

## 1. RICERCA DI TRACCE DI SANGUE MEDIANTE LUMINOLO

### 1.1 Introduzione

Nel caso di reati cruenti, gli operatori della Polizia Scientifica hanno la necessità di rilevare la collocazione e la forma di eventuali tracce di sangue, allo scopo di stabilire la *condotta* del reo e raccogliere quindi elementi per identificarlo.

Il test qui proposto permette questo tipo di indagine *qualitativa*.

Esistono poi test sofisticati, sensibili e molto accurati, che possono mettere in relazione il sangue con la persona che l'ha perso, purché di questa sia noto il *DNA*. Tali test tengono conto dell'esistenza di *sostanze interferenti*, cioè sostanze che *non* provengono dal sangue ma danno lo stesso effetto osservato nel test qui descritto.

Seguono alcuni concetti base fondamentali per comprendere a pieno l'applicazione del test al luminolo, oggetto di questa prima parte dell'esperienza qualitativa proposta.

### 1.2 Il sangue

Il sangue è un fluido biologico. Non si tratta di una *soluzione* (che per definizione è *omogenea*), bensì di una *dispersione* di cellule (dimensione dell'ordine di  $\mu\text{m}$ , ovvero milionesimi di metro) e di *macromolecole* (per esempio proteine, dimensione dell'ordine di  $\text{nm}$ , ovvero miliardesimi di metro) in un liquido (*siero*) contenente acqua, sistemi di tamponamento del pH, sali minerali.

Tra le *cellule* del sangue vi sono i *globuli rossi*, che devono il loro colore ad una proteina, l'*emoglobina*. Tale proteina è costituita da una catena di *amminoacidi* e da un *gruppo prostetico* (la parte non amminoacidica), il quale contiene ferro allo stato di ossidazione II. Quando questo ferro si lega all'ossigeno, si ha colore rosso.

### 1.3 La luminescenza

*Luminescenza* vuol dire emissione di luce. Una reazione chimica si definisce *chemiluminescente* quando produce sostanze ad alto contenuto energetico (*eccitate*), le

quali cercano la stabilità emettendo l'energia in eccesso sotto forma di *fotoni* cioè di *luce*.

#### 1.4 I composti organici

Si chiamano *composti organici* quelli costituiti prevalentemente da carbonio, idrogeno, ossigeno, ed in minor misura da azoto e zolfo, legati mediante *legami covalenti*. Tali legami possono essere *semplici* (es: C-H, quando i due atomi legati condividono *una coppia di elettroni*) oppure *multipli*. Un esempio di legame multiplo è il *doppio legame* (es: C=C). Le molecole organiche con legami multipli sono dette anche *insature*, ovvero si dice che contengono *insaturazioni*. Le molecole con elevato numero di *insaturazioni* hanno particolare capacità di interagire coi *fotoni*: fotoni possono innescare reazioni chimiche, reazioni chimiche possono produrre fotoni.

#### 1.5 Le proteine

Le *proteine* sono sostanze organiche naturali costituite da catene di *aminoacidi* aventi formula di struttura generica:  $H_2N-CHR-COOH$  dove R è un simbolo che identifica un gruppo organico (esempi di R: R=H -> aminoacido GLICINA; R=CH<sub>3</sub>-> aminoacido ALANINA). Esempio di tratto di catena proteica:



#### 1.6 Le ossidoriduzioni

Le *ossidazioni* sono reazioni chimiche nelle quali si ha passaggio di *elettroni* da sostanze che tendono a cederli (*riducenti*) e che nel cederli si *ossidano* (aumentano il proprio stato di ossidazione) a sostanze che tendono ad acquistarli (*ossidanti*) e che nell'acquistarli si *riducono* (diminuiscono il proprio stato di ossidazione).

#### 1.7 I catalizzatori

Un *catalizzatore* è una sostanza in grado di aumentare la *velocità di reazione chimica*.

