



L'uso del bagno ad ultrasuoni SONICA® per l'estrazione di particolato atmosferico da filtri in Teflon

L'estrattore ad ultrasuoni SONICA® viene da tempo utilizzato presso il Centro di ricerca Polaris, afferente al Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e del Territorio e di Scienze della Terra dell'Università Milano-Bicocca, per l'estrazione dai filtri di raccolta sia degli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) sia del particolato atmosferico (PM) (Fig. 1).



Fig. 1: bagno ad ultrasuoni SONICA per l'estrazione di particolato atmosferico

L'efficienza del processo di estrazione degli IPA da campioni di PM è stata analizzata e riportata in precedenza dai ricercatori del Centro (<http://www.soltec.it/d1/it/estrazione-idrocarburi-policiclici-aromatici-particolato-atmosferico-extractor>). Viene qui descritta la modalità d'uso di questo strumento per l'estrazione del PM, al fine di effettuare studi tossicologici su sistemi *in vitro*.

In questo caso la procedura di estrazione del PM, sebbene simile a quella di estrazione degli IPA, presenta differenze di fondamentale importanza, giustificate dal diverso utilizzo che si farà del materiale estratto. La differenza principale è rappresentata dalla necessità di lavorare in condizioni sterili, in quanto il PM estratto sarà utilizzato per il trattamento di cellule in coltura e l'eventuale presenza di batteri o funghi vitali contaminerebbe la coltura stessa. Per questa ragione gli strumenti e i contenitori utilizzati durante il processo di estrazione (pinzette, bisturi, vials...) vengono precedentemente sterilizzati con lavaggio in etanolo, e alcune fasi del processo avvengono sotto cappa sterile.

Innanzitutto, il PM viene campionato mediante sistema gravimetrico a basso volume su filtri in Teflon (diametro 47 mm), che vengono conservati ad una temperatura di -20 °C fino al momento dell'estrazione. Questo accorgimento evita la proliferazione dei batteri atmosferici presenti nel PM campionato, nonché la perdita per evaporazione dei composti più volatili.

I filtri raccolti vengono quindi sottoposti al processo di estrazione: i filtri vengono staccati dai relativi supporti in plastica utilizzando bisturi e pinzette precedentemente sterilizzati (Fig. 2), e quindi posti in un apposito contenitore di vetro ambrato (vial), anch'esso sterilizzato.

Nella vial vengono aggiunti 2 ml di acqua sterile e i filtri vengono spinti e trattenuti sul fondo della vial per mezzo di due astine metalliche, in modo da restare immersi nel mezzo di estrazione durante la sonicazione. La vial viene quindi inserita nell'apposito supporto di estrazione e posta nel bagno del sonicator per 20 minuti. In questo intervallo di tempo l'acqua del bagno di estrazione tende a scaldarsi: questa situazione è assolutamente da evitare in quanto causerebbe l'evaporazione, e quindi la perdita, dei composti più volatili. Per questo il bagno dell'estrattore viene riempito con acqua raffreddata alla temperatura di 4° C.

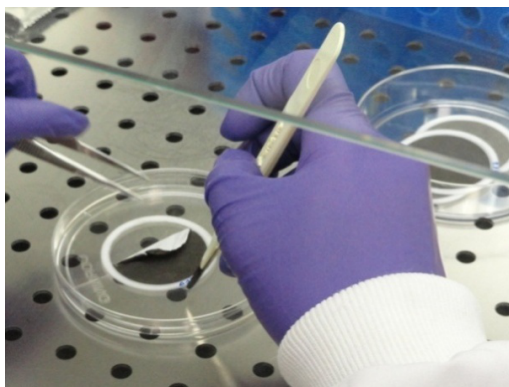


Fig. 2: Distacco dei filtri in Teflon dai supporti in plastica; per evitare contaminazioni si usano guanti, pinzette e bisturi sterili, e si lavora sotto cappa sterile a flusso laminare. I filtri appaiono neri per la presenza di PM.

Al termine di questa prima sonicazione, l'estratto viene rimosso dalla vial e conservato in un contenitore sterile fino al termine del processo di estrazione. Nella vial vengono quindi aggiunti altri 2 ml di acqua sterile e il ciclo di estrazione viene ripetuto. Per avere la massima efficienza di estrazione vengono effettuati 4 cicli di sonicazione da 20 minuti ciascuno, al termine dei quali si ottengono quindi 8 ml di estratto. Questa sospensione viene suddivisa in vials in plastica sterili precedentemente tarate, e portata a secco in un essiccatore a vuoto allestito con gel di silice (Fig. 3).

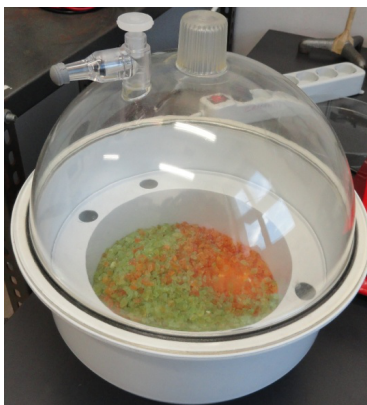


Fig. 3: Essiccatore a vuoto con gel di silice all'interno.

Il tempo di essiccazione è di circa tre giorni e durante questo periodo i campioni vengono tenuti al buio per evitare eventuali reazioni fitochimiche dei composti chimici presenti. Una volta terminato il processo di essiccazione, le vials vengono nuovamente pesate per quantizzare il PM estratto, che viene conservato a -20 °C fino al momento dell'uso. A questo punto viene risospeso ad una concentrazione di 2µg/ul ed utilizzato per l'esposizione delle cellule in coltura.

MILANO, 9 gennaio 2013

Il Presidente del Centro di Ricerca Polaris
MARINA CAMATINI