



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DEL PIEMONTE
ORIENTALE
"AMEDEO AVOGADRO"**

DIPARTIMENTO DI SCIENZE E INNOVAZIONE
TECNOLOGICA
(DiSIT)

TESI DI DOTTORATO IN
SCIENZE AMBIENTALI (ACQUE INTERNE ED AGROECOSISTEMI)

XXVI CICLO

Studio di fibre minerali carcinogeniche in campioni biologici

Responsabili Scientifici:

Chiar.ma Prof.ssa Caterina RINAUDO

Chiar.mo Prof. Paolo TRIVERO

Coordinatore Responsabile:

Chiar.mo Prof. Giorgio MALACARNE

Candidato:

Dott. Alessandro CROCE

Indice

1 - Scopo del lavoro	1
2 – Introduzione	3
2.1 – L’amianto	3
2.2 – L’erionite	17
3 - Materiali e metodi	21
3.1 - Spettroscopia micro-Raman	21
3.2 - Microscopia Elettronica a Scansione	28
3.2.1 - La sorgente	29
3.2.2 - La camera portacampioni	32
3.2.3 - Interazione tra gli elettroni ed il campione	32
3.2.4 - Le diverse modalità operative	41
3.3 - Diffrattometria a raggi X in luce di sincrotrone	42
3.4 - Specifiche tecniche della strumentazione utilizzata	45
3.5 - I campioni	46
3.5.1 – Campioni pre-iniezione	46
3.5.2 – Sezioni istologiche di topo	46
3.5.3 – Sezioni istologiche umane	47
3.5.4 – Metodologia di analisi	47
4 – Risultati	49
4.1 – Caratterizzazione delle fasi naturali di erionite pre-inoculo	49
4.1.1 - Caratterizzazione morfologica e chimica	49
4.1.1.1 - Caratterizzazione morfologica	49
4.1.1.2 - Caratterizzazione chimica	51
4.1.1.2.1 - Erionite Oregon	53
4.1.1.2.2 - Erionite Karlik	56
4.1.1.2.3 - Discussione sui dati chimici	58
4.1.2 - Caratterizzazione chimica di offretite	59
4.1.3 – Caratterizzazione spettroscopica di erionite e offretite	62
4.2 – Analisi di fibre in tessuti di topo	66
4.2.1 – Localizzazione delle fibre e caratterizzazione spettroscopica	66
4.2.2 – Caratterizzazione chimica	77
4.3 – Caratterizzazione di fibre di erionite in sezioni istologiche di polmone umano	82

4.4 - Caratterizzazione di fasi minerali definite “asbesto” per normativa in sezioni istologiche di polmone umano	91
4.5 – Crocidolite in tessuti derivanti da milza e pancreas di topo	109
5 – Conclusioni	116
Bibliografia	120
Ringraziamenti	128
Allegati	129

1 – Scopo del lavoro

In Italia l'estrazione, la produzione, la lavorazione ed il commercio degli amianti sono stati banditi nel 1992 (Legge 27 marzo 1992, n. 257), ma, dopo più di vent'anni da quella data, questi materiali costituiscono ancora problemi in diverse aree del Paese. Grandi impianti di produzione di materiali contenenti amianto (MCA) avevano sede in varie città - Casale Monferrato (Al), Bagnoli (Na), Broni (Pv)...; in ognuna di queste un grande numero di persone sono state o sono tuttora colpite da malattie asbesto-correlate (mesotelioma, asbestosi, carcinomi polmonari) ed il numero dei pazienti affetti da patologie amianto-correlate e dei decessi sta ancor oggi aumentando. Le proiezioni di Peto *et al.*, 1999 hanno predetto un picco di insorgenza di queste malattie nella seconda decade del XXI secolo nelle nazioni europee studiate, Italia inclusa (Peto *et al.*, 1999; Pelucchi *et al.*, 2004).

Per questa ragione, lo studio delle fasi definite "amianto" per normativa (actinolite d'amianto, grunerite d'amianto o amosite, antofillite d'amianto, crisotilo, crocidolite e tremolite d'amianto, secondo la nomenclatura del D. Lgs. 81/2008) risulta essere di vitale importanza per comprendere a fondo le cause dell'insorgenza delle patologie sopramenzionate.

