

Università degli Studi di Napoli “Federico II”
Polo delle Scienze e delle Tecnologie

Dipartimento di Ingegneria Idraulica ed
Ambientale Girolamo Ippolito



Dottorato di Ricerca in Ingegneria delle Reti Civili
e dei Sistemi Territoriali – XVIII Ciclo

“ LA CONTAMINAZIONE
INTENZIONALE DEI SISTEMI IDRICI ”

Relatore
Ch.mo prof.
Maurizio Giugni

Dottorando
Dott. Ing.
Gaetano Ivan Senese

INDICE GENERALE

INTRODUZIONE

1. Rischi ordinari e straordinari di contaminazione	IV
2. La contaminazione accidentale	VII
3. La contaminazione intenzionale	XIV

CAPITOLO 1

CONTAMINAZIONE INTENZIONALE

1. La contaminazione intenzionale	1
2. Identificazione dei contaminanti	14
3. Esperienze di laboratorio	101
3.1. Metodiche analitiche di identificazione e quantizzazione del contaminante Capsicina	173
3.2. Metodiche analitiche di identificazione e quantizzazione del contaminante Ricina	192
4. Procedura generale per l'individuazione di un contaminante e la valutazione della sua concentrazione	229

CAPITOLO 2
FENOMENI DI DIFFUSIONE E DISPERSIONE DI UN
CONTAMINANTE IN UN SISTEMA IDRICO A PRESSIONE

1. Vulnerabilità di un sistema acquedottistico	231
2. Il software EPANET	254
3. Esempio applicativo	264

CAPITOLO 3
CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

1. Considerazioni Conclusive	281
2. Ulteriori prospettive di ricerca	283
Bibliografia	i

INTRODUZIONE

1. Rischi ordinari e straordinari di contaminazione

La contaminazione di un sistema idrico può essere dovuta ad un avvenimento che non sia volontario e in questo caso si parlerà di **rischio ordinario**, oppure può essere dovuta ad un evento doloso e in tal caso si parlerà di **rischio straordinario**. In entrambi i casi il rischio può essere considerato proporzionale sia alla frequenza di accadimento dell'evento indesiderato (F) che alla magnitudo del danno cagionato (D): $R=F*D^k$ dove il coefficiente k ($k > 0$) tiene conto della percezione della società civile di un dato evento. La necessità di introdurre il coefficiente k nasce dal fatto che un evento negativo caratterizzato da una frequenza di accadimento altissima ma da un danno basso, si pensi ad esempio agli incidenti automobilistici, può avere un rischio uguale al crollo di una diga che ha una frequenza bassissima ma comporta un danno enorme; chiaramente il crollo di una diga sarebbe percepito dalla società civile come un rischio inaccettabile anche se di fatto uguale al rischio di morte in incidenti automobilistici e quindi è necessario introdurre il suddetto coefficiente k.

I rischi ordinari possono essere distinti in rischi di contaminazione della risorsa idrica e rischi di contaminazione lungo la rete di adduzione e distribuzione.

I rischi di contaminazione della risorsa idrica possono ad esempio essere dovuti a:

- Infiltrazioni da serbatoi contenenti sostanze inquinanti
- Utilizzo di pesticidi
- Perdite da impianti di trattamento dei reflui

- Sversamenti da attività industriali
- Reflui da allevamenti intensivi
- Sversamenti domestici accidentali

Gli esempi riportati e molti altri casi ancora possono comportare l'immissione di inquinanti nelle falde acquifere con conseguente contaminazione delle acque che vengono poi captate per il consumo umano.

I rischi di contaminazione della rete idrica di adduzione e distribuzione possono, ad esempio, essere dovuti alla:

- rottura di una condotta o semplicemente alla presenza di giunzioni in stato di obsolescenza, che può comportare ritorni in rete di acque esterne, ad esempio a causa di una temporanea riduzione locale della pressione;
- presenza di vecchie tubazioni deteriorate in cemento-amianto che comportano la possibilità di dispersione di fibre di amianto nell'acqua; allo stato delle conoscenze attuali non è certo l'effetto dell'ingestione di fibre di amianto ma pare che esse aumentino notevolmente la probabilità di formazione di polipi.

I rischi straordinari sono invece dovuti ad eventi dolosi che consistono essenzialmente nell'introduzione di una sostanza tossica in un punto della rete idrica; gli agenti tossici utilizzabili possono essere classificati in:

- Agenti chimici
- Agenti biologici
- Agenti radioattivi

I rischi straordinari (CBR Attack), caratterizzati da valori del coefficiente k molto elevati, possono dar luogo a fenomeni di vero e proprio panico nella collettività,

anche in conseguenza di atti dolosi caratterizzati da valori della frequenza di accadimento e del danno normalmente accettati per fenomeni diversi.

2. La contaminazione accidentale

La rottura di una condotta, come già accennato, può comportare un ritorno in rete di acque esterne a causa di una temporanea riduzione locale della pressione. Sebbene episodi di questo tipo abbiano bassa probabilità di accadimento in sistemi idrici gestiti correttamente, in quanto dipendono da più cause che dovrebbero contemporaneamente verificarsi, ciascuna delle quali relativa al malfunzionamento di uno o più componenti e/o alla mancanza di componenti strutturali, tuttavia l'insorgere del fenomeno può provocare danni non trascurabili alla salute umana. Tali episodi si possono classificare fra quelli a bassa frequenza e ad alto rischio.

Il fenomeno dei ritorni in rete ha origine secondo due modalità differenti:

- sifonaggio di sostanze inquinanti all'interno della rete;
- errata connessione della rete di distribuzione idropotabile con reti o serbatoi contenenti sostanze inquinanti o acque già usate o con apparecchi utilizzatori che determinano l'alterazione della qualità dell'acqua a causa di reflussi d'acqua già consegnata all'utenza.

In entrambe le modalità il fenomeno si rende possibile quando le sostanze che entrano in contatto con l'acqua potabile hanno pressione maggiore di quella di esercizio della rete.

Il sifonaggio di sostanze inquinanti all'interno della rete si rende possibile, quindi, quando queste sono presenti nell'ambiente circostante la condotta e si realizza

pressione pari a quella atmosferica o addirittura inferiore all'interno della rete. Ciò può verificarsi per cause di tipo accidentale o gestionale.

Le cause accidentali sono riconducibili alla rottura della condotta o alla perdita di tenuta di giunti o di organi di manovra e controllo.

Le cause gestionali, a loro volta, possono essere strutturali o occasionali: le cause strutturali sono riconducibili all'inadeguato dimensionamento della rete che si traduce in insufficienza di portata e/o pressione; le cause gestionali di tipo occasionale, che si traducono sempre in insufficienza di portata e/o pressione, sono invece riconducibili a carenza di risorsa, interruzione dell'alimentazione, consumi di punta (per presenze turistiche, fluttuanti o per incendi) superiori alle previsioni progettuali.

La errata connessione della rete di distribuzione idropotabile a reti o serbatoi contenenti sostanze inquinanti o acque non potabili può essere causata da allacciamento accidentale, mentre il collegamento ad apparecchi utilizzatori che determinano l'alterazione della qualità dell'acqua può essere causato da allacciamento accidentale o da connessione permanente ad apparecchi idroesigenti senza inserimento di valvola di protezione o con valvola malfunzionante.

Questa seconda modalità in cui si manifesta il fenomeno di ritorno in rete è maggiormente riscontrabile nelle aree industriali, in cui sussistono spesso le possibilità di connessione della rete idropotabile con impianti tecnologici (sia termici che utilizzanti sostanze inquinanti) con una seconda rete convogliante acqua di qualità non potabile e destinata agli usi tecnologici, con condotte di scarico di acque usate, con serbatoi non idonei dal punto di vista igienico-sanitario. Dalle suddette modalità di accadimento del fenomeno è possibile

rilevare come, dal punto di vista temporale, questo possa avere una manifestazione episodica oppure avere carattere di persistenza, specie se l'entità della contaminazione è modesta.

La stessa diffusione della contaminazione è legata alle modalità di accadimento e al punto della rete in cui si realizza il fenomeno, nonché al livello di protezione esistente nel sistema di distribuzione. Ovviamente si passa da un'estensione coincidente con l'intera rete, nel caso di inquinamento dall'alimentazione, alla contaminazione di una singola sottorete, a servizio, per esempio, di agglomerati industriali, alla contaminazione della rete di distribuzione privata all'interno degli edifici.

Sotto l'aspetto igienico-sanitario il problema dei ritorni, oltre ai disagi gestionali dovuti all'interruzione dell'erogazione idrica e agli interventi di disinquinamento e di disinfezione della rete, può comportare a volte, seri pericoli per la salute umana.

La normativa vigente nel campo della qualità delle acque destinate all'uso idropotabile (D.P.R. 31/2001) indica i valori massimi e i valori guida dei parametri organolettici, chimico-fisici e microbiologici, delle concentrazioni delle sostanze indesiderabili e tossiche. In tale normativa sono fissati anche i criteri per la tutela delle aree interessate da opere di captazione per l'approvvigionamento idrico, mentre per le reti di distribuzione sono fissati i criteri per il campionamento e il controllo della qualità delle acque distribuite. La necessità di riferirsi nei controlli a punti singolari della rete e di temporizzare i controlli con cadenze variabili in funzione della popolazione servita comporta, soprattutto per le reti di distribuzione dei piccoli centri che per motivi economico-gestionali

risultano spesso carenti di manutenzione, che i controlli vengano effettuati con cadenza mensile. E' evidente, quindi, come difficilmente un sistema di controllo base possa garantire con queste modalità, la sicurezza di poter individuare una contaminazione dell'acqua di rete. In realtà il controllo capillare è effettuato dagli stessi utenti, nella misura in cui la contaminazione produce un'alterazione delle caratteristiche organolettiche tanto da sconsigliarne l'uso o comunque da segnalare al gestore l'anomalia qualitativa.

Le cause gestionali di tipo strutturale si possono riscontrare in corrispondenza di allacci e collegamenti tra condotte di una stessa rete ovvero tra condotte di una rete di distribuzione collettiva e di impianti privati. Per impianto privato s'intende la rete di distribuzione interna di una utenza, anche collettiva, su cui sono installati gli apparecchi di utilizzazione per uso pubblico e per uso privato. Pertanto le utenze si differenziano solo per l'uso della risorsa, entità e funzione, e solo in piccola parte per le caratteristiche dell'impianto interno di distribuzione. E' possibile, quindi, riguardare i possibili schemi di collegamento dell'impianto interno alla rete collettiva indipendentemente dalla tipologia dell'utenza.

Seguendo la differenziazione delle modalità di avvenimento del fenomeno, i ritorni in rete per sifonaggio di sostanze inquinanti in un qualsiasi punto della distribuzione cittadina si rendono possibili in contemporanea presenza di insufficienti valori di pressione nelle condotte, di rottura di tubo o di giunti non a tenuta, e di presenza di sostanze inquinanti all'esterno del tubo. E' possibile, inoltre, che si verifichino ritorni in rete di acque già immesse in impianti di distribuzione privati per inversione del gradiente di pressione in assenza, o per cattivo funzionamento, delle valvole di ritegno, specie in presenza di autoclave.

Sempre per inversione del gradiente delle pressioni tra rete cittadina e rete privata si possono verificare ritorni di acqua già consegnata in occasione di interventi antincendio per attingimenti dalla rete cittadina non compatibili con le caratteristiche del sistema di distribuzione per finalità antincendio.

Infine, bisogna considerare che, con modalità di cross-connection, è possibile che si realizzino contaminazioni dovute alla presenza di acque non potabili provenienti da doppia rete.

Il fenomeno dei ritorni in rete negli impianti interni è strettamente legato alla tipologia dell'impianto, alle protezioni strutturali installate, al consumo e agli accorgimenti impiantistici condominiali e singoli predisposti per garantire il soddisfacimento dei fabbisogni in periodi di carenza di alimentazione.

Le fonti interne potenziali di inquinamento per ritorno in rete sono sostanzialmente costituite dagli elettrodomestici e dagli apparecchi per la produzione di acqua calda. L'entità del potenziale inquinamento va valutata in funzione dei consumi idropotabili domestici.

Per ciò che riguarda la protezione dai fenomeni di ritorno in rete, una corretta metodologia di controllo e contenimento non può prescindere, per le caratteristiche evidenziate, dall'integrazione di interventi strutturali e gestionali di natura ingegneristica con interventi sistematici e saltuari di natura igienico-sanitaria.

Gli interventi sistematici devono riguardare, oltre i previsti controlli di normativa, l'impiego di ulteriori protocolli di controllo incrociato igienico-sanitario e ingegneristico che, a fronte di anomalie qualitative, sebbene ancora nei livelli di accettabilità, attivino una maggiore sorveglianza tecnico-ingegneristica sul

funzionamento del sistema di distribuzione. In particolare, ad essi devono correlarsi gli adeguamenti delle metodologie di disinfezione ordinaria dell'acqua immessa nella rete, individuando oculatamente eventuali necessità di disinfezione mirate in particolari punti della rete, evitando il ricorso a sistematiche superdisinfezioni ai serbatoi di alimentazione.

Gli indicatori di anomalie possono essere individuati nella scomparsa del residuo del disinfettante, in modifiche dei parametri organolettici, in aumento della carica batterica e nella comparsa di indicatori fecali.

La gestione della rete di distribuzione deve, inoltre, prioritariamente considerare la necessità di assicurare una pressione minima nelle condotte, in modo da garantire un'adeguata quota di soggiacenza agli apparecchi utilizzatori, limitando la possibilità di contaminazione dell'acqua in pressione.

Gli interventi strutturali, in primo luogo, devono riguardare il sistema di distribuzione idropotabile che deve essere correttamente individuabile in ogni sua componente, in modo tale da escludere la già rara possibilità che si realizzino cross-connection accidentali.

Le singole condotte devono trovare opportuna disposizione relativamente alle altre canalizzazioni, evitando che possano verificarsi condizioni di ristagno di liquidi inquinanti a contatto con le tubazioni (come, ad esempio, liquami provenienti da fognature) nell'ambiente circostante.

Le reti di distribuzione con caratteristiche di omogeneità di utenza (e comunque quelle private) devono essere munite, a valle dei misuratori volumetrici, di apparecchiature automatiche atte ad impedire il ritorno dell'acqua già immessa

all'utenza in caso di condizioni anomale di pressione o dotate di vasche di disconnessione idraulica poste tra la rete esterna ed interna.

I singoli impianti di sollevamento e gli impianti tecnologici con utilizzazione idraulica devono essere anch'essi disconnessi idraulicamente dalla rete di distribuzione mediante opportuni disconnettori.

Ai vari livelli di distribuzione, quindi, i ritorni in rete possono essere controllati mediante:

- vasche di disconnessione;
- valvole automatiche: valvole di non ritorno, valvole rompi-vuoto, disconnettori a zona di pressione ridotta controllata o controllabile.

Le valvole di non ritorno (o di ritegno), in particolare, sono di norma utilizzate al fine di garantire gli organi meccanici delle pompe da reflussi, provenienti dalla condotta di mandata, dovuti ad interruzione del funzionamento della pompa stessa. La possibilità di impedire, con una meccanica molto semplice, l'inversione del flusso rende tale organo molto impiegato anche a garanzia di problemi di qualità [Frega et al., 1993].

3. La contaminazione intenzionale

La contaminazione intenzionale di una rete idrica consiste nell'immissione di un agente tossico in un punto della rete stessa e può avvenire mediante l'uso di agenti chimici, agenti biologici o agenti radioattivi. Si è ritenuto necessario, quindi, esaminare in dettaglio i possibili agenti, sia in merito alla facilità di reperimento che in merito all'efficacia dei diversi tossici in soluzione acquosa. Si è proceduto inoltre procederemo ad una disamina dei punti in cui potrebbe avvenire l'introduzione del contaminante lungo la rete, facendo riferimento sia alla facilità di accesso che ai quantitativi necessari per ottenere un effetto dannoso sulla popolazione. È stata, altresì, sviluppata un'attività sperimentale (metodiche analitiche di identificazione e quantizzazione dei contaminanti capsicina e ricina), allo scopo di definire una procedura generale per l'individuazione di un qualsiasi contaminante e la valutazione della sua concentrazione. Sono stati, infine, presi in esame i fenomeni di diffusione di un contaminante in un sistema idrico, al fine di procedere alla valutazione della vulnerabilità di un sistema idrico a contaminazioni indotte.

BIBLIOGRAFIA

A

Abrus precatorius

http://www.hear.org/starr/hiplants/images/600max/html/starr_031108_319_7_abrus_precatorius.htm

ARET (Association pour la recherche en toxicologie) “*Saxitoxina*”

<http://www.aret.asso.fr/artoxinmts4.htm>

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry)

“*Nerve Agents-FAQs*”, April **2000** AGENTS

<http://www.atsdr.cdc.gov/tfacts166.html>

B

Berlinck Roberto Gomes da Souza “*A História da Palitoxina*”

<http://www.s bq.org.br/PN-NET/causo2.htm>

Bingen A., Creppy E.E., Gut J.P., Dirheimer G., Kirn A. “*The kupffer cell is the first target on ricin-induced hepatitis*” J Submicrosc Cytol [19(2); 247-266] **1987**

Biosensor for monitoring water supplies for chemical warfare and other toxic agents, **2001**

<http://www.bgu.ac.il/html/dover/news/1007465773.shtml>

Blister Agent : Sulfur Mustard

<http://www.cbwinfo.com/Chemical/Blister/HD.shtml>

Camille A. **Boulet** “*Capillary electrophoresis in detection of chemicals related to the Chemical Weapons Conventions*” Encyclopedia of Analytical Chemistry [909-923], **2000**

Borenfreund E, Puerner J.A. “*Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption*” Toxicol. Lett. [24; 119-124] **1985**

Burrows W. Dickinson and Sara E. Renner ”*Biological Warfare Agents as Threats to Potable Water*” Environmental Health Perspectives [107, 12] **1998**

Byung Ho Woo, Jung Tae Lee, Kang Choon Lee “Purification of Sepharose-Unbinding Ricin from Castor Beans (*Ricinus Communis*) by Hydroxyapatite Chromatography” Protein Expression and Purification [13, 150-154], **1998**

C

Canadian Security Intelligence Service, “*Counter-Terrorism*” 24 novembre 2004 http://www.csis-scrs.gc.ca/eng/operat/ct_e.html

Carraro Elisabetta, Bonetta Silvia, Palumbo Franca, Grilli Giorgio “*Rischio microbiologico associato al consumo di acqua potabile nei paesi industrializzati*” Ann Ist Super Sanità [40 (1) 117-140] **2004**

CBRNE-Urticants, Phosgene Oxime
http://www.emedicine.com/emerg/byhame/cbrne--urticants-phosgene_oxime.htm

CDC “*Facts About Tabun*”, March **2003 (a)**
<http://www.bt.cdc.gov/agent/tabun/basics/pdf/tabun-facts.pdf>

CDC “Facts About Sarin”, March 2003 (b)

<http://www.bt.cdc.gov/agent/sarin/basics/pdf/sarin-facts.pdf>

CDC “Facts About Soman”, March 2003 (c)

<http://www.bt.cdc.gov/agent/soman/basics/pdf/soman-facts.pdf>

CDC “Facts About VX”, March 2003 (d)

<http://www.bt.cdc.gov/agent/vx/basics/pdf/vx-facts.pdf>

CDC “Facts About Sulfur Mustard” February 2003 (e)

<http://www.bt.cdc.gov/agent/sulfurmustard/basics/pdf/sulfur-mustard-facts.pdf>

CDC “Facts About Strychnine”, May 2003 (f)

<http://www.bt.cdc.gov/agent/strychnine/basics/pdf/facts.pdf>

CDC “Facts About Ricin”, March 2003 (g)

<http://www.bt.cdc.gov/agent/ricin/pdf/ricinfacts.pdf>

CDC “Facts About Abrin”, July 2003 (h)

<http://www.bt.cdc.gov/agent/abrin/basics/pdf/abrinfacts.pdf>

CDC “Facts About Lewisite”, March 2003 (i)

<http://www.bt.cdc.gov/agent/lewisite/basics/facts.asp>

CDC “Facts About Nitrogen Mustards”, June 2003 (l)

<http://www.bt.cdc.gov/agent/nitrogenmustard/basics/facts.asp>

CDC “Facts About Phosgene Oxime”, March 2003 (m)

<http://www.bt.cdc.gov/agent/phosgene-oxime/basics/facts.asp>

CDC “Facts About Tularemia”, February 2002

<http://www.bt.cdc.gov/agent/tularemia/pdf/tularemiafacts.pdf>

CDC “Brucellosis”(n)

http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/brucellosis_g.htm

CDC” Salmonellosis” (o)

http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/salmonellosis_g.htm

CDC “Cholera” (p)

http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/cholera_g.htm

CDC “Viral Hemorrhagic Fevers” (q)

<http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/spb/mnpages/dispages/vhf.htm>

C.E.A.M. Degenhardt-Langelaan, Ch.E. Kientz “*Capillary gas chromatographic analysis of nerve agents using large volume injections*”
Journal of Chromatography A [723, 210-214], **1996**

Cereijo Manuel “*RICIN: A DANGEROUS BIOWEAPON*”

<http://www.amigospais-guaracabuya.org/oagmc193.php>

Cevernini R., Sambri V., Pileri S., Ratti., La Placa M. “*Development of trasplantable ascite tumours which continuously produce polyclonal antiblodies in pristane primed BALB/c mice immunized with bacterial antigens and complete Freund’s adjuvant*” J. Immunol. Methods [140; 111-118] **1991**

Chemical Agents

http://www.in.gov/isdh/bioterrorism/manual/section_12.html

Chemical Data on Capsaicin

<http://www.geocities.com/NapaValley/3378/dynamicchemical.html>

Chemistry of GA (Tabun)

<http://www.mitrotek.org/home.nsf/homelandsecurity/Tabun>

Chemistry of GB (Sarin)

<http://www.mitrotek.org/home.nsf/homelandsecurity/Sarin>

Chemistry of GD (Soman)

<http://www.mitrotek.org/home.nsf/homelandsecurity/Soman>

Chemistry of VX <http://www.mitretek.org/home.nsf/homelandsecurity/VX>

Dr **Chudler** "NERVE AGENTS" **2001**

<http://faculty.washington.edu/chulder/weap.html>

Coleman Kevin, "*Protecting the water supply from terrorism*", **2005**

http://www.directionsmag.com/article.php?article_id=735&trv=1&PHPSESSID=41b1705fe6a4ce0bb16fd8b96fe0f53b

Connett Ellen "*Isofluorphate*". Extremely Hazardous Substance. **1987**
US EPA Chemical Profile.

<http://www.fluorideaction.org/pesticides/isofluorphate.epa.extr.haz.htm>

Corbett M.D., Wei C.I., Johnston J.J., Chang P.F. e Corbett B.R.
"*Mutagenicity of the C-nitroso analog of fenitrothion*" Toxicol. Letters,
1987

Corriere della Sera, "*Cresce il rischio di inquinamento delle falde*", 15
maggio **2003** http://www.unicam.it/unicam-info/rassegna_stampa/maggio03/15/corsera1.pdf

Craig H.L., Alderks O.H., Corwin A.H., Dieke S.H., Karel C.L.
"*Preparation of ricin toxin*" US Patent 3,060,165

Cryptosporidium

<http://www.nal.usda.gov/wqic/cornell.html>

Cryptosporidiosis

http://www.cdc.gov/ncidod/dpd/parasites/cryptosporidiosis/factsht_cryptosporidiosis.htm

D

Darby Shauna M, Miller Mark L., Allen Ralph O. "*Forensic determination of ricin and the alkaloid marker ricinine from castor bean extracts*" J Forensic Sci [46(5); 1033-1042] **2001**

D'Agostino P.A, J.R. Hancock, L.R. Provost "*Analysis of O-ethyl S-[2-(diisopropylamino)ethyl] methylphosphonothioate (VX) and its degradation products by packed capillary liquid chromatography-electrospray mass spectrometry*" Journal of Chromatography A [837, 93-105], **1999**

D'Agostino Paul A., Hancock James R., Provost Lionel R. "*Determination of sarin, soman and their hydrolysis products in soil by packed capillary liquid chromatography-electrospray mass spectrometry*" Journal of Chromatography A [912, 291-299], **2001**

Marco **Delaurenti**, "*Elettroforesi capillare (CE)*" **1999**
<http://www.vlsilab.polito.it/thesis/franco/node15.html>

Tim **De Young**, Adam Gravley "*Coordinating efforts to secure American public water supplies*" NR&E, Winter **2002**

David T. **Dennis**, Thomas V. Inglesby, Donald A. Henderson, John G. Bartlett, Michael S. Ascher, Edward Eitzen, Anne D. Fine, Arthur M. Friedlander, Jerome Hauer, Marcelle Layton, Scott R. Lillibridge, Joseph E. McDade, Michael T. Osterholm, Tara O'Toole, Gerald Parker, Trish M. Perl, Philip K. Russell, Kevin Tonat, "*Tularemia as a Biological Weapon*" Medical and Public Health Management **2001**.
<http://www.bt.cdc.gov/Agent/Tularemia/TularemiaConsensus.pdf>

Derenzini M., Bonetti E., Marionozzi V., Stirpe F. "*Toxic effects of ricin: studies on the pathogenesis of liver lesions*" Virchows Arch B Cell Payhol [20;15-28] **1976**

Detection of Chemical Weapons: A FOA Briefing Book on Chemical Weapons

<http://www.opcw.org/resp/html/detect.html>

DeWitt Dave “ *the nature of capsin*”

<http://www.nsac.ns.ca/envsci/staff/jhoyle/students/cw2/caps.html>

Dizionario di Biologia, Rizzoli, 1988

Drage B.E., Upton J.E, Purvis M. “*On-line Monitoring of Micropollutants in the River Trent (UK) with Respect to Drinking Water Abstraction*” Water Science and Technology, [38(11): 123-130], **1998**

Dreazen Y.J.: “*Backflow water-line attack feared*”, Wall Street Journal, **2001**

Drusiani Renato “Sicurezza delle fognature idriche e terrorismo” L'ACQUA, **2002**

E

Edwards Neil “*Saxitoxina*”

<http://www.bris.ac.uk/Depts/Chemistry/MOTM/stx/saxi1.html>

Eisner P.: “*Mexico reels from explosion*”, The Tech, Massachusetts Institute of Technology, **1992**

ENGRI 119 “*Radiation Units ; Radiation Chemistry*” November 4, **2002**

http://www.mse.cornell.edu/courses/engri119/Class_Notes/radiation.pdf

Engvall E., Perelmann P. “*Enzyme-lynked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin*” Immunochemistry [8; 871-874] **1971**

EPA “*Radionuclides in drinking Water*”

<http://www.epa.gov/safewater/standard/pp/radnucpp.html>

EPA “Water Security – Legislation and Directives” (b)

<http://cfpub.epa.gov/safewater/watersecurity/legislation.cfm>

EPA “Response Protocol Toolbox: Planning for and Responding to Contamination Threats to Drinking Water System” (c) Dicembre 2003

<http://www.epa.gov/safewater/security/publications.cfm>

EARLY WARNING MONITORING TO DETECT HAZARDOUS EVENTS IN WATER SUPPLIES. An ILSI Risk Science Institute Workshop Report. December **1999**. Thomas M. Brosnan, Editor

Ezell B.C, Farr J.V., Wiese I.: “*Infrastructure Risk Analysis of Municipal Water Distribution System*”, Journal of Infrastructure Systems, ASCE, Vol. 6, No. 3, September **2000**

F

“Factsheet - Understanding Radiation and Radioactivity”

http://www.awe.co.uk/main_site/scientific_and_technical/Factsheets/URR/

Stephen Fishman “Nerve Agent: GA (Tabun)” 2002 (a)

<http://www.cbwinfo.com/Chemical/Nerve/GA.shtml>

Stephen Fishman “Nerve Agent: GB (Sarin)” 2002 (b)

<http://www.cbwinfo.com/Chemical/Nerve/GB.shtml>

Stephen Fishman “Nerve Agent: GF (Cyclosarin)” 2002 (c)

<http://www.cbwinfo.com/Chemical/Nerve/GF.shtml>

Fleischfresser Martin “Armi Batteriologiche” 1991

<http://www.peacelink.it/tematiche/disarmo/documenti/batteriologiche/>

Fowler W. K., Smith J.E. “*Indirect determination of O-ethyl S-(2-diisopropylaminoethyl) methylphosphonotioate in the air at low concentrations*” *Journal Chromatography* 478 (1989) 51

Franz David R., Nancy K. Jaax “*Ricin toxin*” *Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare*
<http://www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/ricin/ricin.html>

Franz David R., DVM, PhD. “*Understanding the Threat*” *Defense Against Toxin Weapons: Chapter 1*
<http://www.vnh.org/DATW/chap1.html>

Giuseppe **Frega**, Mario Maiolo, Paolo Veltri “*Sui fenomeni di ritorno nelle rei idriche di distribuzione*” *Atti 14° corso di aggiornamento in Tecniche per la difesa dall'inquinamento*, Giugno **1993**

G

Garrett N.E., Stack, H.F., Waters M.D., “*Evaluation of the genetic activity profile of 65 pesticides*” *Mutation Res.* 168, 301-325, **1986**

GF

http://www.emergency-management.net/gf_agents.htm

Gilbert P.H., Isenberg J., Baecher G.B., Papay L.T., Spielvogel L.G., Badolato E.V.: “*Infrastructure Issues for Cities-Countering Terrorist Threat*”, *Journal of Infrastructure Systems*, ASCE, Vol. 9, No. 1, March **2003**

Ginsberg M.D., Hock V.F. “*Secure water supply*” *US Army Engineer Research and development Center*, Champaign, IL, **2004**

Grayman, W.M.; Deininger, R.A.; & Males, R. "*American Water Works Association Research Foundation Progress Report 2*", Project 2527, Appendix A. AWWARF, Washington, D.C. July **1999**

Jeffrey H. **Grotte**, Lynn I. Yang "*Report of the Workshop on Chemical Agent Toxicity for Acute Effects*" Institute for Defence Analyses, **1998**
[http://chppm-
www.apgea.army.mil/chemicalagent/caw/IDAreport\(2001\).pdf](http://chppm-www.apgea.army.mil/chemicalagent/caw/IDAreport(2001).pdf)

Guilbault G.G., Kramer D.N. Anal. Chem. **1966**, 38-834

Gullick, R.W. "*Early Warning and Source Water Protection Survey of Surface Water Treatment Plants in the American Water System (Preliminary Results, May 16, 1999)*" (5 pp.). American Water Service Company, Voorhees, New Jersey **1999**

Xuemei **Guo**, Somenath Mitra "*On-line membrane extraction liquid chromatography for monitoring semi-volatile organics in aqueous matrices*" Journal of Chromatography A, 904 (**2000**) 189–196

H

Haimes, Y.Y.; Matalas, N.C.; Lambert, J.H.; Jackson, B.A.; & J.F.R. Fellows "*Reducing Vulnerability of Water Supply Systems to Attack*" Journal of Infrastructure Systems, December **1998**

Hall Eric J "*Radiation and Life*".
<http://www.uic.com.au/ral.htm>

Harrison Karl "*MOLECULES OF THE MONTH*"
<http://www.chem.ox.ac.uk/mom/>

Jafrul **Hasan**, Stanley States, Rolf Deininger "*Safeguarding the security of public water supplies using Early Warning Systems: a brief review*",

Journal of contemporary water research and education, [129; 27-33]
Ottobre **2004**

Holland Rebecca “*Mustard gas*”

<http://www.bris.ac.uk/Depts/Chemistry/MOTM/mustard/mustard1.htm>

K

R.W..**Kluiber** <http://genchem.rutgers.edu/spot.html> **1998**

Kumar O., Sugendran K., Vijayaraghavan R. “*Oxidative stress associated hepatic and renal toxicity induced by ricin in mice*” *Toxicon* [41, 333-338], **2003**

L

LABOR SPIEZ “*Fact Sheet RICIN*”

http://www.toxi.ch/ger/pdf/1042799012_21128_1.pdf

Lambotte-Vandepaer M., Duverger-Van Bogaert M. e Rollmann B.
“*Metabolism and mutagenicity of acrylonitrile. An in vivo study*” *Environ. Mutagen.*, 1985

Lee B.H., Deininger R.A. “*Optimal Location of Monitoring Station in Water Distribution System*” *Journal of Environmental Engineering* [118(1):4-16] **1992**

LEWISITE Material Safety Data Sheet: Lewisite (Blister Agent)

http://www.totse.com/en/bad_ideas/guns_and_weapons/msdslews.html

Regione **Lombardia**

<http://www.arpalombardia.it/new/live/download/pubblicazioni/1cd/parte5/cap6.pdf>

Lory E., Cannon S. *“Potable water CBR contamination and countermeasures”* Naval Facilities Engineering Service Center

M

Macromolecole-ricin

http://www.bmcd.nist.gov:8080/cgi-bin/query/bmcd/schema/molecule?MO_ID=M0E8

Philip J. **Mackinnon**, Malcolm R. Alderton *“An investigation of the degradation of the plant toxin, ricin, by sodium hypochlorite”* *Toxicon* [38; 287-291] **2000**

Marks *“Talking about a BioSensor with Dr. Robert Marks at Ben Gurion University”* <http://www.ishitech.co.il/0102ar3.html>

Ministero della salute pubblica *“Relazione illustrativa del Piano Sanitario Nazionale 2003/2005”* **2003**

http://www.ministerosalute.it/resources/static/psn/documenti/relazione_illustrativa.pdf

Moe, C.L. *“Overview of Microbial Epidemiologic Early Warning Monitoring Approaches”* Presentation at the Workshop on Early Warning Monitoring to Detect Hazardous Events in Water Supplies, Reston, Virginia. May, **1999**

Moore Richard E., Structure of Palytoxin, *J. Am. Chem. Soc.* 1981, 103, 2491-2494, **1980**

Dr Thierry **Moreau** “*DFP*” **2001**

<http://delphi.phys.univ-tours.fr/Prolysis/dfp.html>

“**Mustard gas**” International Agency for Research on Cancer (IARC) -
Summaries & Evaluations

<http://www.inchem.org/documents/iarc/suppl7/mustardgas.html>

“**MUSTARD GAS CHEMICAL AND PHYSICAL INFORMATION**”

<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp49-c4.pdf>

N

Upvan **Narang**, G. P. Anderson, Frances S. Ligler, James Burans “*Fiber-optic based biosensor for ricin*” *Biosensors & Bioelectronics* [12(9-10); 937-945] **1997**

NIOSH EMERGENCY RESPONSE CARD “Abrin” 2003 (a)

<http://www.bt.cdc.gov/agent/abrin/erc1393-62-0pr.asp>

NIOSH EMERGENCY RESPONSE CARD “Ricin” 2003 (b)

<http://www.bt.cdc.gov/agent/ricin/erc9009-86-3.asp>

Nishio Akira, Uyeki Edwin M. “*Induction of Sister Chromatid Exchanges in chinese hamster ovary cells by Organophosphate insecticides and their oxygen analogs*” *Journal of Toxicology and Environmental Health* [8, 939-946], **1981**

O

Olsnes S, Kozlov J.V. “*Ricin*” *Toxicon* [39; 1723-1728] **2001**

OSHA “*Chemical Sampling Information: Capsaicin*”

http://www.osha.gov/dts/chemicalsampling/data/CH_224850.html

P

“**Palitoxina**” materiale didattico del corso di CHIMICA ANALITICA II della Facoltà di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali di Torino
<http://www.personalweb.unito.it/claudio.medana/cac2a/palitoxina.html>

Palytoxin: essential data Fact sheets on Chemical and Biological Warfare Agents September 2002

<http://www.cbwinfo.com/Biological/Toxins/Palytoxin.html>

Patocka Jiri “*Abrin and Ricin- Two Dangerous Poisonous Proteins*”, **2003 (a)**

<http://www.asanltr.com/newsletter/01-4/articles/Abrin&RicinRev.html>

Patocka Jiri, Ladislav Streda “*Plant toxic proteins and their significance for warfare and medicine*” Journal of Applied Biomedicine, **2003 (b)**

R

Ricin: essential data Fact sheets on Chemical and Biological Warfare Agents September 2002

<http://www.cbwinfo.com/Biological/Toxins/ricin.html>

“**Ricina**” materiale didattico del corso di CHIMICA ANALITICA II della Facoltà di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali di Torino
<http://www.personalweb.unito.it/claudio.medana/cac2a/ricina.html>

RICIN TOXIN

<http://www.tricareregion10.org/readiness/Smart%20Card%20Ricin.pdf>

S

Santoiani Francesco “*L’ultima epidemia: le armi batteriologiche. Dalla peste all’AIDS*” Edizioni Cultura della Pace **1991**

Saxitoxin: essential data Fact sheets on Chemical and Biological Warfare Agents September 2002

<http://www.cbwinfo.com/Biological/Toxins/Saxitoxin.html>

“**Saxitoxina**” materiale didattico del corso di CHIMICA ANALITICA II della Facoltà di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali di Torino
<http://www.personalweb.unito.it/claudio.medana/cac2a/saxitoxina.html>

van der **Schalie** W.H., Shedd T.R. Knechtges P.L., Widder M.W. “*Using higher organisms in biological early warning systems for real-time toxicity detection*” Biosensors and Bioelectronics [16: 457-465] **2001**

Seventh edition “NUCLEAR ELECTRICITY”, **2003**

<http://www.uic.com.au/neAp1.html>

Sipponen Kaija B. “*Detector for organophosphorus compounds in liquid chromatography based on the cholinesterase inhibition reaction*” Journal of Chromatography [389, 87-94], **1987**

D.A. **Skoog**, D.M. West, F.G. Holler “*Fundamental of Analytical Chemistry*” VII Edizione Saunders College Publishing, **2002**

Smith Daniel C., Marsden Catherine J., Lord J. Michael, Roberts Lynne M. “*Expression, purification and characterization of ricin vectors used for*

exogenous antigen delivery into the MHC Class I presentation pathway
Biological Procedures Online February [5, 13-19], **2003**

Steinberg C.E.W., Lorenz R., Spienser H. "*Effects of Atrazine on Swimming Behavior of Zebrafish, Brachydanio Rerio*" Water Research, [29(3): 981-985] **1995**.

Stewart, M. "*Evaluation of Vulnerability to Chemical and Microbial Threats*" Presentation at the Workshop on Early Warning Monitoring to Detect Hazardous Events in Water Supplies, Reston, Virginia. May, **1999**

Stricnina, General Description

http://www.osha.gov/dts/chemicalsampling/data/CH_268100.html

T

Tod Jeni, Nikki Catt "*Red "why are they so hot?" Chilli Peppers*"

<http://www.chem.ox.ac.uk/mom/capsaicin/capsaicin.html>

U

U.S. Army (1990), SIPRI (1973), Karakchiev (1973), OSRD (1946), AD Little (1986) "*Chemical and Physical Properties of Tabun*" **(a)**

<http://www.rand.org/publications/MR/MR1018.5/MR1018.5.appb.html>

U.S. Army (1990); SIPRI (1973); Karakchiev (1973); OSRD (1946); AD Little (1986), Ch. 5. "*Chemical and Physical Properties of Sarin*" **(b)**

<http://www.rand.org/publications/MR/MR1018.5/MR1018.5.appb.html>

U.S. Army (1990); SIPRI (1973); Karakchiev (1973); AD Little (1986), Ch. 5 "*Chemical and Physical Properties of Soman*" **(c)**

<http://www.rand.org/publications/MR/MR1018.5/MR1018.5.appb.html>

U.S. Army (1990); SIPRI (1971); Karakchiev (1973); AD Little (1986), Ch. 5 "Chemical and Physical Properties of VX" **(d)**

<http://www.rand.org/publications/MR/MR1018.5/MR1018.5.appb.html>

U.S. Army (1990), Marrs et al. (1996). "Chemical and Physical Properties of Cyclosarin" **(e)**

<http://www.rand.org/publications/MR/MR1018.5/MR1018.5.appb.html>

U.S. Army Center for Health Promotion and Preventive Medicine "Detailed Facts About Blister Agent Phosgene Oxime" **(x)**

<http://chppm-www.apgea.army.mil/dts/docs/detcx.pdf>

U.S. Army Center for Health Promotion and Preventive Medicine "Detailed Facts About Blister Agent Nitrogen Mustard" **(y)**

http://www.certip.org/resources/pdf/blister_agent_HN-3.pdf

U.S. Army Center for Health Promotion and Preventive Medicine "Detailed Facts About Blister Agent Lewisite" **(z)**

http://www.certip.org/resources/pdf/blister_agent_L.pdf

V

Verderame Consuelo "Le Armi Biologiche, Definizione e Sviluppo" Periodico mensile dell'Archivio Disarmo, novembre-dicembre **2001**

Verweij A., A. van Liempt-van Houten, Boter H.L. "Int." Journal of Environmental Analytical Chemistry 21 (1985) 63

Vicedo J.L., Pellin M., Vilanova E. "Phthalates and organophosphorus compounds as cholinesterase inhibitors in fractions of industrial texane impurities" Arch. Toxicol. 47 (1985) 46

VN (Synthetic Capsaicin)

<http://www.zarc.com/english/news/vn.html>

Vogel Arthur I., D. Sc. (Lond.), D.I.C., F.R.I.C. "*Practical Organic Chemistry*" Longmans

Vowinkel, E. "*Use of a Numerical Rating Model to Determine the Vulnerability of Community Water Supply Wells in New Jersey to Contamination by Pesticides*". In: Proceedings of the 1998 NWQMC National Monitoring Conference **1998** <http://nwqmc.site.net>

W

Wilson Barry W., Kawakami Thomas G., Cone Norman, Henderson Jhon D., Rosenblatt Leon S., Goldman Marvin, Dacre Jack C. "*Genotoxicity of the phosphoramidate agent tabun (GA)*" *Toxicology* [86, 1-12], **1994**

Wils E.R.J., Hulst A.G. "*Determination of O-ethyl S-2-diisopropylaminoethyl methylphosphonothioate (VX) by thermospray liquid chromatography-mass spectrometry*" *Journal of Chromatography* [523, 151-161], **1990**

Chris **Winder** "*Toxicity of ricin*" *Journal of Toxicology – Clinical Toxicology* [42(2); 201-208] **2004**

CAPITOLO 1 CONTAMINAZIONE INTENZIONALE

1. La contaminazione intenzionale

In una fase storica caratterizzata da forti tensioni internazionali e dal ricorso sistematico ad attentati terroristici come strumento di lotta armata, il rischio di atti di contaminazione intenzionale è decisamente reale. La contaminazione intenzionale dei sistemi acquedottistici ovviamente avrebbe un notevole impatto mediatico per il loro fondamentale ruolo a servizio sia dei cittadini che dei processi industriali e produttivi. L'uomo è spesso ricorso alla distruzione o alla contaminazione delle risorse idriche dei propri nemici nel corso della storia. In epoche recenti si è pensato che il livello di civiltà raggiunto fosse tale da poter escludere tali tipologie di aggressione e sono stati redatti atti quali il Protocollo di Ginevra del 1925 o la Convenzione sulle armi biologiche e tossiche del 1972 o ancora la Convenzione sulle armi chimiche del 1993. Ma la realtà è che il concetto stesso di guerra non ha nulla a che fare con la civiltà e che, inoltre, quando un popolo in guerra è consapevole di non poter affrontare il nemico in campo aperto, si sente in diritto di ricorrere a qualsiasi mezzo pur di difendersi. I Governi di tutti i Paesi occidentali stanno prendendo tutte le misure precauzionali possibili in previsione di attentati terroristici. Già dall'ottobre del 2001 l'EPA (Environmental Protection Agency, l'agenzia di protezione ambientale americana) ha cominciato a lavorare in sinergia con le altre agenzie governative e i gestori di acquedotti per assicurare una maggiore protezione delle risorse idriche da potenziali attacchi terroristici [Coleman, 2005]. Alcuni dei protocolli più importanti e articolati in tal senso sono stati approvati dal governo statunitense nel 2002: si può fare

riferimento in particolare alle Direttive Presidenziali per la Sicurezza Nazionale (HSPDs - Homeland Security Presidential Directives) e alla legge speciale per il bioterrorismo (Public Health Security and Bioterrorism Preparedness and Response Act o semplicemente Bioterrorism Protection Act).

Questi decreti assegnano all'EPA compiti relativi a:

- valutazione delle vulnerabilità dei sistemi idrici;
- sviluppo di strategie di prevenzione e risposta in caso di emergenze e incidenti;
- promozione di rapporti tra gli enti interessati;
- sviluppo ed applicazione dei progressi nel campo della sicurezza dei sistemi idrici.

Tali leggi indicano esplicitamente la necessità di “sviluppare strategie di gestione del rischio al fine di proteggere e mitigare gli effetti di potenziali attacchi a risorse idriche” e di “individuare e stimare le vulnerabilità” attraverso uno specifico Piano Nazionale di Protezione delle Infrastrutture sviluppato dalla Divisione di Sicurezza Idrica. Queste recenti direttive sono andate ad aggiungersi alla già significativa legislazione statunitense del settore, come il Safe Drinking Water Act (1976, aggiornata nel 1996) e il Clean Water Act (1974, aggiornata nel 2002), fino a quel momento il riferimento per gli scopi di salvaguardia dell'integrità delle risorse idriche nazionali [EPA (b)]. Un'altra importante azione dell'EPA finalizzata alla salvaguardia delle risorse idriche da parte dei governi a maggior rischio di attacchi terroristici, è la pubblicazione nel dicembre del 2003 della vasta relazione informativa che ha il nome di Response Protocol Toolbox (RPTB), in cui, attraverso i sei moduli che la costituiscono, si affrontano le problematiche

riguardanti la gestione del rischio di contaminazione nella fase di prevenzione e le possibili azioni e risposte da operare durante e dopo un accadimento del genere [EPA (c), 2003]. Nello stesso periodo, inoltre, il governo canadese ha approvato una delle leggi più severe nella lotta al terrorismo, la cosiddetta Legge C-36 [Canadian Security Intelligence Service, 2004].

In Europa, nel documento denominato Chemical, Biological and Radiological Terrorism del giugno 2004 [Documento A/1858 redatto per conto del Comitato della Difesa Europea], la Interparliamentary European Security and Defence Assembly ha affrontato il problema del rischio di contaminazione CBR, a partire dai presupposti nati dopo l'11 settembre. Dopo aver messo in luce i casi più importanti accaduti negli ultimi anni, dall'attentato alla metropolitana di Tokyo nel 1995 con gas nervino fino all'emergenza antrace del 2002, l'Assemblea ha evidenziato come il potenziale utilizzo di tali contaminanti rappresenti un reale problema di sicurezza che non può essere minimizzato. Citando un passo del rapporto si legge: *“Il rischio è massimo nel caso in cui gli agenti CBR possano essere ottenuti o prodotti industrialmente e siano disponibili sul mercato. La contaminazione della catena alimentare o dell'acqua potabile è un ovvio pericolo [...]. Queste minacce e questi rischi sono molto probabili e non devono essere minimizzati [...]. Devono perciò essere predisposte strategie appropriate per la protezione e per fare i necessari passi al fine di affrontare tali eventualità.”*

Il rapporto ricorda inoltre come già nel dicembre del 2001 la Commissione Europea avesse pubblicato il Programme of Cooperation Preparedness and Response to Biological and Chemic Agent Attacks, redatto dal Comitato di Sicurezza della Salute (Health Security Committee) - istituito nell'ottobre 2001 e

costituito dai maggiori rappresentanti dei Ministeri della Salute Pubblica dei paesi della Comunità Europea - che rappresenta il principale strumento di collaborazione per la risposta ad eventuali attacchi biologici o chimici, i cui punti principali ponevano l'accento proprio sulla necessità di “organizzare un meccanismo di scambio informativo, consultivo e coordinativo al fine di gestire le problematiche riguardanti attacchi in cui agenti biologici e chimici siano stati o possano essere usati”. Inoltre il programma prevedeva di aumentare significativamente la capacità europea nella “rilevazione ed identificazione di agenti biologici e chimici [...] per una rapida ed attendibile determinazione e diagnosi di casi rilevanti”. In effetti proprio su questo punto il programma auspicava l'elaborazione di una “lista aggiornabile degli agenti biologici e chimici che possano essere utilizzati in attacchi o in minacce di attacchi” e di metodi di identificazione dei contaminanti. Tale lista è stata redatta dall'EMEA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) e ciascun contaminante è stato classificato in base alla facilità di diffusione, tossicità, infettività, persistenza e disponibilità di vaccini e profilassi.

Un altro documento fondamentale per comprendere fino in fondo lo sforzo che le nazioni europee stanno sostenendo nella prevenzione e nella gestione del rischio collegato alla contaminazione di agenti CBR, viene da uno studio redatto nel luglio del 2004 dall' Institute for Security Studies, un'agenzia autonoma dell'Unione Europea. Tale rapporto, lo Chaillot Paper n° 69, si presenta come una vasta e completa monografia dal titolo “Protecting the European Homeland – The CBR dimension” e affronta le problematiche connesse a tale argomento, in primis a scala continentale e in secundis analizzando l'organizzazione delle singole

nazioni. Le conclusioni a cui giunge sono molteplici. In esso si afferma che *“sebbene la probabilità di un attacco chimico, biologico e radiologico nel continente europeo siano basse, le sue ramificazioni potrebbero essere alte. I recenti arresti in nazioni quali il Regno Unito e Francia suggeriscono che le probabilità di una minaccia di questo tipo aumentano nel tempo. [...] In un'Europa priva di confini, le misure devono essere disponibili a livello comunitario per assicurare un coordinamento e una risposta adeguati nel caso di un attacco di tipo CBR effettuato su larga scala”*. Si evidenzia poi come i punti più importanti del Programma del 2001 siano stati ampliati grazie al Programma per l'ampliamento della cooperazione nell'Unione Europea per la prevenzione e la limitazione delle conseguenze delle minacce di terrorismo chimico, biologico, radiologico e nucleare del dicembre del 2002.

Il rapporto esplica i suoi scopi attraverso alcuni capitoli fondamentali:

1. Rafforzare l'analisi e la gestione del rischio del terrorismo CBRN e la loro linea di propagazione;
2. Ridurre la vulnerabilità della popolazione, dell'ambiente, della catena alimentare e delle proprietà rispetto ad attacchi di tipo CBRN attraverso misure preventive;
3. Assicurare una rapida rilevazione ed identificazione di un eventuale attacco e la diffusione d'informazione (monitoraggio, allarme e comunicazione);
4. Rafforzare la base di ricerca scientifica del programma;
5. Rafforzare la cooperazione tra gli stati e con le organizzazioni internazionali;
6. Assicurare la completa ed efficiente implementazione del programma e dei suoi strumenti.

Il rapporto continua analizzando i pregi ed i limiti nella situazione europea e conclude riportando una serie di suggerimenti che auspica vengano considerati ed applicati quanto prima. Tra i più importanti ci sembra opportuno segnalare:

- Stabilire un coordinatore per la sicurezza territoriale a livello comunitario;
- Formulare una strategia comune di sicurezza comunitaria, anche in assenza del ruolo di coordinatore suddetto;
- Aumentare le possibilità di formazione di personale preparato a livello comunitario;
- Stabilire una banca dati centralizzata per informazioni riguardanti i CBR;
- Approntare una riserva di vaccini comune;
- Rivedere la quantità di fondi destinati alla prevenzione.

Su quest'ultimo punto ci sembra utile soffermarci per andare a evidenziare le differenze in ambito europeo per ciò che riguarda la quantità di denaro pubblico assicurata alle forze di difesa a livello nazionale. C'è da osservare un costante incremento, da parte di tutti i governi delle nazioni più esposte, delle risorse finanziarie destinate alla prevenzione di attacchi e alla protezione delle infrastrutture. Possiamo notare come l'Italia figuri al terzo posto tra i 15 maggiori paesi dell'Unione Europea per somma totale elargita ai settori di sicurezza, alle spalle della Germania e Regno Unito, mentre per quanto riguarda la percentuale sul Pil essa è quarta con l'1,9% dietro al Regno Unito, alla Spagna (2,1 %) e al Portogallo (2,0%) [tabella 1.1.1].

<i>Nazione</i>	<i>Percentuale sul PIL</i>	<i>Totale fondi stanziati [milioni di €]</i>
Regno Unito	2,1	34.140
Germania	1,6	34.020
Italia	1,9	24.345
Francia	1,0	14.277
Spagna	2,1	13.980
Olanda	1,7	7.382
Belgio	1,6	4.109
Svezia	1,4	3.757
Austria	1,4	3.094
Portogallo	2,0	3.094
Finlandia	1,4	1.968
Irlanda	1,5	1.881
Danimarca	1,0	1.830
Grecia	1,1	1.515
Lussemburgo	1,1	252

Tab. 1.1.1 *Spesa pubblica per l'ordine pubblico e sicurezza dell'Europa dei 15 per il 2002. Fonte: Eurostat (15 giugno 2004)*

Per l'Italia il giudizio è positivo per ciò che riguarda l'adeguatezza organizzativa e strutturale delle misure presenti per prevenire ed affrontare un eventuale attacco

CBR. Si fa notare, infatti, la presenza di un piano nazionale di emergenza previsto per questo tipo di minaccia. Esso descrive in dettaglio i tipi di contaminanti che possono essere utilizzati e il loro impatto potenziale. Contiene, inoltre, alcune informazioni non pubbliche sulle misure da prendere a livello locale, comprese quelle di tipo operativo ed organizzativo. L'ISS (Istituto Superiore di Sanità) e l'ISPELS (Istituto Superiore per la Prevenzione e Sicurezza del Lavoro) sono gli enti individuati come i centri di supporto ed informazione nel caso di un attacco di tipo CBRN. In questo piano, espresso come parte fondamentale del Piano Sanitario Nazionale 2002-2005, sono definiti gli obiettivi strategici fondamentali da adottare per fronteggiare in misura preventiva una minaccia di questo genere:

- programmare le misure preventive;
- definire le misure di sorveglianza, ovvero attivare preventivamente le funzioni specifiche e modellarle rispetto alla minaccia;
- pianificare le misure di soccorso e trattamento, al fine di ripristinare le condizioni di salute dei soggetti eventualmente colpiti, bonificare gli ambienti colpiti e/o i materiali contaminati nonché contenere e/o inattivare il rischio residuo;
- diffondere la cultura dell'emergenza e migliorare la capacità degli operatori a risposte pronte ed adeguate;
- incrementare la capacità informativa a favore della popolazione (anche attraverso l'accesso al numero telefonico verde), al fine di accrescere la fiducia del cittadino e la conoscenza dei comportamenti più opportuni da adottare.

Conseguentemente, le principali azioni da realizzare sono:

- predisporre piani operativi regionali, articolati in ciascuna Azienda Sanitaria, che individuino le funzioni da esperire, ne specifichino le modalità di svolgimento ed identifichino i diversi livelli di responsabilità;
- approntare adeguate attrezzature, risorse e protocolli per affrontare i diversi scenari di emergenza;
- adottare procedure operative standard per la risposta a falsi allarmi;
- intensificare l'aggiornamento e la formazione di operatori sanitari [Ministero della Salute Pubblica, 2003].

Infine, è da sottolineare come il Dipartimento dei Vigili del Fuoco, del Soccorso Pubblico e della Sicurezza Civile abbiano adottato un costante programma di addestramento in materia CBRN, mentre già dal 1999 sia stata fondata la Scuola Interforze per la Difesa Nucleare, Biologica e Chimica al fine di addestrare personale militare e civile. In Campania una prima esercitazione interforze è stata effettuata recentemente presso la Reggia di Caserta con ottimi risultati.

Le riserve idriche e il sistema integrato di distribuzione rappresentano potenziali obiettivi per l'attività terroristica; anche una semplice sospensione del servizio idrico può colpire in maniera significativa una comunità e la contaminazione intenzionale di un sistema acquedottistico come parte di un attacco terroristico comporterebbe soprattutto fenomeni di panico oltre a conseguenze dal punto di vista della salute e della sicurezza pubblica ed economico. La formula "*dilution is the solution*" che veniva espressa con sicura soddisfazione prima dei tragici ed eccezionali eventi degli ultimi anni è però oggi costantemente messa in dubbio. Il Centro di Ricerca e Sviluppo Ingegneristico dell'esercito americano ha

evidenziato alcuni dei fattori da tenere in conto nella valutazione della probabilità di attacco: il basso costo di un'operazione del genere, la necessità di conoscenza di tecniche poco complicate e la sostanziale complessità e difficoltà nelle eventuali contromisure da adottare. Nella relazione *Secure Water Supply* [Ginsberg et al., 2004] si segue un ragionamento di tipo strategico nei confronti dei terroristi, giudicando come principale scopo non il mero risultato quantitativo, ma individuando come reale obiettivo la propaganda attraverso il ruolo dei media. Per questo motivo si giudica meno probabile un attacco isolato ad un sistema di distribuzione idrico, mentre si delineano due scenari attendibili:

1. Un attentato condotto come fase sinergica di un attacco di maggiori dimensioni. La sospensione del servizio idrico potrebbe essere effettuata come prologo di una serie di incendi dolosi, in modo tale da ostacolare gli interventi e causare così una maggior quantità di danni. Si ritiene possibile l'uso di contaminanti in questo scenario per costringere le autorità ad interrompere l'erogazione di acqua.
2. Il secondo scenario prescinde dalle valutazioni mediatiche e valuta un attacco mirato all'interruzione della distribuzione idrica (attraverso contaminanti o danneggiando parti strutturali del sistema) come mezzo per limitare le risorse difensive nei confronti di un attentato. Potenziali obiettivi sono le strutture militari di comando e controllo, le strutture logistiche e quelle governative e giudiziarie. Infine, si giudicano possibili anche obiettivi strategici connessi a stati esteri come ambasciate e società commerciali di particolare importanza.

Secondo altri ricercatori del Centro di Ricerca e Sviluppo Ingegneristico dell'esercito americano (ERDC) [Lory e al.] le conseguenze di un attacco

terroristico di tipo CBR sono da giudicare pericolose anche perché, sebbene esse si stima abbiano una durata limitata pari a poche ore, la decontaminazione di un sistema idrico può impiegare fino a diversi giorni per contaminanti di tipo CB o anche mesi o anni nel caso di agenti radioattivi, comportando l'inutilizzabilità dell'infrastruttura per tutto questo intervallo di tempo. Le diverse categorie di potenziali contaminanti CBR di cui un'organizzazione terroristica può disporre sono riportate nella tabella 1.1.2.

Agente CBR	Gravità della minaccia
<i>Chimico</i>	
Agenti militari	Significativa
Sostanze chimiche tossiche utilizzate in industrie e agricoltura (60000 stimate)	Grande variabilità
<i>Biologico</i>	
Batteri	Grande variabilità (alcuni di entità molto seria)
Virus	Significativa
Protozoi	Inferiore
Biotossine	Massima
<i>Radioattivo</i>	
Armi radioattive "bombe sporche"	Molto seria

Tab. 1.1.2 *Categorie agenti contaminanti CBR e relativa gravità della minaccia*

I fattori che possono ridurre l'efficacia di una contaminazione CBR, sono:

- ⊗ la diluizione;
- ⊗ la possibile interazione con cloro, clorammine, ozono e in genere con i disinfettanti comunemente utilizzati;
- ⊗ la detossificazione che può avvenire per cause come idrolisi, azione della luce;
- ⊗ la possibile degradazione dell'agente da parte di microbi presenti nell'acqua;
- ⊗ la poca quantità di acqua (stimabile nella quantità massima di 3L/giorno) che viene effettivamente utilizzata a fini alimentari e potabili;
- ⊗ le turbolenze ed in genere il complesso regime idraulico presenti all'interno delle condotte di distribuzione;
- ⊗ la presenza di misure di sicurezza interna ed esterna al sistema di distribuzione per prevenire l'introduzione di agenti esterni.

D'altro canto, la pericolosità dei contaminanti si esplica attraverso diverse modalità. Infatti l'acqua contaminata rappresenta un pericolo se ingerita, se viene a contatto con la pelle o se inalata. In tal caso un gran numero di persone sarebbero contaminate allo stesso tempo con sintomi simili e l'acqua sarebbe una delle principali fonti sospette. Altri due potenziali cause potrebbero derivare dalla contaminazione di acqua o di cibo. Le modalità in cui si esplica la contaminazione dipende da alcuni fattori: tipo di agente; concentrazione e tossicità dell'agente; volume d'acqua ingerito; contatto epidermico (incluso il contatto con le mucose della bocca o degli occhi); inalazione; sensibilità individuale. Le biotossine e i microorganismi sono probabilmente le forme primarie di contaminazione di acqua potabile. Un'altro fattore da tenere in conto nel caso di contaminazione di un

sistema idrico è sicuramente la persistenza degli agenti. Alcune sostanze chimiche idrolizzano in acqua in un breve periodo di tempo, ad esempio il *mustard* ha un'emivita (tempo di dimezzamento) di 15 minuti e il *BZ* idrolizza al passaggio in microfiltri. Altre, invece, presentano un'emivita molto più estesa, come quella del VX pari a 110-120 ore. Per ciò che riguarda i contaminanti biologici la loro persistenza ha un ampio campo di variabilità, basti evidenziare che mentre le specie di *Vibrio cholerae*, *Shigella*, *Escheria Coli* e *Salmonella* hanno un'emivita che varia tra le 7 e le 16 ore, per il *Bacillus anthracis* si arriva anche a più di 8 giorni. Gli agenti radiologici più pericolosi da questo punto di vista sono invece lo iodio-131 (emivita di 8 giorni), lo stronzio-90 (29 anni) e il cesio-137 (emivita fisica di 30 anni, emivita biologica variabile tra i 70 e i 140 giorni). I prodotti chimici industriali hanno anch'essi caratteristiche variabili di persistenza e la loro scomparsa dipenderà dalle loro proprietà chimiche e dall'attenuazione indotta dalla presenza di cloro nell'acqua.

2. Identificazione dei contaminanti

La prima fase della ricerca è stata mirata ad un'accurata disamina dello stato dell'arte delle conoscenze esistenti su tale problematica; la ricerca bibliografica è stata effettuata sia presso le biblioteche del Politecnico sia presso altre biblioteche mediante l'ausilio di mezzi informatici. Necessario punto di partenza è l'individuazione degli agenti utilizzabili per un attentato ad un sistema idrico: questi possono essere classificati come: agenti chimici, agenti biologici ed agenti radioattivi.

Agenti chimici

Gli agenti chimici utilizzabili sono molteplici, tra essi se ne sono individuati alcuni che spiccano per tossicità e per facile reperibilità. Si noti che per ottenere risultati su vasta scala sarebbero necessarie quantità enormi di tali sostanze.

Agenti Nervini: appartengono alla classe degli organofosforici. Sono sostanze dall'elevato potere tossico che causano il decesso, negli uomini e negli animali, paralizzandone la muscolatura. Al contrario delle altre sostanze chimiche, gli Agenti Nervini non vengono in genere utilizzati per attacchi localizzati ma per colpire intere popolazioni [Chudler, 2001].

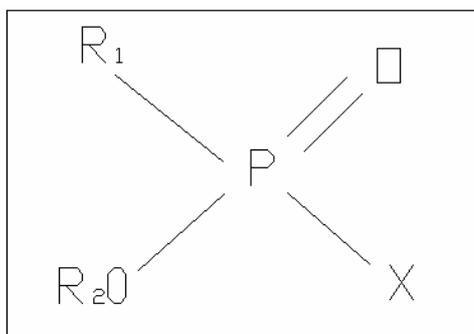


Fig. 1.2.1 Formula di struttura comune agli Agenti Nervini

La struttura degli Agenti Nervini varia a seconda dei legami che si vengono ad instaurare tra gli atomi. La formula di struttura “base” è evidenziata nella figura 1.2.1; nella tabella 1.2.1 sono state, invece, riportate, nello specifico, le combinazioni che si possono avere al variare di R₁, R₂ e X [Chudler, 2001].

AGENTE	X	R ₁	R ₂
DFP	F	O-CH(CH ₃) ₂	CH(CH ₃) ₂
Tabun (GA)	CN	N(CH ₃) ₂	C ₂ H ₅
Sarin (GB)	F	CH ₃	CH(CH ₃) ₂
Soman (GD)	F	CH ₃	CH(CH ₃) C(CH) ₃
Cyclosarin (GF)	F	CH ₃	Cyclohex yl
VX	SCH ₂ CH ₂ N[CH(CH ₃) ₂] ₂	CH ₃	C ₂ H ₅

Tab. 1.2.1

L'azione comune agli Agenti Nervini è di inibire i processi di colinesterasi, enzimi importanti perché provvedono al controllo dell'apparato nervoso. Normalmente, quando un impulso nervoso raggiunge una cellula, essa produce un enzima noto col nome di acetilcolina, che viaggia attraverso lo spazio tra due cellule nervose e stimola la cellula successiva. L'interruzione di questa catena di trasmissioni nervose per effetto degli Agenti Nervini provoca la contrazione incontrollata ed il bloccaggio della muscolatura: a seguito della contrazione dei muscoli della cornea si ha la perdita momentanea della vista, il corpo è preso da

convulsioni e, infine, sopravviene la paralisi. Alla fine la paralisi del diaframma dà luogo al decesso per asfissia [ATSDR, 2002].

A seguito del contagio si possono manifestare i seguenti sintomi, indipendentemente dal modo in cui si è venuti a contatto con uno qualsiasi degli agenti nervini: pupille rimpicciolite, dolore agli occhi, vista sfocata, sudorazione eccessiva, tosse, affanno, diarrea, eccessiva espulsione di urina, stato confusionale, sonnolenza, debolezza, mal di testa, nausea, vomito e/o dolori addominali, battito cardiaco lento o accelerato, anomali sbalzi di pressione. Anche una piccola goccia sulla pelle può causare sudorazione e contrazioni muscolari laddove è entrata a contatto con la cute.

L'esposizione ad una dose maggiore (con qualsiasi modalità) può causare perdita di conoscenza, convulsioni, paralisi, arresto respiratorio che porta alla morte

DFP

$C_6H_{14}FO_3P$ diisopropyl phosphorofluoridate

È stata la prima sostanza chimica ricavata come pesticida sviluppata in Germania intorno al 1930 (figura 1.2.2). A partire dallo sviluppo di questa sostanza hanno poi avuto origine, nel tempo, altri composti organofosforici. Essa ha un peso molecolare pari a 184,2; è poco stabile e facilmente miscibile.

Il DFP risulta solubile in acqua e negli oli vegetali, poco in quelli minerali. È praticamente inodore e liquido dal colore giallognolo. È un potente inibitore della colinesterasi e viene spesso utilizzato a scopo scientifico per studiare gli enzimi.

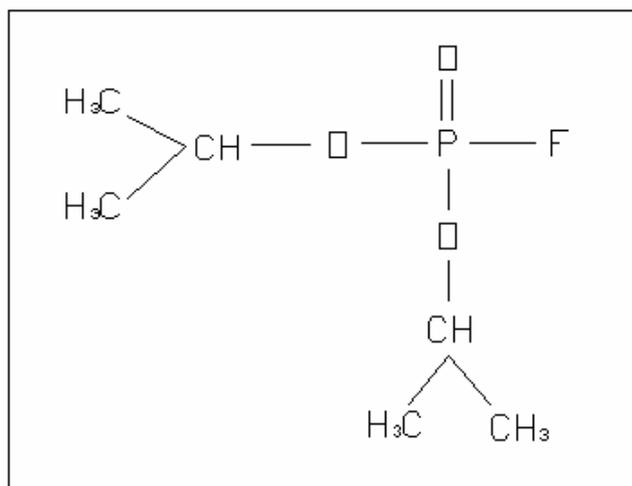


Fig. 1.2.2 Formula di struttura del DFP.

Anche se i valori della LD₅₀ (dose letale nel 50% dei casi) risultano relativamente bassi, la sua tossicità è elevata, qualsiasi sia la modalità secondo cui avviene il contagio. È altamente volatile [Moreau, 2001; Connett, 1987].

GA (Tabun)



O-ethyl dimethylphosphoramidocyanidate

Il Tabun è una sostanza chimica prodotta a scopo bellico (come altri gas nervini è possibile che sia stato utilizzato nella guerra fra Iran-Iraq nel 1980). Fu sviluppato nel 1936 in Germania, come pesticida, dal chimico tedesco Gerhard Schrader, che lavorava presso la IG Farben, una compagnia che poi produsse anche lo Zyklon-B (un gas utilizzato dai nazisti nei campi di concentramento durante la Seconda Guerra Mondiale). La sua produzione risulta essere più semplice rispetto a quella degli altri agenti nervini; la sua formula di struttura è riportata nella figura 1.2.3.

Il Tabun è un liquido chiaro, incolore e insapore ed ha un lieve odore di frutta. Può diventare vapore se viene riscaldato. Paragonato agli altri gas nervini, il Tabun è più volatile del VX, ma meno del Sarin.

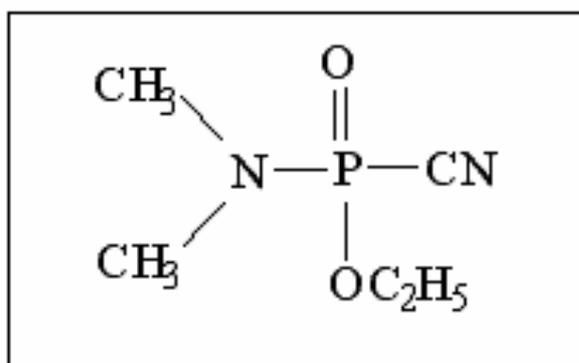


Fig. 1.2.3 Formula di struttura del Tabun

Per queste proprietà, le persone possono essere più facilmente infettate con i vapori del Tabun; esso ha un'azione immediata ma un tempo di persistenza ridotto, senz'altro minore di quello del VX.

