per un "Laboratorio 4.0"** che abbiano l'obiettivo di garantire l'interconnessione e la comunicazione fra Strumenti, Dispositivi e Software per governare i processi di Laboratorio in maniera organica ed efficiente, riducendo così drasticamente le probabilità di errore.

Il LIMS "ActiveLIMS®" di Polisystem dispone di tutti gli strumenti per realizzare il "Laboratorio 4.0", in quanto è in grado di:

- ▶ Garantire la **sicurezza delle Informazioni**.
- ▶ **Acquisire i dati automaticamente**, in modo controllato e nel rispetto dei requisiti di integrità e tracciabilità (**Modulo LIMS-IP PRO**).
- ▶ Raccogliere nel proprio potente DataBase enormi quantità **di dati ed informazioni da tutte le fasi dei Processi di Laboratorio (Modulo ELN)**.
- ▶ Sottoporre i dati a potenti e Flessibili strumenti di **Statistica**.
- ▶ Mettere a disposizione una consistente Origine Dati per l'utilizzo della **Business Intelligence**.
- ▶ Avviare **Progetti di Intelligenza Artificiale** contando sulle competenze specifiche nella realizzazione di tali Progetti nelle più differenti aree applicative.