Esistono, però, altre fasi minerali che si possono presentare in fase fibrosa, che la normativa non classifica come *amianti*, risultate comunque correlabili a picchi di insorgenza di malattie asbesto-correlate.

Tra queste, una fase minerale, la zeolite fibrosa *erionite* ha dimostrato una cancerogenicità 500-800 volte maggiore rispetto a quella del crisotilo e 200 volte maggiore di quella della crocidolite (Carbone *et al.*, 2011; Coffin *et al.*, 1992; Hill *et al.*, 1990).

La comunità scientifica, per questa ragione, sta indirizzando l'attenzione anche allo studio di queste fasi minerali e delle interazioni che queste instaurano con i tessuti umani.

Lo scopo del lavoro effettuato durante il Dottorato di Ricerca è stato lo studio della zeolite fibrosa erionite, sia in campioni usati internazionalmente come standard o naturali che in campioni istologici derivanti da topi trattati con fibre di queste fasi minerali, per studiare eventuali modificazioni a contatto con l'ambiente cellulare. Le metodologie analitiche utilizzate sono state la spettroscopia micro-Raman e la Microscopia Elettronica a Scansione in Pressione Variabile con annessa Microsonda in

Dispersione di Energia.

Le stesse tecniche sono state poi applicate all'analisi di sezioni istologiche ottenute sui tessuti di pazienti residenti nella regione della Cappadocia (Turchia), che hanno mostrato evidenza di mesotelioma maligno.

Parallelamente a questo studio, è proseguita l'analisi applicando la tecnica VP-SEM/EDS dei corpuscoli ferruginosi in sezioni di pazienti italiani affetti da mesotelioma pleurico, con l'obiettivo di mettere a punto una metodologia che permetta l'identificazione della fase di asbesto al loro interno.

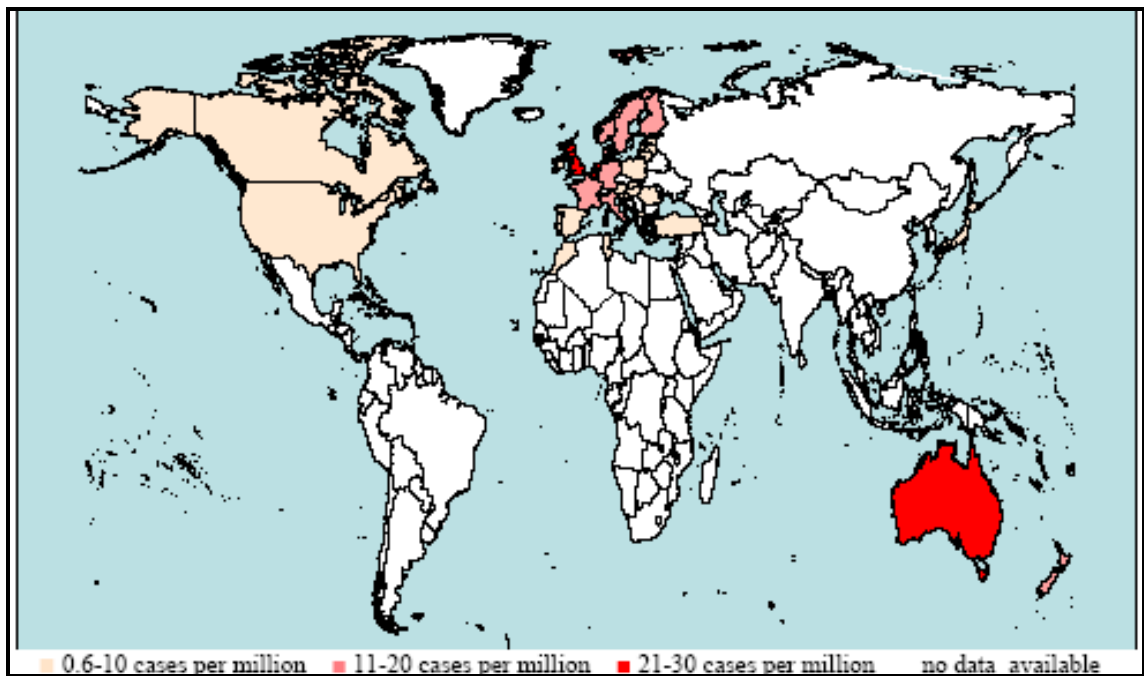


Figura 1.1: Stima di incidenza annuale di Mesotelioma Maligno (da C. Bianchi & T. Bianchi, 2004)