Allo stato gassoso, il Tabun è più pesante dell'aria e, quindi, persiste negli strati bassi aumentando il rischio di contagio.

A seguito del rilascio di Tabun nell'ambiente le persone possono essere esposte al contagio attraverso il contatto con la pelle o con gli occhi oppure attraverso la respirazione del veleno. Esso si mescola, altresì, semplicemente con l'acqua e, quindi, può essere utilizzato per contaminarla. Il contagio in questo modo può avvenire tramite il contatto o l'ingestione del liquido contaminato. Si può essere infettati anche tramite l'ingestione di cibo infetto. Persiste sugli indumenti per circa 30 minuti, per cui in questo modo possono essere contagiate anche persone

che non sono venute a contatto direttamente col veleno. Inoltre il Tabun si decompone molto lentamente nell'organismo, per cui può dar luogo anche ad effetti multipli.

I danni derivanti dall'esposizione dipendono da molti fattori (modalità, tempo...).

La LD₅₀ nei topi, per via orale, è di 3.7mg/Kg [Fishman, 2002 (a)].

I sintomi per quanto riguarda il contagio a seguito dell'ingestione di acqua contaminata si manifestano in un arco di tempo che va da pochi minuti fino alle 18 ore. I gas nervini, come già osservato, in generale agiscono impedendo il corretto funzionamento di ghiandole e muscoli, sollecitando questi ultimi fino a che, a lungo andare, viene ostacolata la respirazione. Le persone esposte in modo lieve devono essere, comunque, ricoverate. Le persone esposte in maniera più forte hanno poche possibilità di sopravvivere.

La guarigione dall'esposizione al Tabun è possibile, ma gli antidoti validi devono essere usati rapidamente (entro pochi minuti) per essere efficaci. In ogni modo, se il Tabun viene ingerito, bisogna cercare di non vomitare o bere altri liquidi. La cura medica consiste nel rimuovere il Tabun dall'organismo per quanto possibile [CDC ,2003 (a); U.S. Army,1990 (a); Chemistry of GA (Tabun)].

GB (Sarin)

C₄H₁₀FO₂P Isopropyl methylphosphonofluoridate

Il Sarin è una sostanza chimica prodotta dall'uomo a scopo bellico (come altri gas nervini, è possibile che sia stato utilizzato nella guerra fra Iran-Iraq nel 1980; è stato utilizzato, inoltre, in due attacchi terroristici in Giappone nel 1994 e nel 1995). Il Sarin è stato sviluppato nel 1938 in Germania come pesticida (nella

figura 1.2.4 è riportata la sua formula strutturale e nella figura 1.2.5 è proposta una rappresentazione tridimensionale della molecola).

Il Sarin è un liquido chiaro, incolore e insapore e non ha odore nella sua forma pura. Comunque può evaporare e diffondersi nell'ambiente. L'esposizione al contagio avviene attraverso il contatto con la pelle o con gli occhi oppure attraverso la respirazione del veleno se questo si trova sotto forma di vapore.

Allo stato gassoso, il Sarin è più pesante dell'aria e quindi persiste negli strati bassi aumentando il rischio di contagio. Il Sarin è il più volatile dei gas nervini e, quindi, è più facile che evapori e si diffonda nell'ambiente. Sempre per questo motivo ha un'azione immediata ma di modesta durata.

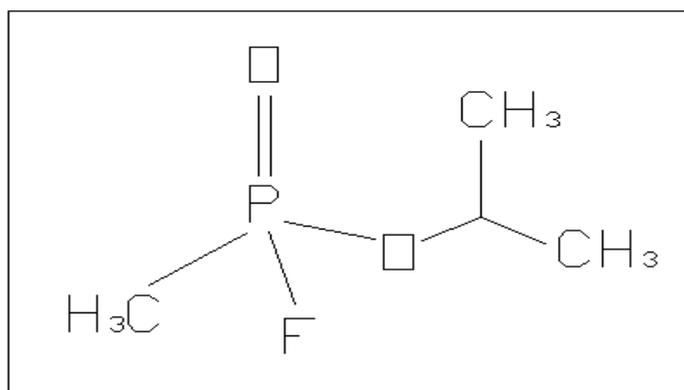


Fig. 1.2.4 Formula di struttura del Sarin

Il Sarin si mescola semplicemente con l'acqua e, quindi, può essere utilizzato per contaminarla. Il contagio in questo modo può avvenire tramite contatto o ingestione del liquido contaminato. Si può essere infettati anche tramite ingestione di cibo infetto. Poiché il Sarin si decompone molto lentamente nell'organismo, può anche dar luogo ad effetti multipli.

I danni derivanti dall'esposizione dipendono da molti fattori (modalità, tempo...). Una dose di appena 0,01mg/Kg di peso corporeo può essere letale. La LD₅₀ nei topi, per via orale, è di 550 µg/Kg [Fishman, 2002 (b)].

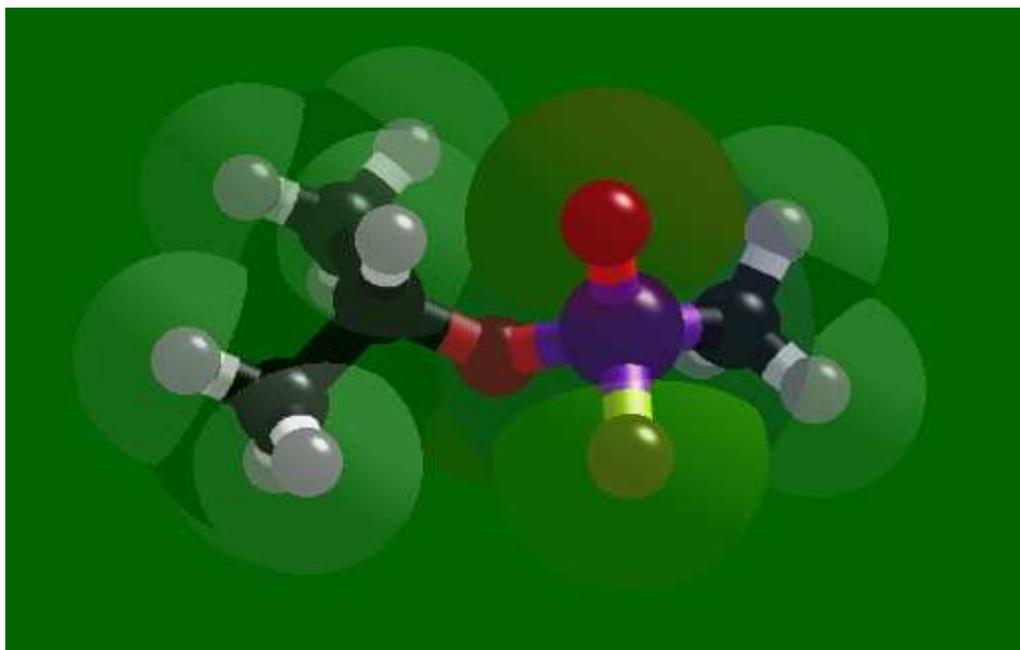


Fig. 1.2.5 *Rappresentazione tridimensionale della struttura della molecola del Sarin*

I sintomi, per quanto riguarda il contagio a seguito dell'ingestione di acqua contaminata, si manifestano in un arco di tempo che va da pochi minuti fino alle 18 ore. Come tutti i gas nervini, il Sarin agisce impedendo il corretto funzionamento di ghiandole e muscoli, sollecitando questi ultimi fino a che, a lungo andare, viene ostacolata la respirazione. Le persone non si accorgono dell'esposizione al Sarin proprio perché esso è privo di odore. La guarigione è possibile, ma gli antidoti validi devono essere usati rapidamente (entro pochi minuti) per essere efficaci. In ogni modo, se il Sarin viene ingerito bisogna

cercare di non vomitare o bere altri liquidi. La cura medica consiste nel rimuovere il Sarin dall'organismo per quanto possibile [CDC,2003 (b); U.S. Army,1990 (b); Chemistry of GB (Sarin)].

GD (Soman)

$\text{CH}_3\text{P}(\text{O})(\text{F})\text{OCH}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{CH}_3)_3$ Pinacolylmethylphosphonefluoridate.

Il Soman è un agente chimico creato dall'uomo a scopo bellico (probabilmente come altri agenti nervini è stato utilizzato negli attacchi della guerra Iran-Iraq nel 1980). Originariamente è stato sviluppato in Germania nel 1944 come insetticida; nella figura 1.2.6 ne è riportata la formula strutturale. Il Soman è un liquido incolore e insapore con un lieve odore di canfora (come il Vicks Vaporub®) o di frutta marcia. Può diventare vapore se riscaldato.

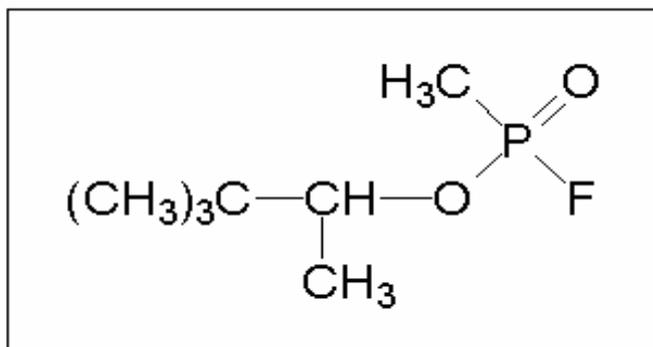


Fig. 1.2.6 Formula di struttura del Soman

Comparato ad altri gas nervini, il Soman è più volatile del VX e meno del Sarin. Più elevata è la volatilità di una sostanza chimica, più probabilmente esso passerà da liquido a vapore e si disperderà nell'ambiente. Data la sua alta volatilità, il

Soman ha un effetto immediato ma breve, con tempo di persistenza modesto. A seguito del rilascio di Soman nell'ambiente, l'uomo può venire a contatto tramite la pelle, gli occhi o per inalazione. La contaminazione può avvenire anche ingerendo cibi infetti. Gli abiti contaminati possono rilasciare i vapori del Soman per circa mezzora così da infettare altre persone. Essendo il Soman sotto forma di gas più pesante dell'aria, si può, inoltre, depositare negli strati inferiori dell'atmosfera, dando luogo, così, ad una maggiore esposizione. Il Soman si miscela facilmente con l'acqua, per cui può essere utilizzato per contaminarla: l'uomo può essere esposto al contagio o bevendo l'acqua contaminata o venendone a contatto tramite la pelle. Il Soman si decompone lentamente nell'organismo per cui possono aversi effetti cumulativi anche con altri agenti nervini. Il danno derivante dall'esposizione al Soman dipende dalla quantità dell'inquinante, dalle modalità di contatto e dal tempo di esposizione. La LD₅₀ nei topi è di 64 µg/kg. I sintomi appaiono a pochi secondi dall'esposizione al Soman in forma di vapore; se il Soman è in forma liquida gli effetti si riscontrano in un arco di tempo che va da pochi minuti a 18 ore.

Anche se il Soman ha un odore di canfora o frutta marcia, questo non viene immediatamente individuato dall'uomo come pericolo. Le persone che vengono esposte al Soman in maniera moderata tramite inalazione, ingestione o assorbimento dalla pelle possono avvertire i sintomi a partire da pochi secondi o ore dall'esposizione. Diversamente dai pesticidi, i gas nervini possono essere associati a problemi neurologici non prima di una o due settimane dell'esposizione. La guarigione dall'esposizione al Soman è possibile, ma gli antidoti devono essere somministrati rapidamente (entro pochi minuti) perché

risultino efficaci. Se il Soman viene, invece, ingerito non bisogna cercare di vomitare o bere altri liquidi, ma cercare aiuto rivolgendosi ad un medico [CDC,2003 (c); U.S. Army,1990 (c); Chemistry of GD (Soman)].

GF (Cyclosarin)

$C_7H_{14}FO_2P$ Cyclohexyl methylphosphonofluoridate

È anche noto come Cyclosarin; in fase liquida ha un tempo di persistenza di circa due giorni (dipende molto dalle condizioni climatiche) e non ha un preciso odore. Probabilmente fu sintetizzato durante la Seconda Guerra Mondiale dai tedeschi durante studi sui pesticidi organofosforici [GF]. Nella figura 1.2.7 è riportata la formula di struttura del GF. Il suo peso molecolare è 180.14 [Fishman, 2002 (c)]. È poco solubile in acqua.

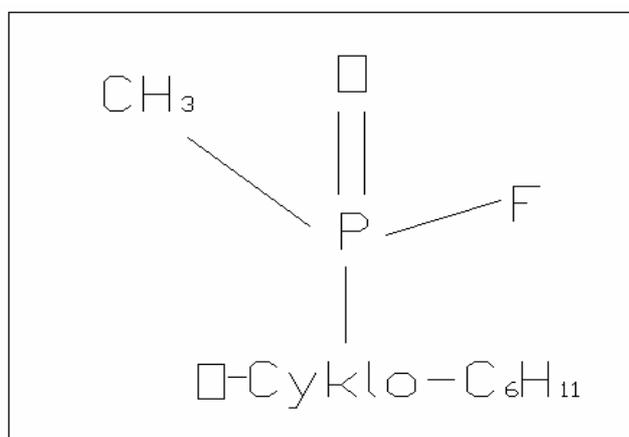


Fig. 1.2.7 Formula di struttura del Cyclosarin (GF)

L'azione di questa sostanza è simile a quella che esercitano gli altri composti organofosforici, ossia inibisce i processi di colinesterasi. Il suo potere inibente è,

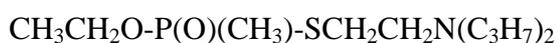
però, superiore rispetto agli altri composti. Questo potere è espresso comunemente tramite $-\log$ della concentrazione molare richiesta per inibire al 50% l'acetilcolinesterasi in vitro (pI50). A titolo di confronto, nella tabella 1.2.2 sono stati riportati i valori dell'indice pI50 per i composti organofosforici. L'LD50, nell'uomo, è stimato pari a 5 mg/Kg [Grotte, 1998]. La solubilità di questo agente è simile a quella del Soman [U.S. Army,1990 (e)].

I sintomi sono: respiro corto, spasmi muscolari e stato di incoscienza. Nel tratto gastrointestinale agisce provocando nausea, vomito, diarrea e anoressia. Può portare al decesso [Chemical Agents].

Agente	pI ₅₀
Cyclosarin	10,1
Soman	9,2
Sarin	8,9
VX	8,8
Tabun	8,6
DFP	6,5

Tab. 1.2.2 Potenza dell'acetilcolinesterasi

VX



S-2 (diisopropylamino) ethyl O-ethyl Methylphosphonothioate.

Il VX è una sostanza chimica prodotta dall'uomo a scopo bellico (è probabile che sia stato utilizzato, come altri gas nervini, nella guerra Iran-Iraq nel 1980).

È stato sviluppato nel 1950 in Inghilterra (*Porton Down Chemical Weapons Research Centre*, Wiltshire) come pesticida; nella figura 1.2.8 ne è riportata la formula strutturale e nella figura 1.2.9 una rappresentazione tridimensionale della molecola.

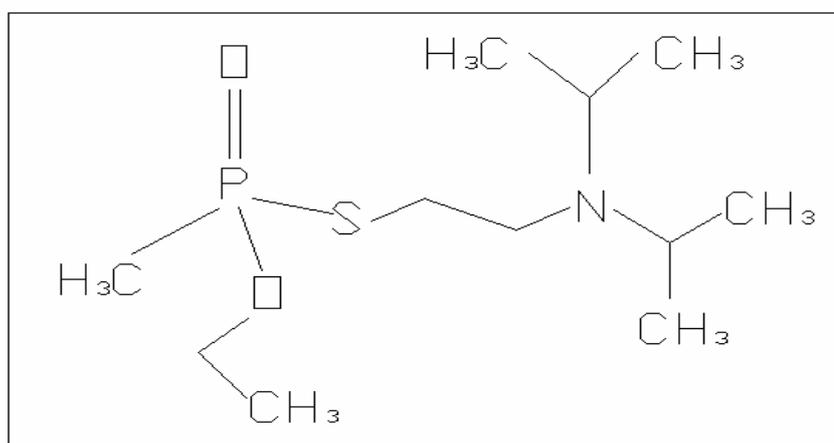


Fig.1.2.8 Formula di struttura del VX

Il VX è privo di odore e di sapore. È un liquido oleoso con un colore ambrato, molto lento ad evaporare (in pratica evapora con la lentezza di un olio per motori).

Anche se non si miscela nell'acqua così facilmente come gli altri gas nervini, può essere rilasciato in acqua ed esporre così le persone al rischio di contaminazione. Allo stato gassoso è più pesante dell'aria e, quindi, persiste negli strati bassi aumentando il rischio di contagio. Infatti, la "V" del VX sta ad indicare la sua lunga persistenza nell'atmosfera.



Fig. 1.2.9 *Rappresentazione tridimensionale della struttura della molecola del VX*

Il VX è il più potente dei gas nervini: il solo contatto con la pelle, se non detersa immediatamente, può essere letale. Il fatto poi che il VX sia il meno volatile fra i gas nervini, comporta che la sua persistenza nell'ambiente è elevata. Se favorito dal clima, il VX può proseguire la sua azione per giorni e, in un clima molto caldo, addirittura per mesi. Il danno derivante dall'esposizione al VX dipende dalla quantità dell'inquinante, dalle modalità di contatto e dal tempo di esposizione. Il contagio avviene attraverso il contatto con la pelle o con gli occhi oppure attraverso la respirazione del veleno sotto forma di vapore. A causa della lenta decomposizione nell'organismo, si possono anche avere effetti multipli. La LD_{50} è, nei topi, di 15 $\mu\text{g}/\text{Kg}$; per l'uomo è di circa 0,14 mg/Kg . I sintomi per quanto riguarda il contagio, a seguito dell'ingestione di acqua contaminata, si manifestano in un arco di tempo che va da pochi minuti fino a 18 ore. Se il VX

viene ingerito bisogna cercare di non vomitare o bere altri liquidi. La cura medica consiste nel rimuovere il VX dall'organismo per quanto possibile [CDC ,2003 (d); U.S. Army ,1990 (d); Chemistry of VX].

A conclusione dell'esame dei gas nervini, in tabella 1.2.3 ne sono state riportate le quantità che risultano letali per l'organismo dell'uomo, se l'esposizione avviene tramite il contatto epidermico col veleno.

Agente	Vapore (CT) (mg-min/m ³)	Liquido	
		µg/person	mg/kg
Tabun	20,000-40,000	1,000-1,500	50-70
Sarin	12,000-15,000	1,000-1,700	25-50
Soman	10,000	600	5-20
Cyclosarin	15,000	350	
VX	600-700	3.4-6.0	0.1-0.2

Tab. 1.2.3

Nella tabella 1.2.4 sono stati invece riportati i precursori degli agenti nervini con i loro utilizzi nel passato.

PRECURSORE	UTILIZZI CIVILI	ARMI CHIMICHE
Tricloruro di fosforo	Sintesi organica Insetticidi Additivi petroliferi Plastificanti Sintesi di tensioattivi Catalizzatori Coloranti	SOMAN (GD) TABUN (GA) SARIN (GB)
Fosfito di dimetile	Sintesi organica Additivi per lubrificanti	SARIN SOMAN
Ossicloruro di fosforo	Sintesi organica Plastificanti Additivi petroliferi Insetticidi Ritardanti di fiamma	TABUN(GA)
Fluoruro di potassio	Fluorurazione composti organici Sterilizzazione alimenti Produzione vetro e porcellana	SARIN (GB) SOMAN (GD)
Dimetilammina	Sintesi organica Industria farmaceutica Detergenti Pesticidi Additivi petroliferi Combustibile per missili	TABUN
Fluoruro di idrogeno	Fluorizzazione in reazioni chimiche Catalizzatore in reazioni di polimerizzazione Additivi combustibili per missili Processamento uranio	SARIN (GB) SOMAN (GD)
Bifluoruro di potassio	Produzione di fluoruro Catalizzatore di alchilazione Trattamento del carbone Saldatura dell'argento	SARIN (GB) SOMAN
Bifluoruro di ammonio	Produzione ceramiche Sterilizzatore per app. alimentari Elettroplaccatura Incisione del vetro	SOMAN GB
Cianuro di sodio	Estrazione oro e argento	GA

Tab. 1.2.4

Agenti Vescicanti

Gli Agenti Vescicanti sono composti citotossici alchilanti, notoriamente indicati come “*Mustard*” o “*Mustard Gas*”. Di seguito vengono sinteticamente discussi i quattro agenti che appartengono a questa categoria.

Sulfur Mustard (Iprite)

Cl-CH₂-CH₂-S-CH₂-CH₂-Cl 1,1-thiobis(2-chloroethane)

È stato sintetizzato per la prima volta da Frederick Guthrie nel 1860, che, facendo reagire l’etilene con il Cl₂, ne notò gli effetti sulla sua pelle. Nel 1886 fu Victor Meyer a pubblicare la sintesi; nella figura 1.2.10 viene riportata la formula di struttura e nella figura 1.2.11 la rappresentazione tridimensionale della molecola dell’Iprite. Ha un peso molecolare pari a 159.08.

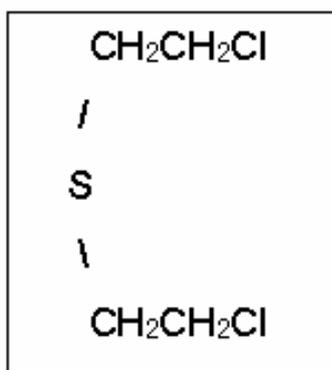


Fig. 1.2.10 Formula di struttura del Mustard Gas

La Sulfur Mustard, che appartiene al gruppo degli agenti alchilanti è un tipo di agente chimico detto anche “agente vescicante” a causa della sua forte azione sui tessuti. È individuato anche, dalle forze militari, con le sigle H, HD, HT. Quando non si presenta inodore, assume il tipico aroma dell’aglio, della cipolla o della mostarda (Mustard Gas). Si può presentare sotto forma di vapore, come un liquido dalla tessitura simile a quella degli olii, oppure solido. Quando è liquido (alla pressione di 1 atmosfera e alla temperatura di 15°C) assume delle colorazioni che vanno dal giallo al marrone.

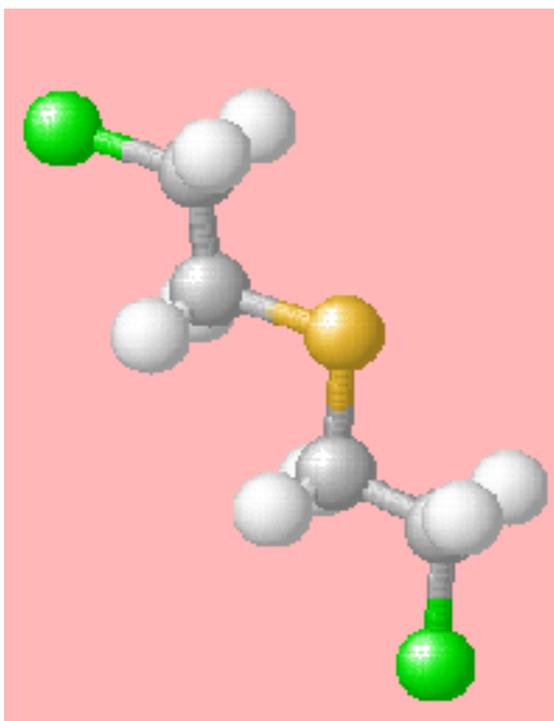


Fig. 1.2.11 *Rappresentazione tridimensionale della struttura della molecola della Sulfur Mustard*

L’Iprite è stata utilizzata per la prima volta come agente chimico bellico durante la prima Guerra Mondiale; recentemente è stata considerata l’opportunità di

utilizzarla per trattare la pelle soggetta a psoriasi. Comunque attualmente non è impiegata nel campo medico.

Se il “gas mostarda” viene rilasciato in acqua, la popolazione può essere esposta bevendo l’acqua contaminata oppure per contatto con la pelle. Si può anche essere esposti direttamente all’azione del vapore o del liquido. Persiste nell’ambiente per due, tre giorni o, in particolari condizioni (temperatura bassa), per alcune settimane. Si scinde lentamente nell’organismo in modo che si possano verificare anche effetti cumulativi per successive esposizioni. È più pesante dell’aria e per questo permane a basse quote. Gli effetti sono diversi in funzione delle modalità tramite le quali si viene a contatto con l’agente, del tempo di esposizione e della quantità con cui si viene a contatto. La LD₅₀ valutata per l’uomo (per via orale) è pari a 0.7mg/Kg [Blister Agent].

I danni consistono prevalentemente nel fatto che il gas attacca le cellule del corpo danneggiando la struttura del DNA, in modo che vengano trasmesse informazioni errate e non si riescano a replicare le cellule morte.

La popolazione può non accorgersi del pericolo, dal momento che il gas può non avere odore o avere un odore che non crea allarmi. I sintomi dell’avvelenamento possono non essere immediati; essi possono rivelarsi in un tempo che va dalle 2 alle 24 ore. I sintomi possono essere irritazione della pelle, dolori addominali, febbre, nausea, vomito ecc., ed a lungo termine si ha il decesso. Nelle esperienze in vitro si osservano effetti mutagenici e genotossici nei linfociti dei ratti. Non essendo sinora stati portati a termine studi tossicologici su tale sostanza, non si è ancora trovata una cura all’intossicazione [Holland; CDC, 2003 (e); Mustard gas; Mustard gas chemical and physical information].

Lewisite

$C_2 H_2 As Cl_3$ Dichloro-(2-chlorovinyl) arsine

La Lewisite è un tipo di agente chimico bellico che provoca vesciche sulla pelle e sulle mucose delle membrane. È una sostanza oleosa che nella sua forma pura si presenta priva di colore e che, se impura, assume colorazioni che vanno dall'ambra al nero. Contiene arsenico e ha un odore che ricorda i gerani. Dalle forze armate viene indicato con la lettera "L". La Lewisite non esiste in natura e la sua scoperta risale al 1918: nella figura 1.2.12 ne è riportata la formula di struttura. Il suo peso molecolare è 207.32.

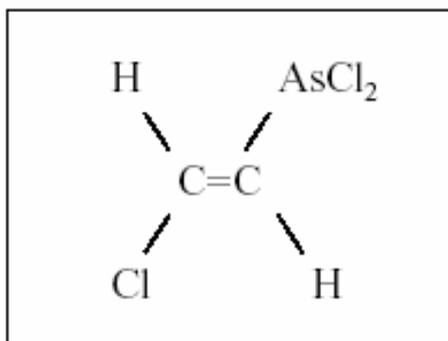


Fig. 1.2.12 *Formula di struttura della Lewisite*

Le persone possono venire a contatto con la Lewisite se questa sostanza viene rilasciata in aria (per inalazione o contatto con la pelle), in acqua (bevendola o bagnandosi) o nel cibo (ingerendola).

Sotto forma di vapore la Lewisite è più pesante dell'aria e di conseguenza permane nelle parti basse dell'atmosfera. La Lewisite in forma liquida permane

per molto tempo in diverse condizioni ambientali: da temperature prossime allo zero fino a temperature elevatissime.

Le diverse modalità di azione di questo agente sono legate alle modalità e ai quantitativi di assunzione. Avendo un elevato potere irritante danneggia immediatamente la pelle, gli occhi e le vie respiratorie. Contenendo arsenico, l'avvelenamento da Lewisite ha anche effetti simili all'avvelenamento da arsenico (come, per esempio, dolori allo stomaco e pressione bassa).

La maggior parte delle informazioni relative all'effetto della Lewisite sulla salute derivano da studi fatti su cavie. I sintomi dell'avvelenamento sopraggiungono immediatamente a seguito dell'esposizione. Sulla pelle essa provoca in breve tempo irritazione e arrossamento e dopo pochi minuti cominciano a formarsi delle vesciche che, quasi istantaneamente, ricoprono tutta l'area che è venuta a contatto col veleno. Gli occhi si irritano e si gonfiano fino ad arrivare alla cecità; l'attacco alle vie respiratorie si manifesta con tosse violenta, starnuti e sangue dal naso fino a comportare danni permanenti; l'attacco all'apparato digerente si manifesta con diarrea, nausea e vomito.

Se la Lewisite viene ingerita non bisogna introdurre altri fluidi nel corpo e non bisogna vomitare. Sono attualmente disponibili degli antidoti contro questa forma di avvelenamenti che, comunque, devono essere somministrati nel minor tempo possibile [CDC, 2003 (i); U.S. Army (z)].

Di seguito è riportata una tabella dove vengono elencati i limiti tossicologici per le Lewisite:

LCt ₅₀ (inalazione, uomo)	1200-1500 mg min/m ³
LCt ₅₀ (vap. su pelle, uomo)	100,000 mg min/m ³
LCt ₅₀ (pelle, uomo)	>1500 mg/min ³
ICT ₅₀ (occhi, uomo):	< 300 mg min/m ³
LD ₅₀ (orale, ratti)	50 mg/kg
LD ₅₀ (sottocutanea, ratti)	1 mg/kg
LD ₅₀ (pelle, conigli)	6 mg/kg
LD ₅₀ (sottocutanea, conigli)	2 mg/kg
LD ₅₀ (intravena, conigli)	500 mg/kg
LD ₅₀ (pelle, porcellini)	12 mg/kg
LD ₅₀ (sottocut., porcellini)	1 mg/kg
LD ₅₀ (pelle,anim. domest.)	15 mg/kg
LCt ₅₀ (inalazione, ratti)	1500 mg min/m ³ (9 min)
LCt ₅₀ (vapore su pelle, ratti)	20,000 mg min/m ³ (25 min)

Tab. 1.2.5

*LCt₅₀ :è la concentrazione letale di un agente chimico somministrato sotto forma di vapore che uccide il 50% degli individui esposti.

Nitrogen Mustard

$N(CH_2CH_2Cl)_3$ Tris(2-chloroethyl)amine

La Nitrogen Mustard, anche nota come HN3, fu prodotta a scopo bellico intorno al 1920. L'HN3 è un agente vescicante molto simile all'Iprite. Si può trovare sotto diverse forme (liquido oleoso, vapore o solidi) e può assumere diversi odori (di pesce, di muffa, di frutta). A temperatura ambiente si trova sotto forma di liquido, il cui colore può essere ambrato o giallo. Le varie forme di questo agente (HN1, HN2 e HN3) furono realizzate al fine di utilizzare tale prodotto come agente chimico bellico. Nella figura 1.2.13 è riportata la formula di struttura dell'HN3. Il suo peso molecolare è pari a 204.54.

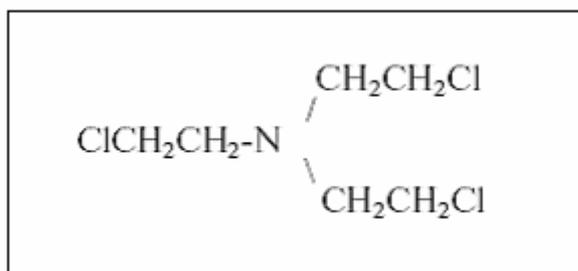


Fig.1.2.13 Formula di struttura della Nitrogen Mustard (HN3)

Se l'HN3 viene rilasciato nell'ambiente come vapore, l'esposizione avviene per contatto con la pelle, con gli occhi o respirandolo; inoltre essendo questo agente più pesante dell'aria, permane nelle parti basse dell'atmosfera. Se viene rilasciato in acqua, si può essere contaminati sia ingerendo l'acqua infetta che venendone a contatto tramite la pelle. Gli effetti sono diversi a seconda delle modalità di contatto con l'agente e del quantitativo assunto. È un potente irritante e attacca la

pelle, gli occhi e le vie respiratorie. L'HN3 entra facilmente e velocemente nelle cellule del corpo danneggiandole permanentemente.

Normalmente i sintomi non sono immediati e possono anche sopraggiungere dopo alcune ore. Gli effetti possono essere divisi in funzione della parte del corpo danneggiata:

- ~ Pelle: rossore, seguito dalla formazione di vesciche entro 12 ore dall'esposizione;
- ~ Occhi: irritazione, dolore, gonfiore e, in alcuni casi, perdita della vista;
- ~ Apparato respiratorio: dolore al naso, tosse, respiro corto e, a lungo termine, danni permanenti all'apparato;
- ~ Apparato digerente: dolori addominali, diarrea, nausea e vomito culminanti in alcuni casi con il decesso;
- ~ Cervello: tremore, non coordinazione dei movimenti e convulsioni.

Il valore dell'LC₅₀ (concentrazione letale di un agente chimico somministrato sotto forma di vapore che uccide il 50% delle persone esposte) per contatto con la pelle è di 10000mg-min/m³. Attualmente non esistono antidoti per questo tipo di veleno [CDC,2003(1); U.S. Army (y)].

Phosgene Oxime

CHCl₂NOH Dichloroformoxime

Il Phosgene Oxime è un agente chimico bellico urticante che produce un effetto simile all'ortica. Il Phosgene Oxime è anche noto come agente corrosivo per il

modo in cui attacca la pelle e i tessuti. Fu prodotto per la prima volta nel 1929. Le informazioni chimiche specifiche su questo agente sono molto limitate: nella figura 1.2.14 ne è rappresentata la formula di struttura.

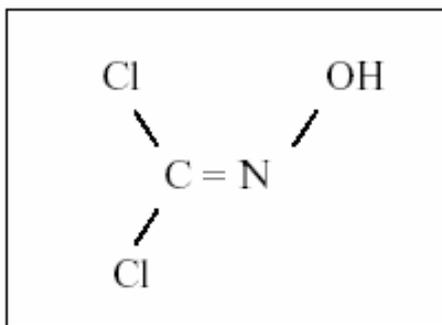


Fig.1.2.14 Formula di struttura del Phosgene Oxime

Fisicamente si presenta trasparente se solido e giallo-marrone se liquido; ha un odore sgradevole e irritante. Dalle forze armate viene individuato con la sigla “CX”. La sua persistenza nell’ambiente è intensa nelle parti basse dell’atmosfera (è più pesante dell’aria) ma limitata nel tempo. Gli effetti sono diversi a seconda delle modalità di contatto con l’agente e del quantitativo assunto. Se viene rilasciato nell’ambiente sotto forma di vapore, si può essere contagiati tramite il contatto con la pelle o l’inalazione. Se viene rilasciato come liquido in acqua, l’esposizione avviene toccando o bevendo l’acqua infetta. Inoltre, può venire a contatto con i cibi ed essere ingerito.

Gli effetti possono essere divisi in funzione della parte del corpo danneggiata:

- ~ Pelle: i dolori giungono dopo pochi secondi accompagnati da un arrossamento della pelle; entro 15 minuti comincia il prurito; la pelle in seguito diventa marrone e le cellule muoiono;
- ~ Occhi: irritazione, dolore, gonfiore e, in alcuni casi, perdita della vista ;
- ~ Apparato respiratorio: istantanea irritazione delle vie respiratorie, dolore al naso, tosse, respiro corto e, a lungo termine, danni permanenti all'apparato.

Il valore dell'LC₅₀ (concentrazione letale di un agente chimico somministrato sotto forma di vapore che uccide il 50% delle persone esposte) stimato è di 3200 mg-min/m³; il valore che provoca irritazione entro 12 secondi è di 0,2 mg-min/m³.

L' LD₅₀, per contatto con la pelle, è pari a 25 mg/Kg [CBRNE].

Attualmente non esistono antidoti per questo tipo di veleno [CDC,2003(m); U.S. Army (x)].

Agenti chimici derivati dalle piante

A questa categoria di agenti chimici bellici appartengono: Ricina, Abrin, Capsicina e Stricnina. Di seguito illustriamo le caratteristiche di questi quattro agenti, con una premessa per la Ricina e l'Abrin, specificando le caratteristiche comuni a queste due tossine.

Ricina e Abrin

Molti organismi producono potenti prototossine che attaccano le altre cellule, spesso con effetti letali. La Ricina e l'Abrin sono particolari tossine capaci di sfruttare il trasporto intracellulare viaggiando dalla superficie

della cellula fino al substrato interno al citosol. Tali proteine tossiche derivanti dalle piante appartengono al gruppo delle fitotossine, che inibiscono la sintesi proteica delle cellule eucarioti. Sono composte da due catene, delle quali la catena A ha una vera e propria azione tossica, mentre la catena B ha la funzione di facilitare il trasporto della catena A all'interno della cellula [Patocka, 2003 (a); Patocka, 2003 (b)].

Ricina

La Ricina è un veleno che può essere prodotto a partire dai rifiuti derivanti dal trattamento dei semi del *Ricinus communis* (figura 1.2.15).



Fig. 1.2.15 *Pianta e semi di ricino*

La Ricina è una prototossina composta da due catene peptidiche indicate come *A-chain* e *B-chain*, legate da un ponte disolfuro: in figura 1.2.16 ne è riportata la struttura in forma tridimensionale.



Fig. 1.2.16 *Rappresentazione tridimensionale della struttura della Ricina*

La Ricina è l'unica tossina che esiste in natura in grande quantità. La semplicità con cui si può separare la tossina dall'olio e il basso costo dei semi fanno sì che questo veleno sia davvero alla portata di tutti. Si può ritenere, quindi, che questa sostanza sia una reale minaccia, perché facilmente utilizzabile come arma in attacchi terroristici.

Abrin

È una tossina naturale che si può ricavare dai semi dell' *Abrus precatorius*, noto anche come "albero del rosario", in quanto se ne utilizzavano i semi per

confezionare corone. Questi semi sono rossi con delle macchie nere sulla superficie. Nella figura 1.2.17 sono raffigurate la pianta e i semi.



Fig. 1.2.17 *Pianta e semi dell' Abrus precatorius.*

L'Abrin è simile alla Ricina, però è molto più velenoso (una dose di 0,04 $\mu\text{g/Kg}$ di Abrin ha un effetto equivalente ad una dose di 3 $\mu\text{g/Kg}$ di Ricina).

L'Abrin è una prototossina; esiste in due forme, indicate come *Abrin-a* e *Abrin-b*. Entrambe le forme sono composte da due catene peptidiche indicate come *A-chain* e *B-chain*, legate da un ponte disolfato: in figura 1.2.18 è stata riportata una rappresentazione tridimensionale della struttura. Il suo peso molecolare varia da 63000 a 67000.

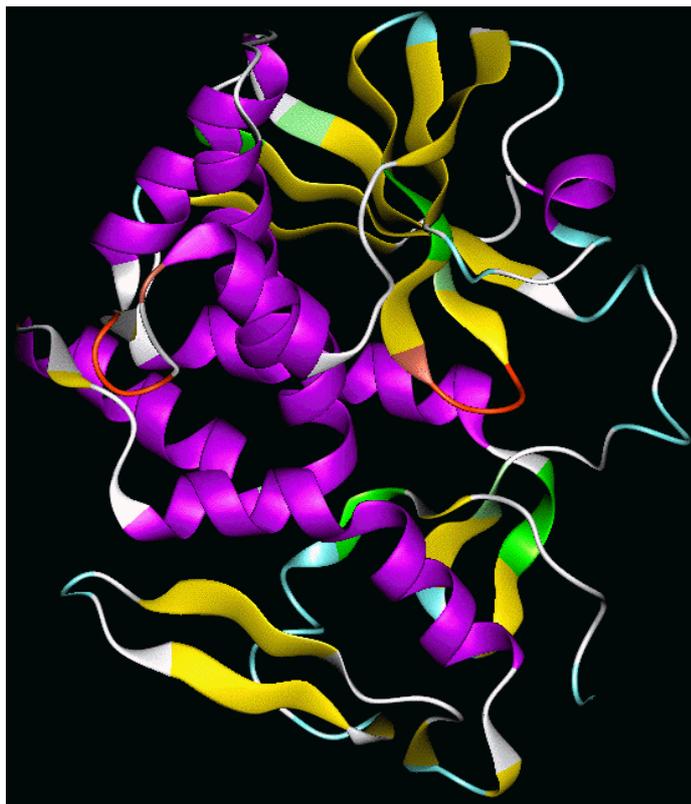


Fig. 1.2.18 *Rappresentazione tridimensionale della struttura dell'Abrin*

L'Abrin si può realizzare sotto forma di polvere (di colore giallognolo), nebbiolina o palline, e si può sciogliere in acqua. È una sostanza stabile, il che significa che può persistere nell'ambiente per molto tempo nonostante forti escursioni termiche. Non si hanno notizie dell'utilizzo di questa sostanza per scopi offensivi. La pianta da cui si ricava è tipica delle zone tropicali ed è di solito utilizzata come erba medicinale. I semi di questa pianta sono stati utilizzati anche come monili ebraici, che potevano però tramutarsi in veleno qualora fossero stati ingoiati.

L'Abrin viene utilizzato nel campo della medicina per sconfiggere le cellule del cancro. Utilizzato come veleno, può essere inalato; si può essere esposti alla

sostanza tossica toccando superfici sulle quali sono cadute particelle o goccioline di Abrin, oppure dal diretto contatto con queste. Lo si può ingerire tramite cibo o acqua. L'avvelenamento da Abrin non è contagioso e non si può trasmettere per contatto tra persone. L'Abrin penetra all'interno delle cellule del corpo umano e inibisce la produzione delle proteine. I sintomi più importanti dell'avvelenamento dipendono dalla modalità di assunzione e dalla dose e dagli organi vitali colpiti. Per i primi sintomi da avvelenamento per inalazione si devono attendere fino ad 8 ore. A seguito dell'ingestione, i sintomi compaiono in meno di 6 ore, ma spesso possono comparire anche dopo 3 giorni. Se viene ingerita una grande quantità di veleno, si possono riscontrare nel soggetto vomito e diarrea ed eventualmente espulsione di sangue. Il soggetto si presenta fortemente disidratato, con pressione sanguigna molto bassa. Si possono avere allucinazioni, convulsioni e sangue nelle urine. Nei giorni a seguire si interrompono le funzioni vitali e si arriva alla morte. La morte si ha dopo 36-72 ore dall'esposizione. Non esistono antidoti. Se avviene l'esposizione, bisogna cercare di espellere il veleno; si possono, inoltre, prescrivere cure mediche che minimizzino i sintomi. Il tipo di cura dipende da molti fattori, per esempio da come è avvenuto il contagio: le cure includono respirazione assistita, liquidi per endovena ed altro [CDC, 2003 (h); NIOSH, 2003 (a); *Abrus precatorius*].

Capsicina

$C_{18}H_{27}NO_3$ *trans-8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide*

La capsicina è un alcaloide derivato dal peperoncino (*Capsicum annum*), detto anche *pepe di Cayenna*, usato per la preparazione della paprica. Ha un peso

molecolare pari a 305.42 [Chemical Data on Capsaicin]; in figura 1.2.19 ne è riportata la formula di struttura. E' una sostanza in grado di attivare tutti i fattori di crescita delle cellule dello strato basale della cute. Svolge un'azione stimolante e decongestionante, riducendo l'edema del cuoio capelluto. Ha proprietà antinfiammatorie, antiforfora, antipruriginose. Di solito si usa il *capsico oleoresina* al 2,5-3% per preparare le lozioni, con l'avvertenza per i preparatori di essere particolarmente precisi nella misurazione, perché anche una piccola quantità in più causa un senso di bruciore eccessivo.

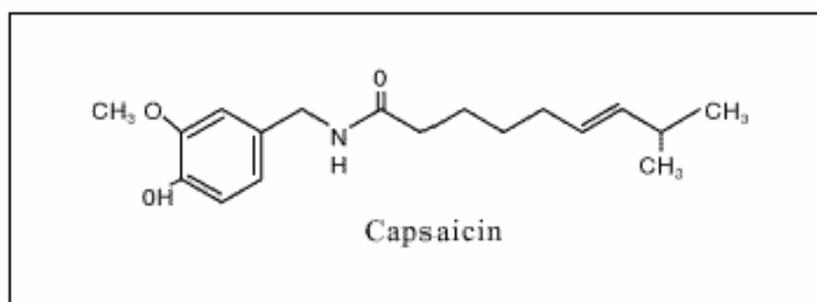


Fig. 1.2.19 Formula di struttura della Capsicina

La Capsicina è una sostanza cristallina priva di colore. Il *Capsicum oleoresin* contiene 100 costituenti chimici volatili [OSHA]. La Capsicina è un alcaloide che ha un elevato potere pungente, è stabile e apparentemente non si degrada al variare della temperatura. La quantità precisa di Capsicina contenuta nei peperoncini (figura 1.2.20) può essere misurata solo attraverso specifiche procedure di laboratorio (HPLC); è poco solubile in acqua e molto solubile in alcool, nei grassi e negli olii. P.A. Bucholtz nel 1816 scoprì per la prima volta che il costituente principale del peperoncino, quello più pungente, poteva essere

estratto dai bacilli essiccati con solventi organici. Nel 1846, L. T. Thresh riportava nel *Pharmacy Journal* che questa sostanza poteva essere estratta in forma cristallina, e fu lui a darle il nome di Capsicina. Nel 1878, lo scienziato ungherese Endre Hogeny estrasse la Capsicina, che lui chiamò *capsicol*, e scoprì che questa stimolava le mucose della bocca e dello stomaco e incrementava la secrezione dei succhi gastrici. La Capsicina fu sintetizzata per la prima volta nel 1930 da E. Spath and F.S. Darling. Gli studiosi hanno identificato sei componenti naturali e uno sintetico della famiglia della Capsicina; quello sintetico viene utilizzato per dare un valore relativo del potere pungente alle altre sostanze.

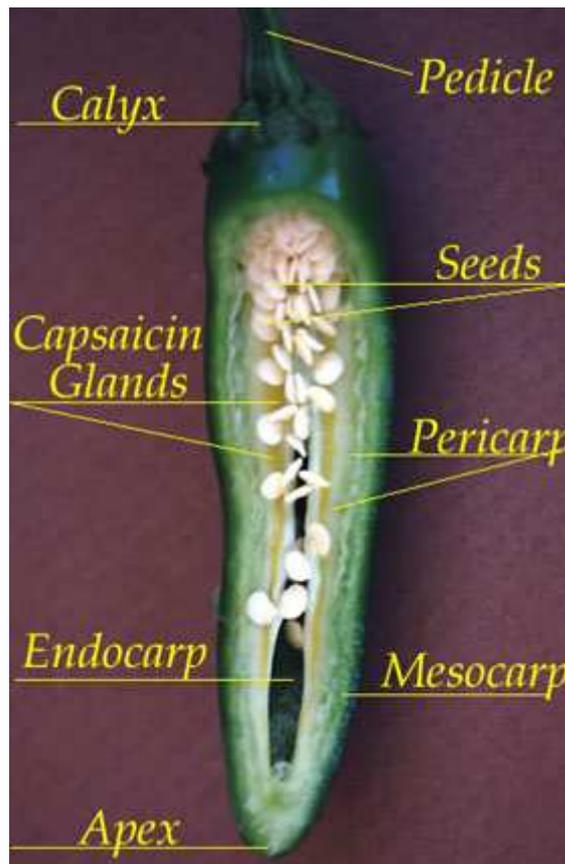


Fig. 1.2.20 Peperoncino verde

Nell'estratto cristallino troviamo Capsicina (69%), *diidrocapsaicina* (22%), e tre componenti minori: *nordiidrocapsaicina* (7%), *omocapsaicina* (1%), e *omodiidrocapsaicina* (1%). Il capsacinoide sintetico VNA (vanillylamide of nonanoic acid) fu ricavato da Anna Krajewska e John Powers dell'Università della Georgia. Il capsacinoide naturale meno irritante è il *nordihydrocapsaicin* (NDHC); a seguire troviamo *homodihydrocapsaicin* (HDHC), un composto descritto come “molto irritante” che “incendia la gola” e provoca un bruciore prolungato e difficile da sanare. I due composti più pungenti sono la *capsaicin* (C) e la *dihydrocapsaicin* (DHC), che producono infiammazioni in ogni parte del corpo, in particolare nei confronti delle mucose. L'unica differenza tra la *capsaicin* e la *dihydrocapsaicin* è la presenza del doppio legame tra gli atomi di carbonio. Se la *capsaicin* è soggetta ad idrogenazione, si forma la *dihydrocapsaicin* [Tod et al]. Nella figura 1.2.21 si riportano, per confronto, le strutture delle due molecole.

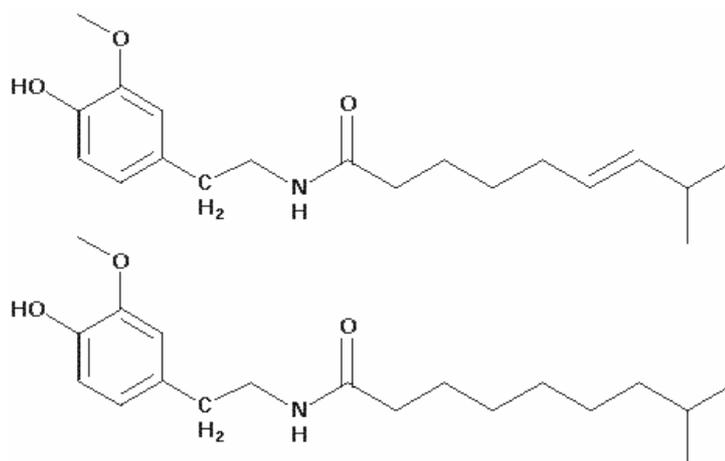


Fig. 1.2.21 Struttura della Capsicina (immagine superiore) e della *Diidrocapsaicina* (immagine inferiore)

Evidentemente i capsacinoidi hanno un effetto sinergico positivo tale da conferire l'effetto "pungente" al peperoncino, ma la Capsicina è ritenuta la componente più potente.

La Capsicina pura è talmente irritante che i ricercatori che lavorano su questa sostanza devono proteggere il corpo integralmente. Il chimico farmaceutico Lloyd Matheson, dell'Università dello Iowa, dichiarò, dopo aver inalato accidentalmente la polvere, che, anche se non era altamente tossica, avrebbe preferito morire.

Al fine di determinare la tossicità letale dei capsacinoidi negli animali sono stati condotti esperimenti su topi, ratti, porcellini e conigli. La Capsicina venne introdotta per endovena, in dosi sottocutanee e direttamente nello stomaco. La dose letale, misurata in milligrammi per chilogrammo di peso corporeo, andava da 56 a 190 mg/Kg (endovena), fino a 512 mg/Kg quando la cavia veniva introdotta all'interno di una soluzione contenente Capsicina. Comunque, la causa principale di morte era la paralisi respiratoria [DeWitt]. Per via orale l' LD_{50} è stata invece valutata pari a 119-97 mg/Kg per i topi e 161-148 mg/Kg per i ratti. Il VN (capsacinoide sintetico) ha un peso molecolare di 293,405. La tossicità del VN, nelle cavie è di circa 8 milligrammi per chilogrammo di peso corporeo; per la Capsicina, tale valore è di circa 120 milligrammi per chilogrammo di peso corporeo (circa 15 volte meno tossica). Il potere pungente viene espresso tramite la *Scoville Heat Unit* (tabella 1.2.6), in onore di Wilbur Scoville che nel 1912 diede vita a questa unità di misura. Inizialmente veniva attribuito il valore tramite il gusto; successivamente, con l'introduzione dell' HPLC la scala è stata perfezionata lasciando il nome precedente in onore dello studioso. Quindi anche

se il VN è più tossico della Capsicina naturale, questa ultima ha un potere pungente molto più grande [VN].

Nome	SHU Pungency
Capsaicin (natural)	16,000,000
Dihydrocapsaicin	16,000,000
Nordihydrocapsaicin	9,100,000
Homocapsaicin	8,600,000
Homodihydrocapsaicin	8,600,000
N-Vanillyl Octanamide	8,000,000
N-Vanillyl nonanamide (VN)	9,200,000
N-Vanillyl decanamide	4,500,000
N-Vanillyl undecanamide	3,500,000
N-Vanillyl piperonic acid amide	1,500,000

Tab. 1.2.6

Stricnina

$C_{21}H_{22}N_2O_2$ Strychnidin-10-one

La stricnina è una polvere cristallina bianca e priva di odore che può essere ingerita, inalata o può essere assunta miscelata in una soluzione anche per endovena.

È un veleno molto potente: anche una piccola dose può provocare seri danni alla salute o addirittura il decesso. La fonte principale di tale veleno si trova in natura ed è una pianta (*Strychnos nux vomica*) che si trova nell'Asia del sud e in Australia (figura 1.2.22). La Stricnina fu scoperta nel 1818 da Pelletier e Caventou nella noce vomica. La sua struttura, chiarita da R. Robinson nel 1947, fu confermata dalla sintesi totale eseguita da R.B. Woodward (figura 1.2.23). Il peso molecolare della Stricnina è 334.



Fig. 1.2.22 *Strychnos nux vomica*

Nel passato era utilizzata sotto forma di pillola per curare alcuni disturbi; attualmente è utilizzata come pesticida e, in particolar modo, contro i ratti. In casi eccezionali, si può trovare anche miscelata ad alcune droghe come l'LDS, l'eroina e la cocaina.

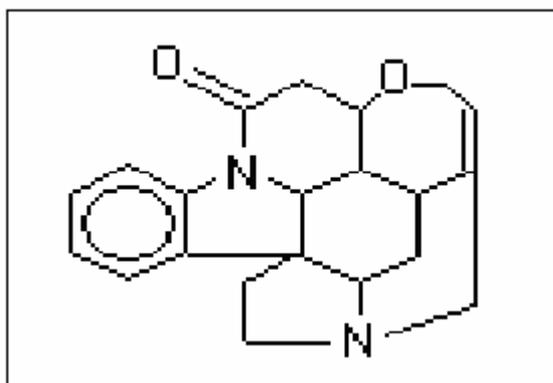


Fig. 1.2.23 *Formula di struttura della Strychnina*

A seguito della diluizione di stricnina in acqua, si può essere esposti al contagio bevendo l'acqua contaminata.

I danni causati da questo tipo di veleno dipendono dalla quantità e dal modo in cui questo viene assunto, nonché dalle condizioni fisiche del soggetto esposto al contagio. La stricnina ostacola il corretto funzionamento degli organi che inviano impulsi nervosi ai muscoli. I muscoli, in assenza di tale sistema, si contraggono violentemente, fino a che, stanchi, non garantiscono più il corretto funzionamento dell'apparato respiratorio. La dose letale di stricnina è difficile da determinare (alcuni autori sostengono che questa sia inferiore a 5-10mg). L'**LD₅₀** (indice del dosaggio letale nel 50% dei casi) è di circa 5mg per i ratti. I sintomi appaiono in un arco di tempo che va dai 15 ai 60 minuti. Le persone esposte a dosi basse o medie di stricnina possono riscontrare i seguenti segnali o sintomi: agitazione, apprensione o paura, irrequietezza, spasmi, febbre, lesioni ai reni, flessioni incontrollate del busto e del collo, arti rigidi, tosse, indolenzimento e dolore ai muscoli, difficoltà respiratorie, urina scura, perdita di coscienza. Se si viene esposti ad una dose maggiore il rischio è una notevole difficoltà respiratoria e la

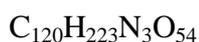
morte celebrale. Le persone colpite da Stricnina raramente sopravvivono, per cui non sono noti effetti a lungo termine di tale forma di avvelenamento, se non il coma. A seguito del contagio, occorre recarsi in ospedale e cercare di non vomitare o ingerire altri liquidi. Le cure mediche consistono nel rimuovere il veleno dall'organismo, somministrare liquidi al soggetto per endovena, fornire cure per le convulsioni e gli spasmi ed infine cercare di far scendere la temperatura del corpo [CDC, 2003 (f); Stricnina]. A titolo di confronto, in tabella 1.2.7 è stato riportato il "potere letale" di Stricnina, Ricina e Abrin prendendo come riferimento il Sarin, il cui potere è stato posto pari a 1000.

Potere letale	Sostanza
1000	Sarin
10-100	Ricina, cristallina
10-100	Abrin, cristallina
100-1000	Ricina, amorfa
1000-10000	Stricnina

Tab. 1.2.7

Agenti chimici derivati da organismi marini

Palitoxina



La Palitoxina è considerata uno dei prodotti naturali di struttura più complessa. A causa della sua struttura e della sua tossicità, la Palitoxina può essere comparata alla Stricnina. È la tossina di natura non proteica che

ha il più alto potere mortale, caratterizzata da un'azione 50 volte più potente rispetto a quella della Saxitoxina. Il suo meccanismo di azione ha risvegliato un notevole interesse in campo farmacologico per trattare le cellule malate.

I primi rapporti sulla Palitoxina furono pubblicati da Paul J. Scheuer nel 1964 e ne descrivevano la natura velenosa a partire dall'animale da cui fu isolata, un zoantideo (un tipo corallino) del genere *Palythoa* (figura 1.2.24). In quei trattati, Scheuer mostra la suscettibilità della tossina ad acidi e basi, la difficoltà nell'ottenere dati corretti dall'analisi elementare ed ancora il fatto che lo stesso animale presenta variazioni nella composizione.

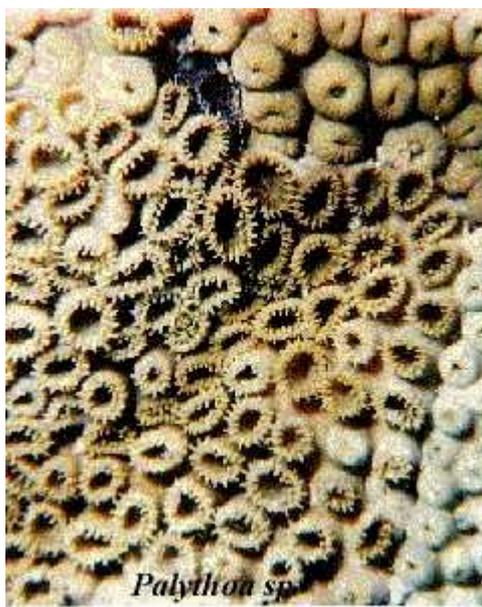


Fig. 1.2.24 *Palythoa toxica*

Nel 1971, Scheuer e Richard E. Moore pubblicarono un articolo nel periodico Scienza, spiegando le modalità di isolamento della Palitoxina, effettuata basandosi su una leggenda delle Hawaii che narrava:

“A Muolea, nel distretto di Hana, si sviluppò un muschio velenoso in una piccola piscina di acqua salata vicina all'oceano. Tale muschio fu usato come esca nella pesca, e diventò fatale. ... Il muschio è di colore rosso, ed ancora può essere trovato, comunque in un solo luogo”.

La leggenda narra ancora che, ogni qualvolta gli uomini di quella zona uscivano a pesca, almeno uno di loro scompariva. Nel tempo, i natii non riuscivano a capire quello che accadeva. I pescatori cominciarono a diffidare di un contadino che viveva in quella zona, ed un giorno, lo uccisero utilizzando la mascella di uno squalo. Fatto ciò gettarono le ceneri dell'uomo in mare. Secondo la leggenda, l'alga velenosa fu denominata “l'alga mortale di Hana”.

Quando è stata isolata, la Palitoxina è stata considerata la sostanza non-proteica più velenosa al mondo. Sono passati 10 anni dalla prima raccolta dell'alga per ottenere la Palitoxina nella sua forma pura, ed altri 10 anni per la determinazione strutturale e completa del Palitoxina, pubblicata solamente nel 1981.

La vera origine è batterica, apparentemente dal batterio del genere *Vibrio*; la Palitoxina possiede 64 atomi di carbonio asimmetrici (figura 1.2.25). il suo peso molecolare è 2700 [Franz David] ed è molto solubile in acqua [Palytoxin].

In seguito all'isolamento, si è osservato che la Palitoxina risultava velenosa per cani, conigli, scimmie, criceti e topi in dosi tra 0,033 e 0,45 mg/Kg. Il tempo di manifestazione dei sintomi è molto basso: pochi minuti. Hashimoto isolò anche la Palitoxina di *Palythoa tuberculosa*, e portò a termine la determinazione strutturale della stessa in parallelo agli autori americani.

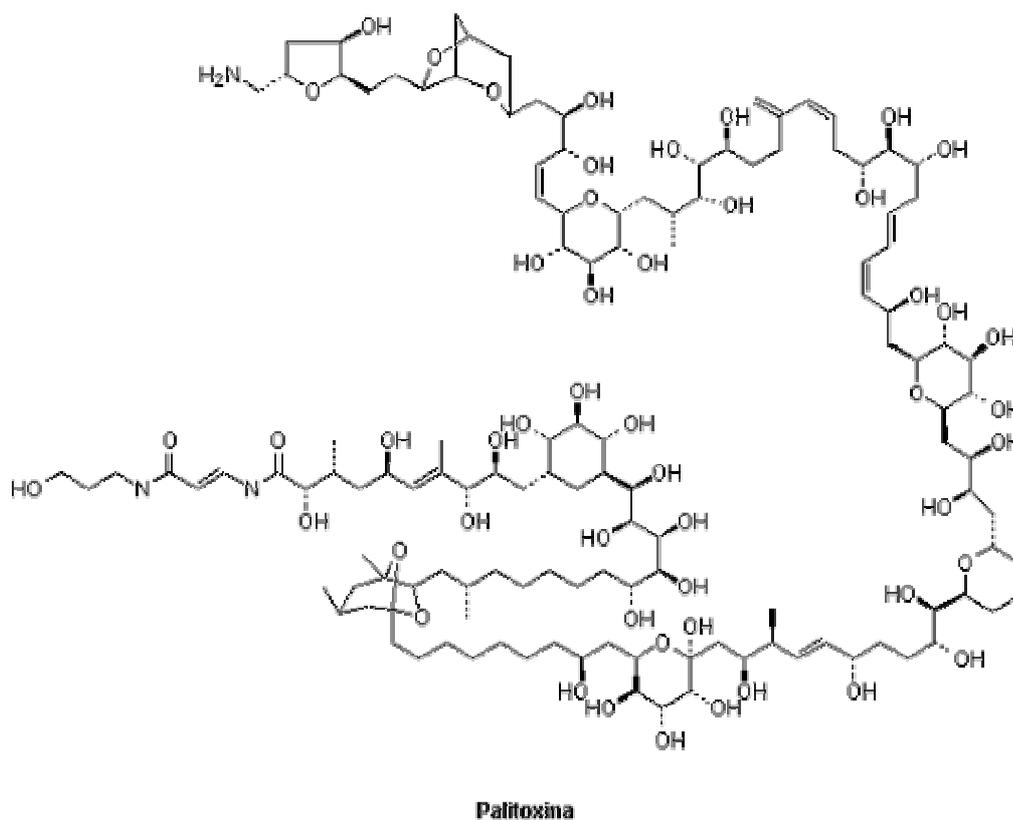


Fig. 1.2.25 Formula di struttura della Palitoxina

La determinazione strutturale è consistita fondamentalmente in esperimenti con periodato od ozono. I lavori di scoperta, isolamento e delucidazione strutturale della Palitoxina sono raccolti in due pubblicazioni ad opera di Moore [Moore], commentati da Shimizu. La LD₅₀ nei topi è stata stimata pari a 0,15 µg/Kg. I sintomi di avvelenamento da Palitoxina includono: paralisi crescente, contrazioni ventrali, dilazione e paralisi delle membra, diarrea, convulsioni e morte per collasso respiratorio. A causa della sua tossicità, la Palitoxina ha poca utilità pratica come medicinale (ne è stato esaminato l'uso come anestetico locale nel campo della chirurgia maxillo-facciale) ma possiede grande versatilità come attrezzo biochimico, perché colpisce innumerevoli processi, principalmente il

trasporto di ioni di calcio. Non esistono ancora antidoti per questo veleno [Berlinck; Palitoxina].

Saxitoxina

$[C_{10}H_{19}N_7O_4]^{2+}$ 2,6-Diamino-4-[[[(aminocarbonyl)oxy]methyl]-3a,4,8,9-tetrahydro-1H,10H-pyrrolo[1,2-c]purine-10,10-diol.

La Saxitoxina è un prodotto dei batteri che crescono in alcuni organismi, compresi i dinoflagellati *Gonyaulax catenella* e *Gonyaulax tamarensis* (figura 1.2.26). Il suo nome deriva dal mollusco, all'interno del quale è stata riscontrata per la prima volta (*Saxidomus giganteus*).

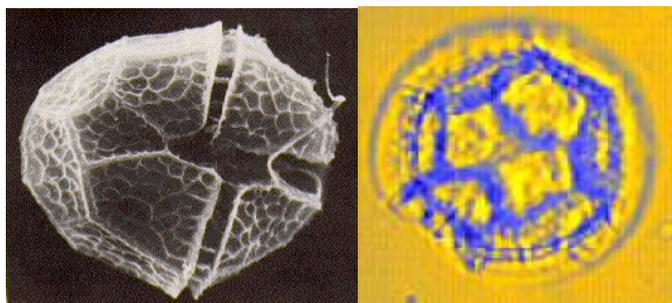


Fig. 1.2.26 *Gonyaulax catenella*

La prima sintesi della Saxitoxina fu completata da Kishi e dai suoi collaboratori ad Harvard nel 1977. Successivamente, una seconda sintesi fu effettuata ad opera di Jocobi ed i suoi collaboratori, nell'università di Wesleyan, nel Connecticut (figura 1.2.27). La Saxitoxina è solubile in acqua e si può trovare anche sotto forma di aerosol. L'US Military ha indicato questa tossina con la sigla SS, ma è anche nota come *Mytilotoxin*. Ha un peso molecolare pari a 299 [Saxitoxin]. La natura polare della molecola la porta ad essere rapidamente solubile in acqua ed

insolubile nei solventi organici. È stabile nelle soluzioni con un pH neutro oppure un po' acidulo, anche ad alte temperature.

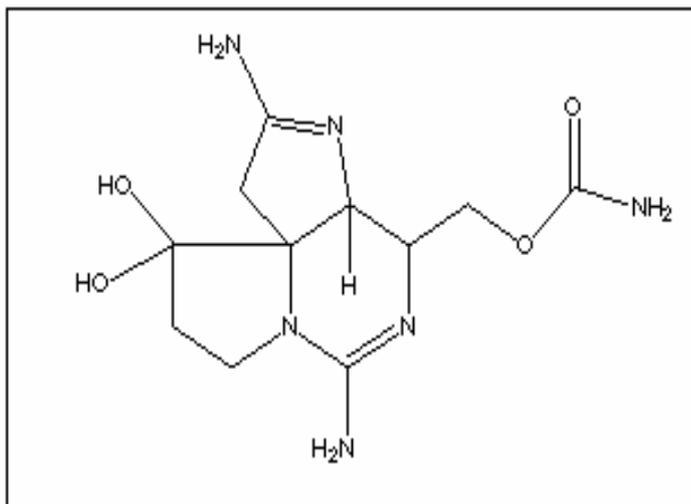


Fig. 1.2.27 Formula di struttura della Saxitoxina

Esperimenti sui topi hanno portato alla compilazione di una tabella (Tab.1.2.8) nella quale si riportano i valori della LD₅₀ per i topi per diverse modalità di somministrazione del veleno.

Toxicity in Mice	
Via	LD ₅₀ (mg/kg)
Intravenoso	3-9
Intraperitoneale	10
Orale	263
Inalazione	<2 (in hamsters)

Tab. 1.2.8

Il meccanismo d'azione della Saxitoxina è quello di bloccare in modo irreversibile la trasmissione dei neuroni, inibendo il trasporto di ioni sodio.

Nel 1987 un gruppo di scienziati marini presentarono una serie di disturbi tipici delle balene e di altri organismi marini. Nel caso delle balene la causa della morte fu attribuita all'inquinamento, fino a che, a seguito di esami *post-mortem*, si rilevò che nessuno di questi animali presentava segni che potessero attribuire il decesso a questa causa. Alla fine dello stesso anno si verificarono altri due incidenti molto più gravi, che coinvolgevano un gruppo di uomini. I sintomi registrati furono: stati confusionali, diarrea e vomito, perdita di orientamento, affanno respiratorio e irritazione agli occhi. Alla fine morirono tre persone ed un centinaio riportarono seri danni.

La causa di questi incidenti fu attribuita ad una sostanza naturale; nei fatti, furono identificate diverse fonti: una serie di organismi algali che producevano una potente biotossina. Una di queste prese il nome appunto di Saxitoxina, definita come una delle più potenti tossine non-proteiche conosciute. Queste specie algali non attaccano direttamente l'organismo umano; esse costituiscono fonte di nutrimento per alcuni molluschi, che concentrano così la tossina nel loro interno. Quando le persone consumano i frutti di mare contaminati, rapidamente risentono dell'effetto della tossina. La sindrome è nota con la sigla PSP (paralytic shellfish poisoning). La morte sopraggiunge in un arco di tempo che va dalle 2 alle 12 ore: solo un tempestivo intervento di cure mediche può far sì che nella maggior parte dei casi di intossicazione non si arrivi alla morte.

