

Considerazioni sul corretto impiego dell'alcool etilico nei laboratori di zoologia

Moreno Dutto

Contrattista Azienda Ospedaliera S. Croce e Carle, Cuneo. E-mail: dutto.moreno@tiscali.it

Marcello Guidotti

Facoltà di Farmacia e Medicina, Università di Roma "La Sapienza". E-mail: marcello.guidotti@uniroma1.it

RIASSUNTO

Nei laboratori di zoologia, in particolare nelle preparazioni acarologiche ed entomologiche, l'alcool etilico rappresenta una sostanza largamente impiegata a varie concentrazioni sia quale mezzo solvente che come mezzo conservante. Lo zoologo per la preparazione e la conservazione dei campioni si trova spesso ad utilizzare soluzioni di alcool etilico a diverse concentrazioni difficilmente reperibili in commercio e che devono essere preparate di volta in volta. Effettuare la diluizione di soluzioni è già spesso una procedura complessa ancor più se si tratta di soluzioni idroalcoliche dove si verifica una contrazione di volume con la produzione di calore che implica un'impresione, qualora si eseguano preparazioni volumetriche, che può ripercuotersi negativamente sulla preparazione e sulla conservazione finale dei reperti biologici. L'articolo analizza gli usi dell'alcool etilico in zoologia e fornisce i criteri per una corretta preparazione delle soluzioni idroalcoliche.

Parole chiave:

etanolo, alcool etilico, soluzioni idroalcoliche, contrazione volume, ETOH.

ABSTRACT

Proper use of the ethyl alcohol in the laboratories of zoology.

In the laboratories of zoology, especially in acarologiques and entomologiques preparations, the ethyl alcohol is a substance widely used to various concentrations as a solvent that as a preservative. For the preparation and storage of samples, the zoologist is often found to use solutions of ethyl alcohol in different concentrations, difficult to obtain in trade and which must be prepared from time to time. The preparation of diluted solutions is a complex procedure, even more if there are hydroalcoholic solutions with a reduction of volume and production of heat that implies an inaccuracy in the execution of volumetric preparations, which may adversely affect the final preparation and the conservation of biological finds. This article analyses the uses of ethyl alcohol in zoology and provides the criteria for the proper preparation of the hydroalcoholic solutions.

Key words:

ethanol, ethyl alcohol, hydroalcoholic solution, volume contraction, ETOH.

INTRODUZIONE

L'alcool etilico nei laboratori di zoologia rappresenta una fra le sostanze chimiche maggiormente impiegate (Steyakal et al., 1986; Arnò & Delmastro, 2002; Delmastro, 2008) grazie alla sua capacità di fissare i tessuti ed impedire i processi putrefattivi mediante disidratazione cellulare e denaturazione delle proteine, conferendo alla sostanza anche protezione microbica.

L'alcool etilico viene utilizzato singolarmente sia per la preparazione, la fissazione e la conservazione definitiva (liquido di dimora) di nematodi, molluschi e artropodi non conservabili a secco (es. stadi preimaginali degli insetti, aracnidi, ecc.) o di loro parti anatomiche (genitali) e di animali superiori (tipo eterotermi quali pesci, anfibi e rettili), sia come mezzo solvente per la preparazione o la diluizione di altri

composti conservanti (es. soluzioni glicerinate, soluzione Oudemans). Fino a pochi anni fa venivano spesso preferite all'alcool etilico le soluzioni di aldeide formica al 4-10% (formalina) che presentano un'elevata capacità penetrativa ed hanno un costo relativamente contenuto, ma offrono gravi problemi di sicurezza tenuto in considerazione che l'aldeide formica e le sue soluzioni acquose sono ritenute cancerogene, oltre ad avere un'importante tossicità acuta (Jayalakshmi et al., 2011). Il problema della tossicità dell'aldeide formica, unitamente ai problemi legati alle analisi genetiche dei campioni ha richiesto la ricerca di nuovi mezzi conservati, rivalutando le proprietà dell'etanolo (Black & Dodson, 2003).

L'etanolo (aethanolum, ethanolum, alcool rettificato, etanolo anidro) è un liquido incolore con le seguenti caratteristiche fisico-chimiche:

Formula bruta	C ₂ H ₅ OH
Peso molecolare	46,97
Punto di ebollizione	78,3°C
Densità (15°C)	0,789 g/cm ³
Indice di rifrazione	1,3611
Numero CAS	64-17-5

Esso è trasparente, mobile, di odore caratteristico gradevole e di sapore bruciante. E' un liquido facilmente infiammabile e brucia con fiamma azzurrognola. E' una sostanza miscibile in tutti i rapporti con acqua, etere, acetato di etile (estere acetico), cloroformio e glicerina (Ministero della Sanità, 1965, 1998).

Per completezza, occorre precisare che con il termine etanolo si identificano soluzioni con concentrazione in purezza > 99,6% v/v, mentre con il termine alcool etilico si intendono le soluzioni di etanolo con concentrazione del 96% v/v. Altre diluizioni di etanolo sono identificate con il termine di "alcool etilico" seguito dall'indicazione della percentuale in volume/volume di etanolo contenuto.

Le espressioni del contenuto devono sempre essere espresse percentualmente volume su volume (% v/v), come raccomandato dall'Organisation Internationale de Métrologie Légale, mentre deve essere abbandonata la vecchia espressione in gradi alcolici. Il termine gradazione alcolica comunemente usato derivava da uno dei primi metodi di misura che - con l'alcolometro - utilizzava i "gradi Gay-Lussac" (°GL) dove 0° corrispondevano all'acqua pura e 100° all'alcool puro (1° GL = 1% v/v) (Guareschi, 1897).

