



UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Chimica

Direttore Prof. Mauro Freccero

Corso di Laurea Magistrale in Chimica

**Studio dell'assorbimento di ricina e
RCA120 su resina selettiva α -lattosio-
agarosio**

Relatore:

Prof. Daniele Merli

Correlatore:

Dr.ssa Roda Elisa

Dr.ssa Rotolo Antonella

Tesi di Laurea Magistrale di

Fabio Perelli

Anno Accademico 2024/2025

Sommario

ABSTRACT	5
1 INTRODUZIONE	8
1.1 La ricina.....	8
1.1.1 Struttura molecolare	8
1.1.2 Stabilità e conservazione	9
1.1.3 Citotossicità e meccanismo d'azione	10
1.1.4 Attività tossica, sintomi e trattamento.....	11
1.1.5 Metodi di analisi e identificazione attualmente impiegati.....	12
1.1.6 Bioterrorismo e rilevanza forense.....	13
1.1.7 Olio di ricino, filiera industriale e Piano Mattei.....	14
1.1.8 Quadro regolatorio su pianta, parti e derivati	14
1.2 Tecniche analitiche.....	15
1.2.1 Assorbanza intrinseca in UV-Vis	16
1.2.2 Fluorescenza UV intrinseca	16
1.3 Modelli cinetici per processi di adsorbimento e desorbimento.....	17
2 PARTE SPERIMENTALE	18
2.1 Materiali e strumenti.....	18
2.2 Reagenti	19
2.3 Procedure	20
2.3.1 Preparazione delle soluzioni.....	20
2.3.2 Prove preliminari	20
2.3.3 Prove di recupero.....	21
2.3.4 Analisi dei campioni allo strumento	22
2.3.5 Determinazione della concentrazione minima di lattosio	22
2.3.6 Cinetiche di adsorbimento	24
2.3.7 Cinetiche di desorbimento	25
2.3.8 Prove a pH variabile	25
2.3.9 Prove a forza ionica variabile	26
2.3.10 Prove in albumina	26
2.3.11 Prove in matrice reale	28

3	RISULTATI	28
3.1.1	PROVE PRELIMINARI.....	28
3.1.2	ELABORAZIONE DEI DATI DI ASSORBANZA	30
3.1.3	Cinetica di adsorbimento.....	32
3.1.4	Cinetica di desorbimento.....	36
3.1.5	Modelli cinetici.....	39
4	CONCLUSIONI.....	48
	BIBLIOGRAFIA.....	49

ABSTRACT

This Master's thesis investigates the adsorption and desorption kinetics of ricin and *Ricinus communis* agglutinin (RCA120) on a selective α -lactose-agarose resin, aiming to optimize an analytical protocol for their detection in complex biological matrices. The study addresses the chemical-analytical challenges posed by these structurally similar lectins from *Ricinus communis* seeds, emphasizing their toxicological relevance and forensic importance. The work systematically explores the dual-use nature of *Ricinus communis* L., an Euphorbiaceae plant valued industrially for castor oil production yet producing highly toxic lectins as byproducts. Ricin is a heterodimeric AB toxin glycoprotein (62–65 kDa) composed of an enzymatic A-chain, acting as an RNA N-glycosidase that depurinates 28S rRNA and inhibits protein synthesis, linked via disulfide bonds to a B-chain with galactose-specific lectin activity responsible for cellular entry. RCA120 is instead a heterotetrameric protein (~120 kDa) consisting of two ricin-like AB units, showing lower cytotoxicity but stronger hemagglutination due to enhanced erythrocyte binding. Despite functional differences, both proteins share high structural homology, which complicates selective analytical discrimination, with seed contents averaging ~9.3 $\mu\text{g}/\text{mg}$ for ricin and ~9.9 $\mu\text{g}/\text{mg}$ for RCA120 depending on cultivar. From a toxicological perspective, ricin potency is highly dependent on the exposure route, with inhalation and injection being significantly more lethal than ingestion, where mastication of seeds affects toxin release, or dermal exposure with intact skin. Clinical manifestations following ingestion include oropharyngeal irritation, abdominal pain, nausea, vomiting, and diarrhea, progressing to lethargy, dehydration, metabolic imbalance, and ultimately multi-organ failure, with onset ranging from 15 minutes to 36 hours. No specific antidote is currently approved, and treatment remains supportive, focusing on decontamination, hydration, and clinical monitoring. RCA120, although less cytotoxic due to reduced cellular uptake efficiency, can still interfere with analytical workflows due to immunological cross-reactivity in immunoassays. Stability of both proteins requires controlled conditions, including pH 4–8 for short-term handling, buffered environments such as PBS or TRIS at pH 6.8–7.7 for storage, ionic strengths up to 500 mM NaCl, temperatures maintained at or below 4°C with freezing at –20°C acceptable in the absence of resin binding, and sonication protocols at 50–60°C for ≤ 20 minutes to disrupt aggregates above 500–600 ppm, with 0.02% NaN₃ used to

prevent microbial degradation. In the analytical context, current strategies combine immunoassay-based screening methods such as ELISA, which offer high sensitivity in the pg/mL range but suffer from cross-reactivity, with confirmatory LC-MS/MS analysis of tryptic peptides enabling discrimination between ricin isoforms (D/E) and RCA120, typically preceded by lectin enrichment using lactose-agarose affinity resins. UV-Vis detection at 280 nm, based on aromatic amino acid absorbance and calibrated extinction coefficients ($1.16 \text{ mL} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ for RCA and 1.17 for ricin), provides more reliable quantification compared to fluorescence methods affected by low signal and autoabsorption or peptide bond absorbance in the 205–225 nm range, which is prone to interference. The biosecurity relevance of these proteins derives from ricin's classification as a Schedule 1 substance under the Chemical Weapons Convention, its historical association with bioterrorism events, and regulatory restrictions on *Ricinus* extracts in nutraceutical applications, while industrial castor oil processing denatures toxins in lipid fractions although residual contamination risks remain relevant in agricultural supply chains. The experimental design employed centrifugation systems, UV-Vis spectrophotometry (Shimadzu UVmini-1240), quartz cuvettes, and 50% α -lactose-agarose slurry with a binding capacity of approximately 30 mg lectin/g, using reagents such as PBS at pH 7.4, lactose monohydrate, BSA, NaCl, and NaN_3 , as well as human serum and urine to simulate real biological matrices. The protocol optimized resin-to-sample ratios of 25 mg/mL, conditioning and washing steps in PBS, adsorption under agitation for 10 minutes, washing phases, and desorption using 25 mM lactose in two 5-minute cycles, with preliminary UV-Vis and fluorescence measurements confirming quantification at 280 nm using $A_{280} - A_{320}$ baseline correction and subtraction of NaN_3 contributions. The minimum effective eluent concentration was established at 50 mM lactose, achieving high recovery yields without affecting LOD or LOQ, while kinetic experiments spanned 15–200 ppm concentrations with adsorption times between 20 seconds and 30 minutes and desorption within 10 minutes at 35 rpm. Additional variables included pH (3–9), ionic strength variations (PBS vs. 30% PBS/0.15 M NaCl), BSA concentrations from 1–10% to simulate protein-rich fluids, and validation in serum and urine matrices. Key results demonstrated strong absorbance at 225 nm with interference effects and stable 280 nm signals for both analytes after correction, while adsorption kinetics showed rapid initial uptake followed by a plateau

within 30 minutes corresponding to over 90% recovery in eluates, with minimal dependence on initial concentration shape but proportional scaling with resin capacity. Desorption occurred more rapidly, reaching equilibrium within 10 minutes with the first eluate fraction contributing the majority of recovered analyte. Kinetic modeling indicated that particle diffusion ($k_{pd} \sim 0.22\text{--}0.28 \text{ min}^{-2}$ for both analytes) better described the system than film diffusion, highlighting intraparticle transport limitations within agarose pores as the rate-limiting step. High recovery rates were maintained across pH 5–9, varying ionic strengths, and in the presence of BSA, confirming selectivity against albumin interference, while real serum and urine samples spiked at 50–100 ppm produced recoveries comparable to buffer systems. Overall, the α -lactose-agarose resin demonstrated efficient and selective preconcentration of ricin and RCA120, with diffusion-controlled kinetics suitable for rapid sample cleanup prior to ELISA or LC-MS/MS analysis, and the predominance of particle diffusion provides important insight for potential scale-up and method optimization, confirming robustness across complex biological matrices and supporting reliable forensic and diagnostic detection of these toxic lectins.

1 INTRODUZIONE

1.1 La ricina

Ricinus communis L. è una Euphorbiaceae di rilevante interesse industriale per la produzione di olio di ricino, ma i suoi semi rappresentano anche la principale fonte naturale di due lectine tossiche strettamente correlate: la ricina e l'RCA120, comunemente indicata come RCA. Oltre a queste proteine, i semi contengono anche ricinina e acido clorogenico. Dal punto di vista chimico-analitico e tossicologico, la distinzione tra ricina e RCA120 è fondamentale, poiché le due molecole condividono un'elevata similitudine strutturale ma differiscono in modo netto per organizzazione strutturale quaternaria, attività tossica, comportamento emoagglutinante e rilievo forense (Rotolo et al., 2025; Worbs et al., 2015).

La letteratura più recente sottolinea inoltre che il *Ricinus communis* L. è tipicamente dual use: la stessa pianta che alimenta una filiera industriale di notevole valore economico genera, come sottoprodotto o contaminante della lavorazione dei semi, una tossina di grande interesse in tossicologia clinica, sicurezza chimica e biosicurezza. Questa duplice natura rende necessario trattare congiuntamente aspetti strutturali, meccanicistici, analitici, applicativi e regolatori (Fredriksson et al., 2005; Rotolo et al., 2025; Worbs et al., 2015).

1.1.1 Struttura molecolare

La ricina è una glicoproteina eterodimerica appartenente alla famiglia delle tossine AB, formata da due subunità, legate da ponti di solfuro. La catena A è responsabile dell'attività enzimatica mentre invece la catena B possiede delle proprietà di riconoscimento verso i ligandi glucidici. La massa molecolare complessiva ricade approssimativamente nell'intervallo 62–65 kDa, mentre le singole subunità hanno masse di circa 30–36 kDa ciascuna. (Simmons and John & Russell, 1985; Kumar et al., 2004; Worbs et al., 2015)

RCA120 (*Ricinus communis* agglutinina) presenta invece un'organizzazione oligomerica più complessa. Consiste in una proteina di circa 120 kDa costituita da due unità ricin-like A-B associate tra loro, ovvero come un'agglutinina eterotetramerica composta da due eterodimeri. Le singole subunità hanno masse dell'ordine di 30–35 kDa ciascuna. Rispetto alla ricina, la RCA è indicata come meno tossica, poiché presenta minore

capacità di adsorbirsi sulle cellule, ma dotata di una più marcata capacità emoagglutinante, ovvero stabilisce dei legami con gli eritrociti formando degli aggregati. Poiché RCA e ricina condividono subunità molto simili ne consegue che presentano alcune proprietà equivalenti, come succede ad esempio nelle interazioni specifiche che spesso non distinguono una molecola dall'altra. (Schieltz et al., 2015; Worbs et al., 2015; Thomas & LI Steven, 1980; Woo et al., 1998)

La pianta del ricino produce maggiormente due isoforme della ricina, in particolare ricina D, la principale e ricina E. Questa distinzione è rilevante solo nel caso in cui si usino cromatografie di affinità che impieghino Sepharose® come fase stazionaria poiché la ricina E è nota essere una specie con minor affinità per questo ligando rispetto alla ricina D. Le due isoforme presentano una tossicità simile nonostante quella della ricina D sia leggermente inferiore. Esistono anche altre microisoforme della ricina D, ovvero strutture con differenze minime prodotte da particolari cultivar della pianta. Tuttavia, poiché questo studio di tesi non utilizza Sepharose® come cromatografia di affinità non si farà alcuna distinzione tra le varie isoforme di ricina che invece verrà distinta da RCA vista la grande differenza di tossicità. (HEGDE & PODDER, 1992; Woo et al., 1998; Worbs et al., 2015)

1.1.2 Stabilità e conservazione

L'attività biologica delle proteine e la loro capacità di interagire in modo specifico sono strettamente legate al mantenimento della struttura nativa. Poiché tale conformazione può essere compromessa, spesso in modo irreversibile, è fondamentale garantire condizioni sperimentali idonee durante le fasi di estrazione, preparazione e stoccaggio dei campioni. In particolare, il controllo rigoroso di parametri quali temperatura, pH e forza ionica risulta determinante per preservare la stabilità e la funzionalità delle macromolecole in esame. (Srinivas et al., n.d.)

Durante le procedure di purificazione ed estrazione, si è visto dalla letteratura scientifica che sono tollerate concentrazioni saline contenenti 500 mM di NaCl e 250 mM di lattosio.

Per il pH si adottano principalmente tamponi come il TRIS o il PBS con pH compresi tra 6.8 e 7.7 sul lungo periodo, come ad esempio lo stoccaggio, mentre sul breve termine, come la preparazione dei campioni e una successiva analisi è possibile mantenere valori

di pH compresi tra 4 e 8 senza incorrere in unfolding. Uscendo da questo range la capacità di legare galattosidi si riduce. (Bushueva & Tonevitsky, 1987; Zentz, Frénoy, et al., 1978)

Per quanto riguarda la temperatura si conservano le soluzioni madri e i campioni a 4 °C o si possono addirittura congelare a -20 °C se le proteine non sono legate a resine o a zuccheri.