In condizioni adatte questi organismi algali crescono molto rapidamente, portando ad uno spettacolare fenomeno visivo, noto come *red tides* (onde rosse). Si tratta di un problema in continua crescita, responsabile dell'inquinamento delle fasce costiere. La maggior parte delle coste orientali del Nord America ed alcune zone della costa occidentale sono affette da questo problema. Queste alghe si trovano anche in Australia ed in molti allevamenti di frutti di mare. Alcune persone che camminavano in riva al mare, durante il fenomeno del red tides, hanno accusato problemi di respirazione, per inalazione delle polveri tossiche [Saxitoxina; Edwards; ARET].

Agenti biologici

Si definisce **agente biologico** qualsiasi microrganismo, anche se geneticamente modificato, coltura cellulare ed endoparassita umano che potrebbe provocare infezioni, allergie o intossicazioni.

L'esame degli agenti biologici ha avuto come punto di partenza la tabella riportata nel D.Lgs. 626/94 [allegato XI (ELENCO DEGLI AGENTI BIOLOGICI CLASSIFICATI)]. Un attacco con tali agenti potrebbe essere particolarmente pericoloso in quanto sono sufficienti modeste quantità per ottenere infezioni su vasta scala; si noti però che la maggior parte degli agenti biologici sono attaccati dal cloro residuo presente nelle reti idriche (ad esempio il *Vibrio cholerae*) con la sua conseguente rapida diminuzione che, a seguito di monitoraggio, può rapidamente rendere edotti dell'esistenza di un problema. Si definisce agente biologico del gruppo 3: un agente che può causare malattie gravi in soggetti umani e costituisce un serio rischio per i lavoratori; l'agente biologico può propagarsi

nella comunità, ma di norma sono disponibili efficaci misure profilattiche o terapeutiche.

Si definisce agente biologico del gruppo 4: un agente biologico che può provocare malattie gravi in soggetti umani e costituisce un serio rischio per i lavoratori e può presentare un elevato rischio di propagazione nella comunità; non sono disponibili, di norma, efficaci misure, profilattiche o terapeutiche. La maggior parte degli agenti biologici può essere immessa nell'ambiente sotto forma di aerosol ed attaccare direttamente le vie respiratorie. Se introdotti però all'interno delle acque, alcuni batteri vengono annientati, mentre altri resistono a trattamenti come la clorazione (vedi *Cryptosporidium*) [Burrows et al,1998].

Gli eventi associati alla contaminazione di tipo biologico possono generalmente essere raggruppati in: inadempienze del sistema, eventi catastrofici e atti intenzionali. I metodi tradizionalmente utilizzati per la rilevazione delle sostanze biologiche in acqua [Moe,1999] seguono tre steps:

- ▶ **Recupero e Concentrazione:** si basa sulle rilevazione di basse concentrazioni di microrganismi in acqua tramite filtrazione, centrifugazione o precipitazione. Tali metodi non sono rapidi.
- ▶ **Purificazione e Separazione:** in questo caso ci sono diverse tipologie di intervento che includono metodi fisici (variazione di densità), metodi chimici (cromatografia) e metodi immunochimici (separazione immunogenetica).
- ▶ **Rilevazione e Identificazione:** questo passo è molto spesso accompagnato dalla cultura intenzionale dei microrganismi per

aumentare la rilevabilità. I metodi di identificazione includono analisi biochimiche, immunologiche e analisi sugli acidi nucleici.

I sistemi di rilevazione tradizionali offrono l'identificazione di una singola tipologia di microrganismo con tempi di attesa notevoli (24 ore per i metodi che utilizzano la cultura dei microrganismi). Per la rilevazione in qualche ora del microrganismo è necessaria la crescita di colonie di batteri per poter rendere visibile la contaminazione. Per superare questo inconveniente, le singole cellule dovrebbero essere etichettate con un segnale che ne consenta la rapida rilevazione. In alternativa, il DNA o l'RNA di ogni cellula devono essere amplificati utilizzando tecniche molecolari di reazione. I metodi risulterebbero quantitativi o semiquantitativi per fornire anche un'idea della grandezza del fenomeno di contaminazione. Altri metodi in fase di studio consentirebbero la rilevazione del contaminante in 30 minuti attraverso l'uso di laser ottici; altri ancora studiano il problema con l'impiego di tecnologie ottiche come la fluorescenza, la luminescenza ed altre ancora [EWM,1999].

BATTERI e organismi simili

Agente biologico	Classificazione	Rilievi
Bacillus anthracis	3	-
Brucella abortus	3	-
Brucella canis	3	-
Brucella melitensis	3	-
Brucella suis	3	-
Burkholderia mallei (pseudomonas mallei)	3	-

Burkholderia pseudomallei (pseudomonas pseudomallei)	3	-
Chlamydia psittaci (ceppi aviari)	3	-
Coxiella burnetii	3	-
Escherichia coli, ceppi verocitotossigenici (es.O157:H7 oppure O103)	3	T
Francisella tularensis (Tipo A)	3	-
Mycobacterium africanum	3	V
Mycobacterium bovis (ad eccezione dei ceppo BCG)	3	V
Mycobacterium leprae	3	-
Mycobacterium microti	3	-
Mycobacterium tuberculosis	3	V
Mycobacterium ulcerans	3	-
Rickettsia akari	3	-
Rickettsia canada	3	-
Rickettsia conorii	3	-
Rickettsia montana	3	-
Rickettsia typhi (Rickettsia mooseri)	3	-
Rickettsia prowazekii	3	-
Rickettsia rickettsii	3	-
Rickettsia tsutsugamushi	3	-
Salmonella typhi	3	V
Shigella dysenteriae (Tipo 1)	3	T
Yersinia pestis	3	V

VIRUS

Agente biologico	Classificazione	Rilievi
LCM-Lassa Virus complex (Arenavirus del Vecchio Mondo) :		
Virus Lassa	4	-
Virus della coriomeningite linfocitaria (ceppi	3	-

neurotropi)		
Virus complex Tacaribe (Arenavirus del Nuovo Mondo) :		
Virus Guanarito	4	-
Virus Junin	4	-
Virus Sabia	4	-
Virus Machupo	4	-
Virus Flexal	3	-
Virus Oropouche	3	-
Hantavirus:		
Hantaan (febbre emorragica coreana)	3	-
Seoul-Virus	3	-
Sin Nombre (ex Muerto Canyon)	3	-
Nairovirus:		
Virus della febbre emorragica di Crimea/Congo	4	-
Phlebovirus:		
Febbre della Valle del Rift	3	V
Caliciviridae :		
Virus dell'epatite E	3	-
Filoviridae :		
Virus Ebola	4	-
Virus di Marburg	4	-
Flaviviridae :		
Encefalite d'Australia (Encefalite della Valle Murray)	3	-
Virus dell'encefalite da zecca dell'Europa Centrale	3	V
Absettarov	3	-
Hanzalova	3	-
Hypr	3	-
Kumlinge	3	-

Virus della dengue tipi 1-4	3	-
Virus dell'epatite C	3	D
Virus dell'epatite G	3	D
Encefalite B giapponese	3	V
Foresta di Kyasanur	3	V
Louping ill	3	-
Omsk (a)	3	V
Powassan	3	-
Rocio	3	-
Encefalite verno-estiva russa (a)	3	V
Encefalite di St. Louis	3	-
Virus Wesselsbron	3	-
Virus della Valle del Nilo	3	-
Febbre gialla	3	V
Hepadnaviridae:		
Virus dell'epatite B	3	V, D
Virus dell'epatite D (Delta) (b)	3	V, D
Herpesviridae:		
Herpesvirus simiae (B virus)	3	-
Poxviridae:		
Monkeypox virus	3	V
Variola (mayor & minor) virus	4	V
Whitepox virus (variola virus)	4	V
Retroviridae		
Virus della sindrome di immunodeficienza umana (AIDS)	3	D
Virus di leucemie umane a cellule T (HTLV) tipi 1 e 2	3	D
SIV (h)	3	-

Rhabdoviridae:	-	-
Virus della rabbia	3	V
Alfavirus:		
Encefalomyelite equina dell'America dell'est	3	V
Virus Chikungunya	3	-
Virus Everglades	3	-
Virus Mayaro	3	-
Virus Mucambo	3	-
Virus Ndumu	3	-
Virus Tonate	3	-
Encefalomyelite equina del Venezuela	3	V
Encefalomyelite equina dell'America dell'Ovest	3	V
Virus non classificati:		
Virus dell'epatite non ancora identificati	3	D
Morbillivirus equino	4	-
Agenti non classici associati con le encefaliti spongiformi trasmissibili (TSE) (i) :		
Morbo di Creutzfeldt-Jakob	3	D
Variante del morbo di Creutzfeldt-Jacob	3	D
Encefalite spongiforme bovina (BSE) ed altre TSE degli animali a queste associate	3	D
Sindrome di Gerstmann-Stráussler-Scheinker	3	D
Kuru	3	D

PARASSITI

Agente biologico	Classificazione	Rilievi
Echinococcus granulosus	3	-
Echinococcus multilocularis	3	-
Echinococcus vogeli	3	-
Leishmania braziliensis	3	-

Leishmania donovani	3	-
Naegleria fowleri	3	-
Plasmodium falciparum	3	-
Taenia solium	3	-
Trypanosoma brucei rhodesiense	3	-
Trypanosoma cruzi	3	-

FUNGI

Agente biologico	Classificazione	Rilievi
Blastomyces dermatitidis (Ajellomyces dermatitidis)	3	-
Cladophialophora bantiana (es. Xylohypha bantiana, Cladosporium bantianum o trichoides)	3	-
Coccidioides immitis	3	A
Histoplasma capsulatum var. capsulatum (Ajellomyces capsulatum)	3	-
Histoplasma capsulatum duboisii	3	-
Paracoccidioides brasiliensis	3	-

Tab 1.2.9

A: possibili effetti allergici;

D: l'elenco dei laboratori che hanno operato con detti agenti deve essere conservato per almeno dieci anni dalla cessazione dell'ultima attività comportante rischio di esposizione;

T: produzione di tossine;

V: vaccino efficace disponibile.

La disamina degli agenti biologici ha portato ad identificare un gruppo di agenti di particolare interesse:

Brucella

La Brucellosi è una malattia infettiva provocata da un batterio del genere *Brucella*. Questo batterio inizialmente si trasmetteva tra gli animali e provocava disturbi in molti vertebrati. La *Brucella* può essere: *abortus*, *canis*, *melitensis* e

suis. Le diverse specie della *Brucella* colpiscono le pecore, le capre, i bovini, i cervi, le alci, i maiali, i cani e molti altri animali. Gli esseri umani possono essere infettati venendo a contatto con gli animali contaminati o i loro prodotti. Nel genere umano i sintomi della malattia sono svariati e spesso simili a quelli influenzali (febbre, emicrania, debolezza). L'infezione si può poi estendere al sistema nervoso centrale o alle arterie principali. In alcuni casi la Brucellosi provoca anche patologie croniche che includono febbre ricorrente, dolori alle articolazioni e stanchezza.

La Brucellosi si può trovare facilmente in quei paesi dove gli animali non sono tenuti sotto controllo: in particolare se non esistono standard che riguardano la salute delle specie animali. Le aree considerate ad alto rischio sono il bacino del Mediterraneo (Portogallo, Spagna, Grecia, Nord Africa), l'America Centrale e Meridionale, l'Europa dell'Est, l'Asia, l'Africa e il Medio Oriente.

Le modalità con cui le persone possono venire a contatto col batterio sono:

- ingestione di cibi e bevande contaminati: sicuramente è la più comune, soprattutto se riferita all'ingestione di latte non pastorizzato;
- respirazione di aria dove risiede il batterio: il rischio di inalazione è elevato soltanto se ci riferiamo ad impiegati in laboratori dove avviene la coltivazione della *Brucella*;
- introduzione del batterio nel corpo tramite una ferita.

Il contagio diretto tra due persone è estremamente raro. Una donna incinta può trasmettere il batterio al feto; si può venire in contatto tramite un rapporto sessuale non protetto. La diagnosi del contagio viene effettuata in laboratorio

analizzando campioni di sangue o di midollo osseo. In ogni caso per il genere umano non è disponibile un vaccino ed il trattamento può essere molto difficoltoso [CDC,(n)]. La dose effettiva che genera il contagio nel 50% dei casi (**ED₅₀**) per assunzione orale di Brucella è di 10⁶ organismi. L'assunzione di acqua contaminata da una concentrazione di 100 organismi/l è infettiva se si ingeriscono 5l/giorno di acqua per 7 giorni. La Brucella melitensis può sopravvivere in acqua per 20-72 giorni [Burrows et al, 1998].

Francisella tularensis

La Tularemia è un'infezione provocata da un pericoloso batterio, la *Francisella tularensis*, trovato negli animali (in particolare nei roditori, nei conigli e nelle lepri).

La Tularemia è una delle armi biologiche che furono accumulate dalle forze armate statunitensi intorno al 1960; furono poi distrutte nel 1973. L'Unione Sovietica continuò fino al 1990 la produzione di vaccini e antibiotici, che resistessero al virus.

La *Francisella tularensis* è un organismo che resiste alle basse temperature. Si divide in due specie: tipo-A, isolato nel Nord America e molto pericoloso per gli uomini e gli animali; tipo-B, che è relativamente meno pericoloso del tipo-A, diffuso in Asia e in Europa.

Si può essere infettati in diversi modi, come per esempio attraverso la puntura di un insetto, toccando carcasse di animali infetti, mangiando cibo infetto, per inalazione oppure bevendo acqua contaminata.

I sintomi della tularemia sono: improvvisa febbre alta, mal di testa, muscoli indolenziti, dolore alle articolazioni, tosse secca, debolezza, polmonite. I soggetti con polmonite presentano dolori al petto ed espulsione di sangue con la saliva, e spesso difficoltà di respirazione. Altri sintomi dipendono dalla modalità di infezione: ulcere sulla pelle e sulla bocca, ghiandole gonfie e con presenza di liquidi, occhi gonfi e gola infiammata.

I sintomi appaiono solitamente dopo 3 giorni dall'esposizione, ma in alcuni casi si possono riscontrare anche dopo 14 giorni.

Per quanto si sa, il contagio non può avvenire tramite il contatto tra persone. Le persone contagiate richiedono cure immediate mediante l'utilizzo di particolari antibiotici [CDC, 2002; Dennis et al, 2001]. Per infettare una persona per via orale occorrono 10^8 organismi. La concentrazione di 10^6 organismi/l è infettiva se si assumono 5l/giorno per 7 giorni. Il virus persiste in acqua per mesi e alcuni studi mostrano che trattamenti con il cloro sono inefficaci contro la *Francisella tularensis* [Burrows et al, 1998].

Salmonella

La Salmonellosi è un'infezione provocata del batterio noto come *Salmonella*. Il batterio della *Salmonella* è presente in diverse tipologie (*arizonae*, *enteritidis*, *typhimurium*, *paratyphi A,B,C* e *typhi*) e si trasmette tramite le feci. Fu scoperto dallo scienziato americano Salmon da cui ha preso il nome.

La maggior parte delle persone che contraggono il virus mostrano i seguenti sintomi: diarrea, febbre e crampi addominali entro 72 ore dal contagio. In alcuni casi il contagio comporta anche irritazione agli occhi e alle vie urinarie e dolori

alle ossa che possono persistere per anni e possono provocare artriti croniche difficili da curare. La malattia generalmente dura 4-7 giorni e le persone contagiate possono essere ricoverate anche senza alcun trattamento specifico: solo in alcuni casi lo sviluppo della malattia genera disturbi che necessitano di cure intensive. In questi casi l'infezione può passare dall'intestino al sangue e porta alla morte se non viene curata con antibiotici.

La *Salmonella* vive nei tratti intestinali dell'uomo e degli animali, compresi gli uccelli. Si trasmette generalmente ingerendo cibi o acqua contaminati dalle feci. Generalmente i cibi contaminati non presentano variazioni di gusto e di odore rispetto a quelli non contaminati. La contaminazione riguarda sia i cibi di origine animale (carne, latte, uova) che di origine vegetale. La cottura di questi cibi può determinare il decesso del batterio. La contaminazione può avvenire anche se non si provvede ad una corretta igiene personale non lavandosi le mani con sapone.

Le persone più a rischio sono i bambini che non hanno ancora sviluppato gli anticorpi necessari e che, quindi, hanno più probabilità che il virus si sviluppi in modo tale da portare al decesso.

Non esiste un vaccino per prevenire la Salmonellosi [CDC,(o)].

L'**ED₅₀** per la *Salmonella* è stimato 10^5 organismi. Mediamente una dose di 10^4 organismi corrisponde ad una concentrazione del virus in acqua pari a 100 organismi/l assumendo per 7 giorni 15l/giorno di acqua. La *Salmonella* permane per circa 8 giorni in acqua. A seguito di trattamenti con il cloro il virus scompare (esperienze statunitensi in reti idriche cittadine) [Burrows et al,1998].

Vibrio cholerae

Il Colera è una malattia provocata dall'infezione intestinale ad opera del *Vibrio cholerae*. L'infezione spesso si presenta senza sintomi e quindi in forma lieve; in altri casi può essere molto più intensa. Approssimativamente una persona su venti contrae il virus in maniera intensa con manifestazioni di diarrea, vomito e crampi alle gambe. In questi casi, la perdita rapida dei fluidi corporei porta alla disidratazione e provoca shock. Senza cure adeguate si arriva al decesso in poche ore. Le persone possono venire a contatto con il virus bevendo acqua contaminata o ingerendo cibi contaminati. Generalmente durante un'epidemia la forma più semplice di contrarre il virus è venire a contatto con le feci di esseri infetti.

Il batterio vive anche nelle acque salmastre e nelle zone costiere, per cui mangiare frutti di mare crudi può portare il contagio. Il virus non si trasmette tramite semplice contatto con una persona infetta.

Il contagio avviene anche viaggiando in zone a rischio. Per questo ai turisti viene raccomandato di:

- bere solo acqua che è stata bollita o trattata con cloro o iodio;
- mangiare solo cibi ben cotti quando sono ancora caldi;
- evitare cibi crudi e frutti di mare;
- evitare di comperare cibi dai venditori ambulanti.

Recentemente sono stati preparati dei vaccini che procurano una certa immunità dal virus. Comunque il Colera viene trattato ripristinando i fluidi e i sali persi a causa della diarrea. I casi critici vengono trattati con fluidi per endovena ed un pronto intervento riduce la probabilità di decesso [CDC, (p)].

Una dose di 10^3 organismi risulta infettiva per un individuo sano. All'interno dell'acqua potabile una concentrazione di 10 organismi/l può essere infettiva se si consumano 5l/giorno di acqua per 7 giorni. Il virus del colera permane circa per 16 giorni all'interno dell'acqua. Il virus viene eliminato facilmente con il cloro [Burrows et al,1998].

Febbre Emorragica Virale

La febbre emorragica virale (VHFs) si riferisce ad un gruppo di malattie provocate da diverse famiglie di virus. I virus associati alla VHFs sono di origine zoonotica (risiedono negli animali): per la maggior parte roditori e artropodi. In generale con il termine "febbre emorragica virale" si indica una sindrome che attacca diverse parti del corpo. Il virus della febbre emorragica si trasmette tramite il contatto con materiale fecale, urina, saliva o altri fluidi corporei. Si sviluppa inizialmente nei roditori ed il contagio avviene anche tramite il contatto tra una persona infetta e una sana. Inizialmente i sintomi sono: febbre, affaticamento, capogiri ed altro. Alcuni soggetti mostrano emorragie ed in alcuni casi si presentano malfunzionamenti del sistema nervoso e renale e si può giungere al decesso dell'individuo.

I principali virus che provocano questa malattia sono: Arenavirus e Filovirus.

Arenaviruses

L' *Arenaviridae* è una famiglia di virus a cui appartiene l'Arenavirus. I componenti di questa famiglia sono generalmente associati alla trasmissione del virus tramite roditori (nei quali si sviluppa il virus). L'Arenavirus si sviluppa

comunemente anche negli esseri umani in alcune parti del mondo. Le particelle del virus sono sferiche con un diametro di 110-130nm e sono racchiuse in una membrana di grasso. Il nome “Arenavirus” deriva dal fatto che viste in sezione le particelle mostrano dei grani (in latino “arena” significa “sabbia”).

Filoviruses

Il Filovirus appartiene alla famiglia di virus chiamata “*Filoviridae*” e provoca febbre emorragica in diverse specie umane.

Di questa famiglia sono stati individuati due virus: *Marburg virus* e *Ebola virus*.

Ebola virus

La febbre emorragica provocata dal virus dell’Ebola è in genere molto intensa e porta alla morte degli organismi umani e dei primati (scimmie, gorilla e scimpanzé). Esistono quattro tipologie di virus dell’Ebola che attaccano gli esseri umani: Ebola-Zaire, Ebola-Sudan, and Ebola-Ivory Coast. Il quarto, Ebola-Reston, è causa di decesso solo per i primati. Nella figura 1.2.28 è riportato il virus dell’Ebola visto al microscopio.

L’infezione da Ebola è molto intensa: le modalità di sviluppo del virus non sono ancora note, ma si può dire che il contagio di un essere umano avviene tramite il contatto con un animale infetto, in particolare tramite il contatto con il sangue o con le secrezioni degli animali. Una volta contagiato un essere umano, il virus attacca anche le persone a stretto contatto con la persona infetta, facilmente esposte alle secrezioni del malato o comunque a contatto con oggetti toccati dal malato.

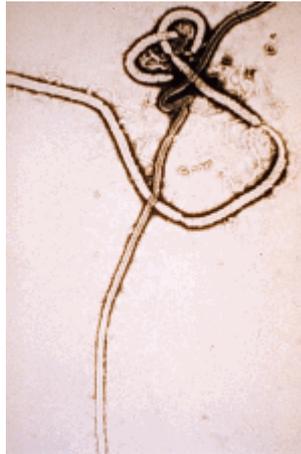


Fig. 1.2.28 *Virus Ebola visto al microscopio*

Il periodo di incubazione del virus va da 2 a 21 giorni. La malattia si sviluppa con febbre, diarrea, vomito, dolori allo stomaco, occhi rossi ed emorragie. Non esistono delle cure standard per il trattamento di questa malattia: di solito la cura consiste nel ripristinare i fluidi corporei persi dall'individuo ed indurre una corretta respirazione.

Marburg virus

La febbre emorragica provocata dal virus Marburg è una forma rara ma potente che colpisce uomini e primati. Fu scoperto per la prima volta nel 1967 quando la febbre emorragica si manifestò contemporaneamente nei laboratori di Marburg e Francoforte in Germania ed a Belgrado nell'ex Jugoslavia. La malattia contagiò sia coloro che lavoravano nel laboratorio sia le famiglie di queste persone. Le persone infettate vennero a contatto con il virus tramite le scimmie africane che erano state portate nei laboratori per ricerche.

Attualmente non si conosce ancora bene la modalità con cui il virus entra a contatto con gli esseri umani, ma è noto che le persone contaminate possono

trasmettere il virus ad altre persone tramite il contatto tra i fluidi corporei o il sangue.

Il periodo dell'incubazione dura 5-10 giorni; la malattia si manifesta con febbre, brividi e mal di testa. Sopraggiungono poi dolori allo stomaco, vomito e diarrea. Successivamente si può avere perdita di conoscenza, shock, emorragie e perdita della funzionalità di alcuni organi. Il ricovero in ospedale può essere prolungato anche a causa di infiammazioni degli occhi, delle ghiandole e della colonna vertebrale. La malattia è fatale nel 25% dei casi [CDC,(q)]. Alcuni autori suggeriscono che la dose infettiva nel 50% dei casi (**ID₅₀**) è di 1 µg, che equivale a 10⁵-10¹⁰ particelle. Ingerire una dose di 10⁵ corrisponde a bere circa 5l/giorno di acqua con una concentrazione di 3000 particelle/litro [Burrows et al,1998].

Cryptosporidium

La Cryptosporidiosi è una malattia provocata da un agente patogeno (*Cryptosporidium*) che vive all'interno dell'intestino degli animali e degli uomini. Il sintomo più comune di questa malattia è la diarrea. Inoltre si possono presentare anche dolori addominali, nausea, febbre, disidratazione e perdita di peso. I sintomi si sviluppano generalmente in 4-6 giorni. Gli individui che presentano un sistema immunitario sano abbattano il virus in poco tempo. Altre persone, che per esempio già soffrono di determinate patologie, necessitano, invece, di un ricovero prolungato e cure adeguate. La Cryptosporidiosi non è semplice da diagnosticare ed occorrono esami specifici. Le persone possono venire a contatto con il parassita in modo molto semplice se, per esempio, portano a contatto con la bocca mani sporche che sono venute a contatto con feci di animali o esseri umani infetti.

Il parassita si trasmette anche al contatto tra persona infetta e persona sana ed è molto facile il contagio all'interno di gruppi sociali. La Cryptosporidiosi può essere contratta anche ingerendo acqua o cibo contaminato. Per quanto riguarda l'acqua, si può essere contaminati bevendo acqua non trattata (di ruscelli e fiumi) o acqua di piscina nuotando. Per quanto concerne il cibo, il parassita si trasmette con cibi non cotti, frutta e ortaggi non lavati accuratamente ed altre cose.

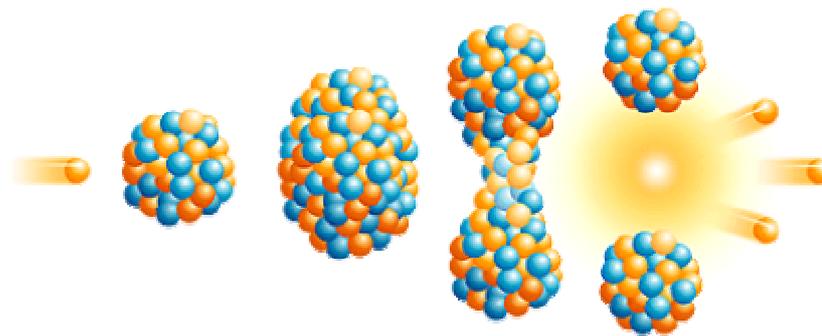
Il *Cryptosporidium* fu scoperto all'interno del corpo umano per la prima volta nel 1976. Dal 1982 il numero di casi di persone contagiate da questo parassita è aumentato notevolmente anche a seguito dello sviluppo dell'AIDS. Nel 1987, in Georgia, 13000 persone si ammalarono a seguito della contaminazione del sistema idrico cittadino di Carrollton. Nella primavera del 1993 nel Wisconsin, a Milwaukee, 400000 persone si ammalarono a seguito sempre della contaminazione del sistema idrico cittadino. Purtroppo la disinfezione per clorazione non risolve il problema della presenza di *Cryptosporidium* [Burrows et al,1998; Cryptosporidium; Cryptosporidiosis].

Agenti radioattivi

In linea generale, l'attacco mediante agenti radioattivi per un attentato ad una rete idrica appare abbastanza improbabile; infatti sembra difficile potersi approvvigionare delle quantità necessarie per compiere un simile atto. Inoltre tali materiali possono più facilmente essere utilizzati per altre tipologie di attacchi terroristici.

Gli atomi che si trovano in natura possono essere stabili o instabili. Un atomo si dice stabile se le forze tra le particelle, che costituiscono il nucleo, si bilanciano. Sono instabili, e quindi radioattivi, se tali forze non si bilanciano e, quindi, nel

nucleo è presente un eccesso di energia interna. L'instabilità del nucleo di un atomo può derivare da un eccesso di protoni o neutroni. Un atomo radioattivo cerca di raggiungere la stabilità espellendo dal nucleo le particelle subatomiche o rilasciando energia sotto diverse forme. Un numero limitato di atomi, come per esempio Uranio-235 e Plutonio-239, hanno nuclei che possono facilmente essere destabilizzati tramite collisione di neutroni. Questi nuclei si dividono (fissione) in due parti approssimativamente della stessa dimensione, rilasciando una quantità di energia superiore a quella rilasciata in un normale processo di decadimento radioattivo e che causa fissioni a catena negli atomi vicini (figura 1.2.29).



Un neutrone viene assorbito da un atomo di U-235	Il nucleo diventa meno stabile.	Il nucleo si divide in due parti uguali.	Vengono rilasciati neutroni che vanno a colpire atomi vicini
--	---------------------------------	--	--

Fig. 1.2.29 *Fissione dell'Uranio*

In termini di “effetto sulla materia” le radiazioni vengono classificate in ionizzanti e non-ionizzanti (ultravioletto, visibile e infrarosso, microonde, onde radio e radar). Le radiazioni ionizzanti sono quelle in grado di produrre energia sufficiente a rimuovere un elettrone dall'atomo (raggi cosmici, raggi-X, radiazioni emesse durante il processo di decadimento radioattivo).

Il fenomeno della radioattività fu scoperto nel 1896 da H. Becquerel che ebbe occasione di osservare che un sale di Uranio, pur avvolto in una carta opaca, emette radiazioni capaci di impressionare una lastra fotografica posta nelle sue vicinanze. Le modalità di decadimento più comuni sono classificate in base alla modalità con cui i nuclei si diseccitano, e sono:

- ❖ Radioattività alfa (α): consiste nell'emissione di nuclei di elio (particelle α), costituiti da due neutroni e due protoni; la massa si riduce di 4 unità e la carica elettrica di due (fig. 1.2.30). Le particelle α furono scoperte da Ernest Rutherford, uno scienziato inglese, nel 1899 mentre lavorava con l'Uranio.

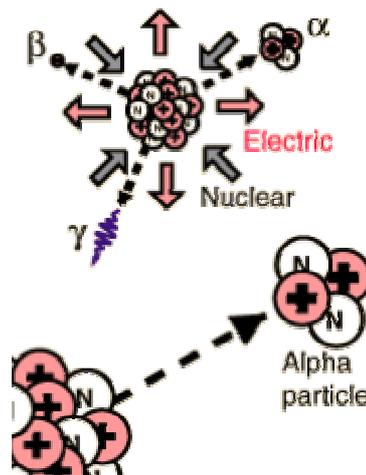


Fig.1.2.30 Particelle alfa

- ❖ Radioattività beta (β): consiste nell'emissione di una particella negativa (o positiva) e di un antineutrino (neutrino); il numero di massa non cambia, mentre si altera di una unità la carica del nucleo (figura 1.2.31). La radioattività beta fu scoperta da Henri Becquerel nel 1900, che notò che le particelle emesse erano identiche agli elettroni scoperti poco prima da Joseph John Thompson. Hanno una massa pari circa ad 1/2000 della massa

dei neutroni o dei protoni. Le particelle beta non sono radioattive in sé, ma sono emesse da atomi che sono radioattivi.

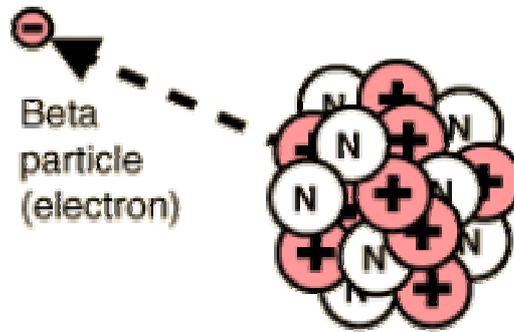


Fig.1.2.31 Particelle beta

- ❖ Radioattività gamma (γ): consiste nell'emissione di un quanto di radiazione elettromagnetica (figura 1.2.32). Questo processo fa passare un nucleo che si trova in uno stato eccitato ad uno stato di eccitazione inferiore o allo stato fondamentale: tale transizione non comporta variazioni di massa e di carica elettrica del nucleo. L'emissione γ accompagna spesso l'emissione α o β .

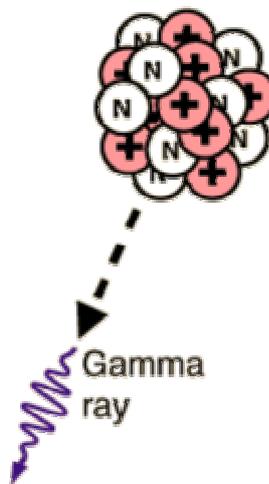


Fig.1.2.32 Raggi gamma

In tabella 1.2.10 sono stati riportati i tipi di radiazione associabili a diversi elementi.

Nome	Numero Atomico	Tipo di radiazione		
		alfa	beta	gamma
Americio-241	95	■		■
Cesio-137	55		■	■
Cobalto-60	27		■	■
Iodine-129e131	53		■	■
Plutonio	94	■	■	■
Radio	88	■		■
Radon	86	■		
Stronzio-90	38		■	
Technetium-99	43		■	■
Trizio (H3)	1		■	
Torio	90	■		■
Uranio	92	■		■

Tab.1.2.10

È fondamentale definire, per avere un'idea degli effetti provocati dall'esposizione, il tipo di radiazione emessa; qual è l'organo che principalmente viene attaccato; il tempo di dimezzamento. Nella figura 1.2.33 viene sintetizzata la diversa capacità delle onde α , β e γ di attraversare i materiali.

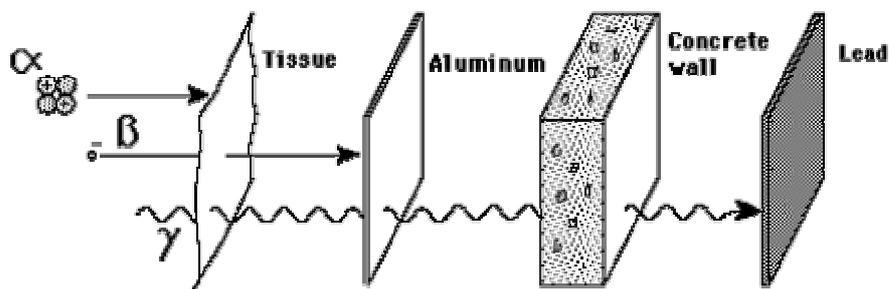


Fig.1.2.33 Diversa capacità delle onde alfa, beta e gamma di attraversare i materiali.

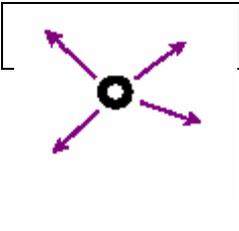
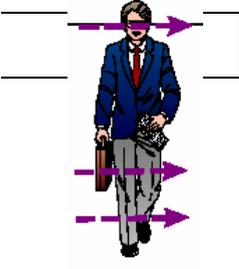
Il tasso di decadimento nei materiali viene misurato tramite il Becquerels, che equivale a un atomo decaduto al secondo (facendo riferimento al numero di

disintegrazioni di un atomo di Radio al secondo). Nel passato, si è utilizzata come unità di misura il Curie: 1C è originato dall'attività di un grammo di Radio-226 e rappresenta $3,7 \cdot 10^{10}$ disintegrazioni per secondo (1Bq). La misura delle radiazioni in termini di energia depositata nel corpo avviene tramite il Millisieverts o il Microsieverts. Un Millisievert è approssimativamente la radiazione rilasciata da cinque macchine per le radiografie (raggi-X). Per esempio in Cornovaglia, dove ci sono rocce granitiche ricche di Uranio che rilascia Radon nel processo di decadimento, la dose totale annua a cui è sottoposta la popolazione è di circa 7,8 Millisievert. Negli Stati Uniti la dose media annua totale è di circa 2,5 Millisievert. La quantità di radiazioni ionizzanti assorbite dai tessuti viene espressa in gray. Un gray di particelle beta o radiazioni gamma equivale ad un Sievert, in termini di effetti biologici; un gray di particelle alfa equivale a 20 Sievert. L'immissione di 1Sv con radiazioni gamma porta la nausea; 5Sv possono uccidere circa la metà delle persone esposte nel tempo di un mese; 10Sv sono fatale per qualsiasi tipo di materia. In tabella 1.2.11 sono state sintetizzate le unità di misura citate in precedenza.

Nuova Unità	Vecchia Unità
1 gray	100 rads (radiation absorbed dose)
1 sievert	100 rem (radiation equivalent man)
1 becquerel	27piC (picocurie)

Tab. 1.2.11

Nella tabella 1.2.12 vengono riportate le varie unità di misura citate in precedenza evidenziando le quantità di energia relative.

dove viene applicata	figura simbolica	vecchia unità	nuova unità
fonte della radiazione		misura il numero di particelle ionizzate che lasciano la fonte	
		Curie Ci 1 Ci = 3.71010 disintegrations	Bequerel Bq 1Bq = 1 disintegrations (realmente si usano i GBq)
oggetto irradiato (radiazione chimica)		misura l'energia adsorbita/unità di massa. Gli effetti dipendono dalla quantità di energia depositata	
		1 rad= 100ergs/g	Gray Gy 1 Gy= 1 j/Kg
persone irradiate (salute fisica)		Si utilizza un fattore Q per indicare l'effetto che è funzione dell'energia adsorbita	
		1 rem= 100*Q ergs/g	Sievert Sv 1Sv=Q J/Kg
		0,1 mSv = 1 chest X-ray; 6 Sv ->morte	

Tab. 1.2.12

Di seguito riportiamo, in ordine crescente, alcune dosi di radiazioni annue:

- 1,5 mSv/anno: radiaz. medie a cui è esposto l'equipag. di un aereo;
- 2 mSv/anno: radiazioni medie in Australia;
- 2,9 mSv/anno : radiazione media a cui sono esposti gli impiegati nelle industrie nucleari degli Stati Uniti;
- 3 mSv/anno: radiazioni medie nel Nord America;
- 5 mSv/anno: radiazione media a cui sono esposti gli impiegati nelle miniere di Uranio in Australia;
- 10 mSv/anno: dose massima attuale per gli impiegati nelle miniere di Uranio in Australia;
- 20 mSv/anno: limite per gli impiegati nelle industrie nucleari;
- 50 mSv/anno: limite formale per gli impiegati nelle industrie nucleari e nelle miniere di Uranio

- 350 mSv/anno: limite a vita per coloro che furono soggetti alle radiazioni a Chernobyl, e che ora vivono altrove;
- 1000 mSv: dose assunta in breve tempo che provoca nausea temp.;
- 10000 mSv: dose assunta in breve tempo e che porta alla morte.

In tabella 1.2.13 è stata riportata la radioattività in alcune sostanze.

Un uomo adulto (100 Bq/kg)	7000 Bq
1 kg di caffè	1000 Bq
1 kg di fertilizzanti	5000 Bq
1 rilevatore di fumo domestico (con Americio)	30 000 Bq
Radioisotopi per diagnosi mediche	70 million Bq
Radioisotopi per terapie mediche	100 000 000 million Bq
1 segnale luminoso di uscita (1970s)	1 000 000 million Bq
1 kg Uranio	25 million Bq
1 kg di minerale Uranio (Canadese, 15%)	25 million Bq
1 kg di minerale Uranio (Australiano, 0.3%)	500 000 Bq
1 kg di rifiuti a bassa radioattività	1 million Bq
1 kg di ceneri di carbone	2000 Bq
1 kg di granito	1000 Bq

Tab.1.2.13 *Radioattività in alcune sostanze naturali e artificiali.*

In tab.1.2.14 sono riportati i tempi di dimezzamento di diversi elementi.

Nome	tempo di dimezzamento	Nome	tempo di dimezzamento
Am-241	432,7 anni	Ra-224	3,66 anni
Cs-137	30 anni	Rn-222	3,8 giorni
Co-60	5,27 anni	Rn-220	54,5 secondi.
I-129	$15,7 \cdot 10^6$ anni	Sr-90	29,1 anni
I-131	8 giorni	Tc-99	$212 \cdot 10^3$ anni
Pu-238	87,7 anni	Trizio (H3)	12,3 anni
Pu-239	24100 anni	Th-232	$14 \cdot 10^9$ anni
Pu-240	6560 anni	Th-230	75400 anni
Ra-226	1600 anni	Th-228	1,9 anni
Ra-228	5,76 anni	U-238	$4,47 \cdot 10^9$ anni

Tab.1.2.14

Le radiazioni ionizzanti emesse dai radionucleidi durante il processo di decadimento sono note per essere cancerogene ed avere effetti nocivi sul fegato e su altri organi. Negli Stati Uniti, l'EPA ultimamente ha revisionato i limiti, definiti tramite il Maximum Contaminant Level (MCL), con riferimento alle sostanze presenti nelle acque potabili (tabella 1.2.15).

contaminante	MCL	Fonte	Effetto sulla Salute
combinazione Ra-226/-228	5pCi/L (1976)	naturalmente presente nelle acque potabili	se l'esposizione supera l'MCL per un tempo prolungato aumentano le probabilità di ammalarsi di cancro
emissioni alfa	15pCi/L (esclusi Rn e U) (1976)	naturalmente presente nelle acque potabili	se l'esposizione supera l'MCL per un tempo prolungato aumentano le probabilità di ammalarsi di cancro
particelle beta e radioattività dei fotoni	4mrem/anno (1976)	utilizzo e produzione di materiale radioattivo	se l'esposizione supera l'MCL per un tempo prolungato aumentano le probabilità di ammalarsi di cancro
U	30microg/L (2000)	naturalmente presente nelle acque potabili	l'esposizione all'Uranio risulta tossica per il fegato. Le persone che assumono tramite acqua particelle alfa in quantità superiori al MCL hanno più probabilità di ammalarsi di cancro

Tab.1.2.15

Americio (Am)

È un metallo radioattivo che non esiste in natura. Fu scoperto dal chimico nucleare Glenn Seaborg e dai suoi collaboratori all'Università di Chicago nel 1944, nel corso di ricerche sull'energia nucleare, per bombardamento del Plutonio. Fra gli isotopi radioattivi dell'Americio il più importante è l'Am-241.

È un metallo bianco-argento, cristallino, che in condizioni normali si trova allo stato solido. L'Am-241 emette particelle alfa spesso accompagnate da raggi gamma. È usualmente commerciato perché viene utilizzato in comuni applicazioni (diagnosi mediche, ricerche), come indicatore del livello della densità dei fluidi, come componente fondamentale nei rilevatori di fumo domestici, ecc. Nell'industria, mescolato con il Berillio, fornisce una valida tecnica di monitoraggio della qualità dei prodotti (per esempio lo spessore del vetro). La maggior parte dell'Americio-241 nell'atmosfera è presente a causa di esperimenti nucleari avvenuti fra il 1950 e il 1960.

Durante il processo di decadimento, si ottiene prima Neptunio-237, anch'esso radioattivo, e poi Bismuto-209, stabile e non radioattivo.

Le persone possono essere esposte alle radiazioni o attraversando zone contaminate, oppure bevendo acqua contaminata. Una volta entrato nel corpo, l'Americio tende a concentrarsi nelle ossa, nel fegato e nei muscoli, e permane nell'organismo; si possono avere effetti multipli a seguito di un'ulteriore esposizione.

Cesio (Cs)

Il Cesio è un metallo che si può trovare sia in forma stabile e, quindi, non radioattiva, che in forma instabile. La forma radioattiva più comune è il Cs-137; esiste poi anche il Cs-134, ma è molto meno significativo del Cs-137. Fu scoperto nel 1860 da Gustav Kirchhoff e Robert Bunsen, nella forma non radioattiva, nelle acque minerali della Germania. Nella forma radioattiva fu scoperto più tardi da Glenn T. Seaborg e dai suoi collaboratori. Tale forma radioattiva deriva

dall'assorbimento di neutroni dall'Uranio e dal Plutonio nei reattori nucleari e nelle armi nucleari. Il Cs-137 è uno dei prodotti della fissione più conosciuti.

È un metallo bianco-argento, malleabile e tenero. È liquido a temperatura ambiente, decade, per emissione di particelle beta e raggi gamma, in Bario-137.

E' molto utilizzato nell'industria e nel campo della ricerca medica, per il trattamento del cancro. La fonte principale di Cesio nell'atmosfera è legata agli esperimenti nucleari (1950-1960). I prodotti di scarto dei reattori nucleari e gli incidenti ambientali, come Chernobyl, hanno contribuito alla presenza di Cesio nell'ambiente. Le persone sono normalmente esposte alle radiazioni da Cesio: esse aumentano nelle aree contaminate, entrando in contatto con prodotti di scarto, respirando aria o bevendo acqua contaminata.

Una volta entrato nell'organismo, il Cesio si distribuisce in modo uniforme; forse una concentrazione leggermente più alta si registra nei muscoli e una più bassa nelle ossa e nei grassi. Con l'esposizione aumenta il rischio di cancro.

Cobalto (Co)

Il Cobalto è un metallo che si può trovare sia in forma stabile e, quindi, non radioattiva, che in forma instabile. L'isotopo radioattivo più comune è il Co-60.

Nel 1735 uno scienziato svedese, Gorge Brandt, dimostrò che il comune colore blu dei vetri colorati era causato da un elemento: il Cobalto. Nella forma radioattiva, fu scoperto da Glenn T. Seaborg e da John Livingood nell'Università della California-Berkeley nel 1930.

Nella sua forma non radioattiva è presente in natura in molti minerali e da centinaia di anni è utilizzato per colorare di blu vetri e ceramiche. Il Co-60 è

prodotto, per uso commerciale, in acceleratori lineari o nelle operazioni dei reattori nucleari, quando i materiali sono esposti alle radiazioni.

È un metallo grigio, duro ma fragile: in condizioni normali è solido e simile al ferro ed al nichel nelle proprietà. In particolare viene magnetizzato come il ferro. Viene utilizzato in alcuni processi industriali e nelle radioterapie in ospedale ed è usato anche per la sterilizzazione di alcuni cibi perché le potenti radiazioni gamma uccidono i batteri e gli altri patogeni senza danneggiare i prodotti. Al termine del processo di decadimento, si ottiene il Nichel.

Una forte esposizione può avvenire durante le fasi di una terapia, anche sotto stretta osservazione del personale medico. Accidentalmente si può essere contaminati ingerendo cibo o acqua in cui è presente un'elevata concentrazione di Co. Una volta nell'organismo, parte viene espulsa tramite le feci e parte permane nel sangue, nelle ossa e nei tessuti dei reni e del fegato. Il Cobalto assorbito viene pian piano rilasciato tramite le urine.

Un'esposizione ai raggi gamma aumenta il rischio di cancro.

Iodio (I)

È un elemento solido non-metallico. Esistono sia isotopi radioattivi che non-radioattivi di questo elemento. Lo I-129 e I-131 sono gli isotopi radioattivi più importanti presenti nell'ambiente. Alcuni isotopi dello Iodio, come lo I-123 e I-124, sono utilizzati nel campo della medicina, e generalmente non comportano problemi perché hanno un tempo di dimezzamento molto piccolo.

Nel 1811, Bernard Courtois scoprì lo Iodio naturale. L'isotopo radioattivo I-131 fu scoperto invece da Glenn T. Seaborg e John Livingood nell'Università della California-Berkeley nel 1930.

Lo I-129 e I-131 sono prodotti tramite fissione di atomi di Uranio nelle operazioni dei reattori nucleari, e dal Plutonio (o Uranio) nel processo di detonazione delle armi nucleari. Gli isotopi radioattivi hanno le stesse proprietà dello Iodio in forma stabile che, in condizioni normali è allo stato solido cristallino con una colorazione scura. Inoltre gode della particolare proprietà di passare direttamente dallo stato solido a quello gassoso (sublimazione). Questo vapore ha un colore violaceo e risulta irritante per gli occhi, il naso e la gola. Lo Iodio si dissolve in alcool ed in acqua e reagisce facilmente con le altre sostanze chimiche. Inoltre si combina facilmente con la materia organica presente nei terreni.

Lo Iodio è il radionucleide usato più di frequente, soprattutto nel campo medico, e grazie al suo breve tempo di dimezzamento ed alle emissioni beta, lo I-131 è utilizzato largamente nella medicina nucleare.

Lo Iodio radioattivo può essere inalato o ingerito attraverso il cibo o l'acqua. La popolazione viene esposta continuamente allo Iodio radioattivo presente nell'atmosfera, sia per effetto degli esperimenti nucleari che per le continue radiazioni emesse dalle industrie e dai presidi medici. Anche se viene immesso sotto forma di gas può contaminare i liquidi ed i solidi. Inoltre l'esposizione può avvenire anche per contatto con i fluidi corporei di persone che hanno subito trattamenti con I-131.

Lo Iodio radioattivo può provocare problemi alla tiroide. Una esposizione cronica a tale sostanza può provocare noduli e cancro.

Plutonio (Pu)

È un metallo radioattivo. Anche se alcuni scienziati hanno rilevato la presenza di Plutonio in natura, proveniente da particolari processi geologici, è considerato un elemento artificiale. I radioisotopi più comuni sono: Pu-238, Pu-239, Pu-240. Il Plutonio fu scoperto dal chimico nucleare Glen T. Seaborg e dai colleghi Joseph W. Kennedy, Edwin M. McMillan e Arthur C. Wahl, nel 1941 nell'Università della California-Berkeley, però la scoperta fu annunciata solo nel 1948, alla fine della guerra. Il Plutonio viene creato dall'Uranio nei reattori nucleari. Quando U-238 assorbe neutroni, diventa U-239, il quale ultimo decade diventando Pu. I diversi isotopi di U e le diverse modalità di assorbimento di neutroni e di decadimento danno vita a differenti isotopi di Pu. La maggior parte del plutonio fu prodotta in reattori tra il 1944 e il 1988 dall'U.S., allo scopo di poter utilizzare tale prodotto come arma nucleare.

Il Plutonio è un metallo dal colore grigio-argento che diventa giallognolo a contatto con l'ambiente. In condizioni normali è solido e chimicamente reattivo. Presenta 15 diversi isotopi, tutti radioattivi. Il Pu-239 è stato, per esempio, utilizzato per la produzione della bomba lanciata su Nagasaki nel 1945. Il Pu-238 viene utilizzato per ricavare energia, grazie al forte calore che emana nei processi di decadimento.

La popolazione può venire in contatto col Plutonio che permane nell'ambiente a seguito dei test nucleari, oppure ingerendo acqua contaminata. Esso permane nell'organismo e si possono avere effetti multipli a seguito di un'ulteriore esposizione.

Radio (Ra)

È un metallo radioattivo presente in natura. Gli isotopi più comuni presenti sono Ra-226, Ra-224 e Ra-228. È un radionucleide formato dal decadimento dell'Uranio e del Torio nell'ambiente. E' presente in piccole quantità nelle rocce, nei terreni, nelle acque, nelle piante e negli animali. Fu scoperto nel 1898 da Marie Curie nel pechblenda (minerale connesso all'Uranio e al Radio): c'è circa 1 grammo di Radio in 7 tonnellate di pechblenda.

È di colore bianco-argento e diventa nero a contatto con l'aria. È chimicamente reattivo. Il Ra-226 deriva dal decadimento dell'U-238, il Ra-228 e il Ra-224 dal decadimento del Th-232; il più comune è il Ra-226, che emette particelle alfa e radiazioni gamma. Il Ra-228 è principalmente un emettitore di particelle beta.

Nel 1900, quando fu scoperto, gli scienziati non erano a conoscenza della sua pericolosità ed, anzi, erano affascinati dalle sue misteriose proprietà, specialmente la luminescenza (per questo venne utilizzato nella produzione di strumenti visibili anche di notte). Le industrie cominciarono a produrre manufatti contenenti il Radio. Attualmente viene impiegato nel trattamento dei tumori (impiantando dei piccoli semi che uccidono le cellule malate), per radiografie e tecniche di analisi simili. Quando viene mescolato con il Berillio, diventa una fonte di neutroni, che vengono utilizzati nel campo della ricerca. Viene, inoltre, aggiunto in punta ai lampioni migliorando l'effetto di ionizzazione dell'aria.

La popolazione è più o meno esposta alle radiazioni proprio per la presenza del Radio nell'ambiente; tuttavia le radiazioni sono maggiori se c'è presenza proprio nel terreno di una forte concentrazione di tale sostanza. Inoltre anche i pozzi

d'acqua utilizzati a scopo privato possono presentare un aumento della concentrazione di Radio, soprattutto se posti in terreni particolarmente ricchi di tale sostanza. La concentrazione nell'acqua potabile è relativamente bassa, ma ci sono specifiche regioni geografiche dove questa concentrazione può aumentare, proprio a causa della litologia.

La maggior parte del Radio ingerito (circa l'80%) abbandona l'organismo tramite l'espulsione di feci e di urine, mentre il rimanente 20% segue il flusso sanguigno accumulandosi principalmente nelle ossa.

Le particelle alfa emesse sono nocive se emesse all'interno dell'organismo. Un'esposizione ai raggi gamma è dannosa sia dall'interno che dall'esterno. L'esposizione comporta cancro alle ossa, danni nel processo di formazione dei componenti del sangue, ecc..

Radon (Rn)

È un gas naturale radioattivo, presente nei terreni, nelle rocce e nell'acqua. Fra gli isotopi, i più comuni sono Rn-220 e Rn-222. L'isotopo Rn-222 fu scoperto dal chimico tedesco Friedrich E. Dorn nel 1900, mentre l'Rn-220 fu scoperto nel 1899 dagli scienziati britannici R.B. Owens e Ernest Rutherford.

Il Rn-222 è un prodotto del decadimento del Radio-226; entrambi sono legati al processo di decadimento dell'Uranio-238.

Il Radon è un gas nobile (essenzialmente inerte); è pesante e si accumula nelle parti basse dell'atmosfera. Non ha colore, non ha odore e non ha sapore e tende a concentrarsi in ambienti chiusi, aumentando il rischio di esposizione.

Ha un uso pratico limitato a qualche applicazione in campo medico.

Si dissolve facilmente in acqua e altrettanto facilmente la lascia se esposto all'aria. Quindi la concentrazione nei fiumi e nei laghi è bassa, ma nelle acque sotterranee può essere alta. Anche se è più facile che venga inalato, la contaminazione può avvenire anche ingerendo cibi o acqua. La maggior parte della quantità immessa nell'organismo, viene espulsa tramite feci o urine. Per le acque potabili altamente contaminate il danno cresce, perché il Radon decade nei tessuti e provoca il cancro ai polmoni.

Stronzio (Sr)

È un metallo grigio-argento che a contatto con l'aria assume subito un colore giallognolo. Lo Stronzio si trova in natura come elemento non radioattivo; di questo elemento si è a conoscenza di almeno 16 isotopi diversi, dei quali 4 si trovano in natura in forma stabile (Sr-84, -86, -87, -88) ed i rimanenti sono radioattivi. Tra questi ultimi, il più importante, presente nell'ambiente, è lo Sr-90. Nel 1790 Adair Crawford e William Cruikshank rilevarono per la prima volta un elemento non radioattivo in un minerale presente in Scozia. Lo stronzio come elemento fu isolato nel 1808 da Sir Humphrey Davy. Lo Sr-90, come altri radionucleidi, fu scoperto nel 1940 durante gli esperimenti connessi con la bomba atomica. Si tratta di un prodotto della fissione dell'Uranio e del Plutonio nei reattori nucleari e nelle armi nucleari che, spesso, contamina parti del reattore ed i fluidi. La maggior parte dell'Sr-90 presente nell'atmosfera risale al 1950 quando venivano condotti test sulle armi nucleari.

Nel processo di decadimento emette particelle beta, ma non radiazioni gamma, divenendo infine Ittrio-90 (radioattivo). In tale processo viene generata una forte

quantità di calore che viene convertita in energia, spesso utilizzata in stazioni molto lontane come le navicelle spaziali. In campo medico viene utilizzato per il trattamento delle ossa malate di cancro. Lo Stronzio, chimicamente, è molto simile al Calcio e per questo tende a concentrarsi nelle ossa e nei denti.

La popolazione è costantemente esposta a piccole quantità di Sr-90 per il fatto che è largamente diffuso nell'ambiente e nella catena alimentare. Di conseguenza l'introduzione di Sr-90 all'interno dell'organismo può avvenire sia tramite inalazione che ingestione: quest'ultima rappresenta la modalità più nociva. Della quantità ingerita circa il 70-80% attraversa l'organismo; il 20-30% viene assorbita e si deposita sulle ossa; circa l'1% si distribuisce nel sangue, nei fluidi extracellulari, nei tessuti molli e sulla superficie delle ossa, causando in alcuni casi il cancro o la leucemia.

Tecnezio (Tc)

È un metallo radioattivo grigio-argento. La maggior parte del Tecnezio è prodotta artificialmente anche se, in natura, è presente in piccole quantità nella crosta terrestre. Tra gli isotopi del Tecnezio (tutti radioattivi) il più comune è il Tc-99m (metastabile). Il Tc-97 fu scoperto nel 1937 da Emilio Segrè e Carlo Terrier nell'Università della California-Berkeley; il Tc-99m fu sviluppato da Glenn T. Seaborg e Emilio Segrè. A temperatura ambiente è un metallo molto denso ed ha un peso circa 11.5 volte maggiore del peso di un ugual volume di acqua. Il Tc-99m decade prima in Tc-99 emettendo radiazioni gamma, con un tempo di dimezzamento di circa 6 ore; il Tc-99 decade in Rutenio-99 emettendo particelle beta e radiazioni gamma. Il suo utilizzo nell'industria è limitato a qualche

applicazione, ma principalmente viene impiegato nei reattori nucleari, negli ospedali e nei laboratori di ricerca.

La presenza del Tecnezio nell'ambiente è legata prevalentemente ai test sulle armi nucleari. Piccole quantità di Tecnezio sono presenti nelle acque, nei terreni, nelle piante e negli animali, di conseguenza si è esposti costantemente anche se le quantità sono piccole. La fonte principale di contaminazione è l'ingestione di cibo o acqua. Una volta che questa sostanza è entrata nell'organismo umano, si concentra in prossimità delle ghiandole tiroidee e dei tratti intestinali. Una prima metà della quantità ingerita viene espulsa entro 60 ore; un quarto viene espulso nelle successive 60 ore. Alla fine delle 120 ore, il quarto rimanente permane nel corpo e, come gli altri elementi radioattivi, aumenta le probabilità che le cellule si ammalinino di cancro.

Trizio (H-3)

Il Trizio viene prodotto sia naturalmente nelle parti alte dell'atmosfera, quando le radiazioni cosmiche colpiscono le molecole di aria, che artificialmente a seguito di esplosioni di armi nucleari. Anche se si può trovare sotto forma di gas, più comunemente è presente nelle acque perché, come l'Idrogeno non-radioattivo, reagisce con gli atomi di Ossigeno formando molecole di acqua. La concentrazione di Trizio nell'atmosfera ha subito un incremento notevole a seguito di esperimenti sulle armi nucleari nel periodo compreso tra il 1950 e il 1960. In particolare nel 1963 si è avuto un picco massimo della concentrazione di tale sostanza, che poi è andata decrescendo nel tempo. Il Trizio viene largamente utilizzato in diversi campi, rivestendo un ruolo fondamentale nell'attivazione dei

meccanismi e nella manutenzione delle centrali termonucleari e nucleari. La popolazione viene, quindi, esposta quotidianamente a piccole quantità di Trizio: l'esposizione aumenta per le persone che vivono nei pressi dei centri dove vengono condotti test nucleari e per coloro che lavorano nei laboratori di ricerca. Una volta che il Trizio entra nell'organismo (per inalazione o per ingestione) si distribuisce in maniera uniforme e viene poi espulso tramite le urine entro un mese dall'ingresso. L'eccessiva esposizione al Trizio aumenta il rischio di sviluppo del cancro. Esso, comunque, è considerato il radionucleide meno pericoloso perché emette delle radiazioni molto deboli e abbandona l'organismo in un tempo relativamente piccolo.

Torio (Th)

È un metallo che si trova in percentuali molto basse nel suolo, nelle rocce e nell'acqua. Presenta molti isotopi, alcuni dei quali naturali, altri artificiali, tutti radioattivi. Quello più comune è il Th-232, che si trova in natura, scoperto nel 1828 dal chimico svizzero Jons Jakob Berzelius. Il suo colore è bianco-argento. Se è puro, a contatto con l'aria permane brillante per mesi; se presenta delle impurezze assume, invece, un colore scuro, quasi nero. Si dissolve lentamente in acqua. Gli isotopi più comuni sono: Th-232, Th-230 e Th-228.

Il Torio ha proprietà coloranti e per questo è utilizzato per la produzione di ceramiche; è anche usato per rivestire le lanterne, proprio per la sua brillantezza; è usato, inoltre, nell'industria aerospaziale e, nel passato, è stato utilizzato per costruire macchine per radiografie. L'esposizione è principalmente legata all'ingestione e all'inalazione. Una volta ingerito può essere espulso tramite le

feci e le urine; se permane, viene a contatto col flusso del sangue e si deposita in prossimità delle ossa, dove permane per molto tempo. I principali effetti dell'esposizione sono legati all'aumento delle probabilità di contrarre il cancro.

Uranio (U)

E' un elemento radioattivo che si trova in natura nelle rocce, nei terreni, nelle piante, nelle acque e negli animali. L'utilizzo dell'Uranio, nella sua forma naturale, risale almeno al 79 a.C., quando veniva usato per colorare le ceramiche. Venne scoperto nel 1789 dal chimico tedesco Martin Klaproth nella pechblenda e isolato nel 1841 da Eugene-Melchior Peligot. Le sue proprietà radioattive furono scoperte dal fisico francese Henri Becquerel nel 1896. Dato il suo elevato tempo di dimezzamento, permane sulla terra in quantità stabili. È un metallo bianco-argento di notevole densità (molto più elevata del piombo). Naturalmente sono presenti tre isotopi: U-238, U-235 e U-234, mentre gli altri possono essere sintetizzati (tabella 1.2.16). In figura 1.2.34 è sintetizzato il processo di decadimento dell'Uranio 238 (U238).

isotopo	U-238	U-235	U-234
Presenza in natura(%)	99,27	0,72	0,0055
Tempo di dimezzamento(anni)	$4,47 \cdot 10^9$	$0,7 \cdot 10^9$	$0,246 \cdot 10^6$

Tab. 1.2.16

Viene utilizzato per la produzione di proiettili e missili, come propellente nucleare per le navi e i sottomarini, per le armi nucleari. Il combustibile utilizzato nei

reattori è tipicamente arricchito di U-235. Alcuni fertilizzanti contengono anche Uranio naturale e le persone che collezionano rocce e minerali sono costantemente a contatto con Uranio naturale, in piccole quantità.

Si è esposti per inalazione o ingestione di acqua e cibo. La dose giornaliera ammissibile è di circa 0,07-1,1 µg. L'esposizione tramite la pelle di questa sostanza è poco nociva perché le particelle alfa non hanno l'energia sufficiente per attraversare la cute.

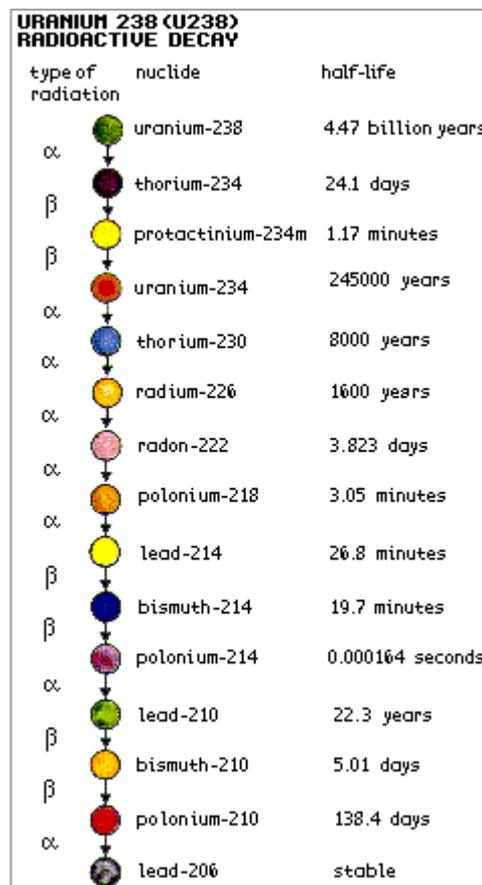


Fig.1.2.34 Decadimento dell'Uranio

Se, invece, le particelle alfa vengono inalate o ingerite, entrano a contatto direttamente con gli organi e provocano un aumento delle probabilità di

ammalarsi di cancro. L'organismo nella maggior parte dei casi espelle l'Uranio tramite le feci e le urine; se invece, esso permane, colpisce principalmente i reni (essendo un metallo tossico). La sua radioattività provoca il cancro alle ossa e al fegato e, in alcuni casi, la leucemia. A conclusione di questo excursus, nelle tabelle 17, 18 e 19 sono stati riportati i tempi di dimezzamento per i nucleidi primordiali (tab. 1.2.17), cosmogenici (tab. 1.2.18) ed artificiali (tab. 1.2.19).

Nucleide	Simbolo	Tempo di Dimezzamento	attività in natura
Uranio 235	^{235}U	7.04×10^8 anni	0.72% dell'Uranio naturale
Uranio 238	^{238}U	4.47×10^9 anni	99.2745% dell'Uranio naturale; 0.5÷4.7 ppm dell'Uranio totale nelle rocce comuni
Torio 232	^{232}Th	1.41×10^{10} anni	1.6÷20 ppm nelle rocce comuni con una media nella crosta di 10.7 ppm
Radio 226	^{226}Ra	1.60×10^3 anni	0.42 pCi/g (16 Bq/kg) in limestone and 1.3 pCi/g (48 Bq/kg) in igneous rock
Radon 222	^{222}Rn	3.82 giorni	Gas Nobile concentrazione media annuale negli US che va da 0.016 pCi/L (0.6 Bq/m ³) a 0.75 pCi/L (28 Bq/m ³)
Potassio 40	^{40}K	1.28×10^9 anni	suolo - 1-30 pCi/g (0.037-1.1 Bq/g)

Tab.1.2.17 Nucleidi Primordiali

Nucleide	Simbolo	tempo di dimezzamento	Fonte	Attività naturale
Carbonio 14	^{14}C	5730 anni	interazione con i raggi cosmici, $^{14}\text{N}(\text{n,p})^{14}\text{C}$;	6 pCi/g (0.22 Bq/g) nei materiali organici
Trizio 3	^3H	12.3 anni	interazione dei raggi cosmici con N and O; attraversamento dei raggi, $^6\text{Li}(\text{n,alpha})^3\text{H}$	0.032 pCi/kg (1.2 x 10 ⁻³ Bq/kg)
Berillio 7	^7Be	53.28 giorni	interazioni dei raggi cosmici con N and O;	0.27 pCi/kg (0.01 Bq/kg)

Tab.1.2.18 *Nucleidi Cosmogenici*

Nucleide	Simbolo	tempo di dimezzamento	fonte
Trizio	^3H	12.3 anni	prodotto dai tests sulle armi e dai reattori; produzione di armi nucleari
Iodio 131	^{131}I	8.04 giorni	prodotto derivante dalle prove sulle armi e reattori; utilizzato nelle cure mediche per i problemi di tiroide
Iodio 129	^{129}I	1.57×10^7 anni	prodotto derivante da prove su armi e reattori;
Cesio 137	^{137}Cs	30.17 anni	prodotto derivante da prove su armi e reattori;
Stronzio 90	^{90}Sr	28.78 anni	prodotto derivante da prove su armi e reattori;
Tecnezio 99	^{99}Tc	2.11×10^5 anni	prodotto del decadimento del ^{99}Mo , usato nelle diagnosi mediche
Plutonio 239	^{239}Pu	2.41×10^4 anni	prodotto dal bombardamento di neutroni del ^{238}U ($^{238}\text{U} + n \rightarrow ^{239}\text{U} \rightarrow ^{239}\text{Np} + \beta^- \rightarrow ^{239}\text{Pu} + \beta^-$)

Tab.1.2.19 *Nucleidi Artificiali*

[EPA; ENGRI 119, 2002; Hall; Factsheet-Understanding Radiation and Radioactivity; Seventh edition, 2003]

3. Esperienze di laboratorio

La fase sperimentale della Tesi - sviluppata presso il Laboratorio di Chimica Farmacologica e Tossicologica della Facoltà di Farmacia dell'Università di Napoli *Federico II* - è stata dedicata all'analisi di metodiche analitiche di identificazione e quantificazione dei contaminanti, al fine di consentire la definizione di un "protocollo" da sottoporre all'attenzione degli enti gestori dei sistemi idrici in modo da poterne valutare la effettiva "sostenibilità" gestionale ed economica. I test sperimentali hanno consentito **la definizione di una procedura per la preliminare individuazione del contaminante e per la successiva immediata valutazione della sua concentrazione.** La scelta della tecnica sperimentale più opportuna va ovviamente effettuata caso per caso analizzando le caratteristiche del singolo agente contaminante al fine di identificare la soluzione più efficace. Nel seguito vengono descritte le metodologie attualmente più avanzate per la rilevazione dei contaminanti nelle acque.

La Cromatografia

La cromatografia è un metodo analitico largamente utilizzato per la separazione, l'identificazione e la determinazione dei componenti chimici in miscele complesse. Il metodo presenta una grande varietà di sistemi e tecniche, che si basano sull'utilizzo di una fase stazionaria¹ e di una fase mobile². I componenti della miscela sono trasportati lungo o attraverso la fase stazionaria dal

¹ La fase stazionaria, in cromatografia, è una fase che è fissa in una determinata posizione: o in una colonna o su una superficie planare.

² La fase mobile, in cromatografia, è una fase che si muove lungo o attraverso la fase stazionaria, trasportando con sé la sostanza da analizzare.

flusso di una fase mobile gassosa o liquida, e la separazione è basata sulle differenti velocità di migrazione dei componenti della miscela. I metodi cromatografici si distinguono in:

- a. **Cromatografia su colonna**, in cui la fase stazionaria è essenzialmente contenuta in un tubo sottile e la fase mobile è forzata a passare attraverso il tubo sotto pressione o per gravità;
- b. **Cromatografia su strato sottile**, in cui la fase stazionaria è supportata su una superficie piana o nei pori della carta, mentre la fase mobile si muove per azione della capillarità o sotto l'influenza della gravità.