2 – Introduzione

2.1 – L’amianto

La correlazione tra l’inalazione delle fibre di asbesto e lo sviluppo delle malattie polmonari era conosciuto fin dalla fine del XIX secolo (Lilienfeld, 1991). Negli anni 1920 Cooke descrisse il caso di un paziente affetto da silicosi e fibrosi (Cooke, 1924; Cooke, 1927; Cooke, 1929): nel 1929 scrisse anche riguardo “curiosi corpuscoli” (*curious bodies*) osservati nei polmoni dei malati. Quelli osservati in quegli anni dallo studioso altro non erano che “corpuscoli dell’asbesto” (*asbestos bodies*), marker di esposizione all’asbesto noto agli scienziati dei nostri giorni. Nel 1935, Lanza *et al.* studiarono le condizioni lavorative di persone impiegate in una fabbrica, analizzando le polveri, i sistemi per controllare le dispersioni delle polveri e le condizioni di salute dei lavoratori: nelle raccomandazioni finali ai gestori degli impianti, gli autori scrissero che l’industria doveva “affrontare seriamente il problema del controllo delle polveri negli impianti di lavorazione dell’asbesto” (*seriously face the problem of dust control in asbestos plants*) e “far esaminare i nuovi impiegati fisicamente, includendo esami a raggi X del torace e rifiutarli per l’impiego nel caso in cui questi mostrassero tubercolosi o pneumoconiosi” (*new employees be examined physically, including X-ray examination of the chest, and rejected for employment if they show tuberculosis or pneumoconiosis*) (Lanza *et al.*, 1935).

Osservando questi esempi del passato risulta evidente che la correlazione tra asbesti e malattie polmonari era sotto osservazione già a partire dai primi decenni del secolo scorso. La relazione tra fibre di asbesto e mesotelioma fu descritta nel 1960 da Wagner *et al.*: in questo studio essi notarono questo tumore molto raro ed inusuale in lavoratori della miniera di crocidolite della provincia di Città del Capo, in Sudafrica (Donaldson *et al.*, 2012). A partire da questo lavoro, la relazione tra fibre di asbesto e malattie polmonari è stata largamente approfondita fino ai nostri giorni (Carbone *et al.*, 2012; Below *et al.*, 2011; Tannapfel, 2011; Zucali *et al.*, 2011; Fujiwara *et al.*, 2005; Cardile *et al.*, 2004; Ghio *et al.*, 2004; Soffritti *et al.*, 2004; Lambertini *et al.*, 2003; Kartaloglu *et al.*, 2003; Testa *et al.*, 1998; Mollo *et al.*, 1995; Lund *et al.*, 1994; Brody, 1993; Dodson *et al.*, 1993; Guthrie, 1992; Koerten *et al.*, 1990, Mossman *et al.*, 1983; Churg, 1982; Arul & Holt, 1980; Holt, 1974; Suzuki, 1974).

Il ritardo tra le scoperte accademiche e la giurisdizione sul divieto di utilizzo dell’amianto ha accresciuto pesantemente il rischio di esposizione, non solo per i

lavoratori, ma anche per la popolazione, sia residente nelle città ospitanti gli impianti di lavorazione dell'asbesto, sia esposta alle componenti delle abitazioni formate da Materiali Contendenti Amianto (M.C.A.). Si stima che oltre 2000000000 m² di lastre di cemento-amianto e 300000000 m³ di asbesto friabile siano ancora presenti sia negli ambienti *indoor* che *outdoor*: tutto questo è l'eredità di decenni di manipolazione industriale dell'asbesto.

L'amianto, grazie alle sue proprietà e caratteristiche, alla sua facile reperibilità ed al basso costo di produzione, è stato utilizzato nelle più disparate realtà industriali e per produrre prodotti applicati alle più diverse sfere di vita antropiche. In modo da sfruttarne al meglio le caratteristiche chimico-fisiche, esso veniva utilizzato puro, oppure, più solitamente, miscelato in percentuali diverse ad altri materiali.