In etichetta, a lato della percentuale volumetrica, può essere indicata anche la percentuale ponderale (p/p) che esprime il contenuto in grammi di etanolo presenti in 100 g di soluzione finale. La percentuale ponderale, unitamente alla densità dell'alcool alle varie percentuali, è indispensabile per le operazioni di diluizione.

NORME DI SICUREZZA E REATTIVITÀ

L'etanolo è un liquido facilmente infiammabile e il grado di infiammabilità aumenta con l'aumentare della concentrazione volumetrica (purezza); ne deriva quindi che l'alcool etilico al 70% v/v è meno infiammabile rispetto all'etanolo anidro. L'etanolo è classificato in base al Reg. CEE 1272/2008 (CLP) come liquido infiammabile (Flam. Liq. 2) ed è quindi caratterizzato dalla frase di rischio H225 e dai consigli di prudenza P101, P102, P210, P233, P280 e P501.

La conservazione dell'etanolo a titolo pari o superiore al 95% v/v deve avvenire preferibilmente in armadi chiusi a chiave riportanti le indicazioni di pericolo relative alla conservazione di composti facilmente infiammabili. I luoghi di conservazione devono essere freschi (T < 30°C) (Ministero della Sanità, 1998), ma non umidi (l'umidità può pregiudicare il titolo dell'etanolo anidro). L'utilizzo dell'etanolo anidro

deve avvenire lontano da fiamme libere, scintille o superfici calde.

Particolare attenzione è richiesta comunque anche nella manipolazione e stoccaggio delle soluzioni idroalcoliche con titolo maggiore al 35% v/v, in quanto esse mantengono un rischio di infiammabilità moderato. Pertanto le soluzioni idroalcoliche con contenuto di etanolo superiore al 35% v/v devono essere conservate in contenitori con chiusura con tappo a vite e preferibilmente in vetro scuro anche se l'alcool non è sensibile alle radiazioni UV. In etichetta deve poi essere riportata chiaramente l'indicazione in lettere del pericolo fisico di infiammabilità (facilmente infiammabile, infiammabile) in associazione al pittogramma romboidale con perimetro rosso rappresentante una fiamma viva nera in campo bianco.

Il profilo tossicologico dell'etanolo è assolutamente favorevole (Olson, 1999); negli impieghi, molto frequenti nei laboratori di zoologia (Montagnani et al., 2002), esso non comporta particolari rischi per l'operatore, a differenza invece dell'alcool metilico i cui metaboliti sono tossici ed è facilmente assorbito per contatto, ingestione e inalazione (Olson, 1999).

L'etanolo e l'alcool etilico con titolo pari al 95% v/v risultano assolutamente incompatibili e reattivi con l'acido nitrico, l'anidride cromica, il bromo e il permanganato di potassio i quali ossidano l'alcool violentemente rendendo particolarmente pericolosa la manovra per l'operatore (AA.VV., 1949). L'etanolo risulta poi anche incompatibile con la gomma arabica (è completamente insolubile in alcool già da concentrazioni superiori a 60% p/p) e tutti gli enzimi (AA.VV., 1949); ne deriva quindi che nella preparazione della colla entomologica l'etanolo non deve essere annoverato fra gli ingredienti, nonostante in alcuni casi sia utilizzato, in sostituzione al fenolo, quale agente antimicotico.

L'ETANOLO NELLE PROCEDURE DI LABORATORIO ZOOLOGICO

Preparazioni zoologiche

Nelle preparazioni zoologiche si impiega solitamente alcool etilico con titolo variabile dal 50 al 99% v/v (Gestro, 1925; Morton, 1950; Manfredi, 1987; Quicke et al., 1999; Delmastro, 2008) a seconda del gruppo zoologico da trattare e del tipo di trattamento da eseguire.

Le fasi di preparazione di un reperto zoologico destinato alla conservazione in mezzo liquido o destinato a preparazioni microscopiche prevedono:

- fissazione;
- lavaggio;
- disidratazione;
- diafanizzazione;
- conservazione finale.

La fase di fissazione deve essere considerata l'operazione più importante nella tecnica di preparazione e conservazione di reperti zoologici che presentano un corpo molle (Zangheri, 1981) che difficilmente si presta a tecniche tassidermiche o a conservazione a secco, considerato che ha tre scopi:

- immobilizzare i costituenti cellulari in uno stato più prossimo possibile a quello vitale;
- consentire al reperto di resistere agli stress chimico-fisici insiti nelle successive fasi di trattamento (riferito in particolare ai reperti destinati a preparazioni microscopiche);
- preservare il materiale dall'attacco di muffe e batteri (arresto dei processi di degradazione biotica).

Nella fissazione, il reperto zoologico, nel più breve tempo post-mortem, deve essere immerso nella soluzione fissante che può anche non essere l'alcool etilico che però rappresenta il mezzo fissante più ampiamente utilizzato talvolta, in particolare in entomologia, associato ad acido acetico glaciale. Per i piccoli reperti (insetti, elminti, acari, molluschi, ecc.) è sufficiente l'immersione nel liquido fissante, mentre nei reperti di dimensioni maggiori (vertebrati) non è sufficiente l'immersione nel liquido, ma è indispensabile anche praticare iniezioni di liquido o incisioni al fine di favorire la penetrazione del mezzo fissativo negli organi interni (Zangheri, 1981).

Le sostanze utilizzate per la fissazione sono generalmente l'etanolo in concentrazione del 70-90% v/v (preferire soluzioni all'80% se il materiale non è destinato all'inclusione), oppure, soluzioni di aldeide formica al 4-10%.

L'etanolo è un fissativo primario coagulante, si tratta comunque di un mezzo fissante blando considerata la moderata capacità di penetrare nei tessuti, a differenza della formalina (mezzo fissante primario non coagulante) che penetra nei tessuti in profondità e rapidamente.