I metodi cromatografici si suddividono in tre categorie basate sulla natura della fase mobile: liquida, gassosa e fluido supercritico. Per la fase mobile liquida esistono cinque tipi diversi di esame, mentre per quella gassosa ne esistono tre: tali sottotipi di esame differiscono per la natura della fase stazionaria e per i tipi di equilibri che si stabiliscono tra le fasi.

La cromatografia liquida (LC) si effettua su colonna o planare; la cromatografia gassosa (GC) si effettua solo su colonna.

GC

I gas di trasporto devono essere chimicamente inerti, per cui si sceglie tra Elio, Argon, Azoto, Biossido di Carbonio e Idrogeno. La scelta è legata al detector usato. In figura 1.3.1 è riportato lo schema di un gas-cromatografo mediante il quale, a seguito dell'iniezione della sostanza tramite la siringa e del trasporto effettuato dal gas, si perviene all'analisi della sostanza tramite il rilevatore.

Esistono poi, i *metodi combinati*, nei quali la GC è accoppiata a tecniche spettroscopiche (come la spettrometria³ di massa, MS), che offrono al chimico un potente mezzo per identificare i componenti di una miscela complessa.

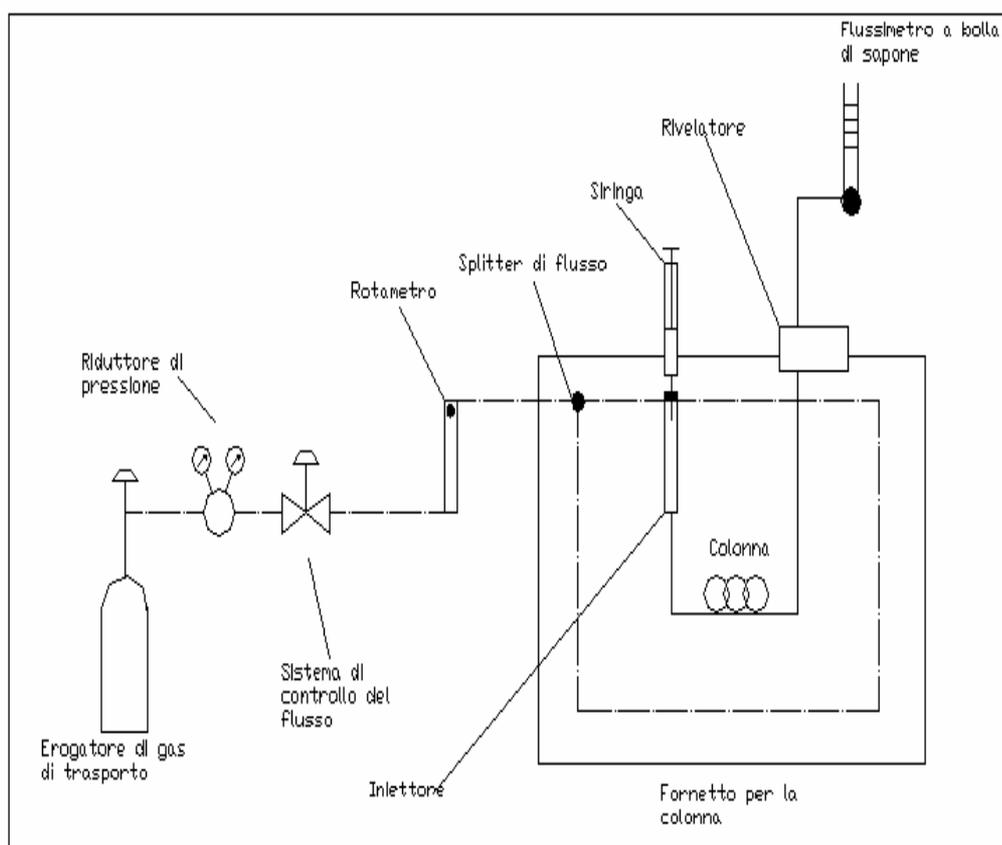


Fig. 1.3.1 Schema di una GC

LC

È una tecnica utilizzata per la separazione di ioni o molecole presenti in soluzione. La cromatografia liquida semplice impiega una colonna dove alla base si pone la fase stazionaria in equilibrio col solvente. La fase stazionaria può essere di diversa natura (solida, un gruppo ionico posto su una resina ecc..). La miscela da separare

³ La spettrometria è una tecnica utilizzata per misure di assorbimento, emissione e fluorescenza

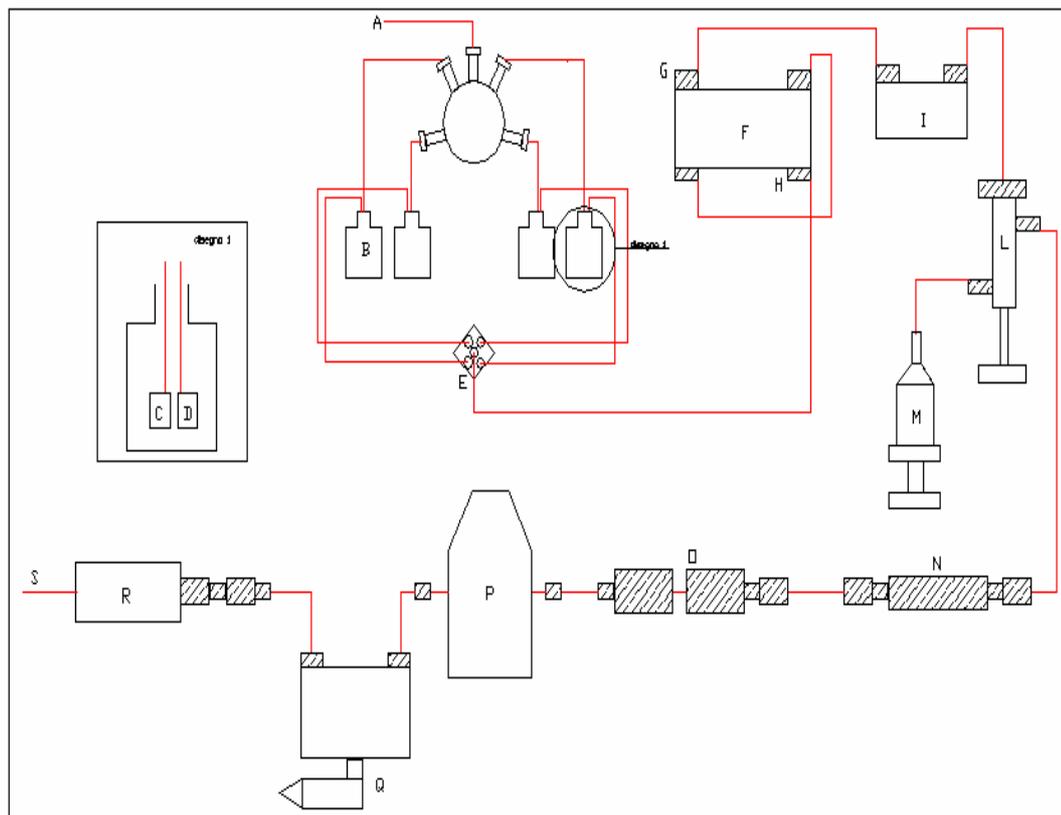
viene posta nella colonna dall'alto; poi si pone il solvente, sempre in testa alla colonna. I componenti della miscela si muovono all'interno della colonna con velocità diverse, in funzione della maggiore o minore affinità con la fase mobile. I componenti vengono suddivisi in funzione del tempo che impiegano a fuoriuscire dalla colonna.

HPLC

La LC ad alta prestazione impiega una fase mobile liquida e una fase stazionaria finemente suddivisa. Per ottenere velocità di flusso sufficientemente alte, il liquido deve essere sottoposto a pressioni elevate. In figura 1.3.2 è riportato lo schema di funzionamento di un HPLC nel quale, tramite una siringa, si inietta la soluzione da esaminare che viene portata a contatto con la fase mobile e la fase stazionaria; in base all'affinità che la soluzione ha con le due sostanze, la stessa verrà rilevata in tempi differenti, dando così luogo ad una curva rappresentativa del contaminante da esaminare.

Un **cromatogramma**, quindi, è **un diagramma di un parametro funzionale della concentrazione del soluto in funzione del tempo di eluizione (processo mediante il quale i soluti sono dilavati attraverso una fase stazionaria da una fase mobile in movimento)**. Se si pone all'uscita della colonna cromatografica un rivelatore e se ne riporta il segnale in funzione del tempo, si ottiene una serie di picchi.

La posizione dei picchi sull'asse dei tempi è utile per l'identificazione dei componenti del campione; inoltre le aree sottese dai picchi forniscono una misura quantitativa del contenuto di ogni specie [Skoog, 2002].



A	Sorgente di elio con riduttore di pressione	B	Contenitori per i solventi
C	Degassatore	D	Filtro di ingresso
E	Valvola per solvente	F	Pompa
G	Valvola di controllo in uscita	H	Valvola di controllo in ingresso
I	Smorzatore di impulso	L	Valvola di drenaggio
M	Siringa	N	Filtro
O	Regolatore di contropressione	P	Trasduttore di pressione
Q	Valvola di iniezione	R	Colonna

Fig. 1.3.2 Schema di un HPLC

Tramite le tecniche cromatografiche è, quindi, possibile rilevare la presenza nelle acque convogliate nei sistemi idrici di sostanze utilizzate come agenti contaminanti chimici o biologici.

Applicazioni di tecniche cromatografiche con riferimento ad alcuni agenti contaminanti

Nel passato sono stati effettuati diversi studi su possibili contaminanti basati sulle tecniche precedentemente esposte. In particolare, le unità militari che partecipano alle azioni di disarmo nel mondo sono costantemente esposte all'azione di agenti chimici bellici. L'analisi dei campioni, ovviamente, richiede l'uso di metodi analitici sensibili e specifici, al fine di rilevare la presenza di queste sostanze anche a bassissime concentrazioni.

Ad esempio, il Tabun (dimethyl-ethyl estere dell'acido fosfoamidocianidrico) è uno dei componenti della classe degli esteri organofosforici (OPs) che inibisce sia l'azione delle colinesterasi⁴ (ChEs) ed altre esterasi⁵ sia quella di alcuni reagenti alchilanti⁶ (come il 4-nitrobenzilpiridina). La capacità alchilante di tali organofosforici fa sorgere la questione sul loro eventuale potere mutagenico [Garrett et al, 1986].

⁴ Enzimi che intervengono nella regolazione degli impulsi nervosi.

⁵ Gruppo di enzimi che catalizzano l'idrolisi degli esteri degli acidi inorganici e organici.

⁶ Composti chimici che introducendo nel DNA gruppi alchilici (es. metilici) agiscono come agenti mutageni provocando mutazioni in vario modo.

Alcune ricerche riguardano gli effetti genotossici di tale agente chimico, usato come aggressivo bellico, relativamente alla salute di coloro che sono costretti ad operare nelle imprese di demilitarizzazione.

Gli effetti vengono evidenziati mediante saggi farmacologici effettuati sulla *Salmonella typhimurium*, su un linfoma di ratto, sulla sintesi di un DNA non preordinato e saggi *in vitro* e *in vivo* sugli scambi reciproci tra i cromatidi (SCE⁷).

Il saggio sulla Salmonella ha messo in evidenza mutazioni per scambi che provocavano variazioni della struttura.

Il saggio sul linfoma di ratto ha utilizzato una linea cellulare di linfoma per determinare il momento di mutazione e distruzione della timidina chinasi (enzima risultante dalla combinazione del ribosio e della timina, che costituisce il DNA) all'azione della trifluorotimidina.

Il test di sintesi del DNA non strutturato era basato sulla capacità di non suddivisione delle culture primarie di epatociti di ratto adulto alla risposta chimica che provoca un danno diretto sul DNA mediante un DNA sintetico non strutturato.

Il saggio sugli scambi dei cromatidi determinava le reciproche variazioni tra cromatidi con il risultato di un errore di replicazione del DNA, dovuto alla modifica dell'informazione trasportata dai cromosomi (i cromatidi sono infatti le metà longitudinali del cromosoma).

⁷ Il processo che va sotto il nome di SCE, Sister Chromatid Exchange, consiste in scambi reciproci di DNA tra le due molecole di DNA del processo di duplicazione dei cromosomi.

I risultati mostrano che il Tabun presenta deboli effetti mutageni nel saggio della Salmonella e che alti livelli di Tabun sono tossici per le cellule di linfoma nel ratto. Inoltre l'incorporazione di ^3H -timidina nel DNA nucleare di epatociti di ratto con concentrazioni di Tabun superiori ai $200\mu\text{g/ml}$, mette in evidenza che, aumentando la concentrazione di Tabun, si inibisce l'induzione della sintesi del DNA non strutturato, mentre lo stesso DNA non strutturato aumenta positivamente nei gruppi di controllo. Dagli esperimenti riportati *in vitro* sulle SCE risulta che il Tabun, oltre la dose di $50\mu\text{g/ml}$, progressivamente inibisce la divisione cellulare, senza totale citotossicità; *in vivo*, ratti iniettati con $700\mu\text{g/Kg}$ di Tabun mostravano effetti tossici con il risultato che un ratto su dieci decedeva nell'arco temporale di 6 minuti.

In conclusione, il Tabun è mutagenico nella Salmonella; è un diretto agente mutante per le cellule del linfoma del ratto, e la sua attività mutagenica aumenta progressivamente alla dose di $100\mu\text{g/ml}$.

Uno studio precedente mostrava che anche altri due agenti nervini (Sarin e Soman) inibivano l'induzione della sintesi del DNA non strutturato, senza totale tossicità. L'estrema tossicità del Tabun per i mammiferi può essere preventivata testando il livello più alto fino a rilevare il suo potere mutagenico *in vivo*. La dose letale nel 50% dei casi (LD_{50}) stimata nell'uomo è dell'ordine di $10\mu\text{g/Kg}$, molto inferiore ai $100\mu\text{g/Kg}$ che certamente induce mutazioni.

Il passato interesse sulla potenziale mutagenicità degli organi fosforici era focalizzato sulla capacità di alcuni agenti organofosforici (ad esempio il dichlorvos) di alchilare reagenti come la 4-benzilpiridina.

È stato osservato che la fosforilazione⁸, piuttosto che l'alchilazione, era la reazione predominante. La velocità della reazione con le colinesterasi era molto più elevata che la velocità di alchilazione, riducendo la concentrazione di composti simili disponibili per l'alchilazione a bassi livelli.

Sono state riportate poche notizie sulla mutagenicità di agenti chimici usati a scopo bellico (organofosforici) o altri organi fosforici paragonati sulla base di studi di genotossicità di altre classi di composti; ad esempio il Soman, ma non il Sarin, aumentava le variazioni cromatiche nelle cellule delle ovaie dei criceti.

Molti studi sono focalizzati sui prodotti chimici agricoli e relativi organofosforici. Benché alcuni autori non evidenzino nessun effetto mutagenico per 26 organofosforici nel saggio della Salmonella, altri hanno ottenuto risultati positivi: per esempio Corbett [Corbett et al, 1987] ha provato che il nitroso fenitrotione, era mutagenico per i alcuni ceppi di Salmonella, indicando che la nitroriduttasi dei batteri potrebbe non metabolizzare il fenotrone a metabolita mutagenico, risultando in mancanza di questa protezione la possibilità di predire la potenziale genotossicità di questo pesticida.

In aggiunta al gruppo fosforico, il Tabun contiene anche il gruppo cianuro, che potrebbe contribuire alla sua tossicità verso le cellule e forse anche alla sua mutagenicità. Lambotte ed altri [Lambotte-Vandepaer et al, 1985] hanno dimostrato che l'attività mutagenica in animali trattati con acrilonitrile⁹ era evidenziata da metaboliti nell'urina: tiocianato¹⁰, acido idrossietilmercapturico ed acido cianoetilmercapturico.

⁸ Reazione che porta all'attacco di un gruppo fosforico a un composto organico.

⁹ $\text{CH}_2=\text{CHC}\equiv\text{N}$ liquido incolore, volatile e molto tossico.

¹⁰ Sale o estere dell'acido solfocianico ($\text{HSC}\equiv\text{N}$).

L'induzione di geni che provocano mutazioni da parte di questi insetticidi organofosforici è stato dimostrato in maniera inequivocabile tramite prove *in vitro*. Gli esperimenti di mutagenesi su cellule mammarie *in vitro*, spesso hanno dato risultati incerti a causa della citotossicità di questi composti; le esperienze *in vivo* sulle cellule mammarie non sono possibili a causa dell'acuta attività colinergica.

È stato poi condotto uno studio per rilevare se l'induzione a scambi cromatici può essere ritenuta una proprietà comune a tutti gli insetticidi organofosfati e se possono rilevarsi differenze negli effetti citogenetici tra i diversi pesticidi.

Nello studio sulle cellule delle ovaie dei criceti, è stato evidenziato che una concentrazione di pesticidi che va da 0,03 a 0,1mM, induce scambi cromatici [Wilson et al. ,1994; Kumar et al. ,2003; Nishio et al, 1981].

I metodi analitici per i composti organofosfati (OP) hanno un grande interesse a causa del loro vasto utilizzo nell'agricoltura, nella medicina e nell'industria. Tra i composti organofosforici ci sono anche dei composti chimici altamente tossici ed utilizzati a scopo bellico. **I metodi cromatografici a fase mobile liquida**, utilizzati per l'analisi dei componenti di questi pesticidi e dei relativi composti, hanno sempre sofferto per la mancanza di rilevatori sufficientemente sensibili e selettivi. Il detector UV, utilizzato largamente per la determinazione dei residui, non può essere utilizzato nel caso di queste sostanze per la mancanza di appropriati gruppi cromofori. Inoltre, sono necessarie prima dell'analisi matrici campione caratteristiche che contengano molti composti in grado di assorbire i raggi UV. Si utilizzano, perciò, i rilevatori "post-column" che si basano su una

specifica reazione chimica e offrono metodi alternativi con un'eccellente selettività e sensibilità, che forniscono diagrammi con ampi picchi.

L'inibizione dell'enzima della colinesterasi è stata largamente applicata per la rilevazione di tracce di pesticidi OP tramite cromatografia su strato sottile. Alcuni studiosi hanno determinato, mediante LC, residui di pesticidi organofosfati e carbammati in un estratto di foglie di prugne. Altri studiosi hanno sviluppato una rivelazione fluorimetrica dell'inibizione enzimatica, per standard di pesticidi carbammati ed applicato il sistema analitico sperimentale su campioni di varia origine. Il problema più grande è ricercare la fase mobile che porti alla separazione analitica dei composti desiderati e che allo stesso tempo non inattivi gli enzimi.

L'obiettivo era trovare un sistema enzimatico per la rilevazione di tracce di composti di OP in campioni ambientali. I composti modello scelti per questi studi non erano, però, rilevabili in tracce con le tecniche convenzionali di cromatografia liquida. In particolare, è stata scelta la possibilità di impiegare solventi organici nella fase mobile. Dopo la scelta di un'adeguata fase mobile e del modo di eluizione, sono stati determinati i limiti di rilevazione per questi composti. In particolare è stato sviluppato un metodo quantitativo lineare e ripetibile. L'acetilcolinesterasi delle anguille *Electrophorus electricus* (AChE) e la pseudocolinesterasi del siero umano (ChE) sono stati utilizzati come enzimi. I vantaggi di tale sistema sono stati verificati attraverso la rilevazione di questi composti in campioni di aria prelevati in un'area urbana. Un rilevatore UV è stato utilizzato on-line con un sistema di rilevatori enzimatici per ottenere informazioni comparative tra i composti che assorbivano i raggi UV presenti nell'area urbana.

L'AChE è stato ottenuto dalla Sigma; l'ChE dal Research Center of Finish Defence Forces. Il preparato liofilizzato è stato sciolto in una soluzione tampone di idrogenofosfato 52 mM a pH 7.2 contenente 0.1M di cloruro di sodio e 0.1% di gelatina (PBSG). Questa soluzione si manteneva stabile per alcune settimane, se conservata ad una temperatura di 4°C e riparata dalla luce. Il composto con il quale questa soluzione deve reagire è lo ioduro di acetylthiocholine. Questo viene sciolto in acqua distillata ad una concentrazione di 100mM, e si divide poi la soluzione in due parti uguali che vengono congelate a -25°C. Prima di essere utilizzato viene diluito in 1/10 di acqua distillata.

I tre componenti modello erano il GA, il GB e il GD, che vennero ottenuti dal Research Center of Finish Defence Forces, con una purezza che variava dal 70 all'85%. Il solvente era acetone o etere etilico, e la concentrazione era determinata tramite un GC equipaggiato con un rilevatore termoionico alcalino e con tri-n-butyl phosphonate e diisopropyl methylphosphonate aggiunto come standard interno. I solventi in fase mobile nell'LC, invece, erano metanolo e acqua distillata.

Prima dell'uso il solvente veniva filtrato attraverso una filtro-membrana con pori di 0.5 µm. In figura 1.3.3 è riportato un esempio di cromatogramma.

Campioni d'aria vennero prelevati sui tetti di sei edifici commerciali di Helsinki. I tempi del campionamento furono di 24 ore ed i volumi prelevati variavano da 1100 m³ a 1600m³.

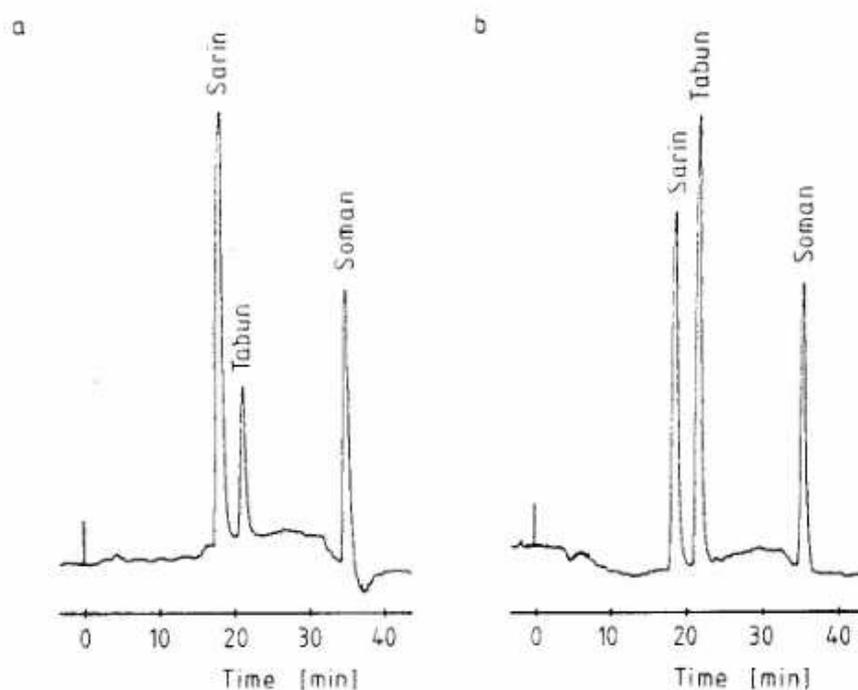


Fig. 1.3.3 Cromatogramma ottenuto dall'analisi di un campione contenente Tabun, Sarin e Soman in acetone, utilizzando AChE (a) e ChE (b); Condizioni: gradiente lineare da 15 a 65% metanolo in acqua 35 minuti; flusso 0.7ml/min; colonna LiChrosorb RP-18 (5mm),250X4mm.

Nei campioni furono poi iniettate soluzioni contenenti 4.1 μ g di Sarin, 3.5 μ g di Soman e 3.6 μ g di Tabun, distribuite uniformemente attraverso il filtro dell'apparato di campionamento dall'inizio del periodo di campionamento.

I campioni furono preventivamente esaminati per rilevare la presenza di pesticidi o altri componenti che potevano avere effetti inibitori sulla colinesterasi. Alla fine un volume di 7 μ l di campione concentrato veniva iniettato all'interno del cromatografo.

La sensibilità dei rilevatori dipende in maniera cruciale dalla capacità del composto di inibire gli enzimi. L'analisi mostra grandi differenze nel potere

inibente degli OP verso gli enzimi colinesterasi legate fundamentalmente al tipo di animale utilizzato. Un incremento del tempo di incubazione del soluto con gli enzimi, aumenta la sensibilità.

Uno studio sulla linearità della risposta è stato effettuato sotto l'ipotesi che gli inibitori fossero in eccesso e che la reazione tra l'enzima e l'inibitore potesse essere espressa tramite la seguente equazione:

$$2.303 \log(100 \cdot E_t / E_0) = -k_i I t$$

dove: E_0 e E_t sono le attività enzimatiche prima e dopo il periodo di incubazione; k_i è una costante; I è la concentrazione dell'inibitore.

In figura 1.3.4 è stato riportato un diagramma standard per il Soman.

Il cromatogramma di figura 1.3.5, ottenuto utilizzando i campioni di aria e di aria contaminata, mostra come il Sarin, il Soman e il Tabun siano chiaramente evidenziati dai picchi. I limiti di rilevabilità per i composti nell'aria sono gli stessi che si ottengono per i composti puri; questo dimostra l'eccellente selettività del rilevatore.

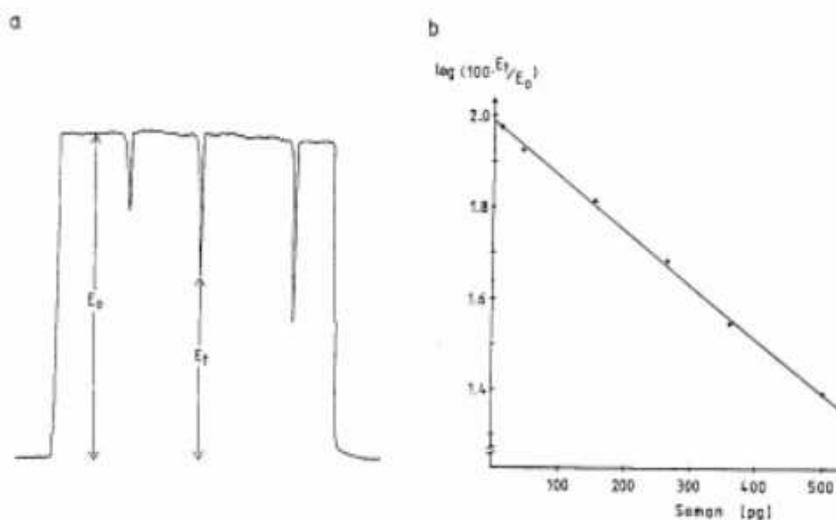


Fig. 1.3.4 *Determinazione dell'attività enzimatica iniziale, E_0 , e dell'attività enzimatica dopo l'incubazione, E_t , [a]; Diagramma standard per il Soman ottenuto tramite l'utilizzo di AChE.*

L'alto numero di composti presenti nell'aria che assorbono i raggi UV è chiaramente indicato dai cromatogrammi. I tre picchi presenti in entrambe gli scenari sono attribuibili alle impurezze nella concentrazione di dietilene, distillato due volte.

Nella figura 1.3.5, la parte alta del cromatogramma è rappresentativa di un'analisi svolta utilizzando come rivelatore enzimatico il siero umano; la parte bassa, invece, è rappresentativa di un'analisi svolta utilizzando il rivelatore UV a 254nm.

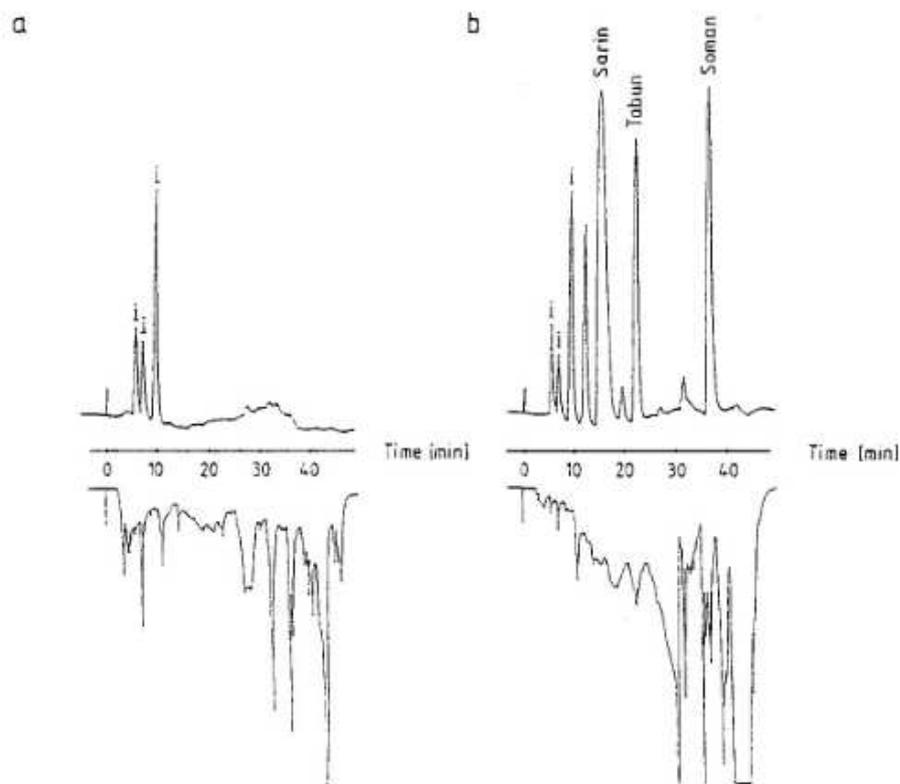


Fig. 1.3.5 Cromatogramma ottenuto dall'analisi dell'aria (a) e dall' analisi dell'aria con Tabun, Sarin e Soman (b).

“I” sono le impurezze presenti nella concentrazione di dietilestere; Condizioni: gradiente lineare da 15 a 65% metanolo-acqua in 35 minuti; flusso 0.7ml/min; colonna LiChrosorb RP-18 (5mm),250X4mm.

La presenza di inibitori della colinesterasi nei solventi organici è stata riportata già in studi passati: Vicedo ed altri trovarono ftalati (esteri dell'acido ortoftalico) e composti OP che mostravano l'attività di inibitori della colinesterasi nei residui del processo di distillazione di esano ed altri solventi industriali. L'identità delle impurezze dei solventi e di altri composti inibitori, però, non fu determinata.

Gli enzimi della colinesterasi possono essere utilizzati con successo in un sistema di reattori post-column per la rilevazione di tracce di composti organofosfati. Il progetto descrive come poter utilizzare solventi organici. L'alta sensibilità e la buona ripetibilità sono ottenuti per basse concentrazioni di componenti organici. L'applicazione su campioni di aria pulita mostra l'efficacia della colinesterasi per la determinazione selettiva dei composti OP. Di contro, i cromatogrammi UV dei campioni ambientali non sono molto attendibili [Sipponen, 1987].

Recentemente, una squadra canadese è stata mandata nell'Est Europeo per prelevare sacchetti e campioni di terreno per effettuare delle analisi sugli agenti chimici bellici. I risultati, a cura del Defence Research Establishment Suffield, non hanno rivelato l'esistenza di tali sostanze all'interno dei campioni prelevati, ma i tipi differenti di suolo sono stati utilizzati per lo sviluppo di nuovi metodi di analisi che riguardano proprio i terreni.

La gas cromatografia è stata largamente utilizzata per la separazione e l'identificazione degli agenti chimici bellici; la gas cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (MS) è, invece, stata usata prevalentemente per la caratterizzazione dei composti. I composti organofosforici sono stati studiati mediante la MS per bombardamento di elettroni e ionizzazione chimica, perché l'uso complementare di questa tecnica di ionizzazione facilita l'acquisizione di informazioni sulla molecola e la frammentazione degli ioni, utilizzata per l'identificazione. Va precisato che la separazione tramite GC, che è utilizzata prevalentemente per analizzare organofosforici in estratti organici, non è di solito utilizzata nell'analisi di campioni o estratti in soluzioni acquose, che richiedono

trattamenti preventivi. I campioni di acqua che contengono agenti chimici bellici sono, invece, generalmente analizzati tramite GC-MS a seguito di una microestrazione della fase solida oppure tramite elettroforesi capillare e LC. La ricerca, in effetti, ha portato allo sviluppo di metodi analitici che utilizzano la LC-MS per l'analisi dei composti liquidi contenenti i prodotti non-volatili dell'idrolisi delle sostanze chimiche belliche organofosforiche. Sono state sviluppate anche tecniche di MS e ionizzazione a pressione atmosferica per l'analisi di questi prodotti dell'idrolisi. Per esempio l'**ESI (Electrospray mass Spectrometry)** recentemente è stata utilizzata per analizzare questi campioni in fase liquida.

In particolare, l'LC-ESI-MS è stata utilizzata per la determinazione degli agenti chimici, dei loro prodotti di idrolisi e dei relativi composti in campioni liquidi, tutto nell'arco di una singola analisi. Questo approccio risulta essere un'alternativa alla GC-MS per queste analisi anche perché, in questo modo, i composti non devono essere precedentemente trattati.

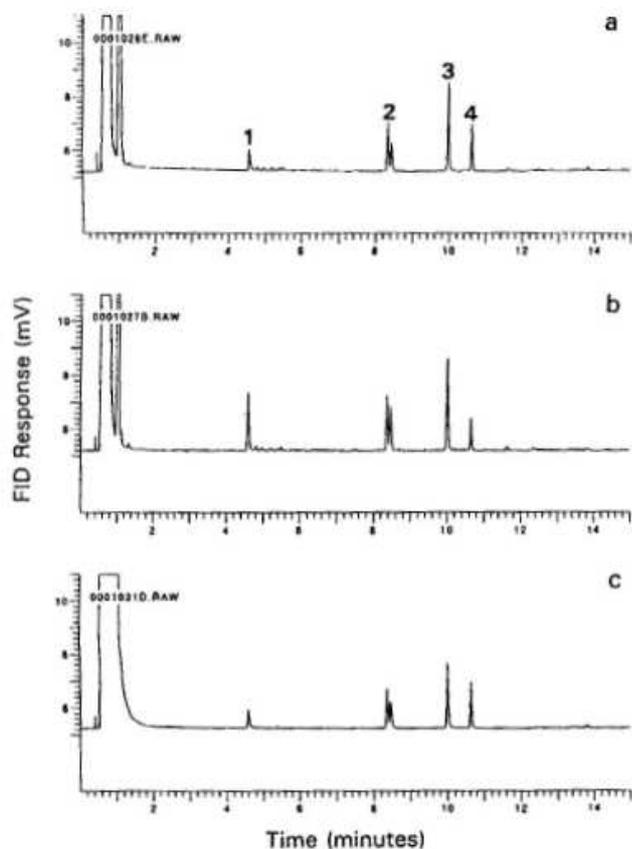


Fig. 1.3.6 Cromatogramma GC-FID ottenuto tramite estratto di diclorometano nei tre tipi di suolo a, b e c iniettati con 10 μ g/g di Sarin (1), Soman (2), trietilfosfato (3) e senape (4).

Allora, a partire da tre varietà di suolo, sono state effettuate analisi sull'acqua estratta da questi terreni con e senza l'iniezione di Soman, Sarin e Tabun (10 μ g in ogni grammo di suolo). I campioni sono stati analizzati sia tramite GC-FID (gas cromatografia con flame ionisation detection) che tramite LC-ESI-MS.

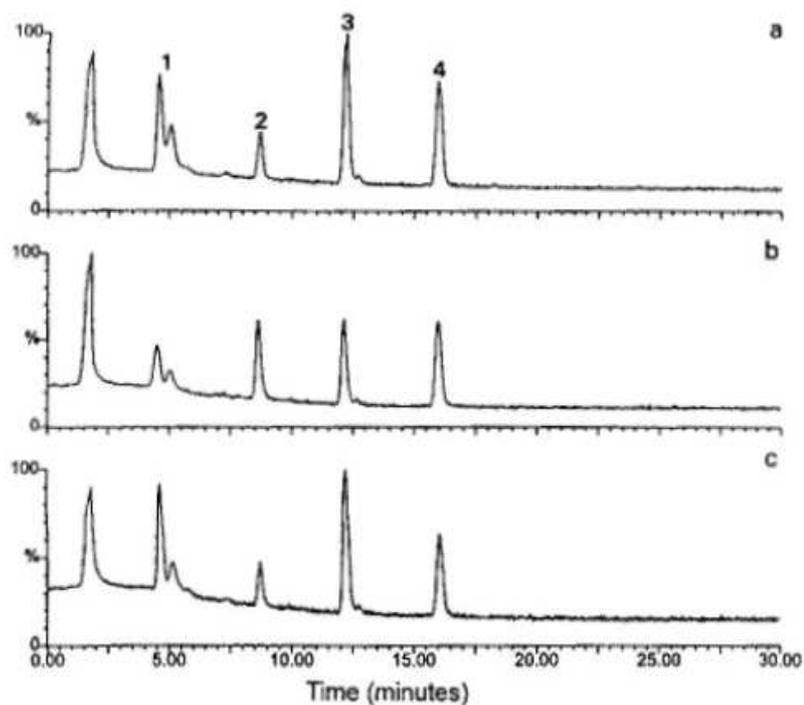


Fig. 1.3.7 Cromatogramma LC-ESI-MS ottenuto tramite estratto acquoso nei tre tipi di suolo *a*, *b* e *c* iniettati con 10 μ g/g di acido isopropyl-methyl-phosphonic (1), Sarin (2), acido pinacolyl- methyl- phosphonic (3) e Soman (4)

I tre tipi di terreno sono stati individuati nei cromatogrammi delle figure 1.3.6 e 1.3.7 con le lettere “a” (argilla rossa), “b” (argilla sabbiosa rossa) e “c” (argilla sabbiosa scura).

Il rilevamento del Soman, della senape e del trietilfosfato con l’utilizzo della tecnica GC-FID ha superato il 50%. Il Sarin è stato rilevato in maniera efficiente dall’argilla sabbiosa rossa (circa il 60%), mentre negli altri due tipi di suolo l’efficienza è stata di circa il 20-30%.

I cromatogrammi ottenuti invece con la tecnica LC-ESI-MS hanno mostrato, per i tre suoli, una rilevazione della maggior parte dei componenti, contenuta nei primi cinque minuti della prova [D'Agostino et al., 2001].

Le procedure sviluppate per la determinazione degli agenti nervini organoforforici e i prodotti di degradazione polare in soluzioni acquose, si basano sulla GC, sulla cromatografia liquida su microcolonna (μ -LC) e sulla TS-LC-MS. Queste procedure possono essere utilizzate per individuare eventuali presenze di agenti chimici in caso di conflitto militare. Nella procedura GC, l'agente viene isolato dall'acqua tramite estrazione con fase solida, usando lo XAD-4 (resina polimerica), a seguito dell'estrazione con etilacetato. In seguito, per incrementare la concentrazione dell'analita, si trasferisce il tutto in un tubo Tenax (tubo con all'interno polimeri che adsorbono i composti), che viene poi analizzato. Con queste procedure, utilizzando poi un rilevatore termoionico, è possibile rilevare il Soman, il Sarin e il Tabun in concentrazioni dell'ordine dei $\mu\text{g/l}$. Il passo più delicato, e difficile da riprodurre, è il trasferimento dell'estratto di etilacetato nel tubo Tenax. È stato analizzato, tramite GC, un volume di 200 μl iniettato con circa 0.4 ng di Sarin, di Soman di Tabun e di DFP, e 0.8ng di VX (fig. 1.3.8).

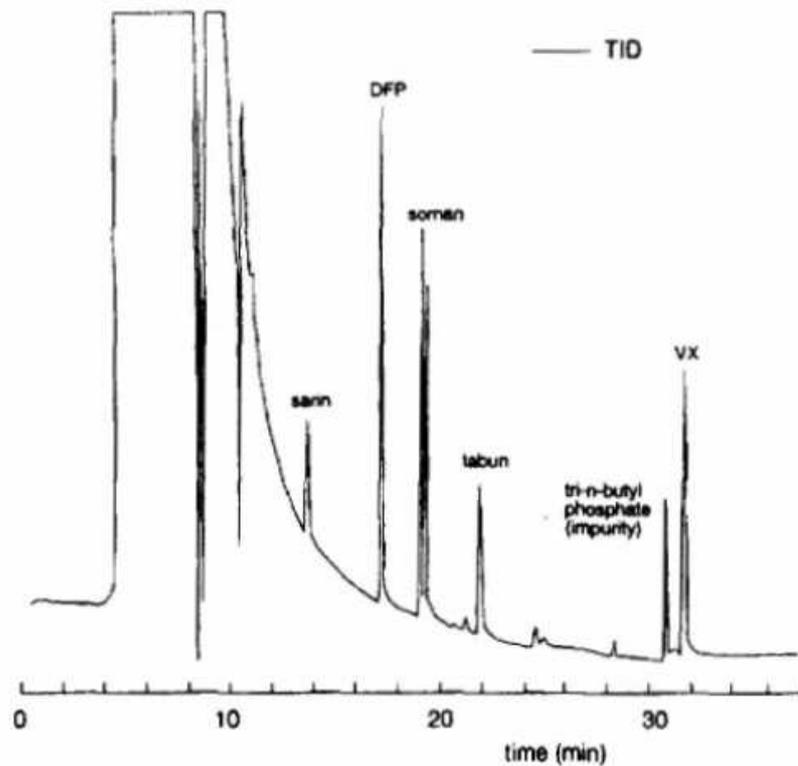


Fig. 1.3.8 Cromatogramma ottenuto iniettando 200 μ g di soluzione contenente Sarin, Soman, Tabun, VX e DFP nel solvente *n*-pentane-methanol (95:95).

Queste esperienze su campioni di acqua hanno consentito di rilevare il Sarin, il Soman e il Tabun al 30-50% e il DFP e il VX all'80-100%.

Gli agenti nervini subiscono rapidi processi di idrolisi in acqua in funzione del pH e della presenza di altri ioni. Questo significa che i campioni possono essere analizzati subito dopo il campionamento e, per ridurre l'idrolisi, è consigliabile acidificare i campioni portando il pH a 4-5 a seguito del prelievo. Comunque, il pH deve essere riportato a 6-7 a seguito dell'estrazione perché per valori bassi il VX permane nell'acqua [C.E.A.M. et al., 1996].

Il VX, grazie al suo potere di inibire l'acetilcolinesterasi, è ritenuto un agente chimico utilizzabile a scopo bellico ed il suo utilizzo come tale è stato vietato dal Protocollo di Ginevra nel 1925. L'utilizzo nella guerra tra Iran e Iraq e il presunto proliferare di questa sostanza hanno fatto sorgere la necessità di proporre metodi di identificazione e rilevazione per tutti i composti chimici che possono essere ritenuti agenti bellici. Una prova inequivocabile dell'utilizzo di queste sostanze chimiche può essere fornita tramite un'analisi spettrometrica. Grazie alla sua sensibilità e sensitività, la spettrometria di massa è la tecnica più adatta a tale scopo, specialmente quando si devono analizzare dei campioni prelevati dall'ambiente.

La determinazione del VX e il numero di impurezze vengono studiate in dettaglio tramite GC-MS. Utilizzando tecniche di bombardamento di elettroni e ionizzazione, possono essere identificati nel VX più di venti componenti. Il VX è un composto che, a seguito del rilascio, riesce a persistere nell'ambiente, diffondendosi nel suolo e nelle acque superficiali. Il destino di tale agente è legato alla natura del suolo in esame. In terreni umidi, nei concimi e nella torba, il 90% del VX permane per due giorni.

Nell'acqua risulta essere molto più stabile. Con pH pari ad 8, il processo di idrolisi è facilmente visibile a 25°C ed il tempo di dimezzamento in queste condizioni è di circa 184 ore. A differenza degli altri agenti nervini organofosfati, non vengono, per il VX, riportati studi esaurienti nella rilevazione in campioni di acqua. Verweij ed altri studiosi [1985], isolarono il Sarin, il Soman ed il Tabun da campioni di acqua tramite assorbimento su resina XAD-4, seguito dal rilascio con etilacetato e dal trasferimento della soluzione in un tubo Tenax, che veniva poi

analizzato attraverso metodi di rilascio tramite innalzamento di temperatura. Comunque, questo metodo di estrazione risultò insoddisfacente. Grazie al fatto che il VX si lega fortemente a qualsiasi superficie, Fowler e Smith [1989] convertirono il VX in un composto maggiormente volatile di etilmetilfosfonofluoridate, tramite l'utilizzo di una colonna riempita con Chromosorb 106 al fine di determinare basse concentrazioni del VX nell'aria per evaporazione.

Invece di isolare il VX dalla fase liquida, furono perfezionate analisi dirette su campioni di acqua tramite l'HPLC. Sipponen [1987] riportò la determinazione del Sarin, del Soman e del Tabun tramite HPLC mettendo in evidenza la loro presenza con reazioni di inibizione della colinesterasi. I limiti di rilevabilità furono ottenuti dai 10 ai 200pg. Comunque il VX non fu analizzato e non furono effettuate applicazioni in campioni di aria urbana. Siccome il VX mostrava un'assorbanza non selettiva relativamente debole con un massimo a 210nm, è risultato limitato l'utilizzo di rivelatori ultravioletti. Negli ultimi anni sono stati pubblicati diversi studi riguardanti i pesticidi organofosfati legati al VX e i prodotti dell'idrolisi dei pesticidi e degli agenti nervini nell'acqua attraverso termospray liquid chromatography-mass spectrometry (TSP-LC-MS).

Tramite l'utilizzo di questa tecnica, non è necessaria la fase di isolamento per la determinazione dei composti in campioni di acqua. Comunque, al fine di ottenere limiti di rilevabilità bassi, è necessaria una preconcentrazione.

Recentemente si è dimostrata l'efficacia delle cartucce Sep-Pak C18 per isolare i pesticidi organofosfati. In questo modo si è analizzato anche il VX.

Il VX è stato ricavato in laboratorio e posto in soluzione acquosa, con una concentrazione di 4µg/ml. È stato conservato ad una temperatura di 4°C con un pH pari a 6 per due settimane. In queste condizioni non si sono osservati processi di idrolisi. I campioni di terreno sono stati preparati durante un progetto coordinato dal Finish Research Project for Chimical Rarefare Verification. I campioni sono stati iniettati con 100mg/Kg di VX e altri prodotti della degradazione.

La TSP-LC-MS del VX dipende dalla composizione della fase liquida. Il peso atomico della molecola è stato ricavato in maniera inequivocabile con un picco a 268, utilizzando la ionizzazione da un tampone di acetato di ammonio in miscela con un elevato contenuto di metanolo o acetonitrile. Frammenti di minore entità si notano a 145,146 e 188m/z. Si è cercato, poi, di definire la struttura dei frammenti trovati, soprattutto quando si utilizza la soluzione di acetato di ammonio 0.1M. L'intensità relativa degli ioni dipende fortemente dalle condizioni in cui si svolgono gli esperimenti (fig. 1.3.9).

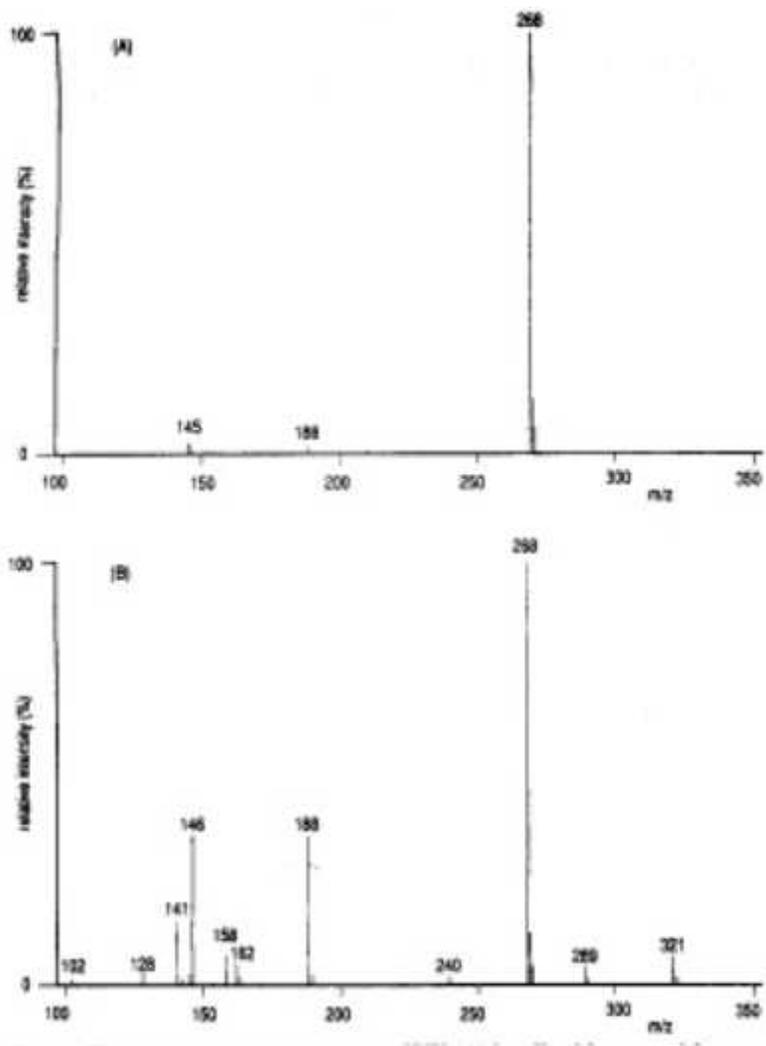


Fig. 1.3.9 TSP-MS del VX in fase liquida con acetonitrile-metanolo-0.089M acetato di ammonio (50:14:36)(A) e con 0.1M di acetato di ammonio (B).

Sfortunatamente, le analisi in soluzioni acquose al 100% possono essere eseguite solo quando il VX viene direttamente introdotto tramite l'iniezione. Questo tipo di analisi può essere limitata qualora la concentrazione di VX sia estremamente elevata rispetto agli altri componenti.

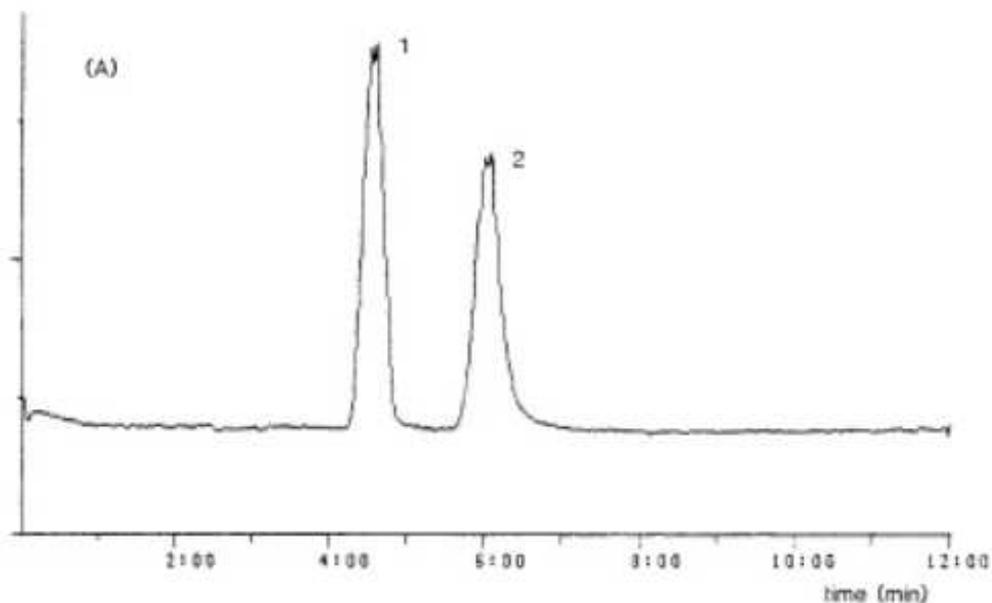


Fig. 1.3.9bis Cromatogramma del VX utilizzando una colonna C_{18} e acetonitrile-metanolo-0,25 M di acetato di ammonio (70:20:10).

Per la determinazione degli agenti nervini organofosforici o pesticidi mediante l'HPLC a fase inversa, viene utilizzata acqua con un elevato contenuto di solventi organici. Condizioni simili vengono stabilite per il VX. A pH 5, i picchi rivelati utilizzando colonne C_{18} e metanolo-0,1M acetato di ammonio (50:50) come eluente, probabilmente sono legati ad una reazione di scambio tra il VX e la sua forma protonata (fig. 1.3.9bis). È stato quindi necessario cambiare la composizione dell'eluente, utilizzando il *tri-n-butyl phosphate*.

Siccome questo eluente è un inquinante che si trova a livelli relativamente alti nei fiumi europei, si può realizzare una separazione cromatografica. In aggiunta, oltre ad essere presente nelle acque fluviali, è difficilmente eliminabile da tali acque.

Probabilmente la sua presenza è legata a solventi organici o tubazioni in plastica. Alla fine è stata valutata un'altra composizione dell'eluente, ottimizzata al fine di separare il VX dal *tri-n-butyl phosphate*: acetonitrile-metanol-0,25M acetato di ammonio (70:20:10). Questa combinazione fa sì che si riducano anche i tempi dell'analisi.

Al fine di rilevare l'applicabilità di queste procedure, sono stati prelevati campioni d'acqua da due importanti fiumi europei, il Reno e la Mosa, ed è stato introdotto in questi campioni il VX.

Nel cromatogramma del campione d'acqua non contaminato (figura 1.3.10) sono evidenti tre picchi, dei quali quello centrale corrisponde al tri-n-butyl fosfato.

Nella figura 1.3.11, invece, è stato riportato il cromatogramma del campione contaminato iniettando 0.1ng/ml di VX.

Il VX è stato anche determinato con successo nell'acqua estratta da campioni di suolo. In particolare sono stati estratti campioni di suolo argilloso contaminati col VX, ed i risultati sono stati descritti da Verweij ed altri [Verweij et al, 1985] attraverso il mescolamento a temperatura ambiente per 1 ora o con una miscela di solventi organici (cloroformio-metanol) o con acqua demineralizzata. L'estrazione di campioni di suolo con acqua e la determinazione del VX tramite TSP-LC-MS ha condotto a risultati migliori rispetto all'estrazione con la miscela di solventi organici seguita dalla determinazione del VX tramite GC.

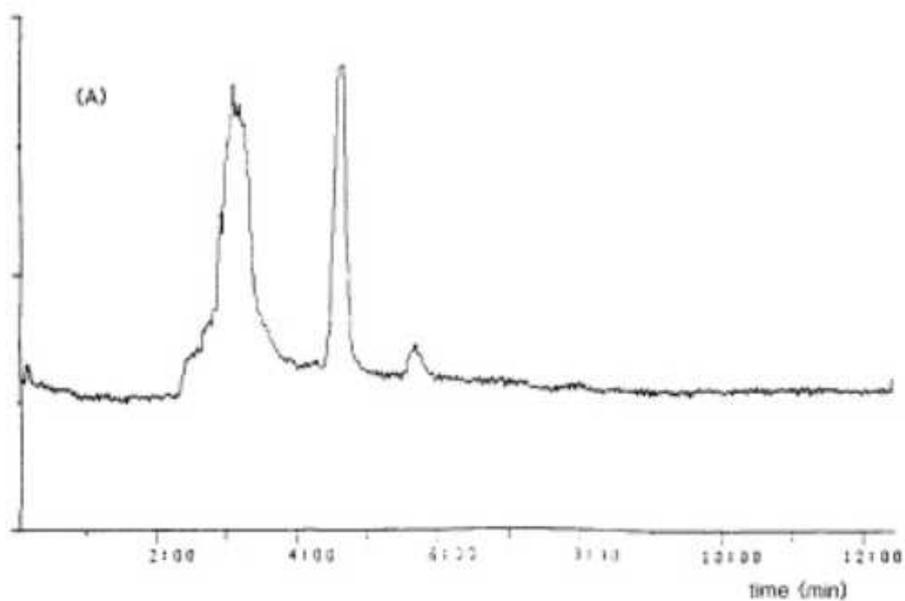


Fig. 1.3.10 Cromatogramma del campione d'acqua non contaminato.

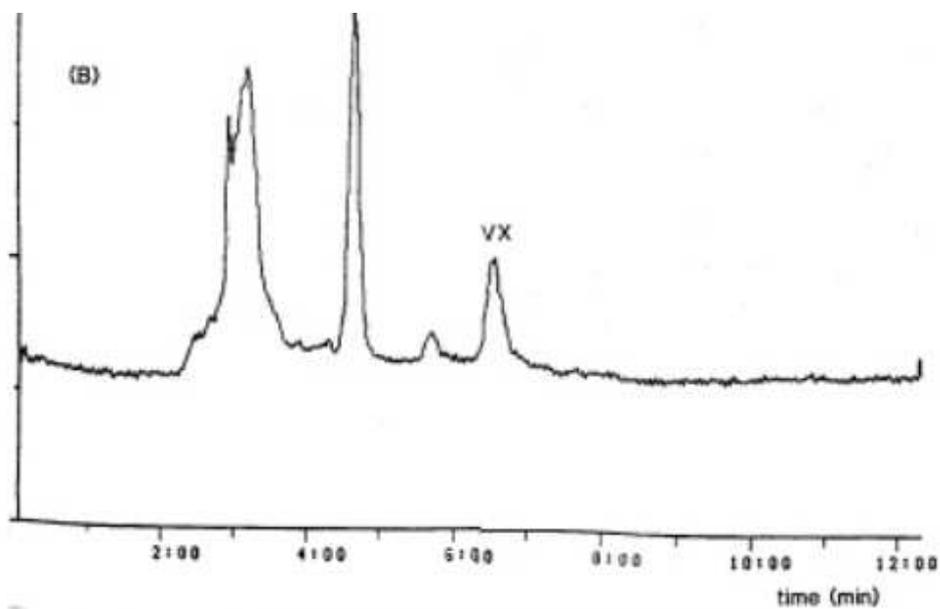


Fig. 1.3.11 Cromatogramma del campione d'acqua contaminato

In tre campioni di suolo è stata rilevata una concentrazione media di 3mg/Kg di VX nell'acqua, mentre nella miscela di solventi organici sono stati rilevati solo 0,4 mg/Kg. Siccome poi non si sono trovate interferenze fra i componenti del terreno, l'analisi basata su TSP-LC-MS può essere considerata una buona alternativa alla GC [Wils et al, 1990].

Le esperienze descritte, relative all'analisi di campioni di armi chimiche belliche hanno sempre indicato che i campioni esaminati possono contenere un numero significativo di altri composti, legati al processo di degradazione dell'agente originale. In alcuni casi questi predominavano in concentrazione all'interno delle soluzioni, al punto che non era più rilevabile l'agente chimico di partenza. In queste condizioni, la tecnica più utilizzata è la GC-MS per rilevare ed identificare questi composti addizionali. La GC-MS viene accoppiata, per la caratterizzazione del VX e dei composti relativi, all'EI (Electron Impact) e alla CI (Chemical Ionization).

Un campione di VX, noto per contenere numerosi prodotti della degradazione, è stato selezionato per caratterizzare la sostanza tramite l'LC-ESI-MS. L'ESI-MS fornisce ampie informazioni sugli ioni presenti e sulla loro struttura molecolare tramite l'utilizzo della CAD (Collisionally Activated Dissociation). I dati forniti tramite questa tecnica sono utili, durante le campagne di distruzione controllata delle armi chimiche approvate dal Chemical Weapons Convention, per verificare la presenza di queste sostanze nei prodotti sospettati di essere stati contaminati.

Un campione degradato di VX è stato ottenuto da container di vetro, conservati per circa 15 anni. L'analisi preliminare del campione è stata effettuata tramite la GC-MS, ed indicava la presenza del VX al 10% nella sostanza organica volatile (questa tecnica non è utile per l'analisi dei componenti non volatili). Questo campione fu sciolto in acqua in concentrazione di 1mg/ml prima di essere analizzato tramite LC-ESI-MS. Un secondo campione di VX relativamente puro, sintetizzato in laboratorio, è stato sciolto in isopropanolo in concentrazione di 0,05mg/ml e analizzato tramite ESI-MS.

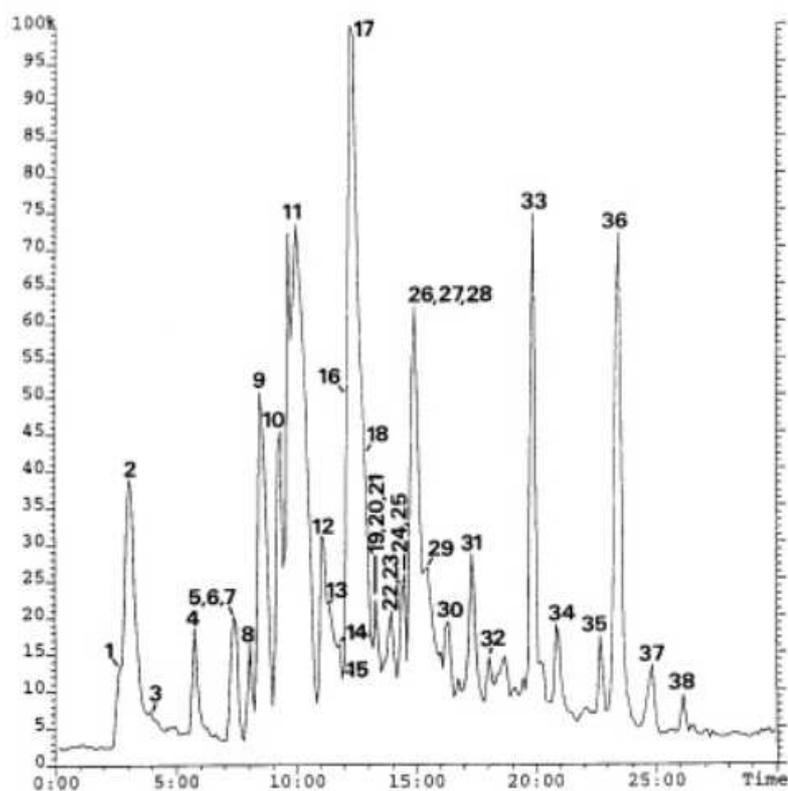


Fig. 1.3.12 Cromatogramma LC-ESI-MS ottenuto per un campione di VX degradato.

Sono state preparate due soluzioni per separare i campioni nell'LC: solvente A (0,1% di acido trifluoroacetico in acqua) e solvente B (0,1% acido trifluoroacetico in acetonitrile (ACN)-acqua, 95:5). La separazione cromatografica è stata effettuata utilizzando una concentrazione variabile di solvente B dall'1 al 75% in 30 minuti.

Tramite l'ESI-MS sono stati ottenuti i dati relativi alla massa molecolare di 38 componenti (figura 1.3.12), dei quali i due terzi sono stati identificati, o almeno se ne è tentata l'identificazione (tab. 1.3.1).

n°Picco	Mr	Nome composto	Struttura
1	202	Ethyl hydrogen dimethylpyrophosphate	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{EtO}-\text{P}-\text{O}-\text{P}-\text{OH} \\ \quad \\ \text{Me} \quad \text{Me} \end{array}$
2	124	Ethyl hydrogen methylphosphonate	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{EtO}-\text{P}-\text{OH} \\ \\ \text{Me} \end{array}$
3	101	Diisopropylamine	$\text{H}-\text{N}(\text{iPr})_2$
4	255	S-[2-(Diisopropylamino)ethyl] methylphosphonothiolate	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{HO}-\text{P}-\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{iPr})_2 \\ \\ \text{Me} \end{array}$
5	255	S-[2-(Diisopropylamino)ethyl] methylphosphonodithiolate	$\begin{array}{c} \text{X} \\ \\ \text{HX}-\text{P}-\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{iPr})_2 \\ \\ \text{Me} \end{array} \quad \text{X}=\text{O},\text{S}$
6	235	Sconosciuto	
7	304	Sconosciuto	

8	299	S-[5-(Diisopropylamino)-3-thiapentyl] methylphosphonothiolate	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{HO} - \text{P} - (\text{SCH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{iPr})_2 \\ \\ \text{Me} \end{array}$
9	288	Bis [2-(diisopropylamino)ethyl] sulfide	$(\text{iPr})_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{iPr})_2$
10	230	Diethyl dimethylpyrophosphate	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \quad \text{O} \\ \quad \quad \\ \text{EtO} - \text{P} - \text{O} - \text{P} - \text{EtO} \\ \quad \quad \\ \text{Me} \quad \quad \text{Me} \end{array}$
11	320	Bis[2-(diisopropylamino)ethyl] disulfide	$(\text{iPr})_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{SSCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{iPr})_2$
12	348	1,8-Bis(diisopropylamino)-3,6-dithiaoctane	$(\text{iPr})_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{iPr})_2$
13	352	Bis[2-(diisopropylamino)ethyl] trisulfide	$(\text{iPr})_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{SSSCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{iPr})_2$
14	348	1,8-Bis(diisopropylamino)-3,4-dithiaoctane	$(\text{iPr})_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{SSCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{iPr})_2$
15	366	1,8-Bis(diisopropylamino)-3,4,5-dithiaoctane	$(\text{iPr})_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{SSSCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{iPr})_2$
16	233	Sconosciuto	
17	327	O-Ethyl S-[5-(diisopropylamino)-3-thiapentyl] methylphosphonothiolate	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{EtO} - \text{P} - (\text{SCH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{iPr})_2 \\ \\ \text{Me} \end{array}$
18	380	1,9-Bis(diisopropylamino)-3,4,7-trithianonane	$(\text{iPr})_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{SSCH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{iPr})_2$
19	374	Sconosciuto	

20	408	1,11-Bis(diisopropylamino)-3,6,9-trithiaundecane	$(iPr)_2 N CH_2 CH_2 S CH_2 CH_2 S CH_2 CH_2 S CH_2 CH_2 N (iPr)_2$
21	408	1,11-Bis(diisopropylamino)-3,6,7-trithiaundecane	$(iPr)_2 N CH_2 CH_2 CH_2 CH_2 S S CH_2 CH_2 S CH_2 CH_2 N (iPr)_2$
22	306	Sconosciuto	
23	412	1,10-Bis(diisopropylamino)-3,4,7,8-tetrathiadecane	$(iPr)_2 N CH_2 CH_2 S S CH_2 CH_2 S S CH_2 CH_2 N (iPr)_2$
24	458	Sconosciuto	
25	412	1,10-Bis(diisopropylamino)-3,4,5,8-tetrathiadecane	$(iPr)_2 N CH_2 CH_2 S CH_2 CH_2 S S S CH_2 CH_2 N (iPr)_2$
26	283	S-oppure O-Ethyl S-[2-(diisopropylamino)ethyl] methylphosphonodithioate	$ \begin{array}{c} X \\ \\ EtX - P - S CH_2 CH_2 N (iPr)_2 \\ \\ Me \end{array} $ <p style="text-align: right;">X=O,S</p>
27	387	O-Ethyl S-[8-(diisopropylamino)-3,6-dithiaoctyl] methylphosphonodithiolate	$ \begin{array}{c} O \\ \\ EtO - P - (S CH_2 CH_2)_3 N (iPr)_2 \\ \\ Me \end{array} $
28	440	1,12-Bis(diisopropylamino)-3,6,7,10-tetrathiadodecane	$(iPr)_2 N CH_2 CH_2 S CH_2 CH_2 S S CH_2 CH_2 S CH_2 CH_2 N (iPr)_2$
29	387	O-Ethyl S-[8-(diisopropylamino)-3-thiapentyl] methylphosphonodithiolate	$ \begin{array}{c} O \\ \\ EtO - P - S (CH_2 CH_2)_2 S S CH_2 CH_2 N (iPr)_2 \\ \\ Me \end{array} $
30	372	Sconosciuto	
31	427	Sconosciuto	

32	343	S-oppure O-Ethyl S-[5-(diisopropylamino)-3-thiapentyl] methylphosphonodithioate	$\begin{array}{c} \text{X} \\ \\ \text{EtX} - \text{P} - (\text{SCH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{iPr})_2 \\ \\ \text{Me} \end{array} \quad \text{X}=\text{O},\text{S}$
33	224	N,N'-Dicyclohexylurea	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_{11} - \text{N} - \text{C} - \text{N} - \text{C}_6\text{H}_{11} \\ \quad \quad \\ \text{H} \quad \quad \text{H} \end{array}$
34	268	Sconosciuto	
35	291	Sconosciuto	
36	240	N,N'-Dicyclohexylthiourea	$\begin{array}{c} \text{S} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_{11} - \text{N} - \text{C} - \text{N} - \text{C}_6\text{H}_{11} \\ \quad \quad \\ \text{H} \quad \quad \text{H} \end{array}$
37	307	Sconosciuto	
38	305	Sconosciuto	

Tab 1.3.1 *Composti identificati in un campione di VX degradato.*

I composti identificati nella degradazione del VX si dividono in due categorie: quelli che appartengono alla prima (che occupano il primo terzo del cromatogramma di Fig.1.3.12) contengono ancora il fosforo legato a gruppi metilenici, mentre quelli che appartengono alla seconda sono costituiti da lunghe catene di idrocarburi come il bis(diisopropylamino)thiaalkane.