Quando la concentrazione supera 500-600 ppm RCA e ricina tendono a formare degli aggregati che precipitano. In quel caso si può riscaldare e sonicare fino a 50-60 °C per un tempo massimo di 20 minuti prima che le proteine inizino a degradare. (Frénoy et al., 1986; Jackson et al., 2006)

Per evitare che l'attività microbica o fungina degradi le proteine, è bene aggiungere NaN_3 0.02 % alle soluzioni di RCA e ricina. (Rotolo et al., 2025) (Feldberg et al., 2021; Fredriksson et al., 2005; Kato et al., 2011; Simmons and John & Russell, 1985; Woo et al., 1998; Zentz, Frénoy, et al., 1978)

1.1.3 Citotossicità e meccanismo d'azione

L'attività tossica della ricina dipende dall'azione complementare delle due subunità. La catena B, in quanto possiede natura lectinica, riconosce strutture glucidiche presenti sulla superficie cellulare e consente la traslocazione della tossina nella cellula. Secondo alcuni articoli in letteratura è possibile che, dopo l'ingresso all'interno della cellula, il complesso venga convogliato fino a compartimenti nei quali la coppia A-B può essere ridotta e separata nelle due subunità. (Olsnes & Pihl, 1973) (Fredriksson et al., 2005; Worbs et al., 2015)

La catena A esercita la funzione citotossica. Essa agisce come una RNA N-glicosidasi capace di rimuovere una adenina specifica dall'rRNA 28S (parte integrante della subunità ribosomiale maggiore). Questa depurinazione impedisce il legame del fattore di elongazione 2 (EF-2), la proteina che catalizza la traslocazione del ribosoma durante la sintesi della catena polipeptidica. L'inibizione di questo passaggio interrompe la sintesi proteica, portando alla morte cellulare. Da un punto di vista biochimico, la tossicità della ricina deriva quindi dall'inattivazione catalitica del ribosoma e dalla successiva compromissione irreversibile della biosintesi proteica cellulare. Simili meccanismi tossicologici sono stati trovati anche in altre tossine estremamente letali, come quella

difterica. (Fredriksson et al., 2005; Murphy, 2011; Olsnes & Pihl, 1973; Schieltz et al., 2015)

1.1.4 Attività tossica, sintomi e trattamento

La gravità della tossicità dipende principalmente dalla via di esposizione. Le vie più pericolose sono l'inalazione e l'iniezione, mentre l'ingestione della tossina è relativamente più debole e l'assorbimento attraverso la cute integra è improbabile. Nelle intossicazioni da assunzione orale di semi di ricino, il rilascio della tossina dipende principalmente dal grado di masticazione dei semi. Dal punto di vista quantitativo, la massa di ricina e RCA120 nel seme varia in funzione della cultivar e delle condizioni di coltivazione. In media, la ricina è stata trovata intorno a 9.3 mg/g di seme, mentre l'RCA120 si colloca intorno a 9.9 mg/g. (Schieltz et al., 2015)

Questi dati sono particolarmente importanti perché indicano che, nel materiale vegetale grezzo, la ricina non è presente come tossina isolata ma in associazione con una lectina simile a livello strutturale che può interferire sia con le determinazioni immunochimiche sia con la valutazione del rischio tossicologico (Rotolo et al., 2025; Schieltz et al., 2015)

Il quadro clinico iniziale, in seguito ad ingestione di semi, è dominato da irritazione orofaringea, dolore addominale, nausea, vomito e diarrea; nelle forme più severe possono comparire letargia, confusione, disidratazione, squilibri metabolici e insufficienza multiorgano. L'esordio dei sintomi può avvenire da circa 15 minuti fino a 36 ore dopo l'assunzione, mentre nei casi non letali il recupero avviene spesso nell'arco di alcuni giorni (Rotolo et al., 2025)

Per quanto riguarda il trattamento, attualmente non esiste un antidoto approvato né una terapia standardizzata. La gestione clinica resta quindi prevalentemente di supporto e dipende dalla via di esposizione e dalla gravità del quadro: decontaminazione precoce quando possibile, eventuale carbone attivo nelle esposizioni orali, supporto idroelettrolitico, monitoraggio cardio-respiratorio, supporto ventilatorio nelle esposizioni inalatorie o sistemiche e trattamento delle complicanze d'organo. Sebbene siano in sviluppo anticorpi neutralizzanti e altre contromisure, il loro impiego rimane, allo stato

attuale, confinato alla ricerca o a contesti preclinici (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2024; Rotolo et al., 2025)

1.1.5 Metodi di analisi e identificazione attualmente impiegati

L'analisi della ricina rappresenta una sfida significativa perché i campioni reali possono contenere quantità molto basse di tossina, matrici biologiche o ambientali fortemente interferenti e, soprattutto, la lectina omologa RCA120. Per questo motivo, l'identificazione analitica moderna richiede quasi sempre un approccio complementare, in cui metodi di screening sensibili sono affiancati da tecniche di conferma ad elevata specificità (Fredriksson et al., 2005; Rotolo et al., 2025; Worbs et al., 2015)

Gli approcci immunochimici, in particolare ELISA ed elettrochemiluminescenza, restano ampiamente utilizzati per lo screening grazie alla semplicità operativa e all'elevata sensibilità. Su materiali di riferimento altamente purificati, ELISA sandwich selettivi hanno mostrato limiti di rilevazione nell'ordine dei pg/mL per ricina e RCA120; tuttavia, l'alta omologia strutturale tra i due analiti comporta una cross-reattività residua che limita la piena specificità in campioni complessi o in miscele concentrate [1,2]. In ambito clinico, un protocollo che combina purificazione su α -lattosio-agarosio, concentrazione, GPC (cromatografia a permeazione di gel) ed ELISA ha mostrato un LOD di 2,74 ng/mL e un LOQ di 3,9 ng/mL, consentendo la quantificazione di ricina e RCA120 in plasma e urina in meno di cinque ore (Rotolo et al., 2025)

La spettrometria di massa, soprattutto nella variante LC-MS/MS sui peptidi tripsinici, costituisce invece il riferimento per l'identificazione selettiva e per la distinzione tra le due isoforme più comuni della ricina (denominate D ed E) e RCA120. Il MALDI-TOF può essere utile come strumento di screening o di supporto nella caratterizzazione di preparazioni relativamente pure, ma non offre, da solo, sensibilità e affidabilità sufficienti per campioni clinici a bassa concentrazione. L'analisi LC-MS/MS dei peptidi marker, invece, permette una identificazione forense inequivoca, anche in estratti grezzi, e consente di differenziare le isoforme e la contaminazione da RCA120 (Fredriksson et al., 2005; Worbs et al., 2015)

Un'evoluzione particolarmente rilevante per la chimica analitica applicata è rappresentata dai protocolli che sfruttano la natura lectinica della tossina per una preconcentrazione selettiva. In tal senso, il catturare la ricina su beads di lattosio-agarosio, seguito da

digestione tripsinica e analisi LC–MS/MS in modalità MRM, ha consentito l'identificazione affidabile di 5 ng/mL di ricina in siero umano in circa 2,5 ore. Lo stesso approccio è stato applicato con successo a un campione reale in un caso di autoavvelenamento, dimostrando la pertinenza del metodo anche in matrici biologiche altamente complesse (Feldberg et al., 2021)

1.1.6 Bioterrorismo e rilevanza forense

La ricina è considerata una sostanza di interesse bioterroristico per una combinazione di fattori: elevata tossicità, disponibilità della materia prima vegetale, relativa semplicità di estrazione da preparazioni grezze e assenza di una contromisura terapeutica approvata. In letteratura recente viene descritta come una minaccia chimico-biologica concreta, con numerosi episodi storici e contemporanei di uso criminale o intimidatorio, tra cui l'assassinio di Georgi Markov e il rinvenimento di lettere contaminate inviate a eminenti figure politiche statunitensi (Rotolo et al., 2025; Worbs et al., 2015)

Dal punto di vista forense, la sola dimostrazione immunochimica della presenza di ricina può non essere sufficiente. In un campione sospetto è infatti spesso necessario dimostrare non soltanto la presenza della tossina, ma anche la sua identità molecolare, il grado di purezza, l'eventuale presenza di RCA120 e la persistenza dell'attività biologica. Per questo motivo la letteratura specializzata privilegia strategie integrate che associano saggi di attività, elettroforesi e spettrometria di massa su peptidi marker, così da ottenere un livello di prova compatibile con esigenze di conferma o di attribuzione forense (Fredriksson et al., 2005; Worbs et al., 2015)

Sul piano normativo internazionale, la rilevanza della ricina è ulteriormente confermata dal fatto che la sostanza è esplicitamente inclusa nello Schedule 1 della Chemical Weapons Convention; l'OPCW la identifica infatti tra le tossine sottoposte al livello più alto di controllo convenzionale. La ricina è inoltre compresa anche nel quadro della Biological and Toxin Weapons Convention, con conseguenti implicazioni in materia di detenzione, dichiarazione e uso esclusivamente per scopi limitati e legittimi, quali ricerca, protezione e analisi (OPCW, n.d.; Worbs et al., 2015)

1.1.7 Olio di ricino, filiera industriale e Piano Mattei

L'interesse industriale per *Ricinus communis* dipende soprattutto dall'olio di ricino, una materia prima di notevole valore applicativo per la presenza di acido ricinoleico e per le sue proprietà chimico-fisiche. L'olio trova impiego, tra gli altri, nella produzione di lubrificanti, vernici, rivestimenti, cosmetici e prodotti farmaceutici. La tossina ricina non coincide però con l'olio purificato: durante la lavorazione industriale dei semi, la componente proteica tossica viene denaturata in modo irreversibile a temperature elevate e si concentra piuttosto nelle frazioni solide residue o nelle polveri da lavorazione. Ne consegue che l'olio di ricino raffinato rappresenta un derivato industriale distinto dai semi e dalle frazioni proteiche tossiche, mentre il rischio tossicologico resta più elevato nelle fasi di manipolazione del seme e dei residui di spremitura (Rotolo et al., 2025; Worbs et al., 2015)

In chiave applicativa contemporanea, la filiera del ricino è stata ricondotta anche ai programmi di produzione di agri-feedstock destinati alla bioraffinazione. Le fonti istituzionali italiane descrivono il Piano Mattei per l'Africa come un piano nazionale articolato in sei direttrici di intervento, tra cui agricoltura ed energia [11,12]. Nelle fonti ufficiali Eni, l'unico progetto Eni formalmente ricondotto al Piano Mattei riguarda la produzione di agri-feedstock in Kenya; la stessa documentazione Eni riferisce che in Kenya sono stati coltivati semi di ricino su terreni degradati e che tali semi sono stati certificati come materia prima idonea alla produzione di oli vegetali destinati alle bioraffinerie [13,14]. In questa prospettiva, il ricino entra nel Piano Mattei non come fonte tossicologica, ma come coltura non food inserita in una filiera energetica e industriale che richiede, proprio per la natura della pianta, un attento controllo chimico e gestionale delle parti tossiche e dei residui di lavorazione (Eni, 2024, 2025; Presidenza del Consiglio dei Ministri, n.d., 2025)

1.1.8 Quadro regolatorio su pianta, parti e derivati

Sul piano regolatorio, è essenziale distinguere fra pianta o seme tal quale, tossina purificata e derivati industriali. La ricina, in quanto tossina specificamente elencata, ricade nel quadro di controllo internazionale delle sostanze a massimo rilievo dual use e di non proliferazione, come già ricordato per la Chemical Weapons Convention (OPCW, n.d.). La pianta *Ricinus communis*, invece, rientra in regolazioni settoriali differenti a

seconda dell'ambito d'impiego: agronomico, alimentare, farmaceutico, cosmetico o industriale.

Per quanto riguarda l'ambito nutraceutico italiano, il Ministero della Salute include *Ricinus communis* L., con riferimento a olio e seme, nell'elenco degli estratti vegetali non ammessi negli integratori alimentari (Ministero della Salute, n.d.). Questo dato è particolarmente significativo perché mostra come, sul piano normativo nazionale, il rischio della specie non sia circoscritto al seme intero, ma riguardi anche la possibilità di impiegare derivati in contesti di consumo umano diretto non adeguatamente controllati.

A livello di identificazione di sostanza, l'ECHA descrive il castor oil come un estrattivo e i suoi derivati fisicamente modificati come materiali costituiti prevalentemente dai gliceridi dell'acido ricinoleico (European Chemicals Agency (ECHA), n.d.). Tale definizione è utile perché chiarisce che il derivato industriale olio di ricino va inquadrato come frazione lipidica specifica, distinta sia dalla matrice vegetale integrale sia dalla componente proteica tossica. Da un punto di vista concettuale, quindi, il rapporto tra pianta, parti e derivati richiede una lettura non unitaria ma frazionata: semi e materiale proteico presentano la massima criticità tossicologica; l'olio raffinato appartiene invece a una filiera merceologica differente, pur derivando dalla stessa specie vegetale (European Chemicals Agency (ECHA), n.d.; Ministero della Salute, n.d.; Rotolo et al., 2025).

1.2 Tecniche analitiche

Nel contesto della chimica analitica applicata alle biomolecole, la caratterizzazione di proteine e tossine proteiche richiede l'impiego integrato di tecniche di separazione, spettroscopiche e immunochimiche per sfruttare al meglio i vantaggi delle singole. L'elettroforesi SDS-PAGE consente di valutare massa molecolare apparente, purezza e composizione delle subunità; l'assorbanza intrinseca in UV-Vis e la fluorescenza intrinseca forniscono informazioni rapide rispettivamente sulla concentrazione e sul microambiente dei residui aromatici; la cromatografia di esclusione dimensionale permette di separare specie native in funzione del volume idrodinamico; infine, l'ELISA sandwich rappresenta uno dei principali immunodosaggi per la rivelazione selettiva di antigeni proteici. Di seguito sono riportati i principi teorici essenziali di queste tecniche, con particolare attenzione al loro impiego nello studio di proteine come la ricina e RCA120 (Kumar et al., 2004; LAEMMLI, 1970; Olsnes & Pihl, 1973; Pace et al., 1995; Thomas & LI Steven, 1980; Weber & Osborn, 1969; Wettasinghe et al., 2013; Worbs et al., 2015; Zentz et al., 1978; Andrews, 1965; PORATH & FLODIN, 1959)

1.2.1 Assorbanza intrinseca in UV-Vis

Nel caso delle proteine, l'assorbimento intrinseco nel vicino ultravioletto è dovuto principalmente ai residui aromatici, in particolare triptofano e tirosina, con un contributo minore dei ponti disolfuro; per tale ragione la misura dell'assorbanza a 280 nm rappresenta uno dei metodi più rapidi e non distruttivi, non necessitando di cromogeni per la stima della concentrazione proteica (Pace et al., 1995). Applicando la legge di Lambert-Beer, l'assorbanza risulta proporzionale alla concentrazione, purché sia noto o stimabile il coefficiente di estinzione molare della proteina in esame. Questo approccio è particolarmente utile quando il campione è già sufficientemente puro e quando si desidera monitorare in modo rapido un processo di isolamento o di purificazione come nel caso di questo studio di tesi.

Le misure spettrofotometriche a 205–215 nm basate sull'assorbimento del legame peptidico, consentono una quantificazione sensibile delle proteine indipendentemente dal contenuto in amminoacidi aromatici. Tuttavia, tali lunghezze d'onda sono altamente interferite, poiché numerose molecole non proteiche assorbono nella stessa regione spettrale, rendendo necessario l'uso di correzioni del fondo o metodi alternativi. (Reinmuth-Selzle et al., 2022)

Dal punto di vista analitico, la misura di A_{280} è ampiamente utilizzata per seguire l'eluizione di frazioni proteiche durante procedure cromatografiche, poiché consente una rilevazione continua del contenuto proteico senza modificare il campione. Nella purificazione della ricina, per esempio, l'assorbanza a 280 nm può essere utilizzata per identificare e raccogliere le frazioni contenenti la tossina o l'agglutinina correlata (Kumar et al., 2004). Il principale limite della metodica è la scarsa selettività: la presenza di altre specie assorbenti, come acidi nucleici, composti fenolici o alcuni componenti del tampone, può interferire con la misura. Inoltre, proteine con contenuto aromatico molto diverso possono mostrare assorbanze differenti a parità di concentrazione; di conseguenza, l'accuratezza del metodo dipende dalla conoscenza della composizione della proteina e dall'idoneità della matrice analizzata (Pace et al., 1995).

1.2.2 Fluorescenza UV intrinseca

La fluorescenza intrinseca delle proteine è una tecnica spettroscopica altamente sensibile allo stato conformazionale della macromolecola. Il segnale è dovuto soprattutto ai residui di triptofano, mentre tirosina e fenilalanina forniscono contributi generalmente minori; per questo motivo, la fluorescenza proteica viene spesso acquisita eccitando il campione a 280 nm oppure, quando si vuole privilegiare il solo contributo del triptofano, a circa 295 nm. La posizione del massimo di emissione e l'intensità del segnale dipendono dal microambiente del fluoroforo: residui più esposti al solvente presentano generalmente emissioni spostate verso lunghezze d'onda maggiori, mentre residui sepolti in ambienti idrofobici mostrano emissioni più intense e a lunghezze d'onda inferiori.

Questa sensibilità all'ambiente locale rende la fluorescenza intrinseca particolarmente adatta allo studio di processi di folding e unfolding, di interazioni proteina-ligando e di variazioni conformazionali indotte da pH, temperatura o composizione del mezzo. Nel caso della ricina, studi di equilibrio basati su fluorescenza e polarizzazione della fluorescenza hanno mostrato che il legame con galattosio e lattosio modifica il comportamento spettroscopico della proteina, fornendo informazioni utili sui siti di riconoscimento degli zuccheri e sulle differenze di affinità verso i diversi ligandi (Zentz, Fri~noy, et al., 1978). Dal punto di vista analitico, la fluorescenza presenta il vantaggio di una sensibilità superiore rispetto alla semplice misura di assorbanza, ma richiede maggiore attenzione al controllo di fenomeni di quenching, inner filter effect e fotodegradazione del campione (Zentz, Fri~noy, et al., 1978).