## 1.8 Il pH

L'acqua  $H_2O$  ha la naturale tendenza ad *autodissociarsi* generando protoni  $H^+$  e ioni idrossido  $OH^-$ . Le concentrazioni di tali *ioni* si misurano mediante l'opposto del logaritmo decimale del valore numerico della concentrazione molare:

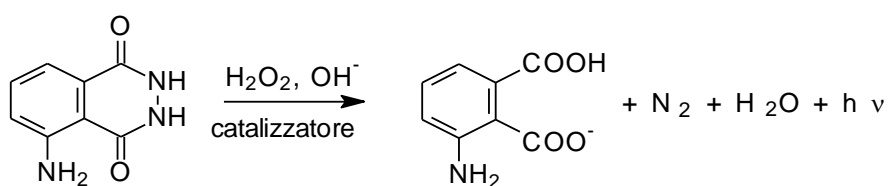
$$pH = -\log_{10} [H^+]$$

Nell'acqua pura la concentrazione di  $H^+$  e quella di  $OH^-$  sono uguali a  $10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$  ed il pH è uguale a 7. Nelle soluzioni *acide* la concentrazione di  $H^+$  è maggiore di quella degli  $OH^-$  ed il pH è minore di 7. Nelle soluzioni *basiche* (sinonimo: *alcaline*) la concentrazione di  $H^+$  è minore di quella degli  $OH^-$  ed il pH è maggiore di 7.

Esistono degli *acidi deboli* HA che si dissociano e si mettono in equilibrio con le loro *basi coniugate*  $A^-$ . La compresenza di HA ed  $A^-$  dà luogo ad un sistema chimico chiamato *tampone di pH* in quanto piccole aggiunte di acidi o basi forti *non* alterano il pH.

## 1.9 La chemiluminescenza del luminolo

Il luminolo è la prima molecola disegnata nella seguente reazione chimica:



In ambiente fortemente *alcalino* (eccesso di  $OH^-$ ), in presenza di *ossidanti* che contengano il *gruppo perossido*  $-O-O-$  (il più semplice perossido è l'acqua ossigenata  $H_2O_2$ ) ed in presenza di un opportuno *catalizzatore* il luminolo si *ossida* e diventa *ftalato*. Il catione  $Fe^{2+}$  è un catalizzatore di questa reazione. Tale reazione conferisce al prodotto un elevato contenuto energetico cosicché esso cerca la stabilità energetica emettendo fotoni (indicati con  $h\nu$ ) di lunghezza d'onda tra 400 e 800 nm. Tali lunghezze d'onda sono *visibili* all'occhio umano sotto forma di *colori*. Ad esempio a 400 nm abbiamo il *colore blu*.

## 1.10 Le unità di concentrazione

### Concentrazione molare o molarità

La molarità della specie X si indica con  $c=[X]$  è espressa in mol/l ed è così definita:

$$[X] = \frac{m}{PM V}$$

dove  $m$  è espresso in grammi (g) ed è la massa di sostanza pesata,  $PM$  è il suo *peso molecolare* espresso in g/mol, e  $V$  è il volume espresso in litri (l) nel quale è stata sciolta la massa pesata.

Dunque la massa da pesare per preparare un volume  $V$  di soluzione a molarità  $c$  è:

$$m = c V PM$$

La caffeina ha  $PM=194.09$  g/mol. Per preparare 10 ml a concentrazione  $2.6 \cdot 10^{-3}$  M occorre pesare:  $m = 0.0026 * 0.010 * 194.09$  g

### Parti per milione o ppm

La concentrazione di X è uguale ad 1 ppm se vi è un microgrammo di X per ogni grammo di soluzione. Nel caso di soluzioni acquose diluite si può considerare che un ml di soluzione pesi un grammo. In tal caso:

$$c_X \text{ (ppm)} = \frac{m_X}{m_{\text{soluzione}}} 10^6$$

dove  $m$  è espresso in grammi (g). La massa  $m_X$  da pesare per preparare una soluzione di massa  $m_{\text{soluz}}$  a concentrazione  $c_X$  ppm è:

$$m_X = \frac{c_X m_{\text{soluz}}}{10^6}$$

Così, per preparare 10 ml (cioè 10 g) di soluzione a concentrazione 100 ppm occorre pesare 0.001 g di X.

## 1.11 Interferenze nella ricerca di sangue mediante luminolo

Il ferro ferroso contenuto nell'emoglobina non è l'unico possibile catalizzatore per la reazione chemiluminescente del luminolo.