Nella figura 1.3.13 sono stati riportati i dati ottenuti dall'ESI-MS per due prodotti di degradazione non-solfurei, ethyl hydrogen dimethylpyrophosphonate e ethyl hydrogen methylphosphonate, che si formano a seguito dell'idrolisi del diethyl methylpyrophosphonate e del VX, rispettivamente.

La massa molecolare dell'ethyl hydrogen dimethylpyrophosphate è chiaramente stabilita dalla presenza di ioni $(M_2Na)^+$, $(M_2H)^+$, $(MNa)^+$ e $(MH)^+$ rispettivamente a m/z 427, 405, 225 e 203. Gli ioni a m/z 216 e 175 sono probabilmente dovuti alla perdita di C_2H_4 da ioni $(MH+ACN)^+$ e $(MH)^+$, mentre lo ione a m/z 281 è dovuto probabilmente a $(M_2H-C_2H_5O_3P)^+$. La massa molecolare dell'ethyl hydrogen methylphosphonate è stata stabilita dalla presenza di ioni a m/z 373, 271, 249, 166, 143 e 125 dovuti a $(M_3H)^+$, $(M_2Na)^+$, $(M_2H)^+$, $(MH+ACN)^+$, $(MH+H_2O)$ e $(MH)^+$. Gli ioni a m/z 327, 138 e 115 sono rispettivamente dovuti a $(M_3H-C_2H_6O)^+$, $(MH+ACN-C_2H_4)$ e $(MH+H_2O-C_2H_4)^+$.

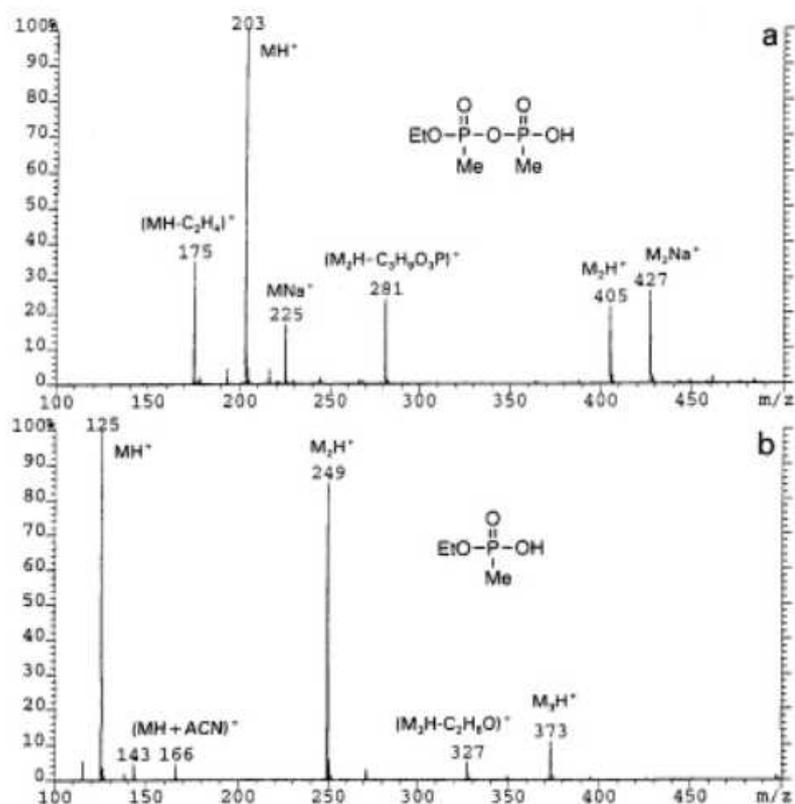


Fig 1.3.13 ESI-MS acquisito per l'ethyl hydrogen dimethylpyrophosphate e per ethyl hydrogen methylphosphate.

Questo tipo di analisi è utile perché, pur non rivelando direttamente la presenza del VX, ne individua i prodotti della degradazione [D'Agostino et al, 1999].

La USEPA (U.S. Environmental Protection Agency) ha effettuato una distinzione tra i **VOCs** (composti organici volatili come per esempio il Benzene e il Toluene) e gli **SVOCs** (composti organici semi-volatili come i pesticidi). Per quanto riguarda l'individuazione dei VOCs, si effettuano analisi GC "intrappolando" i composti tramite l'impiego di membrane semipermeabili; per quanto concerne gli SVOCs gli studi non sono ancora terminati e vengono condotti prevalentemente tramite l'impiego di HPLC [Guo et al, 2000].

L'obiettivo dello studio condotto da Guo ed altri era di pervenire all'estrazione degli SVOCs da una miscela acquosa tramite membrane e analizzare in continuo la soluzione tramite HPLC. Dalla miscela acquosa gli SVOCs venivano introdotti nello strumento di analisi con un solvente che facilitava la separazione della miscela dalla sostanza organica. Lo studio ha dimostrato la possibilità di un'analisi in continuo simulando il flusso dell'acqua.

La strumentazione comprendeva dei filtri per l'estrazione e un HPLC con un detector UV, sei porte di ingresso ed una pompa per la distribuzione del solvente e del campione d'acqua che venivano a contatto in controcorrente (fig.1.3.14).

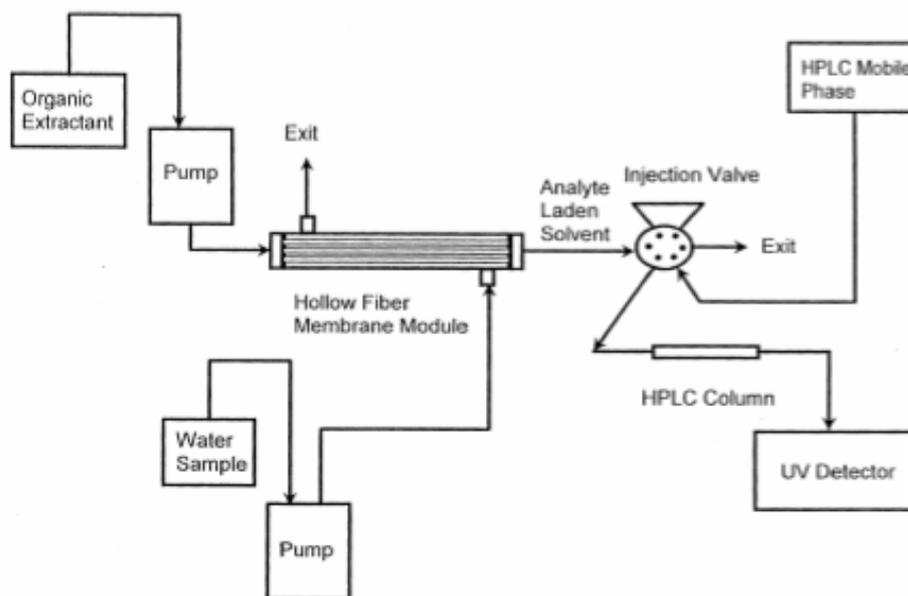


Fig.1.3.14 HPLC con sistema di miscelazione e separazione delle sostanze analizzate.

Il meccanismo di estrazione liquido-liquido che avviene all'interno del tubo-membrana, rappresentato in fig. 1.3.15, comprende cinque fasi diverse:

1. miscelazione dell'analita con acqua e trasporto fino alla linea di confine dell'acqua;
2. dissoluzione nella membrana;
3. la soluzione attraversa la membrana;
4. desorbimento dalla membrana e dissoluzione tramite solvente;
5. trasporto fino alla linea di confine del solvente.

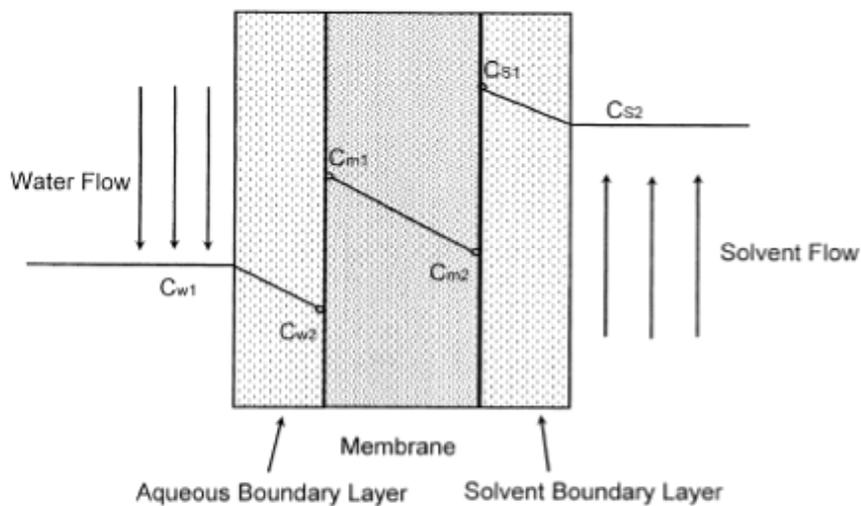


Fig. 1.3.15. Processo di estrazione tramite membrane. C_w è la concentrazione di sostanza organica in acqua; C_m la concentrazione di sostanza organica nella membrana e C_s la concentrazione di sostanza organica nel solvente.

Dall'analisi in continuo dei campioni otteniamo una serie di picchi cromatografici riportati in fig. 1.3.16.

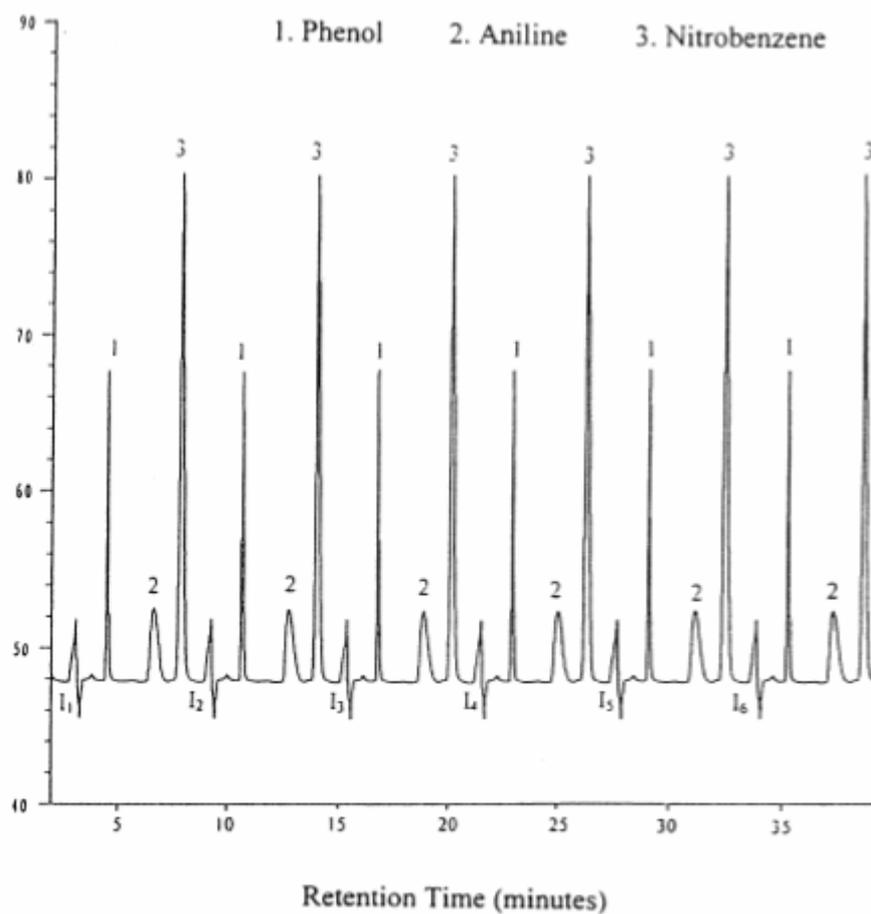


Fig. 1.3.16 Serie di cromatogrammi ottenuti dal monitoraggio continuo del flusso di acqua contenente Phenol, Aniline e Nitrobenzene.

L'Elettroforesi

Il termine *elettroforesi* descrive la migrazione di particelle cariche sotto l'influenza di un campo elettrico. Molte molecole di interesse biologico, come gli aminoacidi, i peptidi, le proteine, i nucleotidi e gli acidi nucleici, possiedono gruppi ionizzabili e, quindi, ad ogni valore di pH sono presenti in soluzione come specie elettricamente cariche sia come cationi (+) che come anioni (-). Sotto l'influenza di un campo elettrico queste molecole cariche migrano verso il catodo o l'anodo, a seconda che possiedano una carica negativa o positiva.

L'apparecchiatura per l'elettroforesi è composta fondamentalmente da due parti: un *alimentatore* e una *cella elettroforetica*. La cella elettroforetica può essere di due tipi: per elettroforesi su *gel verticale* o *orizzontale*. Celle elettroforetiche per separazioni su gel verticali, come quella mostrata in figura 1.3.17, sono acquistabili sul mercato e vengono normalmente utilizzate per la separazione di proteine su gel di poliacrilammide. Il gel viene formato tra due lastre di vetro che sono mantenute parallele e separate da sottili *spaziatori* di plastica. Le normali dimensioni di un gel sono 12 cm x 14 cm, con uno spessore di 1-2 mm. Un *pettine* di plastica viene sistemato nella soluzione che polimerizzando diventerà un gel e viene tolto a polimerizzazione ultimata, in modo da costituire i pozzetti per il caricamento dei campioni.

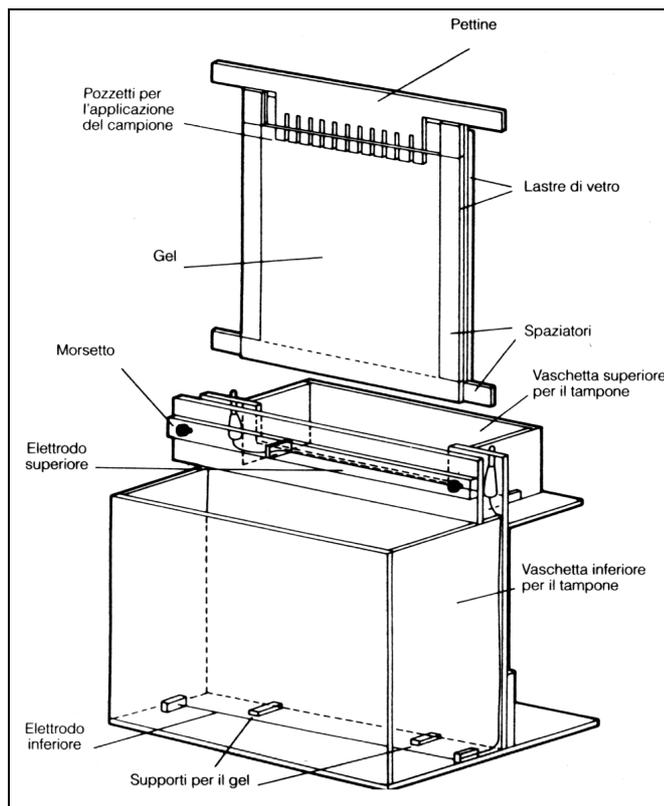


Fig. 1.3.17 *Apparato verticale per elettroforesi utilizzato per la separazione di proteine su gel di poliacrilammide. Una volta che il gel è polimerizzato, lo spaziatore inferiore viene rimosso prima di effettuare la corsa elettroforetica sul gel.*

Una volta che l'apparato per elettroforesi viene assemblato, la vasca elettroforetica inferiore, riempita di tampone, fornisce, attraverso un sistema di raffreddamento opportuno, la termostatazione delle lastre contenenti il gel che in essa pescano. In figura 1.3.17 viene mostrato un tipico apparato per elettroforesi orizzontale. Il gel è montato su una lastra di vetro o di plastica ed è appoggiato su una piastra refrigerante (una superficie isolata attraverso la quale viene fatta circolare dell'acqua fredda per dissipare il calore prodotto durante l'elettroforesi).

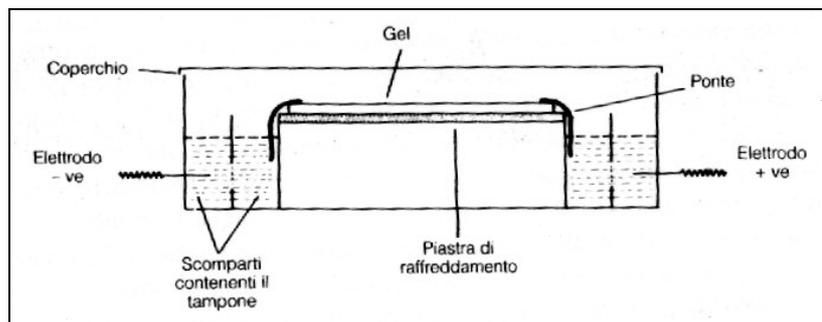


Fig. 1.3.18 *Apparato orizzontale per elettroforesi utilizzato per immunoelettroforesi, isoelettrofocalizzazione ed elettroforesi di DNA e RNA su gel di agarosio.*

Il gel viene connesso al tampone nel quale sono immersi gli elettrodi attraverso sottili strisce di carta da filtro (figura 1.3.18): si noti, tuttavia, che nell'elettroforesi su gel di agarosio del DNA, il gel è immerso totalmente nel tampone. L'alimentatore fornisce una *corrente diretta* tra gli elettrodi nella cella elettroforetica. Tutti i tipi di elettroforesi vengono condotti in un tampone appropriato, che è essenziale per mantenere costante lo stato di ionizzazione delle molecole che devono essere separate. Infatti, ogni variazione del pH provocherebbe una alterazione della carica totale e quindi cambierebbe la *mobilità* (cioè la velocità di migrazione in un campo elettrico applicato) delle molecole da separare.

Per capire meglio come le specie cariche si separino, è necessario ricordare alcune semplici relazioni. Quando tra due elettrodi viene applicata una *differenza di potenziale* (voltaggio), si genera un *gradiente di potenziale elettrico* (E), che corrisponde al voltaggio applicato (V) diviso la distanza (d) tra i due elettrodi. In

presenza di un gradiente di potenziale applicato, la forza su una molecola di carica q (coulomb) equivale a Eq (misurata in newton). Questa è la forza che spinge una molecola carica verso un elettrodo. Tuttavia, esiste anche una *forza frizionale* che rallenta il movimento della molecola. Questa forza frizionale dipende dalle dimensioni idrodinamiche della molecola, dalla sua forma, dalle dimensioni dei pori del mezzo nel quale avviene l'elettroforesi e dalla viscosità del tampone. Quindi, la velocità (v) di una molecola carica che si sposta in un campo elettrico è data dalla seguente equazione:

$$v = Eq/f \quad (1)$$

dove f rappresenta il coefficiente frizionale.

Più comunemente viene utilizzato il termine *mobilità elettroforetica* (μ) dello ione, che equivale alla velocità dello ione diviso l'intensità del campo elettrico (v/E). Pertanto, quando si applica una differenza di potenziale, molecole con carica elettrica totale differente inizieranno a separarsi in funzione della loro mobilità elettroforetica. Anche molecole con carica elettrica uguale, ma con dimensioni molecolari differenti, si separeranno per effetto di forze frizionali diverse. Come descritto più avanti, alcuni tipi di elettroforesi sfruttano quasi esclusivamente la differente carica elettrica delle molecole per ottenere la loro separazione, mentre altri metodi utilizzano le differenze nelle dimensioni molecolari e si basano, quindi, principalmente sulle forze frizionali.

Se il campo elettrico viene tolto prima che le molecole abbiano raggiunto gli elettrodi, si ha una separazione dei singoli componenti in base alla loro mobilità

elettroforetica. Per questo motivo, l'elettroforesi è una forma incompleta di elettrolisi.

Nella soluzione tra gli elettrodi la corrente viene condotta principalmente dagli ioni del tampone, mentre gli ioni del campione ne conducono una piccola parte. La *legge di Ohm* esprime la relazione tra l'intensità di corrente (I), il voltaggio (V) e la resistenza (R):

$$R=V/I \quad (2)$$

In base a questa equazione appare chiaro che è possibile in linea di principio, accelerare una separazione elettroforetica semplicemente aumentando il voltaggio applicato; ciò determina un corrispondente aumento del flusso di corrente. La distanza di migrazione degli ioni sarà proporzionale sia all'intensità di corrente che al tempo. Tuttavia questo semplice ragionamento non tiene conto della possibilità di *sviluppo di calore*, problema, questo, della maggior parte dei tipi di elettroforesi.

Infatti, durante l'elettroforesi la potenza (W, misurata in watt) generata nel mezzo in cui passa la corrente è data dall'equazione:

$$W = I^2R \quad (3)$$

La maggior parte della potenza sviluppata viene dissipata sotto forma di calore. Il calore sviluppato nel mezzo durante una elettroforesi può avere i seguenti effetti negativi:

1. aumento della velocità di diffusione dei campioni e degli ioni del tampone, che determina la formazione di bande meno definite;
2. comparsa di correnti convettive, che portano al mescolamento dei campioni separati;
3. denaturazione di quei campioni che sono poco stabili alle alte temperature;
4. diminuzione della viscosità del tampone e, quindi, diminuzione della resistenza del mezzo.

Se durante una elettroforesi viene applicato un voltaggio costante, l'intensità di corrente, per effetto della diminuzione della resistenza (si veda la legge di Ohm, equazione 2), aumenta, determinando un aumento del calore sviluppato. Per questo motivo, si utilizzano alimentatori stabilizzati, in grado di fornire una corrente costante. In questo modo si eliminano le fluttuazioni di calore e si limitano gli effetti negativi sopra descritti.

Il costante sviluppo di calore rimane comunque un serio problema. Una possibile soluzione potrebbe essere quella di eseguire separazioni elettroforetiche utilizzando intensità di corrente applicata molto basse. In questo modo si otterrebbero, però, separazioni limitate come conseguenza dell'aumento della *diffusione* dei campioni dovuto al maggior tempo richiesto per la separazione.

Una volta terminata la separazione dei campioni, questi vengono visualizzati mediante opportuni metodi di colorazione o, nel caso siano radioattivi, tramite l'autoradiografia.

Materiali di supporto

Gli studi pionieristici di Tiselius e dei suoi collaboratori sull'elettroforesi furono condotti in soluzione libera. Fu chiaro fin dall'inizio che i problemi associati con questa metodica, in particolar modo gli effetti negativi della diffusione e delle correnti convettive, potevano essere limitati stabilizzando il medium dove avviene l'elettroforesi. Ciò fu realizzato facendo avvenire l'elettroforesi su un supporto meccanico poroso, che veniva opportunamente bagnato nel tampone di corsa e all'interno del quale si aveva l'elettroforesi degli ioni del tampone e del campione. Il medium di supporto eliminava le correnti convettive e limitava la diffusione, cosicché i campioni separati erano contenuti in strette zone. I primi supporti utilizzati erano costituiti da carta da filtro o da strisce di acetato di cellulosa, imbevute nel tampone di corsa. Attualmente, questi supporti sono poco usati anche se per certe applicazioni trovano ancora impiego (ad esempio nell'elettroforesi diagonale). In particolare, per molti anni molecole piccole, come aminoacidi, peptidi e carboidrati, sono stati separati ed analizzati per mezzo di elettroforesi su supporti quali carta, lastre sottili di cellulosa, silice o allumina. Al giorno d'oggi, benché questa tecnica sia usata occasionalmente, queste molecole vengono analizzate per mezzo di tecniche più moderne e sensibili, quali ad esempio l'HPLC. Comunque, mentre i supporti di carta o a strato sottile danno buoni risultati con molecole piccole, la separazione di macromolecole, quali proteine e acidi nucleici, su tali supporti è scarsa.

L'utilizzo dei gel come materiale di supporto per elettroforesi ha portato a un rapido miglioramento nei metodi di analisi delle macromolecole. Il primo gel ad essere usato come supporto fu quello di amido, ma oggi per la maggior parte delle tecniche elettroforetiche si utilizzano gel di agarosio o di poliacrilammide.

Gel di poliacrilammide. L'elettroforesi su gel di poliacrilammide viene spesso chiamata PAGE (abbreviazione di *polyacrylamide gel electrophoresis*).

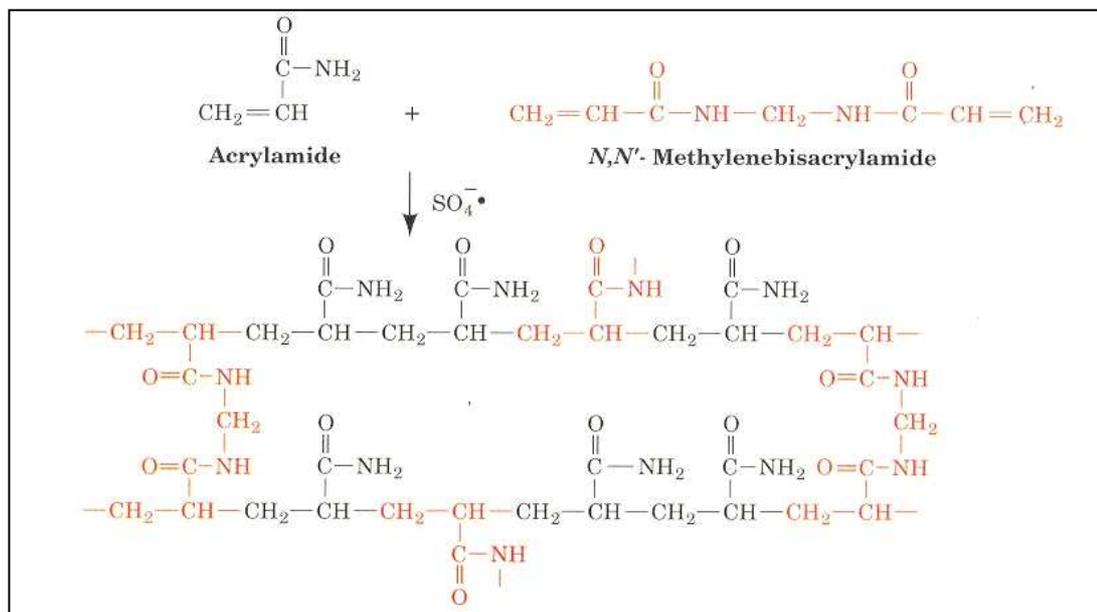
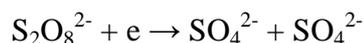


Fig. 1.3.19 *Formazione di un gel di poliacrilammide a partire da acrilammide e bis-acrilammide*

I gel di poliacrilammide vengono preparati facendo copolimerizzare monomeri di acrilammide in presenza di piccole quantità di N,N'-metilenbisacrilammide (chiamata normalmente bis-acrilammide) (figura 1.3.19). La struttura della bis-acrilammide è costituita essenzialmente da due molecole di acrilammide legate da un gruppo metilene. La bis-acrilammide viene utilizzata come agente in grado di formare legami crociati (*cross-linking agent*). I monomeri di acrilammide polimerizzano nel senso testa-coda e occasionalmente si legano ad una molecola

di bis-acrilammide. Ciò fa sì che nella catena venga introdotto un secondo sito per l'estensione della catena. In questo modo si forma una matrice con dei legami crociati a struttura ben definita (figura 1.3.20). Il processo di polimerizzazione dell'acrilammide è un tipico esempio di *catalisi radicalica* e inizia con l'aggiunta di ammonio persolfato e della base N,N,N',N'-tetrametilendiammina (TEMED). Il TEMED catalizza la decomposizione dello ione persolfato con la produzione del corrispondente radicale libero (cioè una molecola con un elettrone spaiato), nel modo seguente:



Se rappresentiamo il radicale libero con R (il punto rappresenta l'elettrone spaiato) e il monomero di acrilammide con M, possiamo schematizzare la polimerizzazione nel modo seguente:

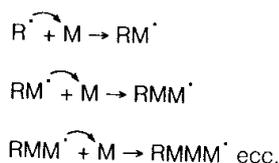


Fig. 1.3.20

In questo modo si formano lunghe catene di acrilammide. Queste sono tenute insieme tra loro da legami crociati derivanti dall'inserzione occasionale all'interno della catena di molecole di bis-acrilammide. Dal momento che l'ossigeno rimuove i radicali liberi dalla soluzione, tutte le soluzioni per la preparazione del gel

vengono degassate prima dell'uso (le soluzioni sono poste in beute da vuoto e poste per breve tempo sotto vuoto per allontanare l'ossigeno disciolto).

La *fotopolimerizzazione* è un metodo alternativo per la polimerizzazione dei gel di acrilammide. Con questa tecnica, al posto dell'ammonio persolfato e del TEMED si utilizza riboflavina. Una volta preparata la soluzione e versata nell'apposito spazio dove deve avvenire la polimerizzazione la si illumina per 2 o 3 ore con una luce intensa. La fotodecomposizione della riboflavina produce radicali liberi che danno inizio alla polimerizzazione del gel.

I gel di acrilammide vengono definiti in base alla percentuale totale di acrilammide presente, e le dimensioni dei pori del gel sono in relazione alle concentrazioni di acrilammide e bis-acrilammide. Pertanto gel a percentuale bassa (ad esempio 3%) possiedono pori di grosse dimensioni e sono utilizzati, ad esempio, nell'elettroforesi di proteine dove la migrazione delle molecole deve avvenire senza l'effetto delle forze frizionali, come nell'*isoelettrofocalizzazione a letto piatto*. Gel di acrilammide a bassa percentuale sono usati anche per i *gel di impaccamento (stacking gel)* nella SDS PAGE e per separare DNA. Gel con una percentuale compresa tra il 10% e il 20% di acrilammide vengono utilizzati in tecniche quali la SDS PAGE, dove le dimensioni più piccole dei pori del gel introducono un effetto di filtrazione che contribuisce a separare le proteine in base alla loro dimensione.

Elettroforesi di proteine

Elettroforesi su gel di poliacrilammide con sodio dodecil solfato (SDS-PAGE).

Questo tipo di elettroforesi su gel di poliacrilammide è uno dei metodi di più largo impiego per l'analisi qualitativa di miscele di proteine. È un metodo particolarmente utile per valutare la purezza dei campioni durante una purificazione e, dal momento che è basato sulla separazione delle proteine in base alle loro *dimensioni*, può essere utilizzato per la determinazione della massa molecolare relativa. Il sodio dodecil solfato (SDS) ($\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{10}\text{-CH}_2\text{OSO-Na}^+$) è un detergente anionico. I campioni da separare in SDS-PAGE vengono dapprima bolliti per 5 minuti in un tampone (*sample buffer*) contenente SDS e β -mercaptoetanolo.

Il β -mercaptoetanolo riduce i ponti disolfuro eventualmente presenti nelle proteine e quindi destabilizza la struttura terziaria, mentre l'SDS, legandosi fortemente alle proteine, le denatura. La carica netta della proteina denaturata viene quindi completamente mascherata dalle molecole di SDS. Il sample buffer contiene anche un *colorante tracciante ionizzabile* (blu di bromofenolo), che permette di seguire l'andamento della corsa elettroforetica. Sono presenti inoltre del saccarosio o del glicerolo, che hanno la funzione di rendere più densa la soluzione del campione. Ciò permette di stratificare senza problemi il campione sul fondo del pozzetto di caricamento del gel dove è presente il tampone di corsa. Una volta terminato il caricamento dei campioni, attraverso il gel viene fatta passare la corrente elettrica. I campioni da separare non vengono caricati direttamente sul *gel di separazione (running gel)*, ma su un *gel di impaccamento (stacking gel)*. Per preparare il gel si opera nel seguente modo: una volta che il gel di separazione, generalmente di 10 cm di lunghezza, è polimerizzato all'interno delle

due lastre di vetro, uno stretto gel di impaccamento (approssimativamente 1 cm) viene versato alla sommità del gel di separazione. I pozzetti per il caricamento dei campioni vengono formati alla sommità del gel di impaccamento. Lo stacking gel ha la funzione di impaccare le proteine contenute nel campione in una sottile banda prima che le proteine entrino nel gel di separazione. Ciò viene ottenuto utilizzando forza ionica e pH differenti nel tampone di corsa e nel gel di impaccamento: questo fenomeno è noto come *isotacoforesi*. Grazie a questo i complessi SDS-proteina si concentrano in una banda molto sottile tra gli ioni glicinato presenti nel tampone di corsa e gli ioni Cl^- del sample buffer e dello stacking gel. La separazione dei complessi SDS-proteine avviene quindi in base agli effetti di *setaccio molecolare* dovuti alle dimensioni dei pori del gel. Le proteine più piccole passano più facilmente all'interno dei pori del gel, mentre le proteine più grosse vengono ritardate dalle forze frizionali. Il blu di bromofenolo, essendo una molecola molto piccola, non subisce alcun effetto frizionale per cui rappresenta il *fronte di migrazione*. L'elettroforesi termina quando il blu di bromofenolo raggiunge il fondo del gel. Dopo aver tolto la corrente, il gel viene rimosso dalle due lastre di vetro e messo a colorare sotto agitazione in una soluzione colorante adatta (normalmente si usa Coomassie Brilliant Blue) per alcune ore. Il gel viene quindi decolorato con una soluzione che rimuove il colorante non legato dal gel lasciando le bande delle proteine colorate di blu. Una elettroforesi di questo tipo prevede circa 1 -1,5 ore per la preparazione dei gel, circa 3 ore per la separazione utilizzando una corrente di 30 mA, circa 2-3 ore per la colorazione e 1 notte per la decolorazione. Per la SDS-PAGE vengono utilizzati apparati per elettroforesi verticale, in quanto, come già descritto in precedenza, si

possono far correre fino a 20 campioni su un unico gel. Tipicamente, per i gel separatori si utilizzano percentuali di acrilammide del 15%. Ciò determina dimensioni dei pori del gel tali per cui si possono separare proteine con una massa molecolare relativa compresa tra 10000 e 100000. Quindi, una proteina con massa molecolare relativa di 150000 non è in grado di penetrare in un gel al 15%. In questo caso si utilizzano gel a pori più larghi (10% o anche 7.5%), in modo che la proteina entri nel gel e possa essere colorata e identificata. Appare quindi ovvio che la scelta del gel dipende dalle dimensioni delle proteine che si vogliono studiare.

La massa molecolare relativa (M_r) di una proteina può essere determinata in SDS-PAGE confrontando la sua mobilità con quella di una serie di proteine standard, delle quali si conosce la massa molecolare relativa, separate sullo stesso gel.

L'SDS-PAGE spesso viene utilizzata dopo ogni singolo passaggio di un protocollo di purificazione per verificare la purezza del campione. Infatti in questo tipo di elettroforesi a una proteina pura corrisponde una singola banda. Proteine multimeriche, costituite quindi da diverse subunità, producono invece più bande, ognuna corrispondente ad una singola subunità.

Rilevazione della proteina da gel. Il colorante più comunemente utilizzato per evidenziare le proteine nei gel è il colorante Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB). Per la colorazione di solito si utilizza una soluzione di CBB allo 0.1% (w/v) in metanolo, acqua e acido acetico glaciale (45:45:10, in volume). La miscela di metanolo e acido agisce come denaturante per precipitare, o *fixare*, le proteine nel gel. In questo modo si impedisce che le proteine vengano lavate via

durante la colorazione del gel. Per la maggior parte dei gel la colorazione richiede circa 2 ore e la decolorazione, di solito della durata di una notte, viene condotta tenendo in leggera agitazione la soluzione contenente il gel, costituita da metanolo e acido, ma senza il colorante. La colorazione con Coomassie è molto sensibile; una banda poco intensa in un gel di poliacrilammide corrisponde a circa 0.1 µg (100 ng) di proteina. Questa colorazione non viene impiegata per l'acetato di cellulosa (e quindi per le proteine dopo Western blot) perché il colorante si lega molto fortemente alla carta. In questi casi, le proteine vengono denaturate immergendo preventivamente la striscia di supporto in una soluzione di acido tricloroacetico al 10% e quindi colorate immergendo il supporto in una soluzione con un colorante che non si leghi al materiale di supporto, ad esempio Procion Blue, Amido Black o Procion S.

Benché la colorazione con Coomassie sia molto sensibile, quando è richiesta una sensibilità maggiore si utilizza la cosiddetta *colorazione ad argento (silver stain)*. Il silver stain sfrutta sia le tecniche sviluppate per le colorazioni istologiche che i metodi impiegati nei processi fotografici. In entrambi i casi gli ioni argento (Ag^+) vengono ridotti ad argento metallico sulla proteina, che dà una colorazione scura. Il silver stain può essere impiegato subito dopo l'elettroforesi oppure dopo aver colorato il gel con Coomassie. In quest'ultimo caso, le bande principali del gel sono rivelate con il Coomassie mentre le bande corrispondenti a proteine presenti in quantità inferiore, non visibili con questa colorazione, vengono risolte con la seconda colorazione. Il silver stain possiede una sensibilità circa 100 volte superiore rispetto al Coomassie Brilliant Blue, per cui si possono identificare proteine presenti in quantità dell'ordine di 1 ng.

Elettroforesi capillare

Questa tecnica analitica sfrutta la mobilità degli analiti in un campo elettrico per operare separazioni ad alta efficacia. Una piccola quantità di soluzione contenente il campione (solitamente 5-30 nl) viene introdotta all'estremità anodica di un capillare in silice fusa contenente una differenza di potenziale tra le due estremità del capillare stesso (figure 1.3.21 e 1.3.22).

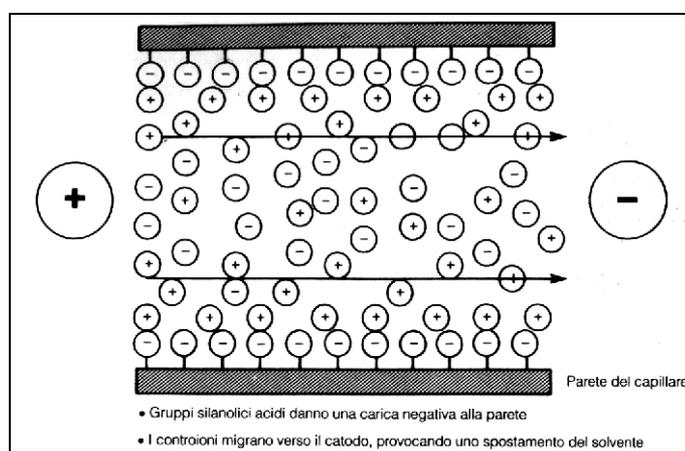


Fig. 1.3.21 *Flusso elettroosmotico*

all'interno di un capillare di vetro.

Le molecole del campione cominciano quindi a migrare con velocità differenti lungo il capillare. La migrazione elettroforetica provoca il movimento delle molecole della soluzione con carica positiva verso l'elettrodo di carica opposta. Le molecole di carica positiva, negativa o neutra migrano con velocità differenti per effetto di questo flusso tampone. Tuttavia, benché gli analiti siano separati in base alle diverse velocità di migrazione elettroforetica, essi vengono spinti verso il

catodo per il fenomeno dell'elettroosmosi. Dal momento che questo flusso è piuttosto elevato, essendo la velocità del flusso elettroosmotico molto più elevata della velocità di migrazione degli analiti, tutti gli ioni, indipendentemente dalla loro carica, si spostano verso il catodo. Le molecole con carica positiva raggiungono il catodo più velocemente perché la migrazione elettroforetica e il flusso elettroosmotico sono diretti nello stesso verso e, quindi, si sommano. In vicinanza del catodo le molecole attraversano una finestra dove ne viene rivelato il passaggio attraverso varie tecniche. Una separazione tipica dura in genere tra i 10 e i 30 minuti. [Delaurenti, 1999]

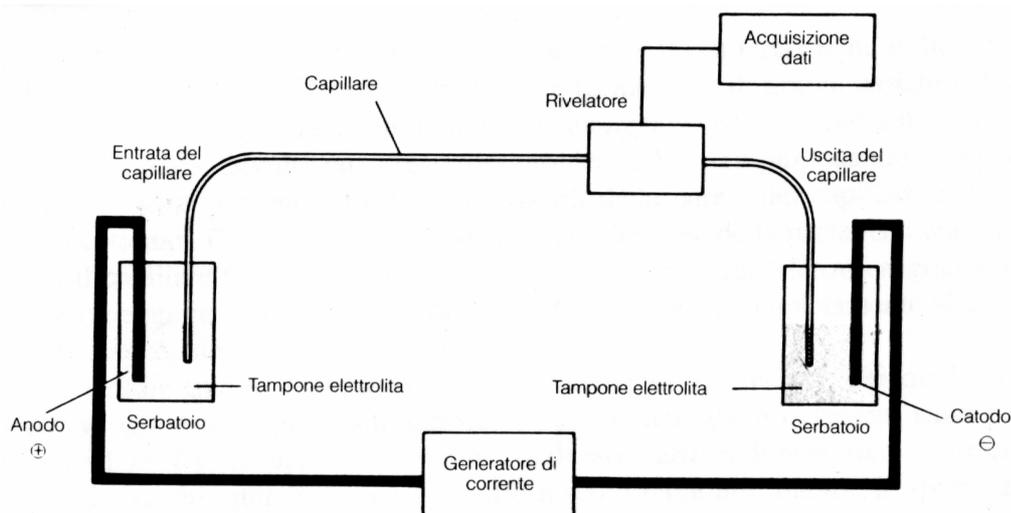


Fig. 1.3.22 Schema di un apparato per elettroforesi capillare

La CE ha trovato particolare applicazione nell'analisi dei peptidi e delle proteine. La precisione e la facilità operativa abbinata alle varie tipologie di metodiche come la CGE (elettroforesi capillare su gel) sono state da sprone allo sviluppo di numerose applicazioni che sfruttano la CE nell'analisi di aminoacidi, peptici e

proteine. Le proteine sono facilmente analizzate attraverso un rilevatore UV a 200 nm. L'analisi CE per le proteine può presentare sfide aggiuntive come la microeterogeneità del campione dovuta a variazioni nella struttura carboidratica, impurità provenienti dall'isolamento o dalla preparazione del campione di proteina ed altre cause ancora. Ciò può provocare la presenza di picchi multipli, un significativo allargamento del picco o finanche la perdita della stessa proteina.

Applicazione di tecniche elettroforetiche con riferimento ad alcuni agenti inquinanti

Tra le tecniche elettroforetiche l'elettroforesi capillare (CE) ha trovato largo impiego nell'analisi di un'ampia gamma di composti ed in particolare dei prodotti solubili in acqua derivanti dalla degradazione di agenti chimici e delle sostanze chimiche incluse nella Convenzione sulle Armi Chimiche (CWC),

Questa metodologia rappresenta uno strumento importante per una rapida rilevazione e una univoca identificazione dei campioni.

La degradazione dei prodotti o delle impurità può portare all'indicazione dell'agente CW introdotto. L'identificazione dell'acido isopropil-metilfosfonico e metilfosfonico, in quanto prodotti derivanti dalla degradazione Sarin (GB), è stata effettuata nel corso di analisi condotte in Iraq anni dopo una contaminazione. Più recentemente l'acido isopropil-metilfosfonico è stato rilevato nelle urine di individui esposti all'attacco terroristico in Giappone in cui fu utilizzato il Soman.

Allo stesso modo il VX come gli altri S-dialchillaminoetil-alchilfosfonotiolati ha tra i prodotti di decomposizione in acqua l'acido metilfosfonico.

Uno studio di Camille Boulet del 2000 ha mostrato l'utilizzo di tecniche elettroforetiche ad alcuni agenti inclusi nella CWC. Alcuni composti organofosfati, ed in particolare gli **acidi alchilfosfonici, alchilfosfonati e metilfosfonotioici** sono stati studiati grazie all'elettroforesi capillare con rilevazione indiretta ultravioletta a 254 nm. In tabella 1.3.2 sono indicati i composti oggetto dell'analisi.

Structure	R ₁	R ₂	Name	CAS No.
Alkylphosphonic acids [CH₃, CH₃CH₂, CH₃CH₂, (CH₃)₂CH]:				
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}_2-\text{P}-\text{OR}_1 \\ \\ \text{OH} \end{array}$	H	CH ₃	MPA	363-06-7
	H	CH ₃ CH ₂	EPA	1782-26-4
	H	CH ₃ CH ₂ CH ₂	nPPA	4672-38-2
	H	(CH ₃) ₂ CH	iPPA	4721-37-3
O-Alkyl (≤C₁₀ including cycloalkyl) alkylphosphonates:				
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}_2-\text{P}-\text{OR}_1 \\ \\ \text{OH} \end{array}$	CH ₃	CH ₃	MMPA	1066-53-1
	CH ₃ CH ₂	CH ₃	EMPA	1832-53-7
	(CH ₃) ₂ CH	CH ₃	IMPA	1832-54-8
	Cyclohexyl	CH ₃	CHMPA	1932-60-1
	(CH ₃) ₂ CHCH ₂	CH ₃	iBMPA	1604-38-2
	Pinacolyl	CH ₃	PMPA	616-52-4
	(CH ₃) ₂ CH(CH ₃)CH	CH ₃	DMPA	151299-67-1
	Cyclopentyl	CH ₃	CPMPA	73207-99-5
	2-Ethylhexyl	CH ₃	EHMPA	13688-82-9
	CH ₃ CH ₂	CH ₃ CH ₂	EEPA	7305-61-5
	(CH ₃) ₂ CH	CH ₃ CH ₂	iPEPA	170135-50-9
	(CH ₃) ₂ CH(CH ₃)CH	CH ₃ CH ₂	DEPA	195158-11-3
	Cyclohexyl	CH ₃ CH ₂	CEPA	170424-87-0
Methylphosphonothioic acids:				
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_3\text{C}-\text{P}-\text{OR}_1 \\ \\ \text{SR}_2 \end{array}$	CH ₃ CH ₂	H	EMPSA	18005-40-8
	(CH ₃) ₂ CHCH ₂	H	IBMPSA	20626-99-7
	H	(iPr) ₂ CH ₂ CH ₂ N	EA 2192	73207-98-4

Tab. 1.3.2 Composti organofosforici analizzati tramite CE

Il limite della rilevazione di questi composti è stata sperimentata nell'ordine dei nanogrammi. E' possibile vedere, come mostrato nella figura 1.3.23, che la tecnica utilizzata è riuscita efficacemente a rilevare tutti gli 8 anioni alchilfosfonici con una eccellente definizione.

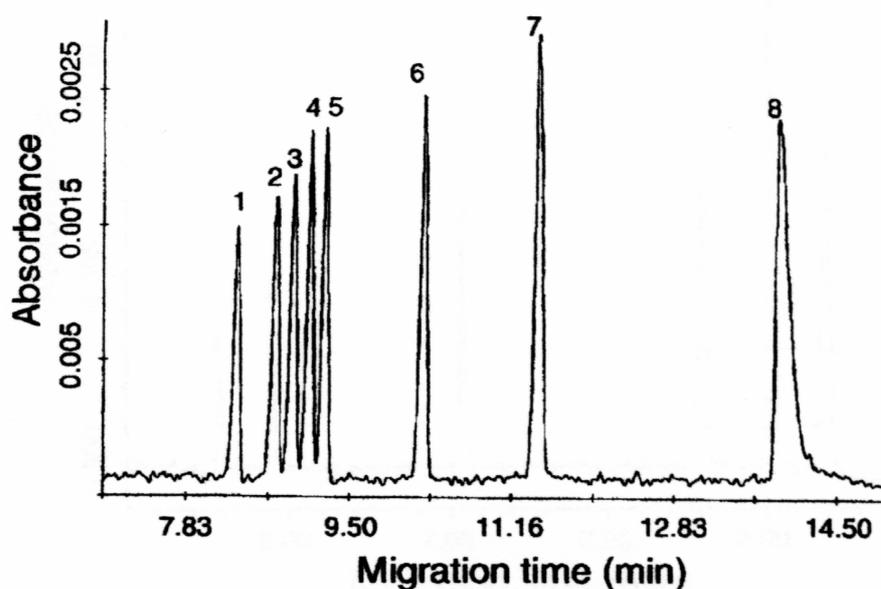
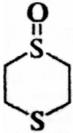


Fig. 1.3.23 CE di otto acidi alchilfosfonici (concentrazione del soluto 20 mg/l: CEPA (1), PMPA (2), CMPA (3), DMPA (4), EEPA (5), IMPA (6), EMPA (7), MPA (8).

Altra famiglia presa in considerazione dallo studio è quella dei **composti fosforici** relativi alla decomposizione della *Sulfur mustard* e riassunti nella tabella 1.3.3. Tale analisi è stata condotta attraverso l'utilizzo di una tecnica combinata di elettroforesi e cromatografia chiamata MEKC (Micellar Electrokinetic Chromatography). Il vantaggio principale di questa tecnica è la capacità di separazione dei soluti sia neutri sia carichi. Questo è dovuto all'aggiunta di sodio

dodecilsolfato (SDS) a concentrazioni superiori a quella critica della micella. Anche se la MEKC può essere utilizzata sia per specie cariche che neutre, le sue applicazioni includono analisi di aminoacidi, nucleotidi, vitamine, idrocarburi aromatici e costituenti esplosivi.

Structure ^a	Name	CAS No.
Sulfur mustard-related compounds:		
$\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	TDG	111-48-8
$\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{S(O)CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	TDGO	3085-45-8
$\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{S(O)}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	TDGO ₂	2580-77-0
	1,4-Thioxane	15980-15-1
	1,4-Dithiane	505-29-3
	1,4-Dithiane-1-oxide	19087-70-8
Lewisite-related compounds:		
ClCHCHAs(O)	CVAOA	3088-37-7
Schedule 2B precursors		
$(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	DEAE	100-37-8
$[(\text{CH}_3)_2\text{CH}]_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	DIPAE	96-80-0
$[(\text{CH}_3)_2\text{CH}]_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$	DIPAESA	1439-97-5

Tab. 1.3.3 Prodotti della degradazione di composti di Sulfur Mustard, Lewisite ed altri composti analizzati tramite CE

Grazie a questa tecnica possono essere analizzati i prodotti neutri di degradazione della *mustard* e degli altri agenti vescicanti attraverso una rilevazione ultravioletta diretta. E' stata quindi effettuata l'analisi sul *thiodiglycol* (TDG), 2,2'-sulfinyldiethanol (TDGO), 1,4-dithiane, 1,4-thioxane, O-isobutil

methylphosphonothioic acid (IBMPSA) e *O-ethyl methylphosphonothioic acid (EMPSA)*.

Questi composti sono stati separati in meno di 10 minuti in un run-buffer di borato 10 mM e SDS 100 mM a pH9 (figura 1.3.24).

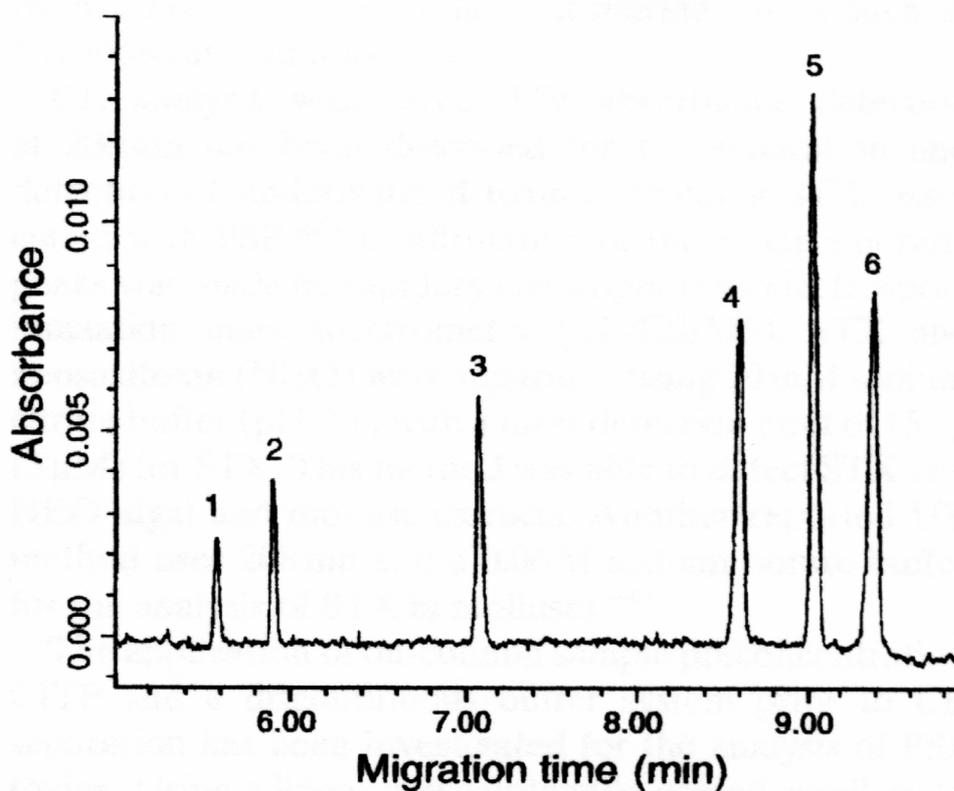


Figura 1.3.24 MEKC di sei composti contenenti zolfo associati alla degradazione della Sulfur mustard e di altri agenti vescicanti: TDGO (1), TDG (2), thioxane (3), iBMPSA (4), dithiane (5), EMPSA (6)

Infine un'altra importante applicazione della CE nell'ambito della rilevazione di contaminanti CB riguarda lo studio delle tossine. Lo studio infatti analizza la

neurotossina **saxitoxina** attraverso l'elettroforesi capillare associata alla rilevazione tramite fluorescenza indotta da laser (LIF). Questo metodo di rilevazione è estremamente sensibile e si basa sul principio che i peptidi e le proteine contenenti residui di lisina o i prodotti naturali che contengono aminoacidi primari possono essere derivatizzati con reagenti fluorescenti. Nel caso della saxitoxina sono stati utilizzati *fluorescamine*, *o-phthalaldehyde (OPA)* e *dansyl chloride*. Purtroppo i metodi di qualificazione richiedono concentrazioni micromolari dell'analita, limitando l'utilità nell'analisi di tracce di contaminante. L'analisi CE con assorbimento ultravioletto UV a 200 nm permette di rilevare la saxitoxina e la neosaxitoxina (presente in molluschi). Questo tipo di analisi riesce ad avere un limite di rilevabilità di 16 nM per la saxitoxina.

Metodi di rilevazione istantanea

Dopo aver preso in considerazione tecniche convenzionali come la cromatografia e l'elettroforesi, efficaci ma non sempre rapide per la rilevazione di contaminanti, sono state prese in considerazione altre metodologie di analisi istantanea, o quasi, dei campioni d'acqua.

Queste tecniche si possono suddividere in metodi che utilizzano biosensori e altri che si basano sul cambiamento cromatico di cartine e soluzioni a contatto con alcuni agenti chimici.

Biosensori

Il termine biosensore generalmente include un insieme di tecniche analitiche che comprendono fasi immobili biologiche (tessuti, microrganismi etc.) e producono un segnale elettrico digitale proporzionale all'analita o al gruppo di analiti. Analogamente al biosensore, il sistema di monitoraggio rapido biologico (Biological Early Warning System) rileva la presenza di sostanze tossiche in continuo mediante la risposta degli organismi.

Da circa 30 anni si sta pensando all'utilizzo di organismi acquatici per la rilevazione di sostanze tossiche in acqua. La maggior parte delle applicazioni di questi organismi è stata fatta in Europa e in Sud Africa. L'utilizzo di sistemi automatizzati è finalizzato alla rilevazione di variazioni delle proprietà fisiche delle acque e dell'incremento di tossicità. Un parametro per la rilevazione è il movimento dei pesci. Molto frequente è anche l'analisi dell'ossigenazione delle specie utilizzate. Il segnale elettrico generato dall'ossigenazione è recepito in tal caso da sistemi di rilevazione posti all'interno delle vasche (**dynamic fish test**).

L'US Army Center for Environmental Health Research (USACEHR) ha sviluppato un **sistema di controllo BEWS**. Si tratta di un sistema di tipo non invasivo, che fornisce il monitoraggio in tempo reale dei parametri fisici ricavato dall'analisi dell'ossigenazione del *Lepomis macrochirus* (pesce d'acqua dolce). Questo sistema è stato inizialmente impiegato per il monitoraggio delle acque profonde; successivamente sono state effettuate delle applicazioni anche nel campo delle acque superficiali. I pesci utilizzati nell'applicazione hanno una lunghezza di 4-8 cm con un peso di 1,2-13,3 grammi. Il sistema di controllo BEWS è rappresentato in figura 1.3.24.

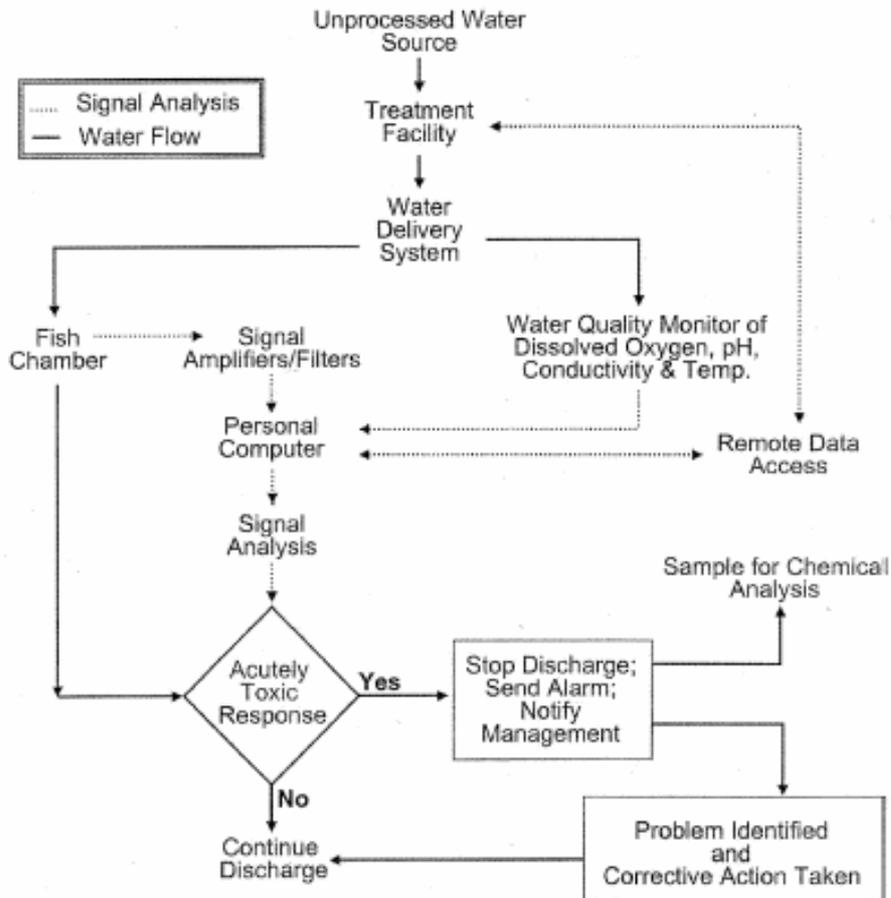


Fig. 1.3.24 Schema rappresentativo del campo-prova: la linea tratteggiata mostra il percorso del segnale derivante dall'andamento dell'ossigenazione dei pesci; la linea continua indica il percorso dell'effluente suggerito dal processore a seguito dell'analisi dei parametri.

Il segnale derivato dall'ossigenazione dei pesci è recepito da elettrodi. Nella figura 1.3.25 è riportato l'andamento dei tipici segnali recepiti dagli elettrodi [Schalie et al,2001].

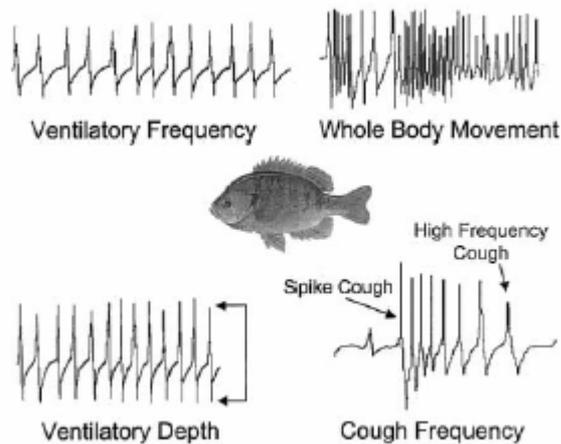


Fig. 1.3.25 Parametri di ossigenazione dei pesci. Tipico andamento del segnale elettrico generato dai pesci. Il processore analizza in continuo il segnale derivante dall'ossigenazione (ventilatory), dalla tosse (coughs), dall'intensità dell'ossigenazione (ventilatory depth) e dal movimento del corpo (body movement).

Un altro sistema di monitoraggio dei pesci è stato riportato da Steinberg et al nel 1994. La sperimentazione consiste nell'analizzare il comportamento di alcuni pesci della specie *Brachydanio rerio* posti all'interno di un acquario con concentrazioni variabili di atrazina (2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-1,3,5-triazine), un erbicida molto comune. La vasca era illuminata e una metà era rivestita al fondo con un foglio di carta scuro in maniera tale da riprodurre

l'habitat naturale dei pesci. I pesci furono sottoposti per quattro settimane all'atrazina che veniva posta nella vasca in concentrazioni di 5, 25, 125, 625 e 3125 $\mu\text{g/l}$ senza essere solubilizzata. L'analisi chimica dell'atrazina veniva effettuata tramite HPLC. Nella figura 1.3.26 è riportato lo schema utilizzato per queste applicazioni.

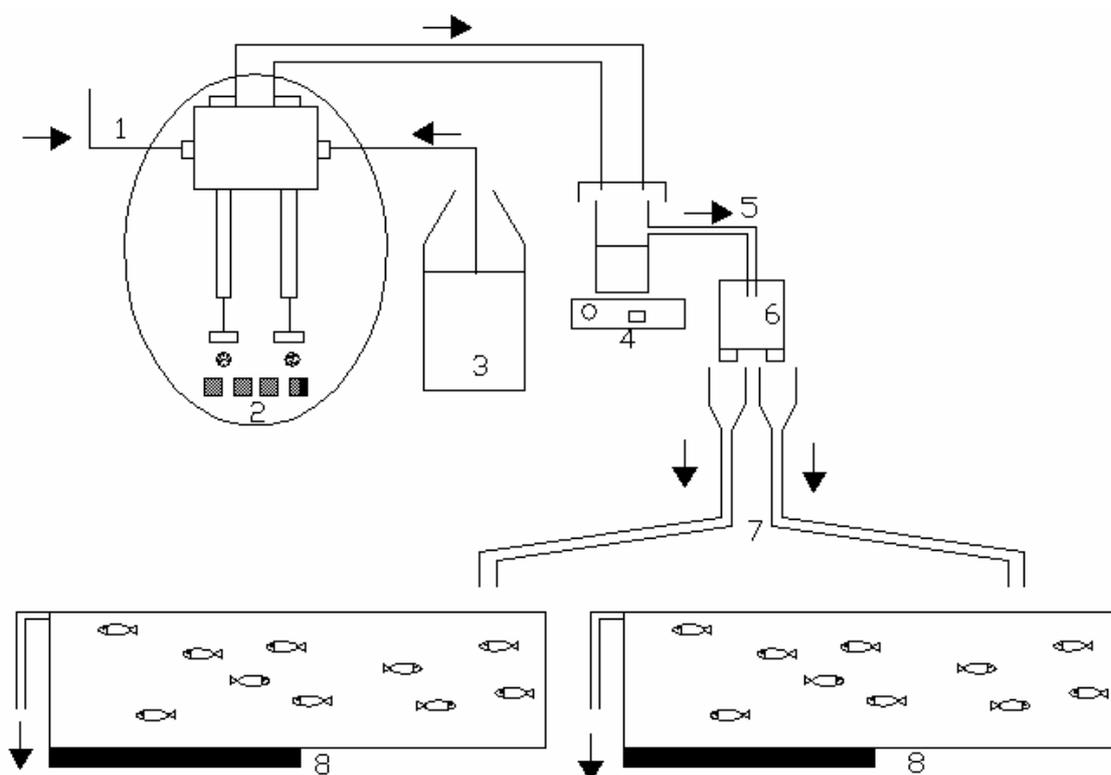


Fig. 1.3.26 Unità per l'applicazione della concentrazione di atrazina. 1) flusso dal serbatoio d'acqua; 2) siringhe per il dosaggio chimico; 3) serbatoio per la sostanza chimica; 4), 5) magneti e miscelatore; 6), 7) sistema di distribuzione dell'acqua contaminata; 8) vasche contenenti 10 pesci ciascuna con il rivestimento di carta nera alla base.

Nella figura 1.3.27 è riportata la distribuzione di frequenza registrata dai pesci prima dell'introduzione dell'atrazina. Le 12 specie esaminate venivano divise in 2 gruppi da 6 posti in parallelo.

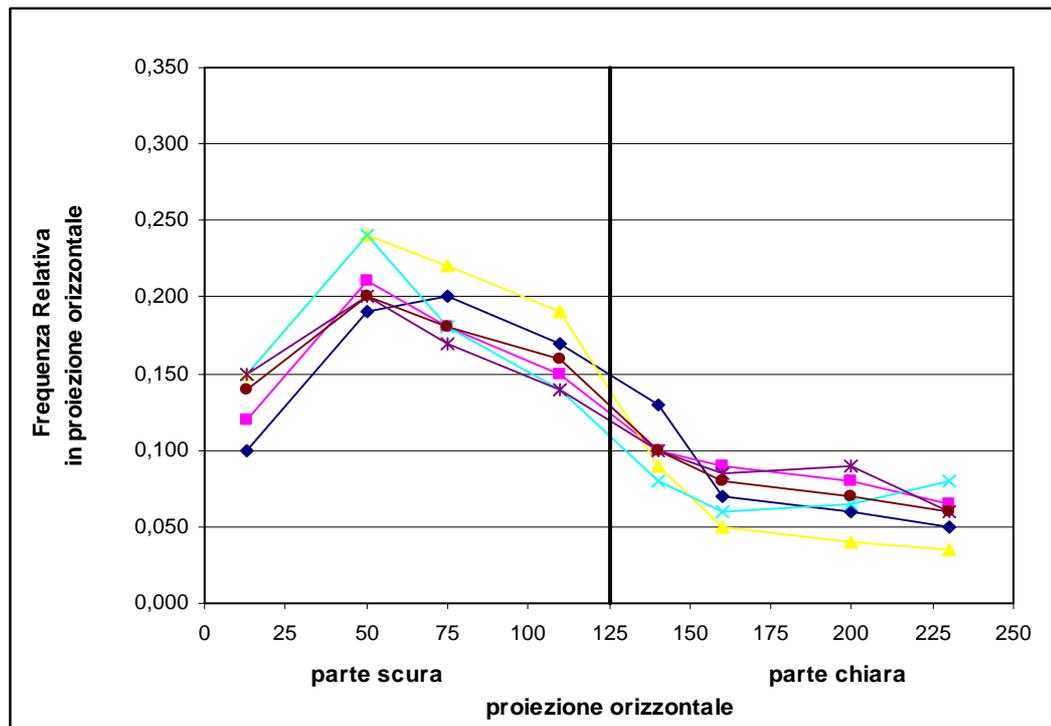


Fig 1.3.27 . Frequenza di distribuzione standard in funzione della parte chiara e della parte scura in assenza del contaminante (sei registrazioni).

Durante la condizione di pre-esposizione, i 2/3 del segnale registrato dal nuotare dei pesci si ha nella parte scura dell'acquario. Nella figura 1.3.28 è mostrata la preferenza dei pesci dopo una settimana di esposizione.

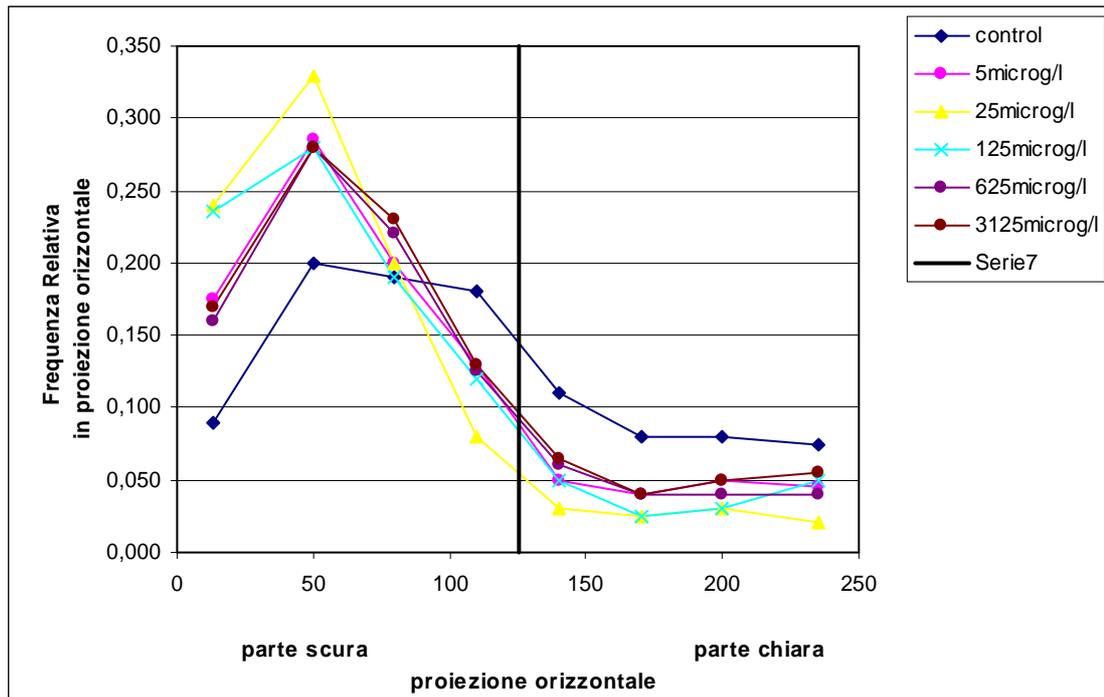


Fig. 1.3.28 *Frequenza di distribuzione standard in funzione della parte chiara e della parte scura durante la prima settimana di esposizione alle diverse concentrazioni del contaminante.*

Circa il 65% delle specie preferisce la parte scura dell’acquario. Al crescere della concentrazione di atrazina, i pesci preferiscono sempre di più la parte scura. Anche se non si rilevano differenze significative nel comportamento al crescere della concentrazione del contaminante, queste variazioni nel “nuotare” possono essere interpretate come “effetto”.