1.3 Modelli cinetici per processi di adsorbimento e desorbimento

Lo studio delle cinetiche di adsorbimento e desorbimento rappresenta un passaggio fondamentale per determinare il tempo necessario al raggiungimento dell'equilibrio e per individuare il modello matematico più adeguato a descrivere il processo. Attraverso tali analisi è possibile comprendere come un analita si distribuisca tra una fase solida e la fase liquida messa a contatto, aspetto particolarmente rilevante nello studio dell'interazione tra proteine, quali ricina e RCA120, e matrici adsorbenti come resine a base di α -lattosio immobilizzato su agarosio. In questi sistemi, infatti, la cinetica complessiva è il risultato dell'interazione tra fenomeni di trasporto di massa e riconoscimento specifico lectina-zucchero.

Tra i modelli cinetici proposti in letteratura, l'Homogeneous Particle Diffusion Model (HPDM) è uno dei più utilizzati per descrivere sistemi di questo tipo, in quanto considera l'adsorbente come se fosse costituito da particelle omogenee all'interno delle quali il trasporto dell'analita avviene prevalentemente per diffusione. Nel caso di proteine come ricina e RCA120, l'interazione con i residui di lattosio è di natura specifica, ma dal punto di vista cinetico risulta rapida; di conseguenza, la velocità complessiva del processo è controllata principalmente da fenomeni diffusivi piuttosto che dalla reazione chimica.

Nel processo di adsorbimento, il trasferimento dell'analita avviene attraverso una sequenza di stadi successivi: dapprima il trasporto dal bulk della soluzione alla superficie della particella, quindi la diffusione attraverso lo strato limite liquido, film

diffusion (FD), seguita dalla diffusione all'interno della matrice porosa, particle diffusion (PD), fino al raggiungimento dei siti attivi. In condizioni sperimentali adeguate, caratterizzate da agitazione continua, come quelle messe in atto per questo studio di tesi, il contributo del trasporto nel bulk risulta trascurabile, mentre invece gli stadi diffusivi rappresentano generalmente i passaggi più lenti e quindi determinanti per la cinetica complessiva.

Nel processo di desorbimento invece, la situazione iniziale risulta invertita: l'analita è già distribuito all'interno della matrice porosa e deve diffondere verso l'esterno prima di essere rilasciato in soluzione. In questo caso, la diffusione intraparticellare assume un ruolo particolarmente rilevante, poiché il trasporto dell'analita è limitato dalla struttura della resina e dalla dimensione delle molecole coinvolte. Studi su sistemi proteina-resina evidenziano come la diffusione nei pori rappresenti frequentemente lo stadio limitante, soprattutto per biomolecole di grandi dimensioni (Chen et al., 2002) dove viene mostrato come la diffusione intraparticellare controlli il trasporto delle proteine in materiali porosi.

Al contrario, la diffusione attraverso il film liquido tende a essere meno influente quando il sistema è opportunamente agitato, poiché la riduzione dello spessore dello strato limite favorisce il trasferimento di massa esterno.

La predominanza relativa tra film diffusion e particle diffusion dipende da diversi parametri, tra cui la dimensione delle particelle, la struttura porosa della matrice e le dimensioni dell'analita. In particolare, nel caso di proteine come ricina e RCA120, la diffusione all'interno di matrici di agarosio risulta rallentata sia dalla dimensione molecolare sia dalla possibile interazione con i siti funzionali.

(Chen et al., 2002; Finch et al., 2013; Sabio et al., 2016)

2 PARTE SPERIMENTALE

2.1 Materiali e strumenti

È stata usata una 5415 R della Eppendorf®® (Milano, Italia) per centrifugare, un Supelco Visiprep SPE (Solid-Phase Extraction) DL collettore da vuoto come sistema per effettuare

filtrazioni su cartuccia e FinePCR TW3 Twist Shaker Finemould Precision Ind. Co. (Seoul, Corea) per agitare i campioni.

Le filtrazioni su cartuccia sono state eseguite in cartucce di polietilene da 3 mL con montati sul fondo frit con pori di 20 μm della Merck (Milano, Italia).

Per le prove preliminari è stato utilizzato uno spettrofluorimetro F-100 della Gibertini (Novate Milanese, Italia) mentre per le analisi di assorbanza è stato usato un UVmini-1240 della Shimadzu (Milano, Italia)

Per sonicare i campioni è stato usato un SONICA della Soltec (Milano, Italia)

Per misurare il pH è stato usato un pHmetro CRISON BASIC 20 tecno-lab della Crison Instruments (Carpi, Italia), per pesare è stata usata una bilancia analitica Crystal 200 SMI della Gibertini (Novate Milanese, Italia).

Per le analisi dei campioni all'UV-Visibile sono state usate le cuvette e semi microcelle 283 QS 1000 di cammino ottico 1 cm, rispettivamente per i bianchi e per i campioni mentre per le analisi di fluorescenza è stata usata una cella 101-QS cammino ottico 1 cm, della Hellma Analytic (Cinisello Balsamo, Italia)

Filtri per siringa 0.22 μm e 0.45 μm in PTFE acquistati dalla Sigma-Aldrich (Milano, Italia)

I materiali monouso sono stati acquistati da BioSigma (Venezia, Italia).

2.2 Reagenti

Acqua deionizzata, tampone fosfato salino P4417-100TAB (PBS, pH 7.4) e sospensione salina 50% α -lattosio-agarosio legante lectine con capacità legante nominale 30 mg lectina/ g resina sono stati acquistati dalla Merck (Milano, Italia).

NaN_3 99% è stata acquistata da Farmitalia Carlo Erba (Milano, Italia)

Idrossido di sodio (NaOH) pellet $\geq 98\%$, Lattosio monoidrato $\geq 99\%$, e Albumina sierica bovina (BSA) $\geq 98\%$ acquistati da Sigma-Aldrich (Milano, Italia)

Cloruro di sodio (NaCl) $\geq 99.5\%$ e Acido cloridrico (HCl) 37% acquistati da Carlo Erba Reagents (Cornaredo, Italia)

Per le prove in matrice reale sono stati utilizzati siero e urine umane offerte da volontari non esposti agli analiti.

2.3 Procedure

2.3.1 Preparazione delle soluzioni

RCA e ricina, essendo delle proteine, necessitano di un ambiente a pH e forza ionica controllata, come spiegato nel paragrafo 1.1.2; pertanto, il PBS è utilizzato come solvente per le frazioni raccolte, le soluzioni standard, la soluzione di lattosio e le soluzioni di albumina usate nelle procedure sotto descritte.

In aggiunta, data la tendenza di ricina e RCA a formare aggregati e a subire precipitazione quando presenti in alte concentrazioni, le soluzioni vengono sonicate in bagno a ultrasuoni per 20 minuti a 50-60 °C e successivamente filtrate (d 0.45 µm) e infine la concentrazione viene ricalcolata. (Frénoy et al., 1986; Jackson et al., 2006)

2.3.2 Prove preliminari

Per poter determinare quantitativamente le concentrazioni di RCA e ricina nei campioni sono state fatte delle prove preliminari utilizzando la spettroscopia di fluorescenza molecolare e la spettroscopia UV-Visibile al fine di determinare i parametri analitici da utilizzare successivamente. Vengono analizzati anche il lattosio e il PBS per verificare che non siano specie interferenti, essendo questi aggiunti ai campioni durante la procedura di estrazione

Le prove all'UV-Visibile sono state fatte analizzando PBS tal quale e soluzioni in PBS di RCA, ricina, lattosio, presi ciascuno in concentrazioni simili a quelle che vengono usate successivamente, nello specifico 617, 132 e 13 ppm per RCA e 222 e 22 ppm per ricina. Lo spettro viene registrato in cuvetta di quarzo tra 200 nm e 800 nm azzerando lo strumento con acqua deionizzata.

Successivamente sono state analizzate soluzioni di RCA, ricina e lattosio in fluorescenza a concentrazioni inferiori a quelle precedenti per ridurre l'effetto dell'autoassorbimento. (Lakowicz, 2006)

Le λ_{ex} sono state scelte sulla base dei picchi di assorbimento in UV-Visibile (Lakowicz, 2006)

È stata eseguita prima una scansione con λ_{ex} 225 nm e λ_{em} 230-440 nm, ma non si è registrata nessuna emissione di fluorescenza né per RCA né per ricina. Poi ne è stata eseguita un'altra con λ_{ex} 280 nm e λ_{em} 285-450 nm.

Dagli spettri che verranno discussi in seguito, si conclude che la fluorescenza non è una tecnica analitica adeguata a questo studio di tesi.

2.3.3 Prove di recupero

I parametri operativi della procedura sottostante sono stati determinati grazie ai risultati ottenuti durante i vari step di questo stesso studio di tesi partendo da condizioni sperimentali presenti nella letteratura (Feldberg et al., 2021)

Nelle varie procedure sotto descritte vengono preparati anche degli standard addizionali, quando richiesto, che hanno la funzione di campione di controllo per verificare che i risultati dei vari campioni raccolti siano nella norma. Inoltre, viene preparata un'aliquota extra di soluzione standard da poter analizzare tal quale allo strumento per poter calcolare i recuperi percentuali.

Si sceglie di lavorare con 25 mg di resina e 1 mL di soluzione perché secondo la capacità legante della resina dichiarata dal produttore e in base all'intervallo di concentrazioni usate successivamente, si raggiungono gradi di saturazione che garantiscano perdite di analita trascurabili.

Le prove di recupero per RCA o ricina vengono eseguite con le seguenti modalità operative:

Vengono prelevati 25 mg di resina per ogni standard, lavati su cartuccia con 2 aliquote da 5 mL di PBS e pesati accuratamente in Eppendorf®® sulla bilancia analitica.

Per due volte la resina viene condizionata con 1 mL di PBS, centrifugata per 2 min a 13'000 rpm e viene scartato il surnatante.

Viene caricato sulla resina 1 mL di standard e agitato gentilmente per 10 minuti per adsorbire l'analita. Si centrifuga per 2 min a 13'000 rpm e si raccoglie il surnatante contenente l'analita non adsorbito (denominato percolato).

Per due volte si lava la resina con 1 mL di PBS, si centrifuga per 2 min a 13'000 rpm e si raccoglie il surnatante contenente i residui del percolato (denominati lavaggio#1 e lavaggio#2).

Per due volte si carica sulla resina 1 mL di lattosio 25 mM, si agita gentilmente per 5 minuti e si raccoglie l'eluato (denominati eluato#1 ed eluato#2).

I campioni che successivamente vengono analizzati allo strumento sono le soluzioni di percolati, lavaggi ed eluati.

2.3.4 Analisi dei campioni allo strumento

Ognuno dei campioni, degli standard e dei bianchi, viene analizzato allo spettrofotometro UV-Visibile. Per le misure si utilizza una semi micro di quarzo di 1 cm di cammino ottico per le soluzioni da analizzare e una cuvetta classica di quarzo per l'azzeramento dello strumento. Viene registrata l'assorbanza di bianchi, standard e campioni a 280 e 320 nm dopo azzeramento con acqua deionizzata ad ogni cambio di lunghezza d'onda.

2.3.5 Determinazione della concentrazione minima di lattosio

Il lattosio viene impiegato nelle soluzioni usate per eluire RCA e ricina in seguito al loro assorbimento su resina. Tuttavia, il lattosio presenta un picco di assorbimento a 280 nm e 320 nm, che sono le lunghezze d'onda usate per quantificare RCA e ricina. Questo implica che va sottratta l'assorbanza del lattosio dall'assorbanza del campione per non sovrastimare la concentrazione. Una concentrazione eccessiva di lattosio comporta la sottrazione di un segnale di maggiore intensità e questo implica un peggioramento di LOD e LOQ. D'altra parte, una concentrazione di lattosio insufficiente non permette di eluire completamente gli analiti, di conseguenza si abbassano i recuperi e quindi le performance del metodo.

Al fine di ottenere alti recuperi senza alzare i limiti di rilevabilità vengono eseguite delle prove di recupero, a concentrazioni di lattosio decrescenti (10-200 mM) e concentrazioni di RCA crescenti (40-425 ppm) in modo da identificare la minima concentrazione di lattosio che non fa diminuire i recuperi di analita.

Vengono quindi preparati gli standard di RCA e le soluzioni di lattosio corrispondenti, le cui concentrazioni sono riportate nella Tabella 1. Come spiegato nel paragrafo 2.3.3 si fanno adsorbire gli standard su resina e poi vengono eluiti con le rispettive soluzioni di lattosio.

I bianchi utilizzati per correggere i valori di assorbanza degli eluati sono le soluzioni di lattosio corrispondenti usate per eluire ogni campione.

Tabella 1. Concentrazione di lattosio usata per eluire le soluzioni di RCA

c RCA (ppm)	c lattosio eluizione 1 (mol/L)	c lattosio eluizione 2 (mol/L)
0	0.000	0.050
40	0.250	0.050
80	0.220	0.050
115	0.200	0.050
155	0.180	0.050
190	0.150	0.050
230	0.120	0.050
270	0.100	0.050
310	0.070	0.050
345	0.050	0.050
385	0.030	0.050
425	0.010	0.050

2.3.6 Cinetiche di adsorbimento

Lo studio delle cinetiche di adsorbimento viene fatto per RCA e ricina utilizzando standard a concentrazioni di 15, 50 e 200 ppm, valori scelti in modo da studiare concentrazioni basse, medie e alte.

La resina viene pesata accuratamente in Eppendorf® e condizionata per due volte con 1 mL di PBS, come già è stato descritto nel paragrafo 2.3.3. Si aggiunge 1 mL di standard, si chiude l'Eppendorf® e si agita brevemente il campione con forza per poi metterlo su bascula orbitante a 35 rpm per il tempo di contatto in esame, misurandolo a partire da quando viene aggiunto lo standard fino a quando la soluzione viene filtrata. Si raccolgono i percolati filtrando su cartuccia e si lavano con 1 mL di PBS per 2 volte, raccogliendo entrambi i lavaggi.

Per due volte si eluiscono gli analiti per 5 minuti con 1 mL di lattosio 25 mM, mescolando di tanto in tanto per disperdere la resina nella soluzione e si raccolgono gli eluati filtrando su cartuccia.

L'intervallo dei tempi di contatto utilizzati è stato scelto secondo i seguenti criteri. 20 s è il tempo minimo per svolgere le operazioni di caricamento dello standard, agitazione e filtrazione su cartuccia, mentre 30 min è un tempo sufficiente per cui i recuperi raggiungano un plateau.

Le soluzioni raccolte, i bianchi e gli standard usati vengono analizzati poi allo spettrofotometro UV-Visibile.

2.3.7 Cinetiche di desorbimento

Lo studio delle cinetiche di desorbimento viene fatto per RCA e ricina utilizzando standard a concentrazioni di 15, 50 e 200 ppm, valori scelti in modo da studiare concentrazioni basse, medie e alte.

La resina viene pesata accuratamente in Eppendorf®, condizionata, si adsorbono gli standard e si lava la resina come descritto nel paragrafo 2.3.3. Gli analiti vengono desorbiti con 1 mL di lattosio 25 mM, agitati brevemente con forza e messi su bascula orbitante a 35 rpm per il tempo di contatto in esame. Si raccoglie il primo eluato filtrando su cartuccia, poi si fa un'altra eluizione con 1 mL di lattosio 25 mM per 5 min, mescolando di tanto in tanto per disperdere la resina nella soluzione. Poi si raccoglie il secondo eluato.

