



UNIVERSITÀ DI PARMA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

DOTTORATO DI RICERCA IN

"Medicina Molecolare"

CICLO XXXVII

***Il ruolo del Laboratorio di Tossicologia Forense nello studio e
nell'individuazione di sostanze d'abuso.***

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Prisco Mirandola

Tutore:

Chiar.mo Prof.ssa Rossana Cecchi

Dottorando: Dott.ssa Sara Dagoli

Anni Accademici 2021/2022 – 2023/2024

*Ai miei nonni, il
ricordo più
dolce e intenso.*

“Com’è semplice sognare! Proiettato sul maxischermo del futuro ogni sogno sembra una cosa facilissima, ma è il presente la vera resa dei conti”.

*“Non voltare mai lo sguardo altrove.
Non serve. Fa’ appello a tutto il tuo coraggio.
Fissa negli occhi la paura e ridi, ridi di lei”*

*“Sappi che la strada più corta
potrebbe anche essere la più facile, ma
non sarà mai la più soddisfacente”.*

INDICE

INDICE TABELLE	pag. 7
INDICE FIGURE	pag. 8-10
ABSTRACT	pag. 11-13
ACRONIMI E ABBREVIAZIONI	pag. 14-18
PREMESSA	pag. 19-23
<i>CAPITOLO 1</i>	
1. Introduzione	pag. 25-34
1.1. Excursus legislativo	pag. 35-38
1.2. Il ruolo della tossicologia forense	pag. 39-41
1.3. Impatto dell'etanolo alla guida	pag. 42-46
1.4. Parte sperimentale (primo studio)	pag. 48
1.4.1. Obiettivo	pag. 48
1.4.2. Materiali e Metodi	pag. 49-51
1.4.2.1. Analisi statistica	pag. 52
1.4.3. Risultati	pag. 53-58
1.4.4. Discussione	pag. 59-61
1.4.5. Conclusioni	pag. 62-63
1.5. Parte sperimentale (secondo studio)	pag. 64
1.5.1. Obiettivo	pag. 64
1.5.2. Materiali e Metodi	pag. 65-66
1.5.3. Risultati	pag. 67
1.5.3.1. Risultati dati circostanziali	pag. 67-71
1.5.3.2. Risultati dati traumatologici	pag. 72-74
1.5.4. Discussione	pag. 75-77
1.5.5. Conclusioni	pag. 78-79

CAPITOLO 2

2. Introduzione	pag. 83
2.1. Le Nuove Sostanze Psicoattive (NPS)	pag.83-88
2.2. Aspetti analitico-tossicologici in campo forense	pag. 89-91
2.2.1. Principali matrici biologiche	pag. 92-99
2.3. Metodologie analitiche forensi	pag. 100
2.3.1. Cromatografia	pag. 100-107
2.3.1.1. Gascromatografia (GC)	pag. 107-109
2.3.1.2. Cromatografia Liquida (LC)	pag. 110-112
2.3.2. Spettrometria di Massa (MS)	pag. 112-114
2.3.3. Gascromatografia (GC)-Spettrometria di Massa (MS)	pag. 115-116
2.3.4. Cromatografia Liquida (LC)-Spettrometria di Massa (MS)	pag. 116
2.4. Excursus legislativo	pag. 117-126
2.5. Cannabinoidi	pag. 127-131
2.5.1. Endocannabinoidi	pag. 132-134
2.5.2. Fitocannabinoidi	pag. 135-136
2.5.3. Cannabinoidi Sintetici (CS)	pag. 137-142
2.5.3.1. Effetti dei cannabinoidi sintetici	pag. 143-145
2.5.4. Parte sperimentale	pag. 146
2.5.4.1. Obiettivo	pag. 146
2.5.4.2. Materiali e Metodi	pag. 146-150
2.5.4.3. Risultati	pag. 151-154
2.5.4.4. Discussione	pag. 155-157
2.5.4.5. Conclusioni	pag. 157-158
2.6. Oppioidi	pag. 159-161
2.6.1. Effetti farmacologici	pag. 162-163

2.6.2. Effetti avversi	pag. 164
2.6.3. Antagonisti oppioidi	pag. 165
2.6.4. Emergenza oppioidi	pag. 166-169
2.6.5. Anche in Italia esiste un'emergenza da oppioidi?	pag. 170-173
2.6.6. Fentanyl	pag. 174-177
2.6.6.1. Storia del fentanyl	pag. 178-185
2.6.7. Butyrylfentanyl	pag. 186-187
2.6.8. Parte sperimentale	pag. 188
2.6.8.1. Obiettivo	pag. 188
2.6.8.2. Materiali e Metodi	pag. 188-194
2.6.8.3. Risultati e Discussione	pag. 194-197
2.6.8.4. Conclusioni	pag. 198

Capitolo 3

3. Certificazione ISO 9001: un percorso di qualità	pag. 200-202
3.1. La certificazione nel Laboratorio di Tossicologia Forense	pag. 203-206

Capitolo 4

4. Conclusioni finali dell'elaborato di tesi	pag. 208-209
--	--------------

BIBLIOGRAFIA

	pag. 210-228
--	--------------

INDICE DELLE TABELLE

Tabella 1. Descrizione dei principali sintomi correlati ai diversi livelli di concentrazione alcolemica.

Tabella 2. Effetti riscontrati sulle abilità alla guida, in base alle diverse concentrazioni ematiche di alcol.

Tabella 3. Prevalenza di alcol in numero assoluto e relativa percentuale per i vari range.

Tabella 4. Dati circostanziali comparati con altri studi internazionali.

Tabella 5. Confronto dei diversi distretti anatomici coinvolti con altri studi internazionali.

Tabella 6. NPS emerse nel 2023.

Tabella 7. Cannabinoidi sintetici inseriti in tabella I del DPR n. 309/90.

Tabella 8. Cannabinoidi indagati nello studio.

Tabella 9. Riassunto dell'analisi sui 66 campioni di fluido orale.

Tabella 10. Recettori oppioidi.

Tabella 11. Principali effetti avversi a breve e lungo termine.

Tabella 12. Tabella riassuntiva delle specialità medicinali a base di fentanyl in commercio in Italia.

Tabella 13. Tempi di ritenzione (in minuti) e ioni diagnostici in m/z.

Tabella 14. Dati di validazione, LODs, LOQs e linearità.

Tabella 15. Precisione intraday e interday, percentuale di errore sistematico, recupero a 5, 20 e 50 ng/ml per ciascun analita.

INDICE DELLE FIGURE

Figura 1. Paesi coinvolti nel progetto DRUID.

Figura 2. Distribuzione e incidenza di alcol, sostanze illecite e farmacologicamente attive rinvenute in soggetti alla guida di veicoli, nei 13 paesi europei monitorati dal progetto DRUID.

Figura 3. Art. 589-bis CP: inasprimento delle pene in conseguenza della violazione degli artt. 186, 186-bis e 187 del CdS.

Figura 4. Art. 590-bis CP: inasprimento delle pene in conseguenza della violazione degli artt. 186, 186-bis e 187 del CdS.

Figura 5. Art. 186: sanzioni amministrative e/o pene commisurate al tasso alcolemico.

Figura 6. Sanzioni previste dall'art. 186-bis in base al tasso alcolemico riscontrato.

Figura 7. Reazioni di metabolizzazione dell'alcol etilico.

Figura 8. Dati relativi al genere, nazionalità e al momento della giornata e della settimana in cui gli incidenti si sono prevalentemente verificati.

Figura 9. Rappresentazione grafica dell'incidenza dei decessi dal 2009 al 2019.

Figura 10. Percentuale delle varie cause di morte.

Figura 11. Prevalenza di alcol, sostanze d'abuso e farmaci nei 153 guidatori sottoposti ad analisi tossicologiche.

Figura 12. Caratteristiche della positività ad alcol.

Figura 13. Caratteristiche della positività a sostanze illecite.

Figura 14. Caratteristiche della positività a farmaci.

Figura 15. Caratteristiche dei soggetti alla guida di motocicli e ciclomotori.

Figura 16. Distribuzione del numero di sinistri stradali dal 1989 al 2019.

Figura 17. Dati relativi all'uso del casco.

Figura 18. Caratteristiche della positività ad alcol.

Figura 19. Descrizione di fratture, emorragie e lesioni d'organo riscontrate.

Figura 20. Esempio di cromatogramma a due componenti.

Figura 21. Cromatogramma di una miscela a due componenti.

Figura 22. Diagramma a blocchi di un tipico gascromatografo.

Figura 23. Esempio di colonna capillare di silice fusa.

Figura 24. Diagramma a blocchi di un tipico sistema analitico GC-MS.

Figura 25. Principali localizzazioni dei recettori CB1 nel SNC.

Figura 26. Strutture chimiche dei primi due endocannabinoidi individuati.

Figura 27. Strutture chimiche dei due principali fitocannabinoidi.

Figura 28. Ruoli fisiologici del sistema endocannabinoide.

Figura 29. Strutture chimiche dei principali fitocannabinoidi.

Figura 30. Struttura chimica di N-(1-carbamoyl-2-methyl-propyl)-1-[(4fluorophenyl)methyl]indazole-3-carboxamide (AB-FUBINACA)

Figura 31. Classificazione chimica dei cannabinoidi sintetici.

Figura 32. Cannabinoidi posti sotto controllo internazionale dal 2015 alla fine del 2023.

Figura 33. Principali effetti dei CS nel corpo umano.

Figura 34. Extracted ion chromatogram (EIC) dei CS JWH122 e JWH081 presenti in un campione di saliva, rispettivamente alle concentrazioni di 0.36 ng/ml e 0.29 ng/ml.

Figura 35. Classi di sostanze d'abuso utilizzate dai partecipanti allo studio.

Figura 36. Strutture chimiche di morfina, codeina, tebaina e papaverina.

Figura 37. Struttura chimica di naloxone, naltrexone, nalmefene.

Figura 38. Struttura chimica fentanyl.

Figura 39. Struttura chimica del butyryl fentanyl.

Figura 40. (a) Spettro in modalità SIM di fentanyl (14.05 rt) e (b) butyryl fentanyl (14.7 rt) alla concentrazione di 50 ng/ml.

Figura 41. Cromatogrammi di fluidi orali addizionati a 1 ng/ml, rispettivamente di fentanyl (**a**, 14.05 rt) e butyryl fentanyl (**b**, 14.7 rt) in modalità SIM.

Figura 42. LOD di fentanyl e BF nel fluido orale.

Figura 43. Attestato di certificazione ISO 9001 rilasciato al Laboratorio di Tossicologia Forense UniPr (2021-2024).

Figura 44. Attestato di certificazione ISO 9001 rilasciato al Laboratorio di Tossicologia Forense UniPr (2024-2027).

ABSTRACT

Il presente lavoro di dottorato ha visto due principali obiettivi: dapprima, lo studio dell'incidenza delle sostanze d'abuso e dell'alcol in soggetti deceduti in conseguenza di un sinistro stradale e, successivamente, lo studio delle cosiddette Nuove Sostanze Psicoattive (NPS), in particolare dei cannabinoidi sintetici e degli oppioidi sintetici, nella matrice salivare.

Il lavoro di ricerca si è affiancato all'attività laboratoristica ed in particolar modo ha riguardato l'ottenimento e il mantenimento della certificazione ISO 9001.

Capitolo 1

Questa parte di tesi si propone di valutare l'incidenza dell'alcol e delle sostanze stupefacenti nei decessi causati da incidenti stradali. Contestualmente è stata effettuata l'elaborazione di tutti i dati epidemiologici raccolti.

Dapprima si è valutata una casistica decennale (2009-2019) che ha considerato tutti i tipi di mezzi stradali coinvolti in un sinistro con esito fatale.

Successivamente, l'attenzione è stata posta solo sui soggetti deceduti coinvolti in sinistro stradale alla guida di un motociclo o di un ciclomotore.

In quest'ultimo caso il periodo di tempo considerato (1989-2019) è stato ampliato con l'intento di comprendere un numero maggiore di casi che hanno coinvolto solamente queste due tipologie di mezzo stradale.

Capitolo 2

Il secondo capitolo è focalizzato sullo studio di due tra le principali classi di nuove sostanze psicoattive:

i cannabinoidi sintetici e gli oppioidi sintetici, nel fluido orale.

La saliva è una matrice gradualmente divenuta popolare come campione biologico alternativo al sangue per la rilevazione di farmaci e sostanze d'abuso.

Relativamente ai cannabinoidi sintetici, l'obiettivo primario ha riguardato l'applicazione di un metodo analitico precedentemente validato dal laboratorio, su campioni di fluido orale raccolti da soggetti in cura presso il Servizio per le Dipendenze Patologiche (SerDP) di Parma, allo scopo di rilevare un'eventuale positività a questa classe di sostanze.

Si è trattato del primo tentativo di rilevare una classe di NPS in una popolazione di soggetti a rischio nella regione Emilia Romagna e, in generale, uno fra i primi studi in Italia per quanto riguarda il riscontro di NPS in soggetti non deceduti o non ospedalizzati per fenomeni acuti. Il lavoro iniziato con la saliva è poi proseguito con la validazione di un metodo analitico per il rilevamento nel fluido orale di sostanze appartenenti ad un'altra classe di NPS, gli oppioidi sintetici, ed in particolare il fentanyl e il butyrylfentanyl (BF).

Capitolo 3

Il terzo capitolo tratta un tema di primaria importanza per un laboratorio altamente specializzato, come quello di tossicologia forense: la qualità.

Il Laboratorio di Tossicologia Forense è un laboratorio di chimica analitica al quale viene richiesta affidabilità e garanzia della qualità della prestazione erogata.

Il Laboratorio ha iniziato il proprio percorso di qualità nel 2021 ottenendo la prima certificazione ISO 9001. Nei tre anni successivi, è stato coinvolto in 2 verifiche ispettive intermedie, prima dell'ultima avvenuta a luglio 2024 in cui è stato definito il rinnovo della certificazione stessa.

Come dottoranda ho visto nascere questo progetto e ho contribuito a tutte le fasi che si sono susseguite per il mantenimento di questo importante traguardo.

Capitolo 4

Il quarto capitolo è dedicato alle conclusioni finali dell'intero elaborato di tesi.

Viene evidenziato l'importante ruolo che la tossicologia forense riveste nell'analisi delle sostanze d'abuso e di alcol in soggetti che si pongono alla guida di un mezzo su strada.

Inoltre, vengono evidenziate le potenzialità della saliva come matrice biologica alternativa al sangue, in grado di fornire informazioni in merito all'attualità d'uso di una sostanza sia in campo forense che clinico.

ACRONIMI ED ABBREVIAZIONI

NPS	Nuove Sostanze Psicoattive
SerDP	Servizio per le Dipendenze Patologiche
BF	butyrylfentanyl
LC-MS	cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa
GC-MS	gascromatografia accoppiata a spettrometria di massa
Δ9-THC	delta-9-tetraidrocannabinolo
UE	Unione Europea
OMS	Organizzazione Mondiale della Sanità
EMCCDA	European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (Osservatorio Europeo delle Droghe e delle Tossicodipendenze)
DRUID	Driving Under the Influence of Drugs Alcohol and Medicine
CdS	Codice della Strada
DL	Decreto legge
CP	Codice Penale
DM	Decreto Ministeriale
ADH	alcol deidrogenasi
NAD	nicotinammide adenina dinucleotide
ALD	aldeide deidrogenasi
BRAC	Breathing Alcohol Concentration
BAC	Blood Alcohol Concentration
HS-GC/MS	gascromatografia con spazio di testa accoppiata a spettrometria di massa
UNODC	Ufficio delle Nazioni Unite per la Droga e il Crimine
A-PBITMO	(Adamantan-1-yl)(3-pentyl-2-thioxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)methanone

HHCH	3-hexyl-6,6,9-trimethyl-6a,7,8,9,10,10a-hexahydrobenzo[c]chromen-1-ol
THCP	3-heptyl-6a,7,8,10a-tetrahydro-6,6,9-trimethyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-1-ol
NMDMSB	1-naphthyl 4-methyl-3-(dimethylsulfamoyl)-benzoate
CUMYL-3TMS-PRINACA	N-(2-phenylpropan-2-yl)-1-(3-(trimethylsilyl)propyl)-1H-indazole-3-carboxamide
MDMB-BINACA	methyl 2-(1-butyl-1H-indazole-3-carboxamido)-3,3-dimethylbutanoate
H4-CBD	2-(2-isopropyl-5-methylcyclohexyl)-5-pentylbenzene-1,3-diol
ADMB-3TMS-PRINACA	N-(1-amino-3,3-dimethyl-1-oxobutan-2-yl)-1-(3-(trimethylsilyl)propyl)-1H-indazole-3-carboxamide
HHC-P	3-Heptyl-6a,7,8,9,10,10a-hexahydro-6,6,9-trimethyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-1-ol
SAMHSA	Substance Abuse and Mental Health Service Administration
EWDTs	European Workplace Drug Testing Society
EI	Ionizzazione Elettronica
CI	Ionizzazione Chimica
FAB	Ionizzazione per bombardamento con atomi veloci
APCI	Ionizzazione a Pressione Atmosferica
APPI	Fotoionizzazione a Pressione Atmosferica
ESI	Ionizzazione per elettro-nebulizzazione
DESI	Ionizzazione per Desorbimento a Elettro-nebulizzazione
MALDI	Ionizzazione per Desorbimento Laser Assistito da Matrice
EB	Analizzatori a doppia focalizzazione
TOF	Analizzatori di massa a Tempo di Volo
CMAS	Centri Medici di Assistenza Sociale
PAN	Piano di Azione Nazionale
2F-QMPSB	Chinolin-8-il-3-((4,4-difluoropiperidin-1-il) solfonil)-4- metilbenzoato

4F-MDMB-BINACA	Metil-2-(1-(4-fluorobutil)-1H-indazol-3-carbossamide)-3,3-dimetilbutanoato
5F-APP-PICA	N-(1-amino-1-ossi-3-fenilpropan-2-il)-1-(5-fluoropentil)-1H-indol-3-carbossamide
5F-APP-PINACA	N-(2-amino-1-benzil-2-ossi-etil)-1-(5-fluoropentil)indazol-3-carbossamide
5F-3,5-AB-PFUPPICA	N-(1-amino-3-metil-1-ossobutan-2-il)-1-(5-fluoropentil)-3-(4-fluorofenil)-1H-pirazol-5-carbossamide
5F-AKB57	adamantan-1-il-(5-fluoropentil)-1H-indazolo-3-carbossilato
5F-A-P7AICA	N-(adamantan-1-il)-1-(5-fluoropentil)-1H-pirrolo[2,3-b]piridina-3-carbossamide
5F-APINACA	N-(adamantan-1-il)-1-(5-fluoropentil)-1H-indazol-3-carbossamide
5F-CUMIL-P7AICA	1-(5-fluoropentil)-N-(2-fenilpropan-2-il)-7-azaindol-3-carbossamide
5F-MDMB-P7AICA	Metil 2- {[1-(5-fluoropentil)-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-3-il]formamido}-3,3-dimetilbutanoato
5F-PB22	Chinolin-8-il-1-(5-fluoropentil)-1H-indol-3-carbossilato
5F-MDMB-PINACA	Metil-[2-(1-(5-fluoropentil)-1H-indazolo-3-carbossamide)-3,3-dimetilbutanoato
AB-CHIMINACA	N-[(1S)-1-(aminocarbonil)-2-metilpropil]-1-(cicloesilmetil)-1H-indazol-3-carbossamide
AB-FUBINACA	N-(1-amino-3-metil-1-ossibutan-2-il)-1-[(4-fluorofenil)metil]indazol-3-carbossamide
AB-PINACA	N-(1-amino-3-metil-1-ossobutan-2-il)-1-pentil-1H-indazolo-3-carbossamide
ADB-CHMINACA	N-[1-(aminocarbonil)-2,2-dimetilpropil]-1-(cicloesilmetil)-1H-indazol-3-carbossamide
ADB-FUBINACA	N-[(1S)-1-(aminocarbonil)-2-metilpropil]-1-[(4-fluorofenil)metil]-1H-indazol-3-carbossamide
AM-694	1-[(5-fluoropentil)-1H-indol-3-il]-(2-iodofenil)metanone
AMB-FUBINACA	Metil-2-(1-(4-fluorobenzil)-1H-indazolo-3-carbossamide)-3-metilbutanoato
APP-FUBINACA	N-(1-amino-3-fenil-1-ossipropan-2-il)-1-[(4-fluorofenil)metil]-1H-indazol-3-carbossamide

BB-22	1-(cicloesilmetil)-1H-indolo-3-acido carbossilico-8- chinolinil estere
CP47,497	(2-[(1R,3S)-3-idrossicicloesil]-5-(2-metilottan-2-il)fenolo
CP47,497-omologo C8	(2-[(1R,3S)-3-idrossicicloesil]-5-(2-metilnonan-2-il)fenolo
CUMIL-ACN-B7AICA	1-(4-cianobutil)-N-(2-fenilpropan-2-il)-1H-pirrolo[2,3- b]piridin-3- carbossamide
CUMIL-4CN-BINACA	1-(4-cianobutil)-N-(1-metil-1-fenil-etil)indazolo-3- carbossamide
CUMIL-5F-PINACA	1-(5-Fluoropentil)-N-(1-metil-1-feniletiletil)-1H-indazol-3- carbossamide
CUMIL-PeGACLONE	2-(1-metil-1-fenil-etiletil)-5-pentilpirido[4,3-b]indol-1-one
DMHP	3-(1,2-dimetileptil)-7,8,9,10-tetraidro-6,6,9-trimetil-6H- dibenzo[b,d]piran- 1-olo
FUB-NPB-22	Chinolina-8-il-(4-fluorobenzil)-1H-indazolo-3-carbossilato
JWH-018	(naftalen-1-il) (1-pentil-1H-indol-3-il) metanone
JWH-073	(naftalen-1-il) (1-butil-1H-indol-3-il) metanone
JWH-122	1-pentil-3-(4-metil-1-naftoil)indolo
JWH250	1-pentil-3-(2-metossifenilacetil)indolo
MAM-2201	1-(5-fluoropentil)-3-(4-metilnaftoil)indolo
MDMB-CHMICA	Metil-3,3-dimetil-2- {(1-(cicloesilmetil)-1H-indol-3-il) carbonil] amino} butanoato
MDMB-PCZCA	Metil 3,3-dimetil -2-(9-pentil-9Hcarbazol-3- carbossamide)butanoato
MO-CHMINACA	1-metossi-3,3-dimetil-1-ossobutan-2-il 1-(cicloesilmetil)- 1H-indazolo-3- carbossilato
PARAESIL	3-esil-7,8,9,10-tetraidro-6,6,9-trimetil-6H- dibenzo[b,d]piran-1-olo
UR-144	[(1-pentilidol-3-il)-(2,2,3,3-tetrametilciclopropil) metanone]
W-18	[(1-pentilidol-3-il)-(2,2,3,3-tetrametilciclopropil) metanone]
XLR-11	(1-(5-fluoropentil)-1H-indol-3-il)(2,2,3,3- tetrametilciclopropil) metanone
AEA	anandamide
2-AG	2-arachidinoil-glicerolo

SNC	Sistema Nervoso Centrale
NADA	N-arachidonoildopamina
CBD	cannabidiolo
THCV	tetraidrocannabivarina
CBN	cannabidiolo
2-AGE	2-arachidonoilgliceride
CS	cannabinoidi sintetici
SCRA	cannabinoidi sintetici agonisti
PKA	protein chinasi A
cAMP	adenosina monofosfato ciclico
LOQ	limite di quantificazione
LOD	limite di rilevabilità o detenzione
CDC	Centers for Disease Control and prevention
EUDA	Osservatorio Europeo delle Droghe e delle Tossicodipendenze
GTFI	Gruppo Tossicologi Forensi Italiani
DPA	Dipartimento per le Politiche Antidroga
NEWS-D	Sistema Nazionale di Allerta Rapida per le Droghe
AF	analoghi del fentanyl
NPF	fentanili non farmaceutici
NSO	nuovi oppioidi sintetici
RT	tempo di ritenzione
SN	signal to noise
SIM	Selective Ion Monitoring

Premessa

Il presente lavoro di tesi nasce dagli studi e dall'esperienza maturati durante il corso di dottorato in Medicina Molecolare.

Il mio lavoro di dottorato si è inserito nel solco della collaborazione tra il Laboratorio di Tossicologia Forense e l'Istituto di Medicina Legale, ed ha visto due principali obiettivi: dapprima, lo studio dell'incidenza delle sostanze d'abuso e dell'alcol in soggetti deceduti in conseguenza di un sinistro stradale e, successivamente, lo studio delle cosiddette nuove sostanze psicoattive (NPS), in particolare dei cannabinoidi sintetici e degli oppioidi sintetici, nella matrice salivare.

L'importanza di studiare il fenomeno della guida sotto l'effetto di alcol e sostanze stupefacenti in incidenti stradali, anche fatali (**capito 1**), per un tossicologo forense è reso necessario dall'importanza che tale fenomeno presenta.

Infatti, l'uso di alcol e sostanze stupefacenti esercita un impatto negativo sulla capacità di guida di veicoli da parte dei soggetti che ne fanno uso.

Sulla base dei lavori citati e già condotti a livello nazionale ed internazionale, e in virtù del fatto che non vi era ancora alcun studio circa l'analisi della problematica nel territorio occidentale dell'Emilia Romagna, nasce l'idea di questa prima parte di tesi.

Il progetto si propone di valutare l'incidenza dell'alcol e delle sostanze stupefacenti nei decessi causati da incidenti stradali, dapprima con il coinvolgimento di tutti i tipi di mezzi stradali e, successivamente, prendendo in considerazione solo incidenti che hanno coinvolto cicli e motocicli. Questo lavoro, quindi, si pone l'obiettivo primario di quantificare ed esaminare il problema relativo all'uso di alcol e sostanze illecite in soggetti vittime di sinistri stradali e, allo stesso tempo, ha l'intento di prendere in esame la tipologia e la prevalenza

delle sostanze riscontrate. La valutazione tossicologica è stata accompagnata, per entrambi gli studi, dall'analisi dei dati circostanziali.

Per fronteggiare il grave problema dell'uso di alcol e sostanze illecite alla guida, soprattutto da parte di giovanissimi, sono state messe in atto diverse campagne da parte di organi istituzionali sia nazionali che internazionali, forze dell'ordine, enti regionali e scuole.

La valutazione finale che verrà dedotta dallo studio, potrà consentire di comprendere in maniera più dettagliata la rilevanza della problematica e dare, così, un contributo proprio a quegli enti che quotidianamente sono in prima linea per fronteggiarne la pericolosità, attraverso l'eventuale introduzione di nuove iniziative locali in ambito di politica sulla sicurezza stradale.

La seconda parte del mio lavoro di tesi si è focalizzata sullo studio di due tra le principali classi di NPS: i cannabinoidi sintetici e gli oppioidi sintetici, nel fluido orale (**capitolo 2**).

Relativamente ai cannabinoidi sintetici, l'obiettivo primario ha riguardato l'applicazione di un metodo analitico precedentemente validato dal laboratorio, su campioni di fluido orale raccolti da soggetti in cura presso il Servizio per le Dipendenze Patologiche (SerDP) di Parma, allo scopo di rilevare un'eventuale positività a questa classe di sostanze psicoattive.

L'intento principale era quello di utilizzare una matrice alternativa, quale la saliva.

L'utilizzo del fluido orale ha consentito un tipo di prelievo non invasivo e certamente maggiormente apprezzabile da parte dei soggetti coinvolti nello studio.

Si è trattato del primo tentativo di rilevare una classe di NPS in una popolazione di soggetti da attenzionare nella regione Emilia Romagna e, in generale, uno fra i primi studi in Italia per quanto riguarda il riscontro di NPS in soggetti non deceduti o non ospedalizzati per fenomeni acuti.

Il lavoro iniziato con la saliva è poi proseguito con la validazione di un metodo analitico per il rilevamento di sostanze appartenenti ad un'altra classe di NPS, gli oppioidi sintetici, ed in particolare di fentanyl e butyrylfentanyl (BF).

In virtù dell'emergenza sviluppatasi negli USA, negli ultimi due decenni i tossicologi forensi hanno posto particolare attenzione nei confronti degli oppioidi, sviluppando una serie di metodi analitici per rilevarli, con l'intento di contrastarne la diffusione.

Tecniche analitiche come la cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (LC-MS)^{1,2} e la gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS)^{3,4} vengono comunemente utilizzate in campo tossicologico per il rilevamento di oppioidi sintetici^{5,6,7,8,9,10}.

Lo sviluppo di questo metodo analitico ha visto l'utilizzo della GC-MS.

¹ Moody M.T., Diaz S., Shah P., Papsun D., Logan B.K. 2018. Analysis of fentanyl analogs and novel synthetic opioids in blood, serum/plasma, and urine in forensic casework. *Drug Test Anal*; 10:1358-1367.

² Arantes A.C.F., da Cunha K.F., Cardoso M.S. 2021. Development and validation of quantitative analytical method for 50 drugs of antidepressants, benzodiazepines and opioids in oral fluid samples by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Forensic Toxicol*; 39: 179–197.

³ Montanari S., Davani L., Terenzi C., Maltoni M., Andrisano V., De Simone A., Ricci M. 2022. Fentanyl pharmacokinetics in blood of cancer patients by Gas Chromatography - Mass Spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*; 20: 219:114913.

⁴ Strano-Rossi S., Alvarez M.J., Taberero M.J., Cabarcos P., Fernández P., Bermejo A.M. 2010. Determination of fentanyl, metabolite and analogs in urine by GC/MS. *J Appl Toxicol*; 31: 649-54.

⁵ Armenian P., Vo K.T., Barr-Walker J., Lynch K.L. 2018. Fentanyl, fentanyl analogs and novel synthetic opioids: A comprehensive review. *Neuropharmacology*; 15: 121-132.

⁶ Finkelstein M.J., Chronister C.W., Stanley C., Ogilvie L.M., Goldberger B.A. 2019. Analysis of Acetyl Fentanyl in Postmortem Specimens by Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS): Method Validation and Case Report. *J Anal Toxicol*; 43: 392-398.

⁷ Sisco E., Burns A., Moorthy A.S. 2021. Development and evaluation of a synthetic opioid targeted gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) method. *J Forensic Sci*; 66: 2369-2380.

⁸ Wei Q., Su F.H. 2022. Determination of Nine Fentanyl Drugs in Hair Samples by GC-MS/MS and LC-MS/MS. *ACS Omega*; 31: 19176-19182.

⁹ Mahlke N.S., Ziesenitz V., Mikus G., Skopp G. 2014. Quantitative low-volume assay for simultaneous determination of fentanyl, norfentanyl, and minor metabolites in human plasma and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Int. J. Leg. Med*; 128: 771–778.

¹⁰ Fogarty M.F., Papsun D.M., Logan B.K. 2018. Analysis of fentanyl and 18 novel fentanyl analogs and metabolites by LC-MS-MS, and report of fatalities associated with methoxyacetylfentanyl and cyclopropylfentanyl. *J. Anal. Toxicol*; 42: 592–604.

La GC-MS costituisce una tecnica comunemente utilizzata nei laboratori di tossicologia forense per la rilevazione e la quantificazione di questo tipo di sostanze e di altri composti di interesse tossicologico, in diverse tipologie di matrici.

Il campo delle sostanze d'abuso è in continua evoluzione e l'interesse nell'utilizzo del fluido orale per scopi forensi e tossicologici è cresciuto in modo significativo negli ultimi anni in conseguenza di diversi vantaggi apportati da questa matrice^{11,12,13}. Il fluido orale quindi è gradualmente diventato popolare come campione biologico alternativo al sangue per la rilevazione di farmaci e sostanze d'abuso, anche per quanto riguarda oppioidi e cannabinoidi sintetici^{14,15,16}.

Per quanto riguarda l'analisi di fentanyl e BF, in letteratura sono riportati diversi esempi di metodi analitici che utilizzano la GC-MS. Tuttavia, la maggior parte di questi metodi riguarda l'analisi di campioni di urina e di sangue. Nel 2013 Strano Rossi et al. hanno riportato un metodo analitico per la quantificazione del fentanyl e dei suoi metaboliti nelle urine¹⁷. Nel 2019 Misailidi e collaboratori hanno riportato la validazione del metodo degli oppioidi sintetici, incluso il BF, nel sangue¹⁸. In letteratura, ad oggi, è riportato un solo caso di

¹¹ Palmquist K.B., Swortwood M.J. 2021. Quantification of fentanyl analogs in oral fluid using LC-QTOF-MS. *J Forensic Sci*; 66: 1871-1878.

¹² de Campos E.G., da Costa B.R.B., Dos Santos F.S., Monedeiro F., Alves M.N.R., Santos Junior W.J.R., De Martinis B.S. 2022. Alternative matrices in forensic toxicology: a critical review. *Forensic Toxicol*; 40: 1-18.

¹³ Vindenes V., Yttredal B., Oiestad E.L., Waal H., Bernard J.P., Mørland J.G., Christophersen A.S. 2011. Oral fluid is a viable alternative for monitoring drug abuse: detection of drugs in oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and comparison to the results from urine samples from patients treated with Methadone or Buprenorphine. *J Anal Toxicol*; 35: 32-9.

¹⁴ Bista S.R., Haywood A., Norris R., Good P., Tapuni A., Lobb M., Hardy J. 2015. Saliva versus Plasma for Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Studies of Fentanyl in Patients with Cancer. *Clin Ther*; 37: 2468-75.

¹⁵ Anzillotti L., Marezza F., Calò L., Andreoli R., Agazzi S., Bianchi F., Careri M., Cecchi R. 2019. Determination of synthetic and natural cannabinoids in oral fluid by solid-phase microextraction coupled to gas chromatography/mass spectrometry: A pilot study. *Talanta*; 20: 335-341.

¹⁶ Bianchi F., Agazzi S., Riboni N., Erdal N., Hakkarainen M., Ilag L.L., Anzillotti L., Andreoli R., Marezza F., Moroni F., Cecchi R., Careri M. 2019. Novel sample-substrates for the determination of new psychoactive substances in oral fluid by desorption electrospray ionization-high resolution mass spectrometry. *Talanta*; 202:136-144.

¹⁷ Strano-Rossi S., Alvarez M.J., Tabernero M.J., Cabarcos P., Fernández P., Bermejo A.M. 2010. Determination of fentanyl, metabolite and analogs in urine by GC/MS. *J Appl Toxicol*; 31: 649-54.

¹⁸ Misailidi N., Athanaselis S., Nikolaou P., Katselou M., Dotsikas Y., Spiliopoulou C., Papoutsis I. 2019. A GC-MS method for the determination of furanylfentanyl and ofentanil in whole blood with full validation. *Forensic Toxicol*; 37:238-244.

rilevamento nel fluido orale utilizzando la GC-MS come strumento analitico¹⁹. Sebbene i miglioramenti siano legati alla quantificazione di questi analiti a basse concentrazioni nel sangue e nelle urine mediante la tecnica GC-MS, la saliva rimane una matrice piuttosto inesplorata. Inoltre, il BF è attualmente meno investigato rispetto ad altri oppioidi sintetici e non vi sono casi descritti in letteratura in cui sia stato rilevato utilizzando la GC-MS nel fluido orale.

Ciò ha portato all'obiettivo di sviluppare un metodo analitico per il rilevamento e la quantificazione di fentanyl e BF nel fluido orale utilizzando una tecnica ifenata, quale la GC-MS.

Il mio lavoro di ricerca si è affiancato all'attività laboratoristica ed in particolar modo ha riguardato l'ottenimento e il mantenimento di un certo standard di qualità mediante la certificazione ISO 9001 (**capitolo 3**).

¹⁹ Ares-Fuentes A.M., Lorenzo R.A., Fernández P., Fernández A.M., Furton K.G., Kabir A., Carro A.M. 2022. Determination of synthetic opioids in oral fluid samples using fabric phase sorptive extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*; 25: 1663:462768.

Capitolo 1

1. Introduzione

In Europa l'alcol rappresenta un importante problema di salute pubblica, classificato come il terzo fattore di rischio di malattia e morte prematura²⁰; il suo consumo, infatti, è associato a numerose malattie e sinistri stradali²¹.

Anche l'uso di sostanze stupefacenti si delinea come una significativa problematica per la sicurezza sociale e stradale. La guida sotto l'effetto di tali sostanze, infatti, comporta un notevole aumento del tasso di incidenti stradali che possono comportare gravi danni o, addirittura, risultare fatali per il conducente e per gli altri soggetti coinvolti nel sinistro^{22,23}.

Assumere e porsi alla guida sotto l'effetto di sostanze come oppiacei, amfetamine, cocaina, cannabinoidi, metadone e buprenorfina, può compromettere le funzioni cerebrali necessarie per condurre un veicolo^{24,25}. A tal proposito, sono diversi gli studi in cui è stato dimostrato che il rinvenimento, nel sangue, della cocaina e del principale componente psicoattivo della cannabis, il delta-9-tetraidrocannabinolo (Δ^9 -THC), sono associati ad una notevole diminuzione della capacità di guida, che determina inevitabilmente un aumento della possibilità di incorrere in incidenti^{22,25,26,27,28}.

²⁰ World Health Organization. 2014. WHO Global status report on alcohol and health.

²¹ Forouzanfar M.H., Alexander L., Anderson H.R., Bachman V.F., Biryukov S., Brauer S. 2013. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 386:2287-323.

²² Ramaekers J.G., Moeller M.R., Van Ruitenbeek P. 2006. Cognition and motor control as a function of Δ^9 -THC concentration in serum and oral fluid: limits of impairment. *Drug Alcohol Depend.* 85:114-122.

²³ Busardò F.P., Pichini S., Pacifici R. 2017. Driving under the influence of drugs: looking for reasonable blood cut-offs and realistic analytical values. *Clin. Chem.* 63:781-83.

²⁴ Ronen A., Gershon P., Drobiner H. 2008. Effects of THC on driving performance, physiological state and subjective feelings relative to alcohol. *Accid. Anal. Prev.* 40:926-934.

²⁵ Elvik R. 2013. Risk of road accident associated with the use of drugs: a systematic review and meta-analysis of evidence from epidemiological studies. *Accid. Anal. Prev.* 60:254-267.

²⁶ Bondallaz P., Favrat B., Chtioui H., Fornari E., Maeder P., Giroud C. 2016. Cannabis and its effects on driving skills. *Forensic Sci.* 268:92-102.

²⁷ Busardò F.P., Pellegrini M., Klein J., di Luca N.M. 2017. Neurocognitive correlates in driving under the influence of cannabis. *CNS. Neurol. Disord. Drug Targets.* 16:534-40.

²⁸ Lamers C.T.J., Ramaekers J.G. 2001. Visual search and urban city driving under the influence of marijuana and alcohol. *Hum. Psychopharmacol.* 16:393-401.

In Italia, la guida sotto l'effetto di alcol e sostanze stupefacenti è regolamentata, rispettivamente, dagli articoli 186 e 187 del Codice Stradale che ne stabiliscono condizioni e sanzioni²⁹. Un importante emendamento riguarda l'introduzione dell'art. 186 bis che disciplina la guida sotto l'influenza dell'alcol per conducenti di età inferiore a 21 anni, per i neopatentati e per chi esercita professionalmente l'attività di trasporto di persone o cose. Si tratta di categorie fortemente a rischio, per le quali la legge pone regole maggiormente rigide. Per tutti costoro, infatti, il divieto di guidare sotto l'influenza dell'alcol è assoluto.

Negli ultimi anni è stato introdotto un inasprimento delle pene; in data 23 marzo 2016, infatti, è stata promulgata la legge n. 41 che ha introdotto nel nostro ordinamento due nuove fattispecie di reato: quella relativa all'omicidio stradale e quella relativa alle lesioni stradali personali gravi e gravissime^{30,31}. L'introduzione di questa legge è conseguente ad un crescente numero di vittime causate da condotte di guida imprudenti o negligenti, anche in relazione all'uso di alcol o sostanze stupefacenti.

Infatti ogni anno migliaia di persone perdono la vita o riportano ferite gravi a seguito di incidenti avvenuti sulle strade dell'Unione Europea (UE)³², causati, in parte, dall'uso/abuso di alcol, sostanze stupefacenti o dal loro uso concomitante.

Secondo il rapporto *'Drug use and road safety: a policy brief'*, redatto dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), sulla sicurezza stradale, nel 2016 il 3.16% e il 15.03% dei decessi in seguito ad incidente stradale furono correlati, rispettivamente, al consumo di sostanze stupefacenti e a quello di alcol³³.

²⁹ Marinelli E., Pichini S., Zaami S., Giorgetti R., Busardò F.P., Pacifici R. 2016. Vehicular homicide, a new italian offence: law provisions and comparison with some other European countries. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 20:3145-51.

³⁰ Law 41 of march 23, 2016. <http://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2016/03/24/16G00048/sg>.

³¹ Montanari Vergallo G., Marinelli E., di Luca N.M., Masotti V., Cecchi R., Zaami S. 2017. Italian law on the vehicular homicide: medical legal issues and comparative analysis. *Clin. Ther.* 168:214-19.

³² Parlamento Europeo. 2019. Le statistiche sugli incidenti stradali mortali nell'UE. Infografica.

³³ World Health Organization (WHO). 2016. Drug use and road safety: a policy brief.

Per quanto riguarda la situazione italiana degli ultimi anni, nel corso del 2022 sono stati rilevati 56.284 sinistri con lesioni (dati forniti da Carabinieri e Polizia Stradale, che rilevano circa 1/3 dei sinistri totali). Tra questi, 4.979 sono quelli in cui almeno per uno dei conducenti dei veicoli coinvolti è stata riscontrata la guida sotto l'effetto di alcol e 1.676 per i quali è stato rilevato l'uso di sostanze stupefacenti. L'8.8% e il 3.0% degli incidenti rilevati da Carabinieri e Polizia Stradale nel complesso, è correlato quindi ad alcol e droga. Si tratta di proporzioni leggermente in diminuzione rispetto al 2021 (9.7% e 3.2% rispettivamente per lo stato di ebbrezza e sotto l'effetto di droga). Per quanto riguarda i due anni precedenti, le percentuali erano pari a 8.7% e 3.4% nel 2019 e a 9.2% e 3.5% nel 2020³⁴.

³⁴ Ministero della Salute. 2024. Dati incidenti stradali alcol correlati.

Numerosi studi condotti a livello internazionale su soggetti deceduti^{35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45} o che hanno subito gravi danni^{46,47,48,49,50,51,52,53,54} a causa di sinistri stradali, hanno evidenziato come l'uso di alcol, sostanze stupefacenti e alcune categorie di farmaci possano ridurre

³⁵ Legrand S.A., Gjerde H., Isalberti C., Van der Linden T., Lillsunde P., Dias M.J., Gustafsson S., Ceder G., Verstraete A.G. 2014. Prevalence of alcohol, illicit drugs and psychoactive medicines in killed drivers in four European countries. *Int. J. Inj. Control Safe Promot.* 21:17–28.

³⁶ Costa N., Silva R., Mendonca M.C., Real F.C., Vieira D.N., Teixeira H.M. 2012. Prevalence of ethanol and illicit drugs in road traffic accidents in the centre of Portugal: an eighteen-year update. *Forensic Sci. Int.* 216:37–43.

³⁷ Morland J., Steentoft A., Simonsen K.W., Ojanperä I., Vuori E., Magnusdottir K., Kristinsson J., Ceder G., Kronstrand R., Christophersen A. 2011. Drugs related to motor vehicle crashes in northern European countries: a study of fatally injured drivers. *Accid. Anal. Prev.* 43:1920–1926.

³⁸ Canadian Centre on Substance Abuse. 2011. A Comparison of Drug- and Alcohol-Involved Motor Vehicle Driver Fatalities, Canadian Centre on Substance Abuse.

³⁹ Gjerde H., Christophersen A.S., Normann P.T., Morland J. 2011. Toxicological investigations of drivers killed in road traffic accidents in Norway during 2006–2008. *Forensic Sci. Int.* 212:102–109.

⁴⁰ Ahlm K., Bjornstig U., Ostrom M. 2009. Alcohol and drugs in fatally and non-fatally injured motor vehicle drivers in northern Sweden. *Accid. Anal. Prev.* 41:129–136.

⁴¹ Jones A.W., Kugelberg F.C., Holmgren A., Ahlner J. 2009. Five-year update on the occurrence of alcohol and other drugs in blood samples from drivers killed in road-traffic crashes in Sweden. *Forensic Sci. Int.* 186:56–62.

⁴² Elliott S., Woolacott H., Braithwaite R. 2009. The prevalence of drugs and alcohol found in road traffic fatalities: a comparative study of victims. *Sci. Justice.* 49:19–23.

⁴³ Biecheler M.B., Peytavin J.F., Facy F., Martineau H. 2008. SAM survey on drugs and fatal accidents: search of substances consumed and comparison between drivers involved under the influence of alcohol or cannabis. *Traffic Inj. Prev.* 9:11–21.

⁴⁴ Brady J.E., Li G. 2013. Prevalence of alcohol and other drugs in fatally injured drivers. *Addiction.* 108:104–114.

⁴⁵ De Boni R., Bozzetti M.C., Hilgert J., Sousa T., Von Diemen L., Benzano D., Menegon G., Holmer B., Do Carmo Arruda Vieira Duarte P., Pechansky F. 2011. Factors associated with alcohol and drug use among traffic crash victims in southern Brazil. *Accid. Anal. Prev.* 43:1408–1413.

⁴⁶ Legrand S.A., Isalberti C., Vander Linden T., Bernhoft I.G., Hels T., Simonsen K.W., Favretto D., Ferrara S.D., Caplinskiene M., Minkuviene Z., Pauliukevicius A., Houwing S., Mathijssen R., Lillsunde P., Langel K., Blencoweh T., Verstraete A.G. 2013. Alcohol and drugs in seriously injured drivers in six European countries. *Drug Test. Anal.* 5:156–165.

⁴⁷ Drummer O.H., Kourtis I., Beyer J., Tayler P., Boorman M., Gerostamoulos D. 2012. The prevalence of drugs in injured drivers. *Forensic Sci. Int.* 215:14–17.

⁴⁸ Breitenbach T.C., Pechansky F., Benzano D., De Boni R. 2012. High rates of injured motorcycle drivers in emergency rooms and the association with substance use in Porto Alegre, Brazil. *Emerg. Med. J.* 29:205–207.

⁴⁹ Bogstrand S.T., Normann P.T., Rossow I., Larsen M., Morland J., Ekeberg O. 2011. Prevalence of alcohol and other substances of abuse among injured patients in a Norwegian emergency department. *Drug Alcohol Depend.* 117:132–138.

⁵⁰ Wong O.F., Tsui K.L., Lam T.S., Sze N.N., Wong S.C., Lau F.L., Liu S.H. 2010. Prevalence of drugged drivers among non-fatal driver casualties presenting to a trauma centre in Hong Kong. *Med. J.* 16:246–251.

⁵¹ Santamarina-Rubio E., Perez K., Ricart I., Rodríguez-Sanz M., Rodríguez-Martos A., Brugal M.T., Borrell C., Ariza C., Díez E., Beneyto V.M., Nebot M., Ramos P., Suelves J.M. 2009. Substance use among road traffic casualties admitted to emergency departments. *Inj. Prev.* 15:87–94.

⁵² Papadodima S.A., Athanaselis S.A., Stefanidou M.E., Dona A.A., Papoutsis I., Maravelias C.P., Spiliopoulou C.A. 2008. Driving under the influence in Greece: a 7-year survey (1998–2004). *Forensic Sci. Int.* 174:157–160.

⁵³ Smink B.E., Movig K.L., Lusthof K.J., De Gier J.J., Uges D.R.A., Egberts A.C.G. 2008. The relation between the use of psychoactive substances and the severity of the injury in a group of crash-involved drivers admitted to a regional trauma center. *Traffic Inj. Prev.* 9:105–108.

⁵⁴ Ch'ng C.W., Fitzgerald M., Gerostamoulos J., Cameron P., Bui D., Drummer O.H., Potter J., Odell M. 2007. Drug use in motor vehicle drivers presenting to an Australian, adult major trauma centre. *Emerg. Med. Australas.* 19:359–365.

significativamente l'attenzione necessaria per porsi alla guida di un mezzo ed essere causa di sinistri stradali.

Con l'intento di valutare in maniera più approfondita e dettagliata questo fenomeno, differenti studi epidemiologici sono stati condotti anche a livello del territorio nazionale italiano e a livello europeo.

In Europa, un importante progetto svolto è lo studio (*'Driving under the influence of Drugs, Alcohol and Medicines'*(DRUID), condotto a livello europeo da EMCDDA (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction)⁵⁵. Si tratta di un progetto istituito dalla commissione generale dell'energia e dei trasporti della commissione europea, nell'ambito del quale sono stati eseguiti studi sperimentali e studi epidemiologici. L'indagine è stata effettuata in 13 paesi europei (**figura 1**).

⁵⁵ Ravera S., Monteiro S.P., De Gier J.J., van der Linden T., Gomez-Talegon T., Alvarez F.J. 2012. A European approach to categorizing medicines for fitness to drive: outcomes of the DRUID project. *J. Clin. Pharmacol.* 74:920–931.

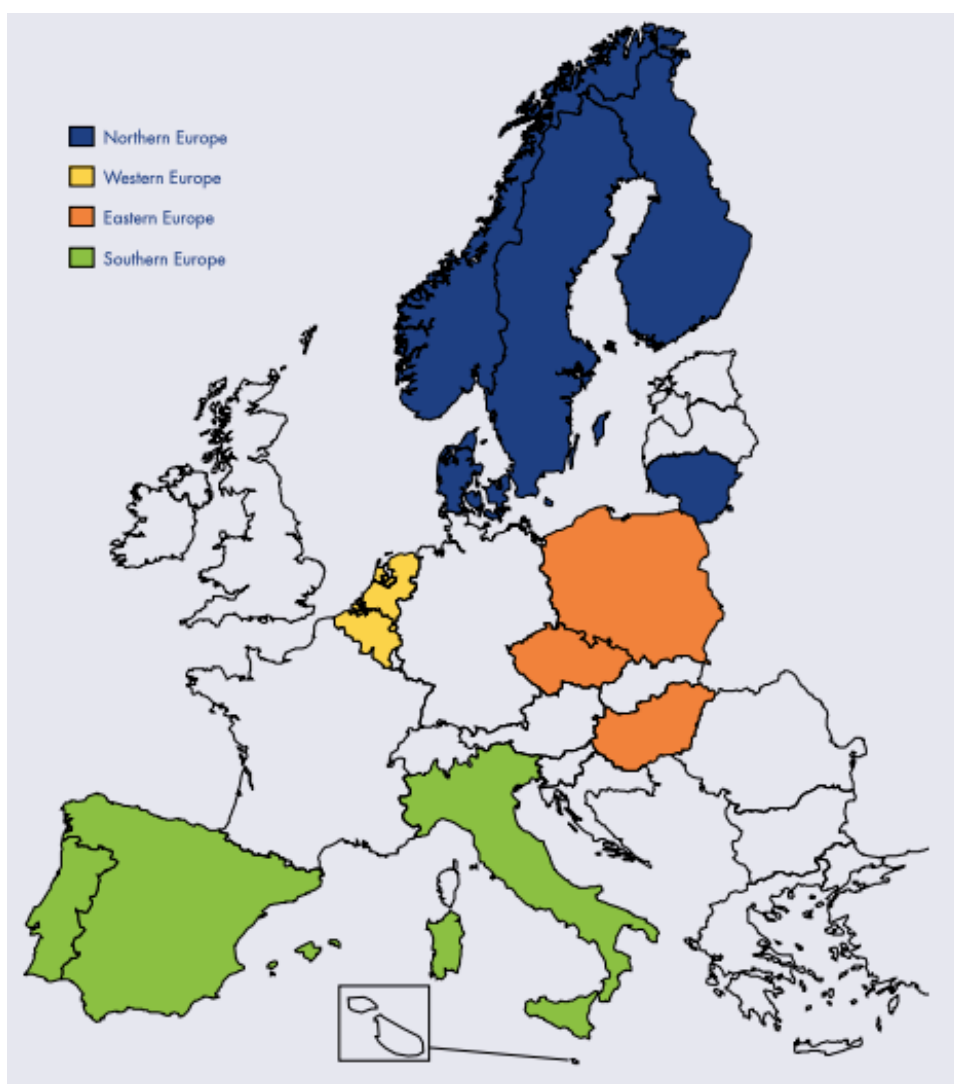


Figura 1. Paesi coinvolti nel progetto DRUID⁵⁵.

Dagli oltre 50.000 campioni di sangue e fluidi orali prelevati da soggetti coinvolti in sinistri stradali, è stata rilevata la presenza di alcol nel 3.5% dei casi, sostanze illecite nell'1.9%, sostanze farmacologicamente attive nell'1.36% ed una combinazione di farmaci con sostanze illecite nello 0.4%⁵⁵ (figura 2).

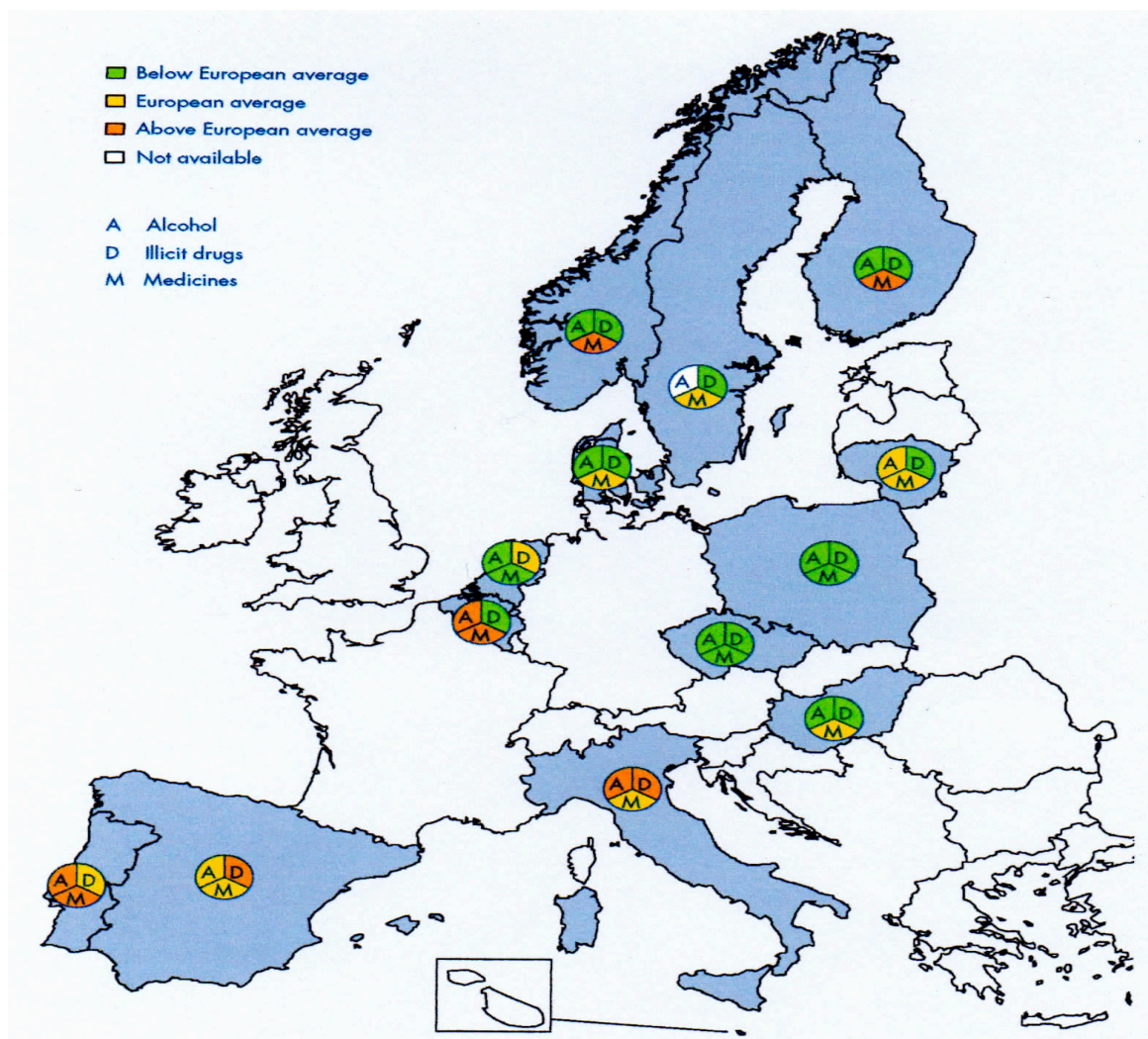


Figura 2. Distribuzione e incidenza di alcol, sostanze illecite e farmacologicamente attive rinvenute in soggetti alla guida di veicoli, nei 13 paesi europei monitorati dal progetto DRUID⁵⁵.

Fra le sostanze illecite, quella maggiormente rilevata è stata la cannabis, seguita da cocaina e amfetamine. Mentre, tra i farmaci, la categoria più riscontrata è quella delle benzodiazepine, seguita dagli oppiacei⁵⁵. Attraverso questo progetto è stato possibile scrivere e diffondere linee guida con l'intento di apportare vantaggi alla politica della sicurezza stradale.

In Italia, studi che correlano il possibile coinvolgimento di alcol e sostanze stupefacenti ad incidenti stradali mortali o che hanno cagionato gravi danni a persone, sono stati condotti in diverse regioni. Presso l'unità di Tossicologia Forense dell'università campana "L. Vanvitelli" è stato condotto uno studio volto a valutare le tendenze del consumo di alcol,

sostanze illecite e sostanze farmacologicamente attive in conducenti coinvolti in incidenti stradali a partire dal 2009 al 2016, nella regione Campania. In tale studio, pubblicato nel 2018, sono stati valutati 1797 soggetti coinvolti in sinistri stradali. Tali individui sono risultati positivi ai test di screening e i loro campioni biologici (urina e sangue) sono giunti al Laboratorio di Tossicologia Forense per le analisi di conferma. La concentrazione di alcol > di 0.5 g/L è stata confermata nel 91.5% dei conducenti sospettati di essersi messi alla guida sotto l'effetto di alcol⁵⁶. Inoltre, è stata dimostrata una maggior incidenza di incidenti stradali che hanno coinvolto conducenti che presentavano una concentrazione di alcol > a 1.5 g/L. Nell'ambito dello stesso studio, è stato constatato che l'assunzione concomitante di alcol e farmaci è costantemente aumentata nel periodo valutato ed è stata rilevata la presenza concomitante, nel sangue, di diversi tipi di droghe (20.0%), cannabis e cocaina da sole (18.0%), seguiti da benzodiazepine (6.0%) e metadone (3.5%)⁵⁶.