Altre applicazioni sono state effettuate monitorando non solo il comportamento dei pesci ma anche di alghe, molluschi e piccoli organismi. Nel seguito sono riportate sintetiche osservazioni.

Dynamic Daphnia Test. La Daphnia (pulce d'acqua) è un organismo che nuota in colonne d'acqua. Un tipico sistema di monitoraggio con la Daphnia è quello di rilevare all'infrarosso questi organismi. Quando la Daphnia nuota lungo queste colonne un segnale rileva la presenza dell'organismo e conta il numero di organismi in transito. Un contaminante nell'acqua generalmente provoca un innalzamento dell'attività seguito da un brusco declino delle pulsazioni dovuto alla morte degli organismi. Nella figura 1.3.29 è mostrato un tipico sistema che sfrutta appunto la Daphnia.

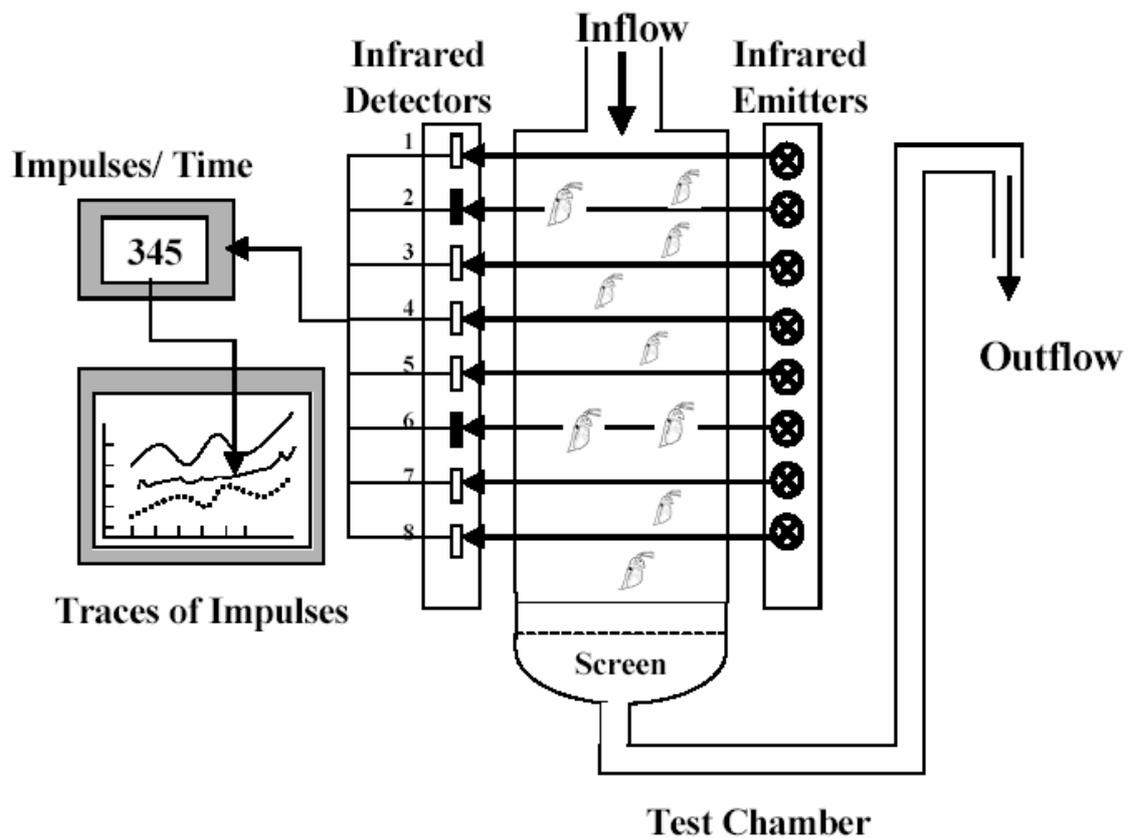


Fig. 1.3.29 Sistema che sfrutta la Daphnia come rilevatore
(Dynamic Daphnia Test)

Mussel Monitor. Negli ultimi anni l'utilizzo dei molluschi come sistema di monitoraggio si è andato incrementando. Generalmente i molluschi vengono posizionati in canali in cui effluisce l'acqua, monitorandone il movimento del guscio. Quando nella corrente è presente un contaminante, i molluschi chiudono il guscio oppure -se la concentrazione del contaminante è elevata- muoiono e aprono completamente il guscio. La percentuale di gusci aperti o chiusi è un indicatore che può essere monitorato.

Il sistema originariamente utilizzato era molto semplice: il guscio del mollusco veniva incollato da un lato ad un muro e sull'altro lato del guscio veniva posto un magnete. Il movimento del magnete era un segnale: rosso se indicava la chiusura o l'apertura totale del guscio. I sistemi di monitoraggio attuali sfruttano, invece, un segnale elettromagnetico che indica lo stato del guscio.

Delayed Algal Fluorescence. Alcuni esperimenti hanno recentemente portato a misurare la fluorescenza delle alghe che può essere soppressa dalla presenza di alcune tossine in acqua. I test si basano sul principio che un ritardo della fluorescenza dell'alga è legato alla concentrazione del contaminante [Stoks, 1994].

Luminescent Bacteria. In alcuni casi è stato impiegato un sistema on-line di sensori biologici: batteri luminescenti. La tossicità del campione è stimata in funzione della perdita di luce del batterio esposto [EWM, 1999].

Il Dr Robert S. Marks, della Ben-Gurion University, ha sviluppato un biosensore che potrebbe essere applicato per la rilevazione di agenti chimici bellici e tossine nelle acque potabili. Questo sistema utilizza batteri sviluppati dal Prof. Shimshon Belken, della Hebrew University, nell'ambito di un progetto appoggiato dal Ministero delle Scienze Israeliano. Una sonda bioluminescente a fibre ottiche utilizza celle di batteri che sono state geneticamente modificate al fine di reagire in presenza di sostanze tossiche, come i pesticidi. Gli esperimenti condotti nel 2001 hanno identificato la presenza di agenti chimici in acqua utilizzando strumenti molto sofisticati: i batteri erano posti in un involucro di sostanza gelatinosa con fibre ottiche. Quando questo sensore veniva inserito all'interno di un campione di acqua i batteri emanavano un bagliore. Ogni test durava circa 60-90 minuti e si poteva svolgere in sito, senza portare i campioni in laboratorio [Biosensor, 2001; Marks].

Detection Papers

Le cartine di rilevazione si basano sulla possibilità di un cambiamento della tinta della cartina a contatto con campioni d'acqua contaminati. Normalmente vengono utilizzate due colori e un indicatore di pH, mischiati con fibre di cellulosa all'interno di una cartina. Quando una goccia di un agente chimico viene assorbita dalla cartina, si evidenziano dei pigmenti. Ad esempio i Mustard Agents mostrano pigmenti rossi; i Nerve Agents mostrano pigmenti gialli; il VX provoca una reazione che si esprime con una colorazione blu che, insieme col giallo, fornisce una colorazione finale verde. Purtroppo, però, sono anche altre sostanze in grado

di colorare le cartine, per cui è necessario tenere lontano dal campione, e dalle cartine, solventi, olii e grassi. Una goccia di acqua pura non fornisce reazioni.

Altri tipi di rilevamento, come Detection Tubes e Detection Tickets, funzionano in maniera analoga fornendo sempre variazioni di colore [Detection].

Spot Test: reazioni colorimetriche

Lo spot test è una metodica di analisi immediata che fa affidamento sulla variazione di colore provocata dalla reazione chimica che avviene tra la sostanza chimica analizzata ed un reattivo. Il reattivo viene determinato per tentativi sulla scorta di uno studio della molecola della sostanza. Questa metodica può essere applicata anche su campioni piccoli e senza trattamenti preliminari [Kluiber, 1998]. Questo tipo di analisi è stato utilizzato, ad esempio, da Guilbault e Kramer per la determinazione di cianuro in acqua [Guilbault et al, 1966]. Sviluppando un metodo colorimetrico basato su una prima reazione tra il cianuro e la *p*-nitrobenzaldeide e poi una successiva reazione tra la soluzione ottenuta e l'*o*-dinitrobenzene. Il risultato era un'intensa colorazione porpora.

3.1 Metodiche analitiche di identificazione e quantizzazione del contaminante Capsicina

E' stata individuata una metodica analitica in grado di determinare la Capsicina in soluzione acquosa; la Capsicina - come già specificato - è una sostanza che si estrae dal peperoncino, ha un colore bianco cristallino ed è molto irritante, risulta poco solubile in acqua ma molto solubile in alcool, olii e grassi. La sperimentazione, come già precisato, è stata condotta presso il laboratorio di Chimica Farmaceutica e Tossicologica della Facoltà di Farmacia dell'Università "Federico II" di Napoli con l'assistenza della dott.ssa Francesca D'Alia, della Prof. Lydia Ferrara e del dott. Domenico Montesano.

Spot test

Queste esperienze sono state condotte al fine di rilevare istantaneamente la presenza di Capsicina in soluzione. Per tentativi, sono stati usati diversi reattivi cercando di ottenere una variazione cromatica della soluzione immediata e visibile ad occhio nudo. Nella tab 1.3.4 sono riportati alcuni dei reattivi utilizzati.

Miscela base	Reattivo	Esito
Capsicina+ H ₂ O	Blu di Bromot	negativo
Capsicina+ H ₂ O	Bromofenolo	negativo
Capsicina+H ₂ O	Rosso timolo	negativo
Capsicina+H ₂ O	Verde Malachite	negativo
Capsicina+H ₂ O	Cloruro ferrico	negativo

Tab. 1.3.4

SPOT TEST con sali di DIAZONIO

Preparazione dei sali di Diiazonio

La preparazione dei sali di Diiazonio è stata condotta seguendo le indicazioni del Manuale di Chimica Organica [Vogel].

Si prelevano 25ml di acido cloridrico (HCl) 12 N e si diluiscono a 100ml con H₂O, ottenendo una soluzione 3 N. Si mettono in un becker 2g di *p*-Anisidine (ammina aromatica primaria). Si agita e si riscalda su fiamma, per facilitare la solubilizzazione della sostanza, per circa 5 minuti. Nella figura 1.3.30 è riportata la struttura della *p*-Anisidine.

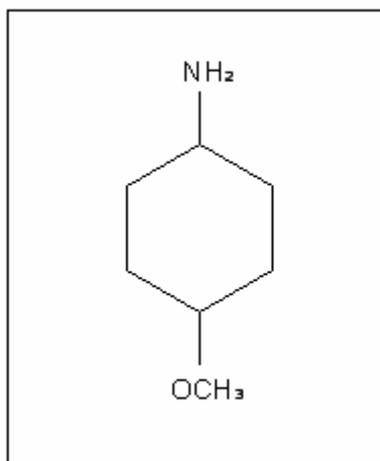


Fig. 1.3.30 Struttura della *para*-Anisidine.

Si aggiunge alla soluzione NaNO₂. Il colore della soluzione diventa viola. Si aspetta che l'ammina diazotata cristallizzi. Dopo circa 10 minuti la cristallizzazione non avviene. Ad una provetta contenente Capsicina e H₂O si aggiungono poche gocce del sale di Diiazonio e si rileva un'istantanea

colorazione rosa che svanisce in circa 10 secondi. Ripetendo il procedimento in H₂O, priva di Capsicina, la colorazione non avviene.

Per ottenere una maggiore stabilità dei sali di Diiazonio si procede con un'ammina diversa. Si prelevano 25ml di HCl 12 N e si diluiscono a 100ml con H₂O ottenendo HCl 3 N. Si mettono nel becker 2g di *2,3-Diaminonaphthalene*. Agitiamo, introduciamo NaNO₂ e aspettiamo la formazione dei cristalli. Si mette il becker sotto ghiaccio per mantenere una temperatura di 0-5°C. Dopo circa 30 minuti avviene la formazione di un precipitato che si filtra e si solubilizza in una soluzione HCl e H₂O 1:1 (50ml di volume). La colorazione della soluzione è giallina ma non si apprezzano variazioni cromatiche significative tra la provetta contenente H₂O e Capsicina e quella contenente solo H₂O.

Si ripete la reazione con la *naftilammina cloridrata* (sale cloridrico della naftilammina) per formare dei sali di Diiazonio. Generalmente i sali di Diiazonio formati con questo sale sono molto più stabili rispetto ai sali formati con l'anilina.

Si sciolgono a freddo 5g di naftilammina in HCl (3 N) con l'aiuto di un agitatore metallico per circa 10 minuti. Prepariamo una soluzione di nitrito di sodio acquosa sciogliendo 2g di nitrito di sodio (NaNO₂) in 10ml di acqua. Aggiungiamo 1ml di tale soluzione alla naftilammina cloridrata precedentemente preparata. Si sviluppa un'intensa colorazione viola scuro (fig 3.31).

La soluzione deve essere poi conservata in un recipiente scuro ad una temperatura di circa 2°C: in queste condizioni i sali sono stabili per circa un mese.



Fig. 1.3.31 *Soluzione contenente naftilammina cloridrata ed 1ml di nitrito di sodio acquoso.*

Facendo reagire tale soluzione con la Capsicina si ottiene una variazione di colore dal viola al rosso di intensità variabile in funzione della concentrazione della Capsicina. Di seguito riportiamo i saggi con i sali di Diiazonio evidenziando i limiti di sensibilità del saggio facendo variare la concentrazione della Capsicina in metanolo.

Provetta zero

Sciogliamo 2mg di Capsicina in 10ml di metanolo

Provetta 1

Preleviamo 1ml dalla provetta zero e poniamolo in una provetta trasparente con una goccia di soluzione di sali di Diiazonio. Si nota una violenta colorazione viola (concentrazione 0,2mg/ml).

Provetta 2

Preleviamo 1ml dalla provetta uno e portiamolo a 10ml con metanolo. Preleviamo ancora 1ml di tale soluzione e poniamolo in una provetta trasparente con una goccia di soluzione di sali di Diiazonio. Si nota una violenta colorazione viola un poco più chiara rispetto a quella della provetta1(concentrazione 0,02mg/ml).

Provetta 3

Preleviamo 1ml dalla provetta due e portiamolo a 10ml con metanolo. Preleviamo ancora 1ml di tale soluzione e poniamolo in una provetta trasparente con una goccia di soluzione di sali di Diiazonio. Si nota una violenta colorazione viola tendente al rosso (concentrazione 0,002mg/ml).

Provetta 4

Preleviamo 1ml dalla provetta tre e portiamolo a 10ml con metanolo. Preleviamo ancora 1ml di tale soluzione e poniamolo in una provetta trasparente con una goccia di soluzione di sali di Diiazonio. Si nota una colorazione tendente al rosso (concentrazione 0,0002mg/ml).

Nella figura 1.3.32 sono state raffigurate le quattro provette.

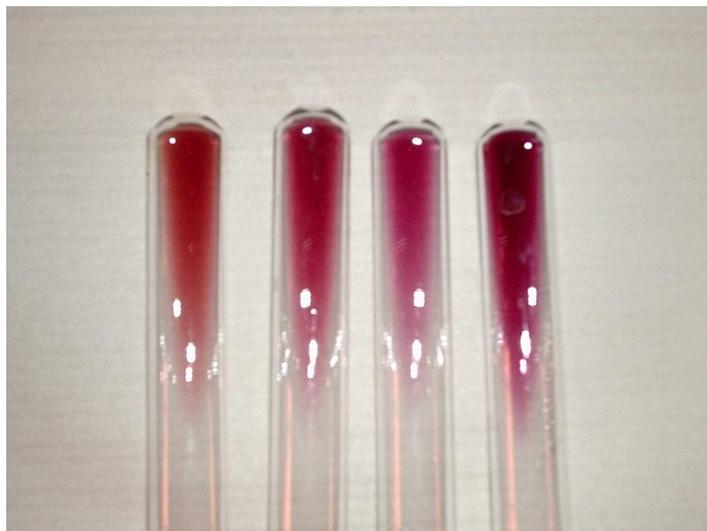


Fig. 1.3.32 *Provette contenenti metanolo e Capsicina in diverse concentrazioni in cui è stata inserita una goccia di soluzione di sali di Diiazonio.*

Il **bianco** (ossia la provetta di riferimento) è ottenuto ponendo una goccia della soluzione di sali di Diiazonio in 10ml di metanolo (figura 1.3.33).



Fig. 1.3.33 *Provetta contenente metanolo e una goccia di soluzione di sali di Diiazonio (bianco).*

Confrontando le provette 1, 2, 3 e 4 con il bianco (figura 1.3.34) si nota la variazione di colore in funzione della concentrazione. Possiamo asserire che il limite di rilevabilità della prova è di $2\mu\text{g/ml}$.



Fig. 1.3.34 Confronto tra le varie provette.

Per la quantificazione del contaminante si è fatto riferimento all'analisi cromatografica, al fine di determinarne la curva di calibrazione.

Analisi HPLC

L'ottimizzazione dei parametri di separazione cromatografica è stata effettuata scegliendo acetonitrile ed acqua come solventi, regolando la lunghezza d'onda a 281nm ed utilizzando come colonna cromatografica una C18 Ultracarb Phenomex 4.6x25, 5 μm i.d. Nella figura 1.3.35 è riportata una fotografia dello strumento e nella figura 1.3.36 è riportata una fotografia della siringa tramite la quale avviene l'iniezione nella macchina. La separazione è stata effettuata utilizzando un sistema isocratico acetonitrile-acqua 70:30; il picco cromatografico della

capsicina in queste condizioni analitiche ha un tempo di ritenzione (R_t) di 8,2 minuti, come verrà messo in evidenza in dettaglio in seguito.



Fig. 1.3.35 Fotografia dell'HPLC utilizzato



Fig. 1.3.36 Dettaglio della siringa dell'HPLC

Curva Area-Volume iniettato

Una prima serie di test è stata effettuata per ricavare la curva area (sottesa dal cromatogramma)/volume iniettato, al fine di verificare la linearità del processo del processo di dilavamento del soluto al variare delle quantità immesse.

È stata preparata una soluzione solubilizzando 5mg di Capsicina in 10ml di metanolo utilizzando un matraccio tarato. Mantenendo costante il valore della concentrazione, sono state effettuate 5 iniezioni a volume crescente (effettuando, inoltre, per ciascun volume 3 prove, in modo da verificare la presenza di eventuali fenomeni aleatori):

iniezione 1: 10 μ l; il corrispondente cromatogramma è riportato in figura 1.3.37;

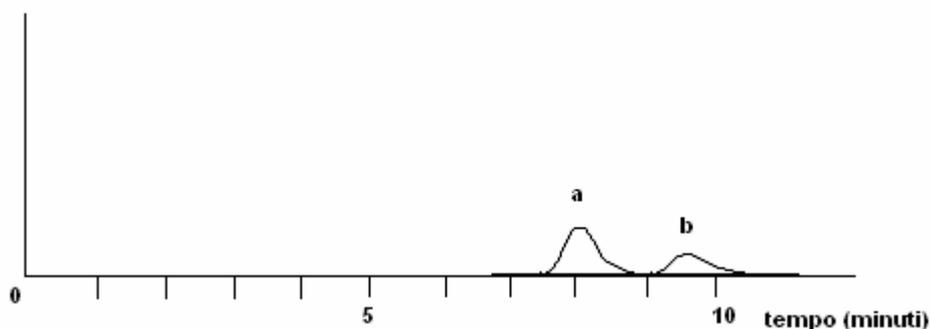


Fig. 1.3.37 *Cromatogramma relativo all'iniezione 1; il picco a è rappresentativo della Capsicina e il picco b della diidrocapsicina*

iniezione 2: 20 μ l; il corrispondente cromatogramma è riportato in figura 1.3.38;

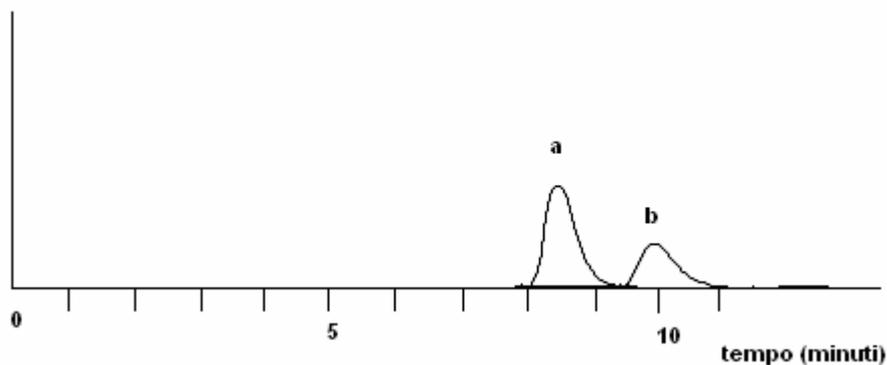


Fig. 1.3.38 Cromatogramma relativo all'iniezione 2; il picco a è rappresentativo della Capsicina e il picco b della diidrocapsicina

iniezione 3: 30 μ l; il corrispondente cromatogramma è riportato in figura 1.3.39;

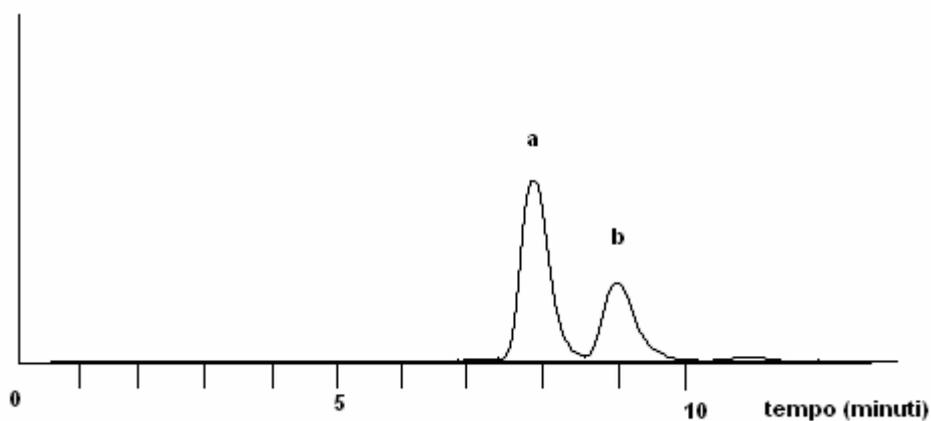


Fig. 1.3.39 Cromatogramma relativo all'iniezione 3; il picco a è rappresentativo della Capsicina e il picco b della diidrocapsicina

iniezione 4: 40 μ l; il corrispondente cromatogramma è riportato in figura 1.3.40;

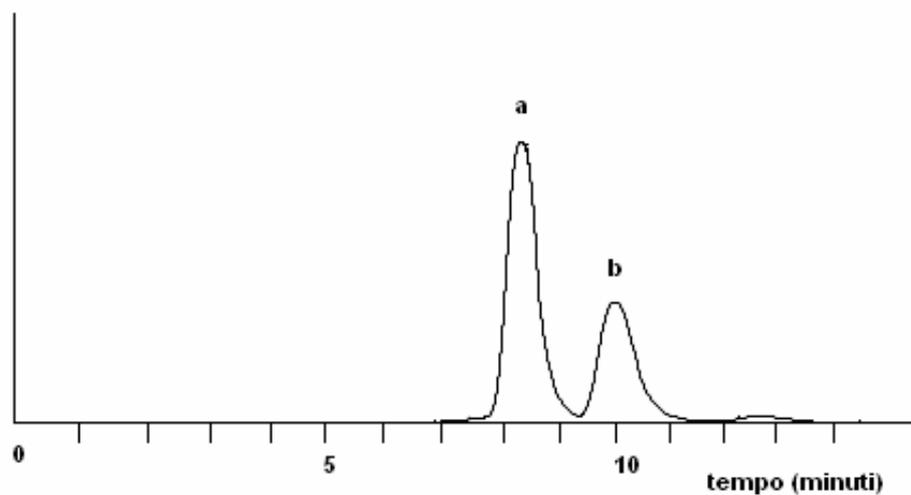


Fig. 1.3.40 Cromatogramma relativo all'iniezione 4; il picco a è rappresentativo della Capsicina e il picco b della diidrocapsicina

iniezione 5: 50 μ l; il corrispondente cromatogramma è riportato in figura 1.3.41;

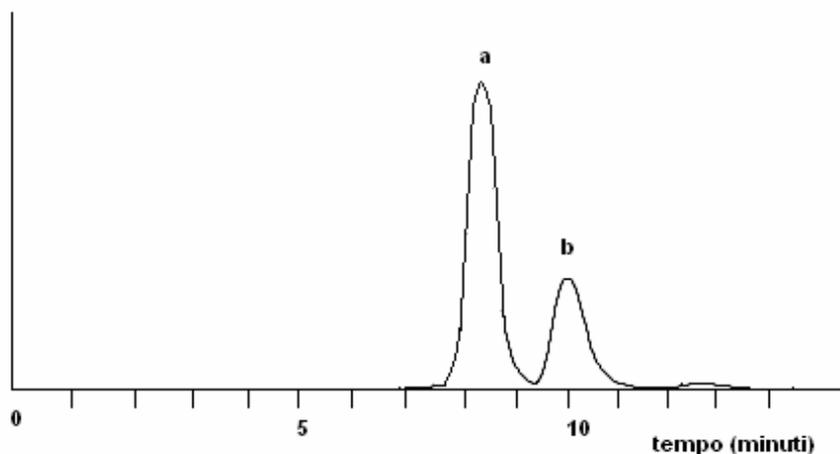


Fig. 1.3.41 Cromatogramma relativo all'iniezione 5; il picco a è rappresentativo della Capsicina e il picco b della diidrocapsicina

È stato quindi costruito un diagramma riportando sull'asse delle ascisse il volume iniettato e sull'asse delle ordinate il valore medio dell'area sottesa dal cromatogramma relativo (figura 1.3.42). Nella tabella 1.3.5 sono stati riportati i valori medi delle aree sottese dai cromatogrammi per le varie iniezioni.

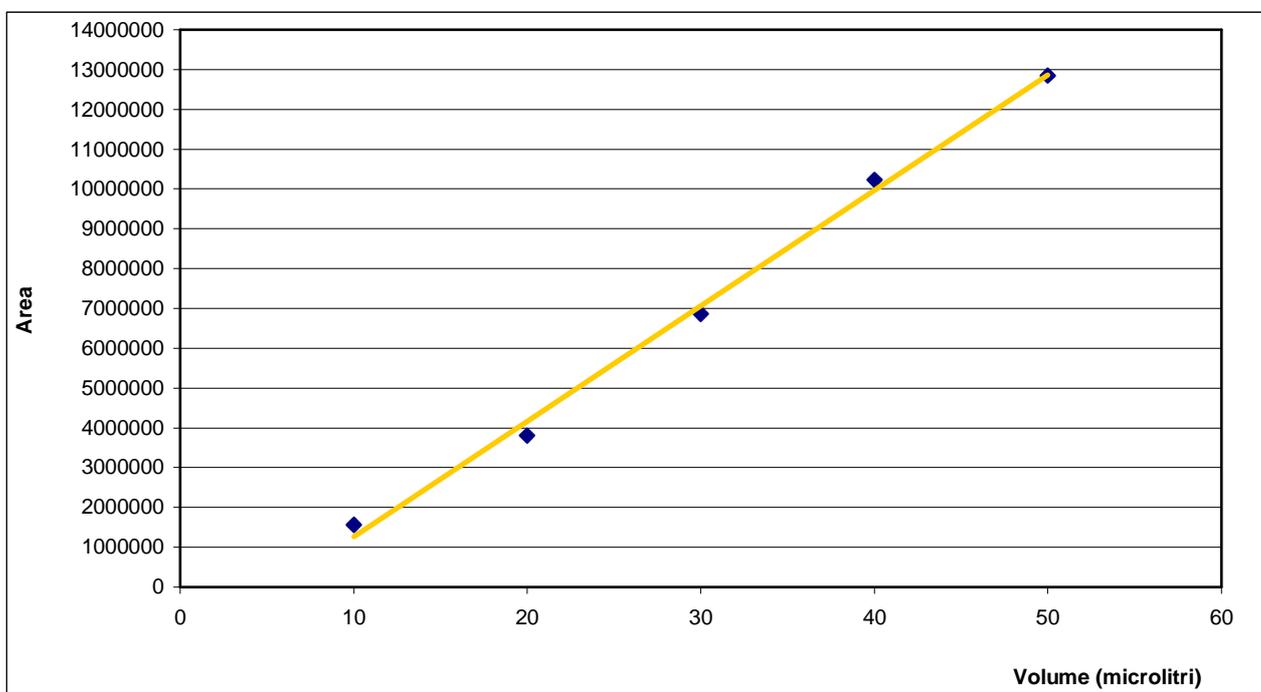


Fig. 1.3.42 *Curva rappresentativa del rapporto Area-Volume iniettato*

Iniezione	Volume iniettato (μ l)	Area (media)
st1	10	1566540
st2	20	3801971
st3	30	6867247
st4	40	10237306
st5	50	12853478

Tab. 1.3.5

Si può notare che la curva di figura 1.3.42 ha un andamento marcatamente lineare che individua, quindi, la proporzionalità tra il volume iniettato all'interno del cromatografo e l'area sottesa dalla relativa curva cromatografica.

Curva di Calibrazione

Nella fase successiva dell'indagine sperimentale è stata costruita **la curva di calibrazione** della Capsicina sulla base di 5 punti corrispondenti a 5 concentrazioni crescenti di Capsicina standard pura. Lo standard è stato solubilizzato ancora in metanolo puro (grado HPLC), solvente in cui tale sostanza è solubile al 100% (in tali prove la solubilità nel solvente deve essere quasi totale altrimenti l'apparecchiatura non è in grado di rilevare la sostanza analizzata).

La soluzione madre è stata preparata ponendo 5mg di Capsicina in un matraccio da 10ml e portata a volume con metanolo (CH_3OH). Dalla soluzione madre sono stati preparati per diluizione 5 campioni di volume pari a 10 μ l. Lo schema prescelto per le diluizioni è il seguente:

campione 1: la soluzione madre viene diluita 1:1 con metanolo (equivalente a $2,5\mu\text{g}/\mu\text{l}$); il corrispondente cromatogramma è riportato in figura 1.3.43;

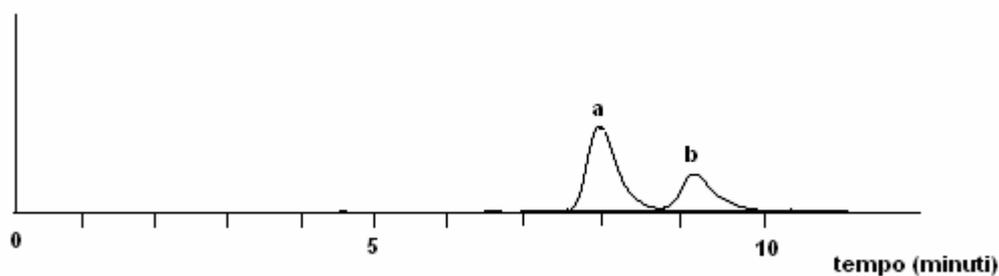


Fig. 1.3.43 *Cromatogramma del campione 1; il picco a è rappresentativo della Capsicina e il picco b della diidrocapsicina*

campione 2: la soluzione madre viene diluita 1:2 con metanolo (equivalente a $1,6\mu\text{g}/\mu\text{l}$); il corrispondente cromatogramma è riportato in figura 1.3.44;

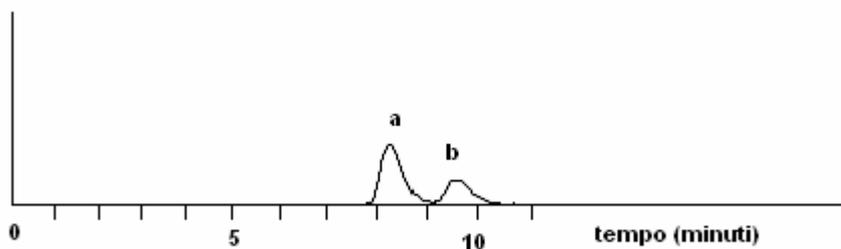


Fig. 1.3.44 *Cromatogramma del campione 2; il picco a è rappresentativo della Capsicina e il picco b della diidrocapsicina*

campione 3: la soluzione madre viene diluita 1:3 con metanolo (concentrazione pari a $1,25\mu\text{g}/\mu\text{l}$); il corrispondente cromatogramma è riportato in figura 1.3.45;

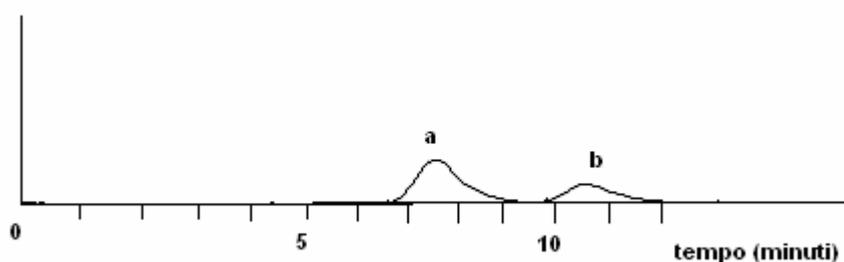


Fig. 1.3.45 Cromatogramma del campione 3; il picco a è rappresentativo della Capsicina e il picco b della diidrocapsicina

campione 4: la soluzione madre viene diluita 1:4 con metanolo (concentrazione pari a $1,00\mu\text{g}/\mu\text{l}$); il corrispondente cromatogramma è riportato in figura 1.3.46;

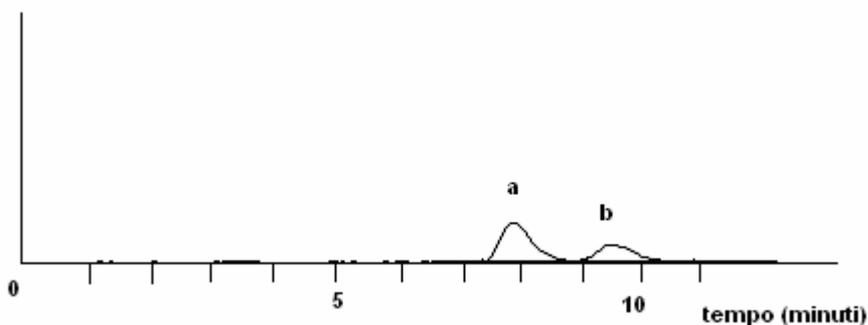


Fig. 1.3.46 Cromatogramma del campione 4; il picco a è rappresentativo della Capsicina e il picco b della diidrocapsicina

campione 5: la soluzione madre viene diluita 1:5 con metanolo (concentrazione pari a $0,83\mu\text{g}/\mu\text{l}$); il corrispondente cromatogramma è riportato in figura 1.3.47;

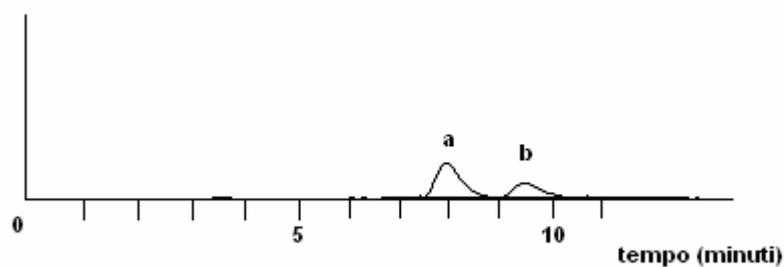


Fig. 1.3.47 Cromatogramma del campione 5; il picco a è rappresentativo della Capsicina e il picco b della diidrocapsicina

Di ogni campione sono stati iniettati 10 μ l. La curva di calibrazione è stata costruita sull'asse delle ascisse la concentrazione e sull'asse delle ordinate il valore dell'area sottesa dal cromatogramma relativo (figura 1.3.48).

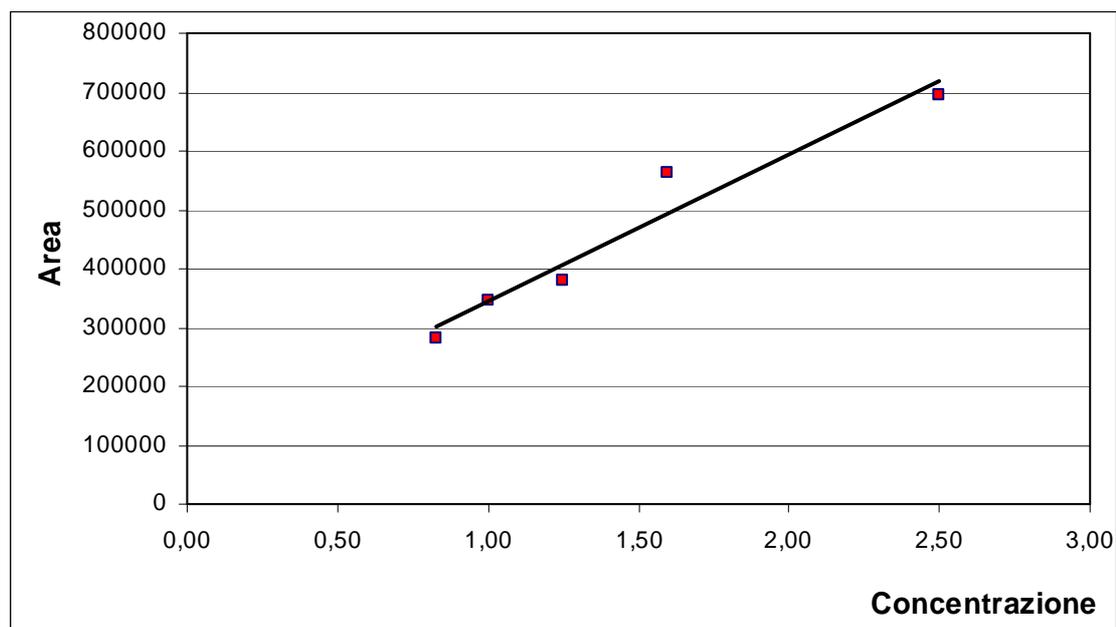


Fig. 1.3.48 Curva di Calibrazione della Capsicina

Anche per questa serie di test sperimentali i punti riportati nella figura 1.3.48 rappresentano ciascuno la media di tre determinazioni (tabella 1.3.6); la

deviazione standard è risultata sempre inferiore all'1%, garantendo, quindi, un ottimo accordo interno dei dati.

Campione	Diluizioni	Concentrazione ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Area (media)
s-1	1:1	2,50	693384,5
s-2	1:2	1,60	564260
s-3	1:3	1,25	380672
s-4	1:4	1,00	346881,5
s-5	1:5	0,83	279672

Tab. 1.3.6

Determinazione della Capsicina in acqua

Il campione acquoso è stato preparato ponendo 5mg di Capsicina pura in 10ml di acqua distillata. La soluzione è stata agitata su Vortex per 60 secondi evidenziando la natura poco solubile della Capsicina in acqua. Sono stati iniettati 50 μl dello standard in acqua nelle stesse condizioni analitiche utilizzate per la costruzione della curva di calibrazione. Il cromatogramma relativo è mostrato in figura 1.3.49. L'area sottesa dal diagramma è pari a 464673.

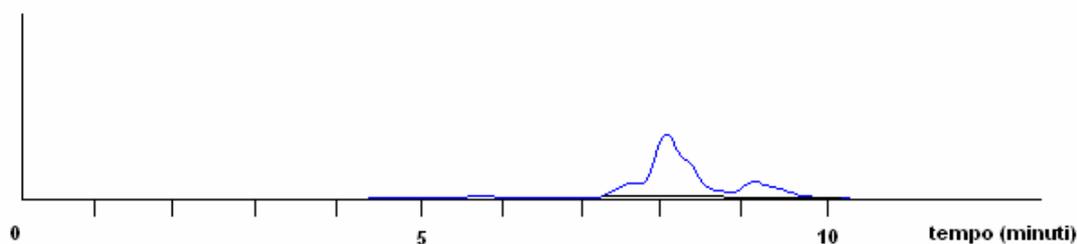


Fig. 1.3.49 Cromatogramma ottenuto iniettando 50 μl dello standard (5 mg di Capsicina in 10ml di acqua distillata).

La concentrazione della Capsicina nel campione acquoso può essere desunta dalla curva di taratura precedentemente elaborata, in corrispondenza del valore dall'area sottesa dal cromatogramma (464673). In particolare, essa è risultata pari a 1,48mg/ml (figura 1.3.50).

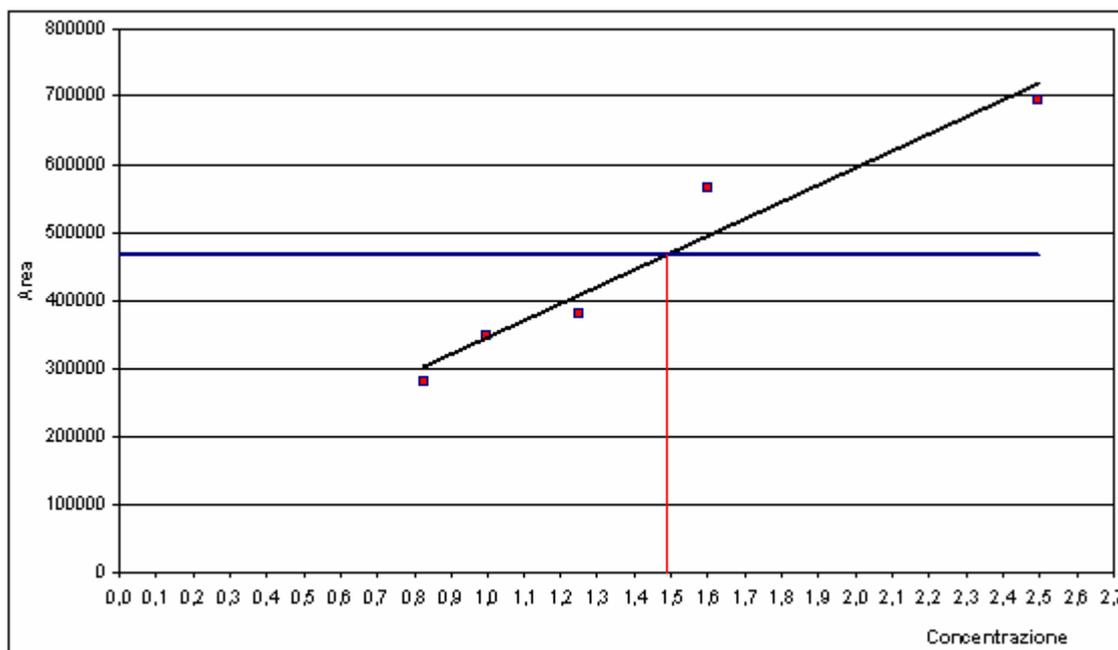


Fig. 1.3.50 *Curva di Calibratura della Capsicina (procedimento grafico per la determinazione della concentrazione della Capsicina in acqua).*

Considerando che la quantità di Capsicina nel metanolo per un'iniezione di un volume pari a 50µl —nell'ambito delle esperienze effettuate— risulta essere pari a 25µg¹, possiamo concludere che la solubilità della Capsicina in acqua è risultata pari al 5.92%².

¹ Se in 10µl di soluzione madre abbiamo 5µg di Capsicina, in 50µl avremo 25µg

² $\frac{1,48}{25} \times 100 = 5,92$

Interazione con il Cloro

In base alla Normativa Italiana la quantità di cloro residuo, al punto di prelievo da parte dell'utenza, deve essere almeno pari a 0,2mg/l. Con riferimento a tale dato è stata testata l'interazione tra la Capsicina in soluzione acquosa e il cloro, ponendo in provetta la soluzione acqua-Capsicina ed introducendo un quantitativo di dicloroammina in eccesso rispetto al parametro stabilito dalla legge. Purtroppo l'esito è risultato negativo, in quanto non si è riscontrato alcun effetto nella soluzione.

3.2 Metodiche analitiche di identificazione e quantizzazione del contaminante Ricina

La sperimentazione, come già precisato, è stata condotta presso il laboratorio di Chimica Farmaceutica e Tossicologica della Facoltà di Farmacia dell'Università Federico II di Napoli con l'assistenza del dott. Andrea Senatore, della Prof. Lydia Ferrara e del dott. Domenico Montesano.

Forse a causa delle recenti notizie di ritrovamenti di rilevanti quantità di ricina in mano ad esponenti di fazioni politiche estremiste in Gran Bretagna, Stati Uniti e Canada, o del sospetto che questa sostanza possa venire considerata quale strumento di offesa da parte di organizzazioni terroristiche, la ricina ha ottenuto attenzione e visibilità dai media e dagli organismi che si occupano della protezione e della sicurezza nazionale di vari paesi del mondo occidentale.

In effetti, la ricina è considerata una delle tossine più potenti tra quelle conosciute, a tal punto che il Center of Disease Control (CDC) statunitense, uno degli enti più autorevoli al mondo per ciò che riguarda lo studio e la classificazione delle sostanze tossiche, l'ha inserita al secondo livello di priorità quale possibile agente terroristico [Franz].

I motivi di tale interesse e preoccupazione sono noti: la facilità di produzione e l'enorme disponibilità della pianta da cui proviene, unite alla stabilità in acqua e al calore e alla elevata tossicità per l'uomo, fanno della ricina l'oggetto di attente valutazioni al fine di prevenire possibili attacchi alla popolazione e di specifici studi atti a determinare in maniera chiara lo sviluppo della sua azione tossica.

Cenni storici

L'utilizzo della pianta di *Ricinus Communis* è antica e risale già all'antico Egitto in cui essa veniva coltivata al fine di sfruttare le proprietà lubrificanti e lassative dell'olio. Sia l'olio che i semi sono stati usati in passato per fini curativi in diverse parti del mondo. Durante la seconda guerra mondiale gli Stati Uniti decisero di insediare vaste coltivazioni di ricino nell'area di San Joaquin Valley in California al fine di sopperire alla carenza dell'olio sul mercato e di avere adeguate riserve di lubrificante per la propria aviazione.

Le scoperte scientifiche sulla ricina cominciano alla fine del 1800 quando Stillmark scoprì che i semi di ricino contenevano una proteina tossica, a cui egli diede il nome di ricina. In particolare Stillmark scoprì che la ricina provocava l'agglutinazione degli eritrociti e la precipitazione delle sieroproteine. Dopo di lui Paul Ehrlich studiò la ricina e l'abrin durante l'ultima decade del secolo. I suoi studi su queste lectine sono considerati un fondamento dell'immunologia moderna. Sebbene la tossicità delle tossine sia minore per via orale piuttosto che per iniezione, Elrich riuscì ad indurre immunità nei topi somministrando loro piccole quantità di semi. Questo lavoro seminale mostrò anche che durante la gravidanza la specifica attività antitossica viene trasferita dalla madre al figlio attraverso il sangue e durante l'allattamento le stesse componenti protettive migrano attraverso il latte. La prima esperienza che dimostrò la capacità della ricina nativa di inibire tumori risale al 1951. La tossina fu testata in vari modi – applicazione locale, intratumorale e introarteriale – in pazienti afflitti da tumori con vari risultati. Più recentemente, con l'avvento di nuove tecniche

immunoterapiche, la ricina si è ancora ritagliato un ruolo di nicchia nelle metodologie cliniche della professione medica. Essa è stata studiata quale componente di agenti antitumorali chiamati immunotossine, o, più in particolare, tossine chimeriche.

La ricina nativa, o solamente la catena A della ricina stessa, viene coniugata agli anticorpi monoclonali delle specifiche cellule tumorali. Sebbene i risultati ottenuti siano stati promettenti, esistono due fattori che tuttora sembrano limitare l'efficacia di questa immunotossina: la mancanza di specificità dell'anticorpo e la significativa immunogenicità della catena, che si traduce in una relativamente rapida nascita di immunità refrattaria all'agente terapeutico.

A causa della sua relativamente alta tossicità e della sua estrema facilità di produzione, la ricina fu presa in considerazione dal governo degli Stati Uniti per la produzione di armi con il nome in codice "Compound W" durante la sua offensiva nel programma per la guerra biologica. L' U.S. Chemical Warfare Service cominciò a studiare armi basate sulla ricina già verso la fine del primo conflitto mondiale, dopodichè l'intensa collaborazione con il governo britannico si risolse nello sviluppo di una bomba W durante la Seconda Guerra Mondiale. Si hanno notizie di test effettuati con questa micidiale arma, ma non del suo effettivo impiego in battaglia.

Forse, però, il caso più famoso in cui la ricina è stata adoperata contro l'uomo rimane l'assassinio del dissidente bulgaro Gorge Markov nel 1978. Venne in quella circostanza iniettata nel suo corpo una quantità pari a 0,5 mg di ricina attraverso una punta posta all'estremità di un ombrello. Questa azione portò il politico alla morte in qualche giorno e pubblicizzò la tossina quale pericoloso

agente terroristico. Negli ultimi anni, la ricina è diventata uno degli strumenti preferiti da estremisti individuali o gruppi terroristici, o anche governi come quello di Saddam Hussein in Iraq che nel 1989 condusse test per la dispersione del contaminante in forma aerosolizzata. Nel 1995 due “protestatori” furono giudicati colpevoli negli Stati Uniti per possesso illegale di armi biologiche. Questo fu il primo caso di condanna a seguito del Biological Weapons Anti-terrorism Act promulgato nel 1989.

La pianta

Di origine tropicale (Africa, India), la pianta di ricino (*Ricinus Communis* L.) appartiene alla famiglia delle euforbiacee (fig. 1.3.51), ed è diffusa nell’emisfero australe, dal quale ancora oggi proviene la droga, costituita dai semi.



Fig. 1.3.51 Fiori della pianta di ricino

Mentre da noi è impiegata soltanto quale pianta ornamentale, in giardini e talvolta in interni, per via delle sue grandi foglie palmate di un verde-rossastro, viene coltivata nel bacino del Mediterraneo sin dall'antichità: al Nord (pianura padana) è un arbusto erbaceo frondoso di circa due metri; al Sud (Calabria, Sicilia), è legnoso ed alto fino ad otto metri; ai tropici, dove è una pianta perenne, raggiunge anche i 20 metri.

I piccoli semi, lunghi 1-2 centimetri, sono lucidi, bruni e di aspetto marmorizzato, appariscente; sono costituiti da un tegumento rigido che avvolge una polpa bianca molle ed oleosa, quasi insapore, non amara né sgradevole (fig. 1.3.52).



Fig. 1.3.52 *Semi di ricino*

La pianta di ricino è comunemente coltivata per i semi in quanto da questi si ricava un olio che ha caratteristiche tali da essere utilizzato in svariati modi, da essiccante usato nell'industria e nella produzione di farmaci, a purgante, o anche come componente per rivestimenti edili, per inchiostri, per tinture tessili, nei processi di conservazione dei pellami e di produzione di fibre poliammidiche

come il Reflon. Inoltre un utilizzo classico è quello di lubrificante di alta qualità. Grande utilizzo è stato e viene tuttora fatto dell'olio nella medicina popolare come ingrediente in cure per numerosissime malattie.

Come medicamento, l'olio di ricino va considerato sicuro a tutti gli effetti. La dose unica efficace raccomandata, dunque valida sia per il bambino quanto per l'adulto, varia da 5 a 10 grammi con effetto dopo 8 ore ma può essere elevata fino a 30 grammi per un effetto più rapido.

L'olio non comporta pericoli per la salute o effetti collaterali se assunto nei dosaggi indicati a scopo terapeutico.

Per ciò che interessa i semi, essi contengono sostanze tossiche per il 2,8-3 % e ciò comporta che la dose letale minima di semi contusi per somministrazione orale nell'uomo adulto sia ritenuta pari a 2,5-20 semi. Altrove si identifica la stessa dose minima con una quantità pari a 0,179 grammi per chilogrammo di peso corporeo. Ciò significa che per uccidere un uomo di 75 kg, si debbono ingerire 13,425 ($0,179 \times 75$) grammi di semi. Tali valori, relativamente elevati, sono certamente dovuti alla presenza dell'olio ed al relativo effetto evacuante.

In condizioni similari i bambini appaiono estremamente più sensibili. Un dato di difficile interpretazione riportato nel "Dangerous properties of industrial materials" (Sax Irving N., Van Nostrand Reinhold Co., 1999) e che gli autori sottolineano come 'esclusivamente indicativo', sostiene che la dose letale minima di semi contusi per somministrazione orale nel bambino (da 1 sino a 13 anni e sino a 20 kg di peso) è ritenuta pari a 0,5 milligrammi per chilogrammo di peso corporeo.

L'azione tossica è certa e più rapida quando i semi vengono masticati e non inghiottiti interi (cosa che spesso fanno i bambini).

L'agente tossico

La ricina è una proteina contenente due emoagglutine e due polieptidi della tossina. Le catene polipeptidiche della tossina sono dimeri con peso molecolare valutato in 66 KDa. Le due catene, chiamate catena A e catena B, rispettivamente con peso molecolare di 32 KDa e 34 KDa, sono unite da un ponte disolfuro. Questo lega l'aminoacido 259 della catena A all'aminoacido 4 della catena B. Entrambe le catene sono glicoproteine contenenti gruppi carboidratici di mannosio, e devono essere associate affinché si esplichi la tossicità [Winder, 2004, Franz].

In figura 1.3.53 è riportata la struttura della ricina.

La ricina rientra nella famiglia delle lectine tossiche. In particolare, essa appartiene alla famiglia A-B delle tossine che comprende altre tossine batteriche come difterica, psedomonas, colera, Shiga e antrace. Le tossine di questo gruppo consistono in due parti funzionalmente differenti, una metà A attiva enzimaticamente nella quale risiede l'attività catalitica e una metà B che ha il compito di legarsi ai carboidrati presenti sulla superficie della cellula. Questo legame è una condizione fondamentale affinché la catena A penetri nella cellula.

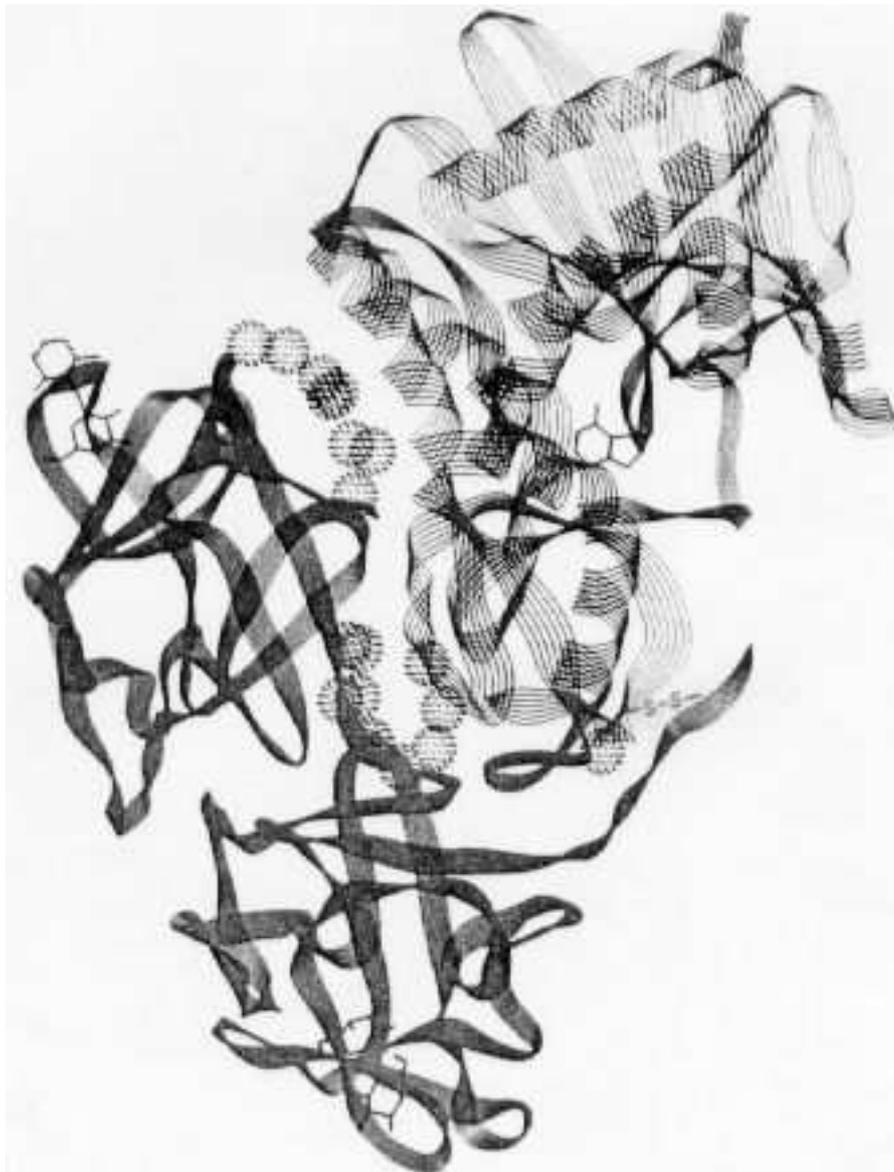


Fig. 1.3.53 *Struttura della ricina*

La presenza della catena B facilita in questa fase il trasporto della catena A all'interno del cytosol che avviene per endocitosi mediata dal Golgi. Una volta nel citoplasma, la catena A attacca enzimaticamente la subunità ribosomiale 28s inattivando quindi il ribosoma. Questa fase porta al blocco della sintesi proteica. A livello cellulare, quindi, la ricina uccide attraverso l'inibizione della sintesi proteica.

L'azione della catena A è molto efficiente e una molecola ha la capacità di inattivare alcune migliaia di ribosomi al minuto. In questo modo una singola catena A riesce ad inattivare i ribosomi più velocemente di quanto una cellula ne riesca a produrre ex novo. Una sola catena A di ricina ha la capacità di uccidere una cellula animale [Franz, Olsnes et al., 2001].

La tossicità

I segni clinici, i sintomi e le manifestazioni patologiche della tossicità della ricina variano a seconda della sua quantità e delle modalità di esposizione. Studi sperimentali su animali indicano che i segni clinici e il decorso patologico sono in gran parte differenti secondo il tipo di esposizione; ad esempio, l'inalazione provoca problemi respiratori e lesioni polmonari e alle vie di respirazione; l'ingestione causa sintomi all'apparato gastrointestinale nel quale si presentano emorragie con necrosi di fegato, milza e reni; ancora, un'intossicazione per via intramuscolare produce forti dolori localizzati, necrosi muscolari e dei linfonodi periferici e un moderato interessamento degli organi viscerali.

La dipendenza della patologia dalle specifiche modalità di esposizione è dovuta probabilmente alle proprietà di lectina della ricina, che permettono di legarsi in tempi brevi ai complessi galattosidici dei carboidrati presenti sulla superficie cellulare. Una caratteristica costante nell'uomo sembra essere una temporanea leucocitosi nel caso in cui l'intossicazione sia avvenuta per iniezione o per ingestione orale. La presenza di un numero di leucociti 5-6 volte maggiore dei valori normali è una caratteristica che si ritrova nei casi di cancro, oltre a essere stato riscontrato nel caso di George Markov [Franz].

Ingestione

La tossicità della ricina assunta per ingestione per via orale è la meno elevata tra tutte, probabilmente a causa del basso assorbimento e per una qualche digestione enzimatica presente nel tratto digerente.

Nell'intossicazione orale (e parenterale) le cellule nel sistema reticuloendoteliale, come le cellule di Kupffer e i macrofagi, sono particolarmente sensibili a causa del recettore mannosio presente esclusivamente nei macrofagi. Nel 1985 A. Rauber e J. Heard raccolsero gli studi di 751 casi di ingestione dei semi di ricino, riportando un tasso di mortalità pari all' 1,9% (14 casi sul totale), molto più basso rispetto a quanto si credesse secondo tradizione. Di questi 14, ben 12 risultavano essere accaduti prima del 1930. Anche nei casi in cui ci sono stati pochi interventi medici, o addirittura nessuno, la percentuale di decessi nei pazienti sintomatici è stata bassa, attorno al 6% circa. Il numero di semi ingeriti da pazienti deceduti varia sensibilmente. Dei due casi di intossicazione orale avvenuti dopo il 1930 di cui abbiamo documentazione, uno riguardava un uomo di 24 anni che aveva ingerito una quantità pari a 15-20 semi, mentre il secondo un ragazzo di 15 anni che aveva assunto 10-12 semi.

Tutti i casi documentati riguardanti ingestione di semi di ricino presentano la stessa storia clinica generale: rapido manifestarsi di attacchi di nausea (in alcune ore o anche meno), vomito e dolori addominale, seguiti da diarrea, emorragia intestinale, anuria, crampi, dilatazione delle pupille, febbre, sete, mal di gola, mal di testa, collasso vascolare e shock. Il decesso avviene dal terzo giorno in poi. I risultati autoptici più comuni di intossicazione orale sono ulcerazioni multifocali

ed emorragie della mucosa gastrica e dell'intestino tenue che possono essere anche piuttosto gravi; inoltre si presentano necrosi linfoidi nei linfonodi mesenterici, tessuti linfoidi del tubo digerente (GALT) e milza, necrosi del fegato e delle cellule di Kupffer, nefrite e splenite diffuse.

Iniezione

In un ampio esperimento clinico è stato rilevato che un basso dosaggio di ricina per via endovenosa (18-20 µg/m²) somministrata a pazienti malati di cancro era ben tollerata. Sintomi simil-influenzali associati ad affaticamento (in alcuni casi molto pronunciato) e a dolori muscolari sono ricorrenti nei pazienti e talvolta si sono manifestati nausea e vomito. I sintomi cominciano a manifestarsi 4-6 ore dopo la somministrazione per continuare per 1-2 giorni.

Due morti per tossicità sono state documentate negli esperimenti clinici della fase I sull'abrin, una proteina strettamente correlata; questi pazienti hanno avuto una crisi generale e altri sintomi di tossicità nei confronti del sistema nervoso centrale. Nel caso di George Markov, il cui assassinio è stato ricordato in precedenza, in seguito all'iniezione letale di ricina, la cui dose è stata stimata in più di 500 µg, si è riscontrata una quasi subitanea manifestazione di dolore locale, e successivamente una sensazione di debolezza nelle prime 5 ore. Nelle 15-24 ore successive si osservò temperatura alta, nausea e vomito. Dopo 36 ore dall'incidente fu ricoverato in ospedale in quanto presentava febbre, tachicardia e pressione del sangue nei normali valori. I linfonodi nella zona affetta presentavano gonfiore ed irritazione. Si poté osservare un'area di indurimento ed infiammazione del diametro di 6 cm intorno al punto dell'iniezione sulla sua

coscia. Dopo soli due giorni dall'attentato egli divenne improvvisamente ipoteso e tachicardico; le pulsazioni arrivavano a 160 battiti al minuto, mentre si presentarono collasso vascolare e shock. I suoi globuli bianchi arrivarono a $26.300/\text{mm}^3$. All'inizio del terzo giorno dopo l'attacco egli presentò anuria e cominciò a vomitare sangue. Con un elettrocardiogramma si dimostrò il completo blocco del condotto atrio ventricolare. Markov morì da lì a poco. Al momento del decesso i suoi globuli bianchi erano arrivati a $33200/\text{mm}^3$.

L'iniezione per via intramuscolare o sottocutanea di dosi alte della tossina nell'uomo, com'è accaduto nel caso dell'attentato, causa gravi necrosi linfoidi, emorragia gastrointestinale, necrosi al fegato, nefrite e splenite diffuse. Nel caso di Markov si osservò che il leggero edema polmonare che si presentò fu successivo alla crisi cardiaca. Risultati simili sono stati riportati negli studi sperimentali sugli animali.

Inalazione

Sebbene dati riguardanti la tossicità per l'uomo di una eventuale esposizione all'aerosol non siano disponibili, i danni provocati da un'esposizione orale e parenterale sono in armonia con quelli visti negli studi sperimentali sugli animali, suggerendoci così una possibile analogia per i casi di tossicità.

Le uniche informazioni che abbiamo riguardanti inalazione di ricina per l'uomo è una sindrome allergica riguardante alcuni lavoratori esposti alla polvere di semi di ricino durante il processo di produzione dell'olio. Il quadro clinico è caratterizzato da un improvviso attacco di congestione al naso e alla gola, irritazione gli occhi, orticaria e dolori al torace. In casi più seri può aggiungersi anche affanno fino ad

arrivare all'asma bronchiale, che può protrarsi per alcune ore. Individui affetti rispondono positivamente a terapie sintomatiche e all'allontanamento dalla fonte di tossicità.

Esperimenti condotti sui topi hanno dimostrato che l'inalazione di ricina porta ad una polmonite necrotizzante delle vie respiratorie, associata ad infiammazione ed edema interstiziale e alveolare. Non avviene nessun significativo cambiamento nelle lesioni polmonari prima di 8 ore dall'esposizione. Dopo 12 ore il numero di cellule infiammatorie e il numero totale di proteine aumenta, mentre dopo 30 ore si presentano ipossemia arteriale e acidosi e diventa significativa la presenza di liquidi nella zona alveolare. Sono stati recentemente completati studi immunostochimici sui topi esposti alla ricina via aerosol e i risultati mostrano che la ricina aerosolizzata si lega alle cellule cigliate bronchiali, ai macrofagi e alle cellule alveolari.

In un recente studio su primati, la tossicità per inalazione è stata definita attraverso un periodo pre-clinico in funzione del dosaggio di 8-24 ore, seguito da anoressia e da un progressivo calo dell'attività fisica. Il decesso è sopraggiunto dalle 36 alle 48 ore dopo l'esposizione, anche questo a seconda della quantità di tossina assunta. I cambiamenti istopatologici più rilevanti sono confinati alla cavità toracica. Tutte le scimmie presentavano polmonite fibrinopurulenta, con vari gradi di necrosi diffusa e infiammazione acuta alle vie respiratorie, oltre ad una diffusa e grave presenza di liquido nella zona alveolare, edema peribroncovascolare, tracheite acuta e una linfadenite mediastinica purulenta catalogata come grave. Due scimmie, infine, presentavano un'acuta adrenalite.

Cause di decesso

L'esatta causa di morte dovuta alla ricina è sconosciuta e probabilmente è funzione del tipo di intossicazione. I risultati di studi clinici sull'utilizzo della catena A della ricina come immunotossina hanno dimostrato che la detta catena provoca una lesione alle pareti vascolari caratterizzata da ipoalbuminemia e edema. Studi in vitro basati su osservazioni di cellule endoteliali di vene ombelicali umane hanno mostrato che la ricina effettivamente provoca danni alle cellule endoteliali. In topi, ratti e primati un alto dosaggio effettuato per inalazione sembra produrre danni abbastanza gravi ai polmoni da causare il decesso, probabilmente dovuto all'ipossemia causata dall'imponente edema polmonare e dalla presenza di liquido nella zona alveolare. Massicce dosi somministrate per via endovenosa in studi sperimentali su animali sono associate a una diffusa coagulazione introvascolare. Si è notato che lesioni epatocellulari e renali sono il risultato di disturbi vascolari indotti dalla tossina piuttosto che da un effetto diretto della tossina stessa. Uno studio pubblicato nel 1987 da Bingen et al. ha dimostrato in maniera evidente che la somministrazione per via endovenosa di ricina nei topi provoca danni diffusi alle cellule di Kupffer, ed in seguito alle cellule endoteliali, formazione di emboli nel sistema vascolare del fegato ed infine necrosi epatocellulare, confermando alcuni studi pubblicati nel 1976 da Derenzini et al.

Diagnosi, gestione medica, immunizzazione e protezione passiva

Diagnosi

Come altre intossicazioni potenziali su campi di battaglia non convenzionali, le scoperte epidemiologiche giocheranno un ruolo centrale nella diagnosi.

Sarebbero, ad esempio, estremamente significative osservazioni di molteplici casi di problemi polmonari molto gravi in una popolazione di giovani soldati in origine sani, legati tra loro dall'essere stati nello stesso luogo e momento in presenza di condizioni climatiche adatte ad un attacco biologico.

Le diagnosi differenziali di un'esposizione all'aerosol di ricina possono includere l'enterotossina B dello stafilococco, esposizione ai sottoprodotti della pirolisi dei polimeri organofluorati (ad es. Teflon, Kevlar) o di altri organoalogenati, ossidi di nitrogeno, fosgene. Insetticidi come il paraquat e α -naftilurea (ANTU), sebbene non attesi in uno scenario di battaglia, possono essere propagati nell'aria su vaste aree geografiche e sono oltretutto potenti agenti edemagenici.