Aspetto da non trascurare nell'impiego di soluzioni idroalcoliche è il parziale irrigidimento irreversibile e l'alterazione cromatica dei reperti in particolare se si tratta di specie con colorazione di tipo pigmentario. I tempi di permanenza in etanolo per la fissazione variano in base alle dimensioni dell'animale e generalmente variano da 12-24 ore a diversi giorni.

L'utilizzo dell'alcool etilico è solitamente non indicato per la fissazione dei gruppi zoologici provenienti dagli ambienti marini, considerato che l'elevato tenore in sali determinerebbe un importante precipitato; a questo inconveniente è comunque possibile ovviare con lavaggi pre-fissazione in acqua dolce deionizzata, oppure sostituire ripetutamente la soluzione idroalcolica fino a quando non si forma più del precipitato.

L'etanolo può essere poi usato in associazione alla formalina nelle soluzioni di fissaggio, come ad esempio nel liquido di Pampel (Gullan & Cranston, 2006). La formalina rappresenta ancora oggi una soluzione

molto utilizzata per la fissazione dei reperti in particolare in ambito ittologico (Delmastro, 2008), mentre è sconsigliata per gli artropodi destinati a preparazione microscopica che richiedono un successivo processo di chiarificazione in quanto l'aldeide formica indurisce i tessuti interni rendendoli non-macerabili.

La formalina nel contempo, però risulta in linea di massima il mezzo di fissaggio migliore per i reperti destinati a studi istologici (Gullan & Cranston, 2006) dove l'indurimento indotto facilita poi le operazioni di sezionamento.

Importante precisare che per una corretta fissazione degli animali di più grandi dimensioni sarebbe necessario sempre mantenere in movimento il liquido fissante attraverso adeguati agitatori.

Per quanto concerne le quantità di liquido fissante, il rapporto fra massa del campione/reperto e volume del mezzo fissante deve essere di 1:10-20.

La fase di lavaggio in ambito zoologico non è sempre necessaria ed ha la funzione di eliminare l'eccesso di fissativo che non si è combinato con i componenti tissutali per evitare che suoi residui possano reagire con le sostanze utilizzate nelle fasi successive. Nel caso dell'utilizzo dell'alcool etilico quale mezzo fissante il lavaggio diventa superfluo se il reperto è destinato ad una conservazione in liquido alcolico. Per il lavaggio si utilizza solitamente acqua corrente, utilizzando per un lavaggio finale acqua preferibilmente deionizzata.

La fase di disidratazione è un processo molto delicato avente la funzione di sottrarre l'acqua presente nei tessuti. Questa fase viene riservata principalmente ai reperti destinati a preparazioni microscopiche che quindi richiedono la completa assenza di acqua. La disidratazione viene elettivamente fatta attraverso la "serie degli alcool" a titolo crescente. I tempi di esposizione variano molto in base alle dimensioni del reperto e possono oscillare da 1-2 ore ad un massimo di 6-12 ore.

I bagni dovrebbero prevedere il passaggio del materiale alle seguenti gradazioni: 70% - 80% - 90% - 95% e 100%, ma per praticità, in entomologia, ci si limita ad effettuare i passaggi alle gradazioni del 70% - 90% e 100%.

Il bagno nell'etanolo anidro deve essere di breve durata e in entomologia è preferibile non superare un'ora di esposizione (tempi differenti sono utilizzati nei preparati anatomo-patologici).

In dettaglio, l'etanolo anidro (titolo 99,9-100% v/v) su materiale biologico deve essere impiegato con molta cautela in quanto sussiste il rischio che la rapida disidratazione del materiale danneggi irrimediabilmente il materiale (Manfredi, 1987). La preparazione di certi gruppi di artropodi (es. acari) esclude il passaggio in etanolo.

La fase di diafanizzazione riguarda solo i reperti o le parti di essi che preventivamente hanno subito un

processo di disidratazione alcolica e che, quindi, sono destinati alle preparazioni microscopiche. Questa fase ha la funzione di sostituire il mezzo disidratante con una sostanza compatibile con i mezzi di inclusione assolutamente idrofobi.

La sostanza che riesce a sostituire meglio l'etanolo è lo xilene che rende i preparati particolarmente limpidi.

La conservazione finale ha la funzione di mantenere lo stato di fissazione dei tessuti (Fink et al., 1979) e di impedire i processi degenerativi e putrefattivi a cui sono soggetti i reperti biologici (Lincoln & Sheals, 1985). Questa è l'operazione meno problematica se la fase di fissazione è stata condotta correttamente e il liquido di fissaggio è stato fatto penetrare e circolare nel reperto in modo omogeneo ed uniforme.

Ai fini della conservazione a lungo termine (bagno permanente) i reperti biologici si immergono in soluzioni idroalcoliche con titolo variabile dal 50 al 80% v/v (King & Porter, 2004; Akutsu et al., 2007; Braun et al., 2009) che presentano un minor grado di evaporazione.

Per la conservazione etanolica dei reperti entomologici e acarologici delicati (es. stadi larvali) è sempre consigliabile aggiungere 4-5 gocce (0,2-0,25 g) di propantriolo ogni 10 ml di soluzione idroalcolica. L'aggiunta di propantriolo permette di mantenere un buon grado di elasticità dei tessuti e concorre a ridurre l'evaporazione dell'etanolo (Romi et al., 1997; Samways et al., 2010).

