

**TESINA PER L'ESAME DI STATO
A.S. 2017/2018**

Antropologia Forense

di *Alessia Terzano*

Viaggio nell'uomo attraverso Amleto

Il presente contributo, elaborato dalla **studentessa Alessia Terzano** dell'ITIS Galileo Galilei di Roma, è connesso alle attività scientifiche e laboratoriali svolte durante lo **"Stage a Tor Vergata"** - promosso dal Piano nazionale Lauree Scientifiche e tenuto presso i laboratori della Macroarea di Scienze MFN dell'**Università degli Studi di Roma Tor Vergata** in due fasi:

- Stage Estivo dal 12 al 16 giugno 2017;
- Stage Invernale dal 12 al 16 febbraio 2018.

Le attività didattiche previste nel Programma dello Stage sono state realizzate in cinque gruppi di ricerca, guidati da docenti dell'Università di Roma Tor Vergata.

Il responsabile scientifico del Modulo "Antropologia Forense"

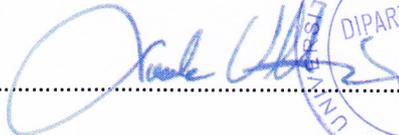
Prof.ssa Cristina Martinez-Labarga

.....



Il Direttore degli "Stage a Tor Vergata"

Prof. Nicola Vittorio

.....



3. Il mistero dell'uccisione del Re

Nella quinta scena del primo atto Amleto incontra il fantasma di suo padre che gli rivela la verità sulla sua morte.

"[...] fu messa in giro la voce che un serpente mi punse mentre dormivo in giardino; così tutta la pubblica opinione danese viene sconciamente ingannata da una falsa versione della mia morte; tu devi sapere, nobile giovane: il serpente che trafisse la vita di tuo padre, ora porta la sua corona. [...]"

Il Re non fu quindi morso da un serpente velenoso, ma fu ucciso dal suo stesso fratello, Claudio, che ora indossa la sua corona e ha sposato Gertrude. Più avanti il fantasma descrive precisamente come il delitto ha avuto luogo.

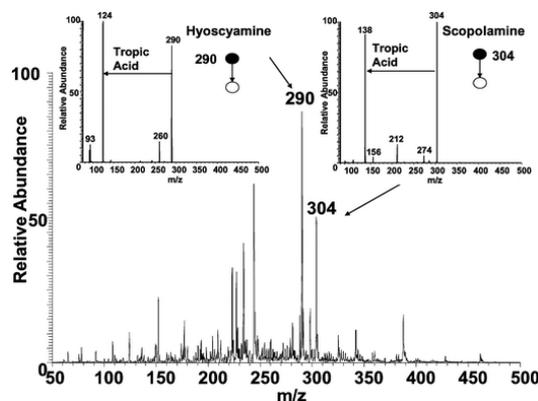
Il defunto re sostiene che Claudio, mentre stava tranquillamente dormendo in giardino, gli abbia versato nell'orecchio del veleno che lo ha portato alla morte. Il veleno è stato capace di uccidere il re in quanto l'orecchio e la gola sono strettamente collegati dalla tuba di Eustachio, un condotto che mette in collegamento il rinofaringe (la parte superiore della faringe) con l'orecchio medio.

Mentre al tempo di Amleto è servito l'intervento di un fantasma per svelare il mistero della morte del Re di Danimarca oggi possediamo tutte le tecnologie e conoscenze per determinare la causa di morte e il colpevole di un omicidio.

CAPIRE LA CAUSA DI MORTE ATTRAVERSO LA BOTANICA FORENSE

Dopo aver esaminato il corpo, e non aver individuato ferite letali, la causa del decesso può restringersi a due opzioni: morte per cause naturali o per avvelenamento.

Nel secondo caso, quello del presunto avvelenamento, si può ricorrere alle competenze del botanico forense. Può essere richiesta un'analisi del contenuto intestinale dell'individuo deceduto e tra le metodologie d'indagine, la tecnica maggiormente utilizzata è la **gascromatografia associata a spettrometria di massa** (tecnica descritta nel paragrafo successivo).



Il risultato di ogni analisi è un cromatogramma (il grafico in figura), nel quale ogni picco indica una molecola che lo strumento ha riconosciuto come tale, ma a differenti percentuali di similarità (ovvero quanto somiglia quella molecola al suo standard di

At

riferimento). Studiando l'insieme di questi composti chimici rilevati, il botanico forense è in grado di fornire supporto alle indagini scientifiche dando preziose informazioni sull'ingestione di bevande/alimenti di natura vegetale consumati dall'individuo prima di morire, e sull'assunzione di sostanze tossiche, velenose e/o medicamentose.

Per avere dei risultati significativi è necessario prendere in considerazione solo le molecole con una percentuale di similarità maggiore dell'85%.