“Amianto” deriva greco e significa “immacolato e incorruttibile”, mentre “asbesto”, che di fatto è sinonimo di amianto, significa “perpetuo e inestinguibile”.

Con il tempo i due termini hanno assunto due campi di utilizzo differenti: “amianto” viene utilizzato per lo più in ambito commerciale/giuridico, mentre “asbesto” è usato in ambito scientifico/accademico.

Questi nomi sono stati attribuiti ad un gruppo di minerali, che presentano in natura un abito fibroso (esistono, infatti, per ognuno di essi i corrispettivi minerali in forma massiva). Cinque di essi appartengono alla serie mineralogica degli anfiboli (inosilicati a catena doppia) e sono:

- actinolite;
- amosite;
- antofillite;
- crocidolite;
- tremolite.

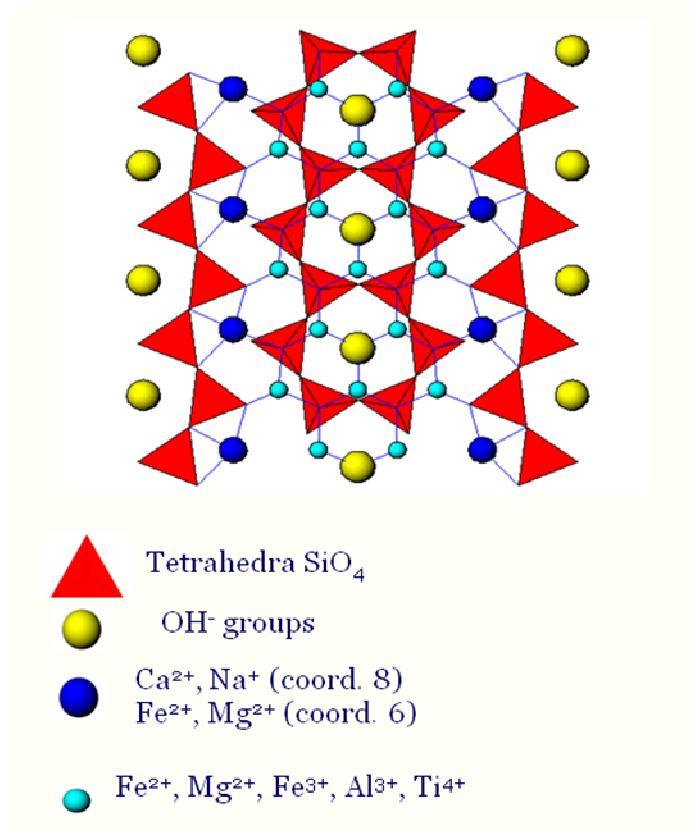


Figura 2.1: Schema della struttura cristallina degli anfibioli: le catene silicatiche si sviluppano lungo l'asse z (da Rinaudo *et al.*, 2003).

Questi minerali rispondono tutti alla formula chimica generale $W_{0-1}X_2Y_5Z_8O_{22}(OH,F)_2$: la cavità Z è la cavità tetraedrica (Si^{4+} , Al^{3+}), nelle cavità Y entrano ioni a coordinazione ottaedrica (Mg^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+}), nelle cavità X entrano ioni a coordinazione cubica (Ca^{2+} , Na^+) o a volte ioni con coordinazione ottaedrica (Mg^{2+} , Fe^{2+}); nella lacuna W, spesso vuota, entrano ioni grandi con coordinazione 12 (Na^+ , K^+).

Il sesto asbesto, il crisotilo, appartiene invece alla serie minerale dei serpentini, con formula generale $Mg_3(Si_2O_5)(OH)_4$.