Come già detto, la maggior parte delle conservazioni zoologiche in mezzo liquido viene eseguita attraverso l'impiego di alcool al 70% v/v; è però necessario effettuare alcune considerazioni al fine di una corretta conservazione dei reperti:

- essere sicuri di adoperare soluzioni con titolo certo e non approssimato. I problemi maggiori derivano dall'impiego di soluzioni con errore in difetto di etanolo; tali soluzioni vanno ad amplificare il problema dell'auto-diluizione dell'etanolo in sede conservativa;
- l'alcool a qualunque titolo tende a sottrarre acqua dai tessuti (disidratazione) avviando un fenomeno di auto-diluizione del mezzo conservante che, in particolare nei grossi animali (pesci, rettili, anfibi) può compromettere la conservazione e la stabilità del reperto. Questo inconveniente può essere ovviato sottoponendo sempre il reperto a un bagno pre-conservativo (disidratazione), dalla durata variabile a seconda delle dimensioni. Alla fine del bagno il reperto deve essere conservato in etanolo al 70% v/v;

- le soluzioni idroalcoliche, indipendentemente dal titolo, tendono a evaporare compromettendo la conservazione della parte del reperto eventualmente emersa. Questo inconveniente può essere risolto attraverso l'impiego di tappi a tenuta stagna (il sughero non è adatto in quanto l'alcool ne estrae delle sostanze che si fissano sui tessuti alterandone la colorazione), utilizzando preferibilmente contenitori con tappo a vite e attraverso l'aggiunta in surplus di mezzo

conservante adeguato al massa del reperto. L'utilizzo di un eccesso di conservante diventa superfluo nella conservazione dei piccoli invertebrati, considerato che nella pratica, solitamente, il rapporto massa reperto/volume soluzione conservante è a favore di quest'ultima;

- nei grossi animali (pesci, rettili, anfibi) è preferibile, prima dell'avvio del processo conservativo effettuare dei tagli con il bisturi (i tagli devono essere effettuati in aree anatomiche che non compromettano caratteri sistematici e, possibilmente, l'estetica) al fine di facilitare la penetrazione nei tessuti del mezzo conservante. Il mezzo conservante deve essere introdotto, attraverso pipette o siringhe, anche nell'apparato digerente attraverso l'apertura boccale;
- nel tempo il mezzo conservante deve essere sostituito totalmente (piccoli reperti) o in parte (grossi reperti), oppure deve essere rivalutato il titolo dell'etanolo attraverso l'impiego di appositi densimetri tarati per le soluzioni idroalcoliche o alcolometri. L'ebullimetro di Malligand non è adatto in quanto è apposito per soluzioni idroalcoliche con concentrazione in etanolo non superiore al 20-30% v/v.

Usi di laboratorio e di campo

L'etanolo è anche utilizzato in laboratorio come mezzo solvente per la preparazione di altri composti per il fissaggio e la conservazione di reperti anatomico-patologici e zoologici (Zangheri, 1981). Per le operazioni di pulizia e disinfezione è conveniente utilizzare l'alcool etilico denaturato, ricordando però che il massimo potere disinfettante è dato non dalle soluzioni più concentrate ma da quelle con titolo al 50-70% v/v (Marmo, 1991; Font et al., 2004); soluzioni con titolo maggiore coagulando le proteine in superficie, perdono la capacità penetrativa all'interno dei microrganismi e dei tessuti (Marmo, 1991).

Soluzioni idroalcoliche al 70% v/v in associazione ad acido acetico glaciale, in ambito entomologico, vengono utilizzate anche per l'uccisione e la conservazione temporanea degli insetti catturati attraverso trappole a cattura massiva. In questo uso è importante precisare che il titolo della soluzione idroalcolica di base può essere fortemente compromesso da fenomeni di diluizione, evaporazione e da reazioni di esterificazione (produzione di acetato di etile). Per i motivi precedentemente esposti le trappole devono essere visitate a periodi ravvicinati (almeno ogni 4-7 giorni) e in ogni caso i reperti una volta raccolti devono essere passati in soluzione idroalcolica fissa-trice (80-90% vol.), se destinati a conservazione in liquido, oppure, lavati in acqua corrente se destinati alla preparazione a secco.

Per la formulazione della soluzione temporanea sono adoperate diverse "ricette" a seconda dei professionisti e dei gruppi studiati (Aguilar, 2010); quella che trova il maggior consenso prevede l'impiego di alcool etilico al 70% v/v in ragione del 92% e di

acido acetico glaciale in ragione del 8%. Questa soluzione in ogni caso tende a indurire le articolazioni ed è assolutamente sconsigliata per artropodi con esoscheletro calcareo (Delmastro, 2008).

L'impiego di soluzioni temporanee fissatrici (etanolo $\geq 90\%$ v/v) può essere fatto solo per gruppi particolari che richiedono una rapida fissazione o che sono destinati a studi genetici.

Analisi genetiche

L'impiego dell'alcool al 95-100% v/v si addice particolarmente bene per la conservazione degli esemplari destinati ad indagini genetiche sul DNA grazie alla capacità di penetrare rapidamente nella membrana cellulare e disattivare l'endonucleasi DNasi in confronto ad altri alcoli primari (King et al., 2004). Lo stoccaggio in etanolo dei preparati destinati ad indagini sul DNA offre i migliori risultati se effettuato a basse temperature (Quicke et al., 1999). Il volume di mezzo conservante deve essere almeno 3 volte superiore alla massa del reperto (Santini et al., 2007).

Assolutamente non è indicata la conservazione dei reperti in formaldeide qualora siano destinati ad indagini genetiche, in quanto la lisi dei tessuti esposti alla formaldeide ostacola l'estrazione del DNA (Zimmermann et al., 2008).