Nel 2019 è stato pubblicato uno studio condotto dall'Istituto di Medicina legale di Bologna, nel quale sono stati presi in considerazione 1026 conducenti coinvolti in incidenti stradali a partire da gennaio 2018 fino a fine marzo 2019. In tale studio è stata valutata la presenza di psicofarmaci, alcol, farmaci appartenenti alla categoria degli oppioidi e sostanze stupefacenti illecite⁵⁷. Tale studio ha rivelato una maggior prevalenza di alcol (17.3%), seguito da farmaci (13.6%) e sostanze illecite (5.5%).

Mentre, nell'ambito di un ulteriore studio condotto nel nord Italia, a Padova, sono stati analizzati 4.443 campioni di sangue. Il 23.7% di questi campioni è risultato positivo all'alcol, il 19.9% a psicofarmaci e nel 4.5% è stata rilevata la presenza concomitante di diversi tipi di

⁵⁶ Carfora A., Campobasso C.P., Cassandro P., Petrella R., Borriello R. 2018. Alcohol and drugs use among drivers injured in road accidents in Campania (Italy): a 8- years retrospective analysis. *Forensic Sci. Int.* 288:291–296. 3

⁵⁷ Pelletti G., Verstraete A.G., Reyns T., Barone R., Rossi F., Garagnani M., Pelotti S. 2019. Prevalence of therapeutic drugs in blood of drivers involved in traffic crashes in the area of Bologna, Italy. *Forensic Sci. Int.* 302: 109914.

droghe e, infine, un uso concomitante di alcol e droghe è risultato presente nel 6% dei campioni⁵⁸.

Il vantaggio di questi studi, condotti in diverse aree del territorio nazionale, è quello di consentire di comprendere al meglio come il fenomeno dell'uso di alcol e sostanze stupefacenti, utilizzati da soggetti che si pongono alla guida di veicoli, sia diffuso in maniera simile oppure presenti caratteristiche differenti all'interno della stessa nazione.

Attualmente, al pericolo legato alla diffusione delle classiche sostanze d'abuso^{59,60}, tra i soggetti che si pongono alla guida di un mezzo su strada, si affianca quello rappresentato dall'emergere delle cosiddette NPS. Si tratta di sostanze che non sono esplicitamente controllate dall'attuale legislazione, in grado di stimolare o deprimere il sistema nervoso centrale, con conseguenti possibili fenomeni di allucinazioni, dipendenza o cambiamenti radicali nelle funzioni motorie di pensiero o di attenzione, necessarie nelle funzioni quotidiane come la guida di un mezzo^{61,62,63,64,65,66,67}. Le informazioni ottenute da questi studi hanno messo in evidenza la grave pericolosità del loro uso e al contempo una scarsa conoscenza, da

⁵⁸ Favretto D., Visentin S., Stocchero G., Vogliardi S., Snenghi R., Montisci M. 2019. Driving under the influence of drugs: Prevalence in road traffic accidents in Italy and considerations on per se limits legislation. *Traffic Inj Prev.* 19:786-793.

⁵⁹ Arroyo A., Sánchez M., Barberia E. 2013. Drivers under the influence of drugs of abuse: quantification of cocaine and impaired driving. *Med. Leg. J.* 81:135-143.

⁶⁰ Papa P., Rocchi L., Rolandi L.M. 2017. Illicit drugs in emergency department patients injured in road traffic accidents. *Ann. Ist. Super. Sanità.* 53:35-39.

⁶¹ Medical bureau of road safety an Lia-Bhiúró um Shábháilteacht ar Bhóithre. 2012. Report on roadside drug testing and equipment and related matters.

⁶² Pichini S., Busardò F.P., Pacifici R., Kintz P. 2017. New psychoactive substances (NPS), a new global issue: neuropharmacological, chemical and toxicological aspects. *Curr. Neuropharmacol.* 15:656-657.

⁶³ Hels T., Lyckegeard A., Simonsen K.W., Steentoft A., Bernhoft I.M. 2013. Risk of severe driver injury by driving with psychoactive substances. *Accid.Anal.Prev.* 59:346-356.

⁶⁴ Adamowicz P., Gieron J., Gil D., Lechowicz W., Skulska A., Tokarczyk B. 2016. The prevalence of new psychoactive substances in biological material, a three-year review of casework in Poland. *Drug Test. Anal.* 8:63-70.

⁶⁵ Musshoff F., Madea B., Kernbach-Wightton G., Bicker W., Kneisel S., Hutter M., Auwarter V. 2014. Driving under the influence of synthetic cannabinoids: a case series. *Int. J. Legal Med.* 128:59-64.

⁶⁶ Zawilska J.B., Andrzejczan D. 2015. Next generation of novel psychoactive substances on the horizon, a complex problem to face. *Drug Alcohol Depend.* 157:1-17.

⁶⁷ Fassette T., Martinez A. 2016. An impaired driver found to be under the influence of methoxetamine. *J. Anal. Toxicol.* 40:700-702.

parte dei consumatori, degli effetti fisiologici e psicologici potenzialmente dannosi che ne derivano dal consumo, in particolar modo per coloro che si pongono alla guida di un mezzo. Tra queste sostanze, i cannabinoidi sintetici rappresentano la classe maggiormente riscontrata in Europa in soggetti alla guida^{63,65,68}.

La frontiera delle nuove sostanze psicoattive è in continuo divenire e il contributo quotidiano di ogni laboratorio di tossicologia forense, insieme alle istituzioni nazionali ed internazionali, risulta fondamentale per accrescere le conoscenze e fronteggiarne la pericolosità di utilizzo alla guida.

⁶⁸ Broyd S.J., van Hell H.H., Beale C., Yucel M., Solowij N. 2016. Acute and chronic effects of cannabinoids on human cognition. *Biol. Psychiatry*. 79:557-567.

1.1. Excursus legislativo

La prima legge in materia di circolazione stradale risale alla seconda metà dell'800, precisamente al 1865⁶⁹ quando venne introdotta una classificazione delle strade e furono stabilite alcune regole a riguardo della velocità e dei comportamenti da tenere da parte del conducente alla guida di un veicolo.

Successivamente a quella data vennero emanati diversi emendamenti che furono poi raccolti nel Testo Unico del 1933 (Decreto n. 1740 del 1933)⁷⁰, che fu successivamente sostituito dal nuovo “Testo Unico”, approvato con il Decreto del Presidente della Repubblica n. 393 del 1959⁷¹ (*Testo unico delle norme sulla circolazione stradale*).

Questo testo resterà in vigore per 33 anni, ovvero fino all'approvazione del nuovo ed ancora attuale “Codice della Strada” (CdS), approvato con D.Lgs. 285/92 ed entrato in vigore il 1° gennaio 1993⁷².

Il CdS è attualmente composto da 240 articoli, distribuiti in 7 Titoli così suddivisi:

- TITOLO I: disposizioni generali; articoli 1-12
- TITOLO II: della costruzione e tutela delle strade; articoli 13-45
- TITOLO III: dei veicoli; articoli 46-114
- TITOLO IV: guida dei veicoli conduzione degli animali; articoli 115-139
- TITOLO V: norme di comportamento; articoli 140-193
- TITOLO VI: degli illeciti previsti dal C.d.s. e delle relative sanzioni; articoli 194-224
- TITOLO VII: disposizioni finali e transitorie; articoli 225-240

⁶⁹ Legge n. 2248 del 20 Marzo 1865 in materia di “Unificazione amministrativa del Regno di Italia”

⁷⁰ Regio Decreto 8 dicembre 1933 n. 1740, “Testo unico di norme per la tutela delle strade e per la circolazione”

⁷¹ Decreto del Presidente della Repubblica 15 giugno 1959 n. 393, “Testo unico delle norme sulla circolazione stradale”

⁷² Decreto Legislativo 30 aprile 1992, n. 285. Nuovo Codice della Strada.

Nel corso degli anni sono state apportate numerose modifiche, in alcuni casi si è trattato di vere e proprie riforme.

Nel 2002, con il D.Lgs 15 n. 9 venne introdotta la patente a punti. Questo processo di riforma è proseguito con il D.L. 151/2003 e quello 117/2007 inerenti ai livelli di sicurezza stradale e successivamente con il D.L 92/2008 e la L. 94/2009 che costituiscono il cosiddetto pacchetto sicurezza.

Nel 2010 e nel 2011 si è proseguito con il lavoro sulla sicurezza tramite la L. 120/2010, per recepire diverse direttive europee sulla patente di guida e il D.Lgs. 59/2011, a riguardo della classificazione dei veicoli e i requisiti per la guida.

Uno degli interventi maggiormente significativi risale al 2016 quando fu emanata la L. 41/2016 che ha introdotto nel codice penale (CP) i reati di omicidio stradale (art. 589-bis CP) e lesioni personali gravi o gravissime (art. 590-bis CP).

L'art. 589-bis al co.1 prevede la reclusione da anni 2 ad anni 7 per chiunque causi un evento letale in violazione delle norme sulla circolazione stradale (ciò è valido anche nel caso in cui il responsabile di tale evento non sia il conducente del veicolo stesso).

Tale pena risulta maggiorata in violazione degli artt. 186, 186-bis e 187 del CdS come illustrato in **figura 3**.

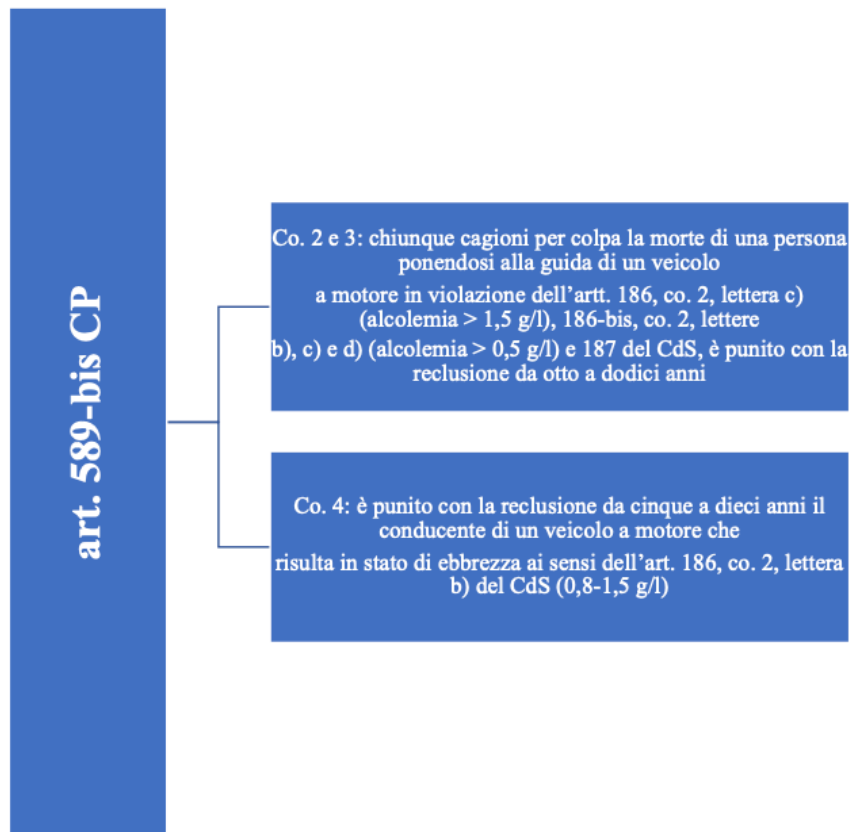


Figura 3. Art. 589-bis CP: inasprimento delle pene in conseguenza della violazione degli artt. 186, 186-bis e 187 del CdS⁷².

L'art. 590-bis prevede la reclusione da tre mesi fino ad un anno e da un anno fino a tre anni per chiunque cagioni, in violazione delle norme sulla disciplina della circolazione stradale, lesioni gravi (prognosi > 40 giorni) o gravissime (malattia insanabile)⁷².

La violazione dagli artt. 186, 186-bis e 187 del CdS rappresenta, anche in questo caso, un'aggravante come indicato dalla **figura 4**.

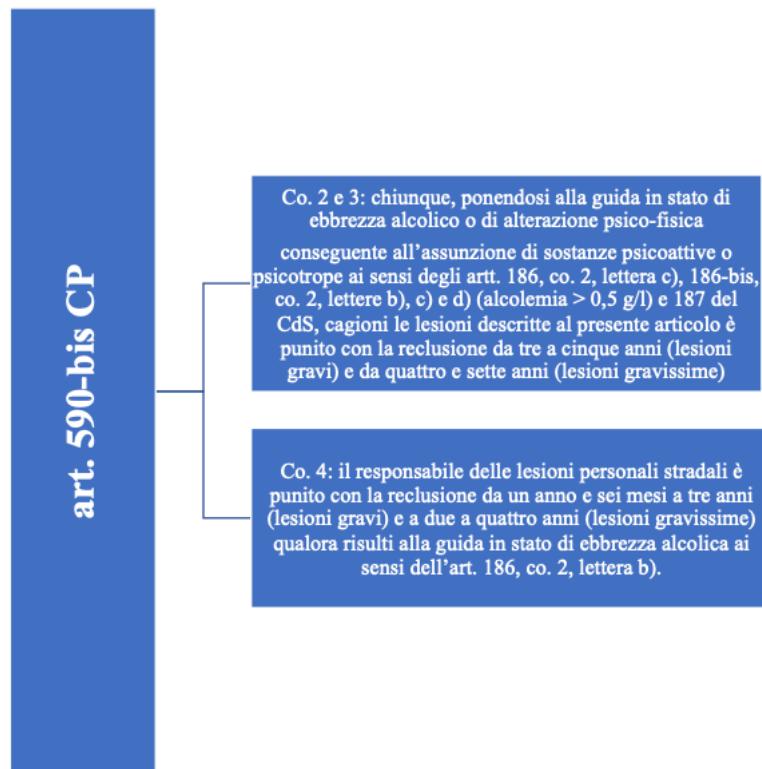


Figura 4. Art. 590-bis CP: inasprimento delle pene in conseguenza della violazione degli artt. 186, 186-bis e 187 del CdS⁷².

I provvedimenti introdotti successivamente al 2016 hanno principalmente riguardato i processi di gestione dei *dati di circolazione e di proprietà*, attraverso l'introduzione del documento unico di circolazione (D.Lgs. 98/2017), la sperimentazione delle soluzioni di *Smart Road* e di *Guida Connessa e Automatica* (D.M. 28 febbraio 2018), la mobilità sostenibile (L. 2/2018) e la circolazione su strada di veicoli di mobilità personale a propulsione prevalentemente elettrica (L. 145/2018).

Le ultime norme di modifica del Codice della Strada sono state approvate nel quadro delle misure mirate alla semplificazione dei procedimenti e all'innovazione digitale (D.L. 76/2020, convertito dalla L. 120/2020)⁷².

1.2. Il ruolo della tossicologia forense

La tossicologia forense riveste un importante ruolo nell'ambito della sicurezza stradale.

Infatti, all'interno del Codice della Strada vi sono diversi articoli che regolano l'uso di alcol e/o sostanze stupefacenti e psicotrope alla guida e il loro conseguente accertamento.

L'accertamento tossicologico-forense presenta carattere probatorio e quindi risulta di fondamentale importanza la garanzia a riguardo del dato analitico e l'osservanza di tutte le disposizioni atte a garantire la qualità del dato.

- *Art. 119 – “Requisiti fisici e psichici per il conseguimento della patente di guida”*

In base a quanto previsto dall'art. 119 non può ottenere la patente di guida colui che sia affetto da malattia fisica o psichica, deficienza organica o minorazione psichica, anatomica o funzionale tale da impedire di condurre con sicurezza veicoli a motore.

Tramite il decreto Legislativo n. 59/2011⁷³ sono state stabilite le patologie o le condizioni che devono essere oggetto di una specifica valutazione medica atta a stimarne l'impatto sulle capacità di guida anche in considerazione della tipologia di patente. Tra queste sono incluse la “dipendenza da alcool o guida dipendente da alcool” e l’“uso di sostanze stupefacenti o psicotrope e abuso e consumo abituale di medicinali”.

⁷³ Decreto Legislativo 18 aprile 2011 n. 59, “Attuazione delle direttive 2006/126/CE e 2009/113/CE concernenti la patente di guida” e s.m.i.

- **Art. 186 – “Guida sotto l’influenza dell’alcool”**

L’art. 186 al co. 1 stabilisce che “è vietato guidare in stato di ebbrezza in conseguenza dell’uso di bevande alcoliche”. Le sanzioni amministrative e/o le pene vengono commisurate in base al tasso alcolemico riscontrato nel conducente e, salvo che il fatto non costituisca un reato maggiormente grave, sono descritte in **figura 5**.

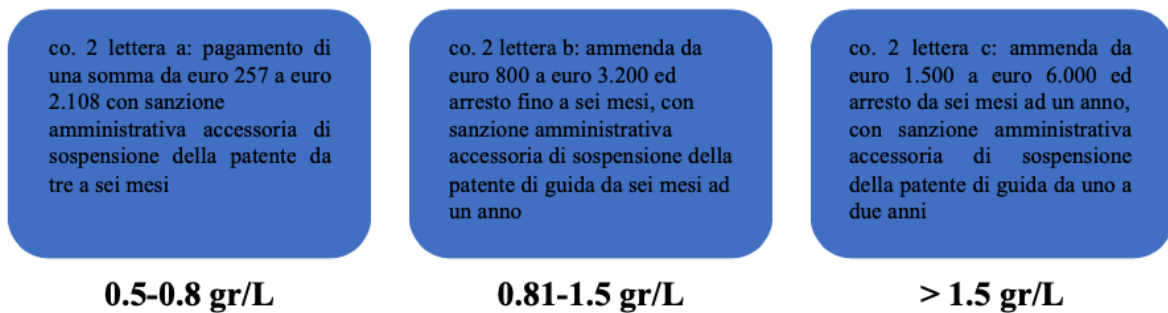


Figura 5. Art. 186: sanzioni amministrative e/o pene commisurate al tasso alcolemico⁷².

L’art. 186-bis regola la guida sotto l’effetto di alcol per alcune specifiche categorie di conducenti: “*Guida sotto l’influenza dell’alcool per conducenti di età inferiore a ventuno anni, per i neo-patentati e per chi esercita professionalmente l’attività di trasporto di persone o di cose*”.

Infatti per queste categorie di conducenti è vietata la guida dopo aver assunto bevande alcoliche⁷². A differenza di quanto regolamentato nell’art. 186, per questi soggetti non esiste un range, anche minimo, di alcolemia tollerata e sono previste sanzioni per qualunque valore che superi 0 gr/L (**figura 6**).

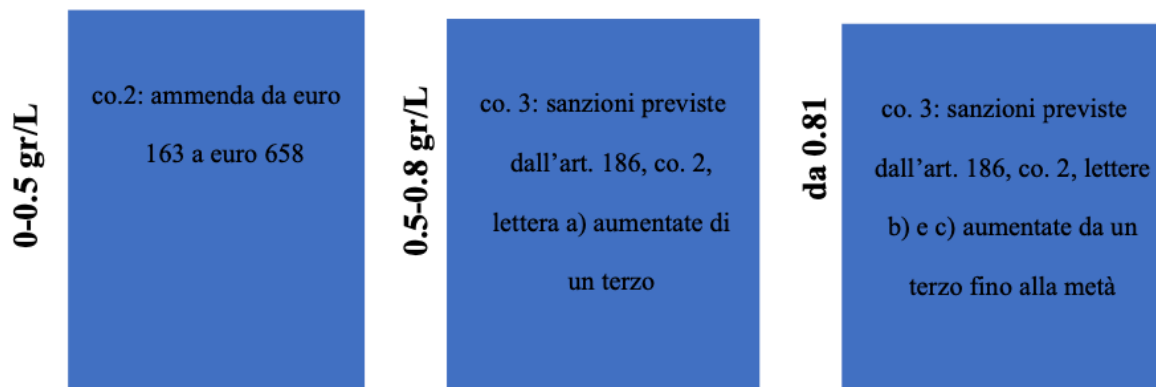


Figura 6. Sanzioni previste dall'art. 186-bis in base al tasso alcolemico riscontrato⁷².

- **Art. 187 – “Guida in stato di alterazione psico-fisica per uso di sostanze stupefacenti”**

Per la guida in stato di alterazione psico-fisica dopo aver assunto sostanze stupefacenti o psicotrope (illecito penale) è prevista la reclusione da sei mesi ad un anno, un'ammenda da euro 1.500 a euro 6.000 e la sanzione amministrativa accessoria della sospensione della patente di guida da uno a due anni.

In caso di rifiuto del soggetto a sottoporsi agli accertamenti è prevista l'applicazione della sanzione nella misura massima⁷².

1.3. Impatto dell'etanolo alla guida

L'etanolo è una sostanza psicoattiva d'uso frequente ed antico⁷⁴.

Si tratta di una molecola piccola e miscibile con l'acqua, per questo motivo l'alcol assunto per via orale viene assorbito molto rapidamente. Generalmente l'assorbimento è completo al 90% entro un'ora dall'assunzione. Il picco massimo della concentrazione ematica viene raggiunto in circa 40 minuti a stomaco pieno e in soli 10 minuti circa a stomaco vuoto. In ogni caso viene raggiunto un equilibrio tra la concentrazione ematica e quella parenchimale dopo circa 10 minuti dal picco ematico⁷⁵. L'alcol presente nel sangue viene progressivamente eliminato immutato con le urine (2-4% del totale) e tramite l'aria alveolare espirata (96% della dose). Sono diversi i fattori che possono influenzare l'assorbimento dell'alcol⁷⁶:

- Presenza di cibo nello stomaco: il cibo va a ricoprire la superficie dell'organo, limitando l'assorbimento diretto da parte dello stomaco stesso;
- Tipo di bevanda alcolica ingerita;
- Costituzione fisica dell'assuntore e suo peso: la distribuzione di alcol nell'organismo è proporzionale alla quantità di acqua presente nei tessuti, per cui un soggetto di corporatura robusta, a parità di quantità di alcol assunta, avrà un'alcolemia più alta di un soggetto con corporatura magra;
- Sesso: a parità di quantità di alcol assunta, l'alcolemia nei soggetti di sesso femminile è più elevata di quella dei soggetti di sesso maschile, per la maggior presenza di tessuto adiposo;
- Parametri individuali: metabolismo e stato psico-emotivo del singolo individuo.

⁷⁴ Frolidi R. 2001. Lezioni di tossicologia forense. G. Giappichelli Editore-Torino.

⁷⁵ Kumar V., Abbas A.K., Aster J.C. 2015. Le basi patologiche delle malattie. Nona edizione. Edra Masson.

⁷⁶ Gagliano-Candela R. 2001. Tossicologia forense in schemi, tabelle e teso. Giuffrè Editore.

Metabolismo dell'alcol:

La quantità di etanolo assorbita e distribuita nel corpo viene metabolizzata quasi completamente (95.0-98.0%) ad opera di un enzima presente prevalentemente nel fegato: l'alcol deidrogenasi (ADH), che ha come coenzima il NAD (nicotinammide adenina dinucleotide)⁷⁷. L'ossidazione completa dell'alcol etilico si realizza in due tappe (**figura 7**):

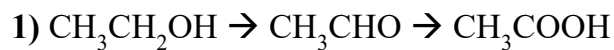


Figura 7. Reazioni di metabolizzazione dell'alcol etilico^{75,77}.

La prima comporta l'ossidazione dell'alcol in acetaldeide, la seconda da acetaldeide ad acido acetico. L'acetaldeide è il primo prodotto dell'ossidazione dell'etanolo e questo metabolita tossico viene rapidamente convertito in acetato. Quest'ultima conversione avviene ad opera di un enzima chiamato aldeide deidrogenasi (ALD), presente prevalentemente nel citoplasma e nei mitocondri delle cellule epatiche, renali e degli eritrociti. Infine, l'acetato può essere trasformato in AcetilCoA, che entra nel ciclo di Krebs e, se in eccesso, nella sintesi del colesterolo o degli acidi grassi⁷⁸.

⁷⁷ Boyd S.J., Corbin W.R. 2018. Faster alcohol metabolism is associated with increased stimulation and within session consumption. *Exp Clin Psychopharmacol.* 26:168-176.

⁷⁸ Paquot N. 2019. Le métabolisme de l'alcool [The metabolism of alcohol]. *Rev Med Liege.* 74:265-267.

Unità di misura dell'alcol nel sangue

La misura dell'alcol presente nell'organismo può essere espressa in diverse unità di misura:

- BRAC (Breathing Alcohol Concentration): concentrazione di alcol nell'aria espirata. E' espressa in mg/l aria espirata;
- BAC (Blood Alcohol Concentration): concentrazione di alcol nel sangue. E' espressa in percentuale di alcol presente nel sangue.

E' possibile convertire il valore espresso con BRAC in BAC in quanto esiste una proporzionalità diretta tra la quantità di alcol presente nell'aria espirata e la quantità di alcol nel sangue, pari a 2300:1, ovvero $1 \text{ mg/l aria} = 2,3 \text{ g/l}$ o $0,23\% \text{ BAC}^{77}$.

La correlazione che intercorre tra le concentrazioni ematiche e gli effetti generali dell'alcol sull'organismo è riassunta in **tabella 1**.

Tabella 1. Descrizione dei principali sintomi correlati ai diversi livelli di concentrazione alcolemica⁷⁹.

Concentrazione ematica	Effetti delle diverse concentrazioni ematiche di alcol sull'organismo
0.2 g/L	Socievolezza, espansività.
0.5 g/L (limite di legge alla guida)	Diminuzione freni inibitori.
0.8-1.2 g/L	Azione depressiva sui centri motori Perdita autocontrollo Disturbi dell'equilibrio
1.5-2.5 g/L	Ubbriachezza Atassia (perdita coordinazione muscolare) Agrafia (perdita della capacità di formulare per iscritto il pensiero)
2.5-4.0 g/L	Irascibilità Nausea Vomito Perdita tono muscolare Stato soporoso e comatoso
➤ 4.0 g/L	Collasso periferico e morte per paralisi dei centri respiratori

⁷⁹ Ministero della Salute. Tabella descrittiva dei vari sintomi correlati ai diversi livelli di concentrazione alcolemica. (Art. 6 del decreto-legge 3 agosto 2007 n. 117 convertito in legge, con modificazioni, dall'art. 1, della legge 2 ottobre 2007, n. 160).

E' molto importante poter verificare e stabilire quali sono gli effetti che le varie concentrazioni ematiche esercitano sulle abilità alla guida (**tabella 2**).

Tabella 2. Effetti riscontrati sulle abilità alla guida, in base alle diverse concentrazioni ematiche di alcol ⁷⁶.

intorno a 0,5 g/l	Diminuita capacità di percepire i colori dei semafori e dei segnali.
da 0,8 a 1,5 g/l	Difficoltà nella percezione di eventuali pericoli laterali e, soprattutto, eccessivo stato di sicurezza che porta a sottovalutare o sfidare il pericolo.
da 1,5 a 2,5 g/l	Mancata coordinazione dei movimenti che comporta un'elevata possibilità di causare incidenti; in ogni caso la condotta di guida è irrazionale ed estremamente imprudente.
oltre 2,5 g/l	Valori che comportano un importante effetto soporifero, che normalmente impediscono di avviare e guidare il veicolo.

Dal un punto di vista tossicologico-forense, il metodo di elezione per verificare la concentrazione di alcol etilico nel sangue è rappresentato dall'uso della gascromatografia con campionamento dello spazio di testa (HS-GC) associata alla spettrometria di massa (MS).

Il lavoro svolto relativamente alla valutazione dell'impatto dell'alcol e delle sostanze stupefacenti alla guida ha condotto a due lavori sperimentali distinti.

Dapprima si è valutata una casistica decennale (2009-2019) che ha considerato tutti i tipi di mezzi stradali coinvolti in un sinistro con esito fatale (**capitolo 1.4**).

Successivamente l'attenzione è stata posta solo sui soggetti deceduti coinvolti in sinistro stradale alla guida di un motociclo o di un ciclomotore.

In quest'ultimo caso il periodo di tempo considerato (1989-2019) è stato ampliato con l'intento di comprendere un numero maggiore di casi che hanno coinvolto solamente queste due tipologie di mezzo stradale (**capitolo 1.5**).

1.4. Parte sperimentale (primo studio)

1.4.1. Obiettivo

Come dimostrato nel capitolo introduttivo del presente lavoro, l'uso di alcol e sostanze stupefacenti esercita un impatto negativo sulla capacità di guida di veicoli da parte dei soggetti che ne fanno uso. Sulla base dei lavori citati e già condotti a livello nazionale ed internazionale, e in virtù del fatto che non vi era ancora alcun studio circa l'analisi della problematica nel territorio occidentale dell'Emilia Romagna, è nata l'idea del presente lavoro. L'obiettivo primario di questo studio è stato quello di esaminare e quantificare il problema relativo all'uso di alcol e sostanze illecite in soggetti vittime di sinistri con esito fatale, nel decennio 2009-2019, che hanno coinvolto tutti i tipi di mezzi di trasporto.

Inoltre, in riferimento alla legge n. 41/2016, è stato valutato, tramite i dati raccolti, l'impatto dell'inasprimento legislativo conseguente a tale legge.

1.4.2. Materiali e Metodi

In questo studio sono stati presi in considerazione tutti i soggetti deceduti in seguito ad incidente stradale nel decennio 2009-2019, afferiti all'Istituto di Medicina Legale dell'Università di Parma.

I soggetti considerati sono deceduti in seguito a sinistro stradale, avvenuto nelle province di Parma, Reggio Emilia e Piacenza. Si tratta di un'area di circa 1.270.000 abitanti. In base a questo criterio di inclusione, sono stati considerati soggetti di qualunque età e sesso, che si trovavano alla guida o erano passeggeri del mezzo a motore coinvolto oppure erano pedoni.

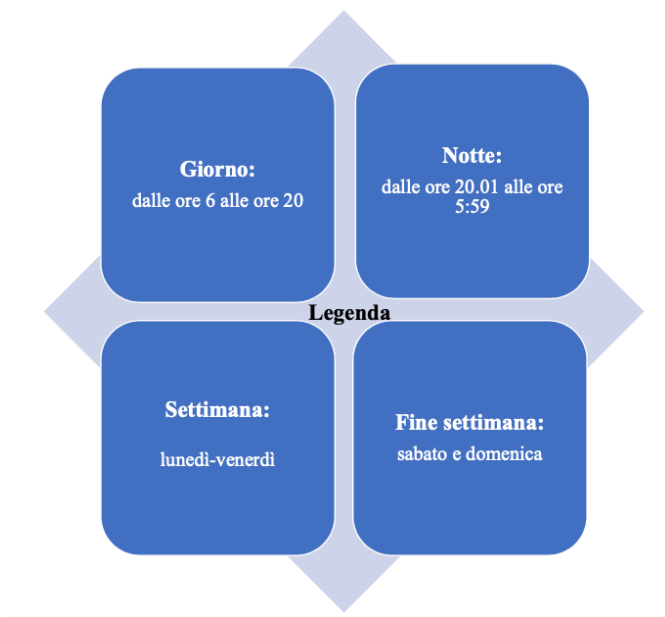
In tutti i soggetti guidatori è stato valutato il possibile coinvolgimento di alcol, sostanze stupefacenti e farmaci con il sinistro che ne ha causato la morte. Le sostanze rilevate sono state accertate mediante analisi tossicologiche, i cui i risultati sono stati riportanti nel verbale autoptico. I mezzi coinvolti nei sinistri appartengono a tipologie diverse: auto, moto, camion e biciclette.

I dati necessari per lo studio, estrapolati dall'archivio informatico e da quello cartaceo dell'Istituto di Medicina Legale di Parma, sono stati trascritti e conservati in files excel custoditi dal personale coinvolto nello studio.

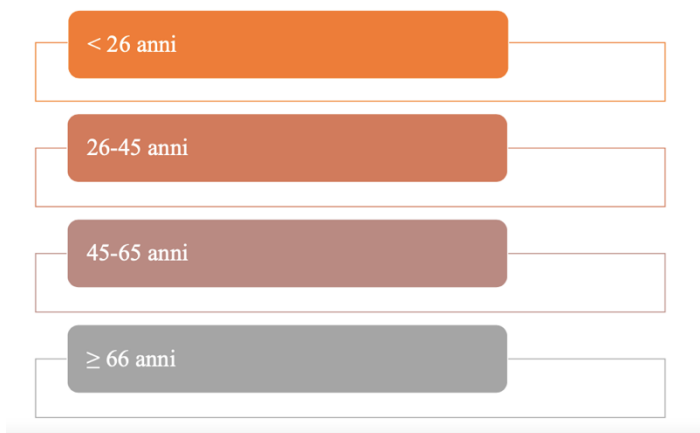
Sono stati estrapolati e successivamente analizzati diversi dati riguardanti i soggetti coinvolti e le circostanze del sinistro:

- Numero verbale autoptico
- Data di nascita
- Data di morte (con distinzione tra settimana/fine settimana).

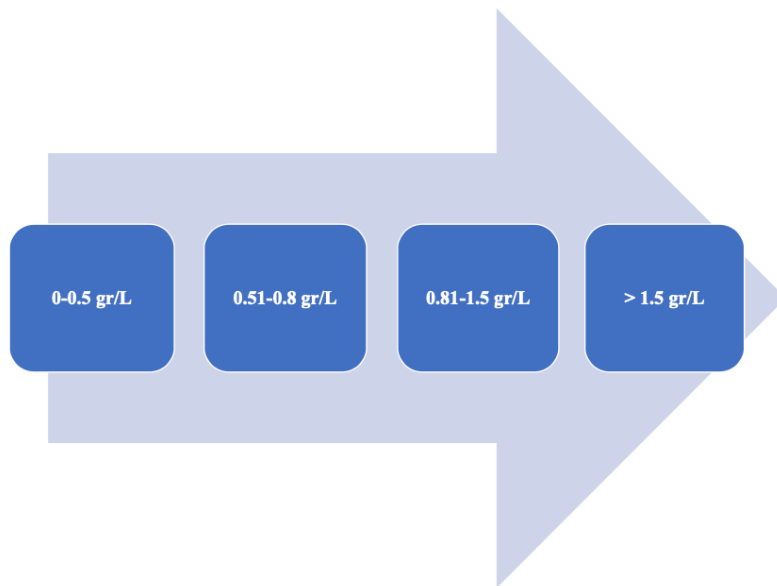
- Ora della morte (con distinzione tra giorno/notte)



- Sesso (M o F)
- Età alla morte (con suddivisione in 4 fasce di età):



- Nazionalità
- Presenza di alcol, con distinzione della concentrazione in base ai range stabiliti per legge:



- Presenza di sostanze stupefacenti e farmaci
- Causa di morte

Le analisi dell'alcolemia sono state eseguite tramite la tecnica di gascromatografia con spazio di testa accoppiata a spettrometria di massa (HS-GC/MS), mentre le analisi relative alle sostanze stupefacenti e farmaci sono state effettuate su sangue mediante le tecniche ifenate di gascromatografia accoppiata a spettrometria di massa (GC-MS) e cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa (LC-MS), in seguito all'esecuzione di un test di screening. Relativamente ai farmaci, in caso di positività, veniva esaminata la cartella clinica redatta dal personale sanitario di emergenza intervenuto in loco e/o da quello ospedaliero per stabilire se i farmaci riscontrati fossero stati somministrati come terapia medica. Per tutti i soggetti risultati positivi a farmaci le cartelle cliniche non riportavano l'uso di tali sostanze.

1.4.2.1. Analisi statistica

Tutti i dati sono stati riassunti come mediane e intervalli interquartili per le variabili numeriche e in termini di frequenze assolute e relative per le variabili qualitative.

Le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il software statistico R.

1.4.3. Risultati

I casi considerati sono stati 327, la cui maggior parte appartenente al genere maschile.

I soggetti italiani deceduti rappresentavano circa l'85.0%, mentre i soggetti di nazionalità straniera sono circa il 15.0% del totale⁸⁰.

E' stata eseguita l'analisi statistica sul momento della giornata (giorno o notte) e, nell'ambito della settimana, sul giorno in cui il sinistro è avvenuto (infrasettimanale o weekend). La possibilità di ricavare l'ora del decesso si è verificata solo nel 96.0% dei casi totali (**figura 8**).

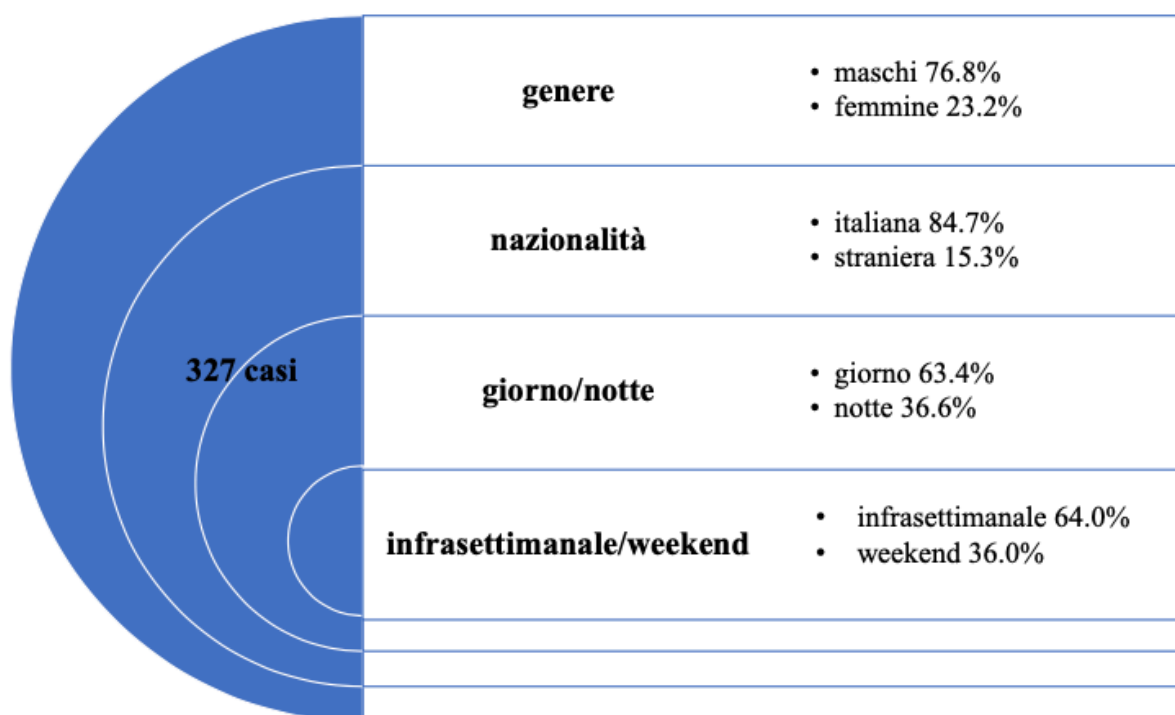


Figura 8. Dati relativi al genere, nazionalità e al momento della giornata e della settimana in cui gli incidenti si sono prevalentemente verificati⁸⁰.

⁸⁰ Anzillotti L., Dagoli S., Calò L., Maglietta G., Cecchi R. 2022. Road traffic deaths: A retrospective analysis (2009-2019) in the north of the Italian region Emilia Romagna. *Traffic Inj Prev.* 23:29-33.

In relazione al momento in cui si è verificato il sinistro, sia per quanto riguarda il giorno della settimana sia per l'orario in cui è avvenuto, si può affermare che la maggior parte dei sinistri si è verificata di giorno e nel weekend (rappresentativo di solo 2/7 giorni che compongono l'intera settimana).

Una condizione particolare riguarda i soggetti con età < 26 anni, per i quali la maggior parte dei sinistri si è verificata durante le ore notturne del weekend.

Avendo considerato un decennio, è stata effettuata una suddivisione dei decessi per ogni anno considerato. A tal proposito, il maggior numero dei casi è avvenuto proprio nel primo anno, il 2009, mentre il minor numero è stato riscontrato nell'anno 2014 (figura 9).

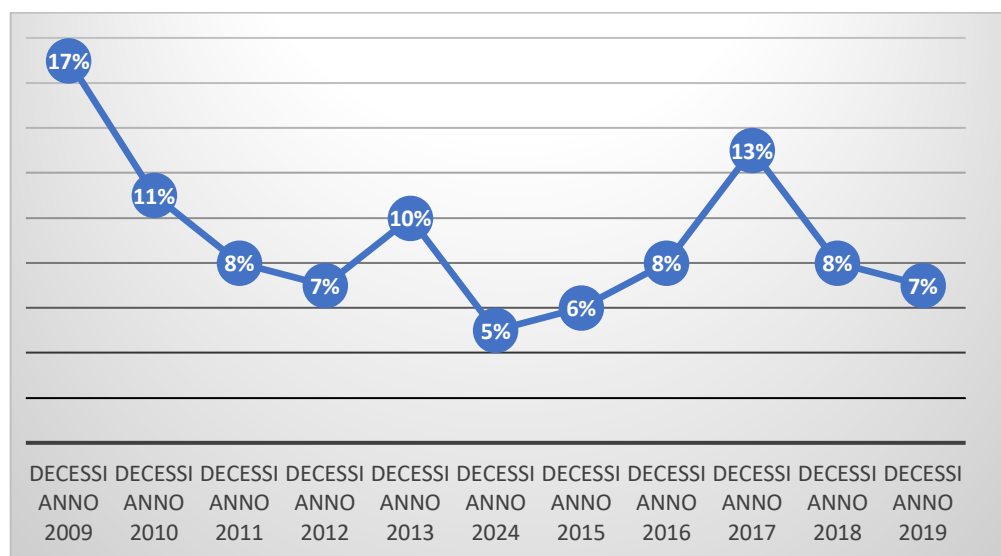


Figura 9. Rappresentazione grafica dell'incidenza dei decessi dal 2009 al 2019⁸⁰.

Data l'ampia rappresentazione della popolazione considerata, è stata eseguita un'analisi riguardante le cause di morte accertate per tutti i casi (figura 10).

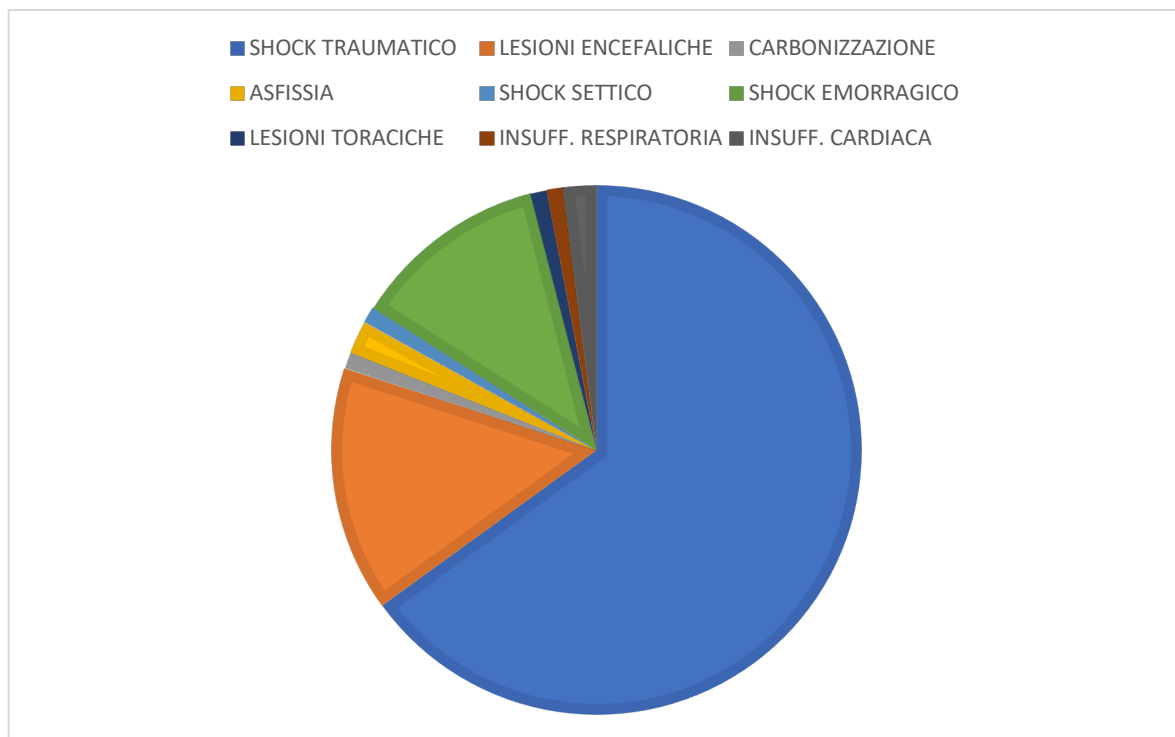


Figura 10. Percentuale delle varie cause di morte.

La maggior parte dei decessi era imputabile a shock traumatico. La causa di morte attribuita a lesioni encefaliche e shock emorragico è stata riscontrata, rispettivamente, in circa il 15.0% e nel 12% dei casi. Le restanti tipologie rappresentano percentuali nettamente inferiori⁸⁰.

Presenza di alcol, sostanze stupefacenti e psicofarmaci

Le analisi tossicologiche sono state eseguite, e di conseguenza erano disponibili, in 153/242 (63.2%) soggetti che erano alla guida del mezzo coinvolto nel sinistro.

In oltre il 50.0% dei casi analizzati (77 soggetti) è stata riscontrata la positività ad una o più sostanze (**figura 11**). Nessun soggetto di età < a 20 anni è risultato positivo alle categorie di sostanze investigate.

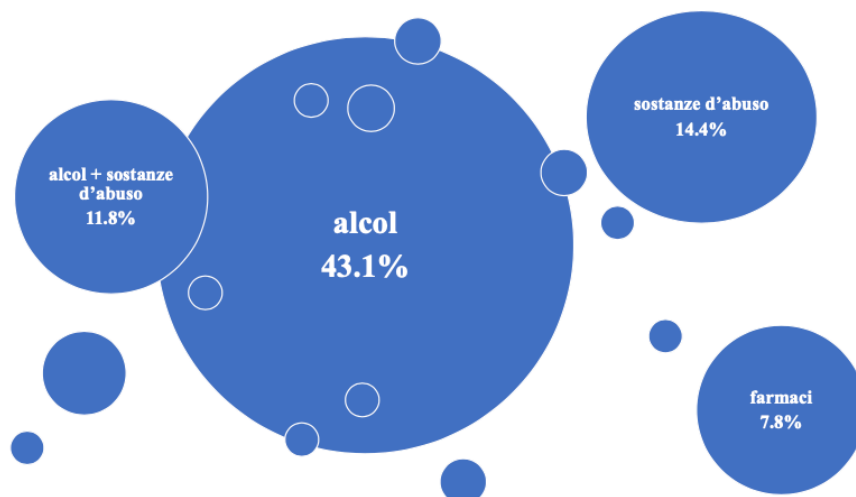


Figura 11. Prevalenza di alcol, sostanze d'abuso e farmaci nei 153 guidatori sottoposti ad analisi tossicologiche⁸⁰.

Identikit della positività ad alcol

Le caratteristiche relative alla positività all'alcol sono riassunte in **figura 12** e in **tabella 3**.

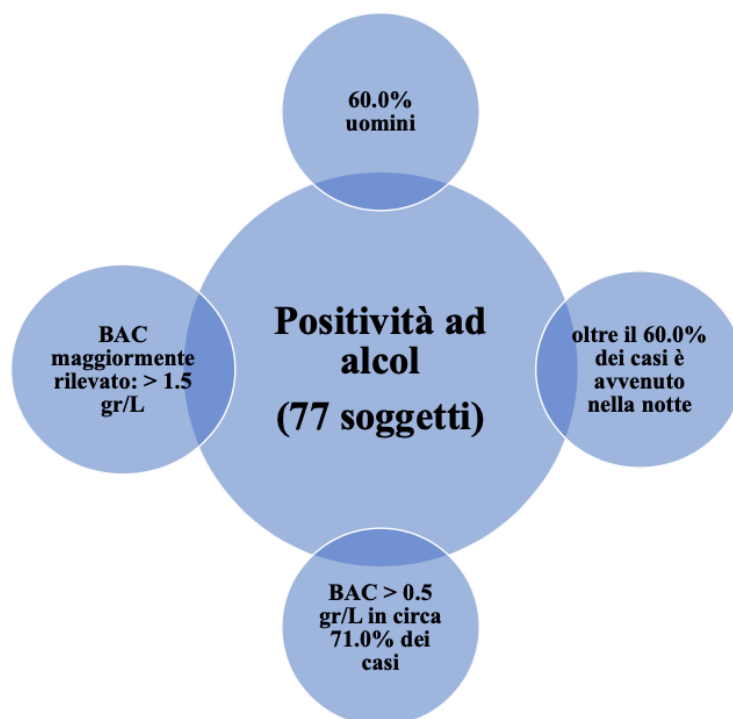


Figura 12. Caratteristiche della positività ad alcol⁸⁰.

In **tabella 3** sono riportati i dati relativi ai valori di alcolemia riscontrati.

Tabella 3. Prevalenza di alcol in numero assoluto e relativa percentuale per i vari range⁸⁰.

Valori di BAC	Numero soggetti (con %)
0.1-0.5 gr/l	19 (28.8%)
0.51-0.8 gr/l	8 (12.1%)
0.81-1.5 gr/l	16 (24.2%)
> 1.5 gr/l	23 (34.9%)

In circa il 60.0% dei casi, l'alcol è stato riscontrato come unica sostanza, in circa il 20.0% era associato a sostanze stupefacenti, nel 2.6% era in associazione a farmaci e, infine, in circa il 4% dei soggetti è stato riscontrato contemporaneamente a sostanze d'abuso e farmaci.

Un valore di alcolemia > 0.5 gr/l è stato riscontrato nel 71.2% dei casi positivi.

Identikit positività a sostanze d'abuso

Le caratteristiche relative alla positività a sostanze d'abuso sono riassunte in **figura 13**.

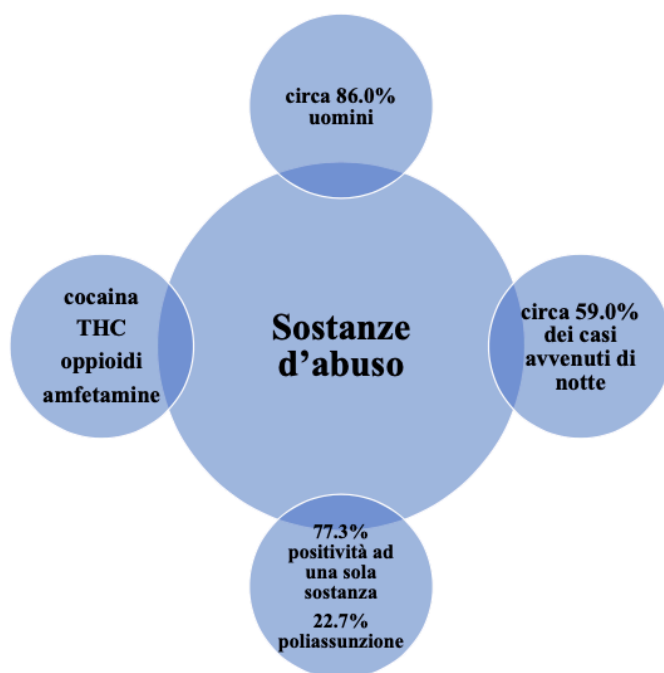


Figura 13. Caratteristiche della positività a sostanze illecite⁸⁰.

Nei casi di poliassunzione, le sostanze maggiormente riscontrate sono state THC e cocaina. La cocaina è stata rinvenuta come singola sostanza in un solo caso, in 6 soggetti era presente insieme all'alcol, in 2 casi con altre sostanze stupefacenti, e rispettivamente in 2 e 3 vittime la sua presenza era in combinazione con alcol e farmaci e con alcol e altre sostanze stupefacenti.

Identikit positività a farmaci

In **figura 14** vengono riassunte le caratteristiche relative alla positività a farmaci.

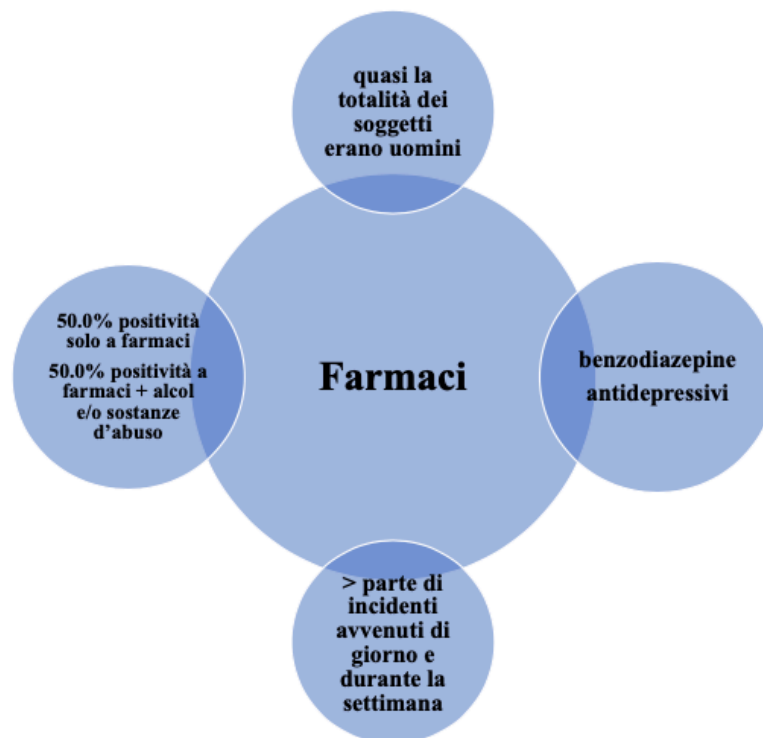


Figura 14. Caratteristiche della positività a farmaci⁸⁰.

1.4.4. Discussione

Questo studio fornisce nuovi importanti spunti sulla prevalenza di alcol, sostanze stupefacenti e farmaci, utilizzati da soli o in combinazione, in relazione a soggetti deceduti in seguito ad incidenti stradali, avvenuti in un'ampia area territoriale rappresentata dalla parte occidentale dell'Emilia Romagna.

Ad oggi, la maggior parte degli studi relativi al fenomeno dell'utilizzo di sostanze con effetti negativi sulle abilità alla guida, riguarda soggetti coinvolti in incidenti non fatali^{56,57,58,81}.

La netta prevalenza di soggetti inclusi nello studio è di sesso maschile con età compresa nella fascia tra 46 e 65 anni.

Le considerazioni dedotte da questo studio riguardano un periodo di tempo piuttosto ampio, all'interno del quale è possibile verificare se e come l'incidenza delle morti causate da incidenti stradali sia cambiata nel corso degli anni, e come la loro correlazione con sostanze stupefacenti, alcol e farmaci si sia evoluta.

Nel 2016 è stata emanata una nuova importante legge che introduce il reato di omicidio stradale e lesioni personali gravi e gravissime. Alla luce di questo nuovo ed importante decreto, si è voluto valutare l'eventuale riscontro positivo. A tal proposito, per i casi presi in considerazione, non si è verificata una diminuzione significativa del numero di decessi negli anni successivi al 2016. Anzi, il 2017, è stato il secondo anno maggiormente colpito da morti su strada.

Tra le analisi tossicologiche eseguite, oltre il 50% è risultato positivo ad una o più sostanze indagate. Come nella maggior parte degli studi considerati, la principale sostanza riscontrata è l'alcol^{55,56,57,58}.

⁸¹ Strano-Rossi S., Anzillotti L., Castrignanò E., Felli M., Serpelloni G., Mollica R., Chiarotti M. 2011. UHPLC-ESI-MS/MS method for direct analysis of drugs of abuse in oral fluid for DUID assessment. *Anal Bioanal Chem.* 40:609-24.

Per quanto riguarda gli incidenti riguardanti la popolazione risultata positiva a valori di alcolemia maggiori rispetto a quello consentito per legge (0.5 gr/L), il dato su cui è importante soffermarsi è relativo al fatto che la maggior parte dei tassi alcolemici riscontrati risultavano > 1.5 g/L.

Come dimostrato anche da un altro studio italiano⁵⁶ anche per il presente lavoro è possibile affermare che i soggetti coinvolti nel sinistro in cui è stata riscontrata una concomitante positività ad alcol e sostanze stupefacenti, il BAC maggiormente rilevato era > 0.80 gr/L.

Per quanto riguarda la positività a sostanze stupefacenti, come indicato dalla maggior parte degli studi considerati, la prevalenza dei casi ha riguardato uomini con un'età compresa tra 26 e 45 anni e le principali sostanze riscontrate sono cannabis e cocaina^{56,57,58,82,83,84}.

Come dimostrato in diversi paesi europei e confermato anche dal nostro studio, la cannabis viene consumata più frequentemente con alcol e/o altre droghe che da sola^{56,85}. Una particolarità da sottolineare riguarda il fatto che la cocaina è stata riscontrata solo in un caso come sostanza singola, mentre nella maggior parte dei casi è stata riscontrata in associazione ad alcol e/o altre sostanze illecite.

Tra i nostri casi, solo due sono risultati positivi ad anfetamine e questo riflette un uso minore di questo tipo di sostanze in Italia rispetto ad altri paesi europei³⁵.

La prevalenza dei casi con positività a sostanze d'abuso si è verificata durante la notte, mentre una significativa differenza non è stata riscontrata valutando il giorno della settimana in cui

⁸² Blencowe T., Pehrsson A., Mykkanen S., Gunnar T., Lillsunde P. 2012. Cannabis findings in drivers suspected of driving under the influence of drugs in Finland from 2006 to 2008. *Forensic Sci Int.* 217:107–112.