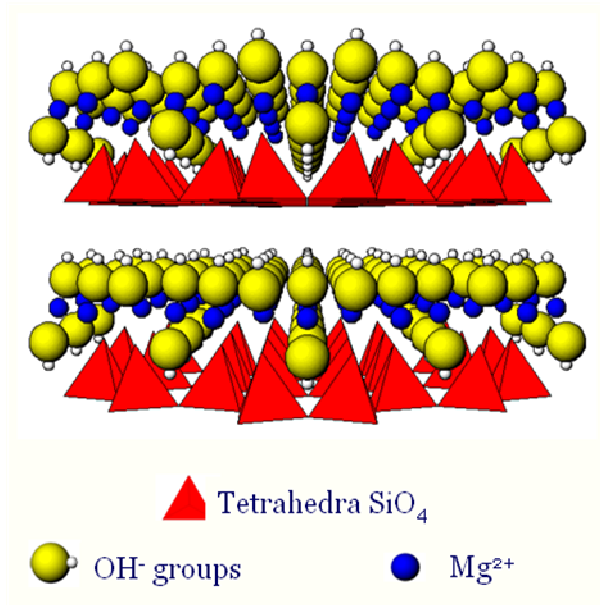


Figura 2.2: Schema della struttura cristallina dei serpentini (vista parallela a z; da Rinaudo *et al.*, 2003).

Nella recente normativa della Repubblica Italiana (D. Lgs. 81/2008, art. 247), i nomi di questi minerali sono stati ridefiniti, per permetterne la distinzione dai corrispettivi massivi, rispettivamente in:

- Actinolite d'amianto (n. CAS 77536-66-4);
- Grunerite d'amianto (n. CAS 12172-73-5);
- Antofillite d'amianto (n. CAS 77536-67-5);
- Crocidolite (n. CAS 12001-28-4);
- Tremolite d'amianto (n. CAS 77536-68-6);
- Crisotilo (n. CAS 12001-29-5).

Commercialmente gli amianti più utilizzati sono stati il crisotilo, la crocidolite e l'amosite.

Tutti questi minerali risultavano facilmente reperibili e venivano ricavati per lo più da miniere a cielo aperto in seguito a macinazione della roccia madre e successivo arricchimento.

Bisogna ricordare, inoltre, come l'utilizzo delle fibre di asbesto non sia stato limitato soltanto agli edifici, bensì esso abbia riguardato i più svariati ambiti di attività antropica. Oltre ad essere utilizzati con lo scopo di coibentare le abitazioni, infatti, questi minerali sono stati utilizzati anche all'interno di componenti dei mezzi di trasporto con differenti scopi: si sono sfruttate sia le loro proprietà isolanti (in treni,

autobus, navi e aerei) che quelle di resistenza (in freni e frizioni, in schermi parafiamma, in guarnizioni ed in vernici e mastici “antirombo”).



Figura 2.3: Bonifica da amianto su treno (da <http://www.costaman.it>)

In passato, sono esistiti anche ambiti di utilizzo ancora più particolari, quali, ad esempio:

- in adesivi e collanti;
- in tessuti ignifughi per arredamento come tendaggi e tappezzerie;
- in tessuti per imballaggio;
- in tessuti per abbigliamento, ignifughi e non, come feltri per cappelli, cachemire sintetico, coperte, grembiuli, giacche, pantaloni, ghette, stivali;
- in carta e cartone (filtri per purificare bevande, filtri di sigarette e da pipa, assorbenti igienici interni, supporti per deodoranti da ambiente, suole interne da scarpe);
- nei teatri (sipari, scenari che simulano la neve, per protezione in scene con fuoco, per riprodurre la polvere sulle ragnatele, su vecchi barili);
- in sabbia artificiale per giochi dei bambini;
- per il trattamento del riso per il mercato giapponese. (da www.arpat.toscana.it).

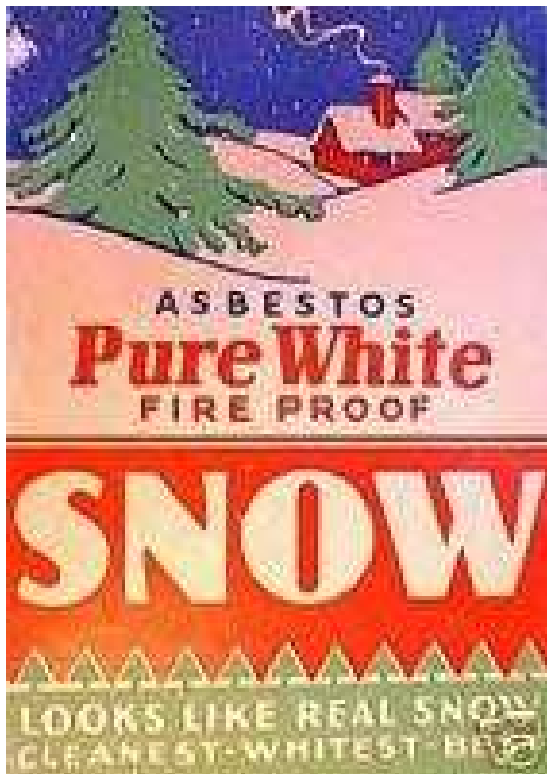


Figura 2.4: Etichetta di una confezione di neve artificiale di asbesto (da <http://reviews.ebay.com>).