Considerazioni sull'alcool etilico denaturato

Per le preparazioni zoologiche è assolutamente controindicato l'impiego dell'alcool etilico denaturato a causa dell'aggiunta nella soluzione di denaturanti (tiofene, denatonium benzoato, reactive red 24, metilchetone) che nelle preparazioni zoologiche sono alla base dei seguenti difetti:

- colorazione del preparato rosso o rosato (la colorazione può essere parzialmente rimossa attraverso bagni in etanolo al 70% v/v non denaturato);
- irrigidimento eccessivo dei tessuti e dei tegumenti (l'aumento dell'irrigidimento non è comunque solo dato dai denaturanti quanto anche dal titolo dell'alcool o da un errato processo di disidratazione) (Zangheri, 1981);
- formazione di precipitati.

In alcuni casi a livello artigianale viene ovviato il difetto della colorazione rossa dell'alcool denaturato (nettamente meno costoso rispetto all'etanolo non denaturato in quanto non soggetto alla accisa di Stato sugli spiriti) aggiungendo carbone vegetale o attivo alla soluzione da decolorare, lasciando in sospensione per alcune ore e filtrando con carta da filtro. Il risultato è un alcool denaturato trasparente. Rispetto a tale pratica, alcuni autori (Zangheri, 1981; Arnò & Delmastro, 2002), suggeriscono per la decolorazione l'impiego di carbone animale (carbone estratto dal nero d'osso); questo carbone presenta però il difetto di essere molto costoso.

Oltre ad essere un'operazione illegale, la procedura di decolorazione, non comunque semplice, permette

solo di ovviare alla colorazione (fattore puramente estetico), mantenendo invece tutti i difetti dati dai composti denaturanti; inoltre a distanza di alcuni anni l'alcool denaturato e sottoposto a processo di decolorazione tende ad assumere una colorazione giallastra.

Risulta importante precisare che i musei, gli istituti di ricerca e gli altri operatori che utilizzano l'etanolo per scopi scientifici possono richiedere il rimborso dell'accisa in riferimento al Decreto n. 524 del 9 luglio 1996 (Ministero delle Finanze, 1996).

CONTENITORI DESTINATI ALLA CONSERVAZIONE

Dato il grado di evaporazione delle soluzioni idroalcoliche la tipologia di contenitore che deve servire alla conservazione del reperto è molto importante e talvolta rappresenta una problematica in particolare nei vertebrati a causa delle dimensioni (Smith, 1965; Palmer, 1974; Fink et al., 1979; De Moor, 1990). In dettaglio un contenitore per essere adeguato deve rispondere ai seguenti requisiti:

- possedere un'adeguata stabilità chimica;
- essere robusto;
- essere possibilmente trasparente;
- essere dotato di un'ottima chiusura;
- essere dotato di fondo piatto o leggermente concavo.

La stabilità chimica del contenitore, che riguarda solo i contenitori in plastica (in quanto il vetro è inerte), è molto importante perché l'alcool etilico può intaccare le pareti del contenitore con la conseguente evaporazione/dispersione del mezzo conservante. I contenitori in vetro sono i migliori ma presentano limitazioni circa la fragilità, la disponibilità di modelli e il costo.

I contenitori in plastica devono essere in polipropilene (PP), polietilene (PE o PELD), polietilene tereftalato (PET) o polistirene, mentre non devono essere assolutamente utilizzati, per conservazioni permanenti, contenitori in metacrilato (nonostante siano trasparenti).

Il sistema di chiusura migliore è il tappo a vite possibilmente con doppio-tappo o guarnizione di tenuta (fig. 1). Nei casi di mancanza di doppio-tappo o guarnizione, situazione tipica dei contenitori in vetro con tappo a vite, si può interporre un film plastico fra il tappo e la bocca del contenitore. Particolarmente comodo ed efficace è l'impiego di pellicola Parafilm® che è modellabile, aderente e termoplastica.

I contenitori in vetro termosaldati sono certamente ottimi contenitori per quanto riguarda la didattica e l'esposizione museale, ma presentano il difetto di rendere difficile l'estrazione del materiale e l'aggiunta o il cambio del mezzo conservante.

Per quanto riguarda le provette, anche per queste la chiusura da preferire è il tappo a vite oppure il tappo a pressione in silicone perforabile.



Fig. 1. Dettaglio di chiusure idonee alla conservazione in etanolo (foto M. Dutto).

Nella scelta delle provette è necessario prestare molta attenzione, in quanto le moderne tecniche diagnostiche automatizzate hanno indotto radicali cambiamenti nella produzione delle provette limitando molto, anche per ovvi motivi di sicurezza, l'uso del vetro per preferire materiali di minor costo (tipo metacrilato) idonei all'impiego monouso; inoltre molti modelli sono già dotati di sostanze tipo sodio citrato o EDTA assolutamente incompatibili con i campioni zoologici da conservare.

Le provette più adatte per la conservazione a lungo termine devono quindi essere preferibilmente in vetro o in materiale plastico idoneo e neutre (assenza di reagenti per analisi chimico-cliniche) e nel caso di dotazione di tappo a pressione, al fine di evitare fenomeni di evaporazione dovuti all'allentamento o all'espulsione di quest'ultimo è bene ad allestimento del contenuto ultimato effettuare il vuoto attraverso aspirazione con siringa.

Il corretto allestimento in provetta degli artropodi deve preferibilmente rispecchiare la figura 2.

PREPARAZIONE DI SOLUZIONI IDROALCOLICHE

Le operazioni che richiedono alcool ad una concentrazione differente da quelle normalmente commercializzate costituiscono uno dei problemi più frequenti correlati all'impiego dell'etanolo presso i laboratori di zoologia in quanto la diluizione dell'alcool in acqua comporta una contrazione di volume data dalla formazione di legami H forti che determinano l'aumento di strutturazione tra soluto e solvente aumentando l'ordine e la compattezza delle molecole.