⁸³ Alcaniz M., Guillen M., Santolino M. 2018. Prevalence of drug use among drivers based on mandatory, random tests in a roadside survey. *Plos One.* 13:e0199302.

⁸⁴ Acar F., Asirdizer M., Aker R.G., Kucukbrahimoglu E.E., Ates I., Erol Y., Sahin A. 2013. A review of suspected cases of driving under the influence of drugs (DUID) involved in traffic accidents in Istanbul (Turkey). *J Forensic Leg Med.* 20:626–631.

⁸⁵ Ferrari D., Manca M., Premaschi S., Banfi G., Locatelli M. 2018. Toxicological investigation in blood samples from suspected impaired driving cases in the Milan area: possible loss of evidence due to late blood sampling. *Forensic Sci Int.* 288:211–217.

il sinistro si è verificato. Infatti, non vi è una sostanziale differenza tra il numero degli incidenti avvenuti di sabato o domenica e quelli avvenuti infrasettimanalmente.

Considerando i farmaci psicoattivi, in questo tipo di popolazione si verifica un'inversione delle condizioni che riguardano le circostanze del momento in cui è avvenuto l'incidente, Infatti, la maggior parte dei casi si è verificato durante il giorno e nel corso della settimana. Anche questi soggetti presentano prevalentemente un'età media maggiore ai 40 anni.

Come ampiamente evidenziato dal progetto DRUID⁵⁵, l'utilizzo di farmaci psicoattivi (come benzodiazepine e antidepressivi), soprattutto in associazione ad alcol e/o sostanze d'abuso comporta un notevole impatto negativo per quanto riguarda le abilità alla guida di un mezzo su strada. Dal nostro studio si evidenzia come il 25.0% dei soggetti in cui è stata riscontrata la positività ad un farmaco, vi era un uso simultaneo di alcol e sostanze d'abuso.

Limiti dello studio

I soggetti considerati nel presente studio sono solo quelli afferiti all'Istituto di Medicina Legale di Parma. Inoltre non è stata effettuata alcuna valutazione riguardante la dinamica del sinistro e l'eventuale coinvolgimento/colpevolezza di soggetti terzi implicati. L'analisi tossicologica non è disponibile per tutti i guidatori inclusi nello studio.

Le considerazioni relative all'introduzione della legge n. 41 del 2016 sono state possibili solo per pochi anni, essendo il decennio considerato quello del 2009-2019.

1.4.5. Conclusioni

La guida sotto l'effetto di alcol e sostanze stupefacenti è oggi ampiamente studiata e discussa.

L'opinione pubblica si dibatte spesso su quali siano le caratteristiche del soggetto "colpevole" e di quello che inconsapevolmente si è trovato ad essere vittima di incidente stradale.

Dall'altra parte, le istituzioni, le forze dell'ordine e diversi enti, ogni giorno, sono in prima linea per fronteggiare questo pericoloso fenomeno per la salute pubblica.

Come ampiamente dimostrato, la rilevanza della problematica presenta caratteristiche differenti a livello dei diversi paesi europei e nel panorama internazionale.

Anche nel nostro paese, attraverso diversi studi pubblicati, è stato possibile apprezzare significative differenze che riguardano le varie zone "indagate".




E' di fondamentale importanza che le caratteristiche comuni e, ancor più, quelle differenti vengano prese in considerazione dagli organi deputati allo sviluppo di leggi che devono essere in grado di adeguarsi a tutte le nuove sfumature che questo grave problema sociale presenta.

Infatti, la società attuale si evolve in maniera veloce e caotica e con essa cambiano anche gli usi e costumi, soprattutto quelli negativi.

Questo studio ha portato alla pubblicazione di un articolo scientifico in una rivista internazionale nel corso del 2022:

Anzillotti L, **Dagoli S**, Calò L, Maglietta G, Cecchi R. Road traffic deaths: A retrospective analysis (2009-2019) in the north of the Italian region Emilia Romagna. *Traffic Inj Prev.* 2022;23(1):29-33. doi: 10.1080/15389588.2021.2002853. Epub 2021 Dec 9. PMID: 34882488.

Road traffic deaths: A retrospective analysis (2009–2019) in the north of the Italian region Emilia Romagna

L. Anzillotti^a , S. Dagoli^a , L. Calò^a, G. Maglietta^b, and R. Cecchi^a 

^aLegal Medicine, Department of Medicine and Surgery, University of Parma, Parma, Italy; ^bResearch and Innovation Unit, University Hospital of Parma, Parma, Italy

ABSTRACT

Objective: International literature and several national studies demonstrate that alcohol and illicit drugs impair driving abilities, diminishing the level of attention, and cause traffic accidents. In Italy, driving under the influence of alcohol or drugs is regulated by Articles 186 and 187 of the National Street Code, which defines penalties and fines for the convicted. The aim of this study was the collection of all available data from 2009 to 2019 focusing on deaths related to road accidents in the Unit of Legal Medicine of Department of Medicine and Surgery at the University of Parma, in order to assess any consumption of alcohol, illicit drugs, and medicinal drugs among drivers.

Methods: Data were retrieved from autopsy reports found at the Unit of Legal Medicine of Parma University related to 327 subjects who died following road accidents in the Italian areas of Parma, Reggio-Emilia, and Piacenza. The population was divided into subgroups according to age, gender, crash time, and drug positivity.

Results: Those in the age group 46 to 65 years old were involved in the most accidents, whereas the category with fewest members included subjects under 26 years old. The majority of road accidents occurred during the daytime and on weekends. Among the toxicological investigations carried out (only for drivers), the highest prevalence was found for alcohol (43.1%), followed by illicit drugs (14.4%) and medicinal drugs (7.8%). The prevalence of alcohol and illicit drugs in combination was 11.8%. Regarding subjects positive for alcohol and illicit drugs in combination, 44.4% had a blood alcohol concentration (BAC) > 1.5 g/L and overall, in 61.1% of the total cases a BAC > 0.81 g/L was detected.

Conclusions: Our results are in line with national and international studies highlighting the prevalence of high BAC levels in most of the cases. Confirmation analyses on blood collected from people who died following road accidents showed levels of BAC above 0.8 g/L (threshold for penal sanctions) in the majority of the subjects who tested positive for alcohol. They also revealed cocaine, cannabis, and benzodiazepines as the most common illicit drugs and medicinal drugs used, respectively, as demonstrated in several international studies.

ARTICLE HISTORY

Received 25 January 2021
Accepted 2 November 2021

KEYWORDS

DUID; DUI; traffic; drugs of abuse; road traffic deaths; road safety

1.5. Parte sperimentale (secondo studio)

1.5.1. Obiettivo

L'obiettivo principale di questo studio è stato quello di documentare le caratteristiche epidemiologiche riguardanti gli incidenti stradali mortali che hanno coinvolto motocicli e ciclomotori, avvenuti nel territorio occidentale dell'Emilia Romagna, avvenuti nel periodo tra il 1989 e il 2019.

Inoltre, i dati, sia circostanziali che traumatologici, ottenuti da questo studio sono stati posti a confronto con altri studi presenti in letteratura.

1.5.2. Materiali e metodi

Per l'indagine oggetto di tesi sono stati analizzati i dati estratti dalla casistica del settore dell'Unità di Medicina Legale dell'Università degli studi di Parma relativo agli incidenti che hanno coinvolto motocicli e ciclomotori, nel periodo compreso tra il 1989 e il 2019, nelle province di Parma, Reggio Emilia e Piacenza.

Si tratta di un'area caratterizzata complessivamente da circa 1.270.000 abitanti.

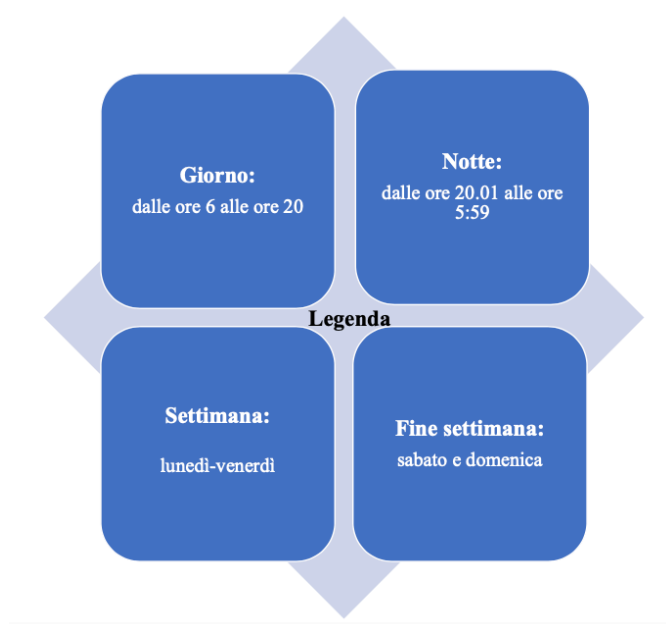
Il campione totale oggetto dell'indagine è rappresentato da 350 casi totali (228 autopsie giudiziarie e 122 esami esterni).

Dai verbali analizzati sono stati estrapolati due tipi di dati: *circostanziali* e *traumatologici*.

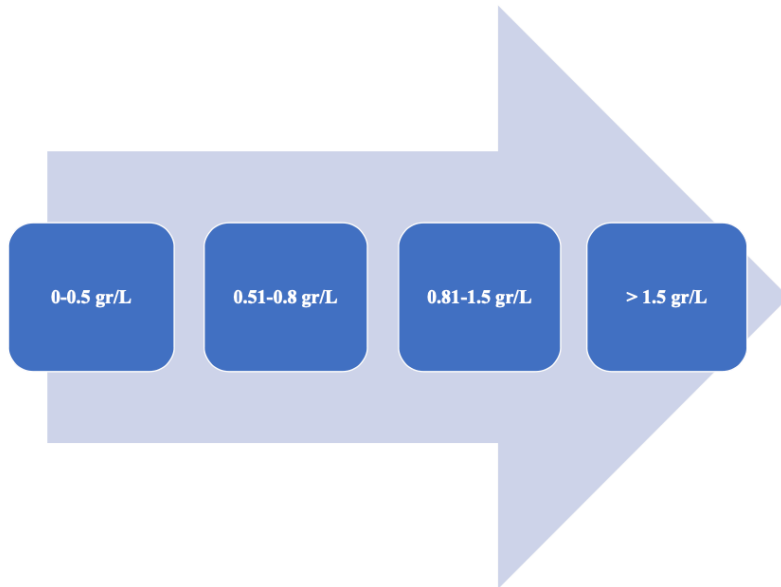
Questi dati sono stati raccolti in due fogli di lavoro elettronici, mantenendo il completo anonimato dei soggetti, e così rappresentati:

DATI CIRCOSTANZIALI

- Numero verbale autoptico
- Data di nascita
- Data di morte (con distinzione tra settimana/fine settimana).
- Ora della morte (con distinzione tra giorno/notte)



- Sesso (M o F)
- Età alla morte
- Nazionalità
- Presenza di alcol, con distinzione della concentrazione in base ai range stabiliti per legge (solo per i casi sottoposti ad autopsia giudiziaria:228):



Le analisi relative all'alcolemia sono state eseguite tramite la tecnica di gascromatografia con spazio di testa accoppiata a spettrometria di massa (HS-GC/MS).

- Presenza o assenza di casco

DATI TRAUMATOLOGICI

Sono state descritte in senso topografico le lesioni, suddivise nei diversi distretti anatomici (capo, torace, addome e arti).

1.5.3. Risultati

1.5.3.1. Risultati dati circostanziali

I casi considerati nel presente studio sono 350 (228 autopsie giudiziarie e 122 esami esterni). La maggior parte dei soggetti coinvolti, italiani (91.4%) e di sesso maschile, si trovava alla guida del mezzo. Mentre, tra i passeggeri (5.1% del totale) la maggior parte era rappresentata da soggetti di sesso femminile (61.1%).

Circa il 72.0% delle vittime è deceduto nell'impatto, circa il 20.0% nell'arco di una settimana dalla data del sinistro, il 5.0% entro un mese e, infine, quasi il 4.0% dopo un mese⁸⁶.

Sono state valutate le caratteristiche e differenze riguardanti i soggetti alla guida di un motociclo e quelli alla guida di un ciclomotore (**figura 15**).

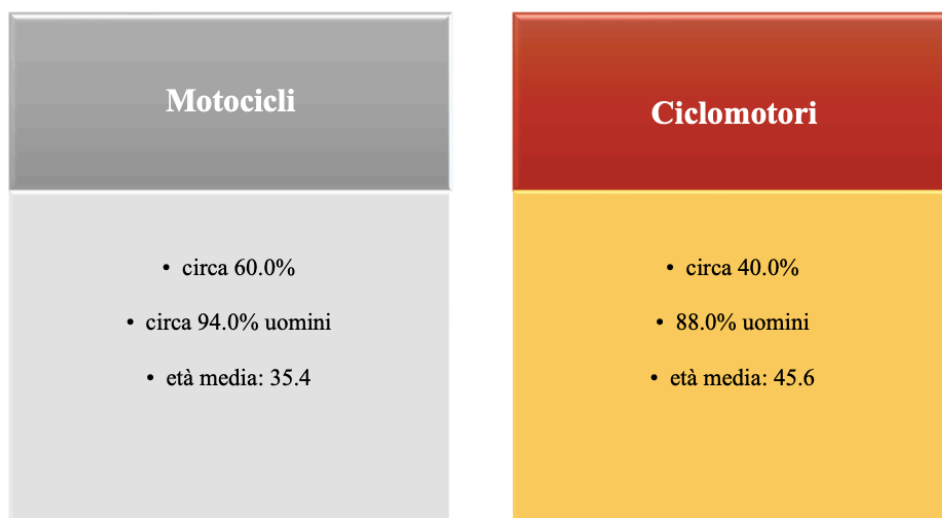


Figura 15. Caratteristiche dei soggetti alla guida di motocicli e ciclomotori⁸⁶.

Avendo considerato un periodo di tempo molto ampio è stata effettuata una suddivisione degli incidenti per ciascun anno (**figura 16**).

⁸⁶ Lusetti A., Dagoli S., Banchini A., Gentile M., Lezzi P., Cecchi R. 2022. Over 30-year retrospective analyses of moped-motorcycle fatal road accidents in the northern area of the Italian region of Emilia Romagna and review of the literature: Aiming for further preventive measures in the future. *Leg Med (Tokyo)*. 59:102139.

Il maggior numero di incidenti si è verificato nel primo e nel quinto anno considerati (1989 e 1993), mentre l'anno in cui si è registrato il numero più basso è il 2016 (solo 2 casi).

E' stata riscontrata una maggiore frequenza degli incidenti nel periodo estivo (giugno, luglio e agosto), rappresentativo di circa il 44.0% dei decessi totali.

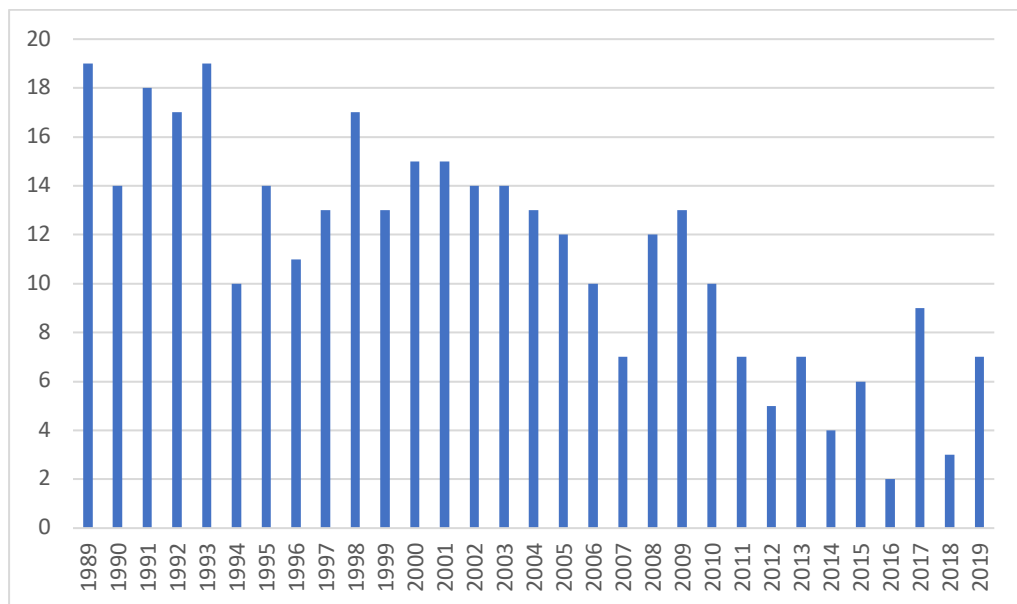


Figura 16. Distribuzione del numero di sinistri stradali dal 1989 al 2019.

Un elemento estremamente importante che è stato valutato nello studio riguarda la presenza o meno del casco da parte del guidatore. L'informazione è stata reperita nel 74.3% dei casi (figura 17).

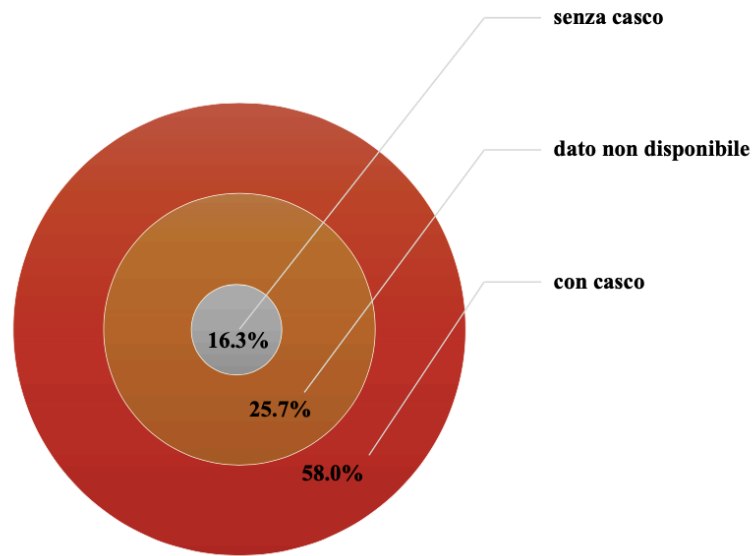


Figura 17. Dati relativi all'uso del casco⁸⁶.

Identikit della positività ad alcol

L'analisi dell'alcolemia è stata effettuata in tutte le 228 autopsie giudiziarie (65.1% del totale dei casi). Le caratteristiche della positività ad alcol da parte del guidatore sono riassunte nella **figura 18**.

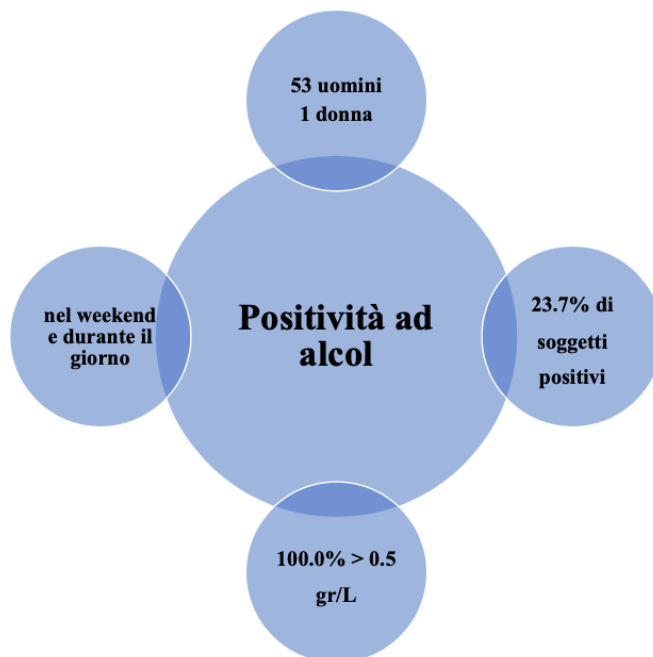


Figura 18. Caratteristiche della positività ad alcol⁸⁶.

I dati circostanziali considerati ed analizzati per il presente studio sono stati confrontati con altri studi internazionali presenti in letteratura (tabella 4).

Tabella 4. Dati circostanziali comparati con altri studi internazionali⁸⁶.

ARTICOLO	TIPOLOGIA DI CASI	PAESE	N. DI CASI	SESSO	GUIDATORI/PASSEGGERI SESSO PREDOMINANTE	ETA' MEDIA	USO DEL CASCO	POSITIVITA' ALCOL	MODALITA' SINISTRO
Hefny et al. (2012) ⁸⁷	Soggetti ospedalizzati	Emirati Arabi	95	98.0% M ⁱ 2.0% F	//	29.8	//		Impatto con altro veicolo 50.5%
Ankarath et al. (2002) ⁸⁸	Soggetti ospedalizzati	Regno Unito	1239	90.4% M 9.6% F	95.9% guidatori 4.1% passeggeri	30.7	//	//	//
Wick et al. (1998) ⁸⁹	Soggetti ospedalizzati	Germania	546	90.7% M 9.3% F	//	28.8	98.8%	1.2%	Impatto con altro veicolo 75.0%
Crandon et al. (2009) ⁹⁰	Soggetti ospedalizzati	Jamaica	270	95.2% M 4.8% F	90.3% guidatori (100.0%M) 9.6% passeggeri (72.2% F)	//	54.9%	//	Fuoriuscita di strada 62.0%
Chichom-Mefire et al. (2015) ⁹¹	Soggetti ospedalizzati	Cameroon	621	50.0% M 50.0% F	46.2% guidatori (100.0% M) 53.8% passeggeri (100.0% F)	34.0	2.2%	9.0% ⁱⁱ	//
Nakahara et al. (2005) ⁹²	Soggetti ospedalizzati	Tailandia	9948	74.7% M 25.3% F	//	//	25.1%	36.5% ⁱⁱⁱ	//
Fitzharris et al. (2009) ⁹³	Soggetti ospedalizzati	India	378	88.1% M 21.9% F	66.7% guidatori (97.2% M) 33.3% passeggeri (69.8% M)	31.3	19.6%	12.7% ^{iv}	//
Barzegar et al. (2020) ⁹⁴	Soggetti deceduti	Iran	28356	95.3% M 4.7% F	77.4% guidatori 21.1% passeggeri 1.5% ignoto	//	37.4%	//	Impatto con altro veicolo 80.0%
Takeda et al. (2017) ⁹⁵	Soggetti deceduti	Giappone	29	89.7% M 10.3% F	//	61.0	93.1%	0.0%	//
Ramli et al. (2014) ⁹⁶	Soggetti deceduti	Malesia	177	93.2% M 6.8% F	92.1% guidatori 7.9% passeggeri	//	37.9%	58.0%	Impatto con altro veicolo 82.5%
Presente studio (2022) ⁸⁶	Soggetti deceduti	Italia	350	91.4% M 8.6% F	94.86% guidatori (94.3% M) 5.14% passeggeri (61.1% F)	39.9	48.0%	25.0% ^{iv}	Impatto con altro veicolo 76.8%

i M-maschi F-femmine; ii consumo di alcol segnalato ma non testato; iii consumo di alcol accertato con intervista al paziente; iv % testati per alcol

⁸⁷ Hefny A.F., Barss P., Eid H.O., Abu-Zidan F.M. 2012. Motorcycle-related injuries in the United Arab Emirates. *Accid. Anal. Prev.* 49:245–248.

⁸⁸ Ankarath S., Giannoudis P.V., Barlow I., Bellamy M.C., Matthews S.J., Smith R.M. 2022. Injury patterns associated with mortality following motorcycle crashes. *Injury.* 33:473–477.

⁸⁹ Wick M., Müller E.J., Ekkernkamp A., Muhr G. 1998. The motorcyclist: easy rider or easy victim? An analysis of motorcycle accidents in Germany. *Am. J. Emerg. Med.* 16:320–323.

⁹⁰ Crandon I.W., Harding H.E., Cawich S.O., McDonald A.H., Fearron-Boothe D. 2009. Motorcycle accident injury profiles in Jamaica: an audit from the University Hospital of the West Indies. *Int. J. Inj. Contr. Saf. Promot.* 16:175–

⁹¹ Chichom-Mefire A., Atashili J., Tsiagadigui J.G., Fon-Awah C., Ngowe-Ngowe M. 2015. A prospective pilot cohort analysis of crash characteristics and pattern of injuries in riders and pillion passengers involved in motorcycle crashes in an urban area in Cameroon: lessons for prevention. *BMC Public Health.* 15:915.

⁹² Nakahara S., Chadbunchachai W., Ichikawa M., Tipsuntornsak N., Wakai S. 2005. Temporal distribution of motorcyclist injuries and risk of fatalities in relation to age, helmet use, and riding while intoxicated in Khon Kaen, Thailand. *Accid. Anal. Prev.* 37: 833–842.

⁹³ Fitzharris M., Dandona R., Kumar G.A., Dandona L. 2009. Crash characteristics and patterns of injury among hospitalized motorised two-wheeled vehicle users in urban India. *BMC Public Health.* 9:11.

⁹⁴ Barzegar A., Ghadipasha M., Forouzesh M., Valiyari S., Khademi A. 2020. Epidemiologic study of traffic crash mortality among motorcycle users in Iran (2011–2017). *Chin. J. Traumatol.* 23:219–223.

⁹⁵ Takeda A., Hitosugi M., Furukawa S. 2017. Autopsy Cases of Motorcyclists Dying of Trauma or Disease. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 38:222–225.

⁹⁶ Ramli R., Oxley J., Noor F.M., Abdullah N.K., Mahmood M.S., Tajuddin A.K., McClure R. 2014. Fatal injuries among motorcyclists in Klang Valley, Malaysia. *J. Forensic Leg. Med.* 26:39–45.

Soltanto alcuni studi considerati prendevano in considerazione solo soggetti deceduti, mentre diversi studi consideravano anche pazienti ospedalizzati e sopravvissuti al sinistro stradale.

Proprio come emerso dal nostro studio, il sinistro stradale ha coinvolto prevalentemente soggetti di sesso maschile alla guida del veicolo e femmine tra i passeggeri. La modalità predominante è quella della collisione con un altro veicolo.

La positività all'alcol da parte del conducente è stata valutata solo in alcuni studi considerati e i risultati sono contrastanti a seconda dello studio considerato.

In Germania solo circa 1.0% dei soggetti è risultato positivo all'alcolemia e in Giappone addirittura tutti i soggetti analizzati presentavano un'alcolemia pari a 0 gr/L.

Al contrario, nel nostro studio è emersa una positività ad alcol (>0.5 gr/L) in $\frac{1}{4}$ dei soggetti investigati mentre nello studio condotto in Malesia quasi il 60.0% dei soggetti analizzati presentava una positività ad alcol.

1.5.3.2. Risultati dati traumatologici

Le lesioni sono state suddivise in base alla loro localizzazione in diversi distretti corporei:

- Testa
- Torace
- Addome
- Arti superiori
- Arti inferiori

In tutti i casi analizzati è stato riscontrato un politrauma che quindi ha coinvolto contemporaneamente diverse localizzazioni corporee.

Un maggior coinvolgimento è risultato a carico delle estremità (90.5%), della testa (87.4%) e del torace (85.7%) e questo viene evidenziato anche dall'analisi svolta a carico delle specifiche lesioni⁸⁶ (**figura 19**).

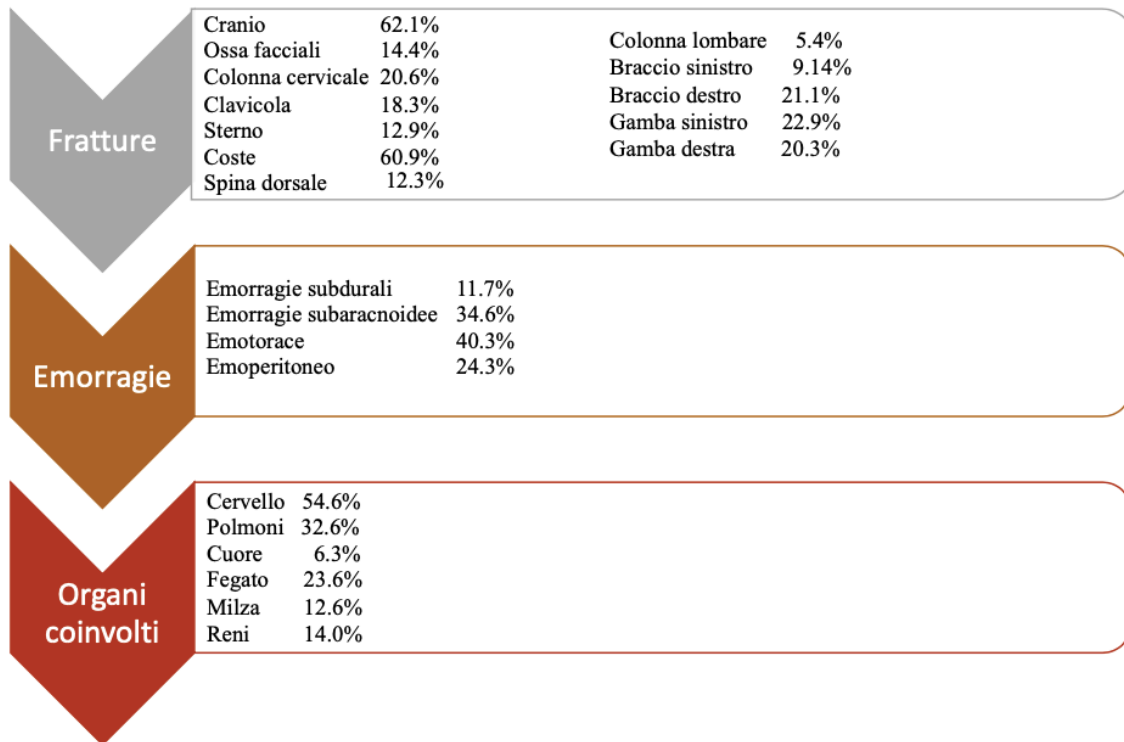


Figura 19. Descrizione di fratture, emorragie e lesioni d'organo riscontrate⁸⁶.

Le fratture maggiormente riscontrate sono state a carico del cranio e delle costole, mentre in riferimento alle emorragie, quelle più frequenti sono state quelle subaracnoidee e l'emotorace. Gli organi più coinvolti sono risultati essere il cervello (1/2 dei casi) e i polmoni (1/3 dei casi). Anche per quanto riguarda le lesioni, è stata effettuata una comparazione con diversi articoli internazionali che presentavano una suddivisione simile dei diversi distretti corporei⁸⁶ (tabella 5).

Tabella 5. Confronto dei diversi distretti anatomici coinvolti con altri studi internazionali⁸⁶.

ARTICOLO	TIPOLOGIA DI CASI	PAESE	N. DI CASI	TESTA	TORACE	ADDOME	ARTI SUPERIORI	ARTI INFERIORI	ESTREMITA'
Hefny et al. (2012) ⁸⁷	Soggetti ospedalizzati	Emirati Arabi	95	10.3%	22.1%	9.5%	53.7%	48.4%	79.0%
Kraus et al. (2002) ⁹⁷	Soggetti ospedalizzati	Stati Uniti	4762	29.8%	12.2%	6.9%	10.9%	34.6%	///
Ankarath et al. (2002) ⁸⁸	Soggetti ospedalizzati	Regno Unito	1239	11.5% ^v	17.4%	12.8%	///	///	94.3%
Alicioglu et al. (2008) ⁹⁸	Soggetti ospedalizzati	Turchia	212	48.6%	7.1%	2.8%	///	///	50.0%
Markogiannakis et al. (2006) ⁹⁹	Soggetti ospedalizzati	Grecia	444	55.9%	30.6%	12.6%	///	///	36.0%
Wick et al. (1998) ⁸⁹	Soggetti ospedalizzati	Germania	546	12.8% ⁱⁱ	21.0%	2.6%	20.2%	46.0%	///
Crandon et al. (2009) ⁹⁰	Soggetti ospedalizzati	Jamaica	270	53.0%	46,7%	14,1%	///	///	///
Presente studio (2022) ⁸⁶	Soggetti deceduti	Italia	350	87.4% ⁱⁱ	85.7%	65.7%	86.9%	87.4%	90.5%

I dati traumatologici di nostro studio si differenziano dagli altri studi in quanto i soggetti analizzati presentano una percentuale di lesività maggiore rispetto ai soggetti considerati negli studi di comparazione. Questo dato può probabilmente essere ricondotto al fatto che i soggetti del presente studio sono tutti deceduti ed avevano subito un politrauma.

Altri studi, invece, hanno considerato sia pazienti ospedalizzati in seguito al sinistro sia soggetti deceduti, prendendo così in esame una maggior variabilità delle lesioni.

Nella maggior parte degli studi considerati, gli arti sono risultati il distretto maggiormente coinvolto dalle lesioni. Il secondo distretto più coinvolto è rappresentato a pari merito da cranio e torace.

⁹⁷ Kraus J.F., Peek-Asa C., Cryer H.G. 2002. Incidence, severity, and patterns of intrathoracic and intra-abdominal injuries in motorcycle crashes. *J. Trauma*. 52:548–553.

⁹⁸ Alicioglu B., Yalniz E., Es kin D., Yilmaz B. Motosiklet kazalarina bag li yaralanmalar [Injuries associated with motorcycle accidents]. 2008. *Acta Orthop. Traumatol. Turc*. 42:106–111.

⁹⁹ Markogiannakis H., Sanidas E., Messaris E., Koutentakis D., Alpantaki K., Kafetzakis A., Tsiftsis D. 2006. Motor vehicle trauma: analysis of injury profiles by road- user category. *Emerg. Med. J.* 23:27–31.

1.5.4. Discussione

Il presente studio è stato condotto con l'obiettivo di fornire maggiori informazioni a riguardo degli incidenti stradali mortali che hanno coinvolto soggetti alla guida di motocicli e ciclomotori, in un ampio periodo di tempo che comprende tre decenni.

L'importanza di questo tema è testimoniata dall'elevato numero di studi condotti sia a livello nazionale che internazionale, in conseguenza anche dell'imponente numero di vittime che ogni anno perdono la vita sulle strade di tutto il mondo.

Tra il 2011 e il 2021 sono 13 milioni le persone che a livello mondiale hanno perso la vita in seguito ad un incidente stradale¹⁰⁰.

La rilevanza del fenomeno ha portato l'Unione Europea a porsi ambiziosi, quanto importanti, traguardi per dimezzare le morti su strada.

A tal proposito, l'UE si è posta il traguardo di dimezzare le morti su strada nel decennio 2010-2020, mettendo in atto diverse misure sulla sicurezza e controlli stradali.

L'obiettivo prefissato è stato ampiamente raggiunto, infatti nel 2020 le morti su strada sono state il 37% in meno rispetto al 2010, risparmiando la morte a oltre 56000 persone se il trend fosse continuato ad essere quello del 2010¹⁰⁰.

Naturalmente, per poter contrastare questo tipo di fenomeno risulta fondamentale conoscere i potenziali fattori di rischio e gli elementi di protezione da poter attuare.

A riguardo dei fattori di rischio nella popolazione investigata, uno dei principali è risultato essere l'uso dell'alcol (il 23.7% dei soggetti analizzati presentava un'alcolemia > 0.5 gr/L).

La maggior parte delle vittime in cui in cui è stata riscontrata un'alcolemia superiore rispetto

¹⁰⁰ European Transport Safety Council (ETSC). 2021. 15 Annual Road Safety Performance Index (PIN) Report.

al valore consentito per legge, erano uomini e gli incidenti si sono verificati prevalentemente di notte e durante il fine settimana.

Come ampiamente dimostrato, l'uso dell'alcol è correlato ad una maggiore frequenza di incidenti stradali soprattutto tra i giovanissimi nella fascia d'età compresa tra i 18 e i 24 anni^{55,101}.

In questo studio oltre il 50.0% dei soggetti con un'alcolemia maggiore a 0.5 gr/L erano ragazzi con un'età compresa tra 20 e 30 anni.

La prevalenza dell'uso dell'alcol è in accordo con diversi studi condotti a livello nazionale^{56,57,80} e internazionale^{55,102}.

A riguardo degli elementi di prevenzione, uno estremamente rilevante per chi si pone alla guida (o chi è passeggero) di un veicolo a due ruote è rappresentato dal casco.

La presenza del casco, infatti, può determinare una diminuzione del numero e della gravità delle lesioni riscontrate.

In diversi studi condotti in Italia, l'introduzione dell'obbligo dell'uso del casco nel nostro paese ha portato ad una significativa riduzione della gravità delle lesioni riportate^{103,104}.

Tuttavia l'analisi della distribuzione delle lesioni in questo studio ha dimostrato la necessità di approntare e investigare nuovi dispositivi in grado di proteggere ulteriori aree del corpo come il tronco e le estremità.

¹⁰¹ Missoni E., Mlinarić-Vrbica S., Meschino M., Pancrazi E. 2018. Alcohol related crashes in Europe. *J J Alcohol Drug Depend. Subst. Abus.* 4:008.

¹⁰² European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. 2012. Driving Under the influence of Drugs, Alcohol and Medicines in Europe-findings from the DRUID project.

¹⁰³ La Torre G., Van Beeck E., Bertazzoni G., Ricciardi W. 2007. Head injury resulting from scooter accidents in Rome: differences before and after implementing a universal helmet law. *Eur J Public Health.* 17:607–611.

¹⁰⁴ Servadei F., Begliomini C., Gardini E., Giustini M., Taggi F., Kraus J. 2003. Effect of Italy's motorcycle helmet law on traumatic brain injuries. *Inj. Prev.* 9:257–260.

In particolare, oltre al casco, potrebbe risultare particolarmente utile l'utilizzo di altri dispositivi come i dispositivi di protezione paraschiena¹⁰⁵ o del torace^{106,107} che hanno dimostrato un'importante efficacia nel ridurre il numero e la gravità delle lesioni.

Tuttavia, allo stato attuale, il loro utilizzo non è normato quindi in conseguenza della mancata obbligatorietà sono scarsamente utilizzati da conducenti di mezzi a due ruote^{105,108}.

¹⁰⁵ Giustini M., Cedri S., Tallon M., Roazzi P., Formisano R., Pitidis A. 2014. Use of back protector device on motorcycles and mopeds in Italy. *Int. J. Epidemiol.* 43:1921–1928.

¹⁰⁶ Manzardo D., Pierini M., Delhayé A., Garcia Ruiz D., Bidal S., Peldschus S. 2009. Development of a thorax protector for motorcyclists. In: 21st International Conference on Enhanced Safety of Vehicles.

¹⁰⁷ Thollon L., Godio Y., Bidal S., Brunet C. 2010. Evaluation of a new security system to reduce thoracic injuries in case of motorcycle accidents. *Int. J. Crashworthiness.* 15:191–199.

¹⁰⁸ De Rome L., Ivers R., Fitzharris M., Dua W., Haworth N., Heritier S., Richardson D. 2011. Motorcycle protective clothing: protection from injury or just the weather? *Accid. Anal. Prev.* 43:1893–1900.

1.5.5. Conclusioni

In accordo con i risultati ottenuti da studi analoghi l'identikit del soggetto vittima dell'incidente ciclo-motociclistico rilevato da questo studio è rappresentato da un soggetto di sesso maschile, quarantenne, di nazionalità italiana, alla guida di un motociclo su strada extraurbana, durante i mesi primaverili ed estivi, coinvolto in uno scontro con un altro veicolo a motore^{87,88,89,91,93}.

Il coinvolgimento dell'alcol e l'uso dei dispositivi di protezione risultano elementi estremamente importanti da valutare e su cui agire al fine di evitare incidenti con esito fatale.

Un tentativo in tal senso fu fatto nel 2010 con l'emendamento 20.2 per il disegno di legge n. 1720 in materia di sicurezza stradale, con cui si intendeva introdurre nel nuovo codice della strada una norma per cui diventasse obbligatorio indossare abbigliamento protettivo.

Sempre l'emendamento 20.2, successivamente ritirato, riformava il codice della strada rendendo obbligatorio l'utilizzo del casco integrale.

In conclusione, interventi normativi in tal senso sarebbero auspicabili data la sempre più rapida evoluzione tecnica in ambito motociclistico, che permette di utilizzare in strada motocicli con prestazioni sempre maggiori.

Questo studio ha portato alla pubblicazione di un articolo scientifico in una rivista internazionale di settore forense nel corso del 2022:

Lusetti A, **Dagoli S**, Banchini A, Gentile M, Lezzi P, Cecchi R. Over 30-year retrospective analyses of moped-motorcycle fatal road accidents in the northern area of the Italian region of Emilia Romagna and review of the literature: Aiming for further preventive measures in the future. *Leg Med (Tokyo)*. 2022 Nov;59:102139. doi: 10.1016/j.legalmed.2022.102139. Epub 2022 Aug 22. PMID: 36055135.

Legal Medicine 59 (2022) 102139



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Legal Medicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/legalmed



Over 30-year retrospective analyses of moped-motorcycle fatal road accidents in the northern area of the Italian region of Emilia Romagna and review of the literature: Aiming for further preventive measures in the future

Andrea Lusetti¹, Sara Dagoli¹, Antonio Banchini, Martino Gentile, Pancrazio Lezzi, Rossana Cecchi

Legal Medicine, Department of Medicine and Surgery, University of Parma, Viale Gramsci 14, 43126 Parma, Italy

ARTICLE INFO

Keywords:
Road traffic
Death
Helmet
Motorcycle
Injuries

ABSTRACT

Road traffic injuries are a major cause of morbidity and mortality worldwide, with pedestrians and riders of two-wheeled motor vehicles being the most vulnerable. The present study aims to determine the epidemiological characteristics of fatal motorcycle crashes in a portion of the Italian region of Emilia Romagna, and to compare them with the data available in literature.

Data were retrieved from autopsy reports on 350 subjects who died following road accidents involving moped or motorcycle in the cities of Parma, Piacenza, and Reggio Emilia. Two types of data were extrapolated: circumstantial and traumatological. The population was divided into subgroups according to gender, crash time, alcohol positivity, presence or absence of the helmet, and the period elapsed between the accident and death.

Most of the considered road accidents occurred during the day and on weekends. 25.5 % of the victims tested positive for alcohol. As far as traumas are concerned, the limbs resulted to be the most affected body segment, followed by the head (87.4 %), the thorax (85.7 %), the abdomen (65.7 %), and lastly the neck (50.3 %).

According to similar studies, the sample victim of a moped/ motorcycle accident is a young male subject. The results obtained allow us to demonstrate that the mandatory use of the helmet has reduced skull and brain injury over the years. At present, no law regulates the use of protections for other body parts. Regulatory interventions in this sense would be desirable given the ever more rapid technical evolutions in the field of motorcycles.

Capitolo 2

Il secondo capitolo è focalizzato sullo studio di due tra le principali classi di nuove sostanze psicoattive (NPS): i *cannabinoidi sintetici* e gli *oppioidi sintetici*, nel fluido orale.

Nella parte introduttiva del capitolo vengono inquadrati le NPS (sezione 2.1.), vengono descritte le principali matrici biologiche utilizzate in tossicologia forense (sezione 2.2.), con particolare attenzione alla saliva, in quanto ha rappresentato la matrice utilizzata nei due lavori sperimentali presentati in questo capitolo.

Inoltre, vengono illustrate le principali caratteristiche delle metodologie analitiche forensi utilizzate per lo svolgimento dei due lavori sperimentali (sezione 2.3.).

Nella sezione 2.4. viene proposto un excursus legislativo relativo alla giurisprudenza delle sostanze stupefacenti in Italia, partendo dal Codice Zanardelli del 1889 fino ai giorni nostri.

Relativamente ai *cannabinoidi* (sezione 2.5.) vengono descritte le principali caratteristiche, in particolar modo in relazione ai cannabinoidi sintetici, accanto ad una disamina degli effetti più importanti che tali sostanze presentano sul corpo umano.

La parte sperimentale relativa ai cannabinoidi sintetici ha avuto come obiettivo primario l'applicazione di un metodo analitico, precedentemente validato dal Laboratorio di Tossicologia Forense UniPr, su campioni di fluido orale raccolti da soggetti in cura presso il Servizio per le Dipendenze Patologiche (SerDP) di Parma, allo scopo di rilevare un'eventuale positività a tali composti.

Il lavoro iniziato con la saliva è poi proseguito con la validazione di un metodo analitico per il rilevamento di sostanze appartenenti ad un'altra classe di NPS, gli *oppioidi sintetici* (sezione 2.6.), ed in particolare di fentanyl e butyrylfentanyl (BF).

Dapprima, vengono presentate le principali caratteristiche di questa classe di sostanze e viene proposto un quadro generale a riguardo dell'emergenza relativa all'abuso di oppioidi negli Stati Uniti, con uno sguardo volto alla situazione in Europa e, di conseguenza, in Italia.

Prima di iniziare con la parte sperimentale relativa agli oppioidi sintetici, vengono descritte le caratteristiche dei due analiti considerati (fentanyl e BF).

Per quanto riguarda il fentanyl, farmaco analgesico in uso da decenni, ne viene descritta la storia, dalla scoperta fino all'uso terapeutico attuale.

2. Introduzione

2.1. Le Nuove sostanze psicoattive (NPS)

Le nuove sostanze psicoattive (NPS) sono un gruppo eterogeneo di sostanze stupefacenti¹⁰⁹, prodotte illegalmente da laboratori illeciti, vendute in molti modi, soprattutto via internet e rese appetibili anche ai giovanissimi. Le NPS vengono anche chiamate colloquialmente “legal highs”¹¹⁰. La definizione data dall’Ufficio delle Nazioni Unite per la Droga e il Crimine (UNODC) è: “sostanze d’abuso, in forma pura o in un preparato, che non sono controllate dalla Convenzione Unica del 1961 sui Narcotici o dalla Convenzione del 1971 sulle Sostanze Psicotrope, ma che possono costituire una minaccia per la salute pubblica”¹¹¹.

Nonostante alcune di queste sostanze siano state sintetizzate da diversi anni, il termine “nuovo” si riferisce al fatto che siano state immesse solo recentemente nel commercio illecito¹¹². L’utilizzo delle NPS è un fenomeno globale in continua espansione.

Dal report di UNODC sulle nuove sostanze psicoattive pubblicato a luglio 2024, sono 1245 i composti finora individuati e riportati da 142 paesi in tutto il mondo¹¹³.

Per quanto riguarda le nuove sostanze emerse nel corso del 2023 i due gruppi più significativi sono rappresentati dai cannabinoidi sintetici e dagli oppioidi sintetici (**tabella 6**).

¹⁰⁹ Pichini S., Busardo F.P., Pacifici R., Kintz P. 2017. EDITORIAL New Psychoactive Substances (NPS), a New Global Issue: Neuropharmacological, Chemical and Toxicological Aspects. *Curr Neuropharmacol*. 15:656-657.

¹¹⁰ Luethi D., Liechti M.E. 2020. Designer drugs: mechanism of action and adverse effects. *Arch Toxicol*; 94: 1085-1133.

¹¹¹ United Nations office on Drugs and Crime. Global smart update 2016.

¹¹² Peacock A., Bruno R., Gisev N., Degenhardt L., Hall W., Sedefov R. 2019. New psychoactive substances: challenges for drug surveillance, control, and public health responses. *Lancet*. 394:1668-84.

¹¹³ United Nations Office on Drugs and Crime. 2024. Current NPS Threats. Volume VII.

Tabella 6. NPS emerse nel 2023¹¹⁴

Nome comune	Nome IUPAC	Classificazione secondo EMCDDA	Data della notifica	Paese
A-PBITMO	(Adamantan-1-yl)(3-pentyl-2-thioxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)methanone	cannabinoide	18/12/2023	Germania
Hexahydrocannabihexol (HHCH)	3-hexyl-6,6,9-trimethyl-6a,7,8,9,10,10a-hexahydrobenzo[c]chromen-1-ol	cannabinoide	18/09/2023	Svizzera
Tetrahydrocannabiphorol (THCP)	3-heptyl-6a,7,8,10a-tetrahydro-6,6,9-trimethyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-1-ol	cannabinoide	13/09/2023	Belgio
NMDMSB	1-naphthyl 4-methyl-3-(dimethylsulfamoyl)-benzoate	cannabinoide	03/07/2023	Ungheria
CUMYL-3TMS-PRINACA	N-(2-phenylpropan-2-yl)-1-(3-(trimethylsilyl)propyl)-1H-indazole-3-carboxamide	cannabinoide	03/05/2023	Svezia
MDMB-BINACA	methyl 2-(1-butyl-1H-indazole-3-carboxamido)-3,3-dimethylbutanoate	cannabinoide	11/05/2023	Svezia
Tetrahydrocannabidiol (H4-CBD)	2-(2-isopropyl-5-methylcyclohexyl)-5-pentylbenzene-1,3-diol	cannabinoide	03/04/2023	Svezia
ADMB-3TMS-PRINACA	N-(1-amino-3,3-dimethyl-1-oxobutan-2-yl)-1-(3-(trimethylsilyl)propyl)-1H-indazole-3-carboxamide	cannabinoide	31/03/2023	Germania
Hexahydrocannabiphorol (HHC-P)	3-Heptyl-6a,7,8,9,10,10a-hexahydro-6,6,9-trimethyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-1-ol	cannabinoide	06/01/2023	Slovenia
N-desethyl isotonitazene	N-ethyl-2-[2-[(4-isopropoxyphenyl)methyl]-5-nitro-benzimidazol-1-yl]ethanamine	oppioide	22/12/2023	Portogallo
N-desethyl etonitazene	2-[2-[(4-ethoxyphenyl)methyl]-5-nitro-benzimidazol-1-yl]-N-ethyl-ethanamine	oppioide	21/12/2023	Svezia
Metonitazepyne	2-(4-methoxybenzyl)-5-nitro-1-(2-(pyrrolidin-1-yl)ethyl)-1H-benzo[d]imidazole	oppioide	23/10/2023	Svezia

¹¹⁴ European Union Drugs Agency (EUDA). 2024. New psychoactive substances- the current situation in Europe (European Drug Report 2024).

Protonitazepyne	5-nitro-2-[(4-propoxyphenyl)methyl]-1-(2-pyrrolidin-1-ylethyl)benzimidazole	oppioide	31/07/2023	Slovenia
2'-Fluoro-2-fluoro-3-methylfentanyl	N-(1-(2-fluorophenethyl)-3-methylpiperidin-4-yl)-N-(2-fluorophenyl)propionamide	oppioide	03/03/2023	Germania
Ethyleneoxynitazene	2-{2-[(2,3-dihydro-1-benzofuran-5-yl)methyl]-5-nitro-1H-benzimidazol-1-yl}-N,N-diethylethan-1-amine	oppioide	24/02/2023	Estonia
Etomethazene	2-[(4-ethoxyphenyl)methyl]-N,N-diethyl-5-methyl-1H-benzimidazole-1-ethanamine	oppioide	19/01/2023	Svezia

Con l'avvento dell'epidemia di Sars-Cov 2 il mercato illecito ed il relativo abuso di droghe si sono spostati verso sostanze alternative rispetto alle comuni droghe d'abuso¹¹⁵.

Gli oppioidi, i cannabinoidi e i catinoni sintetici hanno rappresentato le principali classi di NPS consumate durante gli anni della pandemia¹¹⁶.

¹¹⁵ Corazza O., Guirguis A., Negri A., Di Trana A., Carlier J., Berretta P., Zaami S., Ricci G. 2020. Consequences of COVID-19 Lockdown on the Misuse and Marketing of Addictive Substances and New Psychoactive Substances. *Front. Psychiatry*; 11: 584462.

¹¹⁶ Lo Faro A.F., Berardinelli D., Cassano T., Dendramis G., Montanari E., Montana A., Berretta P., Zaami S., Busardò F.P., Huestis M.A. 2023. New Psychoactive Substances Intoxications and Fatalities during the COVID-19 Epidemic. *Biology (Basel)*; 12:273.

Tra gennaio 2020 e marzo 2022, considerando la condizione di intossicazione, sono 25 i casi riportati^{117,118,119,120,121,122}. La maggior parte di questi casi ha riguardato i cannabinoidi sintetici, seguiti da catinoni sintetici ed oppioidi sintetici.

In riferimento ai casi di decesso, sono stati segnalati 130 soggetti deceduti^{123,124,125,126,127}. Il maggior numero di vittime è stato causato da oppioidi sintetici (58 casi)^{128,129,130}. 43 di questi decessi sono stati causati dall'uso di fentanyl, utilizzato da solo o in combinazione con altre sostanze^{123,124,129}.

¹¹⁷ Verougstraete N., Vandeputte M.M., Lyphout C., Cannart A., Hulpia F., Van Calenbergh S., Verstraete A.G., Stove C. 2020. First Report on Brorphine: The Next Opioid on the Deadly New Psychoactive Substance Horizon? *J. Anal. Toxicol*; 44: 937–946.

¹¹⁸ European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EUDA). 2022. Report on the New Psychoactive Substance 2-(Methylamino)-1-(3- methylphenyl)propan-1-one (3- methylmethcathinone, 3-MMC) in Accordance with Article 5c of Regulation (EC) No 1920/2006 (as Amended); European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction: Lisbon, Portugal.

¹¹⁹ Krotulski A.J., Cannart A., Stove C., Logan B.K. 2021. The next generation of synthetic cannabinoids: Detection, activity, and potential toxicity of pent-4-en and but-3-en analogues including MDMB-4en-PINACA. *Drug Test. Anal*; 13: 427–438.

¹²⁰ European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EUDA). 2021. Report on the Risk Assessment of Methyl 2-([1-(4-Fluorobutyl)-1Hindole-3-carbonyl] amino)-3,3-dimethylbutanoate (4F-MDMB-BICA) in Accordance with Article 5c of Regulation (EC) No 1920/2006 (as Amended); European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction: Lisbon, Portugal.

¹²¹ European Monitoring Centre for Drugs and Addiction (EUDA). 2020. Initial Report on the New Psychoactive Substance N,N-diethyl-2,4-(1- methylethoxy)phenylmethyl-5-nitro-1H-benzimidazole-1-ethanamine Isotonitazene; European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction: Lisbon, Portugal.

¹²² Mata D.C.; Coleman D. 2021. Unusually High Concentration of Fentanyl in a Driver: A Case Report. *J. Anal. Toxicol*. 45:847–850.

¹²³ Dybowski M.P., Dawidowicz A.L. 2020. Furanylfentanyl in whole blood measured by GC–MS/MS after QuEChERS extraction in a fatal case. *Forensic Toxicol*; 38: 496–504.

¹²⁴ Truver M.T., Chronister C.W., Kinsey A.M., Hoyer J.L., Goldberger B.A. 2022. Toxicological Analysis of Fluorofentanyl Isomers in Postmortem Blood. *J. Anal. Toxicol*; 46: 835–843.

¹²⁵ Krotulski A.J., Papsun D.M., Chronister C.W., Homan J., Crosby M.M., Hoyer J., Goldberger B.A., Logan B.K. 2021. Eutylone Intoxications-An Emerging Synthetic Stimulant in Forensic Investigations. *J. Anal. Toxicol*; 45: 8–20.

¹²⁶ Krotulski A.J., Papsun D.M., Noble C., Kacinko S.L., Logan B.K. 2021. Brorphine—Investigation and quantitation of a new potent synthetic opioid in forensic toxicology casework using liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Forensic Sci*; 66: 664–676.

¹²⁷ Krotulski A.J., Papsun D.M., Kacinko S.L., Logan B.K. 2021. Isotonitazene Quantitation and Metabolite Discovery in Authentic Forensic Casework. *J. Anal. Toxicol*; 44: 521–530.

¹²⁸ Vohra V., King A.M., Jacobs E., Aaron C. 2021. Death associated with brorphine, an emerging novel synthetic opioid. *Clin. Toxicol*; 59: 851–852.

¹²⁹ Feisthauer E., Farrugia A., Ameline A., Gheddar L., Arbouche N., Raul J.S., Kintz P. 2021. Interest in testing for 4-ANPP in biological matrices as a precursor of exposure to fentanyl or to a fentanyl derivative. *Toxicol. Anal. Clin*; 33: 338–342.

¹³⁰ The Center for Forensic Science Research and Education. 2021. New High Potency Synthetic Opioid N-Pyrrolidino Etonitazene (Etonitazepyne) Linked to Overdoses across United States. 2021.

Le NPS appartengono a numerose diverse classi, tra cui le principali sono¹³¹:

- Cannabinoidi sintetici
- Catinoni sintetici
- Oppioidi sintetici
- Aminoindani
- Triptamine
- Piperazine
- Fenidati
- Nitazeni
- Lisergamidi
- Fenetilammine
- Fenmetrazine

Queste classi di sostanze hanno la capacità di stimolare o deprimere il sistema nervoso centrale e gli effetti, purtroppo, non sono sempre catalogabili dagli enti preposti, come il Ministero della Salute.

Questo costituisce non solo un problema giudiziario ma anche, e soprattutto, un problema di sicurezza e tutela della salute pubblica.

Il fatto di non essere sempre catalogabili diviene problematico ai fini della loro identificazione, in quanto attualmente spesso sfuggono ai test di screening e alle metodiche di analisi utilizzati per le sostanze d'abuso "più classiche".

¹³¹ United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). 2024. Early Warning Advisory on New Psychoactive Substances.

Negli ultimi anni sono state messe a punto tecniche di tossicologia forense tramite cui identificare queste molecole in diverse matrici biologiche^{132,133,134,135}.

¹³² Alexandridou A., Mouskeftara T., Raikos N., Gika H.G. 2020. GC/MS analysis of underivatized new psychoactive substances in whole blood and urine. *J Chromatogr B Analyst Technol Biomed Life Sci*; 1156: 122308.

¹³³ Dei Cas M., Casagni E., Arnoldi S., Gambaro V., Roda G. 2019. Screening of new psychoactive substances (NPS) by gas-chromatography/time of flight mass spectrometry (GC/MS-TOF) and application to 63 cases of judicial seizure. *Forensic Sci Int Synerg*;71-78.