Anche la proteina naturale *perossidasi di rafano* (HRP) catalizza la reazione chemiluminescente del luminolo con l'acqua ossigenata. Si dice che l'HRP è un *interferente* per la ricerca di tracce di sangue mediante luminolo.

Dunque, qualcuno che voglia depistare le indagini su un crimine cruento potrebbe spargere una soluzione di HRP in una stanza: allorché la Polizia spargesse a sua volta la soluzione capace di generare la luminescenza (luminolo + acqua ossigenata fortemente alcalini) non solo eventuali tracce di sangue ma anche tracce di HRP sparse ad arte darebbero l'effetto luminescente.

Se dunque il test al luminolo risulta positivo, la Polizia Scientifica dovrà eseguire altre analisi chimiche di conferma della natura della sostanza che ha dato la luminescenza.

## **1.12 Procedura sperimentale per la ricerca di emoglobina mediante luminolo**

### **1.12.1 Introduzione**

Si vuole osservare la chemiluminescenza prodotta dall'ossidazione del luminolo con il perborato sodico. La presenza di emoglobina (proteina contenuta nel sangue), catalizza questa reazione anche in piccolissime quantità sviluppando la caratteristica luminescenza, che può indicare quindi la presenza di sangue. L'attività catalitica è dovuta alla presenza all'interno dei gruppi EME della proteina di atomi di Fe ferroso, responsabili del trasporto dell'ossigeno all'interno dell'organismo.

Questa attività catalitica può anche essere svolta da altre proteine o da altri atomi metallici che vengono quindi definiti interferenti. Oltre alla luminescenza prodotta dall'emoglobina, in questa esperienza viene osservato il ruolo di interferente e quindi la luminescenza prodotta da una di queste proteine, la perossidasi di rafano (HRP).

### **1.12.2 Materiale da utilizzare**

Pellicola di alluminio, spatola, 2 matracci da 10 ml, pipetta graduata da 1 ml, 2 flaconcini.

### **1.12.3 Sostanze da utilizzare**

Emoglobina bovina solida (*Sigma*), soluzione pronta di HRP, luminolo solido (sale sodico *Sigma*), perborato sodico tetraidrato solido ( $\text{NaBO}_3 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$   $PM=153,86 \text{ g mol}^{-1}$ , *Fluka*), carbonato sodico anidro solido ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$   $PM=106 \text{ g mol}^{-1}$ , *Rudi Pont*).

### **1.12.4 Parte sperimentale**

#### Preparazione del campione di emoglobina:

Viene fornita una soluzione di emoglobina avente concentrazione 2,5 mg/ml.

Si diluisce tale soluzione prelevandone 5 ml mediante pipetta a bolla e portando a volume con acqua deionizzata in un matraccio da 25 ml.

Successivamente trasferire parte della soluzione in un flaconcino in modo da riempirlo almeno per 1 cm. Contrassegnarlo utilizzando un pennarello indelebile con una sigla identificativa.

#### Preparazione della soluzione a base di luminolo

La soluzione viene fornita già pronta. Essa è stata ottenuta sciogliendo in 10 ml di acqua deionizzata le seguenti quantità:

- 5 mg di luminolo
- 35 mg di  $\text{NaBO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- 250 mg di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

Utilizzare un matraccio oscurato in quanto il luminolo è fotosensibile.

**NB:** Pesare con attenzione **indossando i guanti**.

#### Preparazione della soluzione di proteina interferente

La soluzione viene fornita già pronta, ed ha una concentrazione di 0,5 mg/ml.

Prelevare 1 ml della soluzione interferente di HRP utilizzando la pipetta graduata, e trasferirla in una provetta precedentemente contrassegnata con una sigla identificativa.

#### Sviluppo della chemiluminescenza

La reazione chemiluminescente viene sviluppata all'interno di un ambiente nel quale viene fatto il buio.

Portare quindi all'interno di tale ambiente le due provette contenenti emoglobina ed HRP e due provette di soluzione di luminolo.

In regime di semioscurità (con la porta in parte aperta), versare una parte del luminolo all'interno dei due flaconcini e chiudere velocemente la porta per poter apprezzare nel migliore dei modi il fenomeno di emissione luminosa.

## 2. RICONOSCIMENTO DI DROGHE MEDIANTE TLC

### 2.1 Le droghe

Le *droghe* sono sostanze organiche capaci di alterare il *metabolismo* del corpo umano, cioè quell'insieme di reazioni chimiche su cui si basa il suo funzionamento.