A causa delle particolari reazioni che si verificano nelle soluzioni etanolo/acqua (che non si verificano nelle soluzioni "oneste"), per preparare correttamente soluzioni idroalcoliche alla concentrazione desiderata partendo da una soluzione madre con titolo maggiore, si deve applicare una formula apposita

$$gx = \frac{P \text{ (alcool richiesto)} * ml \text{ (richiesti)} * \text{densità (alcool richiesto)}}{P \text{ (alcool disponibile)}}$$

che prende in considerazione anche il peso specifico (densità) della soluzione e quindi il calcolo dei grammi di alcool più concentrato da diluire (gx) richiede l'impiego della tabella 1.

Lo sviluppo della formula prevede che: si sostituisce il titolo alcolico v/v con il titolo in peso (P) di alcool (es. 70% v/v = 62,50% p/p "P"; 96% v/v = 93,89% p/p "P"), poi si utilizza la densità dell'alcool da preparare (es. 70% v/v ; d = 0,89 g/cm³) (tab. 1). Al quantitativo ponderale di alcool più concentrato ottenuto con la formula deve poi essere aggiunta una quantità d'acqua pari alla differenza fra il peso della soluzione alcolica desiderata (g = volume desiderato * densità) e il peso dell'alcool più concentrato da diluire.

Ad esempio, supponendo di voler preparare 100 ml di alcool al 70% v/v avendo a disposizione una soluzione stock al 96% v/v inserendo i valori nella formula precedente, limitando i calcoli a due cifre decimali, si ottiene:

$$gx = 62,50 \text{ g} * 100 * 0,89/93,89$$

$$gx = 59,20 \text{ g alcool etilico 96\% v/v}$$

Quindi è necessario pesare 59,20 g di alcool al 96% v/v e addizionarvi 29,8 g di acqua distillata in modo da ottenere una soluzione che complessivamente pesi 89 g (peso di 100 ml di alcool al 70% v/v). Il volume finale può comunque subire modeste variazioni considerato che la soluzione dipende dalla

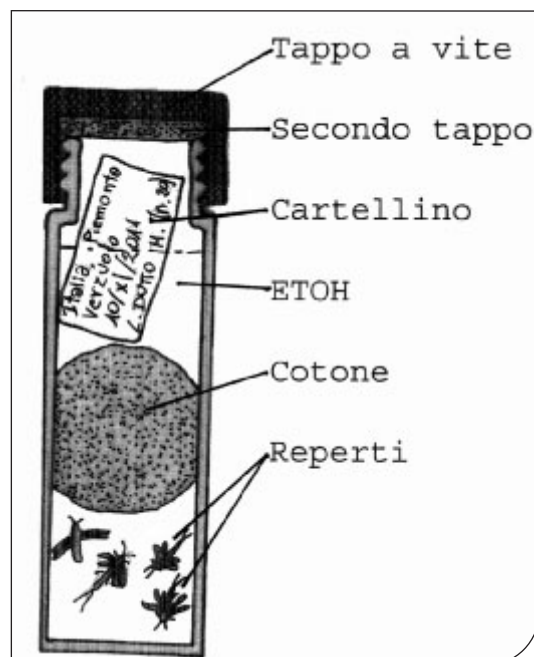


Fig. 2. Corretto allestimento di materiale entomologico in provetta (foto M. Dutto).

Densità a 15°C	Volumi d'alcool contenuti in 100 volumi	Pesi d'alcool contenuti in 100 pesi	Densità a 15°C	Volumi d'alcool contenuti in 100 volumi	Pesi d'alcool contenuti in 100 pesi
1,0	0	0,0	0,9328	51	43,47
0,9985	1	0,81	0,9308	52	44,41
0,9970	2	1,62	0,9288	53	45,37
0,9956	3	2,42	0,9267	54	46,33
0,9942	4	3,22	0,9247	55	47,29
0,9928	5	4,02	0,9226	56	48,26
0,9915	6	4,83	0,9205	57	49,24
0,9902	7	5,63	0,9183	58	50,21
0,9890	8	6,44	0,9161	59	51,20
0,9878	9	7,25	0,9139	60	52,20
0,9865	10	8,06	0,9117	61	53,19
0,9853	11	8,87	0,9095	62	54,20
0,9841	12	9,68	0,9072	63	55,21
0,9833	13	10,49	0,9049	64	56,23
0,9822	14	11,31	0,9026	65	57,25
0,9812	15	12,15	0,9002	66	58,29
0,9801	16	12,98	0,8978	67	59,33
0,9791	17	13,80	0,8954	68	60,38
0,9781	18	14,63	0,8930	69	61,43
0,9771	19	15,46	0,8905	70	62,50
0,9761	20	16,29	0,8880	71	63,58
0,9751	21	17,12	0,8855	72	64,64
0,9741	22	17,96	0,8830	73	65,72
0,9731	23	18,79	0,8804	74	66,82
0,9721	24	19,63	0,8778	75	67,93
0,9711	25	20,47	0,8752	76	69,04
0,9700	26	21,31	0,8725	77	70,16
0,9690	27	22,16	0,8698	78	71,30
0,9679	28	23,00	0,8671	79	72,43
0,9668	29	23,85	0,8644	80	73,59
0,9657	30	24,70	0,8616	81	74,75
0,9645	31	25,56	0,8588	82	75,91
0,9633	32	26,41	0,8559	83	77,09
0,9620	33	27,27	0,8530	84	78,29
0,9607	34	28,1	0,8500	85	79,51
0,9595	35	29,01	0,8470	86	80,72
0,9581	36	29,88	0,8440	87	81,96
0,9568	37	30,75	0,8409	88	83,22
0,9553	38	31,63	0,8377	89	84,47
0,9538	39	32,52	0,8344	90	85,74
0,9522	40	33,40	0,8311	91	87,04
0,9506	41	34,30	0,8277	92	88,37
0,9490	42	35,18	0,8242	93	89,72
0,9473	43	36,09	0,8206	94	91,08
0,9456	44	37,00	0,8169	95	92,45
0,9439	45	37,90	0,8128	96	93,89
0,9421	46	38,82	0,8084	97	95,35
0,9403	47	39,74	0,8042	98	96,83
0,9385	48	40,66	0,8000	99	98,38
0,9366	49	41,59	0,7951	100	100,00
0,9348	50	42,53			