Una conferma di una presunta intossicazione da ricina occorsa per inalazione può venire da un esame che preveda un'analisi di tipo ELISA (enzyme-linked immunoassorbent assay) su un campione di mucosa nasale: la ricina può essere rilevata, con questo metodo, per almeno 24 ore dopo l'attacco. Poiché la ricina è estremamente immunogenica, gli individui che sopravvivono ad un attacco del genere hanno verosimilmente anticorpi in circolazione per 2 settimane dall'esposizione.

Analisi di tipo ELISA (per sangue e altri fluidi corporali) o tecniche immunoistochimiche (per analisi dirette su tessuti) possono essere utili alla conferma di intossicazioni da ricina.

Ad ogni modo, poiché la ricina è trattenuta molto velocemente a prescindere dal tipo di esposizione e metabolizzata prima dell'escrezione, l'identificazione nei fluidi corporali o tessuti è difficoltosa. Nei ratti esposti a ricina tracciata con iodio 125 per iniezione endovenosa il tracciante radioattivo è stato individuato, 30

minuti dopo l'esposizione, nel fegato (46%), muscoli (13%) e milza (9%). La ricina è stata rapidamente rimossa dagli animali, eccetto per un 11% che è rimasto dopo 24 ore. Il 70% è stato espulso attraverso l'urina come metabolica dal basso peso molecolare.

I tentativi di identificazione della tossina possono includere anche l'introduzione di materiali per autopsia biologica in topi o cellule coltivate e neutralizzazione attraverso l'utilizzo di specifici anticorpi.

Gestione medica

Gli scenari più probabili in cui l'intossicazione da ricina può essere osservata da personale medico militare sono un campo di battaglia a scala ristretta o la propagazione di un aerosol a scopi terroristici e la somministrazione parenterale della tossina usata come strumento assassino. Giacché la ricina agisce rapidamente e irreversibilmente, una terapia successiva all'esposizione è più difficile che per altri agenti caratterizzati da processi lenti e da azioni periferiche, come il botulino o gli agenti batterici, che possono essere affrontati con antibiotici. Di conseguenza l'immunizzazione del personale a rischio di esposizione da ricina è addirittura più importante che per altri potenziali agenti biologici.

Immunizzazione e protezione passiva

Studi su animali hanno mostrato che né l'immunizzazione attiva, né la profilassi passiva, né una terapia (se avviene in poche ore) sono efficaci in maniera

completa nei confronti dell'intossicazione da ricina se avvenuta per via endovenosa o intraperitoneale.

D'altro canto, l'esposizione per inalazione è contrastata al meglio attraverso una immunizzazione attiva o attraverso la somministrazione profilattica di uno specifico anticorpo aerosolizzato anti-ricina. La profilassi attiva ottenuta attraverso l'immunizzazione è l'unica contromisura medica efficace nelle nostre mani in questo momento.

L'immunizzazione profilattica di topi, ratti e primati subumani con due o tre dosi del tossoide (3-5 µg per dose), con o senza adiuvante (idrossido di alluminio), protegge dalla morte e dall'inabilitazione che sono conseguenti all'esposizione per inalazione a molteplici dosi letali di ricina. Sia il tossoide della tossina nativa sia un preparato della catena A purificata producono una ragionevole risposta di anticorpi che si correla alla protezione dall'esposizione da aerosol. Il tossoide è stato microencapsulato in particelle *glactide-glycolide* e nei topi provvede ad una effettiva protezione dopo una immunizzazione. Le sole potenziali contromisure mediche approvate per utilizzi sull'uomo sono il tossoide trattato con formalina, testato in esperimenti pre-clinici e presentato alla Food and Drug Administration americana come Investigational New Drug, e la catena A deglicosilata, che ha anche mostrato la promessa di essere usata come antigene in esperimenti pre-clinici. Il tossoide si è dimostrato sicuro ed efficace nel reagire all'esposizione da ricina con aerosol per inalazione nei roditori e primati non umani, considerando che questa è la tipologia di attacco più probabile in una potenziale strategia offensiva. Nel ricercare un approccio alla protezione passiva di soldati sprovvisti di immunizzazione, studi sugli animali hanno condotto in laboratorio a valutare

l'efficacia a breve termine di un'inalazione di uno specifico anticorpo in modo profilattico. Dati preliminari suggeriscono che se i topi vengono esposti per 20 minuti all'immunoglobina G aerosolizzata (circa 24 µg di anticorpi per topo, la quantità minima testata), essi vengono ad essere completamente protetti da minacce di aerosol 1 ora dopo; inoltre, gli stessi esperimenti hanno rilevato che più del 95% di loro sono protetti da lesioni polmonari. Queste scoperte rivelano anche che la somministrazione endovenosa o l'inalazione di uno specifico anticorpo dopo l'esposizione alla ricina aerosolizzata varrà poco se si cerca di bloccare o di invertire gli effetti patologici della tossina.

Analisi sperimentale

Estrazione

La fase di estrazione è stata sviluppata ex novo partendo da una quantità di 5g di semi di ricino interi. Essi vengono pestati e si aggiungono 100 ml di etere di petrolio; dopo 30 minuti a temperatura ambiente il campione avrà perso i lipidi contenuti. In seguito alla delipidizzazione esso viene macerato con 25 ml di soluzione tampone fosfato a pH=7, ottenuta miscelando 11,62 ml di KH_2PO_4 e 13,38 ml di Na_2HPO_4 . Il materiale macerato ottenuto viene filtrato usando una garza; il filtrato viene centrifugato per 10 minuti a 3000 rpm. Aggiungiamo a questo punto diverse gocce di acido tricloroacetico al 10% al surnatante al fine di far precipitare la proteina. Dopo 12 ore centrifughiamo nuovamente per 15 minuti a 5000 rpm. Eliminiamo il surnatante e conserviamo il campione a temperatura ambiente. Effettuiamo sul campione un'analisi spettrofotometrica che ci permette di ricavare il contenuto proteico del campione. Esso è stato analizzato grazie allo

spettrofotometro Beckman DU-62. I risultati ci danno un contenuto proteico pari a 2,35 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Identificazione attraverso l'analisi elettroforetica

Il tipo di procedimento scelto è quello dell'elettroforesi denaturante di tipo SDS-PAGE. Su questa base sono state effettuate due analisi differenti: una prima riducente e una seconda non riducente. Le due tecniche differiscono nell'uso del β -mercaptoetanolo presente nella prima ma assente nella seconda. Per questo motivo nell'elettroforesi non riducente, mancando questo agente, la nostra proteina risulterà integra poiché i ponti disolfuro che legano i due monomeri costituenti la molecola non verranno ridotti.

Elettroforesi denaturante riducente

Il gel utilizzato contiene una percentuale di acrilammide pari al 12%. Le componenti del gel di separazione (*running*) sono elencate in tabella 1.3.7.

Gel di Running (per un volume di 10 ml)	
H ₂ O	3.3 ml
Mix acrilammide al 30%	4.0 ml
Tris HCl pH 8.8	2.5 ml
SDS 10%	100 μl
Ammonio per solfato (APS) 10x	100 μl
TEMED	10 μl

Tab. 1.3.7 *Composizione del gel di separazione (running)*

La scelta di tale percentuale è stata studiata in funzione della dimensione dei monomeri della nostra proteina di cui si vuole andare a rilevare la presenza. In tabella 1.3.8 è stata riportata la composizione del gel di impaccamento (*stacking gel*) utilizzato.

Gel di Stacking (per un volume di 4 ml)	
H ₂ O	2.7 ml
Mix acrilammide al 30%	670 µl
Tris HCl pH 6.8	500 µl
SDS	40 µl
TEMED	4 µl

Tab. 1.3.8 *Composizione del gel di impaccamento (stacking)*

Le analisi sono state effettuate su 3 campioni a crescente contenuto proteico: 30 µg, 60 µg, 100 µg. La preparazione è stata effettuata miscelando i campioni ottenuti dalla fase di estrazione con relative quantità di *sample buffer*. Nelle tabelle 3.9 e 3.10 sono state riportate rispettivamente queste quantità e la composizione del *sample buffer* utilizzato.

Preparazione campioni		
<i>Contenuto proteico (µg)</i>	<i>Volume estratto (µl)</i>	<i>Volume sample buffer (µl)</i>
30	12,8	3,2
60	25,5	6,4
100	42,5	10,6

Tab. 1.3.9 *Composizione dei campioni per la corsa elettroforetica*

Sample buffer 4x (per un volume di 1 ml)	
H ₂ O	150 µl
40 % glicerolo	400 µl
20% β-mercapetanololo	200 µl
0,250 M Tris HCl pH=6,8	40 µl
SDS	80 mg
Blu di bromofenolo	qualche granello

Tab. 1.3.10 *Composizione del sample buffer. La dicitura 4x indica il rapporto tra i volumi del sample buffer e dell'estratto*

Si rimarchi che i separatori utilizzati all'interno della cella elettroforetica hanno dimensione pari a 1,5 mm.

La tabella 1.3.11 illustra la composizione del tampone di corsa utilizzato nella vaschetta inferiore della cameretta elettroforetica.

Tampone di corsa 10x	
Tris HCl	30,2 g
Glicina	188 g
SDS 10%	100 ml

Tab. 1.3.11 *Composizione del tampone di corsa. Questa soluzione viene poi diluita fino ad ottenere il volume di 1 litro (da cui la dicitura 10x). Inoltre il pH viene portato a 8,3 con HCl*

La fase di separazione impiega 30 minuti per la fase di stacking e 1 ora per la corsa (*running*) e viene impiegata una corrente pari a 30 mA per la prima e 70 mA per la seconda.

Successivamente a questa si passa alla fase di fissaggio nella quale il gel viene incubato per 4-12 ore a temperatura ambiente in una soluzione di etanolo, acido acetico e acqua in proporzione 30:10:60, assicurandolo su un agitatore a leggera velocità. Quindi si allontana la soluzione di fissaggio e si lava due volte con una soluzione al 30% di etanolo lasciandola agire per 30 minuti ad agitazione lenta.

Affinché la rilevazione sia più efficace si è optato, per la fase di colorazione, per una tecnica a base di sali d'argento (*silver stains*). La soluzione colorante è preparata utilizzando una concentrazione pari allo 0,1% di AgNO_3 e viene lasciata agire per circa 30 minuti su un agitatore a leggera velocità. Il gel viene successivamente lavato con acqua distillata e si procede alla fase di decolorazione ottenuta con una soluzione acquosa contenente carbonato di sodio (2,5%) e formaldeide (0,02%), lasciandola agire fino al raggiungimento del contrasto voluto delle bande. Si procede poi al lavaggio per alcuni minuti con una soluzione all'1% di acido acetico e in seguito altri lavaggi della durata ciascuno di 10 minuti con acqua distillata.

Il gel viene poi posto su carta 3M e coperto con carta velina per essere seccato mediante il Gel Dryer per la conservazione definitiva.

Lo standard scelto (*weight marker*) è il Full Range Rainbow RPN 800 della Amersham che è ottimale nel campo in cui attendiamo la rilevazione, avendo due bande distinte a 30 KDa e 35 KDa.

Elettroforesi denaturante non riducente

La procedura ed i materiali utilizzati per questo metodo ricalcano in gran parte quelli dell'analisi precedente. Si evidenziano qui, pertanto, i soli scostamenti da essa.

La prima differenza consta nella presenza nel gel di separazione dell'acrilammide, qui ridotto alla percentuale del 10%, essendo le molecole da rilevare di dimensione più importante. Per questo motivo la composizione del gel di *running* viene opportunamente modificata e viene riportata in tabella 1.3.12.

Gel di Running (per un volume di 10 ml)	
H ₂ O	4.0 ml
Mix acrilammide al 30%	3.3 ml
Tris HCl pH 8.8	2.5 ml
SDS 10%	100 µl
Ammonio per solfato (APS) 10x	100 µl
TEMED	4 µl

Tab. 1.3.12 *Composizione del gel di separazione (running)*

Quindi, come già sottolineato in precedenza, nella preparazione del sample buffer viene esclusa la presenza del β -mercaptoanolo in quanto non si vuole qui innescare il processo riducente attivo nell'esperienza antecedente. Resta perciò valida, a meno del componente suddetto, la composizione del *sample buffer* riportata in precedenza.

Infine è stato qui utilizzato come *weight marker* il Coloburst Electrophoresis Marker C 4105 della Sigma. Esso è stato utilizzato in quanto produce una banda di colore blu in corrispondenza di un peso molecolare di 65 KDa, valore molto prossimo a quello atteso.

Risultati delle fasi di estrazione e identificazione

La fase di estrazione si distingue rispetto alle esperienze presenti in letteratura per molteplici aspetti. Essa è del tutto originale rispetto ad esse, potendo contare su una maggiore facilità operativa, oltre che su una notevole rapidità esecutiva.

Per quanto riguarda questi due aspetti, è impossibile non richiamare il noto brevetto n. 3,060,165 [H. L. Craig et al., 1952], già descritto in precedenza. Rispetto alla procedura di Craig, la procedura qui proposta impiega solo una frazione del tempo necessario, includendo inoltre un numero di fasi di gran lunga minore. Altre procedure che vengono utilizzate comunemente in fase estrattiva non possono contare sulla stessa facilità ed immediatezza, come ad esempio quelle che prevedono l'utilizzo di procedure di tipo ELISA con anticorpi monoclonali anti-RTA, presupponendo tecniche sperimentali specifiche.

Altro aspetto che permette di ritenere estremamente valida la procedura di estrazione illustrata è la grande efficacia nella purificazione, come messo in evidenza dai risultati delle analisi elettroforetiche.

Dalla letteratura infatti sappiamo che la ricina è una molecola avente un peso che può essere valutato in 66 KDa. D'altra parte, essa è costituita da due catene, chiamate catena A e catena B, del peso rispettivamente di 32 KDa e 34 KDa. I risultati dell'elettroforesi denaturante riducente mostrano in maniera molto evidente la presenza di questi due monomeri (fig.3.54).

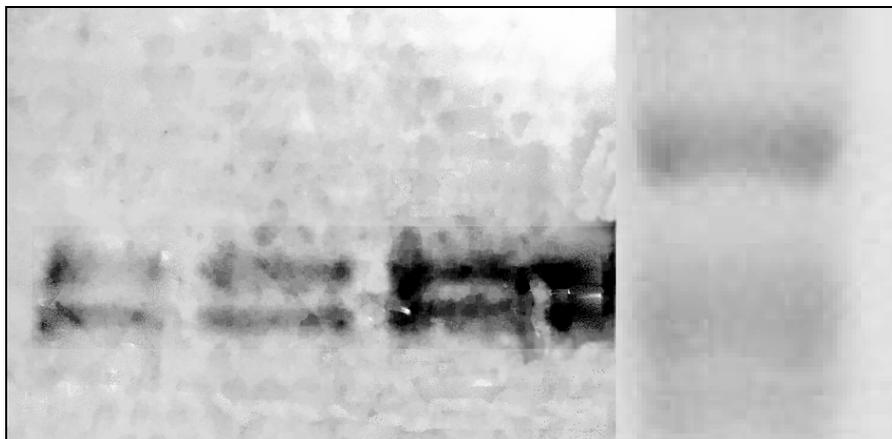


Fig. 1.3.54 SDS-PAGE denaturante riducente. I tre pozzetti a sinistra contengono soluzioni aventi contenuto proteico crescente (30-60-100 µg) mentre a destra è stato riportato lo standard. Si osservano le due bande corrispondenti alle due catene RTA e RTB

L'elettroforesi denaturante non riducente, d'altro canto, ha dato risultati ugualmente efficaci, presentando bande molto marcate in corrispondenza del riferimento dello standard posto a 65 KDa, che ci conferma in maniera totalmente soddisfacente le nostre attese nei confronti della presenza della molecola nello stato integro. Tali risultati sono esposti nella figura 1.3.55.

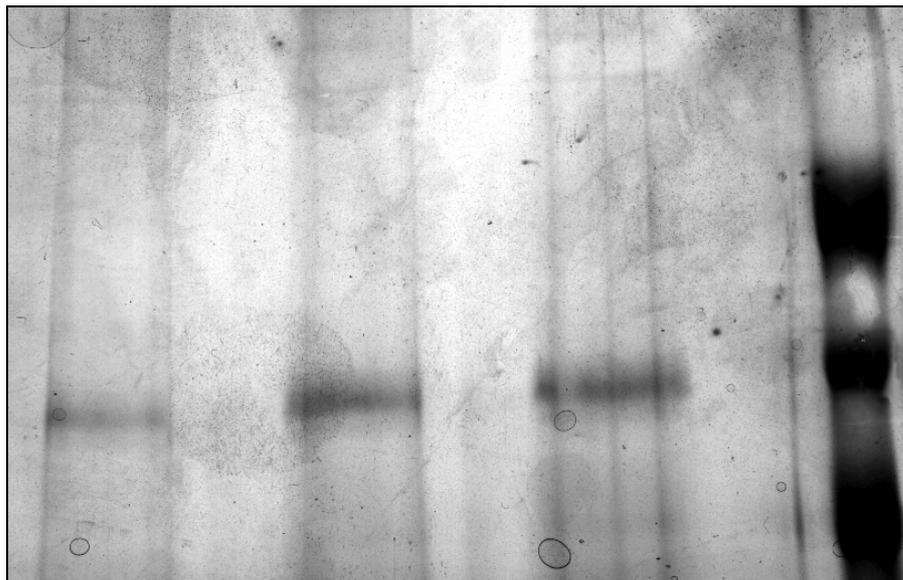


Fig. 1.3.55 SDS-PAGE denaturante non riducente. Come nella figura precedente i tre pozzetti a sinistra contengono soluzioni a contenuto proteico crescente, mentre a destra lo standard. Le tre bande a sinistra, di intensità crescente sono allineate al riferimento di 65 KDa

Si può altresì notare dai risultati mostrati la sostanziale assenza di altre sostanze che ci porta ad osservare anche la valida azione purificante ottenuta sull'estratto.

Questi risultati sottolineano molto chiaramente l'ultimo e forse più importante pregio della tecnica estrattiva adottata, ossia la sua efficienza di isolamento e di purificazione dei campioni contenenti la lectina studiata.

Metodologie di identificazione della ricina in acqua

Spot test con Ninidrina

Lo spot test proposto per la rilevazione istantanea della ricina si basa sulla ninidrina ($C_6H_4COCOCO$) di cui in fig. 1.3.56 è riportata la struttura.



Fig. 1.3.56 Formula di struttura della ninidrina

Si è rilevato che una soluzione contenente ricina, trattata con un test a base di ninidrina, dà una colorazione che va dal blu al violaceo in funzione della concentrazione. In figura 1.3.57 è riportata l'immagine di una provetta in cui è stato aggiunto il test di ninidrina al campione estratto dai semi di ricino.

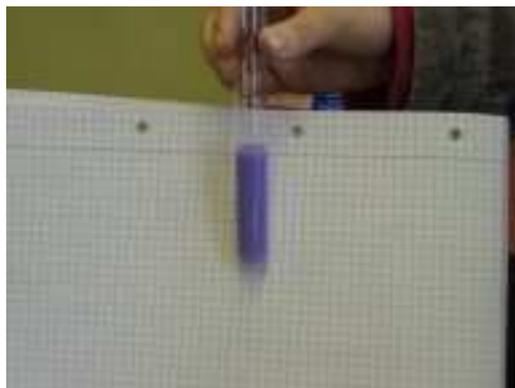


Fig. 1.3.57 *Provetta contenente estratto dei semi di ricino su cui è stato effettuato il test con ninidrina.*

Purtroppo questo spot test è solamente una condizione necessaria, ma non sufficiente, alla presenza di ricina in acqua. Infatti la ninidrina reagisce con tutti gli aminoacidi, pertanto bisogna considerare che un eventuale risultato positivo di questo test potrebbe essere solo un falso positivo. Per l'identificazione univoca della tossina occorre, quindi, fare riferimento a tecniche meno rapide ma più precise come l'elettroforesi.

Analisi HPLC

Le analisi tramite cromatografia liquida ad alta prestazione non hanno fornito dati sufficienti per giungere agli stessi risultati e strumenti metodologici descritti per la capsicina. Ciò è probabilmente dovuto alla maggiore sensibilità che le strumentazioni di rilevazione cromatografica hanno in rapporto, ad esempio, all'elettroforesi. La separazione, pertanto, si è rivelata impossibile, soprattutto considerato il grado di impurità comunque presente nei nostri campioni estratti dai semi di ricino.

D'altro canto, neanche nella vasta letteratura esaminata sono state individuate tecniche di separazione cromatografica utilizzate per la quantificazione della ricina in acqua.

Altre metodiche di identificazione

Un metodo utile all'identificazione della ricina in modo rapido consiste nell'utilizzare **saggi immuno-cromatografici**, altresì chiamati '*a flusso laterale*' **o semplicemente 'strip assay'**. La procedura prevede l'uso di anticorpi monoclonali (Mabs) e delle loro proprietà in modo tale da avere un rapido ed efficace rilevamento della tossina. I vantaggi nell'adottare questa metodologia sono fondamentalmente quattro: facilità operativa, stabilità a lungo termine in un ampio campo di condizioni, grande rapidità nell'ottenere i risultati ed un costo relativamente contenuto. Queste caratteristiche rendono il test adatto ad essere effettuato *in situ* anche da operatori poco esperti.

Nello specifico il metodo prevede che un Mab anti-catena B della ricina (1G7) venga immobilizzato in una zona di identificazione definita sulla superficie di una membrana porosa di nitrocellulosa, mentre l'altro Mab anti-catena A (5E11) viene coniugato alle particelle di oro colloidale che ha la funzione del reagente che permette il riconoscimento.

Il campione contenente ricina viene unito alla membrana e lasciato reagire con le particelle rivestite dal Mab (5E11). In tal modo, esso viene fatto passare attraverso la membrana per capillarità oltre il Mab (1G7) nella zona di riconoscimento, che legherà le particelle che sono unite alla ricina, rendendo un colore rosso

all'interno della zona detta con un'intensità proporzionale alla concentrazione della tossina.

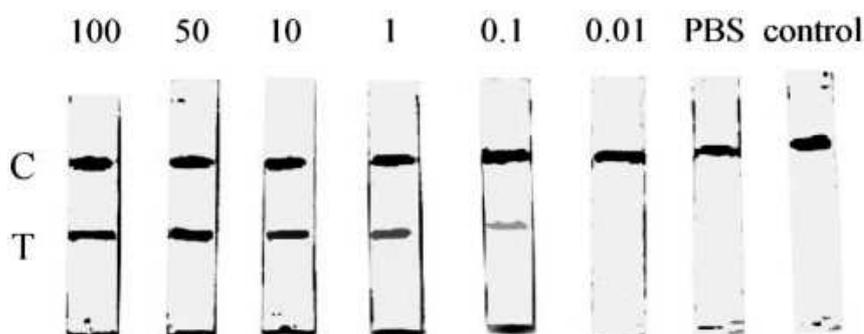


Fig. 1.3.58 Rilevazione immunocromatografica della ricina con utilizzo di argento. Sono state preparate una serie di diluizioni (0,01 - 100 ng/ml) di ricina in PBS. Il saggio di controllo consiste nell'analisi di una proteina diversa dalla ricina.

L'analisi descritta termina in meno di 10 minuti e può annoverare un limite di rilevabilità di 50 ng/ml di ricina anche se si può migliorare quest'ultimo risultato attraverso l'uso dell'argento per arrivare fino a 100 pg/ml (fig. 1.3.58).

Altra interessante metodologia di identificazione della ricina in acqua è **l'elettroforesi capillare** che trova già altre applicazioni nell'ambito della contaminazione, come descritto nel capitolo 3. Le condizioni analitiche per la ricina utilizzate sono state studiate da Hines e Brueggemann. Le colonne non impaccate (*uncoated*), usate con sali zwitterionici o putrescina, danno i migliori risultati. In queste condizioni sono stati risolti picchi multipli. Le analisi eseguite mediante una colonna nuda in silice fusa con un tampone 0.03M di borato di sodio danno un picco singolo, largo e caudato che può essere originato dalle interazioni proteina-colonna, da componenti supplementari, o da entrambe le cause. I migliori risultati si hanno però con l'utilizzo di 0.03M di putrescina in un

tampone 0.02M di K_2SO_4 ed in questo modo vengono risolti sia la forma del picco che i picchi multipli, indicando così possibili impurità e microeterogeneità nel campione di ricina [Boulet et al., 2000]

Altri metodi più complessi e con finalità diverse da quelle di questo studio sono state sviluppati, ad esempio, al fine di migliorare la rilevazione di piccole quantità di ricina a fini di laboratorio o nell'utilizzo terapeutico della tossina.

Le due metodologie più usate nella rilevazione rapida di piccole quantità di ricina sono le **analisi radioimmunologiche** e quelle di tipo **ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)**. Gli svantaggi di questi due metodi sono: per il primo, la necessità di un tempo di incubazione lungo che può limitare l'uso applicativo; d'altro canto, per le analisi di tipo ELISA, sebbene il limite di rilevabilità sia comparabile agli esami radioimmunologici, esse richiedono la presenza di personale qualificato e spesso i tempi sono piuttosto lunghi (4-6 h).

I suddetti limiti di rilevabilità variano a seconda delle specifiche modalità analitiche scelte e sviluppate, e vanno dai 100 pg/ml ai 10 ng/ml per quanto riguarda gli studi più recenti.

Per questi motivi Narang et al. [1997] hanno proposto un metodo che utilizza un saggio immunologico con un biosensore a fibra ottica con un'efficacia rilevativa pari a 100 pg/ml.

Oltre a questi bassi valori di concentrazione rilevati, questa tecnica ha come vantaggio la trasportabilità dello strumento, di peso compreso tra 1 e 2,5 kg, ed interfacciabile ad un computer portatile. Il limite di concentrazione rilevabile è, come si può notare, paragonabile agli altri due metodi citati in precedenza, mentre la maggiore differenza consiste nel tempo di analisi pari qui a 20 minuti.

Al fine di valutare l'efficienza del test, gli autori hanno analizzato campioni di acqua da fiume inquinati con diverse concentrazioni di ricina. I risultati di tale esperimento portano a valutare il limite di rilevabilità in queste condizioni nell'ordine di 1 ng/ml, ed in tal modo si è dimostrato che non sussiste alcuna inibizione da parte dell'acqua di fiume nei confronti del saggio. Queste considerazioni suggeriscono, dunque, l'applicabilità della tecnologia al monitoraggio sperimentale per inquinamento da ricina.

Interazione con il cloro

L'ipoclorito di sodio è un disinfettante utilizzato da molto tempo nella disinfezione delle acque destinate ad uso potabile e rappresenta un possibile strumento di decontaminazione.

Lo studio di Mackinnon et al. [2000] si è focalizzato sull'interazione che tale composto può avere nei confronti della ricina, avendo considerato concentrazioni giudicate indicative di una possibile decontaminazione.

E' stata fatta agire la ricina (in concentrazione di 0,4 µg/µl in 50 mM di fosfato di sodio a pH 7.0) con l'ipoclorito di sodio in concentrazioni che vanno da 200 µM (0,0035% w/v) fino a 40 mM (0,7% w/v) per 2 ore a temperatura ambiente. La reazione termina per aggiunta di un eccesso di cisteina 2M oltre l'iniziale concentrazione di ipoclorito.

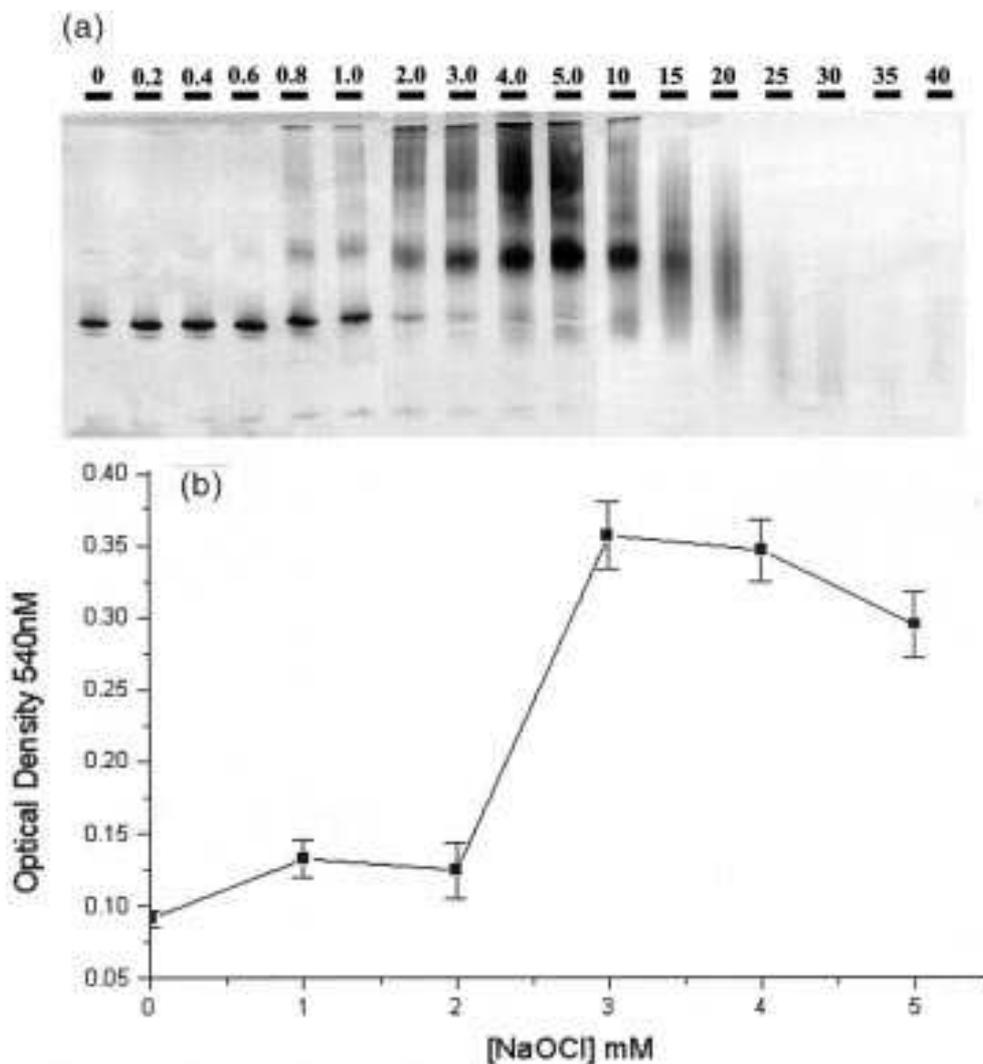


Fig. 1.3.59 SDS PAGE (a) e attività citotossica (b) di campioni di ricina trattata con ipoclorito di sodio.

(a) L'elettroforesi è stata condotta in gel al 10-15% con ricina (0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) trattata con le concentrazioni di ipoclorito di sodio indicate (in mM). I campioni sono stati ridotti con β -mercaptoetanolo e sono stati utilizzati 0,4 μg per pozzetto. I campioni sono stati visualizzati con nitrato d'argento.

(b) Attività citotossica della ricina degradata: sulle ascisse è riportata la concentrazione dell'ipoclorito utilizzata per il trattamento della ricina, sulle ordinate il livello del rosso metile delle cellule Hep2 è stato misurato con una assorbanza di 540 nm. L'aumento dell'assorbanza indica una maggiore ritenzione del rosso metile da parte delle cellule e quindi una maggiore proporzione di cellule vitali.

L'elettroforesi SDS PAGE (figura 1.3.59a) ha dimostrato che all'aumentare della concentrazione dell'ipoclorito di sodio le bande che apparivano ben definite nel caso di sola ricina diventano progressivamente più diffuse e meno definite. Si nota, inoltre, una riduzione di mobilità della proteina per cui risulta che la ricina trattata con il disinfettante ha un peso molecolare apparente maggiore di quella non trattata. La formazione di composti di peso molecolare maggiore può essere causata dalla composizione tra gruppi carbonilici (provenienti dalla decomposizione delle cloroammine prodotta dall'ossidazione degli amino gruppi da parte dell'ipoclorito dei gruppi di amino acidi) e aminogruppi non ossidati. Quando la concentrazione dell'ipoclorito usato per trattare la ricina è stata portata a 10 mM od oltre c'è stata una progressiva perdita dell'intensità delle tracce di argento. Per concentrazioni dell'ipoclorito superiori a 20 mM si riesce a rilevare solamente una piccola quantità di sostanza. Presumibilmente la perdita è causata dall'ossidazione dell'ipoclorito e dalla decomposizione delle ammidi dei peptidi. E' stata, inoltre, analizzata la capacità citotossica della ricina trattata con l'ipoclorito di sodio prendendo spunto dal metodo di Borenfreund e Puerner [1985], utilizzando la reazione da parte delle cellule Hep2 esposte alla ricina (4 µg/ml per 48 ore a 37°C) trattata con concentrazioni crescenti di ipoclorito di sodio. La figura 1.3.59b mostra come la ricina trattata con un minimo di 3 mM di ipoclorito non possiede un'apparente citotossicità in quanto le cellule assumono un colore rosso naturale di intensità simile alle cellule di controllo. La SDS PAGE (figura 1.3.59a) rivela che i campioni aventi residua attività citotossica presentano

ancora bande corrispondenti alle catene della ricina nativa, mentre i campioni che hanno presentato una maggiore diminuzione di tossicità dimostrano una quasi insignificante presenza di bande in questa zona. La tossicità di questi campioni è probabilmente dovuta alla presenza di ricina residua nei campioni trattati con ipoclorito di sodio.

Successivamente è stata effettuata un'analisi per l'identificazione immunologica della ricina trattata attraverso l'ipoclorito attraverso il metodo di Cevenini et al. [1991] opportunamente modificato, in cui a delle cavie vengono somministrate inoculazioni peritoneali di 1 µg di campioni contenenti ricina trattata con concentrazioni di ipoclorito di sodio di 5, 10, 15 e 20 mM. Le analisi Western Blot sulla ricina degradata (1,6 µg/pozzetto) sono state effettuate con il fluido di ascites dei topi così prodotto (figura 1.3.60b) e con anticorpi policlonali di coniglio presenti in commercio fatti reagire con la ricina nativa (figura 1.3.60a). Entrambi i tipi di anticorpi legano con la diffusione dell'alto peso molecolare indotto dall'attività dell'ipoclorito. D'altro canto, i livelli di legame per entrambi diminuiscono delle stesse percentuali all'aumentare della concentrazione di ipoclorito di sodio.

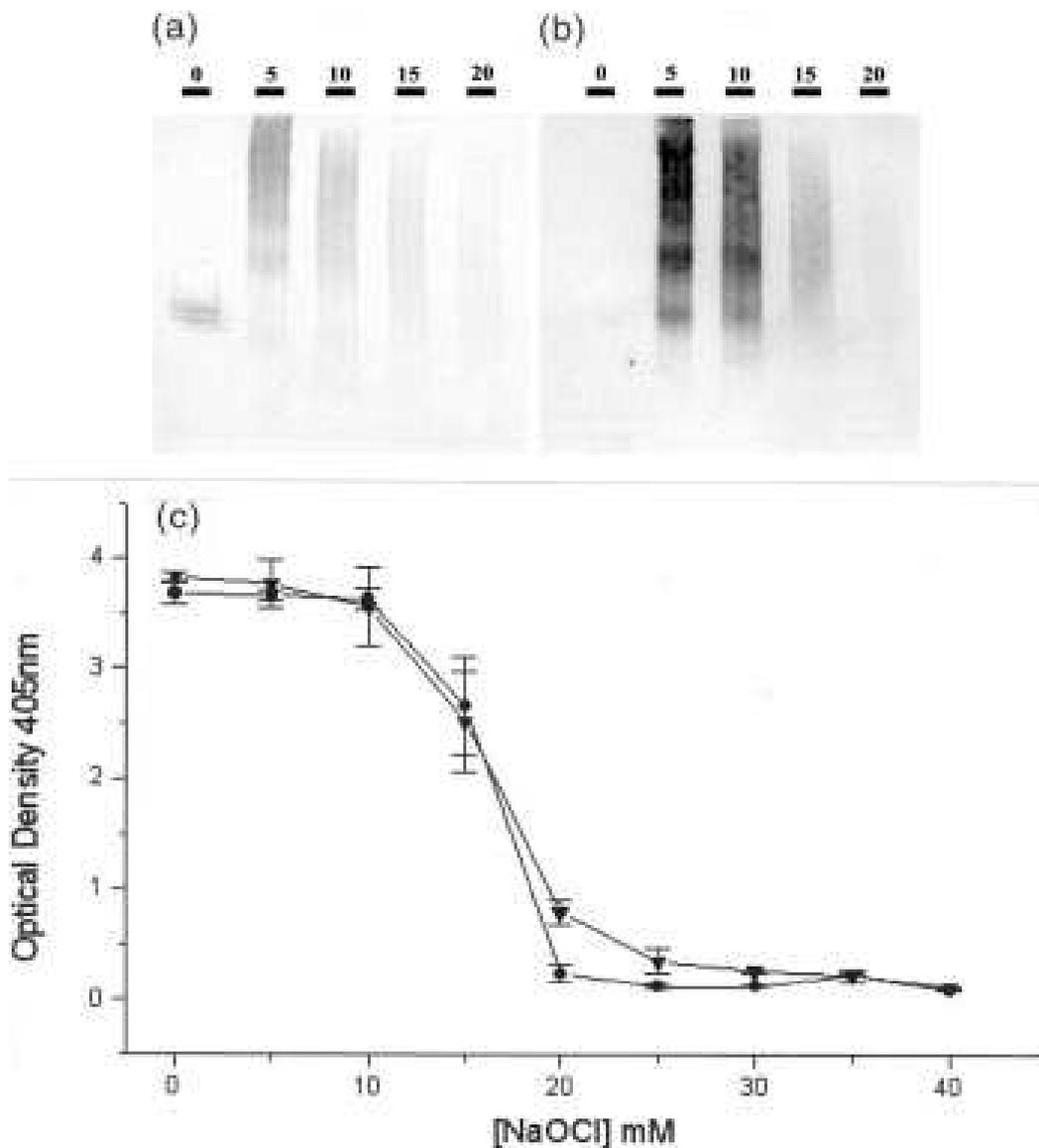


Figura 1.3.60. (a, b) Western Blot e ELISA della ricina degradata. I campioni di ricina ($0,4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) sono state trattate con le concentrazioni indicate di ipoclorito (mM). Sia per il Western Blot che per l'ELISA sono stati utilizzati IgG policlonali anti-ricina di coniglio (diluizione 1:10000) (A e C (▼)) e ascites di topo nei confronti della ricina trattata con NaOCl (diluizione 1:10000) (B e C (●)). I legami degli anticorpi sono stati identificati dal cambiamento cromatico (OD 405 ELISA (C) o direttamente sul filtro Western Blot (A e B) catalizzato dalle fosfatasi alcaline coniugato all'anti rabbit e all'anti mouse

Gli esperimenti di tipo ELISA (figura 1.3.60c) sono state condotte modificando il metodo di Engvall e Perelmann [1971] utilizzando anticorpi monoclonali di topi nei confronti della ricina trattata e anticorpi di coniglio con la ricina nativa per rilevare i campioni di ricina legati direttamente alla superficie del filtro. È stato osservato un livello di sensibilità analogo al Western Blot e anche qui si nota che entrambi gli anticorpi scompaiono quando vengono utilizzate concentrazioni di ipoclorito superiori a 20 mM.

Questi risultati inducono all'ottimismo sulla qualità della disinfezione attraverso l'uso di composti del cloro. Le concentrazioni di ricina e di ipoclorito di sodio prese in esame dallo studio, comparate alle quantità di ipoclorito ed in genere dei disinfettanti costituiti da cloro, inducono a ritenere valida l'azione detossificante del processo. Il solo dubbio che andrà verificato nel prosieguo della ricerca riguarda il tempo di contatto necessario alla detossificazione, che nel caso delle ricerche di Mackinnon et al. è pari a 2 ore, il che potrebbe risultare eccessivo per i nostri sistemi idrici. Infatti, sebbene il tempo di contatto diretto con il disinfettante si limiti a poche decine di minuti, il cloro (definito "residuo") continua ad operare la disinfezione anche all'interno del sistema distributivo, con concentrazioni sempre maggiori di 0,2 mg/l, standard fissato dalla normativa italiana (DPR 31/2001) come valore minimo di cloro libero al rubinetto. Per questi motivi, nel caso venisse confermata la durata efficace di contatto dell'ipoclorito, la clorazione potrebbe non essere efficace in tutti i casi e soprattutto nell'eventualità di contaminazione a valle dell'impianto di trattamento o addirittura all'interno della rete idrica cittadina.

4. Procedura generale per l'individuazione del contaminante e la valutazione della sua concentrazione

La ricerca di una procedura generale per l'individuazione di un contaminante e la valutazione della sua concentrazione ha avuto esito negativo.

Per la Capsicina è stata preliminarmente definita una metodica di identificazione attraverso uno spot test (sali di diiazonio) di tipo colorimetrico. Successivamente si sono applicate le tecniche cromatografiche ad alta precisione (HPLC) per l'identificazione e la quantificazione del contaminante in acqua, individuando il tempo di ritenzione della Capsicina e costruendo la curva area rilevata dal cromatogramma – volume di soluzione iniettato e la curva di calibrazione relativa. Infine, si è valutata l'azione decontaminante del cloro nei confronti della Capsicina, che purtroppo ha dato esito negativo.

Per la Ricina l'analisi ha portato alla definizione di un efficace e rapido processo estrattivo dai semi di ricino, che ha permesso di valutare nell'elettroforesi la metodologia identificativa più efficace per questo agente. L'analisi HPLC, infatti, forse a causa dei residui impuri che i campioni estratti presentavano, si è dimostrata troppo sensibile per operare la separazione della ricina e definire il protocollo sperimentale approntato nel caso della Capsicina. Inoltre si è indicato una metodica di rilevazione istantanea tramite spot test colorimetrico, utilizzando la ninidrina come reagente. Grande rilievo, infine, è stato dato alla individuazione di altre possibili metodologie identificative presenti in letteratura per la Ricina ed alla reattività del contaminante in presenza di composti del cloro. Pur rinviando ad ulteriori verifiche di laboratorio, esso presenta un'efficace interazione con la

tossina, sia perché agisce degradando la sostanza, sia perché riduce in misura notevole la sua attività tossica.

CAPITOLO 2

FENOMENI DI DIFFUSIONE E DISPERSIONE DI UN CONTAMINANTE IN UN SISTEMA IDRICO A PRESSIONE

1. Vulnerabilità di un sistema acquedottistico alla contaminazione intenzionale

La maggiore difficoltà nel difendere un sistema idrico distributivo da una contaminazione intenzionale è nel fatto che esso è in genere molto esteso. Ad esempio, se un contaminante viene iniettato all'interno delle condotte all'estremità della rete con una pressione maggiore di quella di esercizio esso può essere introdotto anche in presenza di un dispositivo di protezione dai “ritorni” in rete. Ufficiali dell'esercito americano credono che questo sia uno dei più probabili metodi che possono essere utilizzati per la contaminazione delle risorse potabili [De Young et al., 2002]. Il Laboratorio di Ricerca di Ingegneria Civile dell'esercito americano (U.S Army Civil Engineer Research Laboratory – CERL) ha condotto una simulazione per dimostrare la vulnerabilità rispetto ad un agente CBR introdotto attraverso un idrante posto alla distanza di mezzo miglio dall'edificio-obiettivo. Lo schema ed i risultati ottenuti sono descritti in figura 2.1.1 [Lory et al.].



*Il livello massimo di concentrazione arriva dopo 9 minuti
La concentrazione massima all'edificio è del 95%*

Fig. 2.1.1 Modello generalizzato di immissione di un contaminante presso un idrante posto ad una distanza di mezzo miglio dall'edificio obiettivo

Gli agenti CBR possono essere introdotti alle fonti di presa dell'acqua grezza, presso gli impianti di trattamento e le strutture di stoccaggio, attraverso sistemi di distribuzione di acqua *on-* o *off-base* o in punti particolari della rete di distribuzione. In tabella 2.1.1 sono stati elencati i potenziali luoghi suscettibili di un attacco terroristico che massimizzerebbero le eventuali conseguenze per l'interruzione del regolare funzionamento del sistema idrico. Un mezzo dotato di sistema di pompaggio (quale un'autopompa dei Vigili del Fuoco) può facilmente vincere la pressione di esercizio di una rete di distribuzione idrica municipale al fine di introdurre agenti contaminanti al suo interno. Allo stesso modo è facilmente ipotizzabile anche l'uso di veicoli come autobotti nel caso di contaminazione a larga scala presso le riserve di acqua.

Potenziali punti di contaminazione	
1	Alle fonti (pozzi, riserve, laghi e fiumi e trasmissione attraverso acquedotti, tunnel, tubazioni, ecc.)
2	Presso gli impianti di trattamento delle acque (processi di coagulazione/flocculazione, letti filtranti, sistema di disinfezione, ecc.)
3	Presso le strutture di stoccaggio (serbatoi, ecc.)
4	Presso i sistemi ausiliari dell'acquedotto (idranti, valvole di <i>blow-off</i> , stazioni di pompaggio, ecc.)
5	Nel sistema idrico interno dell'edificio (tubazioni, serbatoi, sistemi di addolcimento dell'acqua, ecc.)
6	Attraverso attacchi informatici diretti al centro di controllo e supervisione e alla rete di acquisizione dati (strumenti di controllo delle stazioni di pompaggio, filtri, sensori, regolatori di flusso e di pressione)
7	Attraverso connessioni interdipendenti (dosatori di sostanze chimiche, linea elettrica, ecc.)

Tab. 2.1.1 *Potenziali luoghi vulnerabili ad un attacco intenzionale*

L'ERDC dell'esercito statunitense, insieme all'EPA e all'ECBC (Edgewood Chemical Biological Center), ha progettato e costruito un complesso presso l'arsenale di Edgewood nel Maryland col fine di saggiare il comportamento di reali agenti contaminanti CB in una rete di tubazioni di diversa lunghezza. Attraverso questo sistema, chiamato Water Security Research Test Loop (WSRTL), si possono simulare svariati metodi di introduzione di contaminanti

all'interno della rete, avendo a disposizione uno schema flessibile che ha la possibilità di implementare nuovi sensori e componenti di trattamento a seconda delle necessità, un sistema di monitoraggio SCADA attraverso il quale si ha la capacità di controllare i parametri critici e di implementare l'automazione delle misure e una sezione attrezzata per la sostituzione di segmenti di tubazioni in cui possono essere inserite e verificate tratte di condotte utilizzate in linee di distribuzione idrica esistenti. Grazie a questo complesso possono essere provate strategie di decontaminazione prima ancora che vengano adottate dai piani di emergenza da parte dei gestori dei sistemi idrici [Ginsberg et al., 2004].

Un'appropriata risposta alla potenziale minaccia di attacchi e sabotaggi è sicuramente un insieme di misure che comportino il rinnovamento dei sistemi idrici. Negli Stati Uniti è stata documentata una crescita percentuale di 9 punti nei consumi civili di acqua nei soli anni '90, valore che si assesta sull'80% se si va a considerare il periodo dal 1950 ad oggi. Inoltre, le previsioni che riguardano il numero di utenti degli acquedotti americani dovrebbe passare dai 270 milioni del 2000 a più di 390 milioni nel 2050. A riguardo un recente rapporto federale stima in circa 250 miliardi di dollari la spesa da sostenere nei prossimi 30 anni per la sola sostituzione delle componenti usurate. Questa somma non comprende il costo di rinnovamento della struttura di distribuzione associato ad un possibile innalzamento degli standard qualitativi delle acque erogate e dei livelli di sicurezza. Il Water Infrastructure Network ha pubblicato uno studio in cui si è calcolato che saranno necessari 23 miliardi di dollari l'anno per il prossimo ventennio solo per mantenere inalterati gli standard qualitativi [De Young et al., 2002].

L'attuale ed urgente problema della sicurezza può catalizzare gli sforzi dei governi verso un rinnovamento delle strutture acquedottistiche. Nel caso in cui i sistemi siano ricostruiti o aggiornati il fattore di prevenzione e la valutazione del calcolo del rischio e della vulnerabilità possono entrare come parti integranti del progetto sin dalla fase preliminare. L'obiettivo da perseguire con una priorità più alta è l'adozione di misure di sicurezza a basso costo in modo tale che tali interventi non vadano a sottrarre risorse al rinnovamento dell'infrastruttura base.

In generale possiamo suddividere le contromisure primarie in tre tipologie diverse:

1. evitare la contaminazione attraverso l'adozione di componenti di protezione alle strutture;
2. utilizzare strumenti e tecniche di rilevazione, misura e identificazione dei contaminanti CBR;
3. implementare i trattamenti delle acque considerando anche la loro efficacia nei confronti dei contaminanti (ad es. la filtrazione e le tecniche disinfettive).

Spesso in verità non c'è la necessità di partire da zero in questo campo, poiché tutti i sistemi idrici di maggiore entità e molti minori hanno implementato o stanno predisponendo piani di risposta alle emergenze, anche se gran parte di questi protocolli prevedono solamente sversamenti accidentali o disastri naturali tra le cause di una possibile contaminazione. Perciò l'analisi della contaminazione intenzionale è sicuramente un altro dei più importanti obiettivi da tenere in agenda per adeguarsi alla crescente minaccia.

Protezione delle strutture

Al fine di valutare i punti della rete più esposti a potenziali attacchi è indispensabile prendere in esame le componenti fisiche e di processo del sistema idrico:

- ⊗ Opere costituenti il sistema;
- ⊗ Procedure operative;
- ⊗ Processi di trattamento;
- ⊗ Metodologie e capacità di accumulo;
- ⊗ Uso e stoccaggio delle sostanze chimiche;
- ⊗ Sistema di distribuzione;
- ⊗ Sistema informatico e di telecontrollo/telemisura.

Quest'analisi sintetica e strategica deve essere fatta andando a valutare per ogni singolo settore del sistema le dipendenze dagli altri componenti, le preesistenti misure protettive, i protocolli previsti nei piani di manutenzione straordinaria in caso di interruzione o rottura. In questo modo sarà possibile valutare in ogni punto dell'infrastruttura idrica il valore di criticità e di vulnerabilità esistente e le potenzialità di un eventuale attacco mirato ad esso. Successivamente potranno essere prese in esame le opportune misure preventive in base al rischio e alla vulnerabilità esistente.

Sistemi di monitoraggio rapido dei contaminanti

Uno degli approcci più efficaci per evitare o mitigare gli impatti della contaminazione in un sistema di distribuzione idrico è di adottare un **sistema di monitoraggio rapido (Early Warning System – EWS)**. La finalità di un sistema di questo tipo è di identificare in maniera attendibile gli eventi di contaminazione nell'acqua presente nella rete idrica o alla fonte in un tempo tale da permettere una risposta locale efficace che possa ridurre o scongiurare totalmente gli effetti negativi che possono realizzarsi.

Benché i sistemi di monitoraggio rapido siano frequentemente considerati equivalenti alla strumentazione di monitoraggio utilizzata per riconoscere i contaminanti in acqua, un reale EWS è in realtà un sistema integrato per gestire la tecnologia di monitoraggio, analizzare e interpretare i risultati e utilizzare quest'ultimi per prendere decisioni al fine di proteggere la salute pubblica, minimizzando falsi allarmi e inconvenienti all'interno di una comunità. Idealmente un EWS dovrebbe essere parte integrante del sistema idrico. Esso, difatti, dovrebbe essere capace di rilevare non solo la contaminazione intenzionale ma anche tutti quei contaminanti che possano introdursi accidentalmente all'interno delle condotte (ritorni in rete).

Un recente studio della American Water Works Association Research Foundation (AWWARF) ha determinato le cinque componenti fondamentali da cui un sistema di monitoraggio rapido dovrebbe essere composto:

1. Un meccanismo di rilevazione della presenza di un contaminante nell'acqua distribuita;

2. Un mezzo per confermare la presenza del contaminante, determinare la sua natura e intensità (concentrazione) e stimare il tempo in cui esso può raggiungere l'utenza finale;
3. Sistemi di comunicazione per trasferire informazioni relative alla contaminazione;
4. Vari meccanismi per rispondere alla presenza della contaminazione nell'acqua distribuita al fine di mitigare gli effetti nei confronti dell'utenza;
5. Una struttura istituzionale, generalmente costituita da una unità centralizzata di coordinamento degli sforzi relativi alla gestione dell'evento.

Sul mercato e in letteratura esistono numerose tecnologie e sistemi, ma in linea generale si possono sintetizzare le caratteristiche tecniche di un EWS in questi punti:

- Produrre allarmi in un tempo sufficiente per la risposta;
- Avere un costo accessibile;
- Richiedere un basso livello di addestramento e esperienza;
- Coprire tutti i potenziali pericoli;
- Identificare la fonte della contaminazione;
- Dimostrare sensibilità nei confronti delle variazioni di qualità;
- Dare il minimo numero di false risposte positive e negative;
- Avere robustezza;
- Permettere operazioni attraverso il controllo remoto;

- Essere longevo.

Allo stato attuale un EWS con tutte le caratteristiche esposte non esiste. Esistono, però, le tecnologie adatte per assemblare un sistema di questo genere, che possa assicurare determinati punti chiave come la rapidità di risposta, la possibilità di controllare un sostanzioso numero di contaminanti mantenendo nel contempo la sensibilità e la capacità di funzionare come un sistema automatico controllabile da remoto. Queste possono essere considerate le caratteristiche minime affinché un sistema possa essere considerato effettivamente un EWS. Sebbene molta importanza sia da dare a questi tre punti, gli altri che sono stati sopra menzionati non possono essere ignorati nel progetto di un EWS. Ad esempio, deve essere data grande considerazione all'affidabilità del sistema in termini di ricorrenze nelle false risposte positive/negative e alla sensibilità del metodo nell'interpretazione dei risultati. Successivamente il progetto deve includere l'analisi dei costi strutturali e delle tecnologie adottate e delle analisi necessarie.

Il progetto di un EWS, quindi, non è semplice in quanto esiste una grande variabilità di costi e tecnologie. Sommariamente possiamo ricapitolare i principali elementi da considerare nella fase progettuale:

Pianificazione e comunicazione. Prima di affrontare un programma di monitoraggio rapido devono essere definiti chiaramente gli obiettivi del programma e si deve sviluppare un protocollo per l'interpretazione, l'utilizzo e la comunicazione dei risultati. Inoltre il programma dovrebbe essere sviluppato in sinergia con il gestore, le agenzie sanitarie locali e regionali, le unità di emergenza, i corpi di polizia e le strutture politiche locali.

Caratterizzazione del sistema. Il primo passo della progettazione è la completa caratterizzazione del sistema da monitorare, da sviluppare ponendo in rilievo i punti di accesso, l'andamento della disponibilità e della richiesta d'acqua, l'andamento delle pressioni all'interno della rete. Nel caso in cui non fosse già disponibile, è necessario approntare un modello idraulico di simulazione del funzionamento delle infrastrutture. Infine devono essere identificate e classificate le vulnerabilità del sistema. La comprensione di ciascuna di queste caratteristiche rappresenta la base del progetto e dello sviluppo di un EWS.

Contaminanti. Un EWS ideale dovrebbe essere in grado di monitorare tutti i potenziali contaminanti. Ma anche il più complesso sistema di monitoraggio non può coprire tutto lo spettro degli agenti che possono rappresentare pericolo per la salute pubblica se presenti in acqua. Detto ciò, il progetto di un EWS dovrebbe concentrarsi sui contaminanti che possono porre le maggiori minacce. Ci sono diverse valutazioni da fare in questa fase: la concentrazione tossica minima del contaminante, la disponibilità e l'accessibilità, la persistenza e la stabilità in soluzione acquosa e le difficoltà di rilevazione in acqua. Inoltre sono da considerare anche le vulnerabilità del sistema e la capacità dei processi di trattamento delle acque di neutralizzare o rimuovere lo specifico agente.

La sfida che ci si trova ad affrontare nel progettare un sistema di monitoraggio rapido è riuscire a bilanciare la funzione di indagine (cioè la possibilità di affrontare il maggior numero di agenti) e la sua specificità (cioè la capacità di identificare e quantificare un dato contaminante). Un approccio che può risolvere questi obiettivi contrapposti è l'adozione di **un sistema di monitoraggio gerarchizzato**. In una metodica di questo tipo a due livelli, il primo provvede ad

un monitoraggio continuo in tempo reale per un vasto campo di potenziali contaminanti, utilizzando tecnologie di analisi ad ampio raggio capaci di rilevare cambiamenti nella tossicità presente in acqua. Un risultato positivo dal primo livello attiva una serie di analisi specifiche di maggiore sensibilità che, se positive anche dopo le analisi di conferma, possono avviare il protocollo di risposta.

E' da sottolineare che un EWS efficacemente progettato dovrebbe includere tutti gli elementi di un programma di monitoraggio necessari per informare delle decisioni gli enti interessati. Infine devono essere adottate nel progetto preliminare tutte le analisi di conferma successive alle analisi automatiche e la modellazione idraulica o gli studi sul posizionamento dei punti di analisi.

Scelta della tecnologia EWS. Una volta che i contaminanti-obiettivo sono stati determinati, si rende necessario selezionare una tecnologia di monitoraggio per lo specifico contaminante o per una classe di essi, capace di interfacciarsi a complesse matrici acquose. Ciò può richiedere una fase di estrazione per rimuovere il materiale dalla matrice acquosa e/o una fase di concentrazione della soluzione per aumentare la rilevazione e la quantificazione. Sebbene varie tecniche per isolare, concentrare e purificare sostanze chimiche e biologiche siano state sviluppate per metodologie di laboratorio, esse potrebbero non essere adatte ad indagini di campo da parte di questi componenti. Perciò la scelta tecnologica va fatta anche in considerazione della necessaria correttezza di tutte le operazioni. Il passo successivo all'identificazione della tecnologia adatta ai processi di campo previsti è la valutazione degli obiettivi di qualità dei dati che devono essere stabiliti in fase progettuale: specificità, sensibilità, accuratezza e precisione, oltre alle percentuali di false risposte positive e negative.

Se la tecnologia destinata al monitoraggio non fosse capace di raggiungere gli obiettivi premessi, sarà necessario che venga sostituita con una più adeguata. Se, però, non fosse possibile identificare alcuna tecnologia adatta agli scopi, sarebbe a questo punto necessario ripensare la possibilità di adottare un sistema di monitoraggio rapido o, in alternativa, gli obiettivi in termini di risultato dovranno essere rivisti.

Livello di allarme e risposta. Una volta che la tecnologia dell'EWS sia stata definita, è necessario identificare le concentrazioni per le quali gli agenti contaminanti costituiscono un rischio per la salute degli utenti, in modo tale da identificare quali livelli di allarme del sistema. Le fondamenta su cui si basa la scelta dei livelli di allarme dipenderà dalle caratteristiche e dalla qualità dell'EWS progettato. Si vuole segnalare, inoltre, che l'allarme deve derivare dalla combinazione di diversi eventi e non da una singola rilevazione che può portare ad un falso positivo. Quando un sistema di monitoraggio rapido produce un allarme sono possibili molteplici risposte: le risposte possono includere modifiche al sistema di distribuzione idrica (ad es. sospensione del servizio, aggiunta di disinfettante, ecc.), notifiche sia all'intera comunità sia alle singole utenze interessate, raccolta o monitoraggio ulteriore di dati, richieste di sorveglianza e studi epidemiologici, semplicemente l'assenza di azioni o una combinazione di questi. Il tipo di risposta adottata dipende evidentemente dall'entità del pericolo e dalla natura del sistema idrico, compreso il tipo di utenza servita. In presenza di un sistema EWS la credibilità della minaccia può essere giudicata dalle performance dell'EWS stesso nel caso in cui esso sia affidabile nell'identificazione dei contaminanti interessati. In aggiunta potrebbe accadere

che i rappresentanti delle agenzie di protezione civile e sanitarie possano intervenire nel giudizio sulla pericolosità della situazione. Se un falso positivo porta alla decisione di consigliare la popolazione di interrompere l'utilizzo del servizio idrico, ciò potrebbe inficiare sia la salute pubblica che la fiducia della gente.

Comportamento e trasporto di agenti patogeni e chimici. Gli agenti biologici e chimici possono avere comportamenti molto vari durante il trasporto all'interno del sistema idrico. La loro concentrazione e le loro caratteristiche possono essere influenzate da molti fattori, quali le condizioni ambientali, la presenza di ossidanti o delle sostanze chimiche utilizzate nei trattamenti delle acque. Se esistono informazioni sulle caratteristiche degli agenti che influenzano il loro comportamento e trasporto, esso dovrebbe essere considerato nella progettazione dell'EWS. Ad esempio, nel caso in cui un contaminante subisca una degradazione per la presenza di una certa concentrazione di cloro libero, potrebbe essere possibile utilizzare un modello idraulico qualitativo della rete idrica per prevedere il profilo di concentrazione all'interno del sistema. Questa informazione, a sua volta, potrebbe essere usata per progettare l'EWS e la posizione ottimale dei sensori.

Posizionamento e densità dei sensori. La posizione e la densità dei sensori in un EWS è dettata dai risultati della caratterizzazione del sistema, dal riconoscimento delle vulnerabilità, dalle analisi di rischio e dalle considerazioni sul suo utilizzo. La grandezza, la complessità e la natura dinamica dei sistemi di distribuzione complicano la scelta del posizionamento. La caratterizzazione della rete distributiva, inclusa la zonizzazione di utilizzo e l'individuazione dei nodi critici

(ad es. ospedali, agenzie di sicurezza e di protezione civile, istituzioni governative, ecc.) è necessaria per permettere un efficace progetto della rete di monitoraggio. A causa, come sopra detto, della complessità e della natura dinamica di un sistema idrico, si rende utile lo sviluppo di un modello idraulico in modo da aiutare nella scelta del posizionamento dei sensori. Anche se, però, la posizione dei sensori dovesse risultare ottimale all'interno della rete, potrebbe non esserci sufficiente tempo per evitare che la contaminazione colpisca una parte dell'utenza. Nel miglior caso il monitoraggio può dare il tempo per limitare l'esposizione, isolare l'acqua contaminata e dare il via alle azioni di mitigazione e rimedio.

Gestione e interpretazione dei dati. L'infrastruttura informatica di un medio-grande sistema idrico comprende generalmente i sistemi di gestione finanziaria, di gestione delle risorse umane, di gestione delle informazioni dei laboratori, di gestione della manutenzione automatica, di acquisizione dati e controllo (SCADA), ecc. I primi quattro di questi sono considerati parte dell'infrastruttura di tecnologia informatica del servizio utilizzata dagli uffici informatici dei gestori con cicli di 8-10 ore. Un attacco informatico a queste componenti (ad es. un attacco da un singolo computer ad un singolo computer della rete informatica che determini l'accesso a informazioni riservate o che mini la sua integrità) potrebbe essere la causa di danni economici o dell'interruzione di procedure interne, ma non è credibile che possa determinare la sospensione del servizio di distribuzione idrica. D'altro canto, un attacco robusto al sistema SCADA potrebbe causare un immediato e grave impatto sulle funzionalità dell'intero sistema.

Uno dei problemi relativi alla gestione dei dati di un sistema continuo di monitoraggio è l'accumulo di un'ingente quantità di dati generati. L'utilizzo di software di acquisizione dati ed un centro di gestione dati dà luogo ad una certa complessità. Ciò significa che ciascun sensore implementato nel sistema di monitoraggio deve essere dotato di trasmettenti, modem, cablaggio o qualunque altro metodo adatto alla trasmissione dei dati al sistema di gestione dati. Inoltre il sistema adottato deve necessariamente avere un modulo di analisi dei dati, in modo da riconoscere se le informazioni sono congruenti o meno ai livelli di allarme previsti. Si preferisce usare a questo scopo dei sistemi detti "intelligenti" che riescono a minimizzare la possibilità di falsi allarmi distinguendo le escursioni verosimili dal "rumore" dei dati.

Un'ulteriore decisione va presa a proposito delle azioni previste nel caso in cui il sistema di gestione e interpretazione dei dati riconosca un'escursione dei valori al di sopra della soglia di allarme. Ad un livello minimo, il sistema dovrebbe informare gli operatori, le agenzie sanitarie pubbliche e/o i corpi di protezione e sicurezza civile. Se possibile, sarebbe utile effettuare comunicazioni ridondanti (ad es. attraverso diverse modalità di trasmissioni dati come fax, email, ecc.). In alcuni casi sarebbe appropriato programmare il sistema gestionale al fine di automatizzare una serie di risposte preliminari, come la chiusura di valvole o l'avvio di analisi supplementari. In ogni caso questo tipo di risposte preliminari vanno considerate esclusivamente come misure precauzionali mentre le vere decisioni sono demandate ai responsabili dell'emergenza [Hasan et al., 2004].

Altri sistemi di monitoraggio dei contaminanti

In Inghilterra è stato messo a punto un sistema di monitoraggio delle aste del River Trent, mirando a definire la posizione ottimale delle stazioni di monitoraggio lungo il corso del fiume ed una procedura analitica standard in grado di fornire dati operativi che, in tempo reale, diano un quadro della qualità del corso d'acqua. In questo modo, avendo dei dati rilevati in continuo, si può intervenire prontamente allorché si verificano delle anomalie dei valori.

Strumenti utilizzati per l'analisi automatica on-line

Il sistema di monitoraggio multi-parametrico in presa è stato sviluppato in maniera tale da misurare le variazioni dei parametri che definiscono la qualità. I parametri letti da questo sistema sono in genere il pH, l'ammoniaca, la conducibilità, la torbidità, la temperatura ed i nitrati. Inoltre si può determinare la presenza di olii in superficie, tramite un rilevatore che lavora nel campo infrarosso.

Il sistema di monitoraggio delle sostanze organiche è stato sviluppato nel 1994. Questo sistema si basa sull'utilizzo di LC e può essere programmato per l'identificazione di 40 sostanze pericolose (tab. 2.1.2), con limiti di rilevabilità di $1\mu\text{g/l}$.

Carbendazim	Bromacil	Terburyn
Dimethoate	Metoxuron	Chloridazon
Benzothiazole	Atrazine *	Aldicarb
2-Nitrophenol	Isoproturon *	Cyanazine
Chlorotoluron *	Propazine	Simazine *
Diuron	2,4-Dichlorophenol *	Monolinuron
Metazachlor	MCPB *	Metobromuron
Linuron	2,4-DB *	Warfarin
Sebuthylazine	2,4,6-TCP *	Terbuthylazine
Chlorobromuron	3,3'-Dichlorobenzidine	2,4,5-Trichloroaniline
Dinoseb	Prometryn	Alachlor
Phoxim	Barban	Pentachlorophenol *
Metamitron	Dinoterb	Trifluralin
2,6-Dimethylaniline		

Tab. 2.1.2

**composti utilizzati per la calibrazione degli strumenti.*

Il sistema SAMOS LC (System for the Automated Monitoring of Organic Substances in surface water using Liquid Chromatography) rileva anche la presenza di altri composti non elencati nella tabella 2.1.2, con la seguente procedura: inizialmente si concentra la sostanza con una filtro-membrana; in seguito, tramite eluizione, si analizza la sostanza in un'HPLC; se il composto analizzato risulta sconosciuto, si invia il tutto ad un laboratorio di ricerca.

Questo sistema è stato ulteriormente modificato per l'identificazione di acidi diserbanti e composti fenolici che si sono aggiunti alla lista delle sostanze pericolose. Tale monitoraggio richiede campioni filtrati sovrapponendo 2 filtri a diversa magliatura e analizzando singolarmente le sostanze (estraendole tramite eluizione) che si depositano sulle due cartine tramite tecniche cromatografiche. Il limite di rilevabilità per queste sostanze è di circa 1µg/l.

Monitoraggio Aquascan

È un sistema di monitoraggio tramite GC che utilizza come gas di trasporto l'Argon. Tramite questo sistema si identificano i composti organici volatili. Le sostanze rilevabili tramite questa tecnica sono riportate in tab 2.1.3.

Dichloromethane	Benzene *	Ethylbenzene
1,1-Dichloroethane	Trichloroethylene *	meta-Xylene
Chloroform *	Dichlorobromomethane	para-Xylene *
1,1,1-Trichloroethane	Toluene *	ortho-Xylene *
Carbon Tetrachloride	Tetrachloroethylene *	Styrene
1,2-Dichloroethane	Chlorodibromomethane	Bromoform

Tab. 2.1.3

**composti utilizzati per la calibrazione degli strumenti.*

Oltre a questi sistemi in continuo, si è pensato anche a delle indagini che richiedono la presenza di maestranza specializzata nelle stazioni di monitoraggio, come quelle che si basano sull'analisi olfattiva dell'acqua (bypassata e portata a 60°C).

Una combinazione di sistemi di monitoraggio in continuo, eventuali analisi di laboratorio e rilevazione anche da parte degli operatori in sito, consentono una riduzione del rischio di contaminazione. In questo caso si è fatto riferimento ad un corso d'acqua, ma il problema è in sostanza analogo a quello di una rete idrica [Drage et al, 1998].