L'alterazione è tale da lasciare un effetto memoria sotto forma di *assuefazione*: l'organismo che è venuto a contatto con una droga manifesta disagio se tale droga non continua ad essere somministrata.

L'effetto di una droga può essere lieve; per esempio si ha sonno se si è abituati a bere caffè ma il caffè è finito. Oppure l'effetto della droga può essere grave o letale: di eroina si muore, con l'ecstasy ci si rovina il cervello!

### 2.2 La cromatografia su strato sottile (TLC)

La polizia scientifica usa tecniche analitiche separative strumentali (cromatografia) per identificare le droghe. La Thin Layer Chromatography (TLC) è la versione *qualitativa* di tali tecniche e può essere usata come saggio rapido per una prima immediata identificazione, che poi, se positiva, deve essere confermata per via strumentale accurata.

Per eseguire una TLC si prende una lastrina di materiale rigido o semirigido inerte, su cui è stato depositato un sottile strato di un solido molto speciale detto *fase stazionaria*. Nel caso presente la fase stazionaria è *silice*. Si tratta di una sostanza di sottilissima granulometria (microparticelle), che se posta a contatto con liquido (*fase mobile*) viene da esso attraversata per *capillarità*. Solitamente la lastrina viene posta verticalmente in un recipiente con coperchio, detto *camera di sviluppo*, e si lascia che il liquido posto sul fondo della camera *salga* per capillarità.

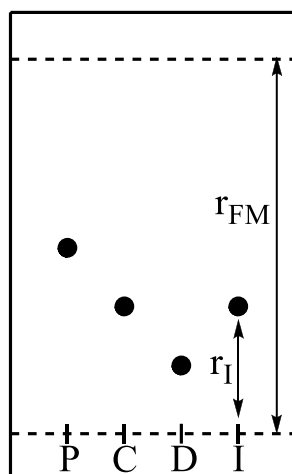
Se alla base della lastrina, ovvero sul lato da cui comincia a salire la fase mobile, è depositata una gocciolina di soluzione che contiene tre droghe diverse A, B e C, si verifica che le tre sostanze vengono sì tutte trasportate dalla fase mobile e dunque fatte salire, ma esse interagiscono anche con la fase stazionaria, la quale lega



temporaneamente tutte, ma alcune con più forza, altre con meno forza. Ne risulta che le tre sostanze si spostano a velocità diverse e quindi l'unica gocciolina iniziale si separa in 3 macchioline diverse.

Se si ha un campione incognito che contiene UNA tra 3 droghe note, si può identificarla procedendo come segue.

Di fianco alla gocciolina che rappresenta il campione da analizzare (detto *incognito*) si pongono anche tre goccioline (dette *soluzioni standard*) ciascuna contenente UNA SOLA delle tre droghe A, B e C. Dal confronto tra la posizione delle macchie degli *standard* con la posizione della macchia dell'incognito è possibile identificarlo.



P= paracetamolo (antinfiammatorio)

C= caffeina (stimolante)

D= diacetilmorfina o DAM (stupefacente)

Così per esempio la figura sopra dice che l'incognito I contiene caffeina.

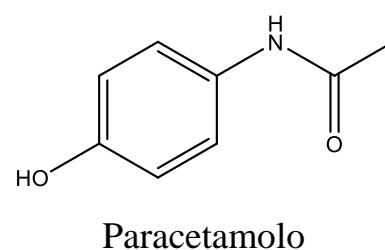
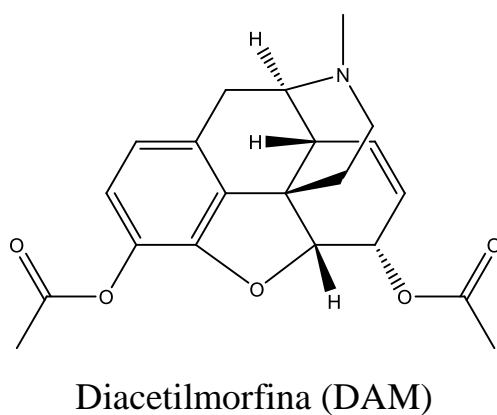
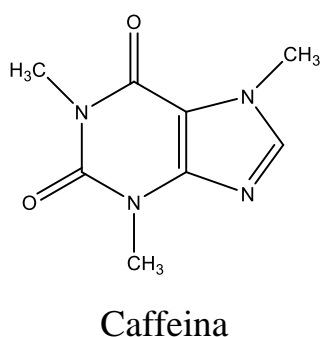
Il parametro identificativo dell'incognito 1 è il suo *fattore  $R_f$*  (*fattore di ritardo*), definito come rapporto tra la distanza  $r_I$  percorsa dalla relativa macchia e la distanza  $r_{FM}$  percorsa dalla Fase Mobile.