Tab. 1. Densità delle mescolanze di acqua e di alcool a 15°C e corrispondenti quantità volumetriche e ponderali di alcool assoluto (Ministero della Sanità, 1965).

temperatura ambientale che dovrebbe essere, per la massima precisione, di 15°C.

Al fine di ovviare a calcoli e formule, per la costituzione delle soluzioni alcoliche di diversa gradazione si può ricorrere ad apposite tabelle che oltre a riferirsi a volumi prestabiliti, non sono sempre affidabili e nemmeno sono presenti nelle edizioni della F.U. successive alla VII. Contrariamente la formula proposta è molto più flessibile e si adatta per qualsiasi richiesta volumetrica.

CONCLUSIONI

L'impiego dell'alcool etilico e dell'etanolo in laboratorio è una manovra assolutamente sicura sotto il profilo tossicologico, mentre al fine di prevenire i rischi fisici (infiammabilità) è prudente conservare le quantità di prodotto strettamente necessarie o, per lo meno, se vengono impiegati in breve tempo grossi quantitativi di prodotto, portare l'alcool a titolo inferiore (ad esempio al 70% v/v), per ridurre il grado di infiammabilità all'aria.

In tutte le preparazioni è sempre opportuno impiegare alcool rettificato e non denaturato, anche se attualmente sono in commercio svariate tipologie di etanolo denaturato ma con colorazione azzurrognola che vengono impiegati per le preparazioni istologiche. In particolare quando è necessario l'uso dell'etanolo è bene optare per prodotti anidri che riportino la dicitura "puro per analisi", i quali rappresentano, in particolare per la disidratazione in microscopia, le formulazioni migliori.

Nella formulazione delle soluzioni idroalcoliche è sempre necessario prestare attenzione anche al tipo di acqua impiegata, considerato che i sali in essa disciolti (che concorrono a formare il grado di durezza) possono determinare precipitati prevalentemente antiestetici (Delmastro, 2008). Al fine di evitare precipitati, in particolare nelle soluzioni destinate ad essere impiegate quale mezzo conservante finale, è necessario utilizzare solo acqua deionizzata che può essere ottenuta per filtraggio attraverso filtri di resina, oppure, più eticamente utilizzando l'acqua proveniente da sistemi di deumidificazione.

Al fine di ottenere preparazioni zoologiche ottimali è importante comunque sempre saper scegliere l'alcool con il titolo che serve al caso, considerato che l'impiego di etanolo a concentrazioni elevate ha l'effetto avverso di irrigidire troppo rapidamente il campione rendendo poi difficili successivi trattamenti. Aspetti legati all'irrigidimento e alla contorsione del reperto devono essere tenuti in assidua considerazione quando si utilizzano soluzioni idroalcoliche per l'uccisione/fissazione degli esemplari; in questi casi (frequenti nel trattamento di larve di insetti e dei plattelminti) è preferibile utilizzare apposite soluzioni (variabili a seconda dei gruppi sistematici) per

l'uccisione che permettano la distensione del reperto limitando fenomeni di rigidità post-mortem. Qualora si debbano utilizzare soluzioni idroalcoliche, per l'uccisione è preferibile utilizzare soluzioni a titolo inferiore a quello utilizzato per il processo di fissazione.

Per quanto concerne la fissazione in etanolo dei reperti questa dovrebbe essere riservata a esemplari o parti di piccole dimensioni, rappresentando quindi un ottimo mezzo di fissaggio nelle preparazioni entomologiche e parassitologiche.

Il corretto e preciso impiego dei reagenti e l'accurata scelta dei contenitori nel laboratorio di preparazioni zoologiche sono procedure basilari per poter disporre nel periodo medio-lungo di materiale didattico e di studio che permetta successivi studi morfo-anatomici; in molte occasioni la degradazione dei preparati è principalmente dovuta a vizi nella costituzione delle soluzioni, alla scarsa qualità dei reagenti e ad inadeguate tecniche (contenitori) di conservazione.

BIBLIOGRAFIA

AA.VV., 1949. *Medicamenta. Guida teorico-pratica per sanitari*. Quinta edizione, vol. II, Cooperativa Farmaceutica, Milano, 1621-2818 pp.

AGUILAR J., 2010. *Methods for catching beetles*. Jorge Barrett Viedma editor, Asuncion, 303 pp.

AKUTSU K., KHEN C.V., TODA M.J., 2007. Assessment of higher insect taxa as bioindicators for logging-disturbance regimes in lowland tropical rain forest in Sabah. *Ecol. Research*, 22: 542-550.

ARNO' C., DELMASTRO G.B., 2002. Annotazioni su alcune sostanze chimiche utilizzate nella costituzione e conservazione delle collezioni biologiche. *Rivista Piemontese Storia Naturale*, 23: 243-280.

BLACK A.R., DODSON S.I., 2003. Ethanol: a better preservation technique for *Daphnia*. *Limnol. Oceanogr.*, 48: 45-50.