¹³⁴ Ameline A., Garnier D., Gheddar L., Richeval C., Gaulier J.M., Raul J.S., Kintz P. Identification and analytical characterization of seven NPS, by combination of (1) H NMR spectroscopy, GC-MS and UPLC-MS/MS, to resolve a complex toxicological fatal case. *Forensic Sci Int*; 298: 140-148.

¹³⁵ Antunes M., Sequeira M., de Caires Pereira M., Caldeira M.J., Santos S., Franco J., Barros M., Gaspar H. *J Anal Toxicol*; 45: 233-242.

2.2. Aspetti analitico-tossicologici in campo forense

Le analisi tossicologiche per la ricerca di xenobiotici (farmaci, composti tossici, sostanze stupefacenti o psicotrope) sono richieste sia per finalità cliniche che medico-legali. Nell'ambito della tossicologia forense, l'impiego della Spettrometria di Massa (MS), in combinazione con una tecnica di separazione di tipo cromatografico, come Gascromatografia (GC), Cromatografia Liquida (LC) o di tipo elettroforetico, per analisi di conferma, ha trovato il consenso generale della comunità scientifica nazionale ed internazionale¹³⁶. Il Gruppo Tossicologi Forensi Italiani (GTFI) adotta la spettrometria di massa accoppiata ad una metodica cromatografica come tecnica identificativa di elezione per l'analisi di conferma. Le linee guida in tema di accertamenti analitici di sostanze d'abuso a scopo tossicologico-forense e medico-legale furono elaborate per la prima volta nel 2000, proprio dalla Commissione Qualità dell'Associazione Scientifica GTFI e sono oggetto di revisioni periodiche che tengono conto dei più recenti aggiornamenti legislativi e tecnologici¹³⁷. L'ultimo aggiornamento risale al settembre 2023¹³⁸.

Gli accertamenti di sostanze d'abuso a scopo forense, infatti, sono suscettibili di continuo miglioramento analitico, dovuto non solo al consolidamento di nuove metodologie e strumentazioni, ma soprattutto ai progressi scientifici nell'individuazione di nuovi marcatori

¹³⁶ Bertol E. 2016. Compendio di Tossicologia Forense: aspetti analitici, interpretativi e giuridici. Società editrice Esculapio.

¹³⁷ Gruppo Tossicologi Forensi Italiani (GTFI). 2017. Linee guida per le strutture dotate di laboratori per gli accertamenti di sostanze d'abuso con finalità tossicologico-forensi e medico-legali su campioni biologici prelevati da vivente. Revisione n.5 del 29 maggio 2017.

¹³⁸ Strano Rossi S., Frison G., Chericoni S., Bertol E., Favretto D., Pichini S. et al. 2023. Linee guida per la determinazione di sostanze stupefacenti e psicotrope su campioni biologici con finalità tossicologico-forensi e medico-legali. *Riv Ital Med Lab.* 19:192-205.

specifici di abuso, nella possibilità di utilizzare matrici biologiche alternative o complementari a quelle di impiego tradizionale^{139,140}.

Le linee guida GTFI hanno l'obiettivo primario di diffondere la cultura analitico-tossicologica applicata alla diagnosi a scopo forense.

Inoltre, hanno l'intento di rappresentare uno strumento di riferimento per un corretto approccio analitico improntato all'armonizzazione e alla confrontabilità dei risultati, fornendo indicazioni e raccomandazioni sulle diverse fasi degli accertamenti con finalità medico-legali¹³⁷.

Gli accertamenti effettuati su sostanze d'abuso a scopo forense assumono carattere di prova giudiziaria e per questo motivo devono possedere requisiti di certezza e affidabilità, nonché di trasparenza e, possibilmente, di uniformità nazionale. Il raggiungimento di un'elevata affidabilità e riproducibilità dell'intero processo analitico risulta essere fondamentale data la valenza legale del dato fornito e per tale motivo, nelle linee guida vengono descritte, in maniera dettagliata, tutte le attività necessarie al corretto svolgimento di ogni tipo di accertamento analitico e le conseguenti procedure. Un elevato livello qualitativo dei risultati dei suddetti accertamenti è assicurato non solo dall'utilizzo di metodi e tecniche consolidate e condivise dalla società scientifica, ma anche dalla certezza che gli stessi risultati provengano da strutture scientificamente preparate, costantemente aggiornate e dotate di un'organizzazione efficiente.

Nelle linee guida GTFI viene, inoltre, posta particolare attenzione alla scelta delle matrici biologiche da analizzare in funzione delle diverse finalità diagnostiche in ambito

¹³⁹ Pichini S., Pacifici R., Mortali C., Gori P., Marchei E., Martucci L., Palmi I., Pellegrini M., Rotolo M.C. 2013. Linee guida per la determinazione delle sostanze d'abuso nella saliva. Istituto Superiore di Sanità.

¹⁴⁰ Pichini S., Pacifici R., Gori P., Marchei E., Martucci L., Mastrobattista L., Palmi I., Pellegrini M., Rotolo M.C. 2013. Linee guida per la determinazione delle sostanze d'abuso nella matrice pilifera. Istituto superiore di Sanità.

tossicologico-forense e medico-legale, nonché alle diverse procedure da adottare in fase di raccolta del campione e della sua conservazione¹³⁸.

Il sistema di gestione per la qualità deve comprendere, oltre all'analisi di screening, anche l'analisi di conferma. L'analisi di screening rappresenta un tipo di analisi preliminare che fornisce solo un risultato presuntivo, ovvero la probabile negatività o positività di un campione rispetto ad una sostanza o ad una classe di sostanze, in riferimento ad un valore di CUT-OFF prestabilito. Per definizione, un risultato ottenuto con un'analisi di screening non può assumere valore legale.

E' pertanto indispensabile che tale risultato sia verificato con un'analisi di conferma. Tale analisi, infatti, viene usata per confermare un dato preliminare e risulta necessaria ad escludere che non vi siano falsi positivi o falsi negativi a causa della non specificità dei test iniziali.

2.2.1. Principali matrici biologiche

Le analisi tossicologiche possono avvalersi dell'esame di diversi campioni biologici (come sangue, urina, capelli, saliva, contenuto gastrico, bile, sudore e umor vitreo) che permettono da soli, o in combinazione tra loro, di esprimere diagnosi con valenza medico-legale in diverse fattispecie, tra cui: idoneità alla guida, infortunistica stradale, mansioni lavorative a rischio, esami tossicologici in seguito ad accertamento autoptico, porto d'armi, idoneità a specifiche norme concorsuali e affidamento di minori¹⁴¹. In questi casi, tali analisi possono assumere carattere di prova giudiziaria e pertanto devono possedere precisi requisiti di certezza e affidabilità, dimostrabili attraverso documentazione e rintracciabilità di ogni fase analitica, nonché di trasparenza ed uniformità.

A tal proposito, è auspicabile giungere, a livello nazionale, ad un elevato grado di condivisione delle procedure pre-analitiche (accettazione campione, consenso informato e prelievo), analitiche (trattamento campione, analisi strumentale) e post-analitiche (refertazione e conservazione del campione)¹⁴².

La scelta della matrice da utilizzare, per effettuare una determinata analisi, rappresenta una fase molto importante di tutta la filiera analitica, in quanto, le diverse matrici oggi a disposizione della tossicologia forense, sono in grado di fornire informazioni diverse.

Tra le principali matrici utilizzate in campo tossicologico-forense e medico-legale vi sono sangue, urina, capelli e saliva.

¹⁴¹ Frolidi R. 2001. Lezioni di tossicologia forense. G. Giappichelli Editore-Torino.

¹⁴² Gagliano-Candela R. 2001. Tossicologia forense in schemi, tabelle e teso. Giuffrè Editore.

Sangue

Il sangue è la matrice biologica di elezione per dimostrare l'attualità di consumo di una sostanza. È idoneo per la determinazione di xenobiotici in campo clinico, per dimostrare l'assunzione di alcol e/o sostanze stupefacenti durante la guida, nello svolgimento di mansioni lavorative a rischio e in ambito medico-legale¹⁴³. La concentrazione ematica della sostanza ricercata, infatti, consente di stabilire o di escludere la recente assunzione di una sostanza ed è direttamente correlabile allo status psicofisico del soggetto al momento del prelievo.

In riferimento al Nuovo Codice della Strada, i protocolli operativi per gli accertamenti richiesti dall'art. 186 e art. 187 prevedono che il prelievo ematico possa essere effettuato presso le competenti strutture sanitarie solo con il consenso del conducente oppure, in caso di rifiuto, su disposizione dell'Autorità Giudiziaria.

I laboratori che effettuano analisi per la ricerca di sostanze d'abuso nella matrice ematica devono istituire una catena di custodia dei campioni al fine di documentare il controllo e la tracciabilità degli stessi dal momento del prelievo, alla loro accettazione nel laboratorio che effettua le analisi, fino al completamento delle analisi stesse, inclusi la refertazione del risultato, la conservazione e lo smaltimento finale del materiale residuo¹⁴³.

La raccolta del campione deve essere effettuata da personale qualificato ed autorizzato, che deve spiegare la procedura di raccolta del campione alla persona sottoposta ad accertamento analitico. Inoltre, il personale è tenuto a compilare il verbale di prelievo, il modulo della catena di custodia e far firmare il consenso informato.

¹⁴³ Pichini S., Bucchioni P., Pellegrini M., Pacifici R., Bacosi A., Di Carlo S., Franceschini P., Gori P., Martucci L., Martucci P., Mastrobattista L., Minutillo A., Mortali C., Petriccioni G., Rotolo M.C., Sbarbaro I.M., Toth G. 2013. Linee guida per la determinazione delle sostanze d'abuso su sangue. Istituto Superiore di Sanità.

Urina

L'urina è fra le matrici biologiche di elezione nelle analisi per la ricerca delle sostanze d'abuso¹⁴⁴. Il suo utilizzo presenta diversi vantaggi: modalità di raccolta non invasiva, campionamento di grandi volumi e l'importante possibilità di rilevare la sostanza parente e/o i suoi metaboliti dopo diversi giorni dall'assunzione.

Mentre, il principale limite risiede nella scarsa rilevanza clinica dell'analisi quantitativa in quanto la concentrazione degli analiti in tale matrice varia con la dose assunta, in funzione della via di assunzione, del periodo di tempo intercorso fra l'assunzione e la raccolta del campione e dello stato fisico dell'individuo¹⁴⁴. Tale fluido biologico, quindi, non fornisce informazioni esatte sulle quantità di sostanza consumata. Inoltre, non è correlabile alla concentrazione ematica né, quindi, alle manifestazioni clinico-sintomatologiche del soggetto assuntore al momento del prelievo del campione.

L'analisi tossicologica su matrice urinaria, pertanto, può solo dare indicazioni circa la presenza o meno di una determinata sostanza e quindi di un avvenuto consumo pregresso.

Capelli

Le analisi per la ricerca di xenobiotici (farmaci, sostanze stupefacenti o psicotrope) e biomarcatori di uso e abuso alcolico nella matrice pilifera, vengono spesso richieste per finalità cliniche e/o medico-legali. La richiesta di un'analisi tossicologica sulla matrice pilifera è legata soprattutto alla possibilità di incrementare la finestra temporale di rilevabilità di una determinata sostanza. Infatti, se una sostanza d'abuso e/o un suo metabolita è rilevabile per alcune ore nel sangue ed alcuni giorni nell'urina, la stessa sostanza può essere rilevabile

¹⁴⁴ Pichini S., Pacifici R., Gori P., Marchei E., Marchioro L., Martucci L., Mastrobattista L., Palmi I., Pellegrini M., Rotolo M.C. 2013. Linee guida per la determinazione delle sostanze d'abuso nelle urine. Istituto Superiore di Sanità.

nei capelli per mesi, a seconda della lunghezza degli stessi¹⁴⁰. Nella parte prossimale del capello, quella vicina al bulbo, è possibile rilevare un'esposizione temporalmente vicina all'assunzione, mentre spostandosi nella parte distale, verso la punta, si rileva un'esposizione più lontana nel tempo. Inoltre, essendo la velocità di crescita del capello di circa 1 cm al mese, la relativa analisi segmentale per centimetro di capello può fornire informazioni riguardanti storia e tipologia di consumo di una sostanza in ognuno dei mesi corrispondenti al segmento analizzato.

In questo caso, il prelievo del campione non è invasivo e il trasporto e la conservazione non richiedono particolari accorgimenti.

Quando si analizza una matrice pilifera e si procede all'interpretazione dei dati, si devono tenere in considerazione alcuni importanti aspetti che riguardano la matrice stessa, come: la sua natura (si tratta di matrice solida), l'eterogeneità, eventuali trattamenti igienici e cosmetici che potrebbero alterare la presenza e la concentrazione delle sostanze da ricercare¹⁴⁰.

Saliva

Si tratta di una secrezione esocrina composta principalmente da acqua (circa 99%), proteine, cellule epiteliali, batteri, residui di cibo^{145,146,147,148}.

Rappresenta una matrice biologica alternativa al sangue, idonea per la determinazione di xenobiotici e/o sostanze d'abuso sia in campo clinico che medico legale¹³⁹.

L'interesse nei confronti di questo tipo di matrice è cresciuto negli ultimi anni grazie ai vantaggi che risiedono nel suo utilizzo. Infatti, il prelievo del fluido orale risulta più veloce, agevole e sicuro e può avvenire senza la necessità di disporre di un luogo di raccolta dedicato^{149,150}.

Mentre, per quanto riguarda gli svantaggi legati al suo utilizzo, è necessario evidenziare che la composizione della saliva è influenzata da diversi fattori, come il ritmo circadiano, l'età, il sesso, lo stato di salute, la dieta e l'abitudine al fumo¹⁵¹.

Le prime linee guida per l'analisi delle sostanze d'abuso nella saliva furono proposte nel 2004 negli Stati Uniti dal "Substance Abuse and Mental Health Service Administration" (SAMHSA) ed erano indirizzate soprattutto alle analisi effettuabili sul posto di lavoro per

¹⁴⁵ Aps J.K.M., Martens L.C. 2005. Review: the physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Sci Int.* 150:119–131.

¹⁴⁶ de Almeida P.D.V., Grégio A.M.T., Machado M.Á.N., de Lima A.A.S., Azevedo L.R. 2008. Saliva composition and functions: a comprehensive review. *J Contemp Dent Pract.* 9:72–80.

¹⁴⁷ da Costa B.R.B., Santos Júnior W.J.R., Maximiano I.F., Gomes N.C., Freitas B.T., De Martinis B.S. 2021. Application of microextraction techniques in alternative biological matrices with focus on forensic toxicology: a review. *Bioanalysis.* 13:45–64.

¹⁴⁸ Elmongy H., Abdel-Rehim M. 2016. Saliva as an alternative specimen to plasma for drug bioanalysis: a review. *Trends Analyt Chem.* 83:70–79.

¹⁴⁹ Martí-Álamo S., Mancheno-Franch A., Marzal-Gamarra C., Carlos-Fabuel L. 2012. Saliva as a diagnostic fluid. Literature review. *J Clin Exp Dent.* 4:e237–e243.

¹⁵⁰ Bellagambi F.G., Lomonaco T., Salvo P., Vivaldi F., Hangouët M., Ghimenti S., Biagini D., Di Francesco F., Fuoco R., Errachid A. 2020. Saliva sampling: methods and devices. An overview. *Trends Analyt Chem.* 124:115781.

¹⁵¹ Desrosiers N.A., Huestis M.A. 2019. Oral fluid drug testing: analytical approaches, issues and interpretation of results. *J Anal Toxicol.* 43:415–443.

determinare l'eventuale uso di sostanze stupefacenti. Successivamente tali linee guida sono state ampliate ed adattate ai progressi¹⁵².

Più recentemente anche la “European Workplace Drug Testing Society” (EWDTTS) ha redatto delle linee guida europee, anch'esse orientate alle analisi sul posto di lavoro, la cui ultima versione è del 2022¹⁵³.

La saliva quindi è una matrice ampiamente utilizzata per verificare la recente esposizione a sostanze attive¹⁵⁴.

Una delle principali applicazioni riguarda il suo utilizzo in caso di sospetto di soggetti alla guida sotto l'effetto di farmaci e/o sostanze stupefacenti, come ad esempio cocaina, cannabinoidi, anfetamine, benzodiazepine, oppiacei^{155,156,157,158,159}.

Inoltre, il fluido orale viene spesso utilizzato per l'identificazione delle nuove sostanze psicoattive (NPS)^{160,161}

¹⁵² Department of Health and Human Services Substance Abuse and Mental Health Services Administration Center for Substance Abuse Prevention. 2022. Collection Site Manual for the collection of oral fluid specimens for Federal Agency Workplace Drug Testing Programs.

¹⁵³ European Workplace Drug Testing Society (EWDTTS). 2022. Guidelines for Oral Fluid.

¹⁵⁴ Malaca S., Busardò F.P., Gottardi M., Pichini S., Marchei E. 2019. Dilute and shoot ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC–MS/MS) analysis of psychoactive drugs in oral fluid. *J Pharm Biomed Anal.* 170:63– 67.

¹⁵⁵ Bueno L.H.P., da Silva R.H.A., Azenha A.V., de Souza Dias M.C., De Martinis B.S. 2014. Oral fluid as an alternative matrix to determine ethanol for forensic purposes. *Forensic Sci Int.* 242:117– 122.

¹⁵⁶ Wille S.M.R., Raes E., Lillsunde P., Gunnar T., Laloup M., Samyn N., Christophersen A.S., Moeller M.R., Hammer K.P., Verstraete A.G. 2009. Relationship between oral fluid and blood concentrations of drugs of abuse in drivers suspected of driving under the influence of drugs. *Ther Drug Monit.* 31:511–519.

¹⁵⁷ Gjerde H., Langel K., Favretto D., Verstraete A.G. 2015. Detection of illicit drugs in oral fluid from drivers as biomarker for drugs in blood. *Forensic Sci Int.* 256:42–45.

¹⁵⁸ Busardo F.P., Pichini S., Pellegrini M., Montana A., Lo Faro A.F., Zaami S., Graziano S. 2018. Correlation between blood and oral fluid psychoactive drug concentrations and cognitive impairment in driving under the influence of drugs. *Curr Neuropharmacol.* 16:84–96.

¹⁵⁹ Milman G., Barnes A.J., Lowe R.H., Huestis M.A. 2010. Simultaneous quantification of cannabinoids and metabolites in oral fluid by two-dimensional gas chromatography mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 1217:1513–1521.

¹⁶⁰ Rocchi R., Simeoni M.C., Montesano C., Vannutelli G., Curini R., Sergi M., Compagnone D. 2018. Analysis of new psychoactive substances in oral fluids by means of microextraction by packed sorbent followed by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Test Anal.* 10:865–873.

¹⁶¹ Bianchi F., Agazzi S., Riboni N., Erdal N., Hakkarainen M., Ilag L.L., Anzillotti L., Andreoli R., Marezza F., Moroni F., Cecchi R., Careri M. 2019. Novel sample-substrates for the determination of new psychoactive substances in oral fluid by desorption electrospray ionization-high resolution mass spectrometry. *Talanta.* 202:136–144.

In Italia la saliva non è al momento contemplata quale matrice biologica nelle analisi per la ricerca delle sostanze d'abuso nei luoghi lavorativi. Viene, invece, menzionata nell'articolo 187 del Nuovo Codice della Strada quale matrice biologica sulla quale è possibile effettuare accertamenti per verificare la presenza di sostanze stupefacenti o psicotrope ed attestare l'assunzione da parte del conducente del mezzo di trasporto.

Il fluido orale, in quanto fluido non invasivo, ha attirato l'attenzione nel campo dello screening tossicologico-farmacologico, sia per scopi terapeutici che forensi, nonché per la diagnosi medica, la gestione clinica, il doping in loco (in tempo reale) e per il monitoraggio dell'esposizione ambientale a sostanze tossiche.

E' stata stabilita una buona correlazione tra la saliva e il sangue per le concentrazioni dei farmaci. Pertanto, il fluido orale potrebbe essere un potenziale sostituto del sangue, soprattutto per la sorveglianza a lungo termine (ad esempio terapie croniche di farmaci) o per lo screening di un gran numero di pazienti¹⁶².

Anche se la finestra temporale di rilevamento dei farmaci è simile in entrambe le matrici, le concentrazioni di farmaco nel fluido orale possono non essere solo un semplice riflesso della quantità totale di farmaco nel sangue. Infatti, il trasferimento dal sangue alla saliva è influenzato da diversi fattori fisico-chimici, quali: pH delle matrici, pKa, liposolubilità, peso molecolare, configurazione spaziale e legame proteico del composto farmacologico. Il pH del sangue è piuttosto costante a 7.4, mentre il pH della saliva è leggermente acido (pH 5.8–6.8) e può anche fluttuare in modo significativo da un individuo all'altro^{163,164}.

¹⁶² Casati S., Binda M., Dongiovanni P., Meroni M., D'Amato A., Roda G., Orioli M., Del Fabbro M., Tartaglia G.M. 2023. Recent advances of drugs monitoring in oral fluid and comparison with blood. *Clin Chem Lab Med.* 61:1978-1993.

¹⁶³ Malaca S., Busardò F.P., Gottardi M., Pichini S., Marchei E. 2019. Dilute and shoot ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) analysis of psychoactive drugs in oral fluid. *J Pharm Biomed Anal.* 170:63-7.

¹⁶⁴ Bosker W.M., Huestis M.A. 2009. Oral fluid testing for drugs of abuse. *Clin Chem.* 55:1910-31.

Oltre ai fattori chimico-fisici, il metodo di raccolta e la via di somministrazione del farmaco possono influenzare la concentrazione del farmaco nel fluido orale.

Alcune tecniche di raccolta, stimolando la salivazione, possono portare ad una modifica del pH salivare e diluire il campione. I farmaci e/o sostanze insufflate, fumate (come cocaina, nicotina ed eroina) o assunti per via orale possono contaminare la cavità orale¹⁶².

Un ulteriore aspetto da considerare, soprattutto in ambito forense, riguarda la difficoltà nel raccogliere volumi adeguati della matrice, ad esempio in conseguenza di una ridotta salivazione dopo l'assunzione di farmaci con proprietà simpaticomimetiche, la contaminazione della cavità orale dopo l'assunzione di cibo e/o sostanze attive per via orale e, infine, basse concentrazioni che richiedono un'elevata sensibilità. Infatti, a causa delle caratteristiche intrinseche, i livelli di farmaco nel fluido orale possono essere ridotti rispetto a quelli del sangue o delle urine.

Per questo motivo, solo il recente miglioramento delle tecnologie strumentali, nonché delle procedure di estrazione e analisi, hanno reso possibile la sua esplorazione e analisi più approfondita.

La matrice salivare rappresenta ad oggi un'ottima alternativa al sangue per le analisi tossicologiche in ambito medico-legale.

2.3. Metodologie analitiche forensi

2.3.1. Cromatografia

La cromatografia è una tecnica analitica mediante la quale è possibile separare i diversi composti di una miscela. La separazione avviene a carico di fenomeni di distribuzione degli analiti tra due fasi: una *fase mobile* e una *fase stazionaria*¹⁶⁵. In tutte le separazioni cromatografiche, il campione viene solubilizzato in una fase mobile¹⁶⁶. Tale fase viene immessa attraverso una fase stazionaria immiscibile con essa, che viene mantenuta stabile in una colonna. Le due fasi vengono scelte in modo tale che i componenti del campione interagiscano diversamente con la fase mobile e quella stazionaria: i soluti che presentano una maggiore affinità per la fase stazionaria vengono, da questa, maggiormente ritenuti e migrano più lentamente; mentre i componenti che vengono trattenuti debolmente si muovono in maniera più rapida. In seguito a queste diverse velocità di migrazione, i componenti del campione si separano in bande, che possono essere analizzate qualitativamente e quantitativamente^{167,168}.

Il sistema di rivelazione ha il compito di produrre un segnale la cui intensità è proporzionale alla frazione di molecole di un dato analita che vengono eluite in un determinato istante. Riportando in un diagramma il segnale in funzione del tempo si ottiene il *cromatogramma* nel quale ogni picco corrisponde ad un componente (**figura 20**). Il cromatogramma è fondamentale per l'analisi qualitativa e quantitativa di miscele anche complesse¹⁶⁹.

¹⁶⁵ Miller J.M. 2005. Chromatography: concepts and contrasts. Wiley.

¹⁶⁶ Heftman E.F. 2004. Chromatography: fundamentals of chromatography and related differential migration methods. Elsevier.

¹⁶⁷ Poole C.F. 2003. The essence of Chromatography. Elsevier.

¹⁶⁸ Cazes J., Scott R.P.W. 2002. Chromatography theory. Dekker

¹⁶⁹ Scott R.P.W. 1995. Techniques and practice of chromatography. Marcel Dekker.

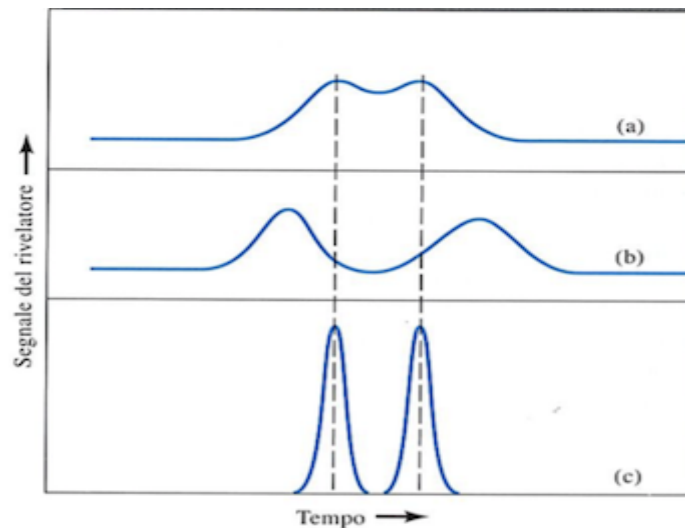


Figura 20. Esempio di cromatogramma a due componenti¹⁷⁰.

In particolare:

- la posizione dei picchi sull'asse del tempo è un'informazione qualitativa, poiché può essere usata per identificare i componenti del campione;
- l'area sottesa da ciascun picco risulta essere proporzionale alla concentrazione di un dato componente presente nel campione, quindi rappresenta un'informazione quantitativa¹⁶⁹.

¹⁷⁰ Skoog D.A., Holler F.J., Crouch S. 2009. Chimica analitica strumentale. Seconda edizione. Edises.

Parametri caratterizzanti una separazione cromatografica

In condizioni ideali, un picco cromatografico ha una forma simmetrica e gaussiana (figura 21).

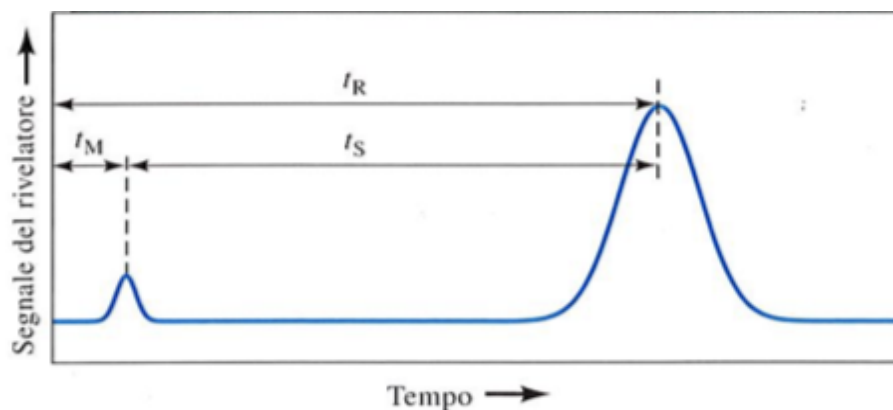


Figura 21. Cromatogramma di una miscela a due componenti¹⁷⁰.

Il picco più largo nella parte destra della figura è relativo ad una specie analitica. L'intervallo di tempo che intercorre dall'istante dell'iniezione a quello della rivelazione di una specie analitica prende il nome di tempo di ritenzione (t_R) ed è caratteristico per ogni analita.

Mentre, il picco più piccolo mostrato in figura si riferisce ad una specie che non viene ritenuta dal sistema cromatografico¹⁷⁰. Una sostanza con un comportamento di questo tipo si muove in colonna con velocità pari alla velocità dell'eluente e il tempo necessario alla sua eluizione corrisponde al cosiddetto tempo morto o tempo vuoto (t_M).

Tutte le componenti della miscela trascorrono nella fase mobile un tempo pari al tempo morto¹⁷¹.

La differenza fra il tempo di ritenzione di un analita e il tempo morto prende il nome di tempo di ritenzione corretto (t_S)¹⁷⁰:

$$t_S = t_R - t_M$$

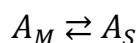
¹⁷¹ Braithwaite A., Smith J. 1996. Chromatographic methods for Laboratories. Blackie.

Conoscendo il flusso ϕ della fase mobile, è possibile ricavare i volumi di ritenzione moltiplicando i rispettivi tempi di ritenzione¹⁷⁰:

- $V_R = \phi t_R$ rappresenta il volume di ritenzione, ossia il volume di eluente necessario per eluire un analita;
- $V_M = \phi t_M$ rappresenta il volume morto, ossia il volume necessario per eluire una sostanza che non viene trattenuta dal sistema cromatografico e corrisponde al volume di colonna non occupato dalla fase stazionaria;
- $V_S = \phi t_S$ è il volume di ritenzione corretto, espresso anche da una relazione analoga a quella del tempo di ritenzione corretto:

$$V_S = V_R - V_M$$

Il grado di separazione di due soluti dipende in parte dalle velocità relative alle quali le due specie vengono eluite. Tali velocità vengono determinate dalla grandezza delle costanti di equilibrio che governano la ripartizione degli analiti fra la fase mobile e quella stazionaria. Per una generica specie A, l'equilibrio di ripartizione può essere schematizzato attraverso la reazione^{170,172}:



¹⁷² Braithwaite A, Smith J. 1996. "Chromatographic methods". Quinta edizione. Blackie.

La costante di equilibrio associata al processo di ripartizione si definisce costante di distribuzione K_C ^{170,172}:

$$K_C = \frac{a_S^A}{a_M^A} \approx \frac{C_S^A}{C_M^A}$$

in cui a_S^A rappresenta l'attività del soluto A nella fase stazionaria e a_M^A è l'attività nella fase mobile. Le attività possono essere approssimate alle concentrazioni se si opera a diluizione elevata. Un analita con $K_C > 1$ è molto affine alla fase stazionaria. K_C è in relazione con i volumi di ritenzione attraverso l'equazione fondamentale della cromatografia:

$$V_R = V_M + K_C V_{FS}$$

dove V_{FS} rappresenta il volume di fase stazionaria.

Sebbene K_C fornisca una chiara indicazione sulla distribuzione dei componenti tra le fasi, non risulta semplice da misurare. Il fattore di capacità k è invece deducibile direttamente analizzando il tracciato cromatografico. Il fattore di capacità è dato dal rapporto fra il numero di moli di soluto disciolte nella fase stazionaria e il numero di moli di soluto disciolte nella fase mobile¹⁷⁰.

$$k = \frac{n_S^A}{n_M^A}$$

Dalla manipolazione di tale equazione si ricava che¹⁷⁰:

$$k = \frac{C_S^A V_{FS}}{C_M^A V_M}$$

$$k = K_C \frac{V_{FS}}{V_M} \frac{V_M}{V_{FS}}$$

$$K_C = k \frac{V_M}{V_{FS}}$$

Sostituendo in $V_R = V_M + K_C V_{FS}$ si ottiene¹⁷⁰:

$$V_R = V_M + k \frac{V_M}{V_{FS}} V_{FS}$$

$$V_R = V_M(1 + k)$$

$$\phi t_R = \phi t_M(1 + k)$$

$$t_R = t_M + t_M k$$

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

$$k = \frac{t_S}{t_M}$$

Se $k = 1$, l'analita eluisce con un tempo doppio rispetto al tempo morto. Per una buona separazione è necessario avere $k > 1$. Gli analiti successivi eluiranno con un k via via maggiore. L'efficienza N rappresenta la capacità del sistema cromatografico di eluire le molecole di un analita con velocità il più possibile simili tra loro. Si esprime come numero di piatti teorici¹⁷²:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2$$

dove w_b rappresenta la larghezza misurata alla base del picco.

L'efficienza è spesso espressa come altezza equivalente al piatto teorico H , la quale rappresenta il rapporto fra la lunghezza della colonna \mathcal{L} e il numero dei piatti teorici:

$$H = \frac{\mathcal{L}}{N}$$

Il sistema è tanto più efficiente quanto minore è il valore di H .

La velocità lineare media delle molecole della fase mobile è espressa da:

$$u = \frac{\mathcal{L}}{t_M}$$

Questa deve essere scelta in modo ottimale poiché da essa dipende l'altezza equivalente al piatto teorico, secondo l'equazione empirica di Van Deemter¹⁷⁰:

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu$$

Dove:

- A tiene conto dei fattori legati alla costruzione della colonna ed è legato alla formazione di cammini preferenziali;
- B tiene conto della diffusione longitudinale ed è tanto minore quanto maggiore è la velocità lineare media;
- C dipende dal trasferimento di massa fra la fase mobile e la fase stazionaria.

La velocità lineare media ottimale è quella che minimizza il valore di H ^{170,172}.

Comunemente, i metodi cromatografici vengono classificati in base al tipo di fase mobile: gascromatografia (GC) e cromatografia liquida (LC)^{173,174}.

2.3.1.1. Gascromatografia (GC)

La gascromatografia è una tecnica adatta alla separazione di analiti volatili e termicamente stabili. In GC, la fase mobile è rappresentata da un gas, chiamato gas di trasporto o carrier gas, che è chimicamente inerte e non partecipa attivamente alla separazione cromatografica, la quale rimane completamente a carico della fase stazionaria¹⁷⁵. Il gas più comunemente utilizzato a questo scopo è l'elio, ma possono essere utilizzati anche argon, azoto e idrogeno. Per controllare la velocità di flusso del gas sono necessari regolatori di pressione e flussometri¹⁷⁶.

I componenti di base di un tipico strumento gascromatografico sono i seguenti: gas di trasporto, sistema di iniezione, colonna e rivelatore (**figura 22**).

¹⁷³ Cozzi R., Protti P., Ruaro T. 2013. Elementi di analisi chimica strumentale. Zanichelli.

¹⁷⁴ Calabrò M.L. 2012. Compendio di biotecnologie farmaceutiche. Edises.

¹⁷⁵ Hage D.S. 2018. Principles and applications of clinical mass spectrometry. 1-32.

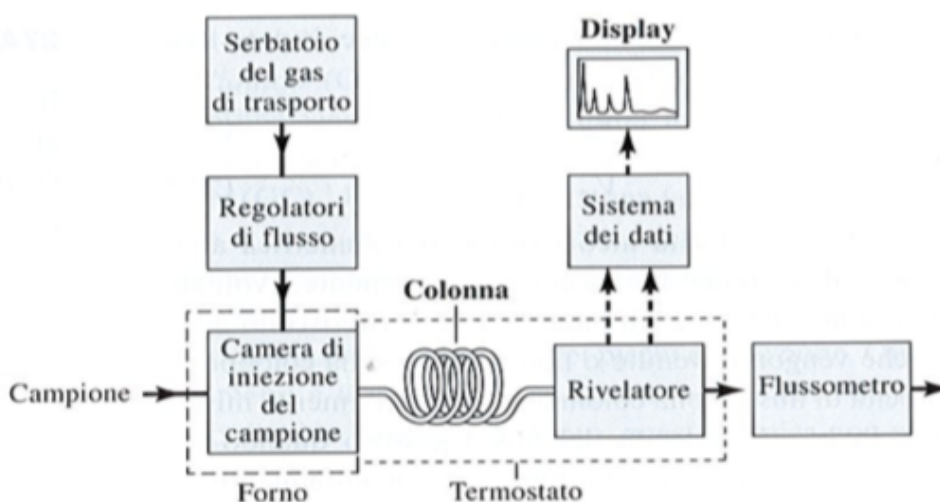


Figura 22. Diagramma a blocchi di un tipico gascromatografo¹⁷⁰.

L'introduzione del campione nella strumentazione GC avviene a carico di sistemi di introduzione manuali, come le microsiringhe tarate, oppure sistemi di campionamento automatico, i quali possono migliorare significativamente la ripetibilità del volume iniettato. Il campione viene introdotto nella camera di iniezione, o iniettore, la quale, mantenuta ad alta temperatura, ha il compito di vaporizzare istantaneamente gli analiti che, successivamente, sospinti dal gas di trasporto, verranno trascinati in colonna.

In GC si usano due tipi di colonne: *colonne impaccate*, le quali hanno ormai solo importanza storica, e *colonne capillari*. Le colonne impaccate sono costituite da tubi di vetro o metallo, impaccati con un materiale adsorbente uniforme finemente suddiviso con un supporto solido inerte rivestito con un sottile strato di fase stazionaria. Le colonne capillari sono maggiormente lunghe rispetto a quelle impaccate e la loro lunghezza varia da pochi metri fino anche ad un centinaio di metri^{170,172}. La maggior parte delle colonne sono fabbricate in silice fusa o acciaio inossidabile, ma si utilizzano anche il vetro e il teflon.

Le colonne capillari maggiormente diffuse sono le colonne tubulari aperte a pareti rivestite di silice fusa (WCOT) (**figura 23**). I capillari di silice fusa sono ricavati da una silice purificata che contiene minime quantità di ossidi metallici e sono ulteriormente rinforzati con un

rivestimento esterno protettivo di poliimmide, la quale conferisce una certa flessibilità al sistema^{172,173}.

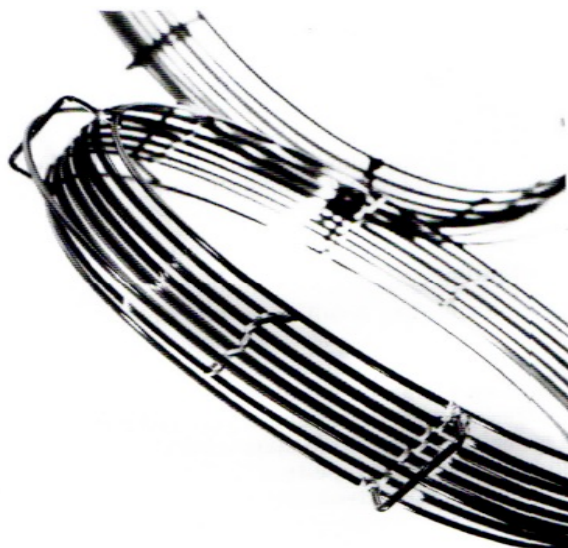


Figura 23. Esempio di colonna capillare di silice fusa¹⁷⁰.

La temperatura della colonna è una variabile importante, pertanto, di solito, la colonna viene alloggiata in un forno termostatico. La temperatura ottimale della colonna dipende dal punto di ebollizione del campione e dal grado di separazione richiesto. Per campioni che hanno un intervallo di ebollizione piuttosto ampio, è preferibile impiegare una programmazione della temperatura. Per quanto riguarda il sistema di rivelazione, uno dei più utilizzati è il rivelatore a spettrometria di massa.

2.3.1.2. Cromatografia liquida (LC)

La cromatografia liquida è tra le più usate tecniche di separazione¹⁷⁶.

La fase mobile è rappresentata da un liquido mentre la fase stazionaria è rappresentata da una matrice solida.

Un classico strumento per LC è costituito da un contenitore di vetro che contiene solvente. In tale contenitore spesso vi è la presenza di un sistema di allontanamento dei gas disciolti, che possono condurre ad una velocità di flusso non riproducibili^{170,172,173,177}.

Per quanto riguarda l'eluizione, vi sono due tipi differenti:

- Eluizione isocratica: riguarda un singolo solvente ma anche una miscela di solventi con composizione costante.
- Eluizione a gradiente: riguarda solventi con polarità molto diversa, che variano di composizione durante la separazione.

Le pompe utilizzate per la cromatografia liquida sono di due tipologie:

- Pompa a siringa: costituite da ampie camere a forma di siringa con la presenza di un pistone che viene attivato da un meccanismo a vite alimentato da un motore. Lo svantaggio principale è riconducibile alla limitata capacità per il solvente.
- Pompa reciprocante: costituite da una camera in cui il solvente viene pompato dal movimento di un pistone spinto da un motore. Il flusso del solvente, sia in ingresso che in uscita, è controllato da due valvole di controllo. Questo tipo di pompa presenta diversi vantaggi, tra cui il piccolo volume interno, elevate pressioni in uscita, adattabilità all'eluizione e velocità di flusso costanti. Presentano però anche un

¹⁷⁶ Blum F. 2014. High performance liquid chromatography. *Br J Hosp Med (Lond)*. 75:C18-21.

¹⁷⁷ Morley R., Minceva M. 2021. Liquid-Liquid Chromatography: Current Design Approaches and Future Pathways. *Annu Rev Chem Biomol Eng*. 12:495-518.

importante svantaggio, ovvero producono un flusso pulsato che si manifesta come un rumore sulla linea di base del cromatogramma^{176,177}.

In riferimento al sistema di iniezione del campione, il metodo principale si basa su anelli (loop) intercambiabili che permettono di scegliere tra dimensioni del campione che variano da 1 ad oltre 100 microlitri.

Le colonne analitiche utilizzate nella cromatografia liquida sono caratterizzate, principalmente, da tubi levigati in acciaio inossidabile ma possono essere utilizzati anche tubi in vetro e tubi di polimeri.

Tali colonne presentano generalmente una lunghezza compresa tra 5 e 25 cm, con un diametro interno compreso tra 3 e 5 mm.

Molto spesso prima di una colonna analitica è inserita una colonna di protezione che ha la funzione di aumentare la vita della colonna analitica stessa in quanto in grado di eliminare il materiale particolato e i contaminanti dai solventi, ed anche di quei componenti del campione che si vanno a legare in maniera irreversibile alla fase stazionaria. La composizione di tale colonna di protezione è molto simile a quella della colonna analitica, anche se la dimensione delle particelle è maggiore in modo da ridurre drasticamente la caduta di pressione.

Una volta che la colonna di protezione viene contaminata, essa viene reimballata oppure sostituita¹⁷⁶.

Nella maggior parte degli strumenti LC vi è la presenza di termostati in grado di controllare la temperatura della colonna. Inoltre, per un maggior controllo della temperatura vi è anche la possibilità di inserire le colonne in camicie di termostatazione ad acqua.

Nella cromatografia liquida sono due i principali tipi di impaccamento:

- a particelle pellicolari: ad oggi poco utilizzate, se non per separare proteine e grandi biomolecole.

- a particelle porose: tali particelle sono costituite da silice (la più comune), allumina, resina sintetica o resina a scambio ionico

I rilevatori che possono essere accoppiata ad una cromatografia liquida sono diversi e tra questi uno dei più diffusi è rappresentato dalla spettrometria di massa^{178,179}.

2.3.2. Spettrometria di massa (MS)

Si tratta di una tecnica analitica che fornisce informazioni utili sulla struttura chimica dei composti esaminati, permettendone l'identificazione e la determinazione quantitativa¹⁸⁰.

Questa tecnica si basa sui segnali che derivano dai risultati di reazioni di ionizzazione e frammentazione di vario genere¹⁸¹.

Il principio su cui si basa la spettrometria di massa (MS) prevede tre fasi fondamentali:

1. Generazione di ioni in fase gassosa;
2. separazione degli ioni generati in base al loro rapporto m/z (massa/carica);
3. rivelazione degli ioni e determinazione della loro abbondanza isotopica.

Le abbondanze relative dei diversi frammenti riportate su un diagramma in funzione dei rispettivi rapporti m/z forniscono lo spettro di massa. Dal momento che i processi di ionizzazione e/o frammentazione che avvengono a carico dei composti analizzati sono tipici

¹⁷⁸ Lopes A.S., Cruz E.C., Sussulini A., Klassen A. 2017. Metabolomic Strategies Involving Mass Spectrometry Combined with Liquid and Gas Chromatography. *Adv Exp Med Biol.* 965:77-98.

¹⁷⁹ Beccaria M, Cabooter D. 2020. Current developments in LC-MS for pharmaceutical analysis. *Analyst.* 145:1129-1157.

¹⁸⁰ Hoffmann W.D., Jackson G.P. 2015. Forensic Mass Spectrometry. *Annu Rev Anal Chem.* 8:419-40.

¹⁸¹ Pu F., Chiang S., Zhang W., Ouyang Z. 2019. Direct sampling mass spectrometry for clinical analysis. *Analyst.* 144:1034-1051.

della loro natura chimica, la spettrometria di massa consente di risalire alla struttura di tali composti per confronto degli spettri sperimentali con spettri noti conservati in banche dati.

Uno spettrometro di massa può essere suddiviso in alcune parti fondamentali¹⁸²:

- Sistema per l'introduzione del campione nello strumento: i campioni introdotti devono essere vaporizzati. Pertanto, il sistema di introduzione dei campioni deve essere costituito da una camera di vaporizzazione. Tali sistemi per l'introduzione possono essere diversi a seconda dello stato fisico del campione e dalla sua volatilità. Ad eccezione del sistema di introduzione, le restanti componenti dello spettrometro di massa sono tipicamente mantenute in alto vuoto, necessario per evitare collisioni con altre molecole evitando deviazioni delle traiettorie e frammentazioni non volute.
- Sorgente di ioni per la ionizzazione del campione: ha il compito di generare, a partire dalle molecole neutre di campione in fase gassosa, ioni e di focalizzare il fascio di ioni verso l'analizzatore di massa. Le sorgenti sono classificate in *hard* e *soft* a seconda dell'energia connessa ai processi di ionizzazione: sorgenti di tipo *hard* sono caratterizzate dalla generazione di ioni frammento a partire dagli ioni primari e consentono di ricavare informazioni strutturali, mentre le sorgenti *soft* sono caratterizzate da una scarsissima frammentazione e consentono di ricavare informazioni riguardanti la massa accurata della specie analizzata. Tra i sistemi di ionizzazione più utilizzati vi sono:

¹⁸² Harris D.C. 2005. Chimica Analitica Quantitativa. Seconda Edizione. Zanichelli

- a) Ionizzazione elettronica (EI)
 - b) Ionizzazione chimica (CI)
 - c) Ionizzazione per bombardamento con atomi veloci (FAB)
 - d) Ionizzazione a pressione atmosferica (APCI)
 - e) Fotoionizzazione a pressione atmosferica (APPI)
 - f) Ionizzazione per elettro-nebulizzazione (ESI)
 - g) Ionizzazione per desorbimento a elettro-nebulizzazione (DESI)
 - h) Ionizzazione per desorbimento laser assistito da matrice (MALDI)
- Analizzatore di massa: apparati preposti alla separazione dei diversi ioni in base ai loro rapporti m/z . I principali sono:
 - a) Analizzatori a doppia focalizzazione (EB)
 - b) Analizzatori di massa a tempo di volo (TOF)
 - c) Analizzatore di massa a quadrupolo (q)
 - d) Analizzatore di massa a trappola ionica (IT)
 - Sistema di rivelazione delle particelle separate: permettono di amplificare le correnti ioniche separate dall'analizzatore di massa. Quelli maggiormente utilizzati sono:
 - a) Coppa di Faraday
 - b) Rivelatore di Daly
 - c) Elettromoltiplicatore

2.3.3. Gascromatografia (GC)-Spettrometria di Massa (MS)

La combinazione tra gascromatografia e spettrometria di massa è nota come GC-MS (figura 24) ed è una tecnica iperfina adatta alla determinazione di analiti volatili e termostabili¹⁸³.

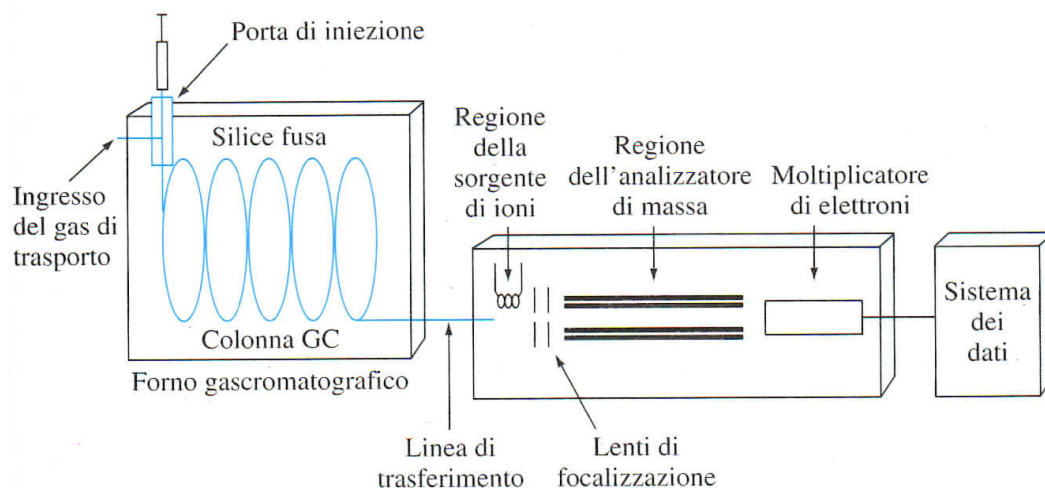


Figura 24. Diagramma a blocchi di un tipico sistema analitico GC-MS¹⁷⁰.

Le più comuni sorgenti di ioni usate in GC-MS sono la ionizzazione elettronica e la ionizzazione chimica. Gli analizzatori di massa più diffusi sono quelli a quadrupolo e a trappola ionica. In GC-MS, lo spettrometro di massa scandisce ripetutamente i rapporti m/z durante l'analisi cromatografica: tale modalità di acquisizione prende il nome di *full-scan*.

È inoltre possibile selezionare un singolo rapporto m/z e monitorarlo per tutta la durata dell'analisi acquisendo quindi in modalità *selected ion monitoring (SIM)*^{170,183}.

La corrente ionica totale, che in un dato istante raggiunge il detector, diagrammata in funzione del tempo consente di costruire il tracciato cromatografico. Una volta che il cromatogramma è stato ottenuto è possibile^{170,183}:

¹⁸³ Rubino C. 2022. Le basi della chimica analitica. Seconda Edizione. Zanichelli.

- Identificare quale composto è eluito in un dato istante di tempo esaminando il suo spettro di massa e confrontandolo con quello di una banca dati;
- Richiamare un singolo rapporto m/z , tipicamente diagnostico dell'analita che si sta cercando, per identificarlo rapidamente mediante la costruzione dell'*extract ion chromatogram* (XIC o EIC).

2.3.4. Cromatografia Liquida (LC)-Spettrometria di massa (MS)

Il sistema accoppiato LC-MS rappresenta un importante strumento per l'identificazione degli analiti che eluiscono dalla colonna.

In tale sistema, l'effluente dalla colonna LC viene introdotto in una sorgente di ionizzazione a pressione atmosferica, come un elettrospray o una sorgente di ionizzazione chimica.

Gli ioni che si sono creati vengono poi selezionati dall'analizzatore di massa e rivelati dal rilevatore di ioni¹⁷⁸.

Gli accoppiamenti GC-MS e LC-MS rappresentano una combinazione ottimale fra una tecnica separativa associata ad un'elevata possibilità di identificazione. Ciò rende le due tecniche strumenti tipicamente utilizzati e utili nelle applicazioni forensi.

2.4. Excursus legislativo

Il Codice Zanardelli del 1889 indicava il divieto di cessione di “sostanze pericolose per la salute”.

Nel 1923 venne emanata la legge 396 dove si parlava, più specificamente, di cessione di “sostanze velenose aventi azione stupefacente”.

Nel 1930 con l'introduzione del Codice di Procedura Penale, noto anche come Codice Rocco, la dicitura “sostanze velenose” venne sostituita con quella di “sostanze psicotrope”.

Successivamente, con la legge n. 1145/1934 contenente “nuove norme sugli stupefacenti” venne introdotto il “ricovero coatto” dei tossicomani in case della salute al fine di sottoporre tali soggetti ad una cura disintossicante.

Novità rilevanti furono apportate dalla legge n. 1041/1954 “disciplina della produzione del commercio e dell'impiego degli stupefacenti” che determinò un significativo spostamento verso l'approccio proibizionistico prevedendo un inasprimento delle sanzioni penali per chiunque detenesse anche solo una piccola quantità di qualsiasi sostanza stupefacente, senza alcuna distinzione tra produzione, commercio e mero uso personale. Il ricorso al ricovero coatto in ospedali psichiatrici fu mantenuto nei confronti “...di chi, a causa di grave alterazione psichica per abituale abuso di stupefacenti, si rende comunque pericoloso a sé e agli altri o riesce di pubblico scandalo”.

A partire dagli anni '60, con la rapida diffusione delle droghe nel mondo giovanile, apparve sempre più inadeguata una legge che non poneva differenza tra consumatori e spacciatori.

Di conseguenza, la legge 685/1975 “Disciplina degli stupefacenti e sostanze psicotrope. Prevenzione, cura e riabilitazione dei relativi stati di tossicodipendenza” diede vita ad una riforma legislativa profonda della materia, sia in termini di trattamento degli autori di reato, sia per quanto riguardava gli interventi medici e sanitari.

La legge 685/1975, pur vietando la detenzione di sostanze stupefacenti, prevedeva una causa di “non punibilità” se la sostanza era destinata al proprio uso personale e se si trattava di una “modica quantità”, introducendo quindi una distinzione tra spacciatore e consumatore. Furono, inoltre, introdotti una serie di interventi di prevenzione e di assistenza socio-sanitaria che permisero a chiunque di sottoporsi volontariamente ad interventi riabilitativi presso presidi ospedalieri, ambulatoriali, mentre permaneva il ricovero coatto nei casi in cui l’autorità giudiziaria ravvisasse la necessità del trattamento medico ed assistenziale.

Vennero istituiti i Centri Medici di Assistenza Sociale (CMAS), precursori degli attuali Servizi per le Dipendenze Patologiche (SerT o SerD).

Nel 1990 venne introdotta la legge “Iervolino-Vassalli”, poi recepita nel Testo Unico 309 del 1990 che disciplina l’intera materia relativa agli stupefacenti, in materia di produzione, commercio e uso delle sostanze stupefacenti e psicotrope nonché la repressione delle attività illecite, prevenzione, cura e riabilitazione dei relativi stati di tossicodipendenza. Il “Testo Unico 309 del 1990” ha subito numerose modifiche.

La prima fu una sentenza della Corte Costituzionale del 1991, che precisava che non bastava avere una quantità di stupefacenti di poco superiore “alla dose media giornaliera” per incombere nel reato di spaccio.

Si verificò una seconda modifica nel 1993 con il referendum abrogativo in cui vi fu la soppressione del divieto dell’uso personale di sostanze stupefacenti e tabella con quantitativo medio, rendendo quindi non illecito l’uso personale indipendentemente dalla dose, facendo entrare nel gergo giudiziario-forense la categoria degli “*elementi sintomatici*”. Diviene penalmente rilevante solo l’uso diverso da quello personale.

Nel 2006 si è assistito all’introduzione della legge 49/2006 (“Fini-Giovanardi”) che ha modificato il sistema in senso molto più rigido, eliminando la distinzione tra droghe

leggere/pesanti.

Nella V Conferenza Nazionale sulle Droghe (Trieste 12-14 Marzo 2009) è emerso come, in relazione alla comparsa di NSP, fosse indispensabile mettere a punto una rete di fonti di informazione, arricchendo gli strumenti di monitoraggio e controllo a disposizione.

Ne è derivato un Piano di Azione Nazionale (PAN) sulle droghe 2010-2013, ove viene chiaramente indicata la necessità di mantenere attivo ed efficiente il Sistema Nazionale di Allerta Precoce (SNAP), ampliando la sua attività di osservazione anche alla rete Internet, agli smart shops ed ai rave illegali.

Stante le segnalazioni effettuate circa le NSP attraverso lo SNAP, sistema di comunicazione tra il “Dipartimento Politiche Antidroga” e il “Ministero della Salute”, dal 2010 sono stati emanati diversi decreti per l’aggiornamento della Tabella I del DPR 309/90 e s.m.i.¹⁸⁴.

Nel febbraio 2014, tuttavia, la Corte Costituzionale bocciava la c.d. “Fini-Giovanardi” creando dunque un vuoto normativo.

Con il “Decreto legge 20 marzo 2014 n° 36” (c.d. decreto Lorenzin), convertito con Legge 16 maggio 2014, n. 79¹⁸⁵, sono state apportate alcune modifiche al Testo Unico sugli stupefacenti (DPR 309/90), a seguito della sentenza 32/2014 della Corte Costituzionale che ha ripristinato il sistema sanzionatorio collegato agli illeciti relativi alle sostanze stupefacenti e psicotrope suddivise in quattro tabelle (I e III sanzioni maggiori; II e IV sanzioni minori). La nuova Legge ricomprende tutti gli aggiornamenti intervenuti dal 2006 al 2014, vale a dire la tabellazione delle “nuove droghe” e elude la rilevanza penale della detenzione o l’acquisto per uso personale.

¹⁸⁴ Ministero della Salute. Tabelle delle Sostanze stupefacenti e psicotrope. Aggiornamento del 24 settembre 2024.

¹⁸⁵ Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana. Decreto Legge 20 marzo 2014. n. 36.

Le sostanze stupefacenti o psicotrope sottoposte a vigilanza e a controllo, secondo il DPR 309/90 sono dunque classificate in cinque tabelle denominate Tabella I, Tabella II, Tabella III, Tabella IV e Tabella dei medicinali.

Nelle **tabelle I, II, III, IV** sono indicate le sostanze con forte potere tossicomaniaco e oggetto di abuso, in ordine decrescente di potenziale abuso e dipendenza.

La tabella dei medicinali, suddivisa in cinque sezioni A-B-C-D-E, comprende le sostanze che hanno attività farmacologica e che vengono utilizzate nelle terapie.

Nella tabella dei medicinali sono listati i medicinali a base di sostanze stupefacenti e psicotrope, impiegate ad uso terapeutico umano o veterinario¹⁸⁴.