Analogamente per tutti gli altri incogniti.

## 2.3 Procedura sperimentale per la TLC di: caffeina, paracetamolo, diacetilmorfina

### 2.3.1 Introduzione

L'obiettivo dell'esperienza è quello di effettuare la separazione delle sostanze in esame, sfruttando le diverse interazioni che esse instaurano con la fase stazionaria costituita dalla silice presente sulla piastrina e la fase mobile contenuta all'interno della camera di eluizione. L'assegnazione della natura delle sostanze verrà poi effettuata per confronto con la corsa cromatografica di 3 standard preparati in laboratorio. I campioni da analizzare sono due alcaloidi (**caffeina** e **diacetilmorfina**) e un antinfiammatorio non steroideo (**paracetamolo**).



Per ogni campione incognito si effettua la corsa insieme ai tre standard. Successivamente è richiesto per ogni sostanza il calcolo dell' $R_f$ , definito come la distanza percentuale percorsa sulla piastrina rispetto al fronte del solvente.

### 2.3.2 Materiale da utilizzare

Pellicola di alluminio, spatola, matraccio da 10 ml, micropipetta P200, flaconcini in PP, 3 capillari, 1 piastrina di silice (*Silice gel 60 F<sub>254</sub> Merck*), camera di eluizione, lampada UV, pipetta graduata da 1 ml, pipetta graduata da 10 ml, 2 microsiringhe da 50  $\mu$ l.

### ***2.3.3 Sostanze da utilizzare***

Caffeina anidra (*Carlo Erba*  $PM=194.09 \text{ g mol}^{-1}$ ), paracetamolo, (*Sigma*  $PM=151,17$ )  
diacetilmorfina cloridrata, acetato di etile (*Fluka*).

### ***2.3.4 Parte sperimentale***

#### *Preparazione dello standard di caffeina*

**Utilizzando i guanti** pesare su un foglietto di carta da pesata 5 mg di caffeina e portare a volume con acqua deionizzata in un matraccio da 10 ml.

#### *Preparazione dello standard di paracetamolo*

**Utilizzando i guanti** pesare su un foglietto di carta da pesata 5 mg di paracetamolo e portare a volume con acqua deionizzata in un matraccio da 10 ml.

#### *Standard di DAM*

È disponibile già pronto e viene maneggiato solo dal personale tecnico.

È stato preparato sciogliendo 10 mg di diacetilmorfina cloridrata in 3 ml di acqua deionizzata.

#### *Fase mobile*

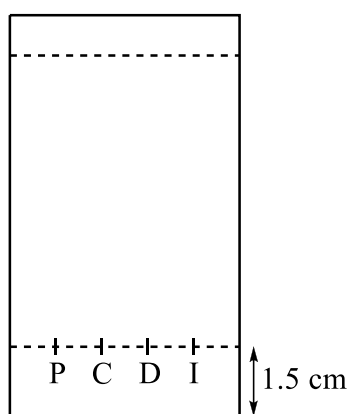
Operando **sotto cappa e con i guanti**, trasferire all'interno della camera di eluizione facendo molta attenzione a **non inalarne i vapori**, 10 ml di acetato di etile.

Chiudere con l'apposito coperchio la camera per saturarne l'ambiente con i vapori.

Deposizione delle sostanze:

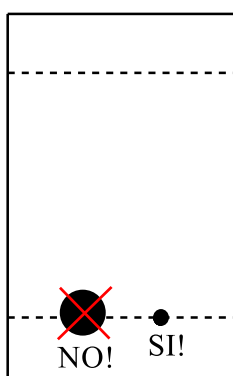
1) Tracciare una linea leggera con una matita a circa 1 cm da una delle due estremità di una lastrina di silice. Questo sarà il punto in cui depositare le sostanze per effettuare la corsa cromatografica.