Figura 2.5: Elmetto da football con asbesto (da <http://reviews.ebay.com>).



Figura 2.6: Piastra da cucina francese in amianto puro (da <http://en.wikipedia.org/wiki/Asbestos>).



Figura 2.7: Fumetto del 1963 (da <http://www.againwiththecomics.com/>).



The bigger the building, the more important fire-proofing becomes

That's why today's buildings have asbestos-cement walls and even floors containing asbestos.

Asbestos contains fire, cannot burn and holds up after metal and glass have melted down, giving vital time for people to escape.


You'll also find asbestos sealing plumbing joints, insulating heating pipes, electric motors and emergency generators.

Asbestos. We couldn't live the way we do without it.

ASBESTOS

When life depends on it, you use asbestos.

Figura 2.8: Pubblicità sulle potenzialità dell'asbesto nel World Trade Center (da http://banasbestosindia.blogspot.it/2010_11_01_archive.html).



**Build with
WUNDERLICH**

DURABESTOS

**Nicer to look at
Nicer to live in**

is the home built of DURABESTOS, the imperishable building material. Better than wood because it requires no paint, is fire-resisting and white-ant proof. More economical because it is easily and quickly fixed without waste. Durabestos building sheets are made in many handy sizes suitable for exterior walls and inside linings and ceilings.

54 USES FOR DURABESTOS

We have prepared a special leaflet suggesting new uses for Wunderlich Durabestos (asbestos-cement) sheets, uses that offer you marked economy, attractiveness and permanence inside and outside your homes . . . Equally suitable too, for existing structures or proposed new buildings . . . This most instructive and interesting leaflet is posted free to you just for the asking.

MAIL THIS COUPON NOW

Please send me samples and free booklet D.A.

NAME _____

ADDRESS _____

WUNDERLICH LIMITED

Manufacturers

LORD, NEWCASTLE AND SHORT STREETS,
PERTH.




Figura 2.9: Pubblicità di un quotidiano del 1929 da Perth, Australia, relativo al rivestimento di asbesto per costruzione. <http://en.wikipedia.org/wiki/Asbestos>.