A differenza di quanto specificato nel paragrafo 2.3.6 il tempo di contatto viene misurato a partire dall'aggiunta di lattosio, inoltre, il tempo massimo studiato per la cinetica di desorbimento è 10 min, poiché si è visto essere sufficiente per desorbire gli analiti.

2.3.8 Prove a pH variabile

Come descritto nel paragrafo 1.1.2 RCA e ricina, essendo proteine restano stabili solo a certi valori di pH oltre i quali precipitano e non sono in grado di legarsi alla resina. Per verificare quali condizioni siano adatte, vengono effettuate delle prove di recupero a pH variabile utilizzando standard di RCA o ricina a concentrazione pari a 50 e 100 ppm. Gli standard vengono portati a valori di pH pari a 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 con HCl o NaOH 1 M. Questi valori di pH sono scelti poiché da letteratura si è visto che RCA e ricina non sono stabili in condizioni più estreme. (Bushueva & Tonevitsky, 1987)

Si esegue poi per ogni standard la procedura descritta nel paragrafo 2.3.3.

Parallelamente sono stati preparati due standard, uno di RCA e uno di ricina in PBS senza variare il pH di caricamento, in modo da poter confrontare i recuperi delle soluzioni tal quali e di quelle a pH diverso.

2.3.9 Prove a forza ionica variabile

Per poter valutare l'influenza della forza ionica sulla stabilità di RCA e ricina sono state effettuate delle prove di recupero a salinità variabile. Sono stati preparati standard a concentrazioni di 50 e 100 ppm sia a forza ionica alta che bassa come riportato nella tabella 2.

Tabella 2. Standard per recuperi a forza ionica diversa

Analita	Concentrazione	Forza ionica
RCA	100 ppm	Alta
RCA	100 ppm	Bassa
RCA	50 ppm	Alta
RCA	50 ppm	Bassa
Ricina	100 ppm	Alta
Ricina	100 ppm	Bassa
Ricina	50 ppm	Alta
Ricina	50 ppm	Bassa

La forza ionica bassa consiste in PBS al 30 % in acqua deionizzata. È stato deciso questo valore poiché le frazioni raccolte di RCA e ricina sono in PBS e vista la loro concentrazione non è possibile preparare degli standard utilizzando un prelievo inferiore.

Gli standard a forza ionica alta sono stati preparati in PBS e NaCl 0.15 M valore preso da letteratura (Frénoy et al., 1986)

Successivamente gli standard vengono adsorbiti ed eluiti come descritto nel paragrafo 2.3.3.

2.3.10 Prove in albumina

Come già è stato spiegato nel paragrafo 1.2.1, il valore di assorbanza a 280 nm non distingue le varie proteine.

Lo studio delle cinetiche di adsorbimento e desorbimento delle tossine sulla resina, con successiva attenzione all'influenza del pH di caricamento e della forza ionica (salinità) della soluzione, è finalizzato all'ottimizzazione di un protocollo analitico robusto e trasferibile a matrici biologiche complesse.

L'analisi di campioni reali, quali sangue e urine, presenta infatti criticità significative dovute alla presenza di elevate concentrazioni proteiche endogene. In particolare, considerando che tali matrici contengono percentuali rilevanti di albumina (Feldberg et al., 2021), risulta fondamentale valutare la capacità di legame selettivo della resina nei confronti di ricina e RCA120. L'obiettivo dell'ottimizzazione è massimizzare l'affinità per le tossine bersaglio, garantendo al contempo che le proteine interferenti (come l'albumina stessa) possano percolare senza legarsi stabilmente alla fase stazionaria. Tale selettività è il prerequisito necessario per ottenere un processo di purificazione e arricchimento efficace, riducendo l'effetto matrice nelle successive fasi strumentali.

Per farlo sono stati preparati degli standard di RCA e ricina a concentrazioni di 15, 50 e 200 ppm con concentrazioni di albumina pari a 1 % e 10 % per simulare rispettivamente l'urina e il siero (Feldberg et al., 2021) come mostrato in tabella 3. Vengono anche preparati degli standard di RCA e ricina alle stesse tre concentrazioni in PBS per poter calcolare i recuperi.

Tabella 3. Standard preparati per prove di selettività in albumina

Analita	Concentrazione	Albumina	Matrice simulata
RCA	15 ppm	1 %	Urina
RCA	50 ppm	1 %	Urina
RCA	200 ppm	1 %	Urina
Ricina	15 ppm	1 %	Urina
Ricina	50 ppm	1 %	Urina
Ricina	200 ppm	1 %	Urina
RCA	15 ppm	10 %	Siero
RCA	50 ppm	10 %	Siero
RCA	200 ppm	10 %	Siero
Ricina	15 ppm	10 %	Siero

Ricina	50 ppm	10 %	Siero
Ricina	200 ppm	10 %	Siero

Gli standard vengono poi adsorbiti come descritto nel paragrafo 2.3.3 con la seguente modifica:

Le resine, dopo essere state lavate per due volte con 1 mL di PBS, vengono caricate in cartuccia e lavate con 10 mL di PBS ciascuna. Poi vengono eluite in cartuccia come descritto nel paragrafo 2.3.6.

2.3.11 Prove in matrice reale

Come descritto successivamente, poiché la presenza di albumina non influenza in maniera significativa i recuperi di RCA e ricina, vengono eseguite delle prove di recupero in matrice reale, ovvero siero e urina. Gli standard a concentrazioni di 50 e 100 ppm di RCA e ricina vengono preparati portando a volume con siero e urina che non contengono gli analiti. Vengono anche preparati due standard addizionali, a 50 ppm di RCA e ricina portati a volume con PBS per poter calcolare i recuperi. Tutti gli standard vengono adsorbiti ed eluiti come spiegato nel paragrafo 2.3.3.

3 RISULTATI

3.1.1 PROVE PRELIMINARI

Si riportano di seguito le prove preliminari eseguite per determinare quale tecnica analitica sia la più adatta per analizzare RCA e ricina.

Dallo spettro UV-Visibile in Figura 1, di cui si riportano solo le lunghezze d'onda da 200 a 400 nm, si può osservare un forte assorbimento a 225 nm per RCA e ricina e un assorbimento meno intenso a 280 nm. Si può anche notare che la ricina a concentrazione più bassa (22.2 ppm) presenta uno shift a λ inferiori poiché il picco si sposta a 205 nm.

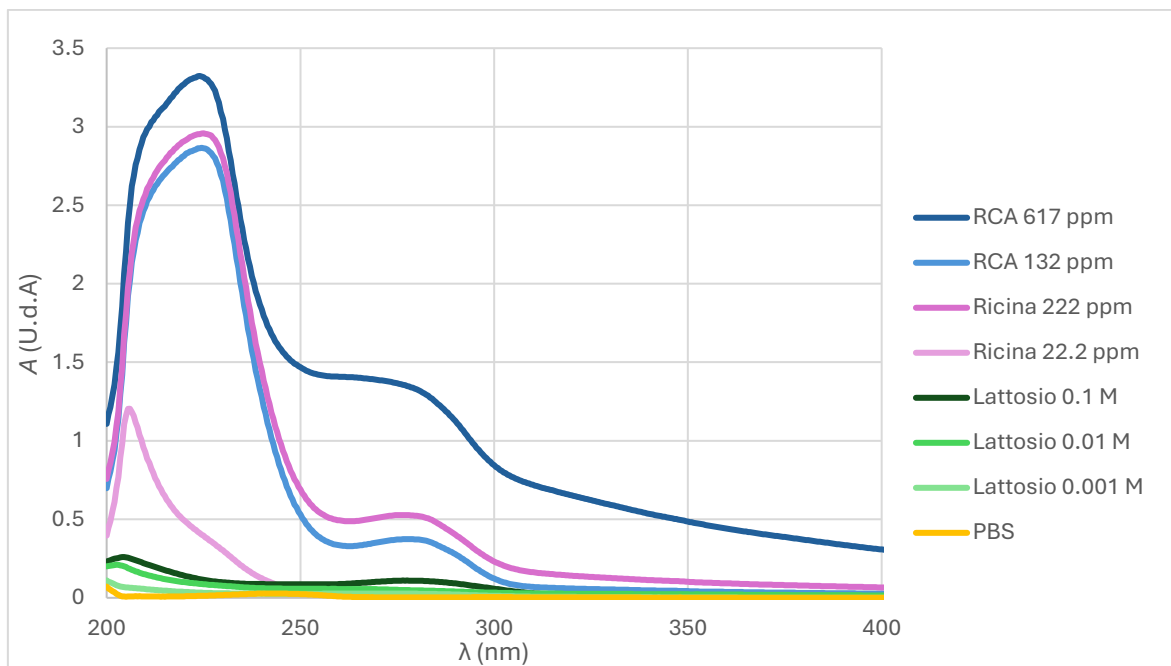


Figura 1. Spettro UV-Vis di RCA, ricina, lattosio e PBS

Il lattosio presenta un assorbimento a 205 nm e un altro più debole a 280 nm entrambi di bassa intensità. Il PBS mostra un assorbimento quasi nullo. A 320 nm l'assorbimento è dato dalle code dei picchi a 280 nm.

Nonostante il picco a 225 nm sia molto più intenso di quello a 280 nm è poco consigliato usarlo, poiché fortemente interferito da molte altre sostanze, come già spiegato precedentemente nel paragrafo 1.2.1. A questo si aggiunge anche lo shift del picco a concentrazioni diverse per ricina, che non rende più valida l'applicazione diretta dell'equazione di Lambert-Beer. Questo implica maggiore difficoltà nell'elaborazione dei dati e maggiori tempi di analisi poiché diventa necessario acquisire lo spettro di ogni campione per poter determinare il massimo di assorbimento, oltre a complicare notevolmente le procedure di calibrazione poiché il coefficiente di estinzione molare ϵ , può cambiare con la concentrazione.

Per quanto riguarda il picco a 280 nm per entrambi gli analiti è sufficientemente intenso e non presenta shift mentre il lattosio presenta un debole assorbimento a questa lunghezza d'onda. Anche a 280 nm sostanze assorbono sebbene siano in numero minore. Tuttavia, questo rende necessario correggere i valori di assorbanza sottraendo le assorbanze a 320 nm e l'assorbimento del lattosio per i campioni che lo contengono come spiegato nel paragrafo 3.1.2.

Dallo spettro di fluorescenza registrato con λ_{ex} 280 nm riportato in Figura 2 si può osservare un'emissione di fluorescenza a 330 nm per RCA e Ricina, mentre il lattosio non dà nessun segnale strumentale.

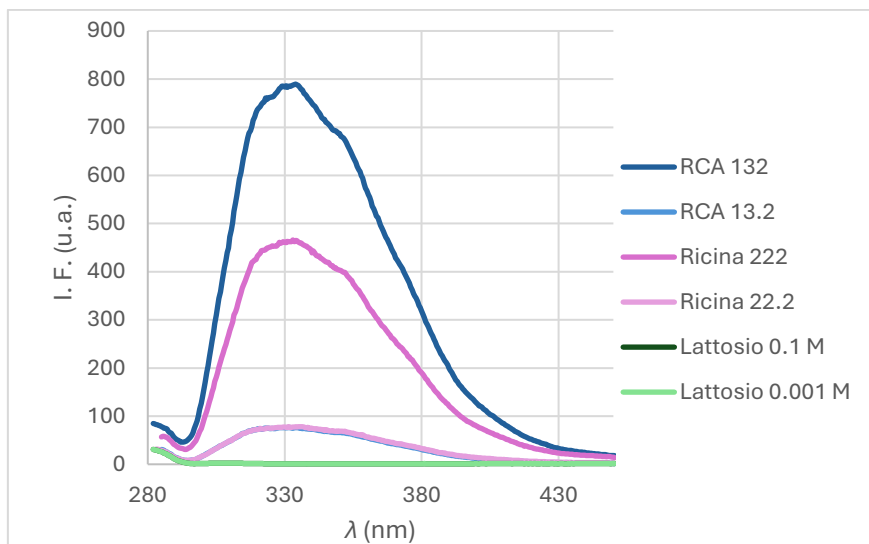


Figura 2. Spettro di fluorescenza λ_{ex} 280 nm di RCA, ricina e lattosio

Le soluzioni concentrate di RCA e ricina hanno valori di assorbanza alla λ_{ex} (280 nm) maggiori di 0.5 U.d.A. e quindi il fenomeno dell'autoassorbimento non è trascurabile (Lakowicz, 2006). Per questo motivo è necessario diluire i campioni per evitare la sottostima della loro concentrazione. Inoltre, i valori di intensità di fluorescenza sono relativamente bassi per lo strumento usato, per cui i campioni già diluiti in origine potrebbero dare risultati di emissione insufficiente.

Lo spettro di fluorescenza registrato a λ_{ex} 225 nm non dà alcun segnale per cui non è riportato.

Dai problemi sopra descritti per quanto riguarda la fluorescenza e l'assorbanza a 225 nm si conclude che l'assorbimento UV-Visibile a 280 nm risulta essere la scelta migliore per quantificare RCA e ricina.

3.1.2 ELABORAZIONE DEI DATI DI ASSORBANZA

La concentrazione di tutti i campioni seguenti viene calcolata nel seguente modo:

Si calcola l'assorbanza del campione e del bianco eliminando il contributo delle impurezze:

$$\Delta A = A_{280} - A_{320} \text{ Equazione 1}$$

$$\Delta A_B = A_{280B} - A_{320B} \text{ Equazione 2}$$

Si sottrae al valore del campione il valore del bianco:

$$A = \Delta A - \Delta A_B \text{ Equazione 3}$$

Per tutti i campioni il bianco è PBS, tranne per gli eluati, nel qual caso è lattosio alla stessa concentrazione usata per eluire gli analiti.

Le frazioni raccolte di RCA e ricina vengono conservate con NaN_3 allo 0,02% m/v, indipendentemente dalla loro concentrazione. Poiché la sodio azide assorbe a 280 nm e non viene trattenuta dalla resina, è necessario sottrarne il contributo. Tale correzione deve essere applicata alle assorbanze delle frazioni raccolte, dei percolati e degli standard.

La correzione viene eseguita nel modo seguente:

$$A' = A - \left(\frac{A_{\text{NaN}_3} * c_{\text{std}}}{c_{\text{madre}}} \right) \text{ Equazione 4}$$

Dove:

- c_{std} è la concentrazione dello standard messo a contatto con la resina
- c_{madre} è la concentrazione della soluzione madre usata per preparare lo standard

La concentrazione degli analiti viene calcolata a partire dall'assorbanza corretta, utilizzando i fattori di risposta tabulati, ϵ degli analiti per 1.16 mL/(mg·cm) per RCA e 1.17 mL/(mg·cm) per ricina

$$c \text{ (ppm)} = \frac{A' * 1000}{\epsilon} \text{ Equazione 5}$$

Per rendere più chiari i dati, nei grafici si decide di usare i recuperi % calcolati nel seguente modo al posto delle concentrazioni assolute:

$$R_{\%} = \frac{C_{sample}}{C_{std}} * 100\% \text{ Equazione 6}$$

Dove:

- c_{sample} è la concentrazione misurata del campione
- c_{std} è la concentrazione dello standard usato

I dati calcolati vengono anche raggruppati per ogni tempo della cinetica, o resina trattata, per rendere più chiari i grafici riportati in seguito nel seguente modo:

- Totali, ovvero la somma di tutti i campioni ottenuti da una singola resina
- Eluati, ovvero la somma di eluato 1 e eluato 2
- Lavaggi, ovvero la somma di lavaggio 1 e lavaggio 2

3.1.3 Cinetica di adsorbimento

I dati di assorbanza ottenuti dalle cinetiche di adsorbimento di RCA e ricina sono stati elaborati come descritto nel paragrafo 3.1.2.