Le predette tabelle sono costantemente aggiornate con Decreto Ministeriale quando:

- vengono effettuate delle modifiche nelle liste a livello internazionale;
- una sostanza non di abuso diviene tale;
- una nuova droga viene commercializzata;
- quando viene segnalato un nuovo medicinale ad azione stupefacente o psicotropa.

In Italia i cannabinoidi sintetici e i loro analoghi di struttura considerati illegali sono riportati nella Tabella I del DPR n. 309/90 e s.m.i. (tabella 7)¹⁸⁴.

Tabella 7. Cannabinoidi sintetici inseriti in tabella I del DPR n. 309/90¹⁸⁴.

NOME COMUNE	DENOMINAZIONE CHIMICA
2F-QMPSB	Chinolin-8-il-3-((4,4-difluoropiperidin-1-il) solfonil)-4- metilbenzoato
4F-MDMB-BINACA	Metil-2-(1-(4-fluorobutil)-1H-indazol-3-carbossamide)-3,3- dimetilbutanoato
5F-APP-PICA	N-(1-amino-1-ossi-3-fenilpropan-2-il)-1-(5-fluoropentil)- 1H-indol-3-carbossamide
5F-APP-PINACA	N-(2-amino-1-benzil-2-ossi-etil)-1-(5-fluoropentil)indazol- 3-carbossamide
5-cloropentil JWH 018 indazol analogo	1-(5-cloropentil)-1H-indazol-3-il](naftalen-1-il)metanone
5F-Cumil-PeGaClone	5-(5-fluoropentil)-2-(1-metil-1-feniletil) pirido [4,3-b] indol- 1-one
5F-3,5-AB-PFUPPICA	N-(1-amino-3-metil-1-ossobutan-2-il)-1-(5-fluoropentil)-3- (4-fluorofenil)-1H-pirazol-5-carbossamide
5F-AKB57	adamantan-1-il-(5-fluoropentil)-1H-indazolo-3-carbossilato
5F-A-P7AICA	N-(adamantan-1-il)-1-(5-fluoropentil)-1H-pirrolo[2,3- b]piridina-3-carbossamide

5F-APINACA	N-(adamantan-1-il)-1-(5-fluoropentil)-1H-indazol-3- carbossamide
5F-CUMIL-P7AICA	1-(5-fluoropentil)-N-(2-fenilpropan-2-il)-7-azaindol-3- carbossamide
5F-MDMB-P7AICA	Metil 2- {[1-(5-fluoropentil)-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-3- il]formamido} -3,3-dimetilbutanoato
5F-PB22	Chinolin-8-il-1-(5-fluoropentil)-1H-indol-3- carbossilato
5F-MDMB-PINACA	Metil-[2-(1-(5-fluoropentil)-1H-indazolo-3- carbossamide)- 3,3-dimetilbutanoato
AB-CHMINACA	N-[(1S)-1-(aminocarbonil)-2-metilpropil]-1-(cicloesilmetil)- 1H-indazol-3-carbossamide
AB-FUBINACA	N-(1-amino-3-metil-1-ossibutan-2-il)-1-[(4-fluorofenil) metil]indazol-3-carbossamide
AB-PINACA	N-(1-amino-3-metil-1-ossobutan-2-il)-1-pentil-1Hindazolo- 3-carbossamide
ADB-CHMINACA	N-[1-(aminocarbonil)-2,2-dimetilpropil]-1-(cicloesilmetil)- 1H-indazol-3-carbossamide
ADB-FUBINACA	N-[(1S)-1-(aminocarbonil)-2-metilpropil]-1-[(4-fluorofenil)metil]-1H-indazol-3-carbossamide

AM-694	1-[(5-fluoropentil)-1H-indol-3-il]-(2-iodofenil)metanone
AMB-FUBINACA	Metil-2-(1-(4-fluorobenzil) -1Hindazolo-3-carbossamide)-3- metilbutanoato
APP-FUBINACA	N-(1-amino-3-fenil-1-ossipropan-2-il)-1-[(4-fluorofenil)metil]-1Hindazol-3-carbossamide
BB-22	1-(cicloesilmetil)-1H-indolo-3-acido carbossilico-8- chinolinil estere
CP 47,497	(2-[(1R,3S)-3-idrossicicloesil]-5-(2-metilottan-2-il)fenolo
CP47,497-omologo C8	(2-[(1R,3S)-3-idrossicicloesil]-5-(2-metilnonan-2-il)fenolo
CUMIL-4CN-B7AICA	1-(4-cianobutil)-N-(2-fenilpropan-2-il)-1H-pirrolo[2,3- b]piridin-3-carbossamide
CUMIL-4CN-BINACA	1-(4-cianobutil)-N-(1-metil-1-fenil-etil)indazolo-3- carbossamide
CUMIL-5F-PINACA	1-(5-Fluoropentil)-N-(1-metil-1-feniletil)-1H-indazol-3- carbossamide
CUMIL-PeGACLONE	2-(1-metil-1-fenil-etil)-5-pentilpirido[4,3- b]indol-1-one
DMHP	3-(1,2-dimetileptil)-7,8,9,10-tetraidro-6,6,9-trimetil-6H- dibenzo[b,d]piran-1-olo

FUB-NPB-22	Chinolina-8-il-(4-fluorobenzil)-1H-indazolo-3-carbossilato
JWH-018	(naftalen-1-il) (1-pentil-1H-indol-3-il) metanone
JWH-073	(naftalen-1-il) (1-butil-1H-indol-3-il) metanone
JWH-122	1-pentil-3-(4-metil-1-naftoil)indolo
JWH-250	1-pentil-3-(2-metossifenilacetil)indolo
MAM-2201	1-(5-fluoropentil)-3-(4-metilnaftoil)indolo
MDMB-CHMICA	Metil-3,3-dimetil-2- {[1-(cicloesilmetil)-1H-indol-3-il] carbonil] amino} butanoato
MDMB-PCZCA	Metil 3,3-dimetil -2-(9-pentil-9Hcarbazol-3-carbossamide)butanoato
MO-CHMINACA	1-metossi-3,3-dimetil-1-ossobutan-2-il 1-(cicloesilmetil)- 1H-indazolo-3-carbossilato
PARAESIL	3-esil-7,8,9,10-tetraidro-6,6,9-trimetil-6H-dibenzo[b,d]piran-1-olo
UR-144	[(1-pentilidol-3-il)-(2,2,3,3-tetrametilciclopropil) metanone]
W-18	4-Cloro-N-(1-[2-(4-nitrofenil)etil]- piperidin-2-ilidene) benzenesulfonamide

XLR-11	(1-(5-fluoropentil)-1H-indol-3-il)(2,2,3,3-tetrametilciclopropil) metanone
--------	--

In Tabella I sono inoltre riportati gli analoghi di struttura derivanti dalla indazol-3-carbossamide, dall'indol-3-carbossamide, dal 3-fenilacetilindolo e dal 3-(1-naftoil) indolo¹⁸⁴.

Spesso i nomi dei CS sono legati alla loro scoperta. In alcuni casi derivano dalle iniziali del nome degli scienziati che per primi li sintetizzarono: es. composti "JWH" da John W. Huffman e composti "AM" da Alexandros Makriyannis.

In altri casi i nomi derivano dall'istituzione o dall'azienda in cui sono stati sintetizzati per la prima volta, ad es. la serie "HU" di cannabinoidi sintetici proviene dall'Università Ebraica di Gerusalemme, o "CP" da Carl Pfizer.

In relazione al fentanyl, come oppioide ad azione analgesica, esso è inserito nella sezione A della tabella dei medicinali.

I principi attivi contenuti nella sezione A sono*: acetildiidrocodeina, alfentanil, amobarbital, buprenorfina, ciclobarbital, codeina, destromoramide, difenossilato, difenossina, diidrocodeina, dipipanone, eptabarbital, etilmorfina, **fentanyl**, flunitrazepam, folcodina, glutetimide, idrocodone, idromorfone, ketamina, levorfanolo, mecloqualone, metadone, metaqualone, metilfenidato, morfina, nandrolone, nicocodina, norcodeina, ossicodone, ossimorfone, papaver somniferum l. tintura, pentobarbital, petidina, phenibut, propiram, remifentanil, secobarbital, sufentanil, tapentadolo, tebaina, tiletamina, tiofentanil, tramadolo, zipeprolo.

*Qualsiasi forma stereoisomera delle sostanze iscritte nella presente tabella, in tutti i casi in cui possono esistere, salvo che ne sia stata fatta espressa eccezione. Gli esteri e gli eteri delle sostanze iscritte nella presente tabella, a meno che essi non figurino in altre tabelle, in tutti i casi in cui questi possono esistere. I Sali delle sostanze iscritte nella presente tabella, compresi i Sali dei suddetti isomeri, esteri ed eteri in tutti i casi in cui questi possono esistere.

2.5. Cannabinoidi

La *Cannabis*, una delle più antiche piante psicoattive conosciute, è costituita da oltre 500 composti chimici, di cui 66 appartengono al gruppo dei cannabinoidi.

I cannabinoidi sono una vasta famiglia di molecole non necessariamente correlate strutturalmente tra di loro ma tutte funzionalmente simili al delta-9-tetraidrocannabinolo (delta-9-THC), principio attivo della cannabis^{186,187,188}, che si uniscono ai recettori cannabinoidi presenti nel corpo umano.

Il sistema endocannabinoide è un sistema biologico di comunicazione tra le cellule: si tratta di molecole di segnalazione molto diffuse nell'organismo, che si legano agli stessi recettori sensibili al THC.

La prima sostanza endogena, appartenente ai cannabinoidi, venne identificata nel 1992 e fu chiamata arachidinoil-etanolamide, nota come Anandamide (AEA) e, poco dopo fu individuato un secondo tipo di endocannabinoide, il 2-arachidinoil-glicerolo (2-AG)¹⁸⁹.

AEA e 2-AG sono endocannabinoidi che derivano dall'acido arachidonico.

2-AG si lega non solo con i recettori per i cannabinoidi di tipo 1, i cosiddetti CB1, ma anche con un secondo tipo di recettore: vennero così scoperti anche i recettori per i cannabinoidi di tipo 2, denominati CB2. Il CB1 fu clonato nel 1990 da Matsuda et al¹⁹⁰, mentre quello CB2 nel 1993 da Munro et al¹⁹¹. La scoperta del recettore CB1 fu casuale, infatti avvenne durante

¹⁸⁶ Fattore, L. 2016. Synthetic cannabinoids-further evidence supporting the relationship between cannabinoids and psychosis. *Biol Psychiatry*. 79:539-548.

¹⁸⁷ Tait, R.J., Caldicott, D., Mountain, D. 2016. A systematic review of adverse events arising from the use of synthetic cannabinoids and their associated treatment. *Clin. Toxicol (Phila)*. 54, 1-13.

¹⁸⁸ Pacher, P., Steffens, S., Haskò, G. 2018. Cardiovascular effects of marijuana and synthetic cannabinoids: the good, the bad and the ugly. *Nat Rev Cardiol*. 15: 151-166.

¹⁸⁹ Devane W.A., Hanus L., Breuer A., Pertwee R.G., Stevenson L.A., Griffin G., Gibson D., Mandelbaum A., Etinger A., Mechoulam R. 1992. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258:1946-1949.

¹⁹⁰ Matsuda L.A., Lolait S.J., Brownstein M.J., Young A.C., Bonner T.I. 1990. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*. 346:561-4.

¹⁹¹ Munro S., Thomas K.L., Abu-Shaar M. 1993. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. 365:61-5.

esperimenti sul DNA di ratto focalizzati sullo studio dei geni dei recettori per le neurochine. Nel 1988 si giunse alla consapevolezza che tramite quel recettore i cannabinoidi mediavano gli effetti farmacologici e comportamentali¹⁹².

L'identificazione dei due tipi di recettori portò, successivamente, all'individuazione dei ligandi: i cannabinoidi endogeni^{193,194}. Il sistema endocannabinoide oltre ad essere composto da propri recettori e ligandi, è caratterizzato anche dalla presenza di un sistema di sintesi e degradazione^{195,196,197}. Infatti, gli endocannabinoidi sono particolarmente lipofili e non possono essere accumulati in vescicole, e vengono così sintetizzati in conseguenza, ad esempio, della depolarizzazione della membrana cellulare o in conseguenza di un aumento del calcio intracellulare.

I recettori CB1 sono distribuiti principalmente nel sistema nervoso centrale (SNC) e le aree maggiormente espressive di tali recettori risultano essere: il bulbo olfattivo, il cervelletto, l'ippocampo, i gangli della base, la corteccia, l'amigdala e l'ipotalamo^{198,199,200,201,202} (**figura**

¹⁹² Devane W.A., Dysarz F.A., Johnson M.R., Melvin L.S., Howlett A.C. 1988. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol.* 34:605-13.

¹⁹³ Mechoulam R., Ben-Shabat S., Hanus L., Ligumsky M., Kaminski N.E., Schatz A.R., Gopher A., Almog S., Martin B.R., Compton D.R. 1995. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol.* 50:83-90.

¹⁹⁴ Sugiura T., Kondo S., Sukagawa A., Nakane S., Shinoda A., Itoh K., Yamashita A., Waku K. 1995. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 215:89-97.

¹⁹⁵ Piomelli D. 2003. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci.* 4:873-884.

¹⁹⁶ De Petrocellis L., Cascio M.G., Di Marzo V. 2004. The endocannabinoid system: a general view and latest additions. *Br J Pharmacol.* 141:765-774.

¹⁹⁷ Di Marzo V., Bifulco M., De Petrocellis L. 2004. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov.* 3:771-784.

¹⁹⁸ Pagotto U., Marsicano G., Cota D., Lutz B., Pasquali R. 2006. The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr Rev.* 27:73-100.

¹⁹⁹ Howlett A.C., Barth F., Bonner T.I., Cabral G., Casellas P., Devane W.A., Felder C.C., Herkenham M., Mackie K., Martin B.R., Mechoulam R., Pertwee R.G. 2002. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev.* 54:161-202.

²⁰⁰ Ashton J.C., Friberg D., Darlington C.L., Smith P.F. 2006. Expression of the cannabinoid CB2 receptor in the rat cerebellum: an immunohistochemical study. *Neurosci. Lett.* 396: 113-116.

²⁰¹ Onaivi E., Ishiguro H., Gong J., Patel S., Meozzi P., Myers L., Perchuka A., Mora Z., Tagliaferro P., Gardner E., Brusco A., Akinsola B., Hope B., Lujilde J., Inada T., Iwasaki S., Macharia D., Teasenfitz L., Arinami T., Uhl G. 2008. Brain neuronal CB2 cannabinoid receptors in drug abuse and depression: from mice to human subjects. *PLoS One.* 3:e1640.

²⁰² Van Sickle M.D., Duncan M., Kingsley P.J., Mouihate A., Urbani P., Mackie K., Stella N., Makriyannis A., Piomelli D., Davison J.S., Marnett L.J., Di Marzo V., Pittman Q.J., Patel K.D., Sharkey K.A. 2005. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science.* 310: 329-332.

25). Inoltre, essi risultano espressi anche nel sistema nervoso periferico e in diversi organi e tessuti, come: sistema immunitario, tessuto adiposo, apparato muscolo-scheletrico^{203,204}, apparato gastro-intestinale in particolare a livello di pancreas e tessuto epatico²⁰⁵.

I recettori CB2 sono caratterizzati da una diversa distribuzione rispetto ai CB1, infatti essi presentano un'elevata espressione a livello periferico, ovvero nelle cellule del sistema immunitario (monociti, macrofagi, linfociti B e T), nella milza, nelle tonsille, nel timo, nel tessuto emopoietico ed anche a livello dei cheratinociti nella cute²⁰⁶.

Il sistema endocannabinoide è coinvolto in numerose funzioni fisiologiche, legate ai sistemi di risposta allo stress e al mantenimento dell'omeostasi, riguardanti in particolare la modulazione delle risposte immunitarie, infiammatorie ed endocrine. Oltre a ciò, esplica la sua azione sul sistema cardiovascolare e respiratorio.

I recettori cannabinoidi, recettori accoppiati a proteine G, sono costituiti da un'unica catena polipeptidica che attraversa per 7 volte la membrana plasmatica. Oltre ai 7 domini transmembrana sono presenti 3 loops intracellulari e 3 extracellulari.

Il recettore CB1 umano è costituito da una catena polipeptidica di 472 aminoacidi, mentre quello CB2 è formato da una sequenza polipeptidica costituita da 360 aminoacidi.

²⁰³ Cota D., Marsicano G., Tschoep M., Grubler Y., Flachskamm C., Schubert M., Auer D., Yassouridis A., Thone-Reineke C., Ortmann S., Tomassoni F., Cervino C., Nisoli E., Linthorst A.C., Pasquali R., Lutz B., Stalla G.K., Pagotto U. 2003. The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest.* 112:423-431.

²⁰⁴ Bensaïd M., Gary-Bobo M., Esclançon A., Maffrand J.P., Le Fur G., Oury-Donat F., Soubrie P. 2003. The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 increases Acp30 mRNA expression in adipose tissue of obese fa/fa rats and in cultured adipocyte cells. *Mol Pharmacol.* 63:908-914.

²⁰⁵ Howlett A.C., Barth F., Bonner T.I., Cabral G., Casellas P., Devane W.A., Felder C.C., Herkenham M., Mackie K., Martin B.R., Mechoulam R., Pertwee R.G. 2002. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol. Rev.* 54: 161-202.

²⁰⁶ Galiègue S., Mary S., Marchand J., Dussossoy D., Carrière D., Carayon P., Bouaboula M., Shire D., Le Fur G., Casellas P. 1995. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur. J. Biochem.* 232: 54-61.

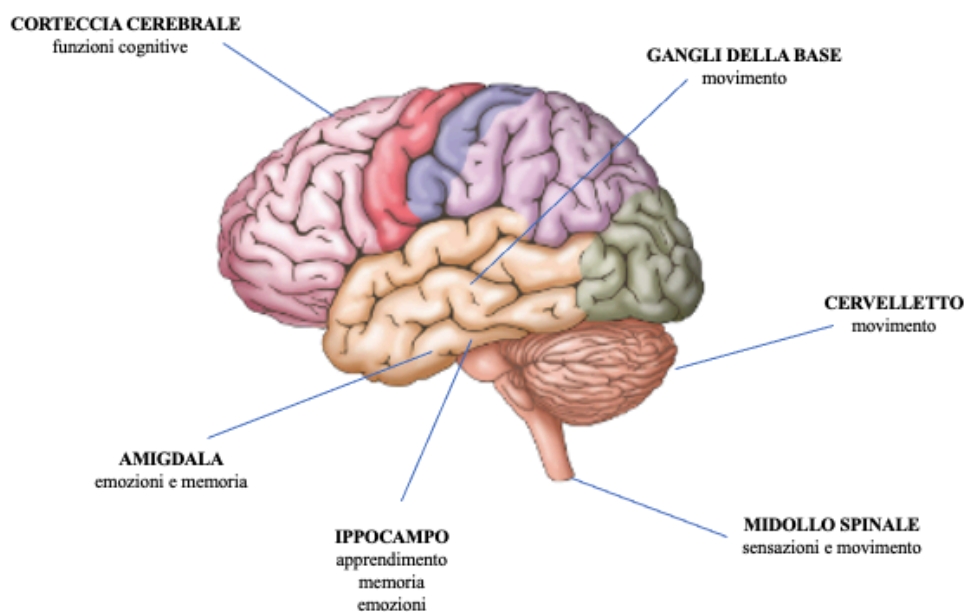


Figura 25. Principali localizzazioni dei recettori CB1 nel SNC.

I cannabinoidi sono suddivisi in tre gruppi: endocannabinoidi (**figura 26**), fitocannabinoidi (**figura 27**) e cannabinoidi sintetici.

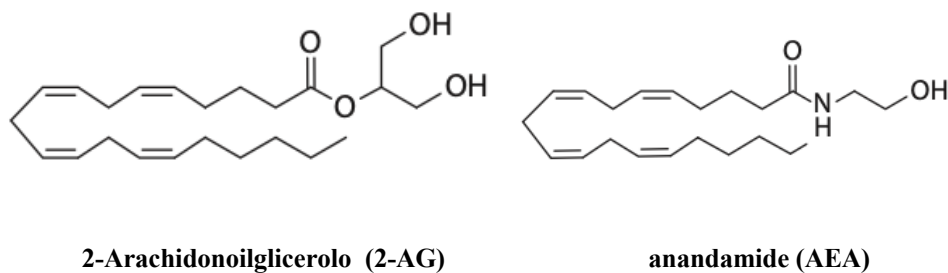


Figura 26. Strutture chimiche dei primi due endocannabinoidi individuati.

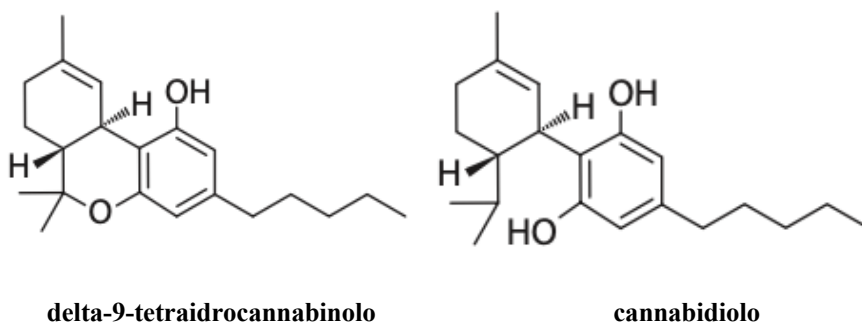


Figura 27. Strutture chimiche dei due principali fitocannabinoidi.

La classificazione dei cannabinoidi è stata proposta da Howlett²⁰⁷ et al., e Thakur et al²⁰⁸.

Tale classificazione dei cannabinoido-agonisti prevede:

- *Cannabinoidi classici*: tra questi il THC che agisce come agonista parziale di CB1 e CB2.
- *Cannabinoidi non classici*: tra i principali ritroviamo il CP-55, 940, agonista sia di CB1 che CB2.
- *Aminoalchilindoli o composti JWH*: composti non strutturalmente correlati a THC ma con potente attività cannabimimetica, in grado di legarsi sia al recettore CB1 che a quello CB2.
- *Eicosanoidi*: derivati dagli acidi grassi con 20 atomi di carbonio
- *Altri*

Per quanto riguarda gli antagonisti, il primo antagonista nei confronti del recettore CB1 fu sintetizzato nei laboratori Sanofi-Synthelabo ed identificato con come SR141716. Successivamente prese il nome di rimonabant²⁰⁹.

Altri composti in grado di antagonizzare il recettore CB1 sono AM251, AM281, LY320135.

Mentre, tra i principali composti in grado di bloccare il recettore CB2 si annovera AM630.

²⁰⁷ Howlett A.C., et al. 2002. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev.* 54: 161-202.

²⁰⁸ Thakur G.A., et al. 2005. CB1 cannabinoid receptor ligands. *Mini Rev Med Chem.* 5: 631-40.

²⁰⁹ Rinaldi-Carmona M., Barth F., Heaulme M., Shire D., Calandra B., Congy C., Martinez S., Maruani J., Neliat G., Caput D., Ferrara P., Soubrie P., Breliere J.C., Le Fur G. 1994. SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett.* 350:240-244.

2.5.1. Endocannabinoidi

In seguito alla scoperta dei recettori CB1 e CB2 nacque un forte interesse nei confronti delle molecole con attività THC-simile.

Successivamente alla scoperta dei primi due endocannabinoidi AEA e 2-AG, avvenute rispettivamente nel 1992 e nel 1995, vennero identificati anche altri composti, come il 2-arachidonoilgliceride (2-AGE o noladin-etero), l'0-arachidonoiletanolamina (virodamina) e la N-arachidonoildopamina (NADA).

Tutti questi endocannabinoidi sono in grado di legarsi ai recettori CB^{210,211,212} e vengono considerati come neurotrasmettitori. Infatti, essi presentano diverse analogie con quest'ultime molecole, come la sintesi intraneuronale, il rilascio conseguente a stimolazione, l'azione su bersaglio recettoriale specifico, la ricaptazione ed infine la degradazione. Nonostante queste caratteristiche comuni, essi però si differenziano dai neurotrasmettitori in quanto non vengono immagazzinati all'interno di vescicole ma sono prodotti "al bisogno", a partire da precursori lipidici che si trovano sulla membrana plasmatica delle cellule²¹³.

Il rilascio degli endocannabinoidi avviene nel terminale postsinaptico in seguito a specifici stimoli fisiologici come la depolarizzazione della membrana postsinaptica.

²¹⁰ Hanus L., Abu-Lafi S., Fride E., Breuer A., Vogel Z., Shalev D.E., Kustanovich I., Mechoulam R. 2001. 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 3662–3665.

²¹¹ Huang S.M., Bisogno T., Trevisani M., Al-Hayani A., De Petrocellis L., Fezza F., Tognetto M., Petros T.J., Krey J.F., Chu C.J. et al. 2002. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 8400–8405.

²¹² Porter A.C., Sauer J.-M., Knierman M.D., Becker G.W., Borna M.J., Bao J., Nomikos G.G., Carter P., Bymaster F.P., Leese A.B., et al. 2002. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 301: 1020–1024.

²¹³ Piomelli D. 2003. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat. Rev. Neurosci.* 4: 873–884.

Una volta rilasciati, gli endocannabinoidi esplicano un'azione retrograda di modulazione della sinapsi stessa tramite l'azione esercitata sui recettori CB presenti sulla membrana presinaptica²¹⁴.

Fra i principali effetti degli endocannabinoidi ritroviamo i meccanismi di plasticità sinaptica, l'attività motoria, l'alimentazione, l'apprendimento, regolazione della nocicezione, della temperatura corporea. Infine, essi esercitano un'azione anche sui sistemi immunitario, cardiovascolare ed endocrino^{215,216} (**figura 28**).

²¹⁴ Freund T.F., Katona, I., Piomelli, D. 2003. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol. Rev.* 83: 1017–1066.

²¹⁵ Ligresti A., De Petrocellis L., Di Marzo V. 2016. From Phytocannabinoids to Cannabinoid Receptors and Endocannabinoids: Pleiotropic Physiological and Pathological Roles Through Complex Pharmacology. *Physiol. Rev.* 96: 1593–1659.

²¹⁶ Piomelli D. 2004. The endogenous cannabinoid system and the treatment of marijuana dependence. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1: 359–367.



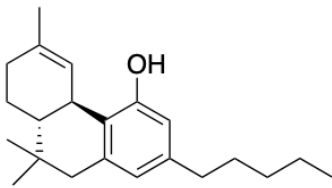
Figura 28. Ruoli fisiologici del sistema endocannabinoide.

2.5.2. Fitocannabinoidi

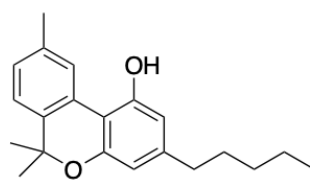
Si tratta di cannabinoidi di origine naturale, contenuti nella pianta di *Cannabis*.

Il gruppo dei fitocannabinoidi comprende circa 120 differenti composti contenenti ciascuno 21 atomi di carbonio e appartenenti alla classe chimica dei terpenofenoli^{217,218}, che si suddividono in diverse sottoclassi, tra cui le principali sono (figura 29):

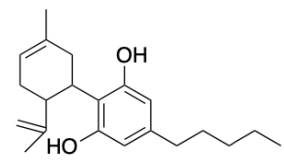
- Tetraidrocannabinolo (Δ^9 -THC)
- Cannabidiolo (CBD)
- Tetraidrocannabivarina (THCV)
- Cannabidiolo (CBN)



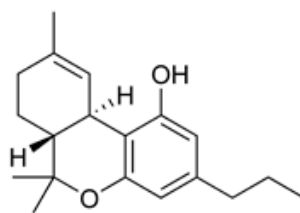
Delta-9-THC



Cannabinolo (CBN)



Cannabidiolo (CBD)



Tetraidrocannabivarina (THCV)

Figura 29. Strutture chimiche dei principali fitocannabinoidi.

²¹⁷ Elsohly M.A., Slade D. 2005. Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sci.* 78: 539–548.

²¹⁸ ElSohly M.A. 2007. Marijuana and the Cannabinoids. Springer.

La struttura chimica dei fitocannabinoidi può essere ricondotta a quella di un terpene unito ad un resorcinolo a sostituzione alchilica, oppure a quella di un sistema ad anello benzopiranic.

Il tetraidrocannabinolo, isolato nel 1964 in Israele da Raphael Mechoulam, Yechiel Gaoni e Habib Edery, rappresenta il capostipite della famiglia dei fitocannabinoidi.

Esso presenta un'azione antidolorifica, euforizzante, antiemetica ed euforizzante.

Il CBD è in grado di potenziare l'azione analgesica del THC in quanto ne prolunga la durata d'azione e, al contempo, ne riduce alcuni degli effetti indesiderati riguardanti la frequenza cardiaca, la respirazione e la temperatura corporea.

La THCV, isolata per la prima volta nel 1971, è un potente agonista dell'endocannabinoide anandamide.

Il CBN è presente in minima quantità nella cannabis fresca ma la sua quantità nei prodotti a base di cannabis aumenta con il passare del tempo. Per questo motivo, il rapporto CBN/THC consente di avere informazioni riguardo alla datazione dei prodotti a base di cannabis che si stanno analizzando.

La percentuale dei fitocannabinoidi presenti nella pianta di *Cannabis* risulta molto variabile essendo influenzata da diversi fattori quali varietà, sesso, habitat di coltivazione della pianta.

Queste variabili quantitative si riscontrano poi anche nelle diverse tipologie di preparati ad uso umano.

2.5.3. Cannabinoidi Sintetici (CS)

Con il termine cannabinoidi sintetici (CS) si intendono tutte quelle sostanze sintetiche che interagiscono con i recettori dei cannabinoidi CB1 e CB2 e provocano effetti cannabinomimetici simili al 9-tetraidrocannabinolo (THC), il principale costituente psicoattivo della cannabis²¹⁹.

Essi vengono colloquialmente denominati “K2” o “spice” e comprendono un ampio repertorio di composti.

Data la vasta gamma, la nomenclatura dei CS non è univoca e, inoltre, vengono utilizzati diversi sistemi di denominazione per identificare i composti, come quelli creati ed utilizzati per scopi di marketing (come “Black Mamba”), ai nomi chimici, fino ai termini colloquiali o “di strada” (come “K2”)²²⁰.

In generale, i CS possono essere classificati chimicamente in base alle loro porzioni chimiche (nucleo, coda, linker e gruppo variabile). Il gruppo principale generalmente è rappresentato da un indolo, da un indazolo o un carbazolo. Mentre il linker è rappresentato, generalmente, da un gruppo metanone, etenone, carbossilato.

AB-FUBINACA è un cannabinoide sintetico che può essere considerato per mostrare la struttura generale dei cannabinoidi sintetici (**figura 30**).

²¹⁹ Wiley J.L., Marusich J.A., Huffman J.W. 2013. Moving around the molecule: relationship between chemical structure and in vivo activity of synthetic cannabinoids. *Life Sci.* 23: 531–534.

²²⁰ Martin F. Casey, Alex F. Manini. 2022. Chapter15 - Synthetic cannabinoids (SC), Novel Psychoactive Substances (Second Edition). Academic Press.

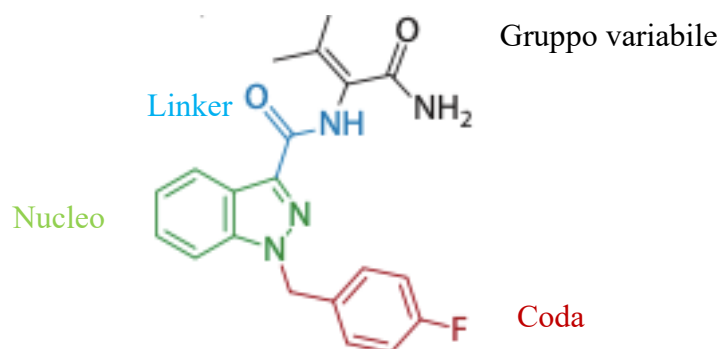


Figura 30. Struttura chimica di N-(1-carbamoyl-2-methyl-propyl)-1-[(4-fluorophenyl)methyl] indazole-3-carboxamide (AB-FUBINACA).

La produzione varia ed estensiva dei cannabinoidi sintetici agonisti (SCRA) è stata ottenuta modificando sistematicamente una o più delle quattro regioni (core, linker, testa e coda) della struttura di base.

I CS possono essere distinti in agonisti, con attività simile alla cannabis, ed antagonisti, non in grado di esercitare gli effetti tipici della cannabis ma tuttavia in grado di bloccare i recettori per altri composti.

I cannabinoidi sintetici agonisti nei confronti dei CB possono essere classificati in 8 differenti sottogruppi (**figura 31**).

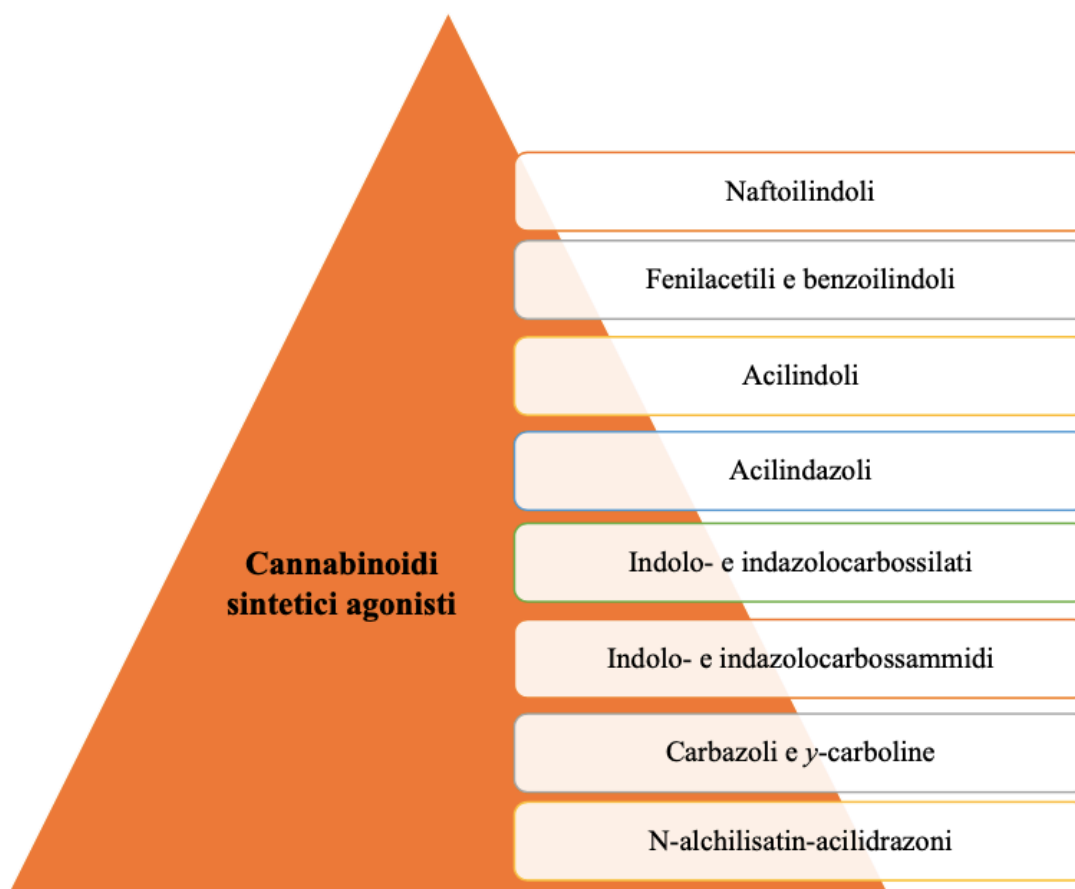


Figura 31. Classificazione chimica dei cannabinoidi sintetici.

L'interesse per la sintesi dei cannabinoidi coincide con la sintesi definitiva del THC nel 1965, da parte di Mechoulam e Gaoni²²¹.

Da quel momento in poi, diversi gruppi di ricerca e aziende commerciali si sono dedicati alla sintesi di composti con attività cannabinomimetica.

Inizialmente vennero sintetizzati solo i cosiddetti cannabinoidi classici (ad esempio il levonantradolo²²² e l'HU-210²²³). Negli anni '80 sono stati sviluppati cannabinoidi non classici

²²¹ Mechoulam R., Gaoni Y., A. 1965. Total Synthesis of DL-Delta-1-Tetrahydrocannabinol, the Active Constituent of Hashish. *J Am Chem Soc.* 87: 3273-5.

²²² Ko, B.K. 1981. Levonantradol, a potent cannabinoid-related analgesic, antagonizes haloperidol-induced activation of striatal dopamine synthesis. *Eur J Pharmacol.* 70: 231-5.

²²³ Howlett A.C., et al. 1990. Stereochemical effects of 11-OH-delta-8-tetrahydrocannabinol-dimethylheptyl to inhibit adenylate cyclase and bind to the cannabinoid receptor. *Neuropharmacology.* 29:161-5.

(ad es. CP-59.540 e CP-47.497^{224,225}) e AAI²²⁶. Essi sono stati sviluppati tra gli anni '80 e '90, in seguito all'identificazione e alla clonazione dei recettori cannabinoidi CB1²²⁷ e CB2²²⁸.

Da allora, l'interesse scientifico per questi composti è aumentato e ha portato alla sintesi di oltre 100 differenti sostanze.

I cannabinoidi sintetici rappresentano la classe più numerosa di droghe rilevate dal Sistema di allerta precoce dell'UE, con un totale di 245 sostanze notificate tra il 2005 e il 2022²²⁹.

A causa del costante emergere di nuove sostanze, appartenenti a questa classe di molecole, è necessario un costante aggiornamento dell'elenco delle droghe sottoposte a sorveglianza.

Negli ultimi anni, i cannabinoidi sintetici sono stati associati a decessi e intossicazioni acute e, nonostante una serie di nuove misure introdotte in questo settore, continuano a rappresentare una sfida per le attuali strategie di lotta e contrasto alla diffusione delle sostanze stupefacenti.

Per quanto riguarda il loro utilizzo, essi spesso vengono spruzzati su miscele di erbe naturali con lo scopo di imitare l'effetto euforico della cannabis e venduti come “miscele da fumare a base di erbe” o “incensi a base di erbe” con nomi di marca come “Spice” o “K2”, e resi disponibili tramite siti web per la combinazione con materiali a base di erbe o, più recentemente, per l'uso nelle sigarette elettroniche.

I cannabinoidi sintetici sono un gruppo eterogeneo e in continua evoluzione.

²²⁴ Compton D.R., et al. 1992. Pharmacological profile of a series of bicyclic cannabinoid analogs: classification as cannabimimetic agents. *J Pharmacol Exp Ther.* 260: 201-9.

²²⁵ Melvin L.S., et al. 1984. A cannabinoid derived prototypical analgesic. *J Med Chem.* 27: 67-71.

²²⁶ Huffman J., et al. 1994. Design, Synthesis and Pharmacology of Cannabimimetic Indoles. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 4: 563-566.

²²⁷ Matsuda L.A., et al. 1990. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature.* 346: 561-4.

²²⁸ Huffman J. 2009. Cannabimimetic indoles, pyrroles, and indenes: structure-activity relationships and receptor interactions. In: *The cannabinoid receptors*, P.H. Reggio, Editor, New York (USA). *Humana Press*.

²²⁹ European Union Drugs Agency (EUDA). 2023. Nuove Sostanze Psicoattive- l'attuale situazione in Europa (Relazione europea sulla droga 2023).

Il numero e la rapida evoluzione di questo gruppo di composti si riflettono anche nel mercato delle NPS, dove il contenuto dei prodotti può variare sia in termini di tipologia di cannabinoidi o miscele di cannabinoidi presenti, sia in termini di quantitativo di cannabinoidi^{230,231}.

Il controllo dello sviluppo e diffusione di tali sostanze diviene un aspetto estremamente importante. La portata e la rapidità dell'evoluzione dei CS rendono difficili il loro monitoraggio e il rilevamento analitico.

Circa 20 CS sono stati posti sotto controllo internazionale dal 2015 (figura 32).

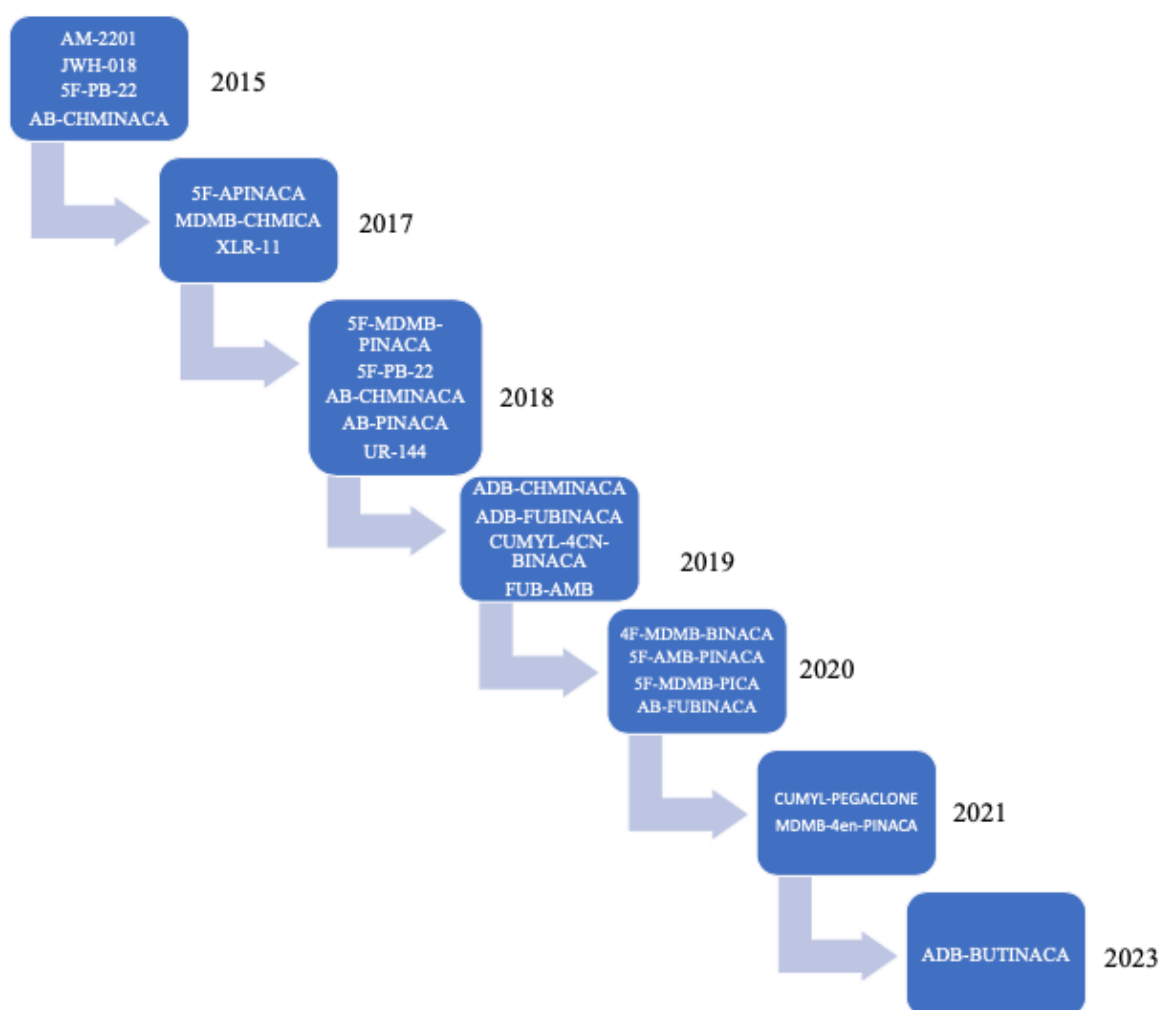


Figura 32. Cannabinoidi posti sotto controllo internazionale dal 2015 alla fine del 2023.

²³⁰ Corazza O. et al. 2014. "Spice," "Kryptonite," "Black Mamba": An Overview of Brand Names and Marketing Strategies of Novel Psychoactive Substances on the Web. *J Psychoactive Drugs*. 46: 287-294.

²³¹ Graziano S. et al. 2017. Herbal Highs: Review on Psychoactive Effects and Neuropharmacology. *Curr Neuropharmacol*. 15: 750-761.

L'individuazione tempestiva dei CS nei campioni biologici può risultare difficoltosa, compromettendo così la corretta diagnosi delle intossicazioni causate da tali sostanze.

Attualmente i CS non vengono sempre indagati sia in ambito clinico che medico legale, quindi non si ha contezza della loro reale diffusione. Sono disponibili in commercio test di screening per le urine che testano i più noti e comuni SC, come JWH-018, JWH-250, JWH-073 e AM-2201^{232,233}.

Per quanto riguarda le analisi di conferma, vengono comunemente utilizzate tecniche analitiche quali la gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS)²³⁴, la risonanza magnetica nucleare (NMR) o la spettroscopia infrarossa, la gascromatografia accoppiata al rivelatore a ionizzazione di fiamma e la cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (LC-MS)²³⁵.

Il rilevamento dei metaboliti è di fondamentale importanza poiché i composti originari dei CS sono instabili e si degradano, soprattutto se conservati a temperatura ambiente o sottoposti a cicli multipli di congelamento-scongelo.

²³² Barnes A.J., Young S., Spinelli E., et al. 2014. Evaluation of a homogenous enzyme immunoassay for the detection of synthetic cannabinoids in urine. *Forensic Sci. Int.* 241: 27e34.

²³³ Spinelli E., Barnes A.J., Young S., et al. 2015. Performance characteristics of an ELISA screening assay for urinary synthetic cannabinoids. *Drug Test. Anal.* 7: 467e474.

²³⁴ Liu C.M., Jia W., Meng X., Hua Z.D. 2021. Identification and quantification of 10 indole/indazole carboxamide synthetic cannabinoids in 36 herbal blends by gas chromatography-mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Forensic Sci.* 66:2156–66.

²³⁵ Tettey J.N.A., Crean C., Rodrigues J., Angeline Yap T.W., Lee Wendy Lim J., et al. 2021. United Nations Office on Drugs and Crime: recommended methods for the identification and analysis of synthetic cannabinoid receptor agonists in seized materials. *Forensic Sci. Int. Synerg.* 3:100129.

2.5.3.1. Effetti dei cannabinoidi sintetici

Gli effetti avversi relativi a questa vasta classe di NPS sono legati sia alle proprietà intrinseche sia al processo di produzione. Infatti, durante la fase di produzione, in alcuni casi, si può verificare un accumulo maggiore di cannabinoidi che può portare a dosi più alte del principio attivo rispetto a quelle previste, aumentando così i possibili effetti avversi, anche gravi.

Alcuni effetti possono derivare anche dall'interazione dei CS con diverse funzioni fisiologiche del corpo, oltre che dall'interazione con i recettori cannabinoidi stessi.

I principali effetti avversi dei CS riguardano numerosi apparati e sistemi del corpo umano (figura 33). Sono stati segnalati anche sintomi relativi a dipendenza e astinenza. A causa del completo agonismo nei confronti dei recettori CB1 e CB2 gli effetti dei CS risultano più gravi rispetto a quelli mostrati dalla marijuana (agonista parziale).

Attraverso le proteine Gi, i CS inibiscono la formazione di cAMP (adenosina monofosfato ciclico), diminuendo la fosforilazione dipendente dalla protein chinasi A (PKA). In seguito alla loro azione inibitoria, gli effetti finali sono principalmente retrogradi, regolando la funzione presinaptica e sopprimendo il rilascio di neurotrasmettitori.

Il metabolismo non è noto per tutti i CS a causa della continua comparsa sul mercato di nuovi composti.

Tra i più conosciuti CS vi sono JWH-018 e AM-2201 che subiscono un metabolismo di primo passaggio epatico per ossidazione attraverso CYP2C9 e CYP1A2, formando metaboliti idrossilati che mantengono un'importante attività sul recettore CB1²³⁶. In misura minore, anche CYP2C19 e CYP2D6 sono coinvolti nel metabolismo di entrambi questi CS.

²³⁶ Chimalakonda K.C., Seely K.A., Bratton S.M., et al. 2012. Cytochrome P450-Mediated oxidative metabolism of abused synthetic cannabinoids found in K2/Spice: identification of novel cannabinoid receptor ligands. *Drug Metab. Dispos.* 40: 2174e2184.

Le isoforme CYP coinvolte presentano numerosi polimorfismi genetici e ciò porta ad un'attività enzimatica differente nei diversi individui.

I principali metaboliti di JWH-018, JWH-015, JWH-073 e JWH-250 sono monoidrossilati e molte volte glucuronidati²³⁷.

Inoltre, UR-144, PB-22 e AKB-48 non fluorurati vengono monoidrossilati e glucuronidati sul carbonio terminale appartenente al gruppo alchilico²³⁸. I metaboliti degli analoghi fluorurati XLR-11, 5F-PB-22 e 5F-AKB-48 sono metaboliti dell'acido 5-idrossipentilene e acido pentanoico.

Alcuni studi hanno dimostrato anche il metabolismo della serie PINACA. AB-PINACA viene principalmente idrolizzato ad acido carbossilico AB-PINAC, in carbonil AB-PINACA, idrossipentil AB-PINACA e acido pentanoico AB-PINACA^{239,240,241}.

L'importanza nel conoscere i metaboliti dei vari CS è necessaria per poter rilevare e confermare la loro presenza.

²³⁷ Moran C.L., Le V.H., Chimalakonda K.C., et al. 2011. Quantitative measurement of JWH-018 and JWH-073 metabolites excreted in human urine. *Anal. Chem.* 83: 4228e4236.

²³⁸ Gandhi A.S., Wohlfarth A., Zhu M., et al. 2015. High-resolution mass spectrometric metabolite profiling of a novel synthetic designer drug, N-(adamantan-1-yl)-1-(5-fluoropentyl)-1H-indole-3-carboxamide (STS-135) using cryopreserved human hepatocytes and assessment of metabolic stability with human liver microsomes. *Drug Test. Anal.* 7: 187e198.

²³⁹ Wohlfarth A., Castaneto M.S., Zhu M., et al. 2015. Pentylindole/pentylindazole synthetic cannabinoids and their 5-fluoro analogs produce different primary metabolites: metabolite profiling for AB-PINACA and 5F-AB-PINACA. *AAPS J.* 17: 660e677.

²⁴⁰ Thomsen R., Nielsen L.M., Holm N.B., et al. 2015. Synthetic cannabimimetic agents metabolized by carboxylesterases. *Drug Test. Anal.* 7: 565e576.

²⁴¹ Wohlfarth A., Scheidweiler K.B., Castaneto M., et al. 2015. Urinary prevalence, metabolite detection rates, temporal patterns and evaluation of suitable LC-MS/MS targets to document synthetic cannabinoid intake in US military urine specimens. *Clin. Chem. Lab. Med.* 53: 423e434.

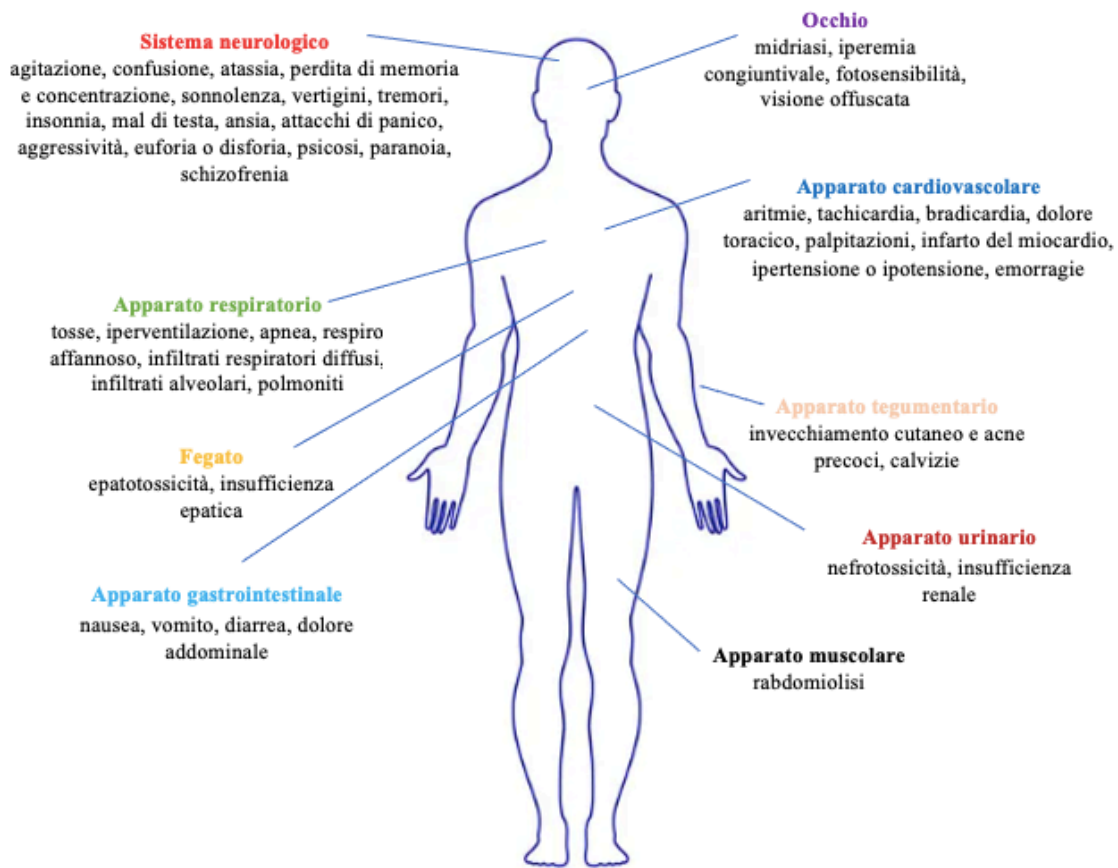


Figura 33. Principali effetti dei CS nel corpo umano.

2.5.4. Parte sperimentale

2.5.4.1. Obiettivo

L'obiettivo primario di questa parte di tesi è l'applicazione di un metodo analitico, precedentemente validato, su campioni di fluido orale raccolti, previo consenso informato, da soggetti in cura presso il Servizio per le Dipendenze Patologiche (SerDP) di Parma, allo scopo di rilevare un'eventuale positività ai cannabinoidi sintetici in questa popolazione di soggetti.

2.5.4.2. Materiali e Metodi

Raccolta campioni

Per lo studio in esame sono stati reclutati 66 soggetti volontari afferenti al Servizio per le Dipendenze patologiche (SerDP) di Parma.

I criteri di eleggibilità dello studio sono stati i seguenti:

- soggetti con età >18 anni, afferiti al SerDP di Parma per problemi legati alla dipendenza da alcol e/o da sostanze stupefacenti;
- primo accesso dei soggetti al SerDP a partire dal 2017.

In sede opportuna ogni individuo coinvolto è stato informato in maniera dettagliata riguardo alla finalità dello studio, alle indagini a cui si sarebbe dovuto sottoporre (raccolta di un campione di fluido orale e compilazione di una scheda per la raccolta di alcune informazioni) e agli eventuali rischi durante il prelievo.

A ciascun soggetto è stata fornita contestualmente la scheda informativa e il modulo di consenso informato.

Ai partecipanti allo studio è stato chiesto di rispondere ad alcune domande inerenti ai dati sociodemografici e anamnestici, nonché alle loro abitudini di abuso.

Sono stati raccolti 66 campioni di fluido orale, mediante sputo spontaneo di 2 ml di saliva.

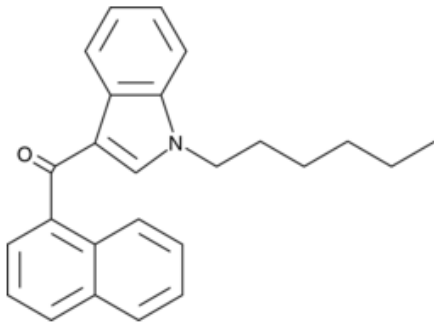
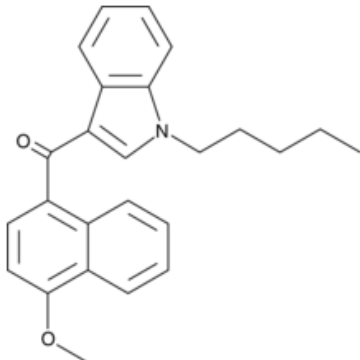
I dati sono stati anonimizzati: il fluido orale è stato raccolto in apposite provette prive di numero di riferimento identificativo per evitare ogni possibile identificazione o tracciabilità del donatore.

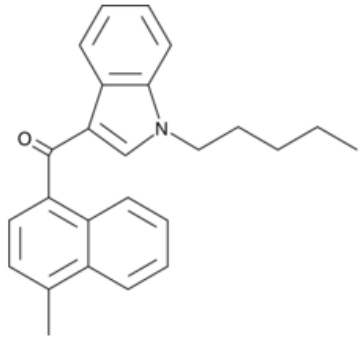
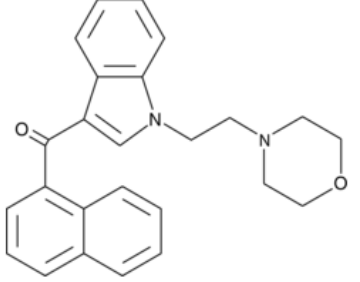
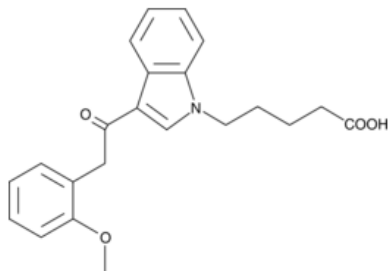
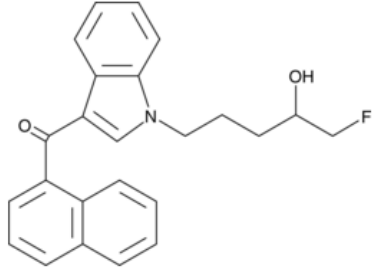
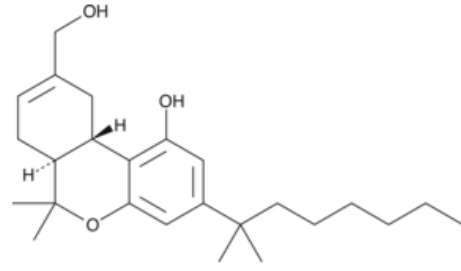
L'analisi è stata eseguita entro 10 giorni dalla raccolta.