BRAUN M., SIMON E., FABIAN I., TOTHMERESZ B., 2009. The effect of ethylene glycol and ethanol on the body mass and elemental composition of insects collected with pitfall traps. *Chemosphere*, 77(10): 1447-1452.

DE MOOR F.C., 1990. Containers for wet collections. Problems and solutions. In: Herholdt E.M. (ed.), *Natural History Collections: their management and value. Transvaal Museum Special Publication*, 1, Transvaal Museum, Pretoria: 27-36.

DELMASTRO G.B., 2008. L'utilizzo di alcuni prodotti chimici nella raccolta e gestione delle collezioni biologiche in un museo naturalistico. *Museologia Scientifica Memoria*, 3: 11-23.

FINK W.L., HARTEL K.E., SAUL W.C., KOON E.M., WILEY E.O., 1979. A report on current supplies and practices used in curation of ichthyological collec-

- tions. Ad hoc Subcommittee on Curatorial Supplies and Practices of the American Society of Ichthyology and Herpetology, Ichthyological Collection Committee. Smithsonian Institution, Washington D.C., 63 pp.
- FONT M., MAFFEI E., CARPEGGIANI A., BERNARDI A., 2004. *Disinfettanti, antisettici ed antiparassitari*. Dialogo sui Farmaci, Verona, 76 pp.
- GESTRO R., 1925. *Il naturalista preparatore, imbalsamatore, tassidermista*. Cisalpino-Goliardica, Milano, 228 pp.
- GUARESCHI I., 1897. *Commentario della farmacopea italiana e dei medicamenti in generale*. Volume I, parte prima. Unione Tipografica editrice, Torino, 555 pp.
- GULLAN P.J., CRANSTON P.S., 2006. *Lineamenti di entomologia*. Zanichelli editore, Bologna, 514 pp.
- JAYALAKSHMI K., RAVIKUMAR H., JAYA NAIDU, RAJU RAGHAVENDRA, 2011. A silent killer in the laboratory - Formaldehyde: a review of the effects and management. *International Journal of Oral & Maxillofacial Pathology*, 2(2): 13-19.
- KING J.R., PORTER S.D., 2004. Recommendations on the use of alcohol for preservation of ant specimens (Hymenoptera, Formicidae). *Insect. Soc.*, 51: 197-202.
- LINCOLN R.J., SHEALS G.J., 1985. *Invertebrate animals. Collection & preservation*. British Museum (Nat. Hist.), London, 150 pp.
- MANFREDI P., 1987. *Microscopia per il naturalista dilettante*. Hoepli, Milano, 328 pp.
- MARMO E., 1991. *Farmacologia generale e speciale*. UTET, Torino, 1532 pp.
- MINISTERO DELLE FINANZE, 1996. Decreto n. 524 del 9 luglio 1996. Regolamento recante norme per disciplinare l'impiego dell'alcol etilico e delle bevande alcoliche in usi esenti da accisa. Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana n. 237 del 9 ottobre 1996.
- MINISTERO DELLA SANITA', 1965. *Farmacopea ufficiale della Repubblica Italiana*. Settima edizione. Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato, Roma, 1179 pp.
- MINISTERO DELLA SANITA', 1998. *Farmacopea ufficiale della Repubblica Italiana*. Decima edizione. Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato, Roma, 2424 pp.
- MONTAGNANI R., CERETTI G., DALLA POZZA G.L., 2002. Rassegna dei dati di letteratura sui rischi lavorativi nei musei di storia naturale. Risultati di un'indagine per la caratterizzazione del rischio da agenti infettivi e da tossine animali. In: Atti del seminario "Rischi lavorativi per gli operatori dei musei di storia naturale?", Venezia, 11 ottobre 2002, 47-56 pp.
- MORTON J.E., 1950. Collecting and preserving zoological specimens. *Tuatara*, 3(3): 104-114.
- OLSON K.R., 1999. *Intossicazioni acute. Veleni, farmaci e droghe*. Springer-Verlag, Milano, 477 pp.
- PALMER W.M., 1974. Inexpensive jars for museum specimens. *Curators* 17(4): 321-324.
- QUICKE D.L.J., LOPEZ-VAAMONDE C., BELSHAW R., 1999. Preservation of hymenoptera specimens for subsequent molecular and morphological study. *Zoological Scripta*, 28(1): 261-267.
- ROMI R., PONTUALE G., SABATINELLI G., 1997. Le zanzare italiane: generalità e identificazione degli stadi preimaginali (Diptera, Culicidae). *Fragmenta Entomologica*, 29: 1-141.
- SAMWAYS M.J., MCGEOCH M.A., NEW T.R., 2010. *Insect conservation. A handbook of approaches and methods*. Oxford University Press, Oxford, 441 pp.
- SANTINI A., LUCCHINI V., FABBRI E., RANDI E., 2007. Ageing and environmental factor affect PCR success in wolf (*Canis lupus*) excremental DNA samples. *Molecular Ecology Notes*, 7: 955-961.
- SMITH C.L., 1965. Maintaining inactive fish collections. *Curator*, 8(3): 248-255.
- STEYKAL GEORGE C., MURPHY W.L., HOOVER E.M. (eds.), 1986. *Insects and mites: techniques for collection and preservation*. U.S. Department of Agriculture, Misc. Pub. n. 1443. 103 pp.
- ZANGHERI P., 1981. *Il Naturalista esploratore, raccogliatore, preparatore, imbalsamatore*. Sesta edizione. Hoepli, Milano, 503 pp.
- ZIMMERMANN J., HAJIBABAEI M., BLACKBURN D.C., HANKEN J., CANTIN E., POSFAI J., EVANS T.C., 2008. DNA damage in preserved specimens and tissue samples: a molecular assessment. *Frontiers in Zoology*, 5: 18.