Nel nostro caso, il Re Amleto, come accennato in precedenza, venne ucciso dal fratello, per avvelenamento, tramite inserimento di una sostanza velenosa, che Shakespeare chiama "habenon", nell'orecchio.

Non possiamo essere certi a quale sostanza lo scrittore si riferisse realmente, ma un candidato plausibile potrebbero essere le molecole contenute nel **giusquiamo** (*Hyoscyamus niger*).

Il giusquiamo è una pianta che fa parte della stessa famiglia delle patate, del tabacco e del pomodoro: in piccole quantità viene utilizzato in medicina per combattere disturbi a livello gastrointestinale. Il suo componente principale è la ioscina, la quale, assunta in dosi molto elevate, può risultare letale per gli esseri umani.

Nel 1918, un ricercatore della John Hopkins University, David Macht, ha studiato l'assorbimento attraverso varie parti del corpo di sostanze stupefacenti e di medicazioni; il ricercatore ha notato che una blanda tintura di giusquiamo veniva utilizzata anche per curare il mal d'orecchio, proprio attraverso l'applicazione sull'orecchio stesso. In uno studio molto più recente, risalente al 2002, il ricercatore argentino Basilo Aristidis Kotsias ha ipotizzato che Claudio, fratello di Amleto, fosse venuto a conoscenza del fatto che il re soffriva di perdita di udito e che tale patologia potesse essere medicata tramite l'uso di questa sostanza. Pertanto, Claudio avrebbe sfruttato il noto uso medicinale di questa sostanza naturale per uccidere il fratello e impossessarsi del regno. Quindi tornando all'analisi del contenuto intestinale, il nostro presunto cromatogramma presenterebbe almeno un picco con percentuale di similarità superiore all'85% di molecole contenute nel giusquiamo (es. ioscina) che ci permetterebbe di ipotizzare con ragionevole certezza che la morte è avvenuta per avvelenamento.

SISTEMA GASCROMATOGRAFICO ASSOCIATO A SPETTROMETRO DI MASSA

La gascromatografia è una tecnica analitica utile per separare componenti o soluti di una miscela. Il dispositivo utilizzato per tale tecnica è composto da una sorgente di gas di trasporto, un iniettore, una colonna capillare gascromatografica inserita in un forno e un rivelatore.

La sostanza da esaminare prima di essere iniettata nel capillare deve andare incontro ad un processo di purificazione. Successivamente il campione viene iniettato, tramite l'utilizzo di una microsiringa, in una camera di vaporizzazione (calda) posta in testa alla colonna. La colonna capillare è il cuore del sistema gascromatografico, dove avviene la separazione delle sostanze. È costituita da un tubo impaccato di silice con diametro interno di 0,1-0,5 mm e una lunghezza di decine di metri.

La colonna capillare è costituita da due fasi: una fase fissa, depositata lungo le pareti interne della colonna, e una fase mobile, ovvero il gas di trasporto che attraversa la colonna. Il gas di trasporto ha la funzione di trasportare le molecole della sostanza e i più utilizzati sono, ad esempio, l'elio, l'idrogeno, o l'argon. Questi sono gas inerti che non reagiscono con le molecole trasportate.

Per poter ottenere risultati precisi e ripetibili, la temperatura del forno dove si trova la colonna deve essere controllata con la precisione del decimo di grado. Normalmente la temperatura della colonna è regolata sul valore corrispondente alla media dei punti di ebollizione dei componenti della miscela.

Subito dopo il termine della colonna troviamo il rivelatore (o detector) che ha la funzione di indicare la presenza del componente in uscita della colonna, e di fornire la misura della concentrazione di esso nel gas di trasporto. Il rivelatore poi traduce la presenza di una sostanza in segnale elettrico.

Lo spettrometro di massa rappresenta il rivelatore ideale per la gascromatografia perché permette di analizzare in tempo reale i singoli picchi in uscita dalla colonna, effettuando sia un'analisi qualitativa che quantitativa, mediante il confronto dello spettro ottenuto con quelli memorizzati nella banca dati.

Lo spettrometro è formato da un sistema di entrata, una sorgente ionica in cui le molecole neutre vengono trasformate in ioni e si frammentano, l'analizzatore in cui gli ioni vengono separati in funzione del rapporto massa/carica ed, infine, il rivelatore, in cui gli ioni vengono raccolti ed i segnali inviati, dopo la loro amplificazione, a un registratore che converte le informazioni contenute nei segnali in uno spettro.

Nelle analisi GC-MS, sono alla fine disponibili due dati sufficienti e fondamentali per l'identificazione e la quantificazione di un composto ignoto: il tempo di ritenzione (il tempo che ogni soluto passa all'interno della colonna), e lo spettro di massa (un diagramma di abbondanza ionica in funzione del rapporto massa/carica).

Ogni molecola ha una frammentazione unica e caratteristica che, come una vera e propria impronta digitale, ci permette di identificare e di risalire alla molecola madre. Gli ioni e la loro intensità relativa permettono di stabilire peso molecolare e struttura del composto in esame.