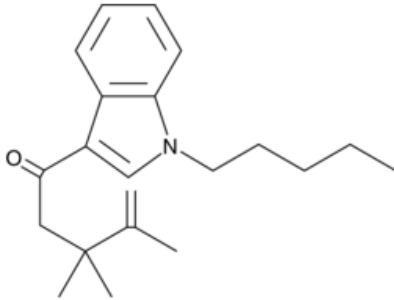
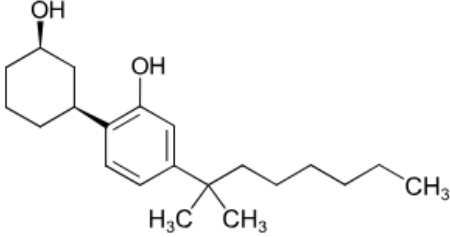
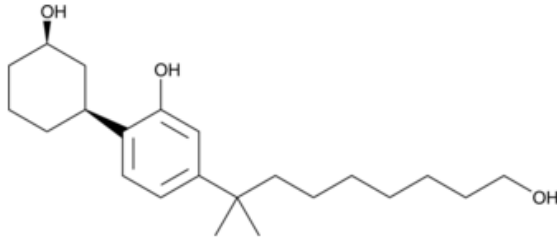
Cannabinoidi sintetici investigati

I CS sintetici investigati nel presente studio sono 10 e sono riassunti nella **tabella 8**.

Tabella 8. Cannabinoidi indagati nello studio.

Cannabinoide sintetico	Struttura chimica
JWH019	
JWH081	

<p>JWH122</p>	
<p>JWH200</p>	
<p>JWH250</p>	
<p>AM2201</p>	
<p>HU211</p>	

UR144	
CP47497-C7	
CP47497-C8	

I 10 cannabinoidi utilizzati nel presente studio sono stati forniti dall'Istituto Superiore di Sanità nell'ambito del progetto nazionale News-Alert.

Lo standard interno deuterato utilizzato è THC-D3 (1mg/ml), preparato alla concentrazione finale di 10 µg/ml.

Apparecchiatura analitica utilizzata HPLC-MS / MS

Le analisi sono state effettuate mediante la tecnica analitica LC-MS/MS, composta da un Agilent 1100 (Agilent Technologies) accoppiata all'API4000 MS/MS (SCIEX), dotato di un'interfaccia Turbo Ion Spray.

Le prestazioni del metodo sono relative ad un metodo analitico precedentemente sviluppato dal Laboratorio di tossicologia Forense UniPr²⁴².

I valori di LOD e LOQ del metodo analitico sono riportati in **tabella 9**.

Preparazione di campioni e standard

La soluzione standard della miscela è stata preparata mediante singole soluzioni madre in metanolo alla concentrazione finale di 500 ng/ml. quindi sono state preparate soluzioni intermedie appropriate in metanolo mediante diluizione.

Per preparare la curva di calibrazione nell'intervallo LOQ-100 ng/ml sono stati utilizzati campioni raggruppati di fluido orale privi di farmaci provenienti da volontari anonimizzati.

Nel frattempo sono stati analizzati campioni bianchi per verificare eventuali residui. I calibratori sono stati preparati nella suddetta matrice bianca, preventivamente controllata ed esente da qualsiasi droga o alcol e raccolta da volontari sani. I campioni e i calibratori sono stati preparati aggiungendo 50 ng di soluzione standard interna a 100 µl di fluido orale e quindi aggiunti 200 µl di metanolo. I campioni sono stati centrifugati a 10.000 giri al minuto per 5 minuti per la rimozione delle proteine e 100 µl di surnatante sono stati trasferiti nella fiala LC per l'analisi.

²⁴² Calò L., Anzillotti L., Maccari C., Cecchi R., Andreoli R. 2020. Validation of a bioanalytical method for the determination of synthetic and natural cannabinoids (new psychoactive substances) in Oral fluid samples by means of HPLC-MS/MS. *Front Chem.* 8;439.

2.5.4.3. Risultati

Risultati relativi alla matrice salivare

In **tabella 8** sono riportati i risultati ottenuti in seguito all'analisi sui 66 campioni di fluido orale raccolti, nei quali sono stati ricercati 10 cannabinoidi sintetici²⁴³.

13/66 (19.7%) campioni sono risultati positivi alla presenza di 6 differenti cannabinoidi sintetici: JHW-019, JHW-081, JHW-122, AM-2201, HU-211 e UR-144.

JWH019, JWH081, JWH122, AM2201, HU211 e UR144 sono risultati presenti in tracce poiché le loro concentrazioni sono risultate comprese fra il LOD e il LOQ del metodo analitico utilizzato²⁴²; mentre solo JWH081, JWH122 sono risultati presenti, in un unico campione di saliva, in concentrazioni tali da essere quantificabili, poiché superiori al corrispettivo limite di quantificazione (LOQ).

In **tabella 9** sono riportate anche le frequenze di ritrovamento dei CS nei campioni raccolti ed esaminati, specificando se la loro concentrazione superava il valore di LOD, e quindi presenti in tracce, o il valore di LOQ, e quindi quantificabili.

²⁴³ Pascali J.P., Dagoli S., Antonioni M., Facetti O., Anzillotti L., Calò L., Affini G.F., Cantarelli B., Cecchi R. 2022. Oral fluid analysis to monitor recent exposure to synthetic cannabinoids in a high-risk subpopulation. *J Forensic Sci.* 67:1932-1937.

Tabella 9. Riassunto dell'analisi sui 66 campioni di fluido orale²⁴³.

Cannabinoide sintetico	Campioni positivi (>LOD)	LOD ng/ml²⁴²	Campioni positivi (>LOQ)	LOQ ng/ml²⁴²	Concentrazione (ng/ml)
JWH019	1	0.005	-	0.018	
JWH081	1	0.002	1	0.006	0.29 ⁱ
JWH122	3	0.001	1	0.004	0.36 ⁱ
JWH200	-	0.082	-	0.275	
JWH250	-	0.166	-	0.553	
AM2201	1	0.003	-	0.553	
HU211	5	0.173	-	0.255	
UR144	3	0.002	-	0.007	
CP47497-C7	-	2.275	-	7.583	
CP47497-C8	-	0.422	-	1.406	

ⁱ dallo stesso campione appartenente ad un solo soggetto

I cromatogrammi del campione di saliva in cui è stata riscontrata la presenza di JWH081 e JWH122, rispettivamente alle concentrazioni di 0.29 ng/ml e 0.36 ng/ml, sono riportati in figura 34.

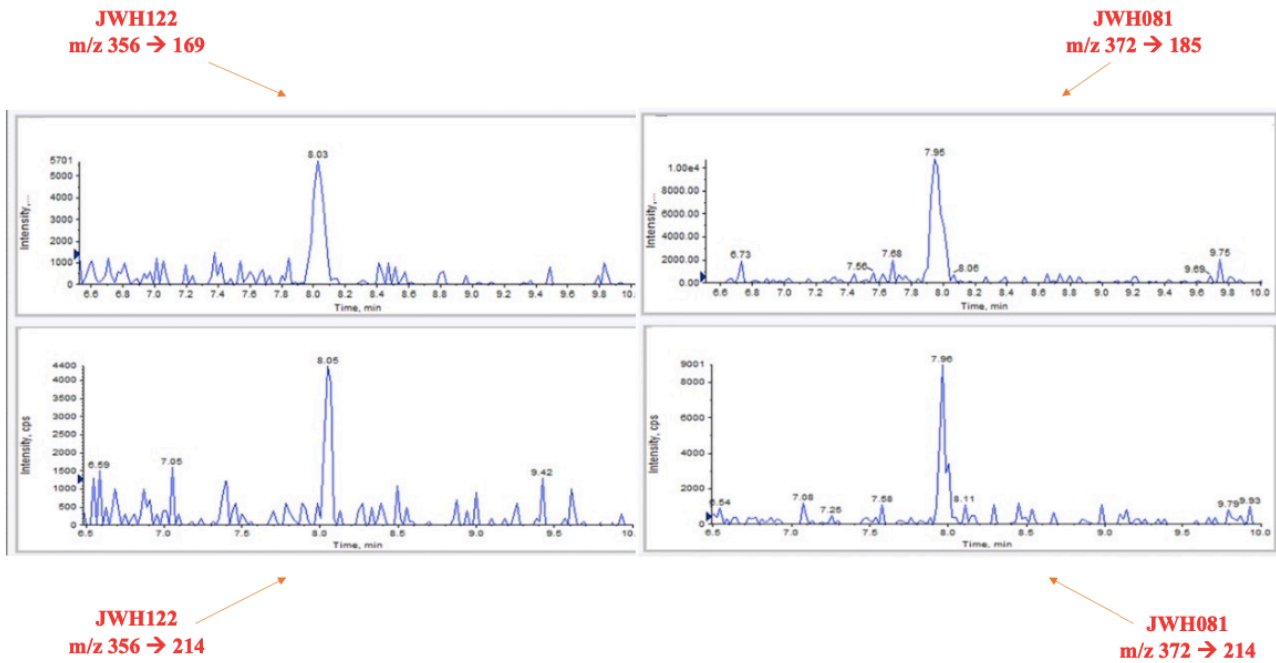


Figura 34. Extracted ion chromatogram (EIC) dei CS JWH122 e JWH081 presenti in un unico campione di saliva, rispettivamente alle concentrazioni di 0.36 ng/ml e 0.29 ng/ml²⁴³.

Risultati relativi al questionario

La maggior parte dei soggetti arruolati è rappresentata da maschi (oltre l'80.0%) con un'età media di circa 41 anni, senza un'occupazione lavorativa (62.1%) e con un grado di istruzione limitato alla scuola dell'obbligo (47.0%)²⁴³.

In fase di compilazione del questionario è stato chiesto ai soggetti di specificare le sostanze di cui facevano uso al momento del primo accesso presso il SerDP di Parma.

Si riportano in **figura 35** le tipologie di sostanze d'abuso utilizzate dai partecipanti allo studio.

La percentuale totale delle sostanze dichiarate risulta essere superiore al 100% in quanto la maggior parte dei soggetti ha dichiarato una poliassunzione.

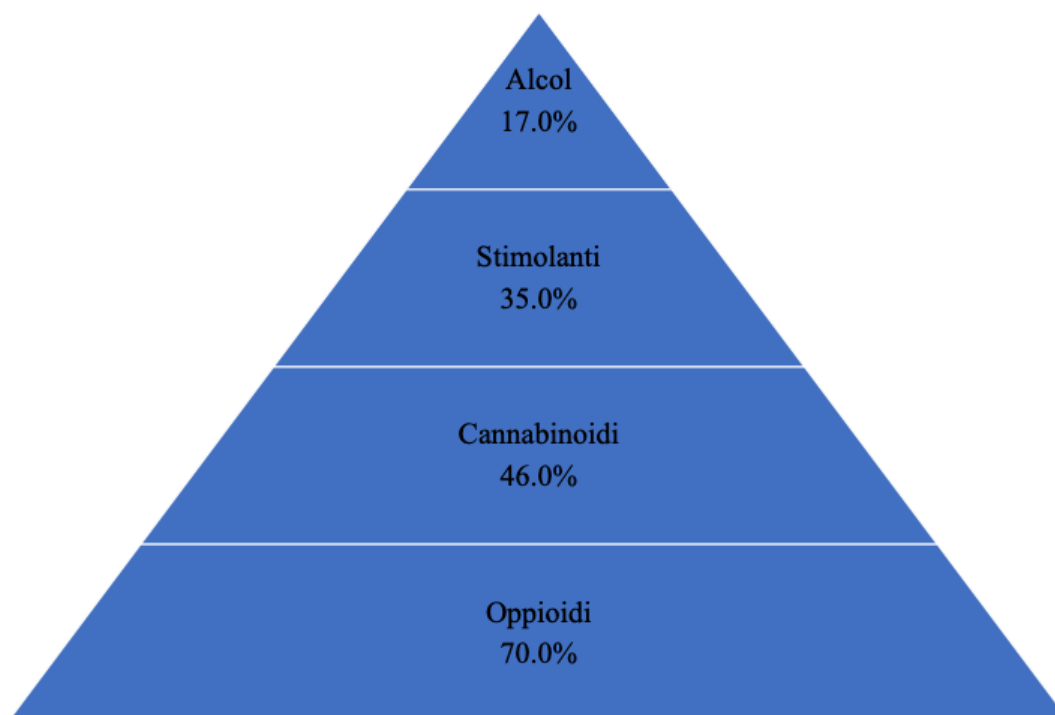


Figura 35. Classi di sostanze d'abuso utilizzate dai partecipanti allo studio²⁴³.

L'uso di cannabinoidi sintetici non è stato dichiarato da nessun partecipante allo studio.

2.5.4.4. Discussione

La metodica analitica utilizzata in questo studio²⁴², validata per cannabinoidi naturali e sintetici, è risultata sensibile, semplice da attuare e rapida. Queste caratteristiche sono indispensabili al fine di rilevare precocemente tali composti in quanto la loro comparsa sul mercato illecito è dinamica e in continua espansione.

In letteratura vi sono diversi studi che riportano intossicazioni acute causate da CS, anche con esito fatale^{244,245,246} ma vi sono pochissimi casi di studi relativi a soggetti viventi.

Questo studio rappresenta il primo tentativo nello scenario italiano di indagare questa classe di NPS in una popolazione di soggetti ad elevato rischio.

Un aspetto importante su cui soffermarsi è quello relativo alla mancata dichiarazione da parte dei soggetti partecipanti allo studio relativa all'uso di cannabinoidi sintetici. Infatti, dal questionario è emerso l'utilizzo di cannabinoidi (marijuana e hashish) ma non di quelli sintetici.

Questa condizione potrebbe riferirsi ad una mancata dichiarazione volontaria da parte dei partecipanti oppure potrebbe riflettere "un'assunzione inconsapevole" dovuta alla presenza di queste sostanze in altri composti assunti.

La positività è stata riscontrata in circa il 20% dei campioni analizzati. Nella maggior parte dei casi il riscontro della sostanza si attestava sotto al LOQ. Solo 1 campione è risultato positivo a due cannabinoidi con valori >LOQ.

²⁴⁴ Tokarczyk B., Jurczyk A., Krupińska J., Adamowicz P. 2022. Fatal intoxication with new synthetic cannabinoids 5F-MDMB-PICA and 4F-MDMB-BINACA-parent compounds and metabolite identification in blood, urine and cerebrospinal fluid. *Forensic Sci Med Pathol.* 18:393-402.

²⁴⁵ Adamowicz P., Meissner E., Maślanka M. 2019. Fatal intoxication with new synthetic cannabinoids AMB-FUBINACA and EMB-FUBINACA. *Clin Toxicol (Phila).* 57:1103-1108.

²⁴⁶ Simon G., Tóth D., Heckmann V., Kuzma M., Mayer M. 2022. Lethal case of myocardial ischemia following overdose of the synthetic cannabinoid ADB-FUBINACA. *Leg Med (Tokyo).* 54:102004.

Dati di farmacocinetica relativi a questa classe di NPS, presenti in letteratura, hanno dimostrato come la positività a tali sostanze, in termini di concentrazione, possa variare significativamente a partire da circa 2 ng/ml fino ad oltre 2000 ng/ml se tali composti vengono fumati in un tempo compreso tra 5 e 20 minuti²⁴⁷, rimanendo rilevabili nel fluido orale fino a 12 ore a concentrazioni inferiori a 0.2 ng/ml. Dunque, le concentrazioni riscontrate dalla nostra analisi molto probabilmente si riferiscono ad un'assunzione avvenuta da diverse ore fino a 12 ore prima del prelievo del campione di saliva.

Questo conferma che i metodi analitici messi a punto ed utilizzati per investigare questa classe di NPS devono essere molto sensibili^{248,249}.

Relativamente alle positività riscontrate, il rilevamento di CS della famiglia JWH è alquanto sorprendente in quanto essi rappresentano i primi SCRA introdotti sul mercato illecito europeo a partire dagli anni 2000²⁵⁰ ed i campioni in esame sono stati analizzati circa 20 anni dopo la loro prima comparsa. Questo dimostra come il costante emergere di nuove sostanze illecite sia affiancato dal continuo consumo di composti già presenti da tempo.

Un'ulteriore considerazione relativa al rilevamento di questa classe di composti in questo tipo di matrice, è legato alla considerevole instabilità che caratterizza i cannabinoidi sintetici nel fluido orale. Tale aspetto si può riflettere sui risultati dei campioni indagati, in quanto, a causa di una precoce degradazione, potrebbero risultare false negatività oppure positività con concentrazioni più basse.

²⁴⁷ Toennes S.W., Geraths A., Pogoda W., Paulke A., Wunder C., Theunissen E.L., et al. 2018. Pharmacokinetic properties of the synthetic cannabinoid JWH-018 in oral fluid after inhalation. *Drug Test Anal.* 10:644–50.

²⁴⁸ Amaratunga P., Thomas C., Lemberg B.L., Lemberg D. 2014. Quantitative measurement of XLR11 and UR-144 in oral fluid by LC-MS-MS. *J Anal Toxicol.* 38:315–21.

²⁴⁹ La Maida N., Pellegrini M., Papaseit E., Pérez-Mañá C., Poyatos L., Ventura M., et al. 2020. Determination of the synthetic cannabinoids JWH-122, JWH-210, UR-144 in oral fluid of consumers by GC-MS and quantification of parent compounds and metabolites by UHPLC-MS/MS. *Int J Mol Sci.* 21:9414.

²⁵⁰ European monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). Synthetic cannabinoids in Europe 2017.

Detto ciò, i CS investigati nel nostro studio hanno dimostrato in studi precedenti una buona stabilità nel fluido orale^{242,251}

2.5.4.5. Conclusioni

L'elevata dinamicità che caratterizza il mondo delle NPS rende necessari continui studi per lo sviluppo di metodi analitico-strumentali che siano sensibili, semplici, di rapida esecuzione ed eseguibili su campioni agilmente prelevabili, come il fluido orale. La disponibilità di un metodo analitico validato che permette di rilevare la presenza di NPS è fondamentale per approfondirne caratteristiche farmacologiche, eventuali tossicità ed interazioni con altre droghe e per poter eseguire studi epidemiologici; aspetti ad oggi non completamente sviscerati ma di grande impatto sulla salute pubblica.

Nonostante le ridotte concentrazioni riscontrate, che ne fanno escludere un uso recente, e una bassa frequenza di rilevamento, risulta chiara la presenza di CS nello scenario relativo alle sostanze d'abuso diffuse nella realtà parmigiana. L'esito ottenuto esprime l'assoluta necessità di valutare le differenti classi di NPS presso strutture come il SerDP, consentendo di adeguare i protocolli terapeutici applicati e di migliorare l'assistenza fornita ai pazienti in cura.

L'obiettivo futuro è quello di poter incrementare sia il numero di cannabinoidi sintetici indagato sia il campione di ricerca.

²⁵¹ Kneisel S., Speck M., Moosmann B., Corneillie T.M., Butlin N.G., Auwärter V. 2013. LC/ESI-MS/MS method for quantification of 28 synthetic cannabinoids in neat oral fluid and its application to preliminary studies on their detection windows. *Anal Bioanal Chem.* 405:4691–706.

Questo studio ha portato alla pubblicazione di un articolo scientifico in una rivista internazionale di settore forense nel corso del 2022:

Pascali JP, **Dagoli S**, Antonioni M, Facetti O, Anzillotti L, Calò L, Oral fluid analysis to monitor recent exposure to synthetic cannabinoids in a high-risk subpopulation. *J Forensic Sci.* 2022;00:1–6. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.15067>.



Received: 11 March 2022 | Revised: 13 May 2022 | Accepted: 13 May 2022

DOI: 10.1111/1556-4029.15067

ORIGINAL ARTICLE

JOURNAL OF
FORENSIC SCIENCES 

Oral fluid analysis to monitor recent exposure to synthetic cannabinoids in a high-risk subpopulation

Jennifer P. Pascali PhD¹  | Sara Dagoli MSc² | Maina Antonioni MD³ |
Olivia Facetti MD³ | Luca Anzillotti PhD² | Luca Calò MSc² |
Giuseppe Fertonato Affini MD³ | Barbara Cantarelli MD³ | Rossana Cecchi MD, PhD² 

¹Legal medicine and toxicology, Department of Cardiologic, Thoracic and Vascular Sciences, University of Padova, Padova, Italy

²Legal Medicine, Department of Medicine and Surgery, University of Parma, Parma, Italy

³Service for Pathological Dependencies (SerDp), Parma, Italy

Correspondence

Jennifer P. Pascali, Legal medicine and toxicology, Department of Cardiologic, Thoracic and Vascular Sciences, University of Padova, Via Falloppio 50, 35127, Padova, Italy.
Email: jennifer.pascali@unipd.it

Abstract

Among novel psychoactive substances, synthetic cannabinoid receptor agonists (SCRA) seem to have the widest diffusion in the population with no limitation to any particular demographic group. Information on drug consumption relies mostly on anonymized surveys and less on clinical or analytical data; notwithstanding, the huge efforts constantly made to enroll subjects to gather epidemiological data. In the present study, we collected 66 oral fluid samples from volunteers in a drug rehabilitation center in 2019 and early 2020. A liquid chromatography–mass spectrometry method previously developed and validated by our Unit was applied to detect SCRA ($n = 10$) in oral fluid. Results proved the presence of synthetic cannabinoids at a positivity rate of almost 20%, with detection frequency HU211(5/13) > UR144/JWH122 (3/13) > JWH019/JWH081/AM2201 (1/13). Concentrations were in the range < LOQ – 0.36 ng/ml. Synthetic cannabinoids consumption had not been declared by any volunteer. This study enabled for the unprecedented detection of synthetic cannabinoids use in the territory of Parma (Italy) in a high-risk subpopulation. The identified SCRA proved the persistence into the market of the “first-generation” JWH family into the Italian territory and the marketing of relatively new ones (AM-2201). Public health consequences represented by NPS consumption are still scarce; therefore, further studies are needed to understand the real diffusion in the population.

KEYWORDS

forensic toxicology, JWH-081, JWH-122, novel psychoactive substances, oral fluid, synthetic cannabinoids

Highlights

1. Oral fluid samples ($n = 66$) from drug abusers were analyzed for synthetic cannabinoid receptor agonists (SCRA).
2. JWH-019, JWH-081, JWH-122, AM-2201, HU-211, and UR-144 were identified in 13 samples.
3. Reports are limited in Europe, but this research confirms the extensive use of SCRA in drug abusers (19.7%).
4. This research confirms the presence and persistence of “first-generation” SCRA in the Italian territory.

2.6. Oppioidi

Il termine **oppiacei** si riferisce agli alcaloidi naturali, derivanti dall'oppio, un lattice gommoso estratto dalle capsule immature del *Papaver somniferum*, il cui uso è antichissimo. Già intorno al 200 a.C., gli scritti di Teofrasto descrivono l'uso dell'oppio in medicina. Tuttavia recenti ricerche evidenziano come tale sostanza fosse in uso già in epoca sumera con azione antidolorifica. Proseguendo nel corso della storia il farmacista Surtürner fu il primo ad isolare nel 1803 un alcaloide dall'oppio, che chiamò morfina, da Morfeo, il dio greco dei sogni²⁵². Nel corso degli anni successivi furono isolati dal papavero da oppio nuovi alcaloidi; quali la codeina, la tebaina e la papaverina, tuttora utilizzati in medicina (figura 36).

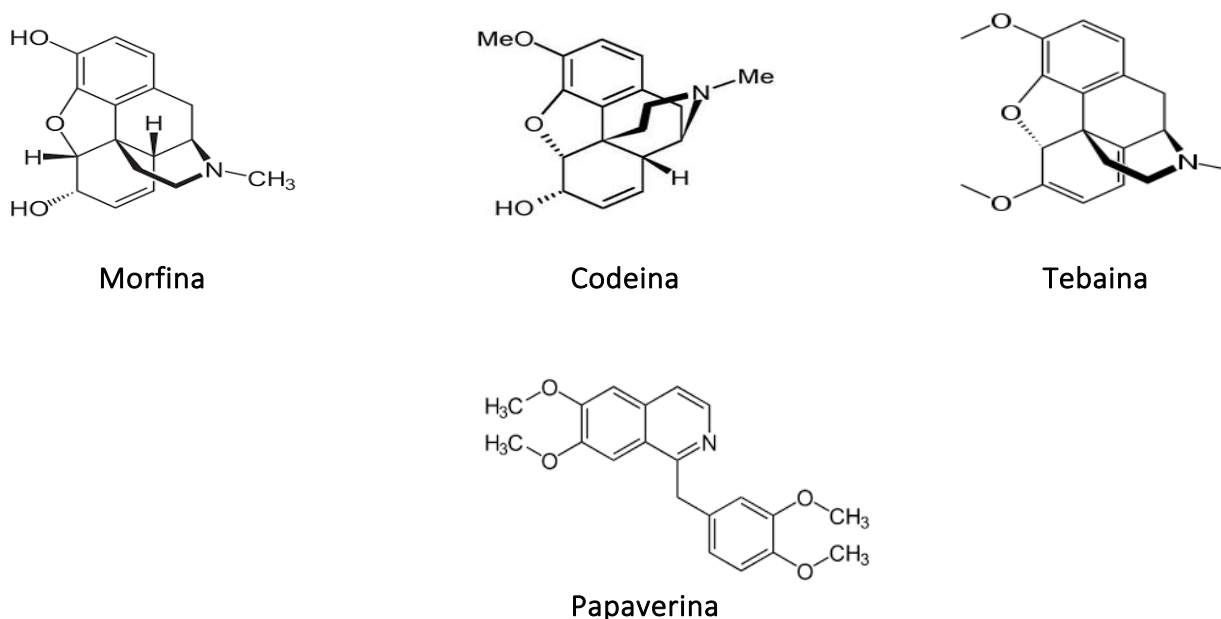


Figura 36. Strutture chimiche di morfina, codeina, tebaina e papaverina.

Tuttavia, per decenni il meccanismo d'azione della morfina rimase sconosciuto. Nel 1973, l'uso di tecniche di *binding* recettoriale permise ad un team di ricercatori di dimostrare la

²⁵² Trescot A.M., Datta S., Lee M., Hansen H. 2008. Opioid pharmacology. *Pain Physician*. 11:133-53.

presenza di siti di legame specifici per la morfina nel cervello. La scoperta di specifici recettori oppioidi aprì la via alla ricerca di un sistema oppioide endogeno, utilizzatore naturale e fisiologico dei recettori della morfina e condusse all'identificazione delle encefaline e delle dinorfine.

Ad oggi, la morfina viene utilizzata come potente analgesico per il controllo del dolore acuto e nel trattamento del dolore cronico (ad esempio in quello oncologico)²⁵³.

Per quanto riguarda la codeina, altra molecola di uso comune, essa presenta un potere antidolorifico inferiore a quello della morfina e quindi viene utilizzata nel trattamento di sintomatologie algiche di minore intensità. Quest'ultima presenta, inoltre, un'importante azione antitussiva, pertanto viene impiegata in diverse forme farmaceutiche come farmaco per il trattamento della tosse severa.

Gli **oppioidi** invece sono prodotti sintetizzati parzialmente (oppioidi semisintetici) o totalmente (oppioidi sintetici) in laboratorio, in grado di mimare gli effetti analgesici, anestetici e sedativi degli oppioidi naturali.

Per poter essere classificato come oppioide, una sostanza, oltre ad avere proprietà farmacologiche simili a quelle della morfina, deve essere antagonizzata da un antagonista oppioide come il naloxone²⁵⁴.

Gli oppioidi non alcaloidi, strutturalmente diversi dalla morfina ottenuti con sintesi organiche vengono divisi principalmente in tre gruppi:

- 1) Fenilpiperidine
- 2) Benzomorfan
- 3) Difetilpropilammine

²⁵³ Juneja R. 2014. Opioids and cancer recurrence. *Curr Opin Support Palliat Care*. 8:91-101.

²⁵⁴ Beardsley P.M., Zhang Y. 2018. Synthetic Opioids. *Handb Exp Pharmacol*. 252:353-381.

Esistono tre tipi principali di recettori oppioidi: mu, kappa e delta.

La nomenclatura adottata dall'Unione Internazionale di Farmacologia (IUPHAR) nel 1996 classifica i tre recettori oppioidi seguendo l'ordine della loro clonazione²⁵⁵. In base a questa classificazione, i recettori oppioidi delta sono i recettori OP₁, quelli kappa gli OP₂ e i mu OP₃. La IUPHAR ha approvato una nuova nomenclatura nel 2000, rinominando i recettori: MOP-mu, DOP-delta e KOP-kappa. Nella letteratura attuale, tuttavia, si indicano i recettori oppioidi con DOR (delta), KOR (kappa) e MOR (mu).

I recettori degli oppioidi sono espressi dai neuroni centrali e periferici e dalle cellule neuroendocrine (ipofisi, surrenali), immunitarie ed ectodermiche²⁵⁶ (tabella 10).

L'identificazione di recettori oppioidi multipli è dipesa dalla scoperta di agonisti ed antagonisti selettivi, dall'uso di tecniche di saggio sensibili²⁵⁷ e dalla clonazione delle proteine recettoriali²⁵⁸.

Tabella 10. Recettori oppioidi.

Recettore	Sito di azione	Effetti
Mu	Sistemico	Analgesia, euforia, costipazione, depressione respiratoria
Mu	Periferico	Analgesia, costipazione, riduzione dell'inflammazione
Delta	Sistemico	Analgesia, convulsioni, ansiolisi
Delta	Periferico	Analgesia, costipazione
Kappa	Sistemico	Analgesia, diuresi, disforia
Kappa	Periferico	Analgesia, riduzione dell'inflammazione

²⁵⁵ Dhawan B.N., Casselin R., Raghbir R. 1996. International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. *Pharmacol Rev.* 48:567-592.

²⁵⁶ Stein C. 2016. Opioid Receptors. *Annu Rev Med.* 67:433-51.

²⁵⁷ Leslie F.M. 1987. Methods used for the study of opioid receptors. *Pharmacol Rev.* 39:197-249.

²⁵⁸ Satoh M., Minami M. 1995. Molecular pharmacology of the opioid receptors. *Pharmacol Ther.* 68:343-364.

2.6.1. Effetti farmacologici

Principali azioni a livello centrale

L'azione analgesica degli oppiacei così come degli oppioidi è esercitata attraverso l'attivazione dei recettori MOP che promuovono il rilascio di dopamina, via inibizione di interneuroni GABAergici (disinibizione), mentre le azioni avverse sono sostenute dal recettore KOP che riduce il rilascio di dopamina, in maniera simile a ciò che accade nella sindrome da astinenza.

Insieme all'analgesia, gli oppioidi inducono sedazione che deriva dall'inibizione della liberazione di mediatori (in particolar modo acetilcolina, noradrenalina e glutammato) in tutto il sistema nervoso centrale (SNC) e sistema nervoso periferico (SNP). Tale effetto viene sfruttato per l'induzione di anestesia nella pratica chirurgica.

Nell'ambito degli effetti sulla psiche, quello più importante è rappresentato dall'euforia. La componente euforica dell'effetto analgesico degli oppioidi riduce la tensione e l'ansia legate al dolore ed è particolarmente utile in pazienti affetti da malattie gravi²⁵⁹.

Tale effetto nel soggetto sano provoca una condizione generale di piacere. L'euforia è riferita all'attivazione dei recettori MOP, mentre la disforia risulta dall'attivazione dei recettori KOP. Particolarmente importate è l'azione degli oppioidi sul sistema respiratorio, dato che la diminuita sensibilità del centro respiratorio alla CO₂ causata dalla loro assunzione è responsabile di effetti collaterali anche gravi in pazienti trattati con questi farmaci e delle morti per overdose (arresto respiratorio) dei tossicodipendenti. La pericolosità di questo effetto ne vieta l'uso in soggetti che facciano uso di farmaci sedativi e ipnotici²⁶⁰.

²⁵⁹ Willner P., Bergman J., Vanderschuren L. 2020. The behavioural pharmacology of opioids. *Behav Pharmacol.* 31:109-111.

²⁶⁰ Martin W.R. 1983. Pharmacology of opioids. *Pharmacol Rev.* 35:283-323.

A livello oculare, gli oppioidi provocano miosi, favorendo la contrazione del muscolo sfintere dell'iride e del muscolo ciliare. Inoltre, provocano la diminuzione della pressione intraoculare e si verifica un aumento del potere di accomodazione.

Gli oppioidi agiscono anche sul sistema endocrino ipotalamo-ipofisario in senso inibitorio a livello dei fattori ipotalamici ormone somatotropo (GRH) e corticotropina (CRH) a cui fa seguito la riduzione dei livelli ematici di ormone luteinizzante (LH), follicolo stimolante (FSH) e ormone adrenocorticotropo (ACTH), con conseguente riduzione della sintesi e liberazione di ormoni sessuali e di cortisolo. Si verifica, invece, un aumento della prolattina a seguito dell'inibizione esercitata dalla dopamina sulla secrezione di questo ormone²⁶¹.

Principali effetti a livello periferico

Uno degli apparati maggiormente coinvolto è quello gastrointestinale.

Infatti i recettori MOP e DOP sono presenti lungo tutto il tratto gastrointestinale dove inibiscono, prevalentemente a livello presinaptico, il rilascio di neurotrasmettitori come noradrenalina e acetilcolina. In questa sede, gli oppioidi provocano paralisi della muscolatura che esita in stipsi, uno degli effetti collaterali più frequentemente associati all'uso di queste molecole^{260,261}.

A livello dello stomaco, lo svuotamento gastrico è rallentato con importanti conseguenze per la digestione degli alimenti e per l'assorbimento di altri farmaci assunti *per os*. Anche la motilità delle vie biliari e le secrezioni biliare e pancreatica risultano ridotte.

²⁶¹ Annunziato L., Di Renzo G.F. 2016. Trattato di farmacologia. Seconda Edizione.

2.6.2. Effetti avversi

Considerata la vasta e diversificata localizzazione dei recettori oppioidi, sono numerosi gli effetti avversi in cui si incorre in seguito all'assunzione, anche terapeutica, di oppioidi^{160,161}.

Tra questi si possono annoverare effetti a breve e a lungo termine (**tabella 11**).

Tabella 11. Principali effetti avversi a breve e lungo termine.

Effetti a breve termine	Effetti a lungo termine
sedazione	tolleranza
sonnolenza	dipendenza
rallentamento psicomotorio	sindrome di astinenza
deficit cognitivi	ansia
apatia	sudorazione intensa
letargia	depressione
difficoltà nell'eloquio	tremori
diminuzione della pressione arteriosa e del battito cardiaco	crampi
stitichezza, nausea e vomito	ipertermia

2.6.3. Antagonisti oppioidi

Tre antagonisti oppioidi puri sono commercializzati per invertire l'azione centrale degli agonisti oppioidi: Naloxone, Naltrexone e Nalmefene (figura 37).

Ciascuno di essi può essere somministrato per via iniettiva per trattare soggetti in overdose da oppioidi. Se somministrati in questa condizione, essi precipitano i sintomi di astinenza ma possono salvare la vita.

Il Naloxone è un antagonista oppioide specifico ad alta affinità che viene utilizzato per contrastare il sovradosaggio o overdose da oltre 40 anni²⁶².

Questa molecola è inefficace oralmente a causa della rapida ossidazione che inattiva il gruppo allilico della struttura e per la coniugazione di fase 2 nel tratto gastroenterico e nel fegato.

Esso viene usato solo come antidoto in emergenza da agonista oppioide²⁶³.

In contrasto, il Naltrexone e il Nalmefene hanno sufficiente biodisponibilità per la somministrazione orale, sebbene solo il naltrexone sia disponibile in commercio *per os*.

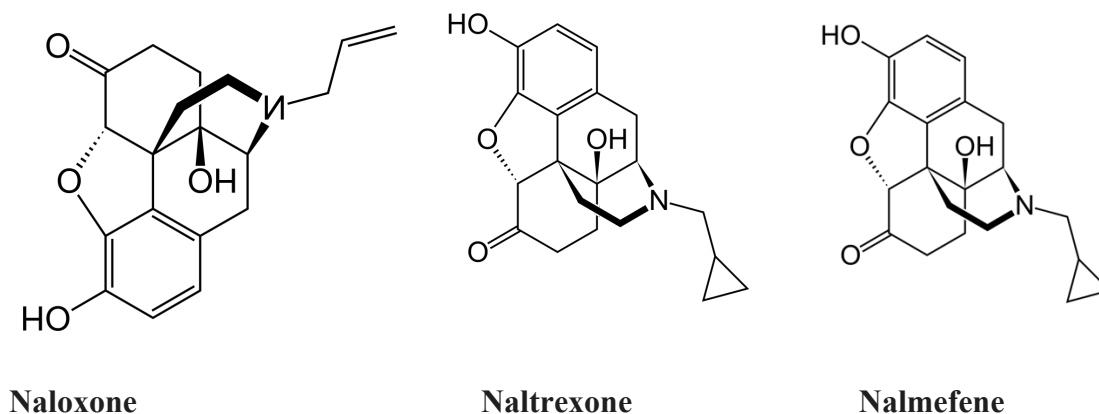


Figura 37. struttura chimica di naloxone, naltrexone, nalmefene.

²⁶² Skolnick P. 2018. On the front lines of the opioid epidemic: Rescue by naloxone. *Eur J Pharmacol.* 835:147-153.

²⁶³ van Dorp E., Yassen A., Dahan A. 2007. Naloxone treatment in opioid addiction: the risks and benefits. *Expert Opin Drug Saf.* 6:125-32.

2.6.4. Emergenza oppioidi

La dipendenza da fentanyl, a differenza di fenomeni analoghi riguardanti altre sostanze d'abuso, coinvolge molto spesso persone ordinarie alla ricerca di un efficace metodo per ridurre un dolore molto spesso derivante da situazioni altrettanto ordinarie e quotidiane.

Un operaio con un'algia cronica ad un gomito derivante da un sovraccarico biomeccanico, dopo una vita passata a lavorare in fabbrica; una ragazza alle prese con l'intenso dolore causato dalla rimozione dei denti del giudizio; un giovane atleta infortunatosi ad un ginocchio durante un incontro di hockey; una donna affetta da un'importante discopatia cervicale. Questi sono solo alcuni esempi di individui la cui quotidianità, a causa di una banale patologia o infortunio, è stata stravolta dal vortice della dipendenza²⁶⁴.

Tuttavia se, come evidenziato dai precedenti esempi, il punto di partenza di molte storie come queste, negli Stati Uniti, è vario e singolare, il successivo percorso è molto spesso tristemente simile: un'iniziale prescrizione medica di un potente antidolorifico che col passare del tempo muta in una dipendenza da farmaci, fino a giungere, in molti casi, ad un triste epilogo rappresentato dalla morte per overdose.

Per dare l'idea della portata del fenomeno e del suo impatto sulla società si riportano alcuni numeri e fatti riguardanti la diffusione del fentanyl e le sue conseguenze negli Stati Uniti. Dalla fine degli anni novanta mezzo milione di persone negli Stati Uniti sono morte per overdose da oppioidi. Tale numero di morti è pari a quelle causate nel triennio 1915-1918 da due catastrofi epocali: l'influenza spagnola e la prima guerra mondiale.

Il trend delle morti per overdose, causate da fentanyl ed altri oppioidi è purtroppo in costante crescita. Secondo le stime dei Centers for Disease Control and prevention (CDC), nel corso del tempo si è passati dagli oltre 18 mila americani morti nel 2014, alle oltre 100 mila persone

²⁶⁴ Sofri L., 2022. Le droghe in sostanza. Post cose spiegate bene. IPERBOREA.

morte per un'overdose da oppioidi negli Stati Uniti nel 2021. Si tratta del numero più alto di sempre e in forte aumento rispetto al 2020 (+ 14.9%)²⁶⁵. Alcuni degli episodi più gravi e dei numeri più alti di quest'epidemia si registrano nelle aree situate lungo il corso del fiume Ohio nella cosiddetta Rust Belt, cintura della ruggine, un tempo florida regione industriale tra i grandi laghi e i monti Appalachi, ma allo stato attuale flagellata da una grave crisi industriale e da alti tassi di disoccupazione che hanno favorito il diffondersi di fenomeni criminali.

Tuttavia è bene sottolineare come il fenomeno della dipendenza da farmaci antidolorifici oppioidi non sia appannaggio solo delle classi sociali maggiormente svantaggiate ma affligga in maniera trasversale l'intera società americana.

Infatti, la morte causata dall'assunzione di oppioidi, ed in particolare da fentanyl, ha colpito anche illustri personaggi dello spettacolo; tra questi i casi più famosi riguardano il cantautore Tom Petty, deceduto a 66 anni nell'ottobre del 2017 in seguito ad un'assunzione accidentale di un cocktail di farmaci oppioidi tra cui il fentanyl, e il cantante Prince morto l'anno precedente per una situazione analoga.

Il fenomeno del consumo e della dipendenza da oppioidi dagli Stati Uniti ha iniziato a espandersi prima agli stati limitrofi e poi al resto del globo.

Per quanto riguarda i primi, è bene sottolineare come nel vicino Canada, nel 2016, vi siano state oltre 15 mila morti per overdose di questi farmaci. Anche in questa nazione la situazione è peggiorata progressivamente nel corso del tempo, in particolare in alcune aree come la British Columbia, la provincia canadese più occidentale, dove tra il 2015 e il 2020 sono stati registrate oltre 5 mila morti per overdose. In questa regione, che ha una superficie che è più di tre volte quella dell'Italia ed è abitata da poco più di 5 milioni di persone, le autorità

²⁶⁵ Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2024. Fentanyl, Overdose Prevention.

sanitarie locali stimano che gli abitanti della provincia con dipendenza da oppioidi siano tra i 50 e i 100 mila soggetti.

Al termine di questa disamina sul continente nordamericano, è bene evidenziare come alla base dell'attuale picco di overdose da fentanyl non ci sono però solo farmaci regolarmente prescritti ma anche pillole di contrabbando provenienti da Messico, India e Cina e disponibili sul mercato nero, nonché l'uso del fentanyl stesso utilizzato per "tagliare" e amplificare gli effetti di sostanze illegali come l'eroina.

Per quanto riguarda quest'ultimo fenomeno durante la pandemia da Sars-Cov 2 la crisi di reperibilità dell'eroina ha portato, secondo le autorità, ad un maggiore ricorso al fentanyl sia come sostanza da assumere tal quale, sia come agente da taglio per altre sostanze. Oltre ad una più facile reperibilità, la decisione di utilizzare il fentanyl per tagliare altre droghe²⁶⁶, è legata ad un effetto stabilizzatore/potenziatore di questa sostanza in grado di garantire ai consumatori l'effetto atteso anche in presenza di una quota minore di eroina. Questo potere amplificatore è la causa per cui oggi tracce di fentanyl si trovano anche in molte altre droghe oltre all'eroina, come ad esempio cocaina, metanfetamina e ketamina o in farmaci contraffatti che mimano prodotti farmaceutici a base di ossicodone e benzodiazepine.

Per quanto riguarda l'Europa, ormai da tempo si teme l'arrivo in quantità ingenti del fentanyl²⁶⁷. Allo stato attuale tuttavia il fenomeno della dipendenza fa registrare numeri nettamente differenti rispetto alla realtà nordamericana²⁶⁸. La minore pervasività di questa

²⁶⁶ Di Gaudio F., Mortali C., Tini A. 2021. Opioid epidemic spread from Northern and Eastern Europe to Mediterranean area. *Clin Ter.* 172: 209-210.

²⁶⁷ European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). 2023. Heroin and other opioids-the current situation in Europe (European Drug Report 2023).

²⁶⁸ European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). 2023. Opioid agonist treatment-the current situation in Europe (European Drug Report 2023).

sostanza in Europa può essere spiegata con una maggiore diffusione di altre droghe ma soprattutto con una maggiore capillarità della sanità pubblica²⁶⁹.

Nonostante ciò, nel contesto del continente europeo, in alcuni paesi est-europei come Polonia, Repubblica Ceca e Slovacchia, la soglia di attenzione per i casi di overdose da oppioidi è incrementata notevolmente. In particolare la situazione risulta decisamente preoccupante in Polonia, dove a fine giugno 2024 il primo ministro ha definito il fentanyl come “il veleno del Ventunesimo secolo” che miete morti in tutto il mondo. Tali parole sono state dettate dallo sgomento causato dal verificarsi in questo paese di 48 morti per overdose successivamente alla prima morte ufficiale per da fentanyl risalente al novembre 2023.

Nonostante tale preoccupante, in generale in Europa il fentanyl circola illegalmente in quantità ancora ridotte rispetto agli Stati Uniti e le morti correlate a questa sostanza rappresentano un fenomeno limitato. Secondo il rapporto del 2024 dell'Osservatorio Europeo delle Droghe e delle Tossicodipendenze (EUDA), nel 2022 nel territorio dell'Unione Europea sono stati sequestrati in tutto 92.2 chili di fentanyl e carfentanil in 14 diversi paesi. Relativamente al numero di decessi, anche questo non è paragonabile a quello degli Stati Uniti. Nel 2022 EUDA ha registrato 163 morti associate all'overdose di fentanyl²⁷⁰.

²⁶⁹ European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). 2023. New psychoactive substances-the current situation in Europe. (European Drug Report 2023).

²⁷⁰ European Union Drugs Agency (EUDA). 2024. Comprendere la situazione della droga in Europa nel 2024: principali sviluppi (Relazione europea sulla droga 2024).

2.6.5. Anche in Italia esiste un'emergenza da oppioidi?

La situazione americana ha suscitato il timore che gli oppioidi sintetici si possano diffondere sempre di più anche nel mercato italiano delle sostanze stupefacenti. La preoccupazione riguarda anche la possibilità che gli oppioidi sintetici possano essere assunti in maniera ignara anche da consumatori di altre sostanze, visto il loro utilizzo come sostanze da taglio.

In virtù di ciò, il consiglio dei ministri n. 73, dell'11 marzo 2024, ha approvato il piano nazionale di prevenzione contro l'uso improprio di fentanyl e di altri oppioidi sintetici. Il piano è stato presentato in una successiva conferenza stampa che ha visto la partecipazione della Prof.ssa Sabina Strano Rossi, presidente del Gruppo Tossicologi Forensi Italiani (GTFI)²⁷¹.

Il piano, coordinato dal Dipartimento per le Politiche Antidroga, è stato sviluppato grazie al lavoro congiunto di diversi ministeri, istituzioni e differenti attori coinvolti nella lotta alla diffusione e nella prevenzione dell'utilizzo di sostanze stupefacenti.

In conseguenza di ciò con un successivo decreto del 30 giugno 2020, in vigore dal 28 luglio 2020, i derivati del fentanyl sono stati inseriti nella tabella I (ultimo aggiornamento DM 24 luglio, DM 1 agosto, DM 2 agosto 2024)²⁷² delle sostanze stupefacenti e psicotrope di cui al Testo Unico delle leggi in materia di disciplina degli stupefacenti e sostanze psicotrope, prevenzione, cura e riabilitazione dei relativi stati di tossicodipendenza (DPR 309/90), analogamente al fentanyl che era già stato precedentemente tabellato.

Per quanto riguarda la reale diffusione di queste sostanze, dal mese di giugno 2016 ad oggi, il Sistema Nazionale di Allerta Rapida del Dipartimento per le Politiche Antidroga ha diffuso

²⁷¹ Presidenza del Consiglio dei Ministri. Dipartimento per le Politiche Antidroga. 2024. Piano nazionale di prevenzione contro l'uso improprio di fentanyl e di altri oppioidi sintetici. Conferenza stampa Gruppo Tossicologi Forensi Italiani (GTFI).

²⁷² Ministero della Salute. Tabelle sostanze stupefacenti e psicotrope.

a tutto il network dei centri collaboratori e delle istituzioni di pertinenza presenti sul territorio nazionale 3 comunicazioni per decessi (aprile 2017, Milano causato da Ocfentanil; luglio 2017, Torino causato da U47-700; giugno 2018, Milano causato da Furanilfentanil), 5 comunicazioni riguardanti intossicazioni non letali associate all'uso di fentanyl e 2 segnalazioni relative al consumo di fentanyl riscontrato dall'analisi di campioni biologici di altrettante persone in trattamento presso i Serd^{273,274}.

In Italia, tra il 2018 e il 2023, le attività delle forze di polizia hanno portato al sequestro di 123,17 grammi di fentanyl in polvere (quantitativo potenzialmente sufficiente a causare migliaia di casi di intossicazioni acute, considerando che circa 3 milligrammi sono sufficienti per ottenere tale effetto), 28 dosi in compresse e 37 altre confezioni (cerotti, flaconi e altre forme farmaceutiche di prodotti medicinali).

Ad inizio 2024, a Perugia il fentanyl è stato rilevato in una dose di eroina prelevata nell'ambito di un'attività di riduzione del danno, ovvero un'attività volta a fornire assistenza alle persone tossicodipendenti. Dai risultati delle verifiche svolte dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS), emerse che il fentanyl rappresentava circa il 5% del campione analizzato.

In seguito alla diffusione di tale notizia, fu attivato il Sistema Nazionale di Allerta Rapida per le Droghe (NEWS-D), coordinato dal Dipartimento per le Politiche Antidroga (DPA) che ha diffuso un'allerta rivolta a tutte le forze di polizia e a tutte le amministrazioni competenti.

Secondo il DPA nel 2023 le NPS più consumate nella fascia di età compresa tra 15 e 19 anni sono stati cannabinoidi sintetici (4.6%), ketamina (1.3%), oppioidi sintetici (1.3%), catinoni (0.8%)²⁷⁴.

²⁷³ Dipartimento Politiche Antidroga, Presidenza del Consiglio dei Ministri. 2024. Piano nazionale di prevenzione contro l'uso improprio di fentanyl e di altri oppioidi sintetici.

²⁷⁴ Presidenza del Consiglio dei Ministri, Dipartimento per le Politiche Antidroga-2024. Relazione annuale al parlamento.

Viene così mantenuto il trend di consumo in crescita osservato dopo la pandemia da Sars-Cov 2.

Una delle principali “piazze di spaccio” del fentanyl, così come delle nuove e altrettanto pericolose sostanze psicoattive, è il web che consente la promozione e la vendita di sostanze che vengono recapitate direttamente al domicilio degli acquirenti in piccoli plichi postali anonimi, rendendo possibile una fruizione autonoma e incontrollata delle stesse. Tale modalità di vendita mette in contatto senza intermediari il distributore e l’utente finale, esponendo quest’ultimo ad un costante rischio di intossicazione acuta, data anche la sua inconsapevolezza della composizione del prodotto acquistato.

L’importanza delle varie segnalazioni risulta cruciale per il contrasto al fenomeno di diffusione di questa classe di sostanze in progressiva espansione in Europa e di conseguenza anche in Italia.

Considerato ciò, si rende necessaria la pianificazione e la messa in atto di un’efficace strategia preventiva. Pertanto, negli ultimi anni, in Italia si sono intensificati sempre di più i progetti di prevenzione, attraverso un lavoro capillare di informazione, comunicazione e sensibilizzazione che vede coinvolti operatori pubblici (come amministrazioni locali e dipartimenti delle dipendenze) e privati (associazioni ed operatori del terzo settore). Solo nel corso del 2023, sono stati realizzati 289 progetti di prevenzione rivolti alla popolazione studentesca.

La gestione territoriale da parte delle forze dell’ordine in collaborazione con i laboratori di tossicologia, che dovranno essere pronti a riconoscere e a quantificare il fentanyl e i suoi derivati, sia in materiale da sequestro che in matrici biologiche, sarà cruciale per limitare la diffusione di queste sostanze nella penisola italiana e prevenire un’epidemia come quella verificatasi negli Stati Uniti.

A tal proposito, a settembre 2024 l'Università degli studi di Parma ha diffuso, a docenti e ricercatori, una mail per comunicare l'associazione di UniPr al MUR per rimarcare i pericoli di questa sostanza.

2.6.6. Fentanyl

Nome

Fentanil; (Fentanyl)

Struttura molecolare

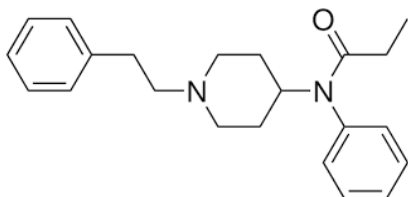


Figura 38. Struttura chimica fentanyl.

Formula di struttura

$C_{22}H_{28}N_2O$ (base libera) / $C_{22}H_{28}N_2O \cdot C_6H_8O_7$ (sale citrato)

Numero CAS

437-38-7 (base libera) / 990-73-8 (sale citrato)

Nome IUPAC

N-(1-phenethylpiperidin-4-yl)-N-phenylpropanamide

Altri nomi

N-(1-(2-phenethyl)-4-piperidinyl)-N-phenyl-propanamide; N-(1-Phenethylpiperidin-4-yl)-N-phenylpropionamide; N-(1-phenethyl-yl-4-piperidyl)-propionanilide; 1-Phenethyl-4-(N-phenylpropionamido)piperidine; 1-Phenethyl-4-N-propionylanilinopiperidine; Fentanylum; Fentanest; Fentanila; Phentanyl; Fentora; Effentora; Duragesic; Sentonil; Matrifen; Alfentanil; Actiq; Onsolis; Sufentanil; Sublimase; Remifentanil; Carfentanil.

Nomi gergali: China White, Synthetic Heroin, Drop Dead, Flatline, Lethal Injection, Apache, China Girl, Chinatown, Dance Fever, Great Bear, Poison, Tango & Cash, TNT.

Peso molecolare

336.471 g/mol (base libera) / 528.59 g/mol (sale citrato)

Aspetto

Il fentanyl e i suoi sali formano granuli bianchi o polveri cristalline.

Il fentanyl ha punto di fusione pari a 87,5°C; la solubilità in acqua è pari a 200 mg/L a 25°C.

Il fentanyl (o fentanil, o fentanile) è un potente oppioide sintetico utilizzato in medicina come analgesico e anestetico²⁷⁵.

Come analgesico, ha effetti simili a quelli della morfina, ma è da 50 a 100 volte più potente di quest'ultima e 30- 50 volte più potente dell'eroina.

Si tratta di un farmaco tipicamente utilizzato per trattare il dolore in forma grave, specialmente in chirurgia, traumatologia e oncologia. Inoltre, è usato per trattare pazienti con patologie dolorose croniche, quando resistenti ad altri oppioidi.

Il fentanyl, come la morfina, la meperidina, l'ossicodone e altri, produce le consuete azioni del sistema nervoso centrale da oppioidi, quali affaticamento, sedazione, nausea, vomito, vertigini, depressione respiratoria (che porta all'apnea a dosi più elevate), bradicardia (secondaria a un'azione stimolante vagale centrale) e incoscienza/anestesia a dosi più elevate, indipendentemente dalla modalità di somministrazione.

Da un punto di vista chimico, il fentanyl appartiene alla classe delle anilidopiperidine con spiccata azione analgesica, sedativa e con capacità di indurre euforia²⁷⁶.

Esso presenta un'elevata lipofilia che gli consente di penetrare rapidamente la barriera ematoencefalica e di aumentare la sua concentrazione nel sistema nervoso centrale (SNC).

²⁷⁵ Kelly E., Sutcliffe K., Cavallo D., Ramos-Gonzalez N., Alhosan N., Henderson G. 2021. The anomalous pharmacology of fentanyl. *Br J Pharmacol.* 180:797-812.

²⁷⁶ Lemke T.L., Williams D.A., Roche V.F., William Zito S. 2014. Foye's, Principi di chimica farmaceutica. Piccin.

L'inizio dell'azione del fentanyl e la concentrazione del picco plasmatico dipendono da diversi fattori, quali il dosaggio e la modalità di somministrazione^{277,278,279,280,281,282}. In seguito a somministrazione per via buccale o intravenosa, la durata d'azione varia da 2 a 4 ore, mentre i livelli ematici del farmaco scendono molto più lentamente quando somministrato mediante cerotto in quanto il suo assorbimento continua per un certo tempo dopo la rimozione del cerotto stesso²⁸³.

L'effetto analgesico si ottiene dopo qualche minuto se somministrato per via intravenosa, mentre se somministrato per via orale, l'effetto analgesico compare in un lasso di tempo compreso tra 5 e 10 minuti.

Mentre per quanto riguarda la somministrazione tramite cerotti, il picco plasmatico non viene raggiunto prima di 8-16 ore dopo l'applicazione^{284,285,286}.

Le formulazioni trans mucosa, transdermiche e gli spray nasali del fentanyl sono disponibili per trattare il dolore cronico severo, incluso il dolore oncologico.

²⁷⁷ Ashburn M.A., Lind G.H., Gillie M.H., de Boer A.J., Pace N.L., Stanley T.H. 1993. Oral transmucosal fentanyl citrate (OTFC) for the treatment of postoperative pain. *Anesth Analg.* 76: 377-381.

²⁷⁸ Becker L.D., Paulson B.A., Miller R.D., Severinghaus J.W., Eger E.I. 1976. Biphasic respiratory depression after fentanyl- droperidol or fentanyl alone used to supplement nitrous oxide anesthesia. *Anesthesiology.* 44:291-296.

²⁷⁹ Parikh N., Goskonda V., Chavan A., Dillaha L. 2013. Single-dose pharmacokinetics of fentanyl sublingual spray and oral transmucosal fentanyl citrate in healthy volunteers: A randomized crossover study. *Clin Ther.* 35:236-243.

²⁸⁰ PhysiciansDeskReference, 53rd ed. Midvale, NJ, Medical Economics Corp, 1999, pp 1418-1422

²⁸¹ Portenoy R.K., Taylor D., Messina J., Tremmel L. 2006. A randomized placebo-controlled study of fentanyl buccal tablet for breakthrough pain in opioid-treated patients with cancer. *Clin J Pain.* 22:805-811.