I risultati ottenuti sono rappresentati nelle Figure 3-8 in cui si mostrano in evidenza i percolati che decrescono all'aumentare del tempo di adsorbimento, mentre le serie eluati e lavaggi e totali servono a monitorare il processo di trattamento dei campioni.

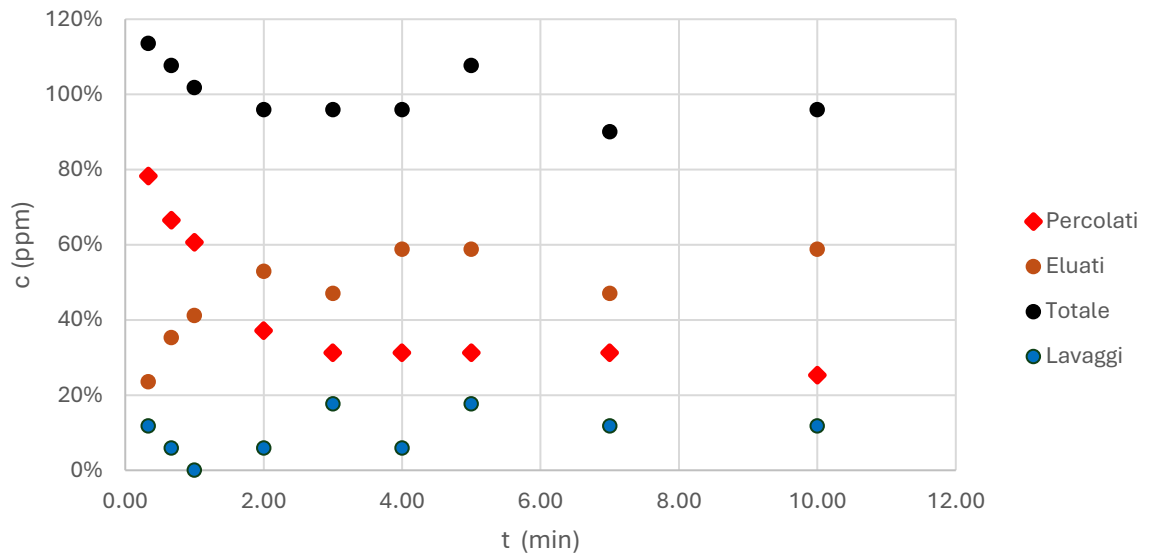


Figura 3. Cinetica di adsorbimento ricina 15 ppm

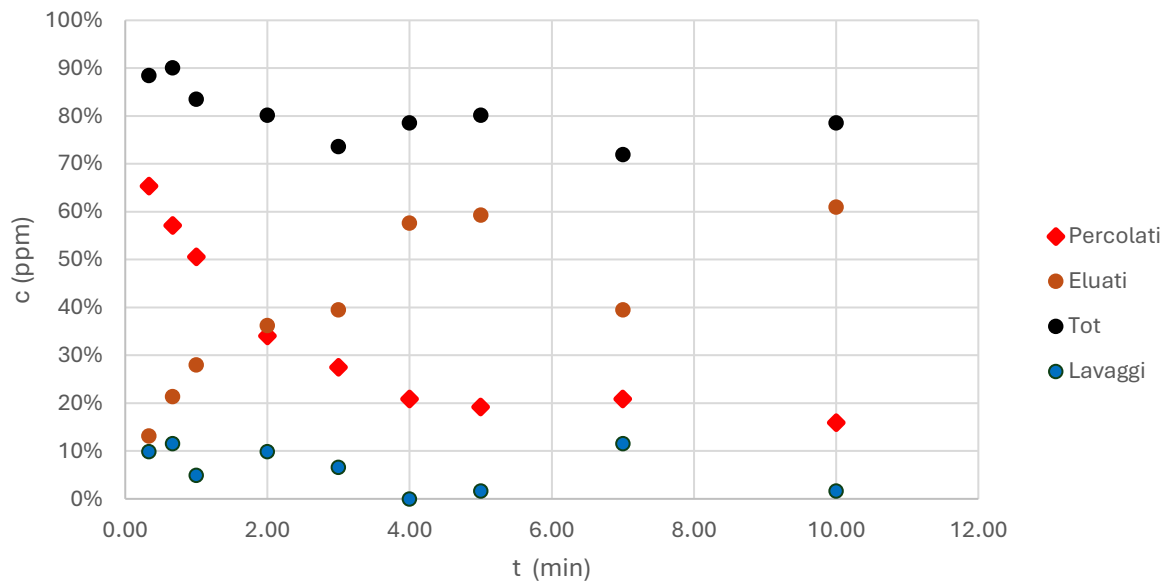


Figura 4. Cinetica di adsorbimento ricina 50 ppm

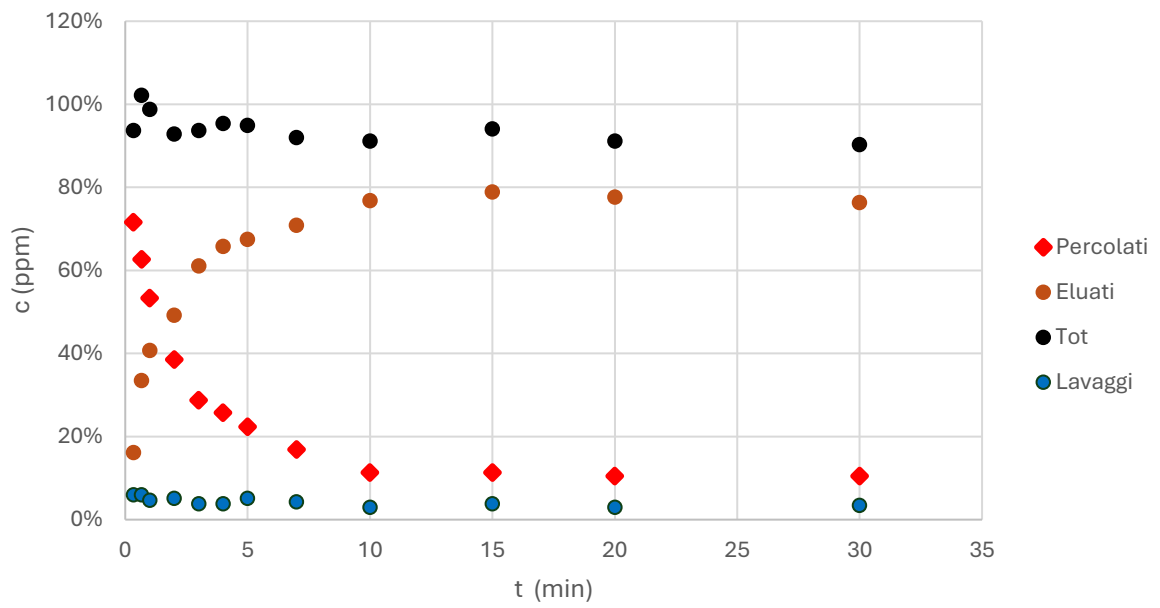


Figura 5. Cinetica di adsorbimento ricina 200 ppm

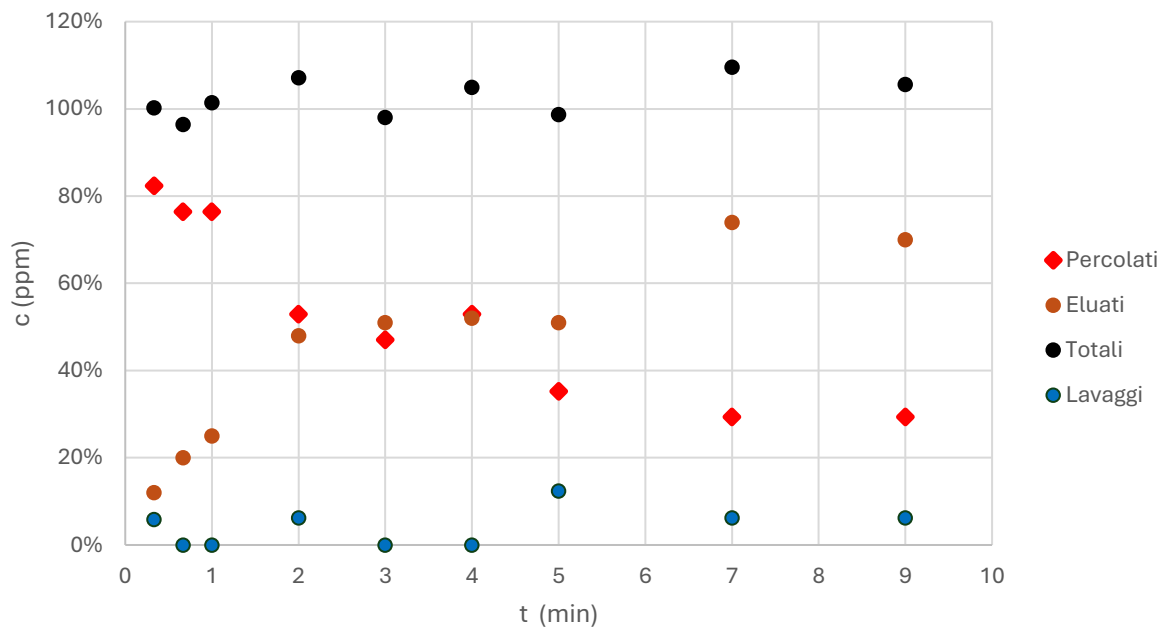


Figura 6. Cinetica di adsorbimento RCA 15 ppm

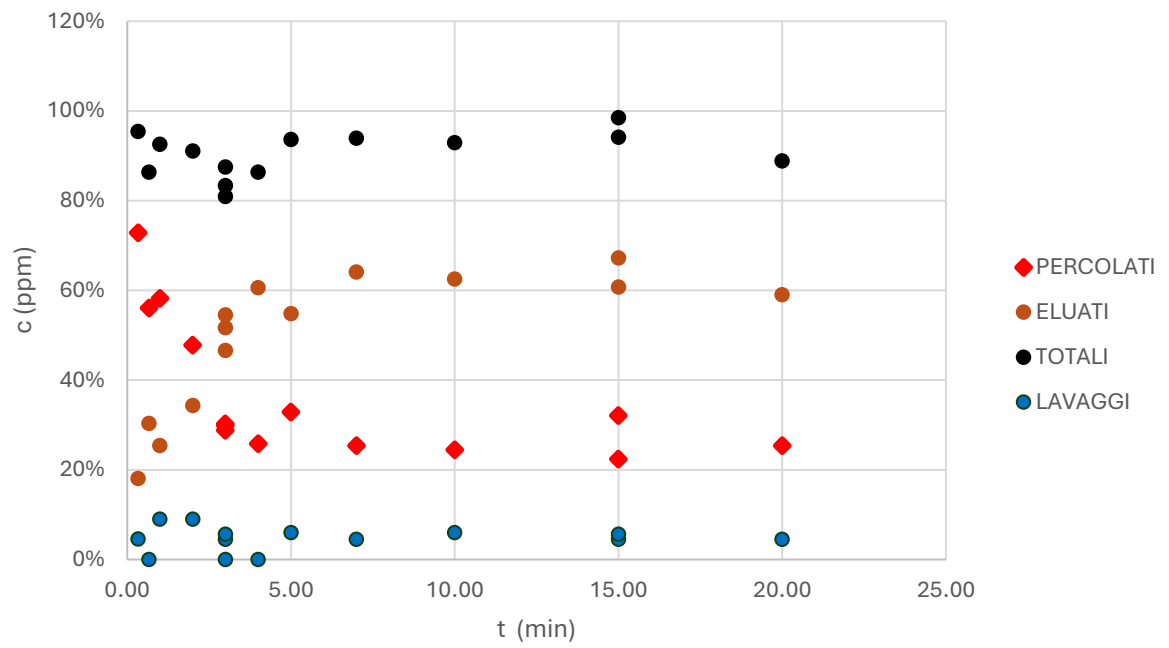


Figura 7. Cinetica di adsorbimento RCA 50 ppm

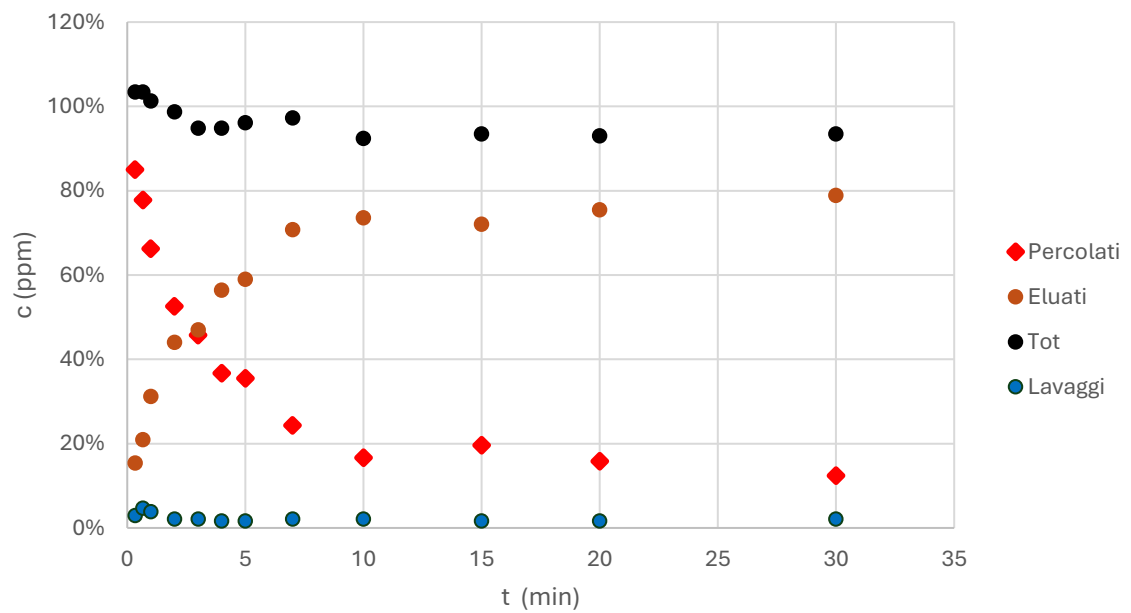


Figura 8. Cinetica di adsorbimento RCA 200 ppm

3.1.4 Cinetica di desorbimento

I dati di assorbanza ottenuti dalle cinetiche di adsorbimento di RCA e ricina sono stati elaborati come descritto nel paragrafo 3.1.2.

I risultati ottenuti sono rappresentati nelle Figure 9-14 in cui si mostrano in evidenza i valori della prima eluizione, che è quella monitorata nella cinetica. Tali valori crescono all'aumentare del tempo di adsorbimento, mentre le serie eluati 2, lavaggi e totali servono a monitorare il processo di trattamento dei campioni.