Il cromatogramma è la rappresentazione bidimensionale, in funzione del tempo, della quantità di sostanza che esce dalla colonna. Il tempo intercorso tra l'inizio dell'esperimento e la rivelazione di una sostanza, viene definito tempo di ritenzione.

INDIVIDUARE IL COLPEVOLE CON LA GENETICA FORENSE

Sulla scena del crimine è possibile rilevare eventuali tracce genetiche utili per riuscire a identificare il colpevole.

La prima cosa da fare è cercare queste tracce (es. sangue, saliva, capelli, impronte digitali ecc.), successivamente sarà necessario specificare la quantità, e la qualità dei reperti in modo da applicare le analisi appropriate.

Identificare una persona è possibile tramite l'analisi di sequenza di DNA o dell'identificazione del numero di volte che si trova una sequenza ripetitiva. Il numero di sequenze ripetute nel genoma variano da persona a persona. Durante l'analisi non è importante quali siano le sequenze ripetute, ma il loro numero.

Una volta acquisita la traccia e averne identificato la natura, si procede con l'**estrazione del materiale genetico**. Successivamente è necessario amplificare il DNA estratto grazie alla tecnica della **PCR**, una tecnica enzimatica per la rapida produzione di milioni di copie di un particolare tratto di DNA in vitro. Per eseguire la PCR è necessario denaturare il DNA che servirà da stampo, i due primers o inneschi che sono complementari alle estremità del tratto d'interesse dei due frammenti opposti della molecola, i nucleotidi e la DNA polimerasi. Questa miscela viene inserita in una macchina che ripete una serie di cicli di una specifica sequenza di temperature:

- la miscela di reazione viene scaldata a 95°C in modo da separare i filamenti di DNA prodotto dallo stampo;
- la temperatura scende, in questo modo gli inneschi si ibridano;
- a circa 72°C, dà avvio a una fase di sintesi della sequenza stampo.

Questo ciclo viene ripetuto molte volte fino ad arrivare alla sintesi di milioni di copie del segmento di DNA di partenza.

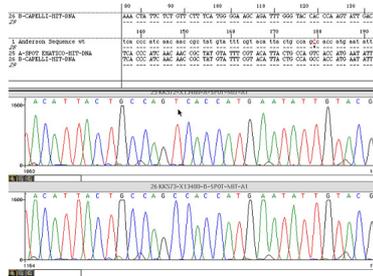
Una volta amplificato il tratto si procede con il **sequenziamento**, una procedura che permette di estrarre il corredo genetico di un individuo e che quindi fornisce la sequenza precisa di basi che compongono il filamento. Come prima cosa è necessario denaturare nuovamente il filamento. Il tratto di filamento denaturato viene poi inserito in una miscela contenente uno dei primer, la DNA polimerasi, le dNTP (che portano le basi azotate) e le ddNTP.

Le ddNTP, anche chiamati terminatori, sono dei nucleotidi modificati che arrestano la sintesi del DNA sostituendo i normali nucleotidi in posizione 3'. I terminatori possono essere di quattro diverse tipologie, ognuna in grado di bloccare la reazione di sintesi all'altezza di ciascuno dei quattro diversi nucleotidi. Ogni terminatore viene marcato con un gruppo fluorescente che emette un determinato colore se illuminato da un laser.

Dopo aver inserito il filamento nella miscela sopra descritta, la DNA polimerasi inizierà a legare i nucleotidi "normali" al tratto di DNA fino a quando un nucleotide non verrà sostituito un ddNTP provocando il distacco della polimerasi. Il distacco avviene in quanto i ddNTP non possiedono un gruppo ossidrilico (OH), ma solo un idrogeno (H), per questo il nucleotide non viene riconosciuto dalla DNA polimerasi che interrompe la sintesi del filamento. Concluse le reazioni di sintesi saremo in possesso di frammenti di DNA con lunghezze differenti, a questo punto si effettua un'elettroforesi su gel o capillare di acrilammide che permetterà di separare i vari frammenti. Il macchinario utilizzato per questa tecnica è formato da un capillare sottoposto a campo elettrico. Il DNA tenderà a



migrare verso il catodo per via della sua componente fosforica che gli fornisce carica negativa. Arrivato al catodo il campo elettrico eccita il marcatore presente nei ddNTP e il dispositivo capta i segnali registrando i vari nucleotidi. Il primo frammento che verrà letto dal macchinario sarà il più corto della serie e l'ultimo il più lungo, in questo modo è possibile trovare l'intera sequenza del filamento analizzato che sarà complementare alla sequenza ricercata.



(Esempio di una sequenza di DNA mitocondriale)

Infine, confrontando il profilo ottenuto dall'analisi appena descritta con quello dei sospettati, è possibile identificare a chi appartiene la traccia trovata, e di conseguenza l'identità del colpevole.

St