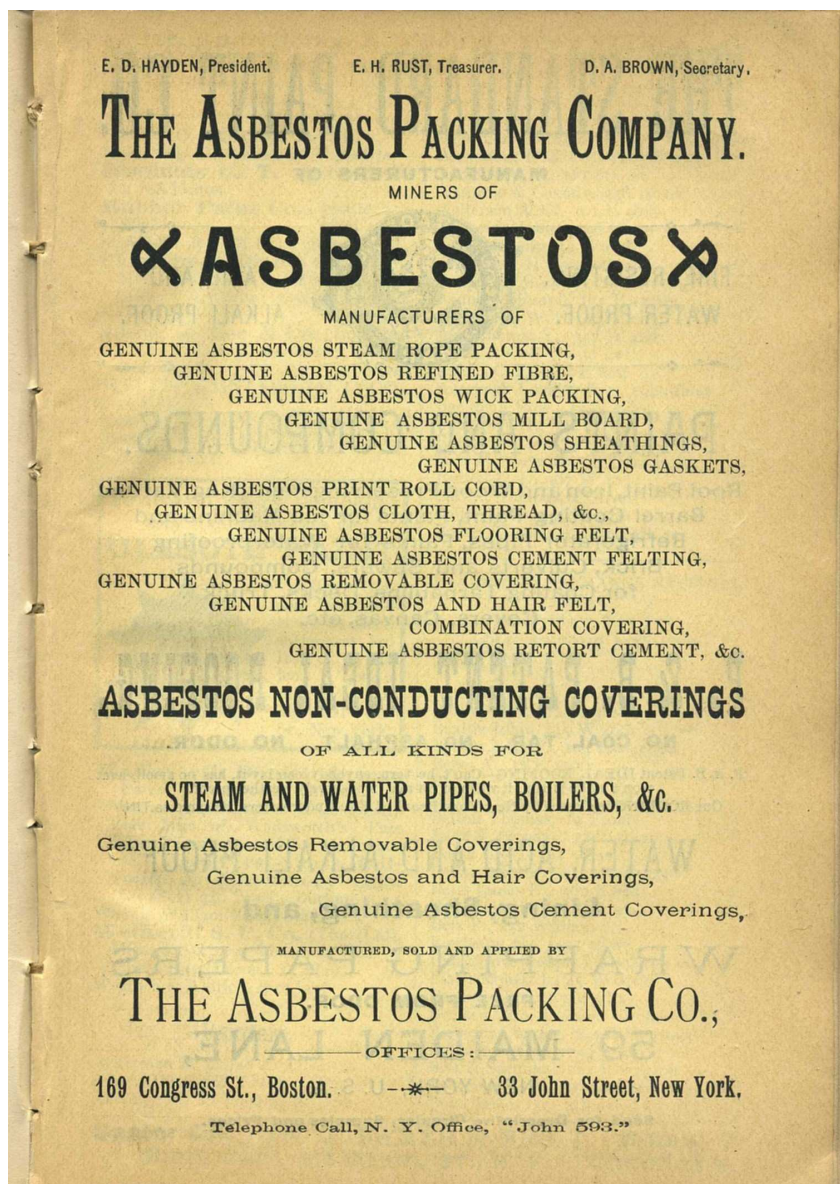


Figura 2.10: Pubblicità della “Asbestos Packing Company”, ditta pioniera, produttrice di sipari da teatro nel XIX secolo (da <http://www.nycbar.org/library/featured-exhibitions/before-mad-men>).

Infine, tra gli usi particolari dell’asbesto, occorre ricordare che, negli anni del dopoguerra si diffusero negli Stati Uniti d’America addirittura sigarette, il cui filtro era chiamato “micronite”. Questa tipologia di filtri era arricchito con ciuffi di fibre di crocidolite, con il fine di trattenere maggiori quantità di nicotina all’interno del filtro. Come si può vedere dalla pubblicità dell’epoca (figura 2.11), la ditta puntava alla protezione della salute dei fumatori (ma, purtroppo, è stato successivamente accertato un fattore di sinergia tra l’amianto ed il fumo di sigaretta nello sviluppo di malattie asbesto-correlate).

Sensitive Smokers:

Published medical reports show that about 1 out of 3 smokers is sensitive to the nicotine and tars in tobacco.



You can
SEE the proof of
Kent's health protection!



Exclusive "MICRONITE" FILTER removes 7 times more nicotine and tars than any other leading filter cigarette ... and you can see and taste the difference!

Compare KENT smoke with the smoke of any other filter cigarette. KENT smoke is lighter, cleaner, almost white in color! Ordinary filter cigarette smoke is heavy, yellowish in color.

The difference is that KENT'S "MICRONITE" FILTER—used in its original form to purify the air in atomic energy plants—removes 7 times more nicotine and tars!

If you're a Sensitive Smoker—if you worry about the effects of smoking—try KENT with its extraordinary "MICRONITE" FILTER.

But expect a new smoking experience with

KENT. After all, this is your first cigarette with a filter that really works (unlike ordinary cotton or crepe-paper filters!).

And if you'll give KENT a fair trial—not just one day of smoking, but a week or even two, time enough to allow your taste to adjust to so much less irritants in the smoke—we promise that KENT'S fine tobaccos will give you more smoking satisfaction than you've ever known.

And at the same time, you'll be enjoying the greatest health protection in cigarette history!