²⁸² Portenoy R.K., Burton A.W., Gabrail N., Taylor D. 2010. Fentanyl Pectin Nasal Spray 043 Study Group: A multicenter, placebo-controlled, double-blind, multi-crossover study of Fentanyl Pectin Nasal Spray (FPNS) in the treatment of breakthrough cancer pain. *Pain.* 151:617-624.

²⁸³ Bailey P.L., Stanley T.H. 1994. Intravenous opioid anesthetics, in Miller RD (ed): *Anesthesia*, 4th ed. Philadelphia, PA, Churchill-Livingston. Chapter 12

²⁸⁴ Anderson D.T., Muto J.J. 2000. Duragesic Transdermal patch: Postmortem tissue distribution of fentanyl in 25 cases. *J Anal Toxicol.* 24:627-634.

²⁸⁵ Bailey P.L., Stanley T.H. 1994. Intravenous opioid anesthetics, in Miller RD (ed): *Anesthesia*, 4th ed. Philadelphia, PA, Churchill-Livingston. Chapter 12

²⁸⁶ Bulow H.H., Linnemann M., Berg H., Lang-Jensen T., La Cour S., Janssen T. 1995. Respiratory changes during treatment of postoperative pain with high dose transdermal fentanyl. *Acta Anaesthesiol Scand.* 39:835-839.

Lo spray dà un rapido delivery della polvere di citrato di fentanyl secca che è facilmente assorbita nei passaggi nasali fortemente vascolarizzati. La biodisponibilità del fentanyl per questa via è di circa 71.0%.

L'effetto analgesico in conseguenza all'uso di fentanyl compare solitamente con concentrazioni plasmatiche comprese tra 0.2 e 1.2 ng/mL in pazienti naïve agli oppioidi e spesso con concentrazioni appena al di sopra in alcuni pazienti tolleranti agli oppioidi. Mentre, in altri soggetti tolleranti, le concentrazioni di fentanyl possono arrivare ad essere anche molto più elevate.

Per quanto riguarda il metabolismo, il fentanyl viene metabolizzato principalmente attraverso il sistema del citocromo P450 (CYP3A4) e perciò possono verificarsi diversi tipi di interazioni farmacologiche quando viene somministrato in concomitanza ad altri farmaci che influenzano l'attività di CYP3A4²⁸⁷.

²⁸⁷ Ellenhorn J. 1997. Ellenhorn's Medical Toxicology, 2nd ed. Baltimore, MD, Williams & Wilkins. pp 319-320.

2.6.6.1. Storia del fentanyl

La storia del fentanyl, uno degli analgesici oppioidi più popolari nella moderna anestesia e terapia del dolore, inizia in Belgio alla fine degli anni '50²⁸⁸.

In quel periodo, il dottor Paul Janssen, fondatore di Janssen Pharmaceutica, si interessò agli analgesici per trattare sindromi dolorose di varia natura.

Janssen partì dall'osservazione della meperidina. Egli riteneva che modificando la struttura di base di questa sostanza, per aumentarne la solubilità nei lipidi, avrebbe potuto aumentarne la potenza e, forse, anche la specificità^{289,290,291}.

Nel corso di 3-4 anni, furono sintetizzate una serie di nuove sostanze con spiccata azione analgesica. La migliore tra quelle molecole risultò essere quella che fu chiamata fentanyl.

Era pratica comune del dottor Janssen quella di far testare le nuove molecole individuate ai suoi colleghi medici in modo che li potessero sperimentare in ambito clinico.

Il dottor. De Castro, amico e collega di Janssen, colpito dalla potenza e dalla rapidità di insorgenza degli effetti di questa nuova sostanza, iniziò così ad utilizzare il fentanyl nella pratica anestetico-narcotica in combinazione con farmaci inalatori e successivamente anche puro^{292,293}.

Il fentanyl ricevette l'approvazione dalla Food Drug Administration (FDA) nel 1968.

²⁸⁸ Stanley T.H. 2014. The fentanyl story. *American Pain Society*.

²⁸⁹ Janssen P.A.J. 1962. A review of the chemical features associated with strong morphine-like activity. *Br J Anaesth*. 34:260–268.

²⁹⁰ Stanley T.H., Egan T.D., Van Aken H. 2008. A tribute to Paul A. J. Janssen: Entrepreneur extraordinaire, innovative scientist, and significant contributor to anesthesiology. *Anesth Analg*. 106:451-462.

²⁹¹ Stanley T.H. 2014. The history of opioid use in anesthetic delivery, in Eger EI II, Saidman LJ, Westhorpe RN (eds): *The Wondrous Story of Anesthesia*. New York, Springer. Chapter 48.

²⁹² De Castro J. 1977. Analgesic anesthesia based on the use of fentanyl in high doses. *Anesthesia vigilie et subvigile*. 1:87–166.

²⁹³ Stanley T.H. 1980. An International Symposium on Intravenous Anesthesia. *Chicago, Grune-Stratton*. 367-384.

Inizialmente fu usato in combinazione con droperidolo a causa del timore a riguardo della sua potenza e maggior propensione a condurre ad una maggiore rigidità muscolare rispetto ad altri oppioidi.

Nonostante questi timori iniziali, la capacità del fentanyl di fornire una buona stabilità cardiovascolare ne ha fatto il pilastro dell'anestesia cardiaca.

L'uso clinico del fentanyl è stato limitato all'anestesia fino agli anni '90, anni in cui sono state immesse in commercio formulazioni diverse da quella iniettabile.

Oggigiorno sono diversi i prodotti farmaceutici a base di fentanyl, utilizzati sia nella pratica anestetica, sia come potenti antidolorifici per trattare il dolore severo, come quello oncologico.

Tra questi tipi di formulazioni ritroviamo: compresse buccali effervescenti, compresse sublinguali, spray sublinguali e nasali, cerotti transdermici.

A metà degli anni '80, l'idea di inserire il fentanyl, un oppioide molto liposolubile, in un cerotto cutaneo è emersa presso la Alza Corporation. Dopo aver sviluppato un prototipo, sono stati avviati studi con il cerotto di fentanyl (in seguito chiamato Duragesic) da utilizzare per contrastare il dolore nel postoperatorio²⁹⁴. Il cerotto di fentanyl rilascia quantità adeguate di questo principio attivo e molti studi hanno dimostrato che l'uso del cerotto riduce la necessità di altri oppioidi nel periodo postoperatorio. Tuttavia, circa il 10-12% dei pazienti ha manifestato una depressione respiratoria piuttosto significativa.

Oltre al cerotto, altri nuovi sistemi di somministrazione che incorporano fentanyl sono stati man a mano sviluppati e utilizzati sia negli Stati Uniti che in tutta l'Europa occidentale.

²⁹⁴ Subramony J.A., Sharma A., Phipps J.B. 2006. Microprocessor controlled transdermal drug delivery. *Int J Pharm.* 317:1-6.

Actiq, comunemente noto come lecca-lecca al fentanyl, è stato approvato negli anni '90 per i pazienti con tolleranza agli oppioidi.

Altre aziende hanno studiato il fentanyl incorporato in pastiglie, spray nasali, cerotti buccali, compresse orali solubili e numerosi sistemi di rilascio transmucoale.

Il fentanyl aerosolizzato è stato studiato per l'assorbimento polmonare, tracheale e faringeo.

Inoltre, il fentanyl è in fase di valutazione in una serie di sistemi di somministrazione ionoforetica.

Attualmente, il fentanyl è ancora uno dei farmaci più popolari in sala operatoria, sottoforma di breve infusione endovenosa, come premedicazione prima dell'intervento chirurgico e come analgesico postoperatorio somministrato per via parenterale.

Sono stati sintetizzati numerosi altri farmaci con strutture chimiche simili al fentanyl, gli analoghi del fentanyl (AF). Tra questi ritroviamo ad esempio il sufentanil, l'alfentanil e il carfentanil, il cui uso è limitato all'anestesia clinica o, più raramente, utilizzati come blocchi nervosi o, nel caso del carfentanil, come radiotracciante in studi di ricerca che utilizzano la tomografia a emissione di positroni (PET).

Si tratta di sostanze molto più potenti della morfina, ad esempio il carfentanil è 10000 volte più potente della morfina stessa.

Il fentanyl, così come i suoi analoghi, sono attualmente attenzionati in tutto il mondo a causa di un loro utilizzo non prettamente farmacologico ma anche voluttuario che ha portato ad una vera e propria epidemia da oppioidi.

Per quanto riguarda il fentanyl come sostanza medicamentosa esso è in commercio in Italia in diverse forme farmaceutiche: cerotti transdermici, compresse orodispersibili e spray (tabella 12).

Tabella 12. Tabella riassuntiva delle specialità medicinali a base di **fentanyl** in commercio in Italia²⁹⁵.

Aic	Medicinale	Principio attivo
038736031	ABSTRAL 10 cpr sub 100 mcg	FENTANYL CITRATO
038736056	ABSTRAL 10 cpr sub 200 mcg	FENTANYL CITRATO
038736070	ABSTRAL 10 cpr sub 300 mcg	FENTANYL CITRATO
038736094	ABSTRAL 10 cpr sub 400 mcg	FENTANYL CITRATO
038736118	ABSTRAL 10 cpr sub 600 mcg	FENTANYL CITRATO
038736132	ABSTRAL 10 cpr sub 800 mcg	FENTANYL CITRATO
035399017	ACTIQ 3 pastiglie mucosa orale 200 mcg	FENTANYL CITRATO
035399031	ACTIQ 15 pastiglie mucosa orale 200 mcg	FENTANYL CITRATO
035399056	ACTIQ 3 pastiglie mucosa orale 400 mcg	FENTANYL CITRATO
035399070	ACTIQ 15 pastiglie mucosa orale 400 mcg	FENTANYL CITRATO
035399094	ACTIQ 3 pastiglie mucosa orale 600 mcg	FENTANYL CITRATO
035399118	ACTIQ 15 pastiglie mucosa orale 600 mcg	FENTANYL CITRATO
035399132	ACTIQ 3 pastiglie mucosa orale 800 mcg	FENTANYL CITRATO
035399157	ACTIQ 15 pastiglie mucosa orale 800 mcg	FENTANYL CITRATO

²⁹⁵ Brescia R., Brescia V. 2023. Norme di legislazione farmaceutica nell'esercizio professionale.

035399171	ACTIQ 3 pastiglie mucosa orale 1200 mcg	FENTANYL CITRATO
035399195	ACTIQ 15 pastiglie mucosa orale 1200 mcg	FENTANYL CITRATO
035399219	ACTIQ 3 pastiglie mucosa orale 1600 mcg	FENTANYL CITRATO
035399233	ACTIQ 15 pastiglie mucosa orale 1600 mcg	FENTANYL CITRATO
029212091	DUROGESIC 3 cerotti 12 mcg/ora	FENTANYL
029212053	DUROGESIC 3 cerotti 25 mcg/ora	FENTANYL
029212065	DUROGESIC 3 cerotti 50 mcg/ora	FENTANYL
029212077	DUROGESIC 3 cerotti 75 mcg/ora	FENTANYL
0292120089	DUROGESIC 3 cerotti 100 mcg/ora	FENTANYL
038660015	EFFENTORA 4 cpr mucosa os 100 mcg	FENTANYL CITRATO
038660039	EFFENTORA 4 cpr mucosa os 200 mcg	FENTANYL CITRATO
038660054	EFFENTORA 4 cpr mucosa os 400 mcg	FENTANYL CITRATO
038660078	EFFENTORA 4 cpr mucosa os 600 mcg	FENTANYL CITRATO

038660092	EFFENTORA 4 cpr mucosa os 800 mcg	FENTANYL CITRATO
039359017	FENTALGON 3 cerotti 25 mcg/ora	FENTANYL
039359029	FENTALGON 3 cerotti 50 mcg/ora	FENTANYL
039359031	FENTALGON 3 cerotti 75 mcg/ora	FENTANYL
039359043	FENTALGON 3 cerotti 100 mcg/ora	FENTANYL
036730012	FENTANIL (HEXAL) 3 cerotti 25 mcg/h	FENTANYL
036730075	FENTANIL (HEXAL) 3 cerotti 50 mcg/h	FENTANYL
036730240	FENTANIL (HEXAL) 3 cerotti 75 mcg/h	FENTANYL
036730188	FENTANIL (HEXAL) 3 cerotti 100 mcg/h	FENTANYL
037563222	FENTANIL (RATIOPHARM) 3 cerotti 12 mcg/h	FENTANYL
037563018	FENTANIL (RATIOPHARM) 3 cerotti 25 mcg/h	FENTANYL
037563057	FENTANIL (RATIOPHARM) 3 cerotti 50 mcg/h	FENTANYL
037563095	FENTANIL (RATIOPHARM) 3 cerotti 75 mcg/h	FENTANYL

037563133	FENTANIL (RATIOPHARM) 3 cerotti 100 mcg/h	FENTANYL
038407019	FENTANIL (SANDOZ) 3 cer 25 mcg/h	FENTANYL
038407084	FENTANIL (SANDOZ) 3 cer 50 mcg/h	FENTANYL
038407159	FENTANIL (SANDOZ) 3 cer 75 mcg/h	FENTANYL
038407223	FENTANIL (SANDOZ) 3 cer 100 mcg/h	FENTANYL
037609017	FENTANIL (ZENT) 3 cer 25 mcg/h	FENTANYL
037609056	FENTANIL (ZENT) 3 cer 50 mcg/h	FENTANYL
037609094	FENTANIL (ZENT) 3 cer 75 mcg/h	FENTANYL
037609132	FENTANIL (ZENT) 3 cer 100 mcg/h	FENTANYL
039784020	FENVEL 3 cer 25 mcg/h	FENTANYL
037609056	FENVEL 3 cer 50 mcg/h	FENTANYL
037609094	FENVEL 3 cer 75 mcg/h	FENTANYL
039784588	FENVEL 3 cer 100 mcg/h	FENTANYL
039542016	INSTANYL 10 dosi spray nasale 50 mcg	FENTANYL
039542028	INSTANYL 20 dosi spray nasale 50 mcg	FENTANYL

039542042	INSTANYL 10 dosi spray nasale 100 mcg	FENTANYL
039542055	INSTANYL 20 dosi spray nasale 100 mcg	FENTANYL
039542079	INSTANYL 10 dosi spray nasale 200 mcg	FENATNYL
039542081	INSTANYL 20 dosi spray nasale 200 mcg	FENTANYL
037405026	MATRIFEN 3 cerotti 12 mcg/h	FENTANYL
037405077	MATRIFEN 3 cerotti 25 mcg/h	FENTANYL
037405127	MATRIFEN 3 cerotti 50 mcg/h	FENTANYL
037405178	MATRIFEN 3 cerotti 75 mcg/h	FENTANYL
037405228	MATRIFEN 3 cerotti 100 mcg/h	FENTANYL
040328015	PECFENT 1 flacone spray nasale 100 mcg	FENTANYL
040328039	PECFENT 1 flacone spray nasale 400 mcg	FENTANYL
037783026	QUATROFEN 3 cerotti 12 mcg/h	FENTANYL
037783077	QUATROFEN 3 cerotti 25 mcg/h	FENTANYL
037783127	QUATROFEN 3 cerotti 50 mcg/h	FENTANYL
037783178	QUATROFEN 3 cerotti 75 mcg/h	FENTANYL
037783228	QUATROFEN 3 cerotti 100 mcg/h	FENTANYL

2.6.7. Butyryl fentanyl (BF)

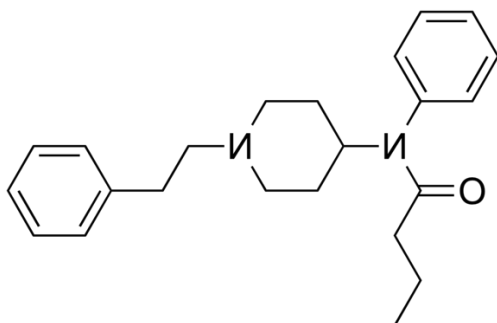


Figura 39. Struttura chimica del butyryl fentanyl.

Le NPS sono un gruppo eterogeneo di sostanze e tra queste vi sono gli oppioidi sintetici che mimano gli effetti della morfina e dell'eroina²⁹⁶. Alcuni oppioidi sintetici (ad esempio acetilfentanyl, acrilofentanyl, butirrilfentanyl, ciclopentilfentanyl, furanilfentanyl e octofentanyl) sono noti anche con il nome di fentanyl non farmaceutici (NPF), in quanto non sono mai stati sviluppati in un medicinale^{297,298,299,300}.

Il butirril fentanyl (BF) è un nuovo oppioide sintetico (NSO) il cui utilizzo è in crescita in tutto il mondo.

Gli NSO stanno guadagnando slancio nel cambiare il panorama dei disturbi da uso di oppioidi.

²⁹⁶ Shafi A., Berry A.J., Sumnall H., Wood D.M., Tracy D.K. 2020. New psychoactive substances: a review and updates. *Ther Adv Psychopharmacol.* 10:2045125320967197.

²⁹⁷ Suzuki J., El-Haddad S. 2017. A review: fentanyl and non-pharmaceutical fentanyls. *Drug Alcohol Depend;* 17: 107–116.

²⁹⁸ Raffa R.B., Pergolizzi Jr J.V., Le Quang J.A., Taylor Jr R. 2018. NEMA Research Group, S. Colucci, M.H. The fentanyl family: a distinguished medical history tainted by abuse. *J. Clin. Pharmacol. Ther.* 43: 154–158.

²⁹⁹ Zawilska B. 2017. An expanding world of novel psychoactive substances: opioids. *Front. Psychiatry.* 8: 110.

³⁰⁰ Kuczyńska K., Grzonkowski P., Kacprzak L., Zawilska J.B. 2018. Abuse of fentanyl: An emerging problem to face. *Forensic Sci Int.* 289: 207-214.

Il butirril fentanil (N-(1-fenetilpiperidin-4-il)-N-fenilbutiramide o butirfentanil o BF) è un fentanyl sintetico ed è stato segnalato per la prima volta in Polonia nell'estate del 2013³⁰¹. La sua potenza è sette volte quella della morfina e, a differenza del fentanyl, il BF può essere ottenuto solo attraverso fonti illegali. Sono stati sintetizzati anche numerosi analoghi di BF: 4-fluorobutirfentanil, 4-metossibutirfentanil, 4-fluoroisobutirfentanil, 4-cloroisobutirfentanil. Le modalità di somministrazione più comuni di BF sono: inalazione, somministrazione orale, intranasale (sniffing), endovenosa.

Il metabolismo del butirrilfentanil è stato studiato utilizzando epatociti umani freschi isolati da un modello murino umanizzato dal fegato da Kanamory et al³⁰². Nel terreno di coltura degli epatociti incubati con butirrilfentanil, il metabolita desfenilato (nor-butirrilfentanil), ω -idrossi-butirrilfentanil, (ω -1)-idrossi-butirrilfentanil, 4'-idrossi-butirrilfentanil, β -idrossi-butirrilfentanil, 4' -idrossi-3'-metossi-butirrilfentanil e ω -carbossi-fentanil sono stati identificati come metaboliti del butirrilfentanil.

Il BF è una molecola di recente scoperta e ancora poco conosciuta. L'importanza di studiare questa molecola e rilevarla in differenti matrici biologiche risiede nella pericolosità di utilizzo e della possibilità che il suo utilizzo si espanda in maniera vertiginosa.

³⁰¹ Bäckberg M., Beck O., Jönsson K.H., Helander A. 2015. Opioid intoxications involving butyrfentanyl, 4-fluorobutyrfentanyl, and fentanyl from the Swedish STRIDA project. *Clin Toxicol (Phila)*. 53: 609-17.

³⁰² Kanamori T., Iwata Y.T., Segawa H., Yamamuro T., Kuwayama K., Tsujikawa K., Inoue H. 2019. Metabolism of Butyrylfentanyl in Fresh Human Hepatocytes: Chemical Synthesis of Authentic Metabolite Standards for Definitive Identification. *Biol Pharm Bull*. 42:623-630.

2.6.8. Parte sperimentale

2.6.8.1. Obiettivo

L'obiettivo del presente lavoro sperimentale riguarda lo sviluppo di un metodo analitico per il rilevamento e la quantificazione di fentanil e BF, nel fluido orale, utilizzando una tecnica analitica molto diffusa in tossicologia forense, quale la GC-MS.

Per quanto riguarda l'analisi del fentanil e del BF, in letteratura sono riportati diversi esempi di metodi analitici che hanno utilizzato la GC-MS. Tuttavia, la maggior parte di essi riguardava campioni di urina e di sangue. Questo ha portato a sviluppare un metodo analitico per la rilevazione e la quantificazione di fentanil e BF nel fluido orale utilizzando questo tipo di metodica analitica.

2.6.8.2. Materiali e Metodi

Reagenti chimici e Materiali

Per preparare le soluzioni di lavoro sono state utilizzate soluzioni standard in metanolo di fentanyl e BF. La soluzione di BF 0.05 mg/mL è stata acquistata da Cayman Chemical (Michigan, Stati Uniti). La soluzione standard contenente 0.02 mg/mL di fentanyl è stata acquistata da LGC Standards (Milano, Italia). Lo standard interno, fentanyl d5, alla concentrazione di 1 mg/ml, è stato ottenuto da Lipomed (Basilea, Svizzera). Acetato di sodio e metanolo sono stati acquistati da Carlo Erba reagenti (Milano, Italia).

Dieci campioni di fluido orale privi di farmaci sono stati ottenuti sia da uomini che da donne e utilizzati per la preparazione delle curve di calibrazione. Le cartucce SPE utilizzate sono di tipo Strata X Drug B 33 mm con cationi forti polimerici, acquistate da Phenomenex s.r.l (Bologna, Italia). L'acetato di etile è stato acquistato dalla divisione ITW Reagents (Illinois, Stati Uniti) mentre l'isopropanolo e l'ammoniaca da Carlo Erba reagenti (Milano, Italia).

Calibrazione e preparazione dei campioni

Per la preparazione dei campioni di saliva arricchiti a concentrazioni di 0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 10, 20, 25 e 50 ng/ml, sono state utilizzate soluzioni di lavoro contenenti sia 0,7 µg/ml di fentanyl e BF, sia 1 µg/ml di fentanyl *d5* (standard interno).

Per i campioni utilizzati come controllo qualità è stata preparata una soluzione di lavoro diversa contenente 0,7 µg/ml di fentanyl e BF.

Le soluzioni standard e i campioni addizionati sono stati conservati a -20°C fino all'uso.

L'estrazione degli analiti è stata effettuata con cartucce polimeriche a cationi forti di tipo Strata X Drug B da 33 mm.

Prima di caricarli nelle cartucce, 10 µl di soluzione di lavoro di fentanyl *d5* 1 µg/ml sono stati aggiunti a 2 ml ± 0,5 di fluido orale e quindi i campioni sono stati diluiti con 2 ml di soluzione tampone acetato 0,1 M a pH 5. I campioni risultanti sono stati quindi caricati nelle cartucce SPE.

L'estrazione è stata condotta ad una velocità di 1 goccia/s. La colonna è stata lavata con ulteriori 2 ml di soluzione tampone acetato 0,1 M a pH 5, metanolo (2 ml) ed essiccata sotto un flusso di azoto per 10 minuti.

L'eluizione degli analiti è stata eseguita con una miscela 70:20:10 di acetato di etile: isopropanolo: idrossido di ammoniaca (750 µl per due volte).

Gli eluati sono stati poi essiccati tramite l'azione dell'azoto a 40°C, ricostituiti con 50 µl di acetato di etile ed iniettati nello strumento.

Fentanyl e BF sono stati analizzati in GC-MS senza l'utilizzo di un derivatizzante.

Analisi in GC-MS

Le analisi GC-MS sono state effettuate tramite un gascromatografo Agilent 7820A accoppiato ad uno spettrometro di massa a singolo quadrupolo 5977B (Agilent Technologies, Waldbronn, Germania), operante sia in modalità SIM (Selective Ion Monitoring) che in modalità Scan (intervallo di scansione 50–550 amu).

L'acquisizione e l'analisi dei dati sono state eseguite utilizzando il software standard fornito dal produttore. La colonna utilizzata è di tipo capillare HP-5MS (5% difenile/95% dimetilpolisilossano) (30 m × 0,25 mm d.i., spessore della pellicola 0,25 µm, Agilent Technologies).

Il programma di temperatura era il seguente: 100 °C, da 42 °C/min a 200 °C, mantenimento per 2,67 minuti, da 15 °C/min a 280 °C, mantenimento per 12 minuti.

Le temperature della porta di iniezione e della sorgente ionica sono state impostate rispettivamente a 250 °C e 230 °C.

È stata utilizzata la modalità di iniezione divisa con un rapporto di divisione di 100:1 e l'elio è stato impiegato come gas di trasporto ad una portata di 0,7 mL/min.

Lo spettrometro di massa (MS) è stato utilizzato in modalità ionizzazione elettronica (EI) (70 eV). Gli spettri di massa degli analiti sono stati registrati mediante monitoraggio degli ioni totali per determinare i tempi di ritenzione (RT) e i caratteristici frammenti di massa.

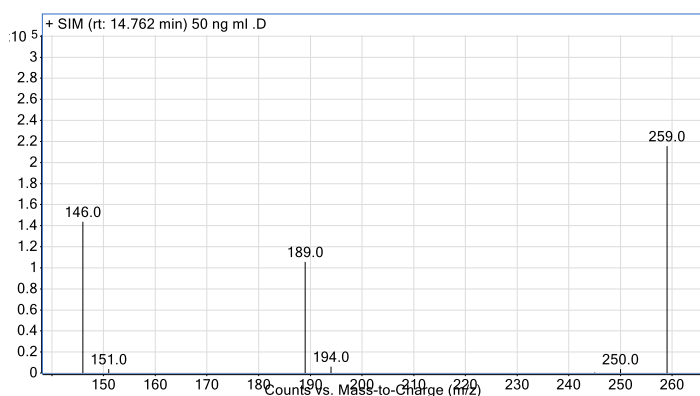
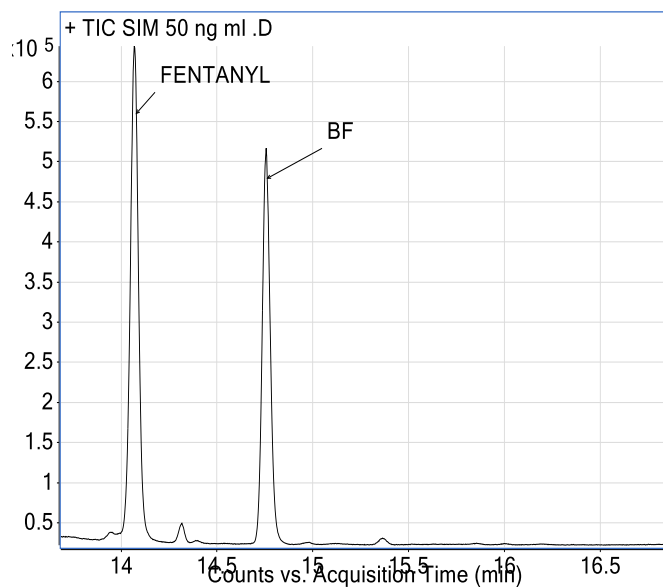
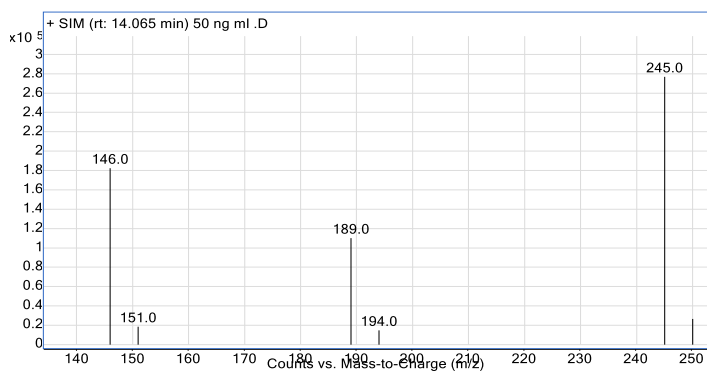
Per l'analisi quantitativa, i frammenti di massa diagnostica scelti sono stati monitorati in modalità SIM. Gli analiti sono stati inizialmente analizzati in modalità scansione (50–500 m/z) utilizzando EI. Lo spettro di ciascun analita è stato confrontato con gli spettri di riferimento disponibili nel programma MS NIST. Per la loro determinazione nella matrice sono stati utilizzati uno ione quantificatore e due ioni qualificatori per ciascun analita (**tabella 13 e figura 40**).

Tabella 13. Tempi di ritenzione (in minuti) e ioni diagnostici in m/z.

Composto	Tempo di ritenzione (min)	Ione quantificatore (m/z)	Ione qualificatore 1 (m/z)	Ione qualificatore 2 (m/z)
fentanyl	14.05	245ⁱ	146	189
Butyryl fentanyl	14.7	259ⁱ	146	189
fentanyl <i>d</i> ₅	14.05	250ⁱ	151	194

ⁱ Gli ioni indicati in grassetto sono stati utilizzati per la quantificazione.

(a)



(b)

Figura 40. (a) Spettro in modalità SIM di fentanyl (14.05 rt) e (b) butyryl fentanyl (14.7 rt) alla concentrazione di 50 ng/ml.

Validazione del metodo

Il metodo analitico è stato validato secondo le linee guida ICH³⁰³ ed è stato valutato per linearità, limite di rilevazione (LOD), limite di quantificazione (LOQ), accuratezza, precisione, selettività, specificità, carryover e recupero.

Le curve di calibrazione sono state tracciate in triplicato in tre giorni diversi aggiungendo aliquote di campioni di fluido orale bianco di una soluzione di lavoro contenente fentanyl e BF a 0,7 µg/ml.

La ripetibilità e l'accuratezza sono state studiate a quattro livelli di concentrazione: LOQ, basso (QC1), medio (QC2) e alto (QC3).

Tutti i parametri studiati sono elencati di seguito.

Interferenze

Dieci fluidi orali negativi sono stati raccolti da soggetti di sesso maschile e femminile ed analizzati per valutare l'assenza di picchi interferenti. I campioni di saliva sono stati arricchiti con aliquote alla concentrazione di 50 ng/ml delle comuni droghe d'abuso (cocaina e metaboliti correlati, coca-etilene e benzoilecgonina, oppiacei comuni come morfina, metadone, codeina, diidrocodeina e benzodiazepine come diazepam, clonazepam, flunitrazepam, lorazepam e nitrazepam) per valutare la specificità.

È stata stabilita una specificità soddisfacente in quanto non sono stati rilevati segnali interferenti in termini di frammenti caratteristici nei tempi di ritenzione degli analiti correlati a composti endogeni o esogeni.

³⁰³ European Medicine Agency. ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study samples.

Limite di Detenzione (LOD) e Limite di Quantificazione (LOQ)

Il LOD è stato espresso come la concentrazione che produce un rapporto segnale/rumore (SN) >3 per almeno tre frammenti ionici per ciascun analita.

Il LOQ è stato considerato come la concentrazione che forniva almeno un SN>10 per tre frammenti ionici e un'accuratezza e precisione accettabili (%CV, %E < 20%).

Linearità

La linearità del metodo è stata studiata nell'intervallo dal LOQ di ciascuna sostanza a 50 ng/ml. Le curve di calibrazione sono state tracciate in triplicato in tre giorni diversi. Le curve sono state costruite mediante il metodo dei minimi quadrati con un fattore di ponderazione pari a 1/x e la linearità è stata espressa come coefficiente di regressione quadratica (R^2).

Accuratezza e precisione

L'accuratezza del metodo è stata espressa come percentuale dell'errore sistematico (E%) e la precisione come coefficiente di variazione (CV%). I fluidi orali sono stati arricchiti a 1,0 ng/ml (LOQ), 3 ng/ml (tre volte LOQ, QC1) e 20,0 ng/ml (30-50% dell'intervallo di calibrazione, QC2) e 40 ng/ml (almeno 75 % di ULOQ, QC3).

La deviazione e la precisione di questo metodo sono state misurate tramite cinque repliche in tre giorni diversi. Precisione e accuratezza sono state calcolate in base agli ioni quantificatori.

La precisione intraday è stata valutata iniettando ciascun campione di QC cinque volte al giorno nello strumento.

La precisione interday, invece, è stata valutata analizzando tutti i QC in tre diversi giorni lavorativi.

Memory effect

Sono stati preparati tre campioni di fluidi orali alla concentrazione di 50, 100, 200 ng/mL di fentanyl e butiril fentanil. Tutti i campioni sono stati estratti una volta come descritto sopra e iniettati nello strumento tre volte con solventi bianchi di acetato di etile. Dopo ogni analisi di un campione fortificato, è stato valutato un bianco per verificare la presenza di carryover, che non è stato riscontrato fino alla concentrazione di 200 ng/ml.

Recupero

Il recupero è stato valutato confrontando i campioni estratti a tre diverse concentrazioni (bassa 5 ng/mL, media 20 ng/mL ed alta 50 ng/mL) con i corrispondenti campioni addizionati dopo l'estrazione.

2.6.8.3. Risultati e Discussione

A causa del crescente abuso a livello mondiale del fentanyl e di numerosi suoi derivati, è necessario sviluppare metodi analitici utili per la loro rilevazione in diverse matrici biologiche. Il metodo proposto ha dimostrato la sua specificità per la rilevazione di fentanyl e BF nel fluido orale, verificando l'assenza di segnali interferenti ai tempi di ritenzione degli analiti (**figura 41 a-b**). Sono state tracciate curve di calibrazione per fentanyl e BF preparati da fluido orale alle concentrazioni di 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 25, 50 ng/ml.

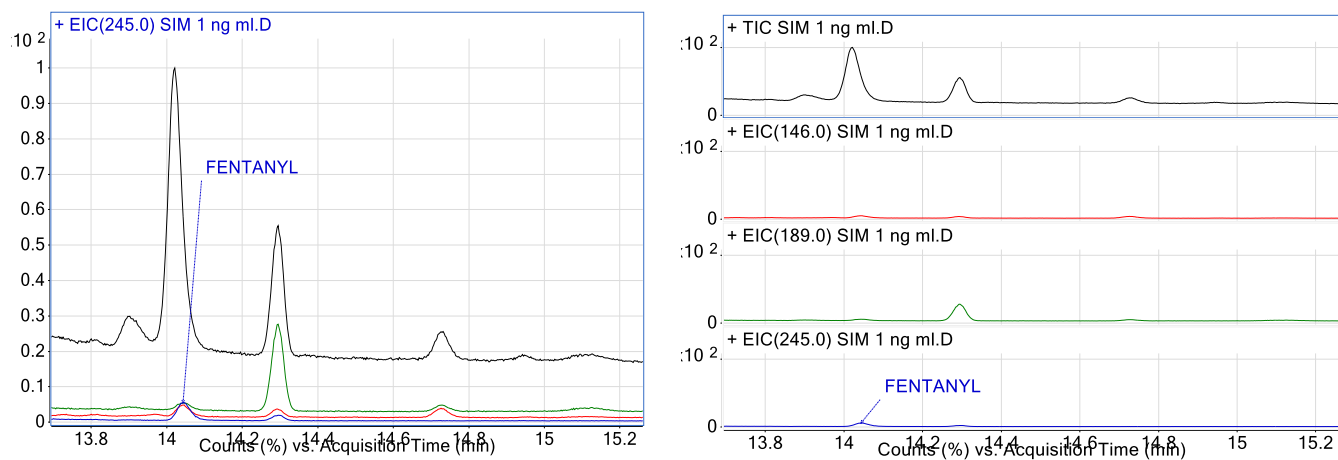
Le curve di calibrazione calcolate hanno mostrato un'eccellente linearità ($R^2 \geq 0,998$) nell'intervallo di 1,0 –50 ng/mL per entrambi gli analiti. Il LOQ è stato definito come la concentrazione più bassa della calibrazione standard con un rapporto segnale/rumore (S/N) di almeno 10 e criteri accettabili di inaccuratezza e imprecisione ($\pm 20\%$).

Pertanto, è stato impostato il LOQ ad 1 ng/ml per entrambi gli analiti ed è stato valutato utilizzando cinque replicati per analisi, nell'arco di 3 giorni differenti con tre diverse fonti di matrice bianca. Sono stati preparati campioni di fluido orale alle concentrazioni di 0,3, 0,5 e 0,7 ng/mL per valutare i LOD nel cromatogramma. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato per ciascuna concentrazione. I LOD erano 0,50 ng/ml per entrambi gli analiti (**figura 42**). I risultati sono riassunti in **tabella 14**.

Accuratezza e precisione sono state definite, rispettivamente, come CV% ed E% e i risultati sono riportati in **tabella 15**. I valori sono inferiori al 20% per basse concentrazioni e inferiori al 15% per alte concentrazioni. L'accuratezza e la ripetibilità sono risultate eccellenti per tutti gli analiti ai rispettivi LOQ. Pertanto, secondo le linee guida, questo metodo ha mostrato valori di accuratezza e precisione accettabili. Il recupero è stato elevato e variava dall'80 al 100%, come mostrato in **tabella 15**. Il CV% correlato all'intra-day era compreso tra 0,8 e 2,5% per fentanyl e tra 1,6 e 2,6% per BF. La precisione tra le analisi varia dal 6 al 12% per entrambi gli analiti.

In sintesi, parametri di validazione quali LOD, LOQ, precisione, accuratezza e linearità rendono questo metodo adeguato per effettuare l'analisi di fentanyl e BF nel fluido orale.

(a)



(b)

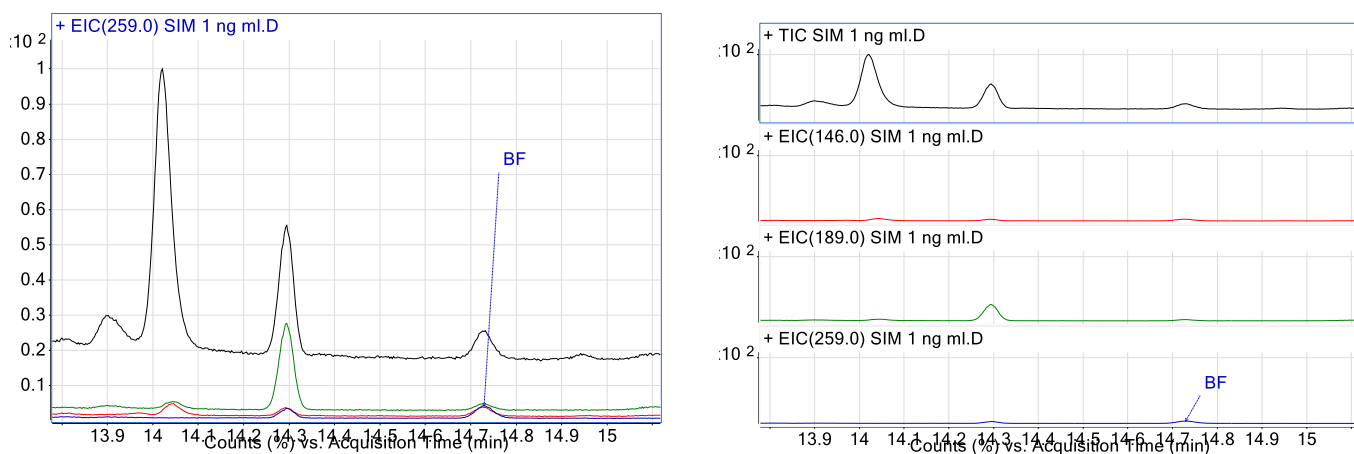


Figura 41. Cromatogrammi di fluidi orali addizionati a 1 ng/ml, rispettivamente di fentanyl (a, 14.05 rt) e butyryl fentanyl (b, 14.7 rt) in modalità SIM.

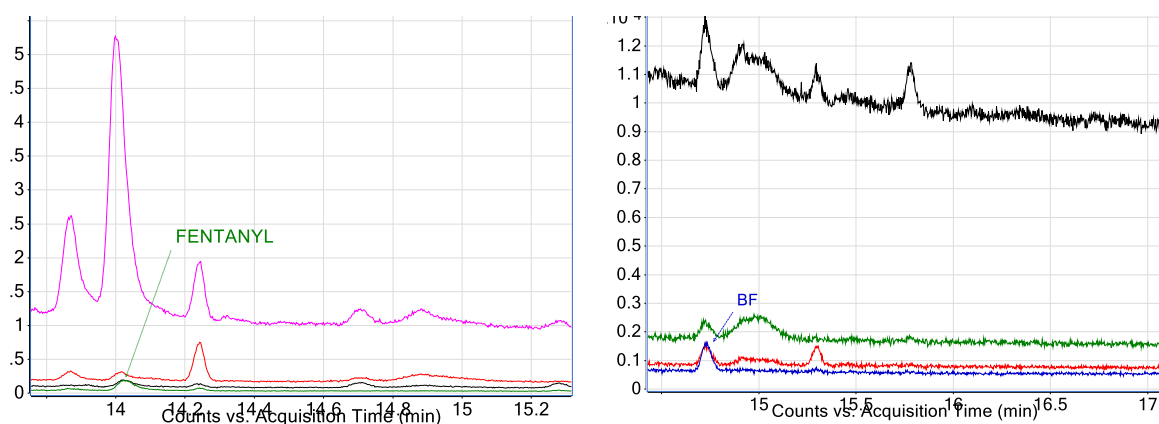


Figura 42. LOD di fentanyl e BF nel fluido orale.

Tabella 14. Dati di validazione, LODs, LOQs e linearità.

Analita	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)	Slope (\pm SD)	Intercept (\pm SD)	R ² (\pm SD)	Slope CV%	R ² CV%
Fentanyl	0.5	1	1.333 \pm 0.0320	-0.0391 \pm 0.020	0.999 \pm 0.0004	2.4	0.04
Butyryl fentanyl	0.5	1	1.245 \pm 0.037	-0.0372 \pm 0.017	0.998 \pm 0.0009	3.0	0.1

Tabella 15. Precisione intraday e interday, percentuale di errore sistematico, recupero a 5, 20 e 50 ng/ml per ciascun analita.

Analita	QCs Concentration (ng/mL)	Precisione intraday (CV%)	Precisione interday (CV%)	Accuratezza (E %)	Recupero a 5, 20, 50 ng/ml (%)
fentanyl	LLOQ	0.84	13.8	2.3	
	3	1.6	1.6	-0.04	89
	20	2.5	4.26	-3.8	100
	40	2.2	6.14	-7	80
Butyryl fentanyl	LLOQ	2.6	12.3	-0.08	
	3	3.4	12.8	-0.94	86
	20	1.6	5.6	-7.24	100
	40	2.6	9.1	-8.45	82

2.6.8.4. Conclusioni

Il sangue e le urine sono generalmente la prima scelta di campioni da testare per valutazioni tossicologiche in diversi contesti. Tuttavia, grazie alla facilità di campionamento e alla finestra di rilevamento simile al sangue, il fluido orale risulta una buona matrice alternativa per il rilevamento degli oppioidi sintetici. Il metodo analitico qui riportato è semplice, selettivo e accurato per la determinazione di questi analiti nel fluido orale e può essere utile non solo nelle indagini forensi sulle storie di dipendenza, ma anche negli studi epidemiologici sulla diffusione del fentanyl e del butyryl fentanyl tra i lavoratori, conducenti di auto e mezzi pubblici, e soggetti che fanno abitualmente uso di sostanze stupefacenti.

In particolare, viene proposto come primo tentativo di quantificare il fentanyl e il suo derivato BF utilizzando GC-MS con un LOQ di 1 ng/ml.

La prospettiva futura di questo studio potrebbe essere un'ulteriore estensione di questo metodo ad altri oppioidi sintetici e la sua applicazione a casi reali.

Capitolo 3

3. Certificazione ISO 9001: un percorso di qualità

L'organizzazione Internazionale per la Standardizzazione (ISO) si è premurata di istituire delle Linee Guida per stabilire i requisiti di qualità indispensabili per i laboratori e per procedere alla loro valutazione.

L'adozione di una politica di verifica della qualità, intesa come eccellenza del risultato ed efficienza organizzativa attraverso il costante miglioramento dello standard di qualità del servizio fornito, dovrebbe essere perseguita come obiettivo primario di qualsiasi laboratorio.

A tal fine è necessario adottare delle procedure che regolino le attività principali, la loro adeguatezza e la corretta esecuzione delle stesse, nonché la misurazione dell'efficienza del sistema qualità. Per perseguire tale obiettivo, il laboratorio deve raccogliere in un manuale le Procedure Operative Standard (SOP o POS) che devono essere complete, aggiornate e disponibili a tutto il personale.

Tutte le procedure che riguardano le varie fasi del processo d'analisi di un campione devono essere raccolte in forma documentale a partire dalla fase di accettazione delle richieste di analisi fino alla consegna del referto analitico.

In merito, la norma ISO 9001 definisce quelli che sono i requisiti minimi che il sistema di Gestione per la Qualità di un'organizzazione deve dimostrare di soddisfare per garantire il livello di qualità di prodotto e servizio che dichiara di possedere con sé stessa e con il mercato.

Le fasi che compongono un iter di accreditamento sono diverse:

- Domanda di accreditamento
- Esame della documentazione
- Verifiche ispettive in sede
- Delibera dell'accREDITAMENTO

- Sorveglianza periodica
- Eventuale estensione dell'accreditamento
- Rinnovo dell'accreditamento

L'iter ha inizio con la richiesta di accreditamento da parte del laboratorio che provvede a compilare la domanda e a corredarla della documentazione richiesta e firmata dal responsabile del laboratorio.

In seguito alla ricezione di tali documenti, l'analisi degli stessi viene condotta da un gruppo di esperti appartenente alla ditta incaricata di verificare la sussistenza dei requisiti di certificazione ISO. Lo scopo di questa operazione è valutare la conformità dell'attività del laboratorio ai requisiti previsti dai documenti normativi.

Qualora dall'esame risultino necessarie integrazioni o adeguamenti, al laboratorio verrà richiesto di fornire i documenti mancanti o di completare le informazioni carenti.

Ad esito positivo, vengono avviate le verifiche ispettive presso la sede del laboratorio che richiede l'accreditamento.

Le verifiche in sede sono condotte da un gruppo di verifica ispettiva composto da ispettori ed esperti di settore qualificati. Lo scopo delle verifiche è accertare che le modalità operative del laboratorio richiedente, relativamente alle attività svolte, siano conformi alle prescrizioni dei regolamenti generali, dei regolamenti tecnici applicabili, e di ogni altro documento normativo generale e settoriale, nonché ai regolamenti e alle procedure stabiliti dal richiedente, così come formalizzati nella documentazione relativa al sistema di gestione nei diversi ambiti oggetto di valutazione (manuale di gestione, regolamenti, procedure, istruzioni, qualifiche del personale ecc.).

Ogni verifica si conclude con un rapporto di valutazione ed i risultati possibili sono tre:

- Se dall'ispezione emergono semplici osservazioni, l'iter di accreditamento procede.
- Nel caso in cui si evidenzino lievi criticità, si effettuano ulteriori visite di valutazione.
- In presenza di non conformità il processo di accreditamento viene sospeso.

In seguito a tali esiti, il comitato settoriale competente per l'attività per cui il laboratorio richiede l'accreditamento valuta la pratica e delibera. L'accreditamento ed il relativo certificato hanno una validità di 3 anni.

Nel corso dei tre anni di validità dell'accreditamento, l'ente certificatore svolge un'attività periodica di sorveglianza sull'attività dell'organismo o del laboratorio accreditato ai fini di verificarne il mantenimento dei requisiti di competenza, indipendenza e imparzialità e la regolare conformità alle norme e a tutti i documenti applicabili.

Nel corso dei tre anni di validità, il laboratorio può chiedere l'eventuale estensione dell'accreditamento a nuove attività e sedi operative. L'estensione, tuttavia, non prolunga la validità dell'accreditamento.

Prima della scadenza del ciclo triennale di accreditamento, può essere avviata la procedura di rinnovo, secondo le stesse modalità previste per il primo accreditamento.

Per il laboratorio, il rationale di sottoporsi a tale valutazione risiede nei benefici derivanti dall'ottenimento della certificazione stessa.

Infatti, l'accreditamento migliora la reputazione e la competitività degli organismi e dei laboratori che lo ottengono, e offre benefici tangibili ai consumatori che si affidano ai servizi accreditati.

Inoltre, i laboratori attraverso il possesso di tale certificazione possono dimostrare la propria competenza, indipendenza e imparzialità, verificate e attestate dall'ente di accreditamento.

3.1. La certificazione nel Laboratorio di Tossicologia Forense

Terminate queste premesse di carattere generale si passa all'analisi dell'attività di accreditamento svolta in questi anni di dottorato presso il Laboratorio di Tossicologia Forense dell'Università di Parma. Il fulcro di questa attività è stato l'ottenimento e il mantenimento della certificazione ISO-9001.

Il Laboratorio di Tossicologia Forense è un laboratorio di chimica analitica ad elevata specializzazione al quale viene richiesta affidabilità e garanzia della qualità della prestazione erogata considerato il delicato ambito in cui opera. A tale scopo impiega sofisticata strumentazione e risorse umane qualificate, istruite ed aggiornate che posseggono competenze specifiche nella diagnostica chimico-tossicologica.

Per garantire la bontà delle operazioni analitiche condotte e la validità dei risultati ottenuti, il Laboratorio di Tossicologia Forense deve regolamentare la propria attività perseguendo l'osservanza non solo di diverse normative, che costituiscono requisito cogente per poter esercitare la propria attività, ma anche delle indicazioni contenute nelle linee-guida delle principali associazioni di tossicologia forense nazionali ed internazionali.

E' quindi necessario dotarsi di strumenti che siano in grado di controllare processi e procedure ed allo stesso tempo di rintracciare e registrare ogni fase del procedimento svolto. A tale scopo risulta di fondamentale importanza l'adozione di un sistema di qualità che grazie all'inserimento di metodologie e procedure codificate fornisca una guida alla gestione dell'intera attività.

Proprio in tale ottica, il Laboratorio di Tossicologia Forense di Parma ha iniziato il proprio percorso di qualità nel 2021 ottenendo la prima certificazione ISO 9001, a cui io stessa collaborai agli inizi della mia esperienza in ambito forense (**figura 42**).

Nei tre anni successivi il laboratorio è stato coinvolto in 2 verifiche ispettive intermedie, prima dell'ultima avvenuta a luglio 2024 in cui è stato definito il rinnovo della certificazione stessa (figura 43).

Come dottoranda posso affermare di aver visto nascere questo progetto di qualità e di aver contribuito con orgoglio a tutte le fasi che si sono susseguite per il mantenimento di questo importante traguardo, fino all'ottenimento della qualifica di responsabile per la qualità.

Durante questo incredibile percorso ho imparato che la qualità risiede nelle azioni quotidiane ed in particolare nel rendere fruibili le procedure di qualità e controllo a tutto il personale del laboratorio, che deve assimilarle e metterle in pratica, in modo da rendere l'attività della struttura conforme in ogni sua fase ed il personale un team efficiente ed affiatato.

A partire da ora inizia un nuovo triennio che, sono certa, sarà caratterizzato da un continuo miglioramento, grazie anche agli insegnamenti e ai suggerimenti pervenuti dal percorso di certificazione.



Audit Service & Certification certifica che il sistema di gestione dell'Organizzazione:

**UNIVERSITA' DI PARMA
DIPARTIMENTO DI MEDICINA E CHIRURGIA**

VIA GRAMSCI, 14
43126 PARMA (PR)
P.I. – C.F.: 00308780345

È stato valutato ed è conforme ai requisiti dello standard:

ISO 9001:2015

Questa certificazione è valida per il seguente Campo d'Applicazione:

EROGAZIONE DI SERVIZI DI LABORATORIO ANALISI TOSSICOLOGICHE

Data emissione: 03/08/2021
Data corrente: 03/08/2021
Data scadenza: 02/08/2024

Certificato n°: 759Q
Settori IAF: 38
Esclusioni: 8.3

Approvato da: Matteo Parpini
Direttore Tecnico

Verifica dello stato di validità del certificato



Il presente certificato è di proprietà AUDIT SERVICE & CERTIFICATION SRL.
La validità è subordinata al superamento delle verifiche annuali di Sorveglianza.
Per ulteriori chiarimenti relativi al campo di applicazione,
allo stato di validità del certificato o ai requisiti applicabili della norma contattare:
AUDIT SERVICE & CERTIFICATION S.r.l. – Via Ventotto Luglio, 218 – 47893 Borgo Maggiore (RSM)
tel. (+378) 0549 878111 – info@auditservicecertification.com

Figura 43. Attestato di certificazione ISO 9001 rilasciato al Laboratorio di Tossicologia Forense UniPr (2021-2024).



Audit Service & Certification certifica che il sistema di gestione dell'Organizzazione:

**UNIVERSITA' DI PARMA
DIPARTIMENTO DI MEDICINA E CHIRURGIA**

VIA GRAMSCI, 14
43126 PARMA (PR)
PAESE: ITALIA
P.I. – C.F.: 00308780345

È stato valutato ed è conforme ai requisiti dello standard:

ISO 9001:2015

Questa certificazione è valida per il seguente Campo d'Applicazione:

EROGAZIONE DI SERVIZI DI LABORATORIO ANALISI TOSSICOLOGICHE

Data emissione iniziale: 03/08/2021
Data decisione di certificazione: 22/07/2024
Data emissione corrente: 22/07/2024
Data scadenza: 02/08/2027

Certificato n°: 759Q
Settori IAF: 38
Esclusioni: //

Approvato da: Matteo Parpinel
Direttore Tecnico

Verifica dello stato di validità del certificato



Il presente certificato è di proprietà AUDIT SERVICE & CERTIFICATION SRL.
La validità è subordinata al superamento delle verifiche annuali di Sorveglianza.
Per ulteriori chiarimenti relativi al campo di applicazione,
allo stato di validità del certificato o ai requisiti applicabili della norma contattare:
AUDIT SERVICE & CERTIFICATION S.r.l. – Via Ventotto Luglio, 218 – 47893 Borgo Maggiore (RSM)
tel. (+378) 0549 878111 – info@auditservicecertification.com

Figura 44. Attestato di certificazione ISO 9001 rilasciato al Laboratorio di Tossicologia Forense UniPr (2024-2027).

Capitolo 4

4. Conclusioni finali dell'elaborato di tesi

Il presente lavoro di tesi ha evidenziato il ruolo centrale che la tossicologia forense riveste nell'ambito di strategie preventive di ampio respiro, sia in ambiti in cui il suo uso è consolidato da tempo, (i.e. sicurezza stradale), sia in altri di maggiore dinamicità come l'analisi della diffusione di nuove sostanze psicoattive (NPS), un campo in continua evoluzione.

Relativamente alla sicurezza stradale, come evidenziato dagli studi condotti, occorre operare con un approccio che sia in grado, da un lato, di valorizzare le caratteristiche e le specificità del singolo territorio, come testimoniato dalle differenze emerse da numerosi lavori svolti a livello nazionale e, dall'altro, che sappia intercettare e comprendere le differenze e le modifiche che si verificano in una realtà sempre più globalizzata.

Questo progetto di tesi, inoltre, ha messo in luce l'opportunità di considerare una matrice biologica alternativa al sangue, la saliva, che consente di mantenere i vantaggi del sangue stesso per dimostrare l'attualità d'uso di una sostanza, a fronte di minor invasività e rischio nel prelievo.

Infatti, nella seconda parte di questo progetto di dottorato, l'attenzione si è spostata sullo studio e sull'utilizzo del fluido orale per l'identificazione delle cosiddette nuove sostanze psicoattive.

Queste sostanze non sono sempre catalogabili dagli enti preposti, come il Ministero della Salute e questo costituisce non solo un problema giudiziario ma anche, e soprattutto, un problema socio-sanitario e, come tale risulta estremamente importante per la tossicologia forense investigarlo.

L'uso della saliva ha riguardato, dapprima, la ricerca di una classe di NPS, i cannabinoidi sintetici, rappresentando il primo tentativo di rilevare questa classe di sostanze in una popolazione di soggetti con una storia di tossicodipendenza nella regione Emilia Romagna e, in generale, uno fra i primi studi in Italia per quanto riguarda il riscontro di NPS in soggetti non deceduti o non ospedalizzati per fenomeni acuti.

Successivamente, il fluido orale è stato utilizzato per lo sviluppo di un metodo analitico di una sostanza utilizzata da decenni come farmaco ma che presenta una lunga storia di abuso, il fentanyl, e di un suo derivato sintetico, con l'intento di contribuire al contrasto della diffusione di queste sostanze che sta dilagando e creando allarme in tutto il mondo.

Concludendo, è importante sottolineare che per poter compiere queste tipologie di studi è necessaria una stretta sinergia tra la tossicologia e le altre scienze forensi, in particolare con la medicina legale, ma anche con i servizi ospedalieri che si occupano di salute pubblica, ed enti territoriali che si dedicano a soggetti da attenzionare, ad esempio persone con una storia di tossicodipendenza, al fine di offrire una panoramica che possa essere la più completa possibile.