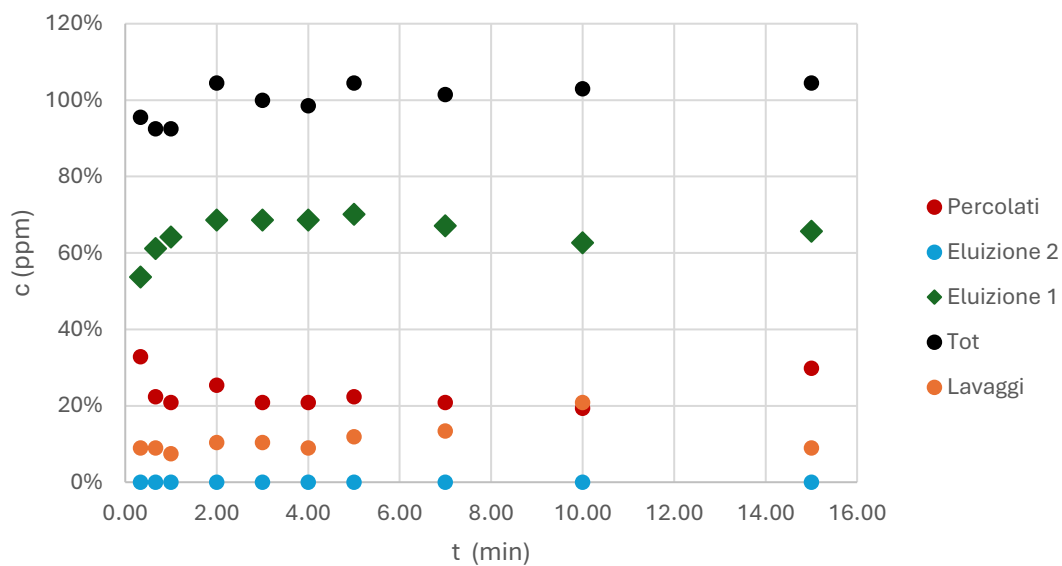


Figura 9. Cinetica di desorbimento RCA 50 ppm

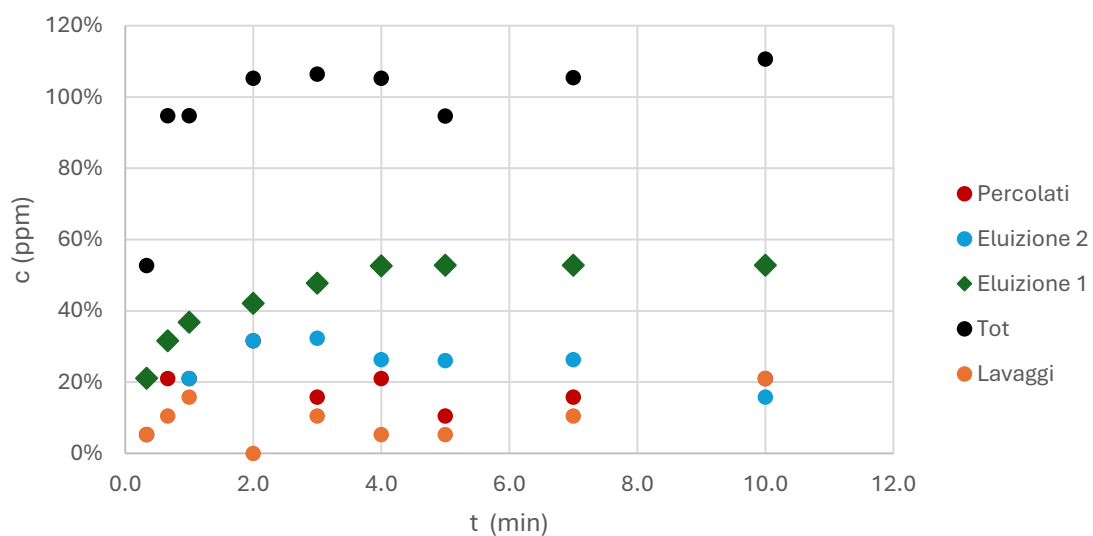


Figura 10. Cinetica di desorbimento RCA 15 ppm

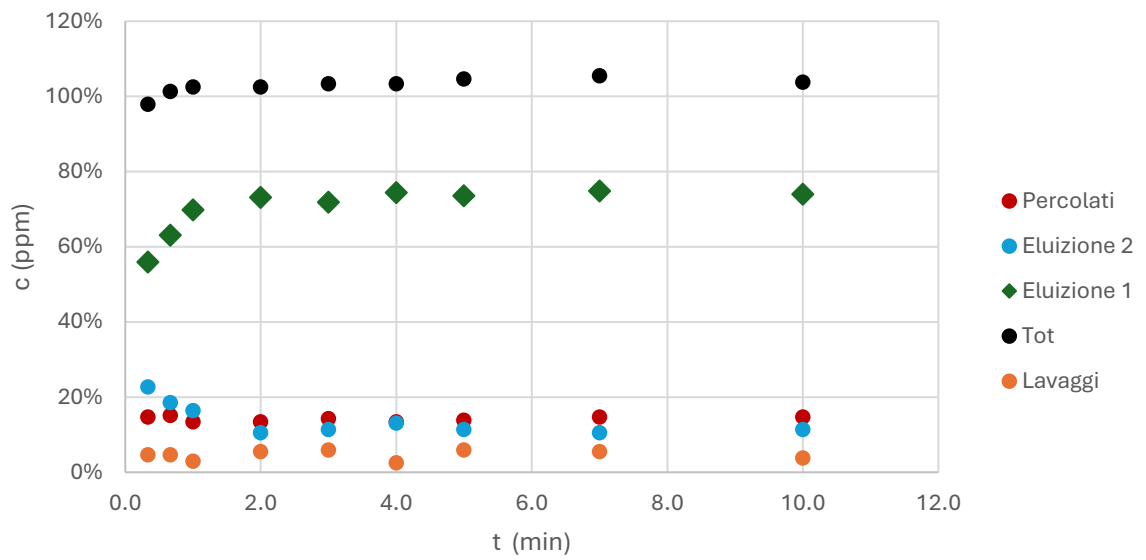


Figura 11. Cinetica di desorbimento RCA 200 ppm

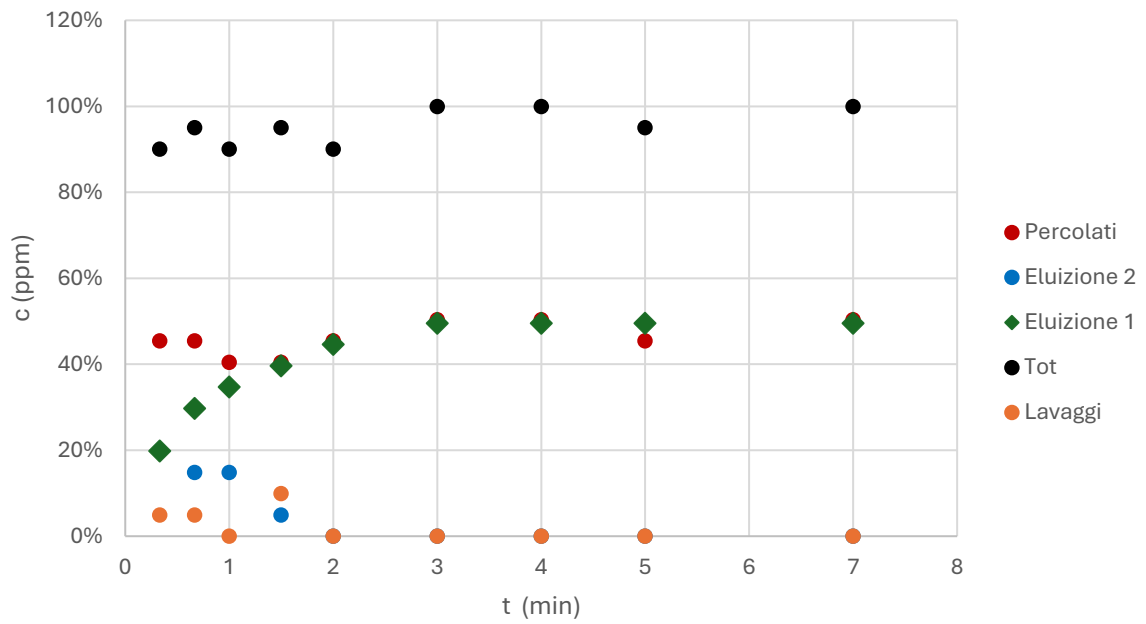


Figura 12. Cinetica di desorbimento Ricina 15 ppm

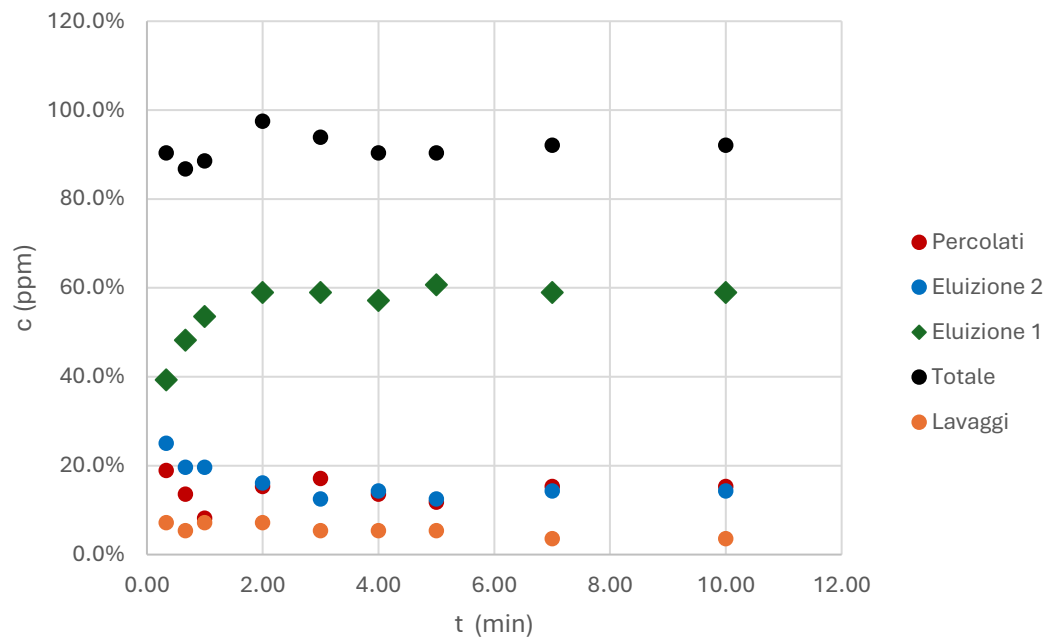


Figura 13. Cinetica di desorbimento Ricina 50 ppm

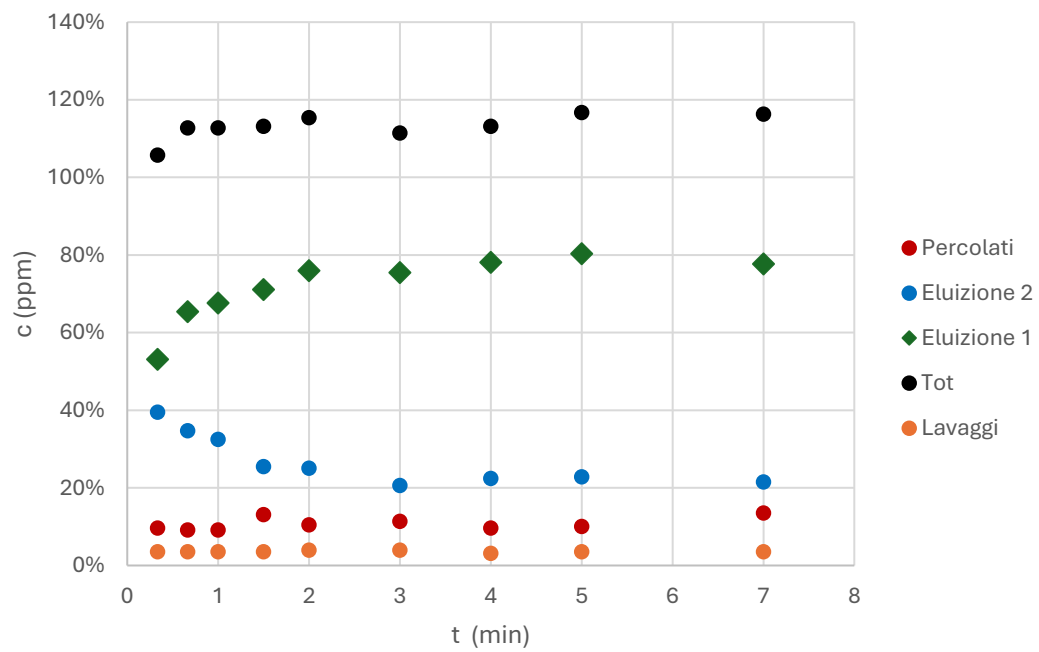


Figura 14 Cinetica di desorbimento Ricina 200 ppm

3.1.5 Modelli cinetici

Per ogni cinetica, si calcola la quantità adsorbita nel tempo q_t , a partire dai valori di concentrazione corrispondenti a tempi di assorbimento diverso.

$$q_t = \frac{C_t \cdot V}{m} \text{ Equazione 7}$$

dove:

- C_t = concentrazione al tempo t
- V = volume soluzione (L)
- m = massa adsorbente (g)

la quantità adsorbita all'equilibrio q_e

$$q_e = \frac{C_e \cdot V}{m} \text{ Equazione 8}$$

dove:

- C_e = concentrazione all'equilibrio

e la frazione adsorbita f

$$f = \frac{q_t}{q_e} \text{ Equazione 9}$$

Dall'equazione del modello di film diffusion

$$f = 1 - e^{-kt} \text{ Equazione 10}$$

si ottiene la forma linearizzata

$$\ln(1 - f) = -kt \text{ Equazione 11}$$

e dall'equazione del modello di particle diffusion

$$f = \sqrt{(1 - e^{-2kt})} \text{ Equazione 12}$$

Si ottiene la forma linearizzata

$$\ln(1 - f^2) = -2kt \text{ Equazione 13}$$

che permettono di calcolare la k , costante cinetica del processo, per ognuna delle concentrazioni di entrambi gli analiti secondo entrambi i modelli.

I risultati ottenuti sono rappresentati in figura 15-18.

Mentre in tabella 4 e 6 sono riportati i valori delle costanti cinetiche (k_{fd} e k_{pd}) calcolate su tre valori di concentrazione nelle tabelle 5 e 7 sono mostrate la media e la deviazione standard di ogni modello.

Tabella 4. Costanti cinetiche (k_{fd} e k_{pd}) calcolate per RCA a tre diverse concentrazioni.

ppm	k_{fd} (min ⁻¹)		k_{pd} (min ⁻²)	
	valore	dev st	valore	dev st
15	0.46	0.04	0.16	0.01
50	0.9	0.3	0.39	0.04
200	0.41	0.03	0.105	0.005

Tabella 5. Media e dev. St. costante cinetica k_{pd} calcolate per RCA

k_{pd} min ⁻²	
0.22	media
0.15	dev st

Tabella 6. Costanti cinetiche (k_{fd} e k_{pd}) calcolate per ricina a tre diverse concentrazioni.

ppm	k_{fd} (min ⁻¹)		k_{pd} (min ⁻²)	
	valore	dev st	valore	dev st
15	1.0	0.1	0.43	0.07
50	0.9	0.2	0.26	0.02
200	0.7	0.1	0.161	0.004

Tabella 7. Media e dev. St. costante cinetica k_{pd} calcolate per ricina.

$k_{pd} \text{ min}^{-2}$	
0.28	media
0.14	dev st

Sono state investigate le cinetiche di adsorbimento alle concentrazioni iniziali di 15, 50 e 200 ppm, al fine di valutare l'influenza della concentrazione sulla velocità e sulla capacità di adsorbimento del materiale studiato. L'andamento della frazione adsorbita nel tempo evidenzia, per tutte le concentrazioni considerate, un incremento rapido nelle fasi iniziali seguito da un progressivo rallentamento fino al raggiungimento di un valore di plateau, indicativo dell'equilibrio. Tale comportamento è coerente con la progressiva saturazione dei siti attivi disponibili sulla superficie dell'adsorbente.