2) Sempre con una matita indicare sulla linea quattro punti equidistanti e contrassegnarli al di sotto della linea con le sigle identificative dei tre standard e del campione che si vuole analizzare. (Vedi immagine).



3) Immergere un capillare all'interno di uno standard e lasciare che il liquido salga all'interno di esso per capillarità circa fino alla seconda tacca (2  $\mu$ l). Depositare il liquido sulla piastra sul punto in corrispondenza della sua sigla.

**NB:** Evitare che la macchia si allarghi troppo. Depositare quindi poco liquido alla volta, lasciando ogni volta evaporare l'acqua prima di depositare nuovamente. (Vedi immagine).



- 4) Effettuare la stessa operazione anche per gli altri due standard e per il campione.
- 5) Quando tutte le macchie sono asciutte inserire la piastrina delicatamente all'interno della camera di eluizione facendo in modo che rimanga il più verticale possibile. **NB:** Evitare il contatto della piastrina con la parete interna della camera. Chiudere subito col coperchio.
- 6) Osservare la corsa della fase mobile che sale lungo la piastrina e quando è quasi arrivata in cima estrarre la piastrina dalla camera e richiuderla. **NB:** Evitare che la fase mobile arrivi all'estremità della piastrina.
- 7) Prima che sia asciutta tracciare con una matita la linea che contraddistingue il fronte del solvente e misurare con un righello la distanza totale percorsa dal solvente, cioè la distanza compresa tra le due linee.
- 8) Quando la piastrina è **asciutta** illuminarla con la lampada UV presente in laboratorio e tracciare i contorni delle macchie che compaiono. Per ogni macchia misurare la distanza dalla linea di partenza ed annotarla.

### RISULTATI

È ora possibile identificare il campione analizzato confrontando la sua corsa con quella degli standard.

Si calcoli l' $R_f$  percentuale per ogni macchia visualizzata in seguito alla corsa cromatografica.

## INDICE

<b>1. RICERCA DI TRACCE DI SANGUE MEDIANTE LUMINOLO.....</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Introduzione .....</i>	<i>1</i>
1.2 <i>Il sangue.....</i>	<i>1</i>
1.3 <i>La luminescenza .....</i>	<i>1</i>
1.4 <i>I composti organici.....</i>	<i>2</i>
1.5 <i>Le proteine .....</i>	<i>2</i>
1.6 <i>Le ossidoriduzioni .....</i>	<i>2</i>
1.7 <i>I catalizzatori .....</i>	<i>2</i>
1.8 <i>Il pH.....</i>	<i>3</i>
1.9 <i>La chemiluminescenza del luminolo.....</i>	<i>3</i>
1.10 <i>Le unità di concentrazione .....</i>	<i>4</i>
1.11 <i>Interferenze nella ricerca di sangue mediante luminolo.....</i>	<i>4</i>
1.12 <i>Procedura sperimentale per la ricerca di emoglobina mediante luminolo.....</i>	<i>6</i>
1.12.1 <i>Introduzione .....</i>	<i>6</i>
1.12.2 <i>Materiale da utilizzare .....</i>	<i>6</i>
1.12.3 <i>Sostanze da utilizzare .....</i>	<i>6</i>
1.12.4 <i>Parte sperimentale .....</i>	<i>6</i>
<b>2. RICONOSCIMENTO DI DROGHE MEDIANTE TLC .....</b>	<b>8</b>
2.1 <i>Le droghe .....</i>	<i>8</i>
2.2 <i>La cromatografia su strato sottile (TLC).....</i>	<i>8</i>
2.3 <i>Procedura sperimentale per la TLC di: caffeina, paracetamolo, diacetilmorfina .....</i>	<i>10</i>
2.3.1 <i>Introduzione .....</i>	<i>10</i>
2.3.2 <i>Materiale da utilizzare .....</i>	<i>10</i>
2.3.3 <i>Sostanze da utilizzare .....</i>	<i>11</i>
2.3.4 <i>Parte sperimentale .....</i>	<i>11</i>