BIBLIOGRAFIA

- Acar F., Asirdizer M., Aker R.G., Kucukibrahimoglu E.E., Ates I., Erol Y., Sahin A. 2013. A review of suspected cases of driving under the influence of drugs (DUID) involved in traffic accidents in Istanbul (Turkey). *J Forensic Leg Med.* 20:626–631.
- Adamowicz P., Gieron J., Gil D., Lechowicz W., Skulska A., Tokarczyk B. 2016. The prevalence of new psychoactive substances in biological material, a three-year review of casework in Poland. *Drug Test. Anal.* 8:63-70.
- Adamowicz P., Meissner E., Maślanka M. 2019. Fatal intoxication with new synthetic cannabinoids AMB-FUBINACA and EMB-FUBINACA. *Clin Toxicol (Phila).* 57:1103-1108.
- Ahlm K., Bjornstig U., Ostrom M. 2009. Alcohol and drugs in fatally and non-fatally injured motor vehicle drivers in northern Sweden. *Accid. Anal. Prev.* 41:129-136.
- Alcaniz M., Guillen M., Santolino M. 2018. Prevalence of drug use among drivers based on mandatory, random tests in a roadside survey. *Plos One.* 13:e0199302.
- Alexandridou A., Mouskeftara T., Raikos N., Gika H.G. 2020. GC/MS analysis of underivatized new psychoactive substances in whole blood and urine. *J Chromatogr B Analyst Technol Biomed Life Sci*; 1156: 122308.
- Alicioglu B., Yalniz E., Eskin D., Yilmaz B. Motosiklet kazalarina bagli yaralanmalar [Injuries associated with motorcycle accidents]. 2008. *Acta Orthop. Traumatol. Turc.* 42:106–111.
- Amaratunga P., Thomas C., Lemberg B.L., Lemberg D. 2014. Quantitative measurement of XLR11 and UR-144 in oral fluid by LC-MS-MS. *J Anal Toxicol.* 38:315–21.
- Ameline A., Garnier D., Gheddar L., Richeval C., Gaulier J.M., Raul J.S., Kintz P. Identification and analytical characterization of seven NPS, by combination of (1) H NMR spectroscopy, GC-MS and UPLC-MS/MS, to resolve a complex toxicological fatal case. *Forensic Sci Int*; 298: 140-148.
- Anderson D.T., Muto J.J. 2000. Duragesic Transdermal patch: Postmortem tissue distribution of fentanyl in 25 cases. *J Anal Toxicol.* 24:627-634.
- Ankarath S., Giannoudis P.V., Barlow I., Bellamy M.C., Matthews S.J., Smith R.M. 2022. Injury patterns associated with mortality following motorcycle crashes. *Injury.* 33:473–477.
- Annunziato L., Di Renzo G.F. 2016. Trattato di farmacologia. Seconda Edizione.
- Antunes M., Sequeira M., de Caires Pereira M., Caldeira M.J., Santos S., Franco J., Barros M., Gaspar H. *J Anal Toxicol*; 45: 233-242.
- Anzillotti L., Dagoli S., Calò L., Maglietta G., Cecchi R. 2022. Road traffic deaths: A retrospective analysis (2009-2019) in the north of the Italian region Emilia Romagna. *Traffic Inj Prev.* 23:29-33.
- Anzillotti L., Marezza F., Calò L., Andreoli R., Agazzi S., Bianchi F., Careri M., Cecchi R. 2019. Determination of synthetic and natural cannabinoids in oral fluid by solid-phase microextraction coupled to gas chromatography/mass spectrometry: A pilot study. *Talanta*; 20: 335-341.

Aps J.K.M., Martens L.C. 2005. Review: the physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Sci Int.* 150:119–131.

Arantes A.C.F., da Cunha K.F., Cardoso M.S. 2021. Development and validation of quantitative analytical method for 50 drugs of antidepressants, benzodiazepines and opioids in oral fluid samples by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Forensic Toxicol*; 39: 179–197.

Ares-Fuentes A.M., Lorenzo R.A., Fernández P., Fernández A.M., Furton K.G., Kabir A., Carro A.M. 2022. Determination of synthetic opioids in oral fluid samples using fabric phase sorptive extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*; 25: 1663:462768.

Armenian P., Vo K.T., Barr-Walker J., Lynch K.L. 2018. Fentanyl, fentanyl analogs and novel synthetic opioids: A comprehensive review. *Neuropharmacology*; 15: 121-132.

Arroyo A., Sánchez M., Barberia E. 2013. Drivers under the influence of drugs of abuse: quantification of cocaine and impaired driving. *Med. Leg. J.* 81:135–143.

Ashburn M.A., Lind G.H., Gillie M.H., de Boer A.J., Pace N.L., Stanley T.H. 1993. Oral transmucosal fentanyl citrate (OTFC) for the treatment of postoperative pain. *Anesth Analg.* 76: 377-381.

Ashton J.C., Friberg D., Darlington C.L., Smith P.F. 2006. Expression of the cannabinoid CB2 receptor in the rat cerebellum: an immunohistochemical study. *Neurosci. Lett.* 396: 113–116.

Bäckberg M., Beck O., Jönsson K.H., Helander A. 2015. Opioid intoxications involving butyrfentanyl, 4-fluorobutyrfentanyl, and fentanyl from the Swedish STRIDA project. *Clin Toxicol (Phila)*. 53: 609-17.

Bailey P.L., Stanley T.H. 1994. Intravenous opioid anesthetics, in Miller RD (ed): Anesthesia, 4th ed. Philadelphia, PA, Churchill- ill Livingston. Chapter 12

Barnes A.J., Young S., Spinelli E., et al. 2014. Evaluation of a homogenous enzyme immunoassay for the detection of synthetic cannabinoids in urine. *Forensic Sci. Int.* 241: 27e34.

Barzegar A., Ghadipasha M., Forouzesh M., Valiyari S., Khademi A. 2020. Epidemiologic study of traffic crash mortality among motorcycle users in Iran (2011–2017). *Chin. J. Traumatol.* 23:219–223.

Beardsley P.M., Zhang Y. 2018. Synthetic Opioids. *Handb Exp Pharmacol.* 252:353-381.

Beccaria M, Cabooter D. 2020. Current developments in LC-MS for pharmaceutical analysis. *Analyst.* 145:1129-1157.

Becker L.D., Paulson B.A., Miller R.D., Severinghaus J.W., Eger E.I. 1976. Biphasic respiratory depression after fentanyl- droperidol or fentanyl alone used to supplement nitrous oxide anesthesia. *Anesthesiology.* 44:291-296.

Bellagambi F.G., Lomonaco T., Salvo P., Vivaldi F., Hangouët M., Ghimenti S., Biagini D., Di Francesco F., Fuoco R., Errachid A. 2020. Saliva sampling: methods and devices. An overview. *Trends Analyt Chem.* 124:115781.

- Bensaid M., Gary-Bobo M., Esclangon A., Maffrand J.P., Le Fur G., Oury-Donat F., Soubrie P. 2003. The cannabinoid CB₁ receptor antagonist SR141716 increases Acrp30 mRNA expression in adipose tissue of obese fa/fa rats and in cultured adipocyte cells. *Mol Pharmacol.* 63:908-914.
- Bertol E. 2016. Compendio di Tossicologia Forense: aspetti analitici, interpretativi e giuridici. Società editrice Esculapio.
- Bianchi F., Agazzi S., Riboni N., Erdal N., Hakkarainen M., Ilag L.L., Anzillotti L., Andreoli R., Marezza F., Moroni F., Cecchi R., Careri M. 2019. Novel sample-substrates for the determination of new psychoactive substances in oral fluid by desorption electrospray ionization-high resolution mass spectrometry. *Talanta*; 202:136-144.
- Biecheler M.B., Peytavin J.F., Facy F., Martineau H. 2008. SAM survey on drugs and fatal accidents: search of substances consumed and comparison between drivers involved under the influence of alcohol or cannabis. *Traffic Inj. Prev.* 9:11–21.
- Bista S.R., Haywood A., Norris R., Good P., Tapuni A., Lobb M., Hardy J. 2015. Saliva versus Plasma for Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Studies of Fentanyl in Patients with Cancer. *Clin Ther*; 37: 2468-75.
- Blencowe T., Pehrsson A., Mykkanen S., Gunnar T., Lillsunde P. 2012. Cannabis findings in drivers suspected of driving under the influence of drugs in Finland from 2006 to 2008. *Forensic Sci Int.* 217:107–112.
- Blum F. 2014. High performance liquid chromatography. *Br J Hosp Med (Lond).* 75:C18-21.
- Bogstrand S.T., Normann P.T., Rossow I., Larsen M., Morland J., Ekeberg O. 2011. Prevalence of alcohol and other substances of abuse among injured patients in a Norwegian emergency department. *Drug Alcohol Depend.* 117:132–138.
- Bondallaz P., Favrat B., Chtioui H., Fornari E., Maeder P., Giroud C. 2016. Cannabis and its effects on driving skills. *Forensic Sci.* 268:92-102.
- Bosker W.M., Huestis M.A. 2009. Oral fluid testing for drugs of abuse. *Clin Chem.* 55:1910–31.
- Boyd S.J., Corbin W.R. 2018. Faster alcohol metabolism is associated with increased stimulation and within session consumption. *Exp Clin Psychopharmacol.* 26:168-176.
- Brady J.E., Li G. 2013. Prevalence of alcohol and other drugs in fatally injured drivers. *Addiction.* 108:104–114.
- Braithwaite A, Smith J. 1996. Chromatographic methods. Quinta edizione. Blackie.
- Braithwaite A., Smith J. 1996. Chromatographic methods for Laboratories. Blackie.
- Breitenbach T.C., Pechansky F., Benzano D., De Boni R. 2012. High rates of injured motorcycle drivers in emergency rooms and the association with substance use in Porto Alegre, Brazil. *Emerg. Med. J.* 29:205–207.
- Brescia R., Brescia V. 2023. Norme di legislazione farmaceutica nell'esercizio professionale.

- Broyd S.J., van Hell H.H., Beale C., Yucel M., Solowij N. 2016. Acute and chronic effects of cannabinoids on human cognition. *Biol. Psychiatry*. 79:557-567.
- Bueno L.H.P., da Silva R.H.A., Azenha A.V., de Souza Dias M.C., De Martinis B.S. 2014. Oral fluid as an alternative matrix to determine ethanol for forensic purposes. *Forensic Sci Int*. 242:117– 122.
- Bulow H.H., Linnemann M., Berg H., Lang-Jensen T., La Cour S., Janssen T. 1995. Respiratory changes during treatment of postoperative pain with high dose transdermal fentanyl. *Acta Anaesthesiol Scand*. 39:835-839.
- Busardò F.P., Pellegrini M., Klein J., di Luca N.M. 2017. Neurocognitive correlates in driving under the influence of cannabis. *CNS. Neurol. Disord. Drug Targets*. 16:534-40.
- Busardò F.P., Pichini S., Pacifici R. 2017. Driving under the influence of drugs: looking for reasonable blood cut-offs and realistic analytical values. *Clin. Chem*. 63:781-83.
- Busardo F.P., Pichini S., Pellegrini M., Montana A., Lo Faro A.F., Zaami S., Graziano S. 2018. Correlation between blood and oral fluid psychoactive drug concentrations and cognitive impairment in driving under the influence of drugs. *Curr Neuropharmacol*. 16:84–96.
- Calabrò M.L. 2012. Compendio di biotecnologie farmaceutiche. Edises.
- Calò L., Anzillotti L., Maccari C., Cecchi R., Andreoli R. 2020. Validation of a bioanalytical method for the determination of synthetic and natural cannabinoids (new psychoactive substances) in Oral fluid samples by means of HPLC-MS/MS. *Front Chem*. 8:439.
- Canadian Centre on Substance Abuse. 2011. A Comparison of Drug- and Alcohol-Involved Motor Vehicle Driver Fatalities, Canadian Centre on Substance Abuse.
- Carfora A., Campobasso C.P., Cassandro P., Petrella R., Borriello R. 2018. Alcohol and drugs use among drivers injured in road accidents in Campania (Italy): a 8- years retrospective analysis. *Forensic Sci. Int*. 288:291–296.
- Casati S., Binda M., Dongiovanni P., Meroni M., D'Amato A., Roda G., Orioli M., Del Fabbro M., Tartaglia G.M. 2023. Recent advances of drugs monitoring in oral fluid and comparison with blood. *Clin Chem Lab Med*. 61:1978-1993.
- Cazes J., Scott R.P.W. 2002. Chromatography theory. Dekker
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2024. Fentanyl, Overdose Prevention.
- Ch'ng C.W., Fitzgerald M., Gerostamoulos J., Cameron P., Bui D., Drummer O.H., Potter J., Odell M. 2007. Drug use in motor vehicle drivers presenting to an Australian, adult major trauma centre. *Emerg. Med. Australas*. 19:359– 365.
- Chichom-Mefire A., Atashili J., Tsiagadigui J.G., Fon-Awah C., Ngowe-Ngowe M. 2015. A prospective pilot cohort analysis of crash characteristics and pattern of injuries in riders and pillion passengers involved in motorcycle crashes in an urban area in Cameroon: lessons for prevention. *BMC Public Health*. 15:915.

- Chimalakonda K.C., Seely K.A., Bratton S.M., et al. 2012. Cytochrome P450- Mediated oxidative metabolism of abused synthetic cannabinoids found in K2/Spice: identification of novel cannabinoid receptor ligands. *Drug Metab. Dispos.* 40: 2174e2184.
- Compton D.R., et al. 1992. Pharmacological profile of a series of bicyclic cannabinoid analogs: classification as cannabimimetic agents. *J Pharmacol Exp Ther.* 260: 201-9.
- Corazza O. et al. 2014. “Spice,” “Kryptonite,” “Black Mamba”: An Overview of Brand Names and Marketing Strategies of Novel Psychoactive Substances on the Web. *J Psychoactive Drugs.* 46: 287-294.
- Corazza O., Guirguis A., Negri A., Di Trana A., Carlier J., Berretta P., Zaami S., Ricci G. 2020. Consequences of COVID-19 Lockdown on the Misuse and Marketing of Addictive Substances and New Psychoactive Substances. *Front. Psychiatry;* 11: 584462.
- Costa N., Silva R., Mendonca M.C., Real F.C., Vieira D.N., Teixeira H.M. 2012. Prevalence of ethanol and illicit drugs in road traffic accidents in the centre of Portugal: an eighteen-year update. *Forensic Sci. Int.* 216:37–43.
- Cota D., Marsicano G., Tschoep M., Grubler Y., Flachskamm C., Schubert M., Auer D., Yassouridis A., Thone-Reineke C., Ortmann S., Tomassoni F., Cervino C., Nisoli E., Linthorst A.C., Pasquali R., Lutz B., Stalla G.K., Pagotto U. 2003. The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest.* 112:423-431.
- Cozzi R., Protti P., Ruaro T. 2013. Elementi di analisi chimica strumentale. Zanichelli.
- Crandon I.W., Harding H.E., Cawich S.O., McDonald A.H., Fearron-Boothe D. 2009. Motorcycle accident injury profiles in Jamaica: an audit from the University Hospital of the West Indies. *Int. J. Inj. Contr. Saf. Promot.* 16:175–183.
- da Costa B.R.B., Santos Júnior W.J.R., Maximiano I.F., Gomes N.C., Freitas B.T., De Martinis B.S. 2021. Application of microextrac- tion techniques in alternative biological matrices with focus on forensic toxicology: a review. *Bioanalysis.* 13:45–64.
- de Almeida P.D.V., Grégio A.M.T., Machado M.Â.N., de Lima A.A.S., Azevedo L.R. 2008. Saliva composition and functions: a com- prehensive review. *J Contemp Dent Pract.* 9:72–80.
- De Boni R., Bozzetti M.C., Hilgert J., Sousa T., Von Diemen L., Benzano D., Menegon G., Holmer B., Do Carmo Arruda Vieira Duarte P., Pechansky F. 2011. Factors associated with alcohol and drug use among traffic crash victims in southern Brazil. *Accid. Anal. Prev.* 43:1408–1413.
- de Campos E.G., da Costa B.R.B., Dos Santos F.S., Monedeiro F., Alves M.N.R., Santos Junior W.J.R., De Martinis B.S. 2022. Alternative matrices in forensic toxicology: a critical review. *Forensic Toxicol;* 40: 1-18.
- De Castro J. 1977. Analgesic anesthesia based on the use of fentanyl in high doses. *Anesthesia vigilie et subvigile.* 1:87–166.
- De Petrocellis L., Cascio M.G., Di Marzo V. 2004. The endocannabinoid system: a general view and latest additions. *Br J Pharmacol.* 141:765-774.

De Rome L., Ivers R., Fitzharris M., Dua W., Haworth N., Heritier S., Richardson D. 2011. Motorcycle protective clothing: protection from injury or just the weather? *Accid. Anal. Prev.* 43:1893–1900.

Decreto del Presidente della Repubblica 15 giugno 1959 n. 393, “Testo unico delle norme sulla circolazione stradale”.

Decreto Legislativo 18 aprile 2011 n. 59, “Attuazione delle direttive 2006/126/CE e 2009/113/CE concernenti la patente di guida” e s.m.i.

Decreto Legislativo 30 aprile 1992, n. 285. Nuovo Codice della Strada.

Dei Cas M., Casagni E., Arnoldi S., Gambaro V., Roda G. 2019. Screening of new psychoactive substances (NPS) by gas-chromatography/time of flight mass spectrometry (GC/MS-TOF) and application to 63 cases of judicial seizure. *Forensic Sci Int Synerg*;71-78.

Department of Health and Human Services Substance Abuse and Mental Health Services Administration Center for Substance Abuse Prevention. 2022. Collection Site Manual for the collection of oral fluid specimens for Federal Agency Workplace Drug Testing Programs.

Desrosiers N.A., Huestis M.A. 2019. Oral fluid drug testing: analytical approaches, issues and interpretation of results. *J Anal Toxicol.* 43:415–443.

Devane W.A., Dysarz F.A., Johnson M.R., Melvin L.S., Howlett A.C. 1988. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol.* 34:605-13.

Devane W.A., Hanus L., Breuer A., Pertwee R.G., Stevenson L.A., Griffin G., Gibson D., Mandelbaum A., Etinger A., Mechoulam R. 1992. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258:1946-1949.

Dhawan B.N., Casselin R., Raghbir R. 1996. International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. *Pharmacol Rev.* 48:567-592.

Di Gaudio F., Mortali C., Tini A. 2021. Opioid epidemic spread from Northern and Eastern Europe to Mediterranean area. *Clin Ter.* 172: 209-210.

Di Marzo V., Bifulco M., De Petrocellis L. 2004. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov.* 3:771-784.

Dipartimento Politiche Antidroga, Presidenza del Consiglio dei Ministri. 2024. Piano nazionale di prevenzione contro l’uso improprio di fentanyl e di altri oppioidi sintetici.

Drummer O.H., Kourtis I., Beyer J., Tayler P., Boorman M., Gerostamoulos D. 2012. The prevalence of drugs in injured drivers. *Forensic Sci. Int.* 215:14–17.

Dybowski M.P., Dawidowicz A.L. 2020. Furanylfentanyl in whole blood measured by GC–MS/MS after QuEChERS extraction in a fatal case. *Forensic Toxicol*; 38: 496–504.

Ellenhorn J. 1997. *Ellenhorn’s Medical Toxicology*, 2nd ed. Baltimore, MD, Williams & Wilkins. pp 319-320.

Elliott S., Woolacott H., Braithwaite R. 2009. The prevalence of drugs and alcohol found in road traffic fatalities: a comparative study of victims. *Sci. Justice*. 49:19–23.

Elmongy H., Abdel-Rehim M. 2016. Saliva as an alternative specimen to plasma for drug bioanalysis: a review. *Trends Ana-lyt Chem*. 83:70–79.

ElSohly M.A. 2007. Marijuana and the Cannabinoids. Springer.

Elsohly M.A., Slade D. 2005. Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sci*. 78: 539–548.

Elvik R. 2013. Risk of road accident associated with the use of drugs: a systematic review and meta-analysis of evidence from epidemiological studies. *Accid. Anal. Prev*. 60:254–267.

European Medicine Agency. ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study samples.

European Monitoring Centre for Drugs and Addiction (EUDA). 2020. Initial Report on the New Psychoactive Substance N,N-diethyl-2,4-(1- methylethoxy)phenylmethyl-5-nitro-1H-benzimidazole-1-ethanamine Isotonitazene; European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction: Lisbon, Portugal.

European monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). Synthetic cannabinoids in Europe 2017.

European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). 2023. Heroin and other opioids-the current situation in Europe (European Drug Report 2023).

European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). 2023. Opioid agonist treatment-the current situation in Europe (European Drug Report 2023).

European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). 2023. New psychoactive substances-the current situation in Europe. (European Drug Report 2023).

European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EUDA). 2022. Report on the New Psychoactive Substance 2-(Methylamino)-1-(3- methylphenyl)propan-1-one (3-methylmethcathinone, 3-MMC) in Accordance with Article 5c of Regulation (EC) No 1920/2006 (as Amended); European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction: Lisbon, Portugal.

European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EUDA).2021. Report on the Risk Assessment of Methyl 2- {[1-(4-Fluorobutyl)-1Hindole-3-carbonyl] amino}-3,3-dimethylbutanoate (4F-MDMB-BICA) in Accordance with Article 5c of Regulation (EC) No 1920/2006 (as Amended); European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction: Lisbon, Portugal.

European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. 2012. Driving Under the influence of Drugs, Alcohol and Medicines in Europe-findings from the DRUID project.

European Transport Safety Council (ETSC). 2021. 15 Annual Road Safety Performance Index (PIN) Report.

- European Union Drugs Agency (EUDA). 2023. Nuove Sostanze Psicoattive- l'attuale situazione in Europa (Relazione europea sulla droga 2023).
- European Union Drugs Agency (EUDA). 2024. Comprendere la situazione della droga in Europa nel 2024: principali sviluppi (Relazione europea sulla droga 2024).
- European Union Drugs Agency (EUDA). 2024. New psychoactive substances- the current situation in Europe (European Drug Report 2024).
- European Workplace Drug Testing Society (EWDTs). 2022. Guidelines for Oral Fluid.
- Fassette T., Martinez A. 2016. An impaired driver found to be under the influence of methoxetamine. *J. Anal. Toxicol.* 40:700-702.
- Fattore, L. 2016. Synthetic cannabinoids-further evidence supporting the relationship between cannabinoids and psychosis. *Biol Psychiatry.* 79:539-548.
- Favretto D., Visentin S., Stocchero G., Vogliardi S., Snenghi R., Montisci M. 2019. Driving under the influence of drugs: Prevalence in road traffic accidents in Italy and considerations on per se limits legislation. *Traffic Inj Prev.* 19:786-793.
- Feisthauer E., Farrugia A., Ameline A., Gheddar L., Arbouche N., Raul J.S., Kintz P. 2021. Interest in testing for 4-ANPP in biological matrices as a precursor of exposure to fentanyl or to a fentanyl derivative. *Toxicol. Anal. Clin;* 33: 338–342.
- Ferrari D., Manca M., Premaschi S., Banfi G., Locatelli M. 2018. Toxicological investigation in blood samples from suspected impaired driving cases in the Milan area: possible loss of evidence due to late blood sampling. *Forensic Sci Int.* 288:211–217.
- Finkelstein M.J., Chronister C.W., Stanley C., Ogilvie L.M., Goldberger B.A. 2019. Analysis of Acetyl Fentanyl in Postmortem Specimens by Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS): Method Validation and Case Report. *J Anal Toxicol;* 43: 392-398.
- Fitzharris M., Dandona R., Kumar G.A., Dandona L. 2009. Crash characteristics and patterns of injury among hospitalized motorised two-wheeled vehicle users in urban India. *BMC Public Health.* 9:11.
- Fogarty M.F., Papsun D.M., Logan B.K. 2018. Analysis of fentanyl and 18 novel fentanyl analogs and metabolites by LC-MS-MS, and report of fatalities associated with methoxyacetylfentanyl and cyclopropylfentanyl. *J. Anal. Toxicol;* 42: 592–604.
- Forouzanfar M.H., Alexander L., Anderson H.R., Bachman V.F., Biryukov S., Brauer S. 2013. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet.* 386:2287-323.
- Freund T.F., Katona, I., Piomelli, D. 2003. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol. Rev.* 83: 1017–1066.
- Froldi R. 2001. Lezioni di tossicologia forense. G. Giappichelli Editore-Torino.

- Gagliano-Candela R. 2001. Tossicologia forense in schemi, tabelle e teso. Giuffrè Editore.
- Galiègue S., Mary S., Marchand J., Dussossoy D., Carrière D., Carayon P., Bouaboula M., Shire D., Gandhi A.S., Wohlfarth A., Zhu M., et al. 2015. High-resolution mass spectrometric.
- Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana. Decreto Legge 20 marzo 2014. n. 36.
- Giustini M., Cedri S., Tallon M., Roazzi P., Formisano R., Pitidis A. 2014. Use of back protector device on motorcycles and mopeds in Italy. *Int. J. Epidemiol.* 43:1921–1928.
- Gjerde H., Christophersen A.S., Normann P.T., Morland J. 2011. Toxicological investigations of drivers killed in road traffic accidents in Norway during 2006–2008. *Forensic Sci. Int.* 212:102–109.
- Gjerde H., Langel K., Favretto D., Verstraete A.G. 2015. Detection of illicit drugs in oral fluid from drivers as biomarker for drugs in blood. *Forensic Sci Int.* 256:42–45.
- Graziano S. et al. 2017. Herbal Highs: Review on Psychoactive Effects and Neuropharmacology. *Curr Neuropharmacol.* 15: 750-761.
- Gruppo Tossicologi Forensi Italiani (GTFI). 2017. Linee guida per le strutture dotate di laboratori per gli accertamenti di sostanze d'abuso con finalità tossicologico-forensi e medico-legali su campioni biologici prelevati da vivente. Revisione n.5 del 29 maggio 2017.
- Hage D.S. 2018. Principles and applications of clinical mass spectrometry. 1-32.
- Hanus L., Abu-Lafi S., Fride E., Breuer A., Vogel Z., Shalev D.E., Kustanovich I., Mechoulam R. 2001. 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 3662–3665.
- Harris D.C. 2005. Chimica Analitica Quantitativa. Seconda Edizione. Zanichelli
- Hefny A.F., Barss P., Eid H.O., Abu-Zidan F.M. 2012. Motorcycle-related injuries in the United Arab Emirates. *Accid. Anal. Prev.* 49:245–248.
- Heftman E.F. 2004. Chromatography: fundamentals of chromatography and related differential migration methods. Elsevier.
- Hels T., Lyckegaard A., Simonsen K.W., Steentoft A., Bernhoft I.M. 2013. Risk of severe driver injury by driving with psychoactive substances. *Accid. Anal. Prev.* 59:346-356.
- Hoffmann W.D., Jackson G.P. 2015. Forensic Mass Spectrometry. *Annu Rev Anal Chem.* 8:419-40.
- Howlett A.C., Barth F., Bonner T.I., Cabral G., Casellas P., Devane W.A., Felder C.C., Herkenham M., Mackie K., Martin B.R., Mechoulam R., Pertwee R.G. 2002. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev.* 54:161- 202.
- Howlett A.C., et al. 1990. Stereochemical effects of 11-OH-delta-8-tetrahydrocannabinol-dimethylheptyl to inhibit adenylate cyclase and bind to the cannabinoid receptor. *Neuropharmacology.* 29:161-5.

- Howlett A.C., et al. 2002. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev.* 54: 161-202.
- Huang S.M., Bisogno T., Trevisani M., Al-Hayani A., De Petrocellis L., Fezza F., Tognetto M., Petros T.J., Krey J.F., Chu C.J. et al. 2002. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 8400–8405.
- Huffman J. 2009. Cannabimimetic indoles, pyrroles, and indenes: structure-activity relationships and receptor interactions. In: *The cannabinoid receptors*, P.H. Reggio, Editor, New York (USA). *Humana Press*.
- Huffman J., et al. 1994. Design, Synthesis and Pharmacology of Cannabimimetic Indoles. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 4: 563-566.
- Janssen P.A.J. 1962. A review of the chemical features associated with strong morphine-like activity. *Br J Anaesth.* 34:260–268.
- Jones A.W., Kugelberg F.C., Holmgren A., Ahlner J. 2009. Five-year update on the occurrence of alcohol and other drugs in blood samples from drivers killed in road-traffic crashes in Sweden. *Forensic Sci. Int.* 186:56–62.
- Juneja R. 2014. Opioids and cancer recurrence. *Curr Opin Support Palliat Care.* 8:91-101.
- Kanamori T., Iwata Y.T., Segawa H., Yamamuro T., Kuwayama K., Tsujikawa K., Inoue H. 2019. Metabolism of Butyrylfentanyl in Fresh Human Hepatocytes: Chemical Synthesis of Authentic Metabolite Standards for Definitive Identification. *Biol Pharm Bull.* 42:623-630.
- Kelly E., Sutcliffe K., Cavallo D., Ramos-Gonzalez N., Alhosan N., Henderson G. 2021. The anomalous pharmacology of fentanyl. *Br J Pharmacol.* 180:797-812.
- Kneisel S., Speck M., Moosmann B., Corneillie T.M., Butlin N.G., Auwärter V. 2013. LC/ESI-MS/MS method for quantification of 28 synthetic cannabinoids in neat oral fluid and its application to preliminary studies on their detection windows. *Anal Bioanal Chem.* 405:4691–706.
- Ko B.K. 1981. Levonantradol, a potent cannabinoid-related analgesic, antagonizes haloperidol-induced activation of striatal dopamine synthesis. *Eur J Pharmacol.* 70: 231-5.
- Kraus J.F., Peek-Asa C., Cryer H.G. 2002. Incidence, severity, and patterns of intrathoracic and intra-abdominal injuries in motorcycle crashes. *J. Trauma.* 52:548–553.
- Krotulski A.J., Cannaert A., Stove C., Logan B.K. 2021. The next generation of synthetic cannabinoids: Detection, activity, and potential toxicity of pent-4en and but-3en analogues including MDMB-4en-PINACA. *Drug Test. Anal;* 13: 427–438.
- Krotulski A.J., Papsun D.M., Chronister C.W., Homan J., Crosby M.M., Hoyer J., Goldberger B.A., Logan B.K. 2021. Eutylone Intoxications-An Emerging Synthetic Stimulant in Forensic Investigations. *J. Anal. Toxicol;* 45: 8–20.
- Krotulski A.J., Papsun D.M., Kacinko S.L., Logan B.K. 2021. Isotonitazene Quantitation and Metabolite Discovery in Authentic Forensic Casework. *J. Anal. Toxicol;* 44: 521–530.

Krotulski A.J., Papsun D.M., Noble C., Kacinko S.L., Logan B.K. 2021. Brorphine—Investigation and quantitation of a new potent synthetic opioid in forensic toxicology casework using liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Forensic Sci*; 66: 664–676.

Kuczyńska K., Grzonkowski P., Kacprzak L., Zawilska J.B. 2018. Abuse of fentanyl: An emerging problem to face. *Forensic Sci Int*. 289: 207-214.

Kumar V., Abbas A.K., Aster J.C. 2015. Le basi patologiche delle malattie. Nona edizione. Edra Masson.

La Maida N., Pellegrini M., Papaseit E., Pérez-Mañá C., Poyatos L., Ventura M., et al. 2020. Determination of the synthetic cannabinoids JWH-122, JWH-210, UR-144 in oral fluid of consumers by GC- MS and quantification of parent compounds and metabolites by UHPLC-MS/MS. *Int J Mol Sci*. 21:9414.

La Torre G., Van Beeck E., Bertazzoni G., Ricciardi W. 2007. Head injury resulting from scooter accidents in Rome: differences before and after implementing a universal helmet law. *Eur J Public Health*. 17:607–611.

Lamers C.T.J., Ramaekers J.G. 2001. Visual search and urban city driving under the influence of marijuana and alcohol. *Hum. Psychopharmacol*. 16:393– 401.

Law 41 of march 23, 2016. <http://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2016/03/24/16G00048/sg>.

Le Fur G., Casellas P. 1995. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur. J. Biochem*. 232: 54–61.

Legge n. 2248 del 20 Marzo 1865 in materia di “Unificazione amministrativa del Regno di Italia”

Legrand S.A., Gjerde H., Isalberti C., Van der Linden T., Lillsunde P., Dias M.J., Gustafsson S., Ceder G., Verstraete A.G. 2014. Prevalence of alcohol, illicit drugs and psychoactive medicines in killed drivers in four European countries. *Int. J. Inj. Control Safe Promot*. 21:17–28.

Legrand S.A., Isalberti C., Vander Linden T., Bernhoft I.G., Hels T., Simonsen K.W., Favretto D., Ferrara S.D., Caplinskiene M., Minkuviene Z., Pauliukevicius A., Houwing S., Mathijssen R., Lillsunde P., Langel K., Blencoweh T., Verstraete A.G. 2013. Alcohol and drugs in seriously injured drivers in six European countries. *Drug Test. Anal*. 5:156–165.

Lemke T.L., Williams D.A., Roche V.F., William Zito S. 2014. Foye’s, Principi di chimica farmaceutica. Piccin.

Leslie F.M. 1987. Methods used for the study of opioid receptors. *Pharmacol Rev*. 39:197-249.

Ligresti A., De Petrocellis L., Di Marzo V. 2016. From Phytocannabinoids to Cannabinoid Receptors and Endocannabinoids: Pleiotropic Physiological and Pathological Roles Through Complex Pharmacology. *Physiol. Rev*. 96: 1593–1659.

Liu C.M., Jia W., Meng X., Hua Z.D. 2021. Identification and quantification of 10 indole/indazole carboxamide synthetic cannabinoids in 36 herbal blends by gas chromatography-mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Forensic Sci*. 66:2156–66.

- Lo Faro A.F., Berardinelli D., Cassano T., Dendramis G., Montanari E., Montana A., Berretta P., Zaami S., Busardò F.P., Huestis M.A. 2023. New Psychoactive Substances Intoxications and Fatalities during the COVID-19 Epidemic. *Biology (Basel)*; 12:273.
- Lopes A.S., Cruz E.C., Sussulini A., Klassen A. 2017. Metabolomic Strategies Involving Mass Spectrometry Combined with Liquid and Gas Chromatography. *Adv Exp Med Biol*. 965:77-98.
- Luethi D., Liechti M.E. 2020. Designer drugs: mechanism of action and adverse effects. *Arch Toxicol*; 94: 1085-1133.
- Lusetti A., Dagoli S., Banchini A., Gentile M., Lezzi P., Cecchi R. 2022. Over 30-year retrospective analyses of moped-motorcycle fatal road accidents in the northern area of the Italian region of Emilia Romagna and review of the literature: Aiming for further preventive measures in the future. *Leg Med (Tokyo)*. 59:102139.
- Mahlke N.S., Ziesenitz V., Mikus G., Skopp G. 2014. Quantitative low-volume assay for simultaneous determination of fentanyl, norfentanyl, and minor metabolites in human plasma and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Int. J. Leg. Med*; 128: 771–778.
- Malaca S., Busardò F.P., Gottardi M., Pichini S., Marchei E. 2019. Dilute and shoot ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC–MS/MS) analysis of psychoactive drugs in oral fluid. *J Pharm Biomed Anal*. 170:63– 67.
- Manzardo D., Pierini M., Delhayé A., Garcia Ruiz D., Bidal S., Peldschus S. 2009. Development of a thorax protector for motorcyclists. In: 21st International Conference on Enhanced Safety of Vehicles.
- Marinelli E., Pichini S., Zaami S., Giorgetti R., Busardò F.P., Pacifici R. 2016. Vehicular homicide, a new Italian offence: law provisions and comparison with some other European countries. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci*. 20:3145-51.
- Markogiannakis H., Sanidas E., Messaris E., Koutentakis D., Alpantaki K., Kafetzakis A., Tsiftsis D. 2006. Motor vehicle trauma: analysis of injury profiles by road-user category. *Emerg. Med. J*. 23:27–31.
- Martí-Álamo S., Mancheno-Franch A., Marzal-Gamarra C., Carlos-Fabuel L. 2012. Saliva as a diagnostic fluid. Literature review. *J Clin Exp Dent*. 4:e237–e243.
- Martin F. Casey, Alex F. Manini. 2022. Chapter 15 - Synthetic cannabinoids (SC), Novel Psychoactive Substances (Second Edition). Academic Press.
- Martin W.R. 1983. Pharmacology of opioids. *Pharmacol Rev*. 35:283-323.
- Mata D.C.; Coleman D. 2021. Unusually High Concentration of Fentanyl in a Driver: A Case Report. *J. Anal. Toxicol*. 45:847–850.
- Matsuda L.A., Lolait S.J., Brownstein M.J., Young A.C., Bonner T.I. 1990. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*. 346:561-4.
- Mechoulam R., Ben-Shabat S., Hanus L., Ligumsky M., Kaminski N.E., Schatz A.R., Gopher A., Almog S., Martin B.R., Compton D.R. 1995. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*. 50:83-90.

Mechoulam R., Gaoni Y., A. 1965. Total Synthesis of DL-Delta-1-Tetrahydrocannabinol, the Active Constituent of Hashish. *J Am Chem Soc.* 87: 3273-5.

Medical bureau of road safety an Lia-Bhiúró um Shábháilteacht ar Bhóithre. 2012. Report on roadside drug testing and equipment and related matters.

Melvin L.S., et al. 1984. A cannabinoid derived prototypical analgesic. *J Med Chem.* 27: 67-71. metabolite profiling of a novel synthetic designer drug, N-(adamantan-1-yl)-1-(5-fluoropentyl)-1H-indole-3-carboxamide (STS-135) using cryopreserved human hepatocytes and assessment of metabolic stability with human liver microsomes. *Drug Test. Anal.* 7: 187e198.

Miller J.M. 2005. Chromatography: concepts and contrasts. Wiley.

Milman G., Barnes A.J., Lowe R.H., Huestis M.A. 2010. Simultaneous quantification of cannabinoids and metabolites in oral fluid by two-dimensional gas chromatography mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 1217:1513–1521.

Ministero della Salute. 2024. Dati incidenti stradali alcol correlati.

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

Ministero della Salute. Tabelle delle Sostanze stupefacenti e psicotrope. Aggiornamento del 24 settembre 2024.

Misailidi N., Athanaselis S., Nikolaou P., Katselou M., Dotsikas Y., Spiliopoulou C., Papoutsis I. 2019. A GC-MS method for the determination of furanylfentanyl and fentanyl in whole blood with full validation. *Forensic Toxicol*; 37:238–244.

Missoni E., Mlinarić-Vrbica S., Meschino M., Pancrazi E. 2018. Alcohol related crashes in Europe. *J J Alcohol Drug Depend. Subst. Abus.* 4:008.

Montanari S., Davani L., Terenzi C., Maltoni M., Andrisano V., De Simone A., Ricci M. 2022. Fentanyl pharmacokinetics in blood of cancer patients by Gas Chromatography - Mass Spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*; 20: 219:114913.

Montanari Vergallo G., Marinelli E., di Luca N.M., Masotti V., Cecchi R., Zaami S. 2017. Italian law on the vehicular homicide: medical legal issues and comparative analysis. *Clin. Ther.* 168:214-19.

Moody M.T., Diaz S., Shah P., Papsun D., Logan B.K. 2018. Analysis of fentanyl analogs and novel synthetic opioids in blood, serum/plasma, and urine in forensic casework. *Drug Test Anal*; 10:1358-1367.

Moran C.L., Le V.H., Chimalakonda K.C., et al. 2011. Quantitative measurement of JWH-018 and JWH-073 metabolites excreted in human urine. *Anal. Chem.* 83: 4228e4236.

Morland J., Steentoft A., Simonsen K.W., Ojanperä I., Vuori E., Magnusdottir K., Kristinsson J., Ceder G., Kronstrand R., Christophersen A. 2011. Drugs related to motor vehicle crashes in northern European countries: a study of fatally injured drivers. *Accid. Anal. Prev.* 43:1920–1926.

- Morley R., Minceva M. 2021. Liquid-Liquid Chromatography: Current Design Approaches and Future Pathways. *Annu Rev Chem Biomol Eng.* 12:495-518.
- Munro S., Thomas K.L., Abu-Shaar M. 1993. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature.* 365:61-5.
- Musshoff F., Madea B., Kernbach-Wighton G., Bicker W., Kneisel S., Hutter M., Auwarter V. 2014. Driving under the influence of synthetic cannabinoids: a case series. *Int. J. Legal Med.* 128:59-64.
- Nakahara S., Chadbunchachai W., Ichikawa M., Tipsuntornsak N., Wakai S. 2005. Temporal distribution of motorcyclist injuries and risk of fatalities in relation to age, helmet use, and riding while intoxicated in Khon Kaen, Thailand. *Accid. Anal. Prev.* 37: 833–842.
- Onaivi E., Ishiguro H., Gong J., Patel S., Meozzi P., Myers L., Perchuka A., Mora Z., Tagliaferro P., Gardner E., Brusco A., Akinsola B., Hope B., Lujilde J., Inada T., Iwasaki S., Macharia D., Teasenfitz L., Arinami T., Uhl G. 2008. Brain neuronal CB2 cannabinoid receptors in drug abuse and depression: from mice to human subjects. *PLoS One.* 3:e1640.
- Pacher, P., Steffens, S., Haskò, G. 2018. Cardiovascular effects of marijuana and synthetic cannabinoids: the good, the bad and the ugly. *Nat Rev Cardiol.* 15: 151-166.
- Pagotto U., Marsicano G., Cota D., Lutz B., Pasquali R. 2006. The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr Rev.* 27:73-100.
- Palmquist K.B., Swortwood M.J. 2021. Quantification of fentanyl analogs in oral fluid using LC-QTOF-MS. *J Forensic Sci;* 66: 1871-1878.
- Papa P., Rocchi L., Rolandi L.M. 2017. Illicit drugs in emergency department patients injured in road traffic accidents. *Ann. Ist. Super. Sanità.* 53:35– 39.
- Papadodima S.A., Athanaselis S.A., Stefanidou M.E., Dona A.A., Papoutsis I., Maravelias C.P., Spiliopoulou C.A. 2008. Driving under the influence in Greece: a 7- year survey (1998–2004). *Forensic Sci. Int.* 174:157–160.
- Paquot N. 2019. Le métabolisme de l'alcool [The metabolism of alcohol]. *Rev Med Liege.* 74:265-267.
- Parikh N., Goskonda V., Chavan A., Dillaha L. 2013. Single-dose pharmacokinetics of fentanyl sublingual spray and oral transmucosal fentanyl citrate in healthy volunteers: A randomized crossover study. *Clin Ther.* 35:236-243.
- Parlamento Europeo. 2019. Le statistiche sugli incidenti stradali mortali nell'UE. Infografica.
- Pascali J.P., Dagoli S., Antonioni M., Facetti O., Anzillotti L., Calò L., Affini G.F., Cantarelli B., Cecchi R. 2022. Oral fluid analysis to monitor recent exposure to synthetic cannabinoids in a high-risk subpopulation. *J Forensic Sci.* 67:1932-1937.
- Peacock A., Bruno R., Gisev N., Degenhardt L., Hall W., Sedefov R. 2019. New psychoactive substances: challenges for drug surveillance, control, and public health responses. *Lancet.* 394:1668-84.

Pelletti G., Verstraete A.G., Reyns T., Barone R., Rossi F., Garagnani M., Pelotti S. 2019. Prevalence of therapeutic drugs in blood of drivers involved in traffic crashes in the area of Bologna, Italy. *Forensic Sci. Int.* 302: 109914.

Pichini S., Bucchioni P., Pellegrini M., Pacifici R., Bacosi A., Di Carlo S., Franceschini P., Gori P., Martucci L., Martucci P., Mastrobattista L., Minutillo A., Mortali C., Petriccioni G., Rotolo M.C., Sbarbaro I.M., Toth G. 2013. Linee guida per la determinazione delle sostanze d'abuso su sangue. Istituto Superiore di Sanità.

Pichini S., Busardo F.P., Pacifici R., Kintz P. 2017. EDITORIAL New Psychoactive Substances (NPS), a New Global Issue: Neuropharmacological, Chemical and Toxicological Aspects. *Curr Neuropharmacol.* 15:656-657.

Pichini S., Pacifici R., Gori P., Marchei E., Marchioro L., Martucci L., Mastrobattista L., Palmi I., Pellegrini M., Rotolo M.C. 2013. Linee guida per la determinazione delle sostanze d'abuso nelle urine. Istituto Superiore di Sanità.

Pichini S., Pacifici R., Gori P., Marchei E., Martucci L., Mastrobattista L., Palmi I., Pellegrini M., Rotolo M.C. 2013 Linee guida per la determinazione delle sostanze d'abuso nella matrice pilifera. Istituto superiore di Sanità.

Pichini S., Pacifici R., Mortali C., Gori P., Marchei E., Martucci L., Palmi I., Pellegrini M., Rotolo M.C. 2013. Linee guida per la determinazione delle sostanze d'abuso nella saliva. Istituto Superiore di Sanità.

Piomelli D. 2003. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci.* 4:873-884.

Piomelli D. 2004. The endogenous cannabinoid system and the treatment of marijuana dependence. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1: 359-367.

Poole C.F. 2003. The essence of Chromatography. Elsevier.

Portenoy R.K., Burton A.W., Gabrail N., Taylor D. 2010. Fentanyl Pectin Nasal Spray 043 Study Group: A multicenter, placebo-controlled, double-blind, multi-crossover study of Fentanyl Pectin Nasal Spray (FPNS) in the treatment of breakthrough cancer pain. *Pain.* 151:617-624.

Portenoy R.K., Taylor D., Messina J., Tremmel L. 2006. A randomized placebo-controlled study of fentanyl buccal tablet for breakthrough pain in opioid-treated patients with cancer. *Clin J Pain.* 22:805-811.

Porter A.C., Sauer J.-M., Knierman M.D., Becker G.W., Berna M.J., Bao J., Nomikos G.G., Carter P., Bymaster F.P., Leese A.B., et al. 2002. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 301: 1020-1024.

Presidenza del Consiglio dei Ministri, Dipartimento per le Politiche Antidroga-2024. Relazione annuale al parlamento.

- Presidenza del Consiglio dei Ministri. Dipartimento per le Politiche Antidroga. 2024. Piano nazionale di prevenzione contro l'uso improprio di fentanyl e di altri oppioidi sintetici. Conferenza stampa Gruppo Tossicologi Forensi Italiani (GTFI).
- Pu F., Chiang S., Zhang W., Ouyang Z. 2019. Direct sampling mass spectrometry for clinical analysis. *Analyst*. 144:1034-1051.
- Raffa R.B., Pergolizzi Jr J.V., Le Quang J.A., Taylor Jr R. 2018. NEMA Research Group, S. Colucci, M.H. The fentanyl family: a distinguished medical history tainted by abuse. *J. Clin. Pharmacol. Ther.* 43: 154–158.
- Ramaekers J.G., Moeller M.R., Van Ruitenbeek P. 2006. Cognition and motor control as a function of Δ^9 — THC concentration in serum and oral fluid: limits of impairment. *Drug Alcohol Depend.* 85:114–122.
- Ramli R., Oxley J., Noor F.M., Abdullah N.K., Mahmood M.S., Tajuddin A.K., McClure R. 2014. Fatal injuries among motorcyclists in Klang Valley, Malaysia. *J. Forensic Leg. Med.* 26:39–45.
- Ravera S., Monteiro S.P., De Gier J.J., van der Linden T., Gomez-Talegon T., Alvarez F.J. 2012. A European approach to categorizing medicines for fitness to drive: outcomes of the DRUID project. *J. Clin. Pharmacol.* 74:920–931.
- Regio Decreto 8 dicembre 1933 n. 1740, “Testo unico di norme per la tutela delle strade e per la circolazione”
- Rinaldi-Carmona M., Barth F., Heaulme M., Shire D., Calandra B., Congy C., Martinez S., Maruani J., Neliat G., Caput D., Ferrara P., Soubrie P., Breliere J.C., Le Fur G. 1994. SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett.* 350:240-244.
- Rocchi R., Simeoni M.C., Montesano C., Vannutelli G., Curini R., Sergi M., Compagnone D. 2018. Analysis of new psychoactive substances in oral fluids by means of microextraction by packed sorbent followed by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Test Anal.* 10:865–873.
- Ronen A., Gershon P., Drobiner H. 2008. Effects of THC on driving performance, physiological state and subjective feelings relative to alcohol. *Accid. Anal. Prev.* 40:926–934.
- Rubino C. 2022. Le basi della chimica analitica. Seconda Edizione. Zanichelli.
- Santamarina-Rubio E., Perez K., Ricart I., Rodríguez-Sanz M., Rodríguez-Martos A., Brugal M.T., Borrell C., Ariza C., Díez E., Beneyto V.M., Nebot M., Ramos P., Suelves J.M. 2009. Substance use among road traffic casualties admitted to emergency departments. *Inj. Prev.* 15:87–94.
- Satoh M., Minami M. 1995. Molecular pharmacology of the opioid receptors. *Pharmacol Ther.* 68:343-364.
- Scott R.P.W. 1995. Techniques and practice of chromatography. Marcel Dekker.
- Servadei F., Begliomini C., Gardini E., Giustini M., Taggi F., Kraus J. 2003. Effect of Italy's motorcycle helmet law on traumatic brain injuries. *Inj. Prev.* 9:257–260.
- Shafi A., Berry A.J., Sumnall H., Wood D.M., Tracy D.K. 2020. New psychoactive substances: a review and updates. *Ther Adv Psychopharmacol.* 10:2045125320967197.

- Simon G., Tóth D., Heckmann V., Kuzma M., Mayer M. 2022. Lethal case of myocardial ischemia following overdose of the synthetic cannabinoid ADB-FUBINACA. *Leg Med (Tokyo)*. 54:102004.
- Sisco E., Burns A., Moorthy A.S. 2021. Development and evaluation of a synthetic opioid targeted gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) method. *J Forensic Sci*; 66: 2369-2380.
- Skolnick P. 2018. On the front lines of the opioid epidemic: Rescue by naloxone. *Eur J Pharmacol*. 835:147-153.
- Skoog D.A., Holler F.J., Crouch S. 2009. *Chimica analitica strumentale*. Seconda edizione. Edises.
- Smink B.E., Movig K.L., Lusthof K.J., De Gier J.J., Uges D.R.A., Egberts A.C.G. 2008. The relation between the use of psychoactive substances and the severity of the injury in a group of crash-involved drivers admitted to a regional trauma center. *Traffic Inj. Prev*. 9:105–108.
- Sofri L., 2022. Le droghe in sostanza. Post cose spiegate bene. IPERBOREA.
- Spinelli E., Barnes A.J., Young S., et al. 2015. Performance characteristics of an ELISA screening assay for urinary synthetic cannabinoids. *Drug Test. Anal*. 7: 467e474.
- Stanley T.H. 1980. An International Symposium on Intravenous Anesthesia. *Chicago, Grune-Stratton*. 367-384.
- Stanley T.H. 2014. The fentanyl story. *American Pain Society*.
- Stanley T.H. 2014. The history of opioid use in anesthetic delivery, in Eger EI II, Saidman LJ, Westhorpe RN (eds): *The Wondrous Story of Anesthesia*. New York, Springer. Chapter 48.
- Stanley T.H., Egan T.D., Van Aken H. 2008. A tribute to Paul A. J. Janssen: Entrepreneur extraordinaire, innovative scientist, and significant contributor to anesthesiology. *Anesth Analg*. 106:451-462.
- Stein C. 2016. Opioid Receptors. *Annu Rev Med*. 67:433-51.
- Strano Rossi S., Frison G., Chericoni S., Bertol E., Favretto D., Pichini S. et al. 2023. Linee guida per la determinazione di sostanze stupefacenti e psicotrope su campioni biologici con finalità tossicologico-forensi e medico-legali. *Riv Ital Med Lab*. 19:192-205.
- Strano-Rossi S., Alvarez M.J., Taberner M.J., Cabarcos P., Fernández P., Bermejo A.M. 2010. Determination of fentanyl, metabolite and analogs in urine by GC/MS. *J Appl Toxicol*; 31: 649-54.
- Strano-Rossi S., Anzillotti L., Castrignanò E., Felli M., Serpelloni G., Mollica R., Chiarotti M. 2011. UHPLC-ESI-MS/MS method for direct analysis of drugs of abuse in oral fluid for DUID assessment. *Anal Bioanal Chem*. 40:609-24.
- Subramony J.A., Sharma A., Phipps J.B. 2006. Microprocessor controlled transdermal drug delivery. *Int J Pharm*. 317:1-6.
- Sugiura T., Kondo S., Sukagawa A., Nakane S., Shinoda A., Itoh K., Yamashita A., Waku K. 1995. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 215:89-97.

- Suzuki J., El-Haddad S. 2017. A review: fentanyl and non-pharmaceutical fentanyls. *Drug Alcohol Depend*; 17: 107–116.
- Tait, R.J., Caldicott, D., Mountain, D. 2016. A systematic review of adverse events arising from the use of synthetic cannabinoids and their associated treatment. *Clin. Toxicol (Phila)*. 54, 1-13.
- Takeda A., Hitosugi M., Furukawa S. 2017. Autopsy Cases of Motorcyclists Dying of Trauma or Disease. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 38:222–225.
- Tetty J.N.A., Crean C., Rodrigues J., Angeline Yap T.W., Lee Wendy Lim J., et al. 2021. United Nations Office on Drugs and Crime: recommended methods for the identification and analysis of synthetic cannabinoid receptor agonists in seized materials. *Forensic Sci. Int. Synerg.* 3:100129.
- Thakur G.A., et al. 2005. CB1 cannabinoid receptor ligands. *Mini Rev Med Chem.* 5: 631-40.
- The Center for Forensic Science Research and Education. 2021. New High Potency Synthetic Opioid N-Pyrrolidino Etonitazene (Etonitazepyne) Linked to Overdoses across United States. 2021.
- Thollon L., Godio Y., Bidal S., Brunet C. 2010. Evaluation of a new security system to reduce thoracic injuries in case of motorcycle accidents. *Int. J. Crashworthiness.* 15:191–199.
- Thomsen R., Nielsen L.M., Holm N.B., et al. 2015. Synthetic cannabimimetic agents metabolized by carboxylesterases. *Drug Test. Anal.* 7: 565e576.
- Toennes S.W., Geraths A., Pogoda W., Paulke A., Wunder C., Theunissen E.L., et al. 2018. Pharmacokinetic properties of the synthetic cannabinoid JWH-018 in oral fluid after inhalation. *Drug Test Anal.* 10:644–50.
- Tokarczyk B., Jurczyk A., Krupińska J., Adamowicz P. 2022. Fatal intoxication with new synthetic cannabinoids 5F-MDMB-PICA and 4F-MDMB-BINACA-parent compounds and metabolite identification in blood, urine and cerebrospinal fluid. *Forensic Sci Med Pathol.* 18:393-402.
- Trescot A.M., Datta S., Lee M., Hansen H. 2008. Opioid pharmacology. *Pain Physician.* 11:133-53.
- Truver M.T., Chronister C.W., Kinsey A.M., Hoyer J.L., Goldberger B.A. 2022. Toxicological Analysis of Fluorofentanyl Isomers in Postmortem Blood. *J. Anal. Toxicol*; 46: 835–843.
- United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). 2024. Early Warning Advisory on New Psychoactive Substances.
- United Nations Office on Drugs and Crime. 2024. Current NPS Threats. Volume VII.
- United Nations office on Drugs and Crime. Global smart update 2016.
- van Dorp E., Yassen A., Dahan A. 2007. Naloxone treatment in opioid addiction: the risks and benefits. *Expert Opin Drug Saf.* 6:125-32.
- Van Sickle M.D., Duncan M., Kingsley P.J., Mouihate A., Urbani P., Mackie K., Stella N., Makriyannis A., Piomelli D., Davison J.S., Marnett L.J., Di Marzo V., Pittman Q.J., Patel K.D., Sharkey K.A. 2005. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science.* 310: 329–332.

Verougstraete N., Vandeputte M.M., Lyphout C., Cannart A., Hulpia F., Van Calenbergh S., Verstraete A.G., Stove C. 2020. First Report on Brophine: The Next Opioid on the Deadly New Psychoactive Substance Horizon? *J. Anal. Toxicol*; 44: 937–946.

Vindenes V., Yttredal B., Oiestad E.L., Waal H., Bernard J.P., Mørland J.G., Christophersen A.S. 2011. Oral fluid is a viable alternative for monitoring drug abuse: detection of drugs in oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and comparison to the results from urine samples from patients treated with Methadone or Buprenorphine. *J Anal Toxicol*; 35: 32-9.

Vohra V., King A.M., Jacobs E., Aaron C. 2021. Death associated with brophine, an emerging novel synthetic opioid. *Clin. Toxicol*; 59: 851–852.

Wei Q., Su F.H. 2022. Determination of Nine Fentanyl Drugs in Hair Samples by GC-MS/MS and LC-MS/MS. *ACS Omega*; 31: 19176-19182.

Wick M., Müller E.J., Ekkernkamp A., Muhr G. 1998. Themotorcyclist:easyrideroeasy victim? An analysis of motorcycle accidents in Germany. *Am. J. Emerg. Med.* 16:320–323.

Wiley J.L., Marusich J.A., Huffman J.W. 2013. Moving around the molecule: relationship between chemical structure and in vivo activity of synthetic cannabinoids. *Life Sci.* 23: 531–534.

Wille S.M.R., Raes E., Lillsunde P., Gunnar T., Laloup M., Samyn N., Christophersen A.S., Moeller M.R., Hammer K.P., Verstraete A.G. 2009. Relationship between oral fluid and blood concentrations of drugs of abuse in drivers suspected of driving under the influence of drugs. *Ther Drug Monit.* 31:511–519.

Willner P., Bergman J., Vanderschuren L. 2020. The behavioural pharmacology of opioids. *Behav Pharmacol.* 31:109-111.

Wohlfarth A., Castaneto M.S., Zhu M., et al. 2015. Pentyindole/pentyindazole

Wohlfarth A., Scheidweiler K.B., Castaneto M., et al. 2015. Urinary prevalence, metabolite detection rates, temporal patterns and evaluation of suitable LC-MS/MS targets to document synthetic cannabinoid intake in US military urine specimens. *Clin. Chem. Lab. Med.* 53: 423e434.

Wong O.F., Tsui K.L., Lam T.S., Sze N.N., Wong S.C., Lau F.L., Liu S.H. 2010. Prevalence of drugged drivers among non-fatal driver casualties presenting to a trauma centre in Hong Kong. *Med. J.* 16:246–251.

World Health Organization (WHO). 2016. Drug use and road safety: a policy brief.

World Health Organization. 2014. WHO Global status report on alcohol and health.

Zawilska B. 2017. An expanding world of novel psychoactive substances: opioids. *Front. Psychiatry.* 8: 110.

Zawilska J.B., Andrzejczan D. 2015. Next generation of novel psychoactive substances on the horizon, a complex problem to face. *Drug Alcohol Depend.* 157:1-17.