All'aumentare della concentrazione iniziale si osserva un incremento della quantità adsorbita all'equilibrio, mentre la forma generale delle curve cinetiche rimane simile. Questo suggerisce che il meccanismo di adsorbimento non vari in maniera significativa al variare della concentrazione iniziale, mentre l'aumento della forza motrice del processo favorisce sia una maggiore capacità di adsorbimento sia una velocità iniziale più elevata.

Per approfondire il meccanismo di trasporto di massa, i dati sperimentali sono stati analizzati mediante modelli di diffusione attraverso il film diffusion e di particle diffusion. Il modello di film diffusion descrive in modo soddisfacente l'andamento iniziale del processo, evidenziando il ruolo del trasferimento di massa esterno nelle prime fasi dell'adsorbimento.

L'analisi mediante il modello di particle diffusion mostra anch'essa una buona capacità descrittiva dell'andamento sperimentale, in particolare per quanto riguarda le fasi successive del processo, caratterizzate da un progressivo rallentamento della velocità di adsorbimento. Questo comportamento è compatibile con una limitazione dovuta alla diffusione dell'adsorbato all'interno dei pori dell'adsorbente.

Nel complesso, i dati disponibili non consentono di individuare in maniera univoca il modello cinetico predominante. Tuttavia, il confronto qualitativo tra i diversi approcci

suggerisce che il particle diffusion possa essere un modello più adeguato nel descrivere la cinetica, soprattutto nelle fasi avanzate del processo.

Per quanto riguarda le cinetiche di desorbimento, sono state svolte alle stesse concentrazioni iniziali al fine di valutare il comportamento del sistema nella fase di rilascio dell'adsorbato e di confrontarlo con quanto osservato durante il processo di adsorbimento.

I risultati ottenuti sono rappresentati in figura 19 e 20

Mentre in tabella 8 e 10 sono riportati i valori delle costanti cinetiche (k_{pd}) calcolate su tre valori di concentrazione nelle tabelle 9 e 11 sono mostrate la media e la deviazione standard del modello PD.

L'andamento della frazione desorbita nel tempo mostra, per tutte le concentrazioni considerate, un incremento rapido nelle fasi iniziali seguito da un progressivo rallentamento fino al raggiungimento di un valore di plateau, indicativo di una condizione di equilibrio dinamico tra fase solida e fase liquida.

Analogamente a quanto osservato per l'adsorbimento, la forma delle curve cinetiche risulta sostanzialmente simile al variare della concentrazione iniziale, mentre quantitativamente varia la frazione desorbita. Questo comportamento suggerisce che il meccanismo di rilascio dell'adsorbato non subisca variazioni significative con la concentrazione, ma sia principalmente influenzato dalla quantità inizialmente adsorbita e dalla distribuzione dell'adsorbato all'interno del materiale.

Per l'interpretazione dei dati sperimentali sono stati considerati i modelli di diffusione attraverso il film diffusion e di particle diffusion. Il modello di film diffusion descrive in maniera soddisfacente le fasi iniziali del processo, evidenziando il contributo del trasferimento di massa esterno nel rilascio dell'adsorbato dalla superficie del materiale.

Tuttavia, sulla base delle considerazioni teoriche, il modello di particle diffusion risulta più appropriato per descrivere il processo di desorbimento, in quanto tiene conto della diffusione dell'adsorbato all'interno della struttura porosa dell'adsorbente, che rappresenta un passaggio cruciale nelle fasi successive del rilascio. In particolare, come già descritto nel paragrafo 1.3, le costanti cinetiche associate alla particle diffusion sono

indipendenti dalla concentrazione iniziale, riflettendo un meccanismo determinato dalle proprietà strutturali del materiale piuttosto che dalle condizioni esterne.

Nel sistema studiato, tuttavia, si osserva una variazione delle costanti cinetiche al variare della concentrazione iniziale, sia nel caso del modello di film diffusion sia nel caso del modello di particelle diffusion. Questo comportamento indica che il processo reale è più complesso rispetto ai modelli ideali e che possono intervenire effetti aggiuntivi, quali eterogeneità dei siti di adsorbimento o variazioni nella distribuzione dell'adsorbato all'interno dei pori.

Nonostante ciò, il modello di particelle diffusion fornisce una descrizione complessivamente più coerente del processo di desorbimento, in quanto meglio rappresenta il contributo dei fenomeni diffusivi interni che caratterizzano le fasi più lente del rilascio. Pertanto, pur in assenza di un modello che descriva perfettamente il sistema, la particelle diffusion può essere considerata il meccanismo predominante nel controllo della cinetica di desorbimento.

In conclusione, i risultati ottenuti suggeriscono che il processo di desorbimento è governato da un meccanismo complesso, in cui il trasferimento di massa attraverso il film liquido e la diffusione intraparticellare contribuiscono congiuntamente, con un ruolo prevalente dei fenomeni diffusivi interni nel determinare la dinamica complessiva del sistema.

Tabella 8. Costante cinetica (k_{pd}) calcolata per RCA a tre diverse concentrazioni

ppm	kpd min-1	
	valore	dev st
15	0.9	0.1
50	3.7	0.5
200	4.0	0.5

Tabella 9. Media e dev. St. costante cinetica k_{pd} calcolate per RCA

k_{pd} min ⁻²	
2.8	media
1.7	dev st

Tabella 10. Costante cinetica (k_{pd}) calcolata per ricina a tre diverse concentrazioni