Un esempio di come può essere effettuato il monitoraggio di una rete idrica è fornito da Lee et al [1992], suggerendo una rotazione della stazione di campionamento nei vari nodi della rete.

Efficacia delle tecniche di trattamento delle acque

La maggiore difficoltà nella gestione del rischio è la prevenzione delle vulnerabilità. In questo campo assume grande importanza **la valutazione del livello di prevenzione presente nel sistema**. Nel campo delle risorse idropotabili questa funzione è demandata alla fase di trattamento e disinfezione delle acque, che può comprendere una varietà di trattamenti. Le ricerche in tal senso stanno conducendo alla definizione dei rapporti tra i contaminanti e le tecniche decontaminanti ad oggi già presenti negli impianti di potabilizzazione e trattamento, ma le incertezze sono ancora notevoli. Ciò è dovuto anche al grande numero di agenti riconosciuti quali potenzialmente pericolosi ed alla stessa incertezza nel chiarire l'intera gamma delle possibili cause di contaminazione. Nella tabella 2.1.4 si è cercato di assegnare a ciascuno dei processi di cui può essere composto un ciclo di trattamento delle acque una valutazione orientata sulla sua efficienza nella rimozione delle principali categorie contaminanti. Un'analisi di questo tipo è utile nella definizione delle possibili misure correttive applicabili.

[Lory et al.]

	Agenti chimici	Batteri	Spore	Virus	Protozoi	Cisti e Oocisti	Biotossine	Ag. radiologici
<i>Strippaggio, aerazione</i>	VS	S	S	S	S	S	S	S
<i>Coagulazione Sedimentazione Filtrazione</i>	S	B-E	B-E	B-E	B-E	B	S	B
<i>Carboni Attivi</i>	B*	D	D	D	D	D	VS	S
<i>Microfiltrazione</i>	S	E	E	S	E	E		E**
<i>Addolcimento</i>	VS	B-E	I	B-E	B-E			S
<i>Scambio Ionico</i>	S	S	S	S	S	S	S	E
<i>Osmosi inversa</i>	E	E	E	E	E	E	E	E**
<i>Ultra Filtrazione</i>	S	E	E	E	E	E		E**
<i>Disinfezione (Cloro)</i>	VS	E		E		S	VS	S
<i>Disinfezione (Ozono)</i>	VS	E		E				S
<i>Disinfezione (UV)</i>	I	E		E	E			S

NOTE: S – Scarsa (0-20% rimosso) VS – Variazioni significative
D – Discreta (20-60%) I – Dati insufficienti
B – Buona (60-90%) * - Richiede pretrattamenti
E – Eccellente (90-100%) ** - Particelle rimosse

Tab. 2.1.4 Efficienza relativa di rimozione di agenti contaminanti delle tecniche di trattamento delle acque potabili

Dalla lettura della tabella si può notare come nessuno dei trattamenti può rimuovere l'insieme di agenti CBR. Solo il processo di osmosi inversa riesce ad assicurare un alto livello di sicurezza: pur se bisogna sottolineare che questa ricerca non ha preso in considerazione l'intero numero di possibili contaminanti, si può comunque osservare come essa sia la sola tecnica che riesca ad operare in tutte le classi considerate. Ci sono, infatti, alcuni contaminanti che resistono anche ad alte concentrazioni di cloro e che quindi rendono inutile una disinfezione con tali composti. La ricerca in tal senso è ancora insufficiente per avere un quadro completo del comportamento dei singoli agenti in presenza dei processi di purificazione delle acque ad uso potabile. Riportiamo le informazioni disponibili sull'efficacia dei composti utilizzati nella fase di disinfezione delle acque in relazione agli agenti contaminanti CB più rappresentativi [Burrows et al., 1998]:

Antrace: La forma vegetativa del *B. anthracis* è inattivata al 99,2% con concentrazioni di 5 mg/l di FAC (cloro attivo libero), con tempo di contatto di 20 minuti e a temperatura ambiente. La spora è invece altamente resistente e viene rimossa dal cloro o dalla formaldeide solo su superfici contaminate.

Botulino: Questa tossina è resa inattiva da 3 mg/l di FAC in 20 minuti con un'efficacia maggiore del 99,7%. Nel caso della disinfezione con cloro si arriva all'84% con 0,4 mg/l di FAC in 20 minuti.

Brucella: è inattivata da ipoclorito di sodio all'1% ma non esistono informazioni sul comportamento dell'agente in condizioni disinfettive nei trattamenti delle acque.

Colera: *V. cholerae* è facilmente distrutto dal cloro ed è virtualmente assente in tutti i sistemi che adottano sistemi di disinfezione.

Febbre emorragica virale (VHF): La gran parte dei virus VHF sono rimossi da percentuali di ipoclorito di sodio dell'1-2% e/o iodio all'1%. Purtroppo non esistono riferimenti sul comportamento di tali agenti in condizioni comuni di disinfezione delle acque.

Salmonellosi: dall'introduzione dei trattamenti con cloro negli impianti di potabilizzazione questo agente è praticamente scomparso. *S. typhimurium* viene inattivato con un'efficacia del 99,9% dopo una radiazione UV a 15,2 mW sec/cm² a 253,7 nm.

Saxitoxina: La saxitoxina è insensibile ad esposizioni di FAC in concentrazioni di 10 mg/l per 20 minuti, mentre in presenza di 100 mg/l di FAC la sua rimozione ha un'efficacia maggiore del 99%. Non risultano effetti da parte dello iodio in concentrazioni fino a 16 mg/l.

Tularemia: *Francisella tularensis* viene inattivata al 99,6-100% da concentrazioni di 0,5-1,0 mg/l di FAC a 10°C e pH 7 in circa 7 minuti. Altri studi invece hanno mostrato l'inefficacia del cloro (0,5-2,0 mg/l) nei confronti della tularemia.

Vaiolo: Questo virus è reso inattivo dall'ipoclorito di sodio all'1%, ma è sconosciuta la sua tolleranza nei confronti dell'ipoclorito in condizioni di disinfezione.

Virus enterici: L'efficacia riportata in letteratura, pari al 99% a 5°C da parte del cloro in concentrazioni di 0,01-0,5 mg/l, lascia supporre che i comuni processi di disinfezione riescano a fronteggiare questa categoria virale.

2. Il software EPANET

In pratica si è ritenuto opportuno esaminare con riferimento ad una rete idrica reale, le possibili conseguenze di una contaminazione intenzionale, effettuata con un generico contaminante. Le simulazioni quali-quantitative sono state effettuate utilizzando il software EPANET che all'uopo viene preliminarmente e sinteticamente descritto.

EPANET è un programma realizzato dall'Agenzia per la Protezione dell'Ambiente (EPA) degli Stati Uniti d'America. La versione utilizzata nella Tesi è la numero 2.0 sviluppata dalla Divisione Water Supply and Water Resources del National Risk Management Research Laboratory di Cincinnati – Ohio. EPANET lavora in ambiente Windows ed è liberamente scaricabile dal sito internet dell'EPA.

EPANET permette di effettuare simulazioni di reti idrauliche in pressione con riferimento sia ai fenomeni idraulici che alla qualità dell'acqua. Le capacità di EPANET rappresentano lo stato dell'arte nell'idraulica e comprendono:

- Reti di dimensioni illimitate.
- Utilizzo delle formule di Hazen-Williams, Darcy-Weisbach o Chezy-Manning per il calcolo delle perdite di carico indotte dalle resistenze al moto.
- Calcolo di perdite di carico concentrate.
- Velocità delle pompe costante o variabile.
- Calcolo di consumi energetici e costi di pompaggio.
- Modellazione di svariati tipi di valvole.
- Serbatoi di stoccaggio di qualsiasi forma.
- Richieste d'acqua ai nodi di varie tipologie, comprese quelle variabili nel tempo.
- Può basare le operazioni del sistema sia sul livello del serbatoio che con un timer.

Il modello di simulazione idraulica di EPANET computa i carichi ai nodi e le portate sui tratti per un fissato set di livelli dei serbatoi, di livelli degli invasi e di

domande idriche in una successione di punti nel tempo. Da uno step al successivo i livelli degli invasi e le domande ai nodi sono aggiornati secondo i prescritti andamenti temporali mentre i livelli nei serbatoi sono aggiornati con riferimento alla portata corrente. L'output dei carichi nei nodi e delle portate nei tratti al variare del tempo viene desunto dalla risoluzione del set di equazioni della conservazione della portata in ogni nodo e delle resistenze al moto in ogni tratto della rete. Questo processo, conosciuto come bilancio idraulico, richiede una tecnica iterativa per la risoluzione delle equazioni non lineari coinvolte. EPANET a tale scopo utilizza l'algoritmo del gradiente, così chiamato da Todini e Pilati (1987) e successivamente da Salgado et al. (1988).

Il Metodo del Gradiente

Assumiamo di avere una rete con N nodi e NF vincoli, la relazione tra portata e perdite di carico per un tratto tra i nodi i e j può essere scritta come:

$$H_i - H_j = h_{ij} = r (Q_{ij})^n + m (Q_{ij})^2 \quad \text{EQ. 2.2.1}$$

in cui H è il carico al nodo, h è la perdita di carico, r è il coefficiente di resistenza, Q è la portata, n è l'esponente della portata e m il coefficiente delle perdite minori. Il valore del coefficiente di resistenza dipende dalla formula utilizzata per il calcolo delle perdite di carico indotte dalle resistenze al moto. Per i gruppi di sollevamento le perdite di carico possono essere rappresentate da una legge del tipo:

$$h_{ij} = -\omega^2 (h_0 - r (Q_{ij} / \omega)^n)$$

dove h_0 è il carico di shutoff della pompa, ω è la velocità relativa settata, e r e n sono i coefficienti della curva caratteristica della pompa.

Il secondo set di equazioni da soddisfare è quello della continuità delle portate nei nodi:

$$\sum_j Q_{ij} - D_i = 0 \quad \text{per } i=1, \dots, N \quad \text{EQ. 2.2.2}$$

in cui D_i è la domanda di portata al nodo i (per convenzione la portata entrante in un nodo è assunta positiva). Per un set di carichi conosciuti ai nodi fissati, occorre individuare una soluzione per tutte le H_i e Q_{ij} che soddisfi le equazioni 2.2.1 e 2.2.2.

Il Metodo del Gradiente inizia con una prima stima di tentativo delle portate in ogni tratto che potrebbe anche non soddisfare le equazioni di continuità. Ad ogni

iterazione del metodo, i nuovi carichi ai nodi sono trovati risolvendo la seguente equazione matriciale:

$$AH=F \quad \text{EQ. 2.2.3}$$

in cui $A=an(N \times N)$ è la matrice Jacobiana, $H=an(N \times 1)$ è un vettore di carichi incogniti ai nodi e $F=an(N \times 1)$ è un vettore di elementi del lato destro. Gli elementi della diagonale della matrice jacobiana sono: $A_{ij} = \sum_j p_{ij}$ mentre gli elementi non nulli non della diagonale sono: $A_{ij} = -p_{ij}$ in cui p_{ij} è la derivata dell'inverso delle perdite di carico nel tratto tra i nodi i e j rispetto alla portata. Per i tubi $p_{ij} = 1 / (nr |Q_{ij}|^{n-1} + 2m |Q_{ij}|)$ mentre per le pompe $p_{ij} = 1 / (n \omega^2 r (Q_{ij} / \omega)^{n-1})$. Ogni elemento del lato destro consiste nel bilancio netto della portata al nodo più il seguente fattore correttivo: $F_i = (\sum_j Q_{ij} - D_i) + \sum_j y_{ij} + \sum_f p_{if} H_f$ dove l'ultimo termine si applica ad ogni tratto che collega il nodo i ad un fissato nodo f ed il fattore correttivo per la portata è $y_{ij} = p_{ij} (r|Q_{ij}|^n + m|Q_{ij}|^2) \text{sgn}(Q_{ij})$ per i tubi, e $y_{ij} = -p_{ij} \omega^2 (h_0 - r(Q_{ij}/\omega)^n)$ per le pompe; dove $\text{sgn}(x)$ è 1 se $x > 0$ altrimenti vale -1 . Dopo che i nuovi valori dei carichi sono stati computati risolvendo l'equazione 2.2.3, i nuovi valori delle portate sono desunti mediante le equazioni:

$$Q_{ij} = Q_{ij} - (y_{ij} - p_{ij} (H_i - H_j)) \quad \text{EQ. 2.2.4}$$

Se la somma delle portate assolute cambia relativamente alla portata totale in tutti i tratti più di una tolleranza fissata, allora le equazioni 2.2.3 e 2.2.4 sono risolte una volta ancora. La formula di aggiornamento della portata (EQ 2.2.4) risulta sempre nella continuità della portata attorno ad ogni nodo dopo la prima iterazione.

EPANET implementa il metodo del Gradiente attraverso i seguenti passaggi:

1. Il sistema lineare di equazioni 2.2.3 è risolto utilizzando il metodo della matrice rada basato su una riorganizzazione dei nodi (George e Liu, 1981). Dopo aver riordinato i nodi per minimizzare la quantità di tappabuchi per la matrice A , viene effettuata una fattorizzazione simbolica così che solo gli elementi non nulli di A necessitano di essere conservati in memoria. Per simulazioni su periodi prolungati questa riorganizzazione e fattorizzazione è effettuata solo una volta all'inizio dell'analisi.

2. Per la prima iterazione, la portata in un tratto è scelta uguale alla velocità corrispondente ad 1 ft/s, mentre la portata attraverso una pompa è assunta uguale alla portata di progetto della pompa in oggetto.
3. Il fattore di resistenza per un tubo, r , è calcolato come descritto nella seguente tabella:

Formula	Coefficiente di resistenza	Esponente portata
Hazen-Williams	$4.727C^{-1.852} d^{-4.871} L$	1.852
Darcy-Weisbach	$0.0252 f(\epsilon, d, q) d^{-5} L$	2
Chezy-Manning	$4.66 n^2 d^{-5.33} L$	2

Dove C è il coefficiente di rugosità di Hazen-Williams, ϵ è il coefficiente di rugosità di Darcy-Weisbach, f è il fattore di attrito (dipendente da ϵ, d, q), n è il coefficiente di rugosità di Manning, d è il diametro del tubo (in feet), L è la lunghezza del tubo (in feet) e q è la portata (in cfs).

Per l'equazione di Darcy-Weisbach il fattore di attrito f è:

$$f=64/Re \text{ se } Re < 2000 \text{ (Bhave, 1991)}$$

$$f=0.25/[\ln((\epsilon/(3.7d))+5.74/(Re^{0.9})))]^2 \text{ se } Re > 4000 \text{ (Bhave, 1991)}$$

$$f=(X1+R(X2+R(X3+X4))) \text{ SE } 2000 < Re < 4000 \text{ (Dunlop, 1991)}$$

dove:

$$R=Re/2000,$$

$$X1=7FA-FB, X2=0.128-17FA+2.5FB, X3=-0.128+13FA-2FB, X4=R(0.032-3FA+0.5FB),$$

$$FA=(Y3)^{-2}, FB=FA(2-(0.00514215/(Y2)(Y3))),$$

$$Y2=(\epsilon/(3.7d))+5.74/Re^{0.9}, Y3=-0.86859 \ln[(\epsilon/(3.7d))+5.74/4000^{0.9}],$$

ϵ è la rugosità del tubo e d il diametro del tubo.

4. Il coefficiente m delle perdite concentrate è convertito nel coefficiente K basato sulla velocità secondo la seguente relazione $m=0.02517K/d^4$.
5. Le emissioni ai nodi sono modellati come tratti fittizi tra il nodo ed un bacino d'acqua fittizio. I parametri delle perdite di carico dei tubi sono $n = (1/\gamma)$, $r=(1/C)^n$, e $m=0$ dove C è il coefficiente di scarico dell'emissione e γ è l'esponente della pressione. Il carico al bacino fittizio è la quota del nodo. La

portata misurata attraverso il tubo fittizio diventa la portata associata con l'emissione.

6. Alle valvole aperte è assegnato un valore r assumendo che esse si comportino come un tubo liscio ($f=0.02$) la cui lunghezza è pari a due volte il diametro della valvola. I collegamenti chiusi sono assunti soddisfare una relazione di perdita di carico lineare con un elevato fattore di resistenza.
7. Il controllo dello stato delle pompe, delle valvole, della portata nelle valvole di controllo e nei tubi connessi con serbatoi pieni o vuoti è effettuato dopo ogni iterazione fino alla decima iterazione; dalla undicesima iterazione i controlli sullo stato sono effettuati solo al raggiungimento della convergenza.
8. Durante il controllo dello stato le pompe sono chiuse se vi è il rischio di inversione del flusso, le valvole sono chiuse se la perdita di carico attraverso esse è negativo, i collegamenti ad un serbatoio vuoto sono chiusi se vi è richiesta di acqua da quest'ultimo e i collegamenti ad un serbatoio pieno sono chiusi se vi è invio di acqua a quest'ultimo.
9. Un'apposita procedura provvede ad un test sullo stato delle valvole di ritegno (Check Valves):
if $|h| > H_{tol}$ then
 if $h < -H_{tol}$ then status = CLOSED
 if $Q < -Q_{tol}$ then status = CLOSED
 else status = OPEN
else
 if $Q < -Q_{tol}$ then status = CLOSED
 else status = unchanged
dove $H_{tol}=0.0005$ [feet] e $Q_{tol}=0.001$ [cfs]
10. Se il test sullo stato chiude una pompa, una Check Valve o un tubo aperti, allora la sua portata è fissata uguale a 10^{-6} [cfs]. Se una pompa è riaperta, la sua portata è calcolata con riferimento alla sua curva caratteristica. Se un tubo o una valvola sono riaperte la portata è calcolata risolvendo l'equazione 2.2.1 per Q con riferimento alla perdita di carico corrente h e trascurando le perdite concentrate.

11. I coefficienti della matrice per le Pressure Breaker Valves sono settati nel seguente modo: $p=10^8$ e $y=10^8 H_{set}$, dove H_{set} è la caduta di pressione settata per la valvola (usando come unità di misura i piedi). Le Throttle Control Valves sono trattate come tubi con r come indicato al punto 6 e m come indicato al punto 4.

12. I coefficienti della matrice per le Pressure Reducing Valves, le Pressure Sustaining Valves e le Flow Control Valves sono calcolati alla fine.

13. La logica per i tests ad una Pressure Reducing Valves è:

if current status = ACTIVE then

if $Q < -Q_{tol}$ then new status=CLOSED

if $H_i < H_{set} + H_{ml} - H_{tol}$ then new status=OPEN

else new status=ACTIVE

if current status = OPEN then

if $Q < -Q_{tol}$ then new status=CLOSED

if $H_i > H_{set} + H_{ml} - H_{tol}$ then new status=ACTIVE

else new status=OPEN

if current status = CLOSED then

if $H_i > H_j + H_{tol}$ e

$H_i < H_{set} - H_{tol}$ then new status= OPEN

if $H_i > H_j + H_{tol}$ e

$H_j < H_{set} - H_{tol}$ then new status=ACTIVE

else new status=CLOSED

Dove Q è la portata attuale attraverso la valvola, H_i è il carico a monte, h_j è il carico a valle, H_{set} è la sua pressione settata (convertita in carico), H_{ml} è la perdita concentrata quando la valvola è aperta.

14. La portata attraverso una Pressure Reducing Valve attiva è mantenuta per forzare la continuità al suo nodo di valle, mentre la portata attraverso una Pressure Sustaining Valve fa lo stesso per il nodo a monte. Per una PRV attiva dal nodo i al nodo j : $p_{ij}=0$ $F_j=F_i+10^8 H_{set}$ $A_{jj}=A_{ij}+10^8$.

15. Per una Flow Control Valve attiva dal nodo i al nodo j con la portata settata a Q_{set} , Q_{set} è aggiunta alla portata che lascia il nodo i ed entra nel nodo j , ed è sottratta da F_i e aggiunta a F_j . Se il carico al nodo i è minore di quello al nodo

j, allora la valvola non può consegnare la portata ed è trattata come un tubo aperto.

16. Dopo il raggiungimento della convergenza iniziale è effettuato un altro test su pompe Cv, FCV e collegamenti ai serbatoi. Se qualche variabile cambia allora si effettuano almeno altre due iterazioni.

17. Per simulazioni su intervalli di tempo estesi (EPS), è implementata la seguente procedura in tre passi:

- a) dopo che è stata trovata una soluzione per l'intervallo di tempo corrente, l'intervallo di tempo per la soluzione successiva è il minimo tra: il tempo fino all'inizio di un nuovo intervallo di richiesta; il minor tempo per svuotare o riempire un serbatoio; il minor tempo tale che il livello in un serbatoio raggiunga il punto che modifichi lo stato di un collegamento; l'intervallo di tempo più piccolo perché scatti un timer; l'intervallo di tempo più piccolo perché un controllo comporti un cambiamento di stato nella rete.
- b) Il tempo è avanzato in base all'intervallo determinato al punto a), sono trovate le nuove richieste, i livelli dei serbatoi sono corretti in base alla soluzione corrente della portata, ed i collegamenti sono testati per evidenziare cambiamenti negli stati.
- c) Un nuovo set di iterazioni delle equazioni 2.23 e 2.24 è iniziato con i valori correnti delle portate.

Oltre alla modellazione idraulica, EPANET ha le seguenti capacità di modellazione della qualità delle acque:

- Modella il movimento di un tracciante non reattivo attraverso la rete idraulica.
- Modella il movimento di un reagente, la sua crescita o il suo decadimento nel tempo.
- Permette di valutare il tempo di permanenza dell'acqua in una rete.
- Permette di seguire la percentuale della portata attraverso un nodo che raggiunge gli altri nodi.
- Modella le reazioni nel seno del fluido e alle pareti.

- Permette di considerare reazioni nel seno del fluido con cinetica di n-esimo ordine.
- Permette di considerare reazioni alle pareti con cinetica di ordine zero o uno.
- Considera le limitazioni sul trasferimento di materia quando modella reazioni alle pareti.
- Permette di considerare crescita o diminuzione di reagenti fino ad una concentrazione limite.
- Permette di considerare velocità di reazioni globali che si differenziano poi tratto per tratto.
- Consente di correlare la velocità di reazione alla parete con la scabrezza del tubo.
- Permette di avere concentrazioni variabili nel tempo o introduzione di una quantità definita di reagente in ogni punto della rete.
- Modella i serbatoi di stoccaggio come di tipo CSTR (tipo a completo mescolamento) o PFR (tipo a pistone).

L'approccio utilizzato per seguire il moto delle particelle discrete d'acqua nella rete ad intervalli di tempo fissati è di tipo Lagrangiano; nello studio degli aspetti qualitativi delle acque si utilizzeranno però intervalli di tempo generalmente più piccoli di quelli usati nella modellazione idraulica. Tale approccio consiste, come è noto, nel fissare un sistema di riferimento inerziale e nel descrivere il movimento delle singole particelle di liquido in tale sistema di riferimento. Il mescolamento nei serbatoi è schematizzato secondo quattro tipologie: CSTR completamente mescolato, PFR flusso a pistone verticale o orizzontale, e mescolamento a due compartimenti che hanno singolarmente un comportamento analogo ad un CSTR.

EPANET permette di seguire la crescita o la diminuzione di una sostanza per reazione attraverso il suo moto nella rete una volta fissate la velocità di reazione e come essa dipenda dalla concentrazione; inoltre permette di distinguere le reazioni che avvengono nel seno della fase liquida da quelle che avvengono alle pareti. Le reazioni che avvengono nel seno della fase liquida possono essere considerate come reazioni con cinetica di ordine n, in cui la velocità istantanea di reazione R è data da: $R=K_b C^n$ dove K_b è il coefficiente di reazione, C è la concentrazione del

reagente (massa/volume) e n è l'ordine di reazione. Nel caso in cui vi sia una concentrazione limite C_L affinché la reazione avvenga allora:

$$R = K_b(C_L - C)C^{n-1} \text{ per } n > 0 \text{ e } K_b > 0$$

$$R = K_b(C - C_L)C^{n-1} \text{ per } n > 0 \text{ e } K_b < 0$$

Se si utilizza un ordine di reazione negativo viene usata l'equazione di Michaelis-Menton:

$$R = K_b C / (C_L - C) \text{ per reazioni di decadimento,}$$

o $R = K_b C / (C_L + C)$ per reazioni di crescita. Tale equazione è particolarmente utile nello studio di reazioni di crescita microbiologica.

La dipendenza dalla temperatura del coefficiente di reazione è calcolata usando l'equazione di Van't Hoff-Arrhenius:

$$K_{b2} = K_{b1} \theta^{T2-T1}$$

dove θ è una costante.

Le reazioni che avvengono alle pareti sono, invece, caratterizzate dalla seguente espressione della velocità istantanea di reazione:

$$R = (A/V) K_w C^n$$

dove K_w è il coefficiente di reazione alla parete e A/V è l'area di contatto per unità di volume. Le reazioni alle pareti possono essere modellate solo se di ordine 0 oppure 1, inoltre il coefficiente di reazione deve essere inserito dall'operatore così come nel caso di reazione nel seno della fase liquida. K_w è corretto automaticamente da EPANET tenendo conto delle limitazioni ai trasferimenti di materia di reagenti e prodotti tra il seno della fase liquida e le pareti: la correzione è basata sulla diffusività molecolare delle sostanze in oggetto e sul numero di Reynold. K_w può dipendere dalla temperatura e dall'età delle pareti di tubi o recipienti, infatti l'incremento della rugosità di un tubo metallico con il tempo comporta un aumento della reattività delle pareti con alcune sostanze quali ad esempio il cloro. La dipendenza di K_w dalla rugosità dipende dalla formula utilizzata per il calcolo delle perdite di carico:

$K_w = F/C$	Hazen-Williams
$K_w = -F/\log(e/d)$	Darcy-Weisbach
$K_w = Fn$	Chezy-Manning

Dove C è il fattore di Hazen-Williams, e è la rugosità di Darcy-Weisbach, d è il diametro del tubo, n è il coefficiente di rugosità di Manning e F un coefficiente che deve essere calcolato mediante misure di campo.

EPANET, inoltre, permette di calcolare **l'età dell'acqua**, cioè il tempo di permanenza di una particella d'acqua nella rete.

Il moto dell'acqua nei tubi può essere schematizzato per filetti fluidi paralleli, trascurando la dispersione longitudinale e considerando quindi la seguente equazione:

$$\delta C_i / \delta t = -u_i (\delta C_i / \delta x) + r C_i$$

dove C_i è la concentrazione nel tubo (massa/volume), funzione della distanza x e del tempo t ; u_i è la velocità del flusso nel tubo (lunghezza/tempo); r è la velocità di reazione funzione della concentrazione.

Il mescolamento di fluidi provenienti da più tubi in un nodo è ipotizzato completo e istantaneo. Quindi la concentrazione di un reagente in uscita da un nodo è semplicemente data dalla somma pesata delle concentrazioni in ingresso:

$$C_{i/x=0} = (\sum_{j \in I_k} Q_j C_{j/x=L_j} + Q_{k,ext} C_{k,ext}) / (\sum_{j \in I_k} Q_j + Q_{k,ext})$$

Dove i è il collegamento con il flusso che lascia il nodo k , I_k è un set di collegamenti con il flusso dentro k , L_j è la lunghezza del collegamento j , Q_j è la portata nel collegamento j , $Q_{k,ext}$ è la portata esterna entrante al nodo k , $C_{i/x=0}$ è la concentrazione all'inizio del collegamento i , $C_{i/x=L}$ è la concentrazione alla fine del collegamento.

La concentrazione di un reagente in un CSTR è espressa dalla seguente equazione:

$$\delta (V_s C_s) / \delta t = (\sum_{i \in I_s} Q_i C_{i/x=L_i} - \sum_{j \in O_s} Q_j C_s + r C_s)$$

dove V_s è il volume nel serbatoio al tempo t , C_s è la concentrazione, I_s è l'insieme dei collegamenti che adducono acqua al serbatoio, O_s è l'insieme dei collegamenti che prelevano acqua dal serbatoio.

Considerate le sue potenzialità EPANET può essere quindi proficuamente utilizzato per lo studio della propagazione di contaminanti in una rete idrica.

3. Esempio applicativo: analisi di un evento di contaminazione dolosa

Allo scopo di mettere in evidenza le problematiche ed i pericoli connessi ad un evento di contaminazione dolosa, è stato sviluppato un esempio applicativo con riferimento ad una rete idrica reale. La rete presa in esame (fig. 2.3.1) è una subrete del sistema idrico napoletano dell'ARIN e cioè la rete di distribuzione idrica del Vomero Alto Servizio, alimentata dalla centrale di sollevamento di San Gennaro al Vomero e munita di un serbatoio di estremità ubicato in Castel Sant'Elmo. La rete in oggetto si sviluppa da nord a sud, da via Bonito a via Sanfelice e, da est a ovest da San Martino a piazza Vanvitelli; altimetricamente si va dai 174.50 m.s.m. della centrale di sollevamento di via San Gennaro al Vomero ai 247.60 m.s.m. del piazzale del castello di Sant Elmo per un dislivello totale pari a 73.00 metri. La rete può essere schematizzata da un punto di vista idraulico come costituita da:

- una centrale di pompaggio,
- una rete di distribuzione,
- un serbatoio di estremità.

La centrale di pompaggio è costituita da 2 pompe di tipo centrifugo, la prima per il normale esercizio e la seconda posta in parallelo viene utilizzata solo in situazioni di particolare disagio per l'utenza.

Il serbatoio di estremità, sito nel fossato del castel Sant Elmo, è una struttura in cemento armato costituita da due vasche per un volume totale di circa 380 m³; il serbatoio svolge funzione di compenso e presenta una quota media del pelo libero di 251.8 m.s.m..

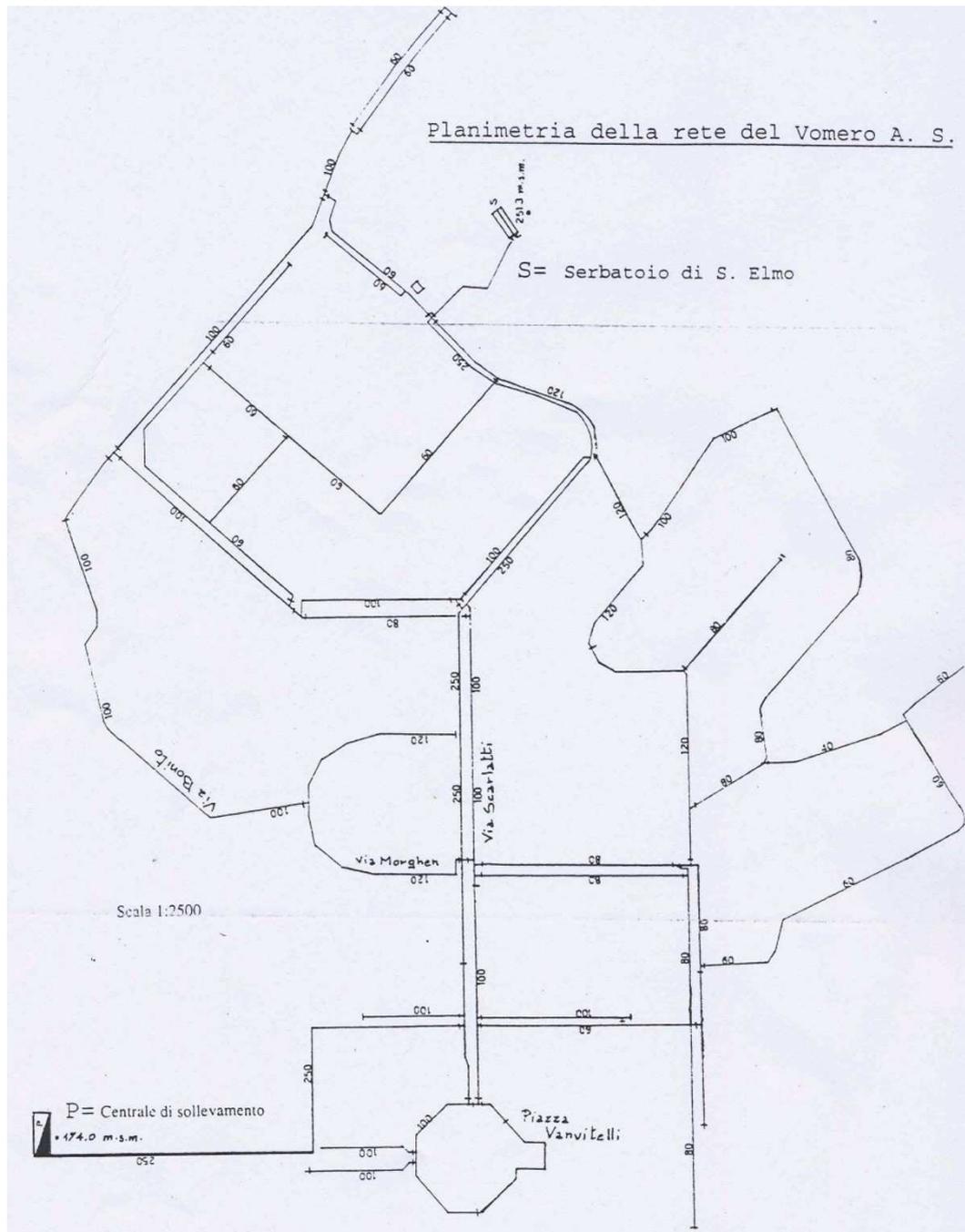


Fig. 2.3.1 Rete Vomero Alto Servizio

La rete di distribuzione ha uno sviluppo complessivo di circa 6300 metri ed è costituita principalmente da condotte in ghisa dettagliatamente elencate nella seguente tabella 2.3.1:

RETE DI DISTRIBUZIONE DEL VOMERO ALTO SERVIZIO		
DISTINTA DELLE TUBAZIONI		
TRATTA	DIAMETRO [mm]	LUNGHEZZA [m]
VIA S.GENNARO AL VOMERO	250	80
VIA BERNINI	250	180
VIA BERNINI	100	120
VIA SOLIMENE	250	80
VIA KERBAKER	250	95
VIA KERBAKER	60	130
VIA KERBAKER	100	150
VIA SCARLATTI	100	300
VIA SCARLATTI	250	300
VIA PIRRO	100	120
VIA PIRRO	250	120
VIA CACCAVELLO	250	140
VIA CACCAVELLO	120	220
VIA CACCAVELLO	60	180
FINO AL FORTE S.ELMO	250	70
VIA MICHETTI	120	50
VIA MICHETTI	80	90
VIA CIMAROSA	120	120
VIA CIMAROSA	80	350

PEDEMENTANA S.MARTINO	60	310
VIA DONIZETTI	40	95
VIA DONIZETTI	80	55
VIA PUCCINI	60	230
PIAZZA FUGA	60	40
VIA MANCINI	80	250
GRADINI PETRAIO	100	120
VIA MORGHEN	60	100
VIA MORGHEN	80	270
VIA MORGHEN	100	110
VIA MORGHEN	120	250
VIA D'AURIA	100	150
VIA D'AURIA	60	140
VIA ANGELINI	60	380
VIA ANGELINI	100	245
VIA DAL BONO	60	140
VIA COTRONEI	60	70
VIA COLANTONIO	60	105
VIA BONITO	100	340
PIAZZA VANVITELLI	100	240

Tab. 2.3.1

La rete del “Vomero Alto Servizio” è stata schematizzata come riportato in figura 2.3.2, essa è costituita da 52 lati, 16 maglie di cui 15 reali ed una fittizia, 36 nodi interni e 2 nodi esterni

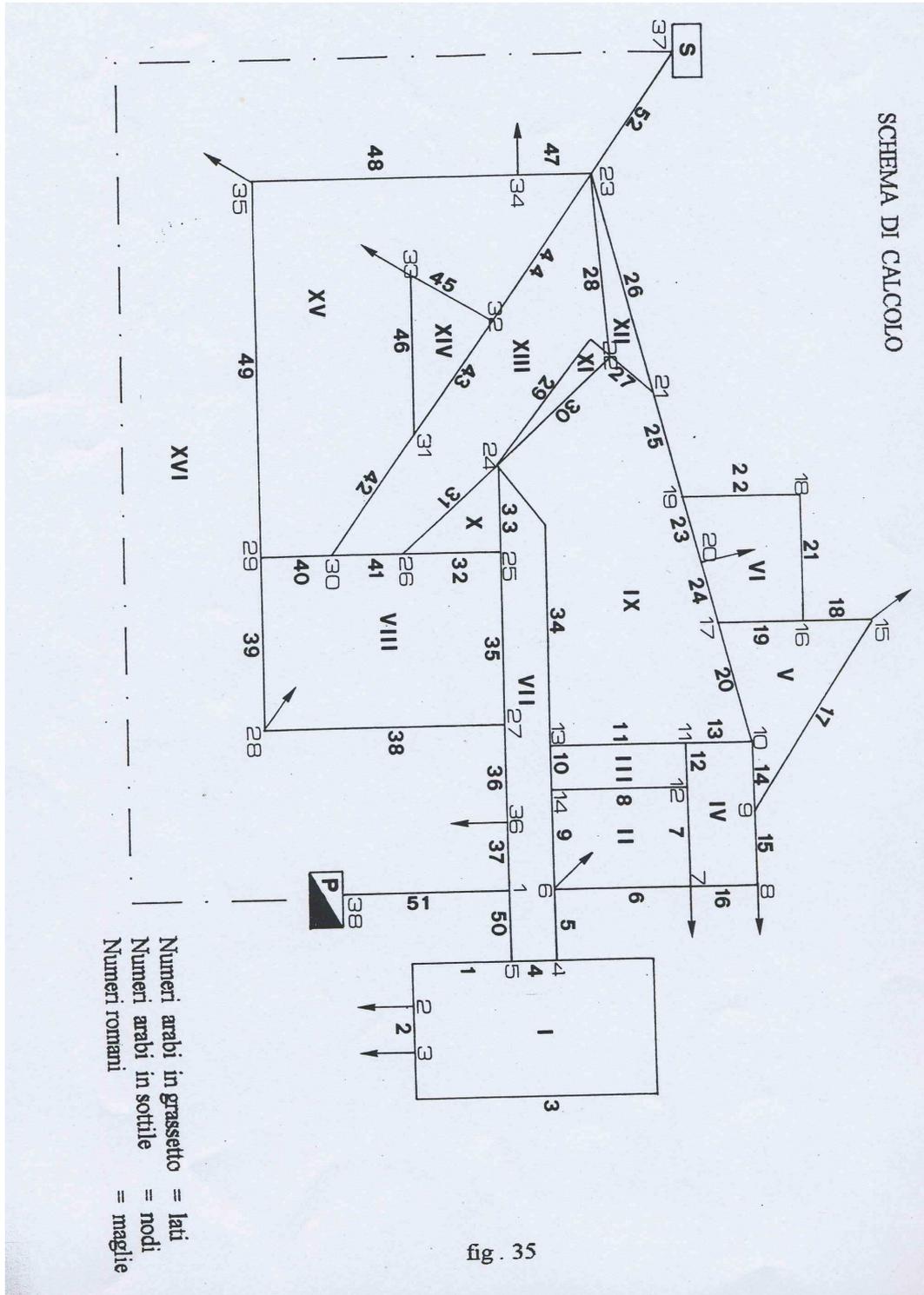


Fig. 2.3.2 Schematizzazione Rete Vomero Alto Servizio

Una prima simulazione è stata ottenuta ipotizzando una situazione di funzionamento notturno in assenza di richieste idriche e, quindi, con una fase di invaso nel serbatoio di estremità. La scelta di tale condizione di funzionamento è dovuta alla maggiore semplicità operativa, unita al fatto che effettivamente durante le ore notturne le probabilità di una contaminazione dolosa sono sicuramente più alte. La simulazione è stata effettuata ipotizzando l'introduzione di una generica sostanza tossica nel serbatoio di carico della stazione di pompaggio, in modo da valutare come e in quanto tempo il tossico si diffonde nella rete. L'operazione è stata effettuata utilizzando l'opzione *mass booster source* prevista proprio per simulare l'introduzione di contaminanti nella rete. Per la sostanza introdotta, definita genericamente *tossico*, si è ipotizzata una reazione nel bulk e alle pareti con una cinetica del 1° ordine; con un global bulk coeff. di 0.1 ed un global wall coeff. di 0.2.

Riepilogo ipotesi simulazione	
Formula utilizzata per le perdite di carico	Hazen-Williams
Cinetica di reazione	1° ordine
Unità di misura grandezze idrauliche	LPS
Diffusività relativa del tossico	1
Viscosità relativa	1
Tolleranza concentrazione	0.01

Il report allegato riporta tutte le condizioni della rete nell'istante in cui avviene la contaminazione e a step nelle due ore successive:

Page 1

```
*****
*                               E P A N E T                               *
*                               Hydraulic and Water Quality                 *
*                               Analysis for Pipe Networks                   *
*                               Version 2.0                                 *
*****
```

Input File: vomeroAS6.NET

Link - Node Table:

Link ID	Start Node	End Node	Length m	Diameter mm
2	2	3	6	100
4	5	4	6	100
5	4	6	48	100
6	6	7	130	60
7	12	7	92	80
8	14	12	130	80
9	6	14	88	100
10	14	13	6	100
11	13	11	130	80
12	12	11	10	80
13	11	10	9	80
14	10	9	66	80
15	9	8	36	80
16	8	7	6	60
17	9	15	268	60
18	15	16	94	40
19	17	16	54	80
20	17	10	34	120
21	16	18	252	80
22	18	19	120	100
23	19	20	140	120
24	20	17	84	120
25	21	19	60	120
26	23	21	140	120
27	22	21	4	120
28	23	22	140	120
30	22	24	124	250
31	24	26	109	100
32	25	26	100	60
33	25	24	8	250
35	27	25	148	100
36	36	27	96	250
37	1	36	6	250
38	27	28	118	120
39	28	29	328	100
40	29	30	142	100
41	26	30	11	100

Page 2

Link - Node Table: (continued)

Link ID	Start Node	End Node	Length m	Diameter mm
42	30	31	72	60
43	31	32	69	60
44	23	32	180	60
45	32	33	67	60
46	31	33	129	60
47	23	34	26	60
48	34	35	84	60
49	29	35	206	100
50	1	5	47	250
51	38	1	441	250
3	4	3	178	100
29	24	22	118	100
34	13	24	154	100
52	23	39	71	250
1	5	2	48	100
54	37	38	#N/A	#N/A Pump

Energy Usage:

Pump	Usage Factor	Avg. Effic.	Kw-hr /m3	Avg. Kw	Peak Kw	Cost /day
54	100.00	75.00	0.33	48.48	48.61	0.00
Demand Charge:						0.00
Total Cost:						0.00

Node Results at 0:00 Hrs:

Node ID	Demand LPS	Head m	Pressure m	Quality mg/L
1	0.00	263.86	65.96	0.00
2	0.34	263.71	263.71	0.00
3	0.34	263.70	263.70	0.00
4	0.00	263.49	67.49	0.00
5	0.00	263.82	67.82	0.00
6	1.18	260.20	62.30	0.00
7	0.27	255.80	62.20	0.00
8	0.27	255.68	62.08	0.00
9	0.00	255.54	61.44	0.00
10	0.00	255.41	52.91	0.00
11	0.00	255.68	255.68	0.00
12	0.00	255.77	255.77	0.00
13	0.00	256.56	256.56	0.00
14	0.00	256.71	256.71	0.00
15	0.46	255.13	62.83	0.00

Page 3

Node Results at 0:00 Hrs: (continued)

Node ID	Demand LPS	Head m	Pressure m	Quality mg/L
16	0.00	255.11	57.01	0.00
17	0.00	255.21	49.91	0.00
18	0.00	254.58	61.08	0.00
19	0.00	254.50	36.60	0.00
20	1.19	254.86	44.36	0.00
21	0.00	254.24	32.84	0.00
22	0.00	254.28	254.28	0.00
23	0.00	250.82	21.52	0.00
24	0.00	254.46	254.46	0.00
25	0.00	254.46	36.26	0.00
26	0.00	254.56	34.96	0.00
27	0.00	263.67	61.27	0.00
28	1.10	262.36	55.56	0.00
29	0.00	255.33	35.63	0.00
30	0.00	254.58	34.48	0.00
31	0.00	253.32	32.32	0.00
32	0.00	252.86	30.86	0.00
33	0.40	252.91	30.11	0.00
36	0.77	263.84	65.94	0.00
38	0.00	265.97	91.47	0.00
34	0.16	251.50	23.00	0.00
35	1.79	253.98	29.38	0.00
37	-40.66	174.50	0.00	0.00 Reservoir
39	32.39	250.60	3.00	0.00 Tank

Link Results at 0:00 Hrs:

Link ID	Flow LPS	Velocity m/s	Headloss m/km	Status
2	2.07	0.26	1.67	Open
4	13.62	1.73	54.87	Open
5	15.34	1.95	68.44	Open
6	2.74	0.97	33.88	Open
7	-0.42	0.08	0.26	Open
8	2.53	0.50	7.23	Open
9	11.42	1.45	39.64	Open
10	8.89	1.13	24.91	Open
11	2.46	0.49	6.82	Open
12	2.95	0.59	9.60	Open
13	5.41	1.08	29.43	Open
14	-1.26	0.25	1.98	Open
15	-1.78	0.35	3.75	Open
16	-2.05	0.72	19.80	Open
17	0.52	0.18	1.56	Open
18	0.06	0.05	0.21	Open
19	1.23	0.25	1.90	Open

Page 4

Link Results at 0:00 Hrs: (continued)

Link ID	Flow LPS	Velocity m/s	Unit Headloss m/km	Status
20	-6.67	0.59	6.02	Open
21	1.29	0.26	2.08	Open
22	1.29	0.16	0.70	Open
23	-4.24	0.38	2.61	Open
24	-5.43	0.48	4.12	Open
25	-5.54	0.49	4.27	Open
26	-14.21	1.26	24.42	Open
27	8.67	0.77	9.78	Open
28	-14.29	1.26	24.69	Open
30	-21.02	0.43	1.41	Open
31	-1.54	0.20	0.97	Open
32	-0.41	0.14	1.00	Open
33	14.98	0.31	0.76	Open
35	14.58	1.86	62.24	Open
36	23.87	0.49	1.79	Open
37	24.64	0.50	1.90	Open
38	9.29	0.82	11.13	Open
39	8.19	1.04	21.42	Open
40	3.86	0.49	5.32	Open
41	-1.95	0.25	1.50	Open
42	1.91	0.68	17.44	Open
43	1.15	0.41	6.77	Open
44	-1.51	0.54	11.29	Open
45	-0.37	0.13	0.81	Open
46	0.77	0.27	3.20	Open
47	-2.38	0.84	26.14	Open
48	-2.54	0.90	29.48	Open
49	4.33	0.55	6.58	Open
50	16.02	0.33	0.85	Open
51	40.66	0.83	4.80	Open
3	-1.73	0.22	1.20	Open
29	1.94	0.25	1.48	Open
34	6.43	0.82	13.69	Open
52	32.39	0.66	3.15	Open
1	2.41	0.31	2.21	Open
54	40.66	0.00	-91.47	Open Pump

Page 5

Node Results at 1:00 Hrs:

Node ID	Demand LPS	Head m	Pressure m	Quality mg/L
1	0.00	264.15	66.25	4.18
2	0.34	264.00	264.00	4.32
3	0.34	263.99	263.99	4.42
4	0.00	263.78	67.78	4.38
5	0.00	264.11	68.11	4.22
6	1.18	260.55	62.65	4.49
7	0.27	256.22	62.62	4.69
8	0.27	256.10	62.50	4.57
9	0.00	255.97	61.87	4.48
10	0.00	255.84	53.34	4.22
11	0.00	256.10	256.10	4.18
12	0.00	256.19	256.19	4.46
13	0.00	256.97	256.97	4.43
14	0.00	257.12	257.12	4.62
15	0.46	255.55	63.25	0.00
16	0.00	255.54	57.44	0.94
17	0.00	255.64	50.34	4.29
18	0.00	255.02	61.52	0.00
19	0.00	254.94	37.04	0.00
20	1.19	255.30	44.80	0.98
21	0.00	254.69	33.29	2.51
22	0.00	254.73	254.73	4.16
23	0.00	251.33	22.03	3.21
24	0.00	254.90	254.90	4.35
25	0.00	254.91	36.71	4.36
26	0.00	255.00	35.40	4.70
27	0.00	263.97	61.57	4.26
28	1.10	262.67	55.87	4.36
29	0.00	255.76	36.06	4.48
30	0.00	255.02	34.92	4.59
31	0.00	253.78	32.78	4.79
32	0.00	253.32	31.32	4.05
33	0.40	253.38	30.58	4.99
36	0.77	264.14	66.24	4.22
38	0.00	266.23	91.73	4.10
34	0.16	252.00	23.50	4.83
35	1.79	254.42	29.82	4.62
37	-40.34	174.50	0.00	4.10 Reservoir
39	32.07	251.11	3.51	0.05 Tank

Page 6

Link Results at 1:00 Hrs:

Link ID	Flow LPS	Velocity m/s	Unit Headloss m/km	Status
2	2.05	0.26	1.64	Open
4	13.51	1.72	54.05	Open
5	15.22	1.94	67.40	Open
6	2.71	0.96	33.33	Open
7	-0.41	0.08	0.25	Open
8	2.51	0.50	7.12	Open
9	11.32	1.44	38.98	Open
10	8.81	1.12	24.49	Open
11	2.44	0.48	6.71	Open
12	2.93	0.58	9.43	Open
13	5.36	1.07	28.95	Open
14	-1.25	0.25	1.94	Open
15	-1.76	0.35	3.69	Open
16	-2.03	0.72	19.50	Open
17	0.52	0.18	1.54	Open
18	0.06	0.04	0.18	Open
19	1.22	0.24	1.87	Open
20	-6.61	0.58	5.92	Open
21	1.28	0.25	2.04	Open
22	1.28	0.16	0.69	Open
23	-4.19	0.37	2.55	Open
24	-5.38	0.48	4.05	Open
25	-5.47	0.48	4.17	Open
26	-14.07	1.24	23.97	Open
27	8.59	0.76	9.62	Open
28	-14.15	1.25	24.25	Open
30	-20.82	0.42	1.39	Open
31	-1.52	0.19	0.95	Open
32	-0.40	0.14	0.97	Open
33	14.85	0.30	0.74	Open
35	14.45	1.84	61.23	Open
36	23.67	0.48	1.76	Open
37	24.44	0.50	1.87	Open
38	9.22	0.82	10.97	Open
39	8.12	1.03	21.08	Open
40	3.82	0.49	5.21	Open
41	-1.92	0.25	1.46	Open
42	1.90	0.67	17.16	Open
43	1.14	0.40	6.65	Open
44	-1.50	0.53	11.07	Open
45	-0.36	0.13	0.79	Open
46	0.76	0.27	3.15	Open
47	-2.35	0.83	25.55	Open
48	-2.51	0.89	28.86	Open
49	4.30	0.55	6.49	Open
50	15.90	0.32	0.84	Open
51	40.34	0.82	4.73	Open

Page 7

Link Results at 1:00 Hrs: (continued)

Link ID	Flow LPS	Velocity m/s	Unit Headloss m/km	Status
3	-1.71	0.22	1.18	Open
29	1.92	0.24	1.46	Open
34	6.37	0.81	13.45	Open
52	32.07	0.65	3.09	Open
1	2.39	0.30	2.19	Open
54	40.34	0.00	-91.73	Open Pump

Node Results at 2:00 Hrs:

Node ID	Demand LPS	Head m	Pressure m	Quality mg/L
1	0.00	264.44	66.54	4.21
2	0.34	264.29	264.29	4.36
3	0.34	264.28	264.28	4.46
4	0.00	264.08	68.08	4.41
5	0.00	264.40	68.40	4.25
6	1.18	260.89	62.99	4.53
7	0.27	256.63	63.03	4.73
8	0.27	256.51	62.91	4.94
9	0.00	256.38	62.28	5.09
10	0.00	256.26	53.76	5.15
11	0.00	256.51	256.51	4.97
12	0.00	256.61	256.61	4.85
13	0.00	257.37	257.37	4.78
14	0.00	257.52	257.52	4.65
15	0.46	255.98	63.68	6.06
16	0.00	255.96	57.86	5.41
17	0.00	256.06	50.76	5.26
18	0.00	255.46	61.96	5.74
19	0.00	255.38	37.48	5.59
20	1.19	255.73	45.23	5.35
21	0.00	255.13	33.73	5.14
22	0.00	255.17	255.17	4.68
23	0.00	251.84	22.54	5.03
24	0.00	255.34	255.34	4.63
25	0.00	255.35	37.15	4.44
26	0.00	255.44	35.84	4.74
27	0.00	264.26	61.86	4.30
28	1.10	262.98	56.18	4.39
29	0.00	256.18	36.48	4.52
30	0.00	255.46	35.36	4.63
31	0.00	254.24	33.24	4.83
32	0.00	253.79	31.79	5.13
33	0.40	253.84	31.04	5.15
36	0.77	264.43	66.53	4.25
38	0.00	266.49	91.99	4.13

Page 8

Node Results at 2:00 Hrs: (continued)

Node ID	Demand LPS	Head m	Pressure m	Quality mg/L
34	0.16	252.49	23.99	4.87
35	1.79	254.86	30.26	4.66
37	-40.01	174.50	0.00	4.13 Reservoir
39	31.74	251.62	4.02	0.61 Tank

Link Results at 2:00 Hrs:

Link ID	Flow LPS	Velocity m/s	Headloss m/km	Status
2	2.03	0.26	1.62	Open
4	13.40	1.71	53.23	Open
5	15.09	1.92	66.38	Open
6	2.69	0.95	32.79	Open
7	-0.41	0.08	0.24	Open
8	2.49	0.50	7.01	Open
9	11.22	1.43	38.34	Open
10	8.73	1.11	24.08	Open
11	2.42	0.48	6.61	Open
12	2.90	0.58	9.26	Open
13	5.31	1.06	28.47	Open
14	-1.23	0.25	1.90	Open
15	-1.75	0.35	3.62	Open
16	-2.02	0.71	19.20	Open
17	0.51	0.18	1.52	Open
18	0.05	0.04	0.16	Open
19	1.21	0.24	1.84	Open
20	-6.55	0.58	5.81	Open
21	1.26	0.25	2.00	Open
22	1.26	0.16	0.67	Open
23	-4.14	0.37	2.49	Open
24	-5.33	0.47	3.98	Open
25	-5.41	0.48	4.08	Open
26	-13.93	1.23	23.54	Open
27	8.52	0.75	9.47	Open
28	-14.01	1.24	23.81	Open
30	-20.63	0.42	1.36	Open
31	-1.50	0.19	0.92	Open
32	-0.40	0.14	0.95	Open
33	14.72	0.30	0.73	Open
35	14.32	1.82	60.23	Open
36	23.47	0.48	1.73	Open
37	24.24	0.49	1.84	Open
38	9.15	0.81	10.82	Open
39	8.05	1.03	20.74	Open
40	3.78	0.48	5.11	Open
41	-1.90	0.24	1.43	Open

Link

Results at 2:00 Hrs: (continued)

Link ID	Flow LPS	Velocity m/s	Unit Headloss m/km	Status
42	1.88	0.66	16.88	Open
43	1.13	0.40	6.54	Open
44	-1.48	0.52	10.84	Open
45	-0.35	0.12	0.76	Open
46	0.75	0.27	3.10	Open
47	-2.32	0.82	24.98	Open
48	-2.48	0.88	28.26	Open
49	4.27	0.54	6.41	Open
50	15.77	0.32	0.83	Open
51	40.01	0.82	4.66	Open
3	-1.69	0.22	1.16	Open
29	1.90	0.24	1.43	Open
34	6.31	0.80	13.21	Open
52	31.74	0.65	3.03	Open
1	2.37	0.30	2.16	Open
54	40.01	0.00	-91.99	Open Pump

I risultati della suddetta simulazione sono osservabili nelle figure da 2.3.3 a 2.3.5 che mostrano l'andamento della concentrazione del tossico nella rete al passare del tempo. In particolare, la colorazione dei tratti e dei nodi della rete tende a mutare dal blu al rosso in corrispondenza dell'aumento di concentrazione. Nella figura 2.3.3 è rappresentato il punto zero in cui il tossico ancora non si è diffuso nella rete.

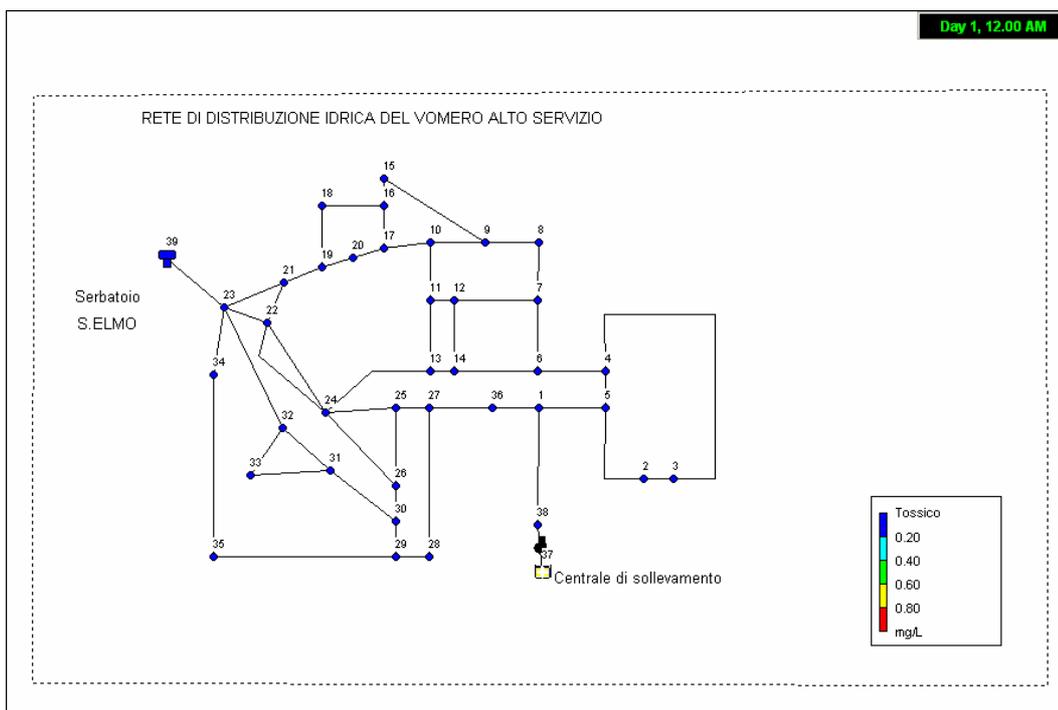


Fig. 2.3.3 Al tempo zero la concentrazione del tossico nella rete è nulla

Come si può osservare dalla figura 2.3.4 già dopo un ora la quasi totalità della rete è stata contaminata raggiungendo valori della concentrazione che per molte tipologie di veleni possono avere conseguenze sulla popolazione. Nella figura 2.3.5 dopo due ore la totalità della rete è stata contaminata con concentrazioni di tossico che solo nel serbatoio di estremità non hanno ancora superato i 0.8 mg/lt.

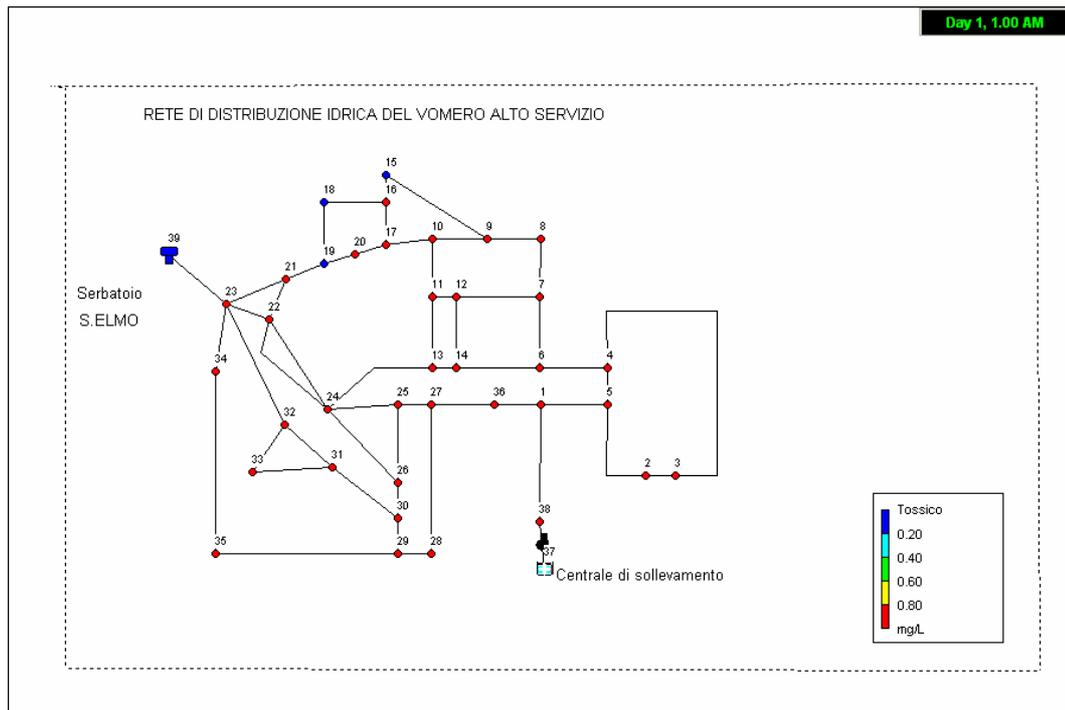


Fig. 2.3.4 Concentrazione del tossico nella rete dopo un ora

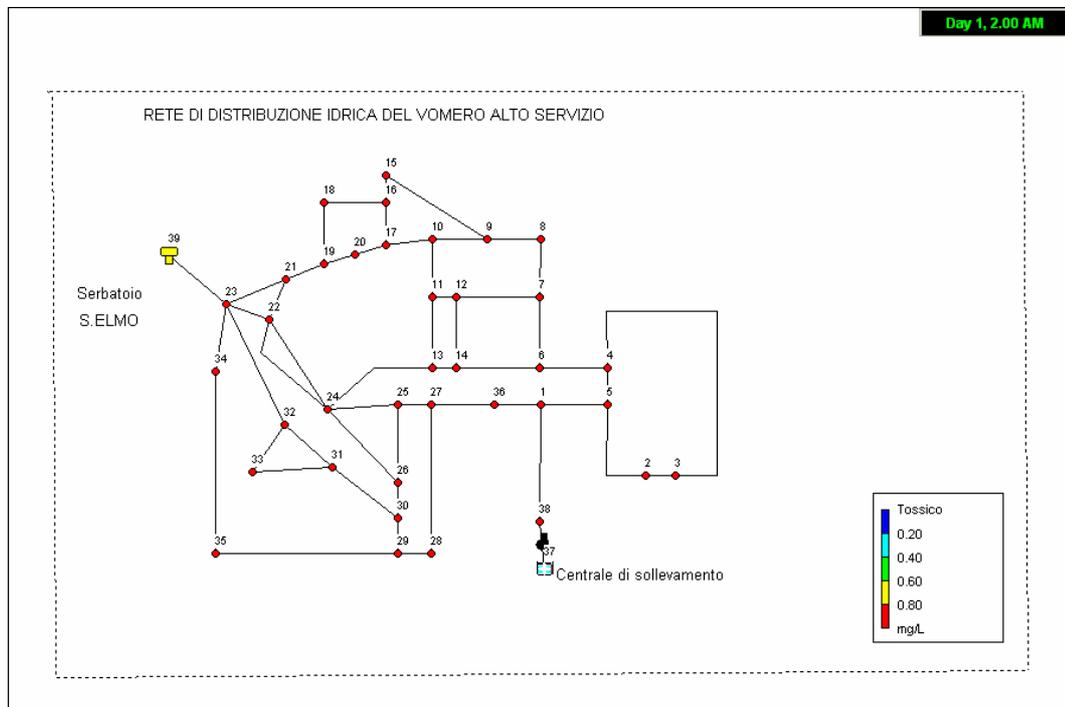


Fig. 2.3.5 Concentrazione del tossico nella rete dopo due ore

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

1. Considerazioni conclusive

La prima parte del presente lavoro ha cercato di tracciare un quadro generale sul rischio ordinario e straordinario di contaminazione di un sistema idrico; in particolare si è definito **rischio straordinario** il rischio di contaminazione di un sistema idrico dovuta ad un evento doloso. Gli agenti tossici utilizzabili per un tale atto doloso possono essere classificati in:

- Agenti chimici
- Agenti biologici
- Agenti radioattivi

Il rischio può essere considerato proporzionale sia alla frequenza di accadimento dell'evento indesiderato (F) che alla magnitudo del danno cagionato (D): $R=F*D^k$ dove il coefficiente k ($k > 0$) tiene conto della percezione della società civile di un dato evento. I rischi straordinari (CBR Attack), caratterizzati da valori del coefficiente k molto elevati, possono dar luogo a fenomeni di vero e proprio panico nella collettività, anche in conseguenza di atti dolosi caratterizzati da valori della frequenza di accadimento e del danno normalmente accettati per fenomeni diversi.

Il lavoro è proseguito con una disamina sui possibili contaminanti di tipo chimico, biologico e radioattivo. La ricerca si è poi soffermata sulle problematiche di controllo ed identificazione della contaminazione, esaminando le tecniche di rilevazione che permettono di rilevare il contaminante, quantificarlo e valutarne la reattività in presenza di cloro residuo in rete.

Nella parte sperimentale sviluppata presso il Laboratorio di Chimica Farmaceutica e Tossicologica sono state definite le metodiche sperimentali di rilevazione su due contaminanti: la Capsicina e la Ricina.

La Capsicina deriva dal peperoncino e pur essendo molto irritante, non può considerarsi un agente di elevata pericolosità. Per tale sostanza è stata preliminarmente definita una metodica di identificazione attraverso uno spot test (sali di diiazonio) di tipo colorimetrico. Successivamente si sono applicate le tecniche cromatografiche ad alta precisione (HPLC) per l'identificazione e la quantificazione del contaminante in acqua, individuando il tempo di ritenzione della capsicina, e costruendo la curva area rilevata dal cromatogramma – volume di soluzione iniettato e la curva di calibrazione relativa.

Infine, si è valutata l'azione decontaminante del cloro nei confronti della Capsicina, che purtroppo ha dato esito negativo.

La Ricina, invece, è considerata uno dei più potenti agenti contaminanti potenzialmente utilizzati per la contaminazione delle acque. La scelta di questa tossina è stata dettata dalla facilità con cui la si può reperire, essendo derivata dalla pianta di ricino, diffusa in molte zone del mondo. Per questo motivo, a differenza della Capsicina si è dovuto partire non più da campioni commerciali puri ma dai semi della pianta, seguendo in questo modo un percorso simile a quello che può portare alla contaminazione delle acque. Nonostante le evidenti difficoltà sperimentali, l'analisi sulla Ricina ha portato alla definizione di un efficace e rapido processo estrattivo dai semi di ricino che hanno permesso di valutare nell'elettroforesi la metodologia identificativa più efficace per questo agente. L'analisi HPLC, infatti, forse a causa dei residui impuri che i campioni estratti presentavano, si è dimostrata troppo sensibile per operare la separazione della ricina e definire il protocollo sperimentale approntato nel caso della Capsicina.

Inoltre si è indicato una metodica di rilevazione istantanea tramite spot test colorimetrico, utilizzando la ninidrina come reagente.

Grande rilievo, infine, è stato dato alla individuazione di altri possibili metodologie identificative presenti in letteratura per la Ricina ed alla reattività del contaminante in presenza di composti del cloro. Pur rinviando

ad ulteriori verifiche di laboratorio, presenta un'efficace interazione con la tossina, sia perché agisce degradando la sostanza, sia perché riduce in misura notevole la sua attività tossica.

Nel secondo capitolo della tesi si è esaminata la vulnerabilità di un sistema acquedottistico alla contaminazione, accennando alla protezione delle strutture, ai sistemi di monitoraggio rapido dei contaminanti ed alla efficacia delle tecniche di trattamento delle acque. Infine è stata effettuata una prima analisi di un evento di contaminazione dolosa mediante l'utilizzo del software EPANET. Allo scopo di mettere in evidenza le problematiche ed i pericoli connessi ad un evento di contaminazione dolosa, è stato sviluppato un esempio applicativo con riferimento ad una rete idrica reale. La rete presa in esame è una subrete del sistema idrico napoletano dell'ARIN e cioè la rete di distribuzione idrica del Vomero Alto Servizio.

2. Ulteriori prospettive di ricerca

L'argomento oggetto del presente lavoro sarà sicuramente oggetto di ulteriori studi e sviluppi in tutto il mondo a causa dell'elevata probabilità che un atto doloso di questo tipo possa avvenire. Certamente sarà necessario effettuare ulteriori simulazioni su attacchi dolosi a reti idriche in modo da poter poi pensare alla realizzazione di opere di rilevazione, difesa e mitigazione. Probabilmente, almeno in una fase iniziale, solo gestori di grosse dimensioni potrebbero avere le risorse necessarie a prendere in esame la possibilità di approntare protocolli o addirittura opere per la difesa da contaminazioni intenzionali; ma gli investimenti in questo campo potrebbero essere l'unico modo per salvare molte vite umane.