ppm	kpd min-1	
	valore	dev st
15	0.7	0.1
50	2.1	0.2
200	4.4	0.2

Tabella 11. Media e dev. St. costante cinetica k_{pd} calcolate per ricina

$k_{pd} \text{ min}^{-2}$	
2.4	media
1.9	dev st

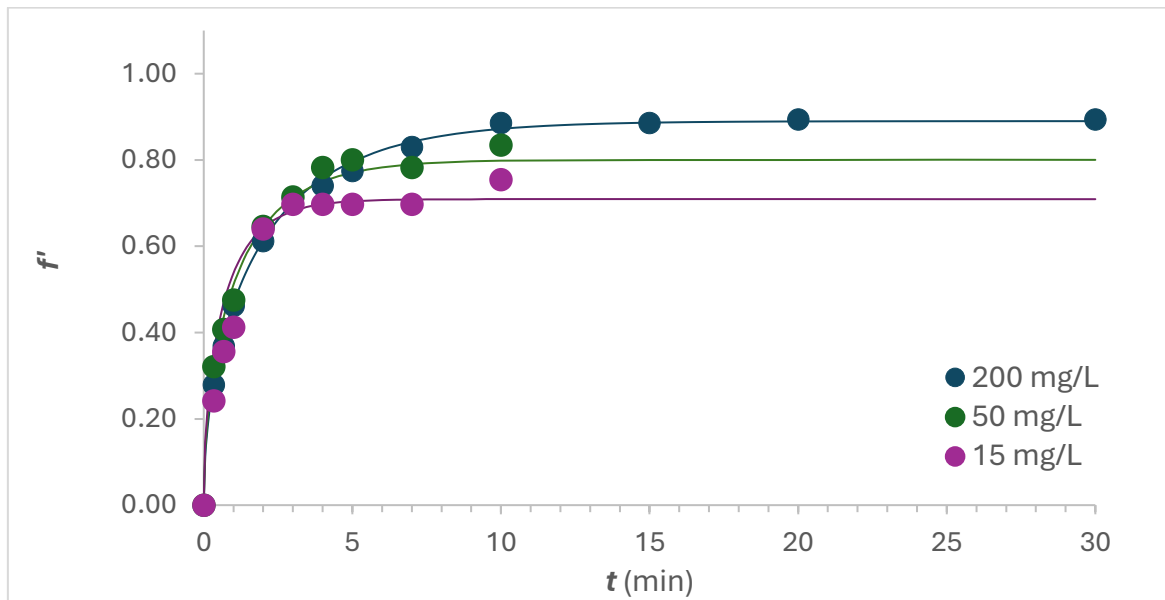


Figura 15. Adsorbimento Ricina modello PD

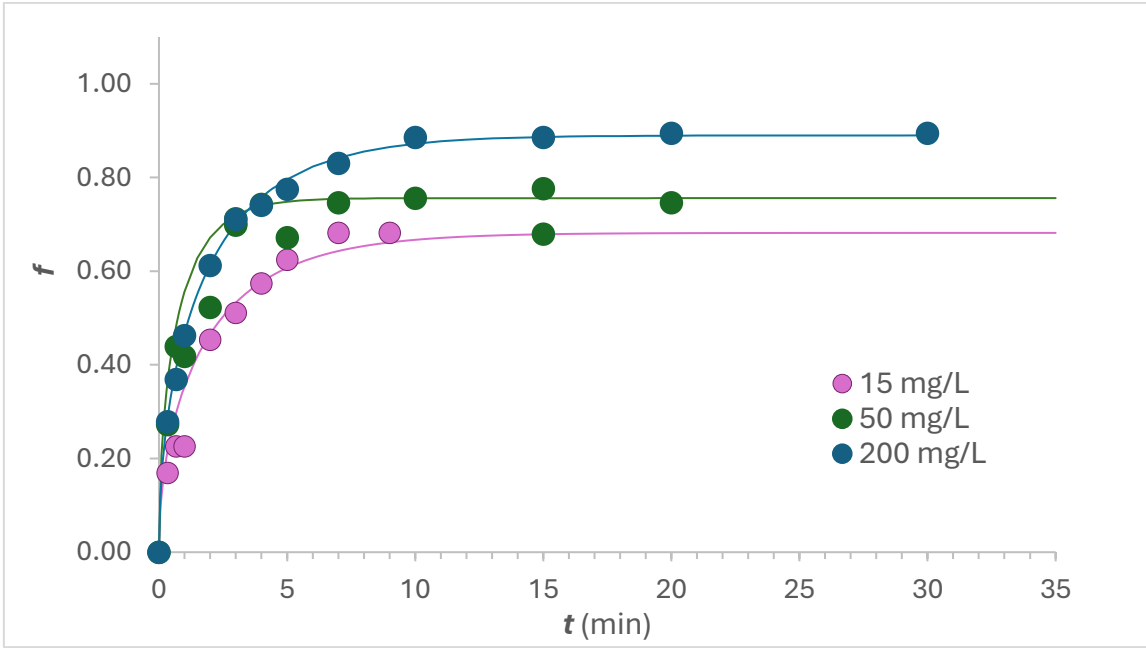


Figura 16. Adsorbimento Ricina modello FD

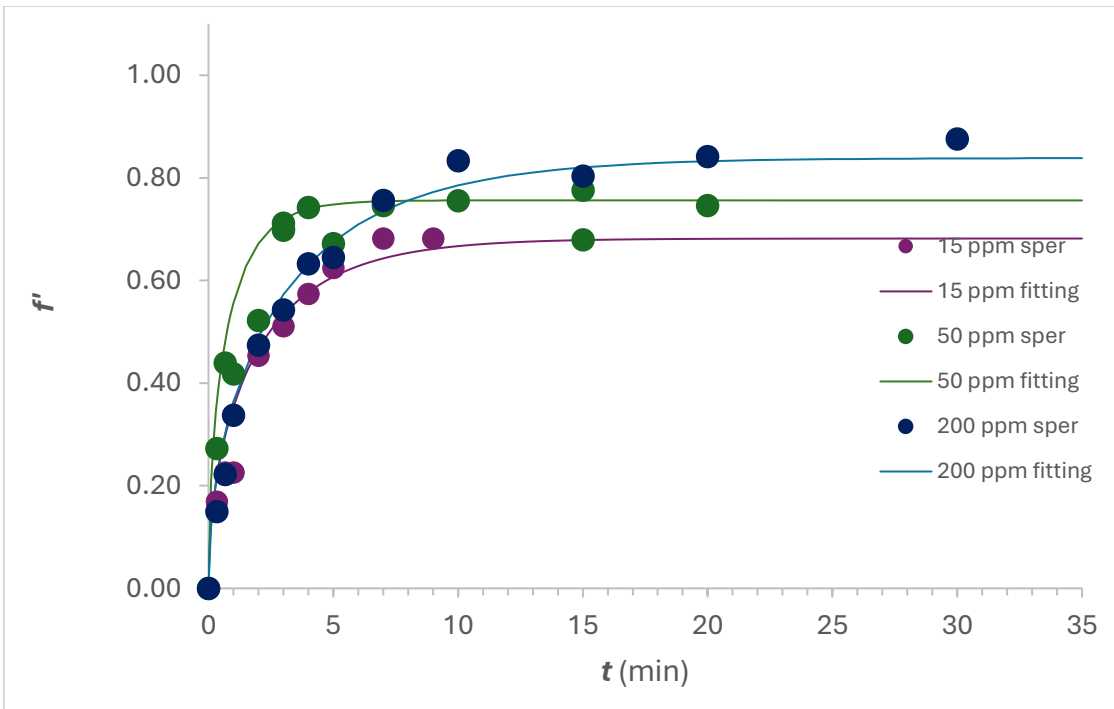


Figura 17. Adsorbimento RCA modello PDI

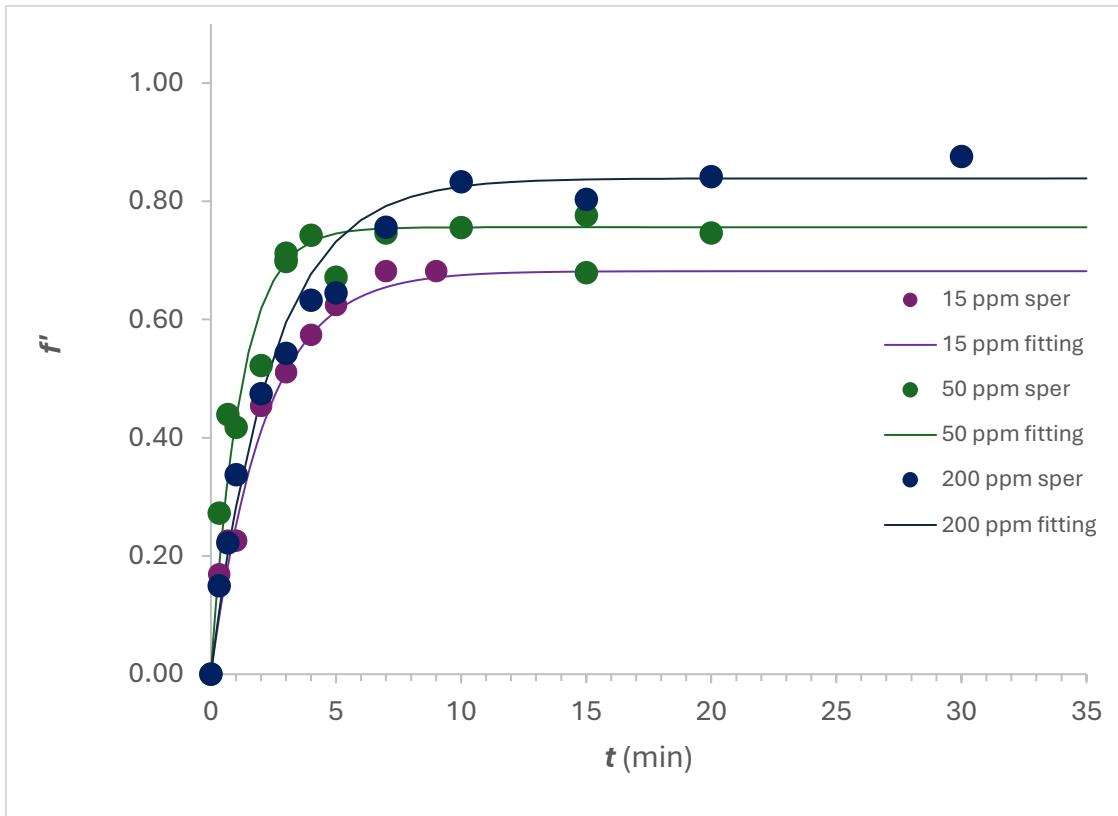


Figura 18. Adsorbimento RCA modello FD

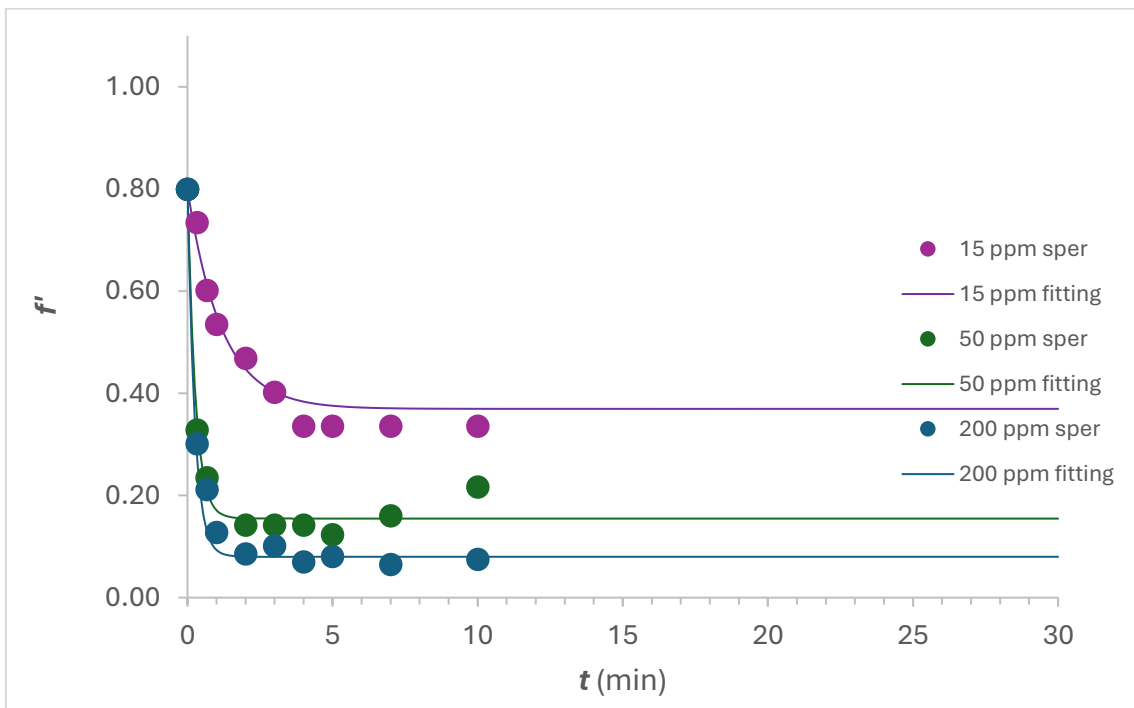


Figura 19. Desorbimento RCA modello PD

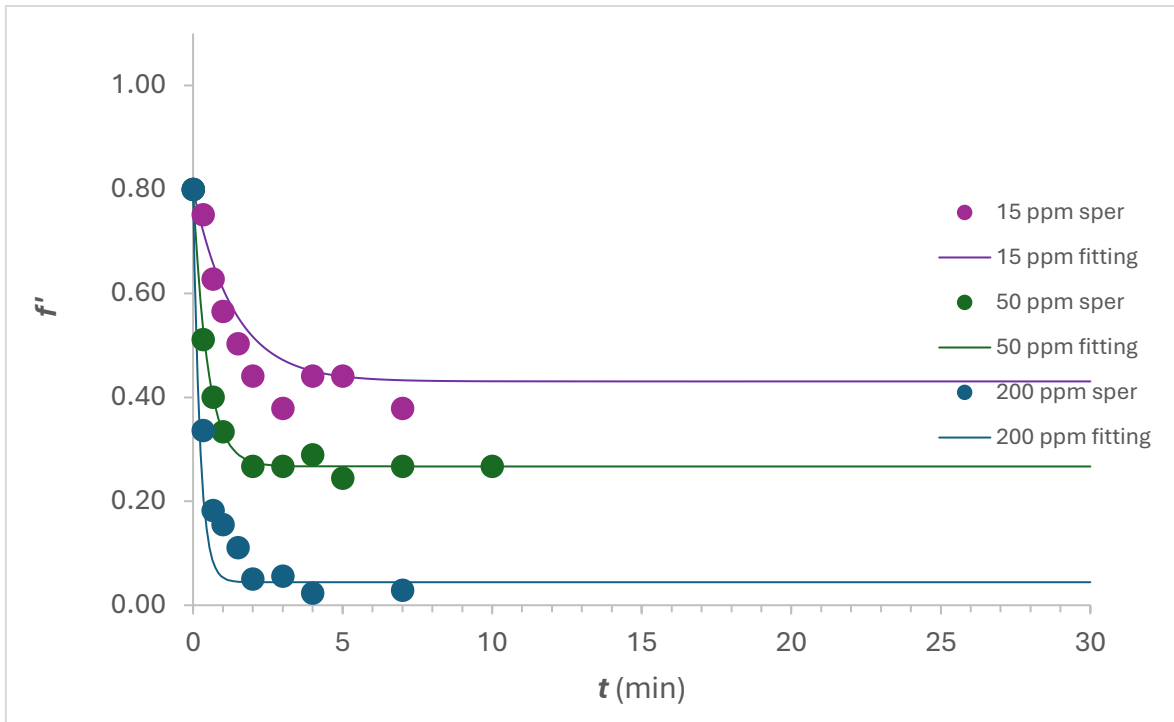


Figura 20. Desorbimento Ricina modello PD

4 CONCLUSIONI

Nel complesso, il lavoro di tesi ha mostrato che la resina selettiva α -lattosio-agarosio rappresenta una fase adsorbente promettente per il trattenimento e il successivo rilascio di ricina e RCA120. Le prove preliminari hanno indicato che l'assorbanza UV-Visibile a 280 nm costituisce il compromesso analitico più affidabile tra sensibilità, robustezza e controllo delle interferenze, mentre la fluorescenza e la misura a 225 nm si sono rivelate meno adatte allo scopo. Lo studio cinetico ha evidenziato, per entrambi gli analiti e per tutte le concentrazioni investigate, un comportamento caratterizzato da una fase iniziale rapida seguita dal raggiungimento di un plateau, coerente con l'instaurarsi dell'equilibrio di adsorbimento o desorbimento. L'interpretazione dei dati suggerisce che, pur con il contributo del trasferimento di massa attraverso il film liquido nelle fasi iniziali, la diffusione intraparticellare rappresenta il meccanismo più coerente per descrivere il controllo cinetico del sistema, soprattutto nella fase di desorbimento. Inoltre, l'assenza di un effetto marcato dell'albumina sui recuperi indica che l'approccio sviluppato possiede un potenziale concreto per l'estensione a matrici biologiche più complesse. In prospettiva, l'ottimizzazione ulteriore delle condizioni operative e l'integrazione della fase di preconcentrazione con tecniche di rivelazione più selettive potranno rendere questa strategia utile non solo per studi di laboratorio, ma anche per applicazioni analitiche in ambito tossicologico, bioforense e di sicurezza chimica.

BIBLIOGRAFIA

- Andrews, P. (1965). The gel-filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range. *Biochemical Journal*, 96(3), 595–606. <https://doi.org/10.1042/bj0960595>
- Bushueva, T. L., & Tonevitsky, A. G. (1987). The effect of pH on the conformation and stability of the structure of plant toxin — ricin. *FEBS Letters*, 215(1), 155–159. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(87\)80132-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(87)80132-1)
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2024). *Ricin | Chemical Emergencies*.
- Chen, W.-D., Dong, X.-Y., & Sun, Y. (2002). Analysis of diffusion models for protein adsorption to porous anion-exchange adsorbent. *Journal of Chromatography A*, 962(1–2), 29–40. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00466-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00466-1)
- Eni. (2024). *Le falsità di Report sui progetti in Kenya*.
- Eni. (2025). *Low ILUC certification for a more responsible agri-hub supply chain*.
- European Chemicals Agency (ECHA). (n.d.). *Castor oil – Substance Information*.
- Feldberg, L., Elhanany, E., Laskar, O., & Schuster, O. (2021). Rapid, Sensitive and Reliable Ricin Identification in Serum Samples Using LC–MS/MS. *Toxins*, 13(2), 79. <https://doi.org/10.3390/toxins13020079>
- Finch, C., Clarke, T., & Hickman, J. J. (2013). A continuum hard-sphere model of protein adsorption. *Journal of Computational Physics*, 244, 212–222. <https://doi.org/10.1016/j.jcp.2012.07.034>
- Fredriksson, S.-Å., Hulst, A. G., Artursson, E., de Jong, Ad. L., Nilsson, C., & van Baar, B. L. M. (2005). Forensic Identification of Neat Ricin and of Ricin from Crude Castor Bean Extracts by Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 77(6), 1545–1555. <https://doi.org/10.1021/ac048756u>
- Frénoy, J. P., Tran, A. T., & Bourrillon, R. (1986). Structure and stability of *Ricinus communis* haemagglutinin. *Biochemical Journal*, 240(1), 227–231. <https://doi.org/10.1042/bj2400227>
- HEGDE, R., & PODDER, S. K. (1992). Studies on the variants of the protein toxins ricin and abrin. *European Journal of Biochemistry*, 204(1), 155–164. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb16618.x>

- Jackson, L. S., Tolleson, W. H., & Chirtel, S. J. (2006). Thermal Inactivation of Ricin Using Infant Formula as a Food Matrix. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(19), 7300–7304. <https://doi.org/10.1021/jf061199n>
- Kato, H., Uzawa, H., Nagatsuka, T., Kondo, S., Sato, K., Ohsawa, I., Kanamori-Kataoka, M., Takei, Y., Ota, S., Furuno, M., Dohi, H., Nishida, Y., & Seto, Y. (2011). Preparation and evaluation of lactose-modified monoliths for the adsorption and decontamination of plant toxins and lectins. *Carbohydrate Research*, 346(13), 1820–1826. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.06.025>
- Kumar, O., Nashikkar, A. B., Jayaraj, R., Vijayaraghavan, R., & Prakash, A. O. (2004). Purification and Biochemical Characterisation of Ricin from Castor Seeds. In *Defence Science Journal* (Vol. 54, Number 3).
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lakowicz, J. R. (Ed.). (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>
- Ministero della Salute. (n.d.). *Estratti vegetali non ammessi negli integratori alimentari*.
- Murphy, J. R. (2011). Mechanism of diphtheria toxin catalytic domain delivery to the eukaryotic cell cytosol and the cellular factors that directly participate in the process. In *Toxins* (Vol. 3, Number 3, pp. 294–308). <https://doi.org/10.3390/toxins3030294>
- Olsnes, S., & Pihl, A. (1973). Different biological properties of the two constituent peptide chains of ricin a toxic protein inhibiting protein synthesis. *Biochemistry*, 12(16), 3121–3126. <https://doi.org/10.1021/bi00740a028>
- OPCW. (n.d.). *Annex on Chemicals*.
- Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., & Gray, T. (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science*, 4(11), 2411–2423. <https://doi.org/10.1002/pro.5560041120>
- PORATH, J., & FLODIN, P. (1959). Gel Filtration: A Method for Desalting and Group Separation. *Nature*, 183(4676), 1657–1659. <https://doi.org/10.1038/1831657a0>
- Presidenza del Consiglio dei Ministri. (n.d.). *Piano Mattei per l’Africa: obiettivi e settori di intervento*.

- Presidenza del Consiglio dei Ministri. (2025). *Relazione sullo stato di attuazione del Piano Mattei*.
- Reinmuth-Selzle, K., Tchipilov, T., Backes, A. T., Tscheuschner, G., Tang, K., Ziegler, K., Lucas, K., Pöschl, U., Fröhlich-Nowoisky, J., & Weller, M. G. (2022). Determination of the protein content of complex samples by aromatic amino acid analysis, liquid chromatography-UV absorbance, and colorimetry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *414*(15), 4457–4470. <https://doi.org/10.1007/s00216-022-03910-1>
- Rotolo, A., Pes, M., Solarino, G., Roda, E., Schicchi, A., Lonati, D., Uberti, F., Locatelli, C. A., & Merli, D. (2025). From Bench to Bedside: Validation of an ELISA Analytical Method for the Determination of Ricin in Biological Samples and Clinical Data on Related Intoxications. *Chemosensors*, *13*(12). <https://doi.org/10.3390/chemosensors13120414>
- Sabio, E., Zamora, F., González-García, C. M., Ledesma, B., Álvarez-Murillo, A., & Román, S. (2016). Homogeneous Diffusion Solid Model as a Realistic Approach to Describe Adsorption onto Materials with Different Geometries. *Nanoscale Research Letters*, *11*(1). <https://doi.org/10.1186/s11671-016-1746-5>
- Schieltz, D. M., McWilliams, L. G., Kuklenyik, Z., Prezioso, S. M., Carter, A. J., Williamson, Y. M., McGrath, S. C., Morse, S. A., & Barr, J. R. (2015). Quantification of ricin, RCA and comparison of enzymatic activity in 18 *Ricinus communis* cultivars by isotope dilution mass spectrometry. *Toxicon*, *95*, 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.01.003>
- Simmonsandjohn, B. M., & Russell, H. (1985). A Single Affinity Column Step Method for the Purification of Ricin Toxin from Castor Beans (*Ricinus communis*)'. In *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* (Vol. 146).
- Srinivas, V. R., Reddy, G. B., Ahmad, N., Swaminathan, C. P., Mitra, N., & Surolia, A. (n.d.). *Legume lectin family, thènatural mutants of the quaternary state, provide insights into the relationship between protein stability and oligomerization*. Retrieved www.bba-direct.com
- Thomas, T. -S, & LI Steven, S. -L. (1980). Purification and Physicochemical Properties of Ricins and Agglutinins from *Ricinus communis*. *European Journal of Biochemistry*, *105*(3), 453–459. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1980.tb04520.x>

- Weber, K., & Osborn, M. (1969). The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry*, 244(16), 4406–4412. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)94333-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)94333-4)
- Wettasinghe, R. C., Zabet-Moghaddam, M., Ritchie, G., & Auld, D. L. (2013). Relative quantitation of ricin in *Ricinus communis* seeds by image processing. *Industrial Crops and Products*, 50, 654–660. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.037>
- Woo, B. H., Lee, J. T., & Lee, K. C. (1998). Purification of Sepharose-Unbinding Ricin from Castor Beans (*Ricinus communis*) by Hydroxyapatite Chromatography. In *PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION* (Vol. 13).
- Worbs, S., Skiba, M., Söderström, M., Rapinoja, M.-L., Zeleny, R., Russmann, H., Schimmel, H., Vanninen, P., Fredriksson, S.-Å., & Dorner, B. (2015). Characterization of Ricin and *R. communis* Agglutinin Reference Materials. *Toxins*, 7(12), 4906–4934. <https://doi.org/10.3390/toxins7124856>
- Zentz, C., Frénoy, J.-P., & Bourrillon, R. (1978). Binding of galactose and lactose to ricin. Equilibrium studies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, 536(1), 18–26. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(78\)90047-8](https://doi.org/10.1016/0005-2795(78)90047-8)
- Zentz, C., Frénoy, J.-P., & Bourrillon, R. (1978). BINDING OF GALACTOSE AND LACTOSE TO RICIN EQUILIBRIUM STUDIES. In *Biochimica et Biophysica Acta* (Vol. 536).