Stop to think ... and you'll start to smoke **KENT**

A PRODUCT OF W. GUILFORD COMPANY, AMERICA'S OLDEST TOBACCO COMPANY, ESTABLISHED 1792

© 1962, F. L. BURNETT COMPANY

Figura 2.11: Pubblicità delle sigarette Kent con "micronite" in crocidolite. (da <http://www.mesothelioma-lawyersblog.com>)



Figura 2.12: Dettaglio di un filtro “micronite” di una sigaretta Kent, che mostra la parte su cui poggiare le labbra; evidenti sono le fibre di crocidolite, intervallate da carta crespata pressata. (da <http://www.flickr.com>)

Riassumendo, le caratteristiche di resistenza meccanica e termica, nonché le proprietà di fonoassorbimento e di materiale isolante, hanno permesso una vasta diffusione di questi materiali in ogni attività dell’uomo, riguardante la sfera lavorativa, abitativa o di svago. Purtroppo tutti questi materiali hanno dimostrato nel tempo una deperibilità più o meno alta, ed il loro deterioramento provoca il rilascio nell’ambiente di una quantità di fibre direttamente proporzionale alla loro friabilità, le fibre possono venire inalate e a livello polmonare provocare malattie asbesto-correlate.

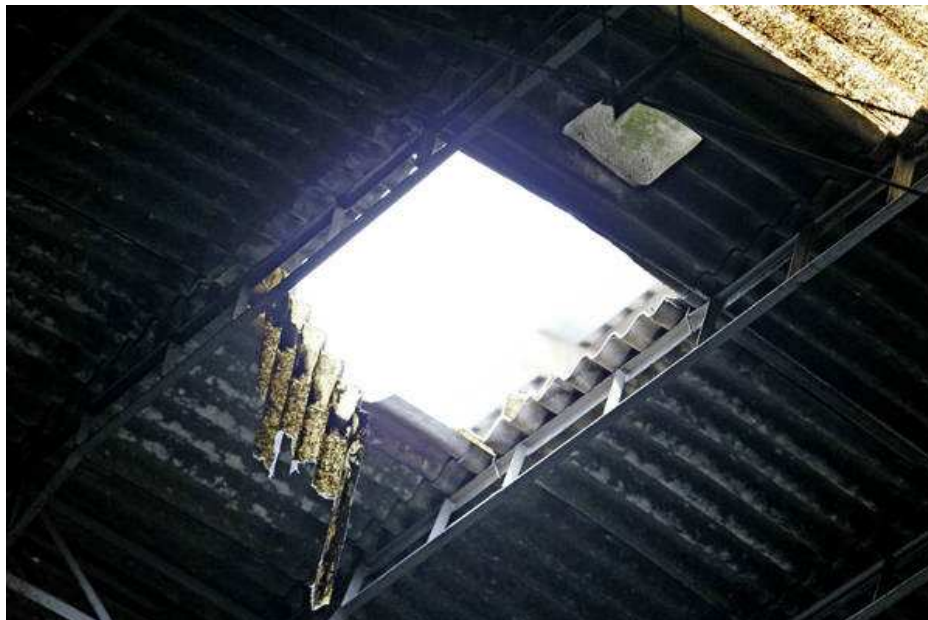


Figura 2.13: Lastre di cemento-amianto deteriorate. (<http://vittime-amianto.blogspot.it/>).



Figura 2.14: Lastre di cemento-amianto che mostrano segni di cedimento strutturale (nel cerchio un frammento di lastra).

Le malattie asbesto-correlate sono caratterizzate da un lungo tempo di latenza (la malattia può svilupparsi anche a distanza di decenni dall'esposizione) e possono essere raggruppate in due sottoinsiemi: malattie infiammatorie degenerative (asbestosi polmonare, placche pleuriche) e malattie neoplastiche (carcinomi bronchiali, cancro della laringe, cancro dell'ovaia, mesoteliomi pleurici, peritoneali vaginali e del testicolo). Il rischio di contrarre una patologia risulta essere legato alla dose cumulativa di fibre inalate (fibre/litro per anno) relativamente al tempo di esposizione. Per la letteratura internazionale, mentre per le malattie degenerative esiste una dose al di sotto di cui è possibile escludere il rischio di contrarre malattie (ad esempio secondo Finkelstein, 1982, la soglia di dose cumulativa per l'asbestosi è di 10 ff/cc per anno), per le malattie neoplastiche non esiste alcuna soglia di sicurezza.

Il mesotelioma risulta essere un tumore piuttosto raro nella popolazione generale, ma risulta colpire circa il 15% delle persone esposte a fibre di asbesto: per questa ragione il mesotelioma è riconosciuto come un tipico *marker* di esposizione all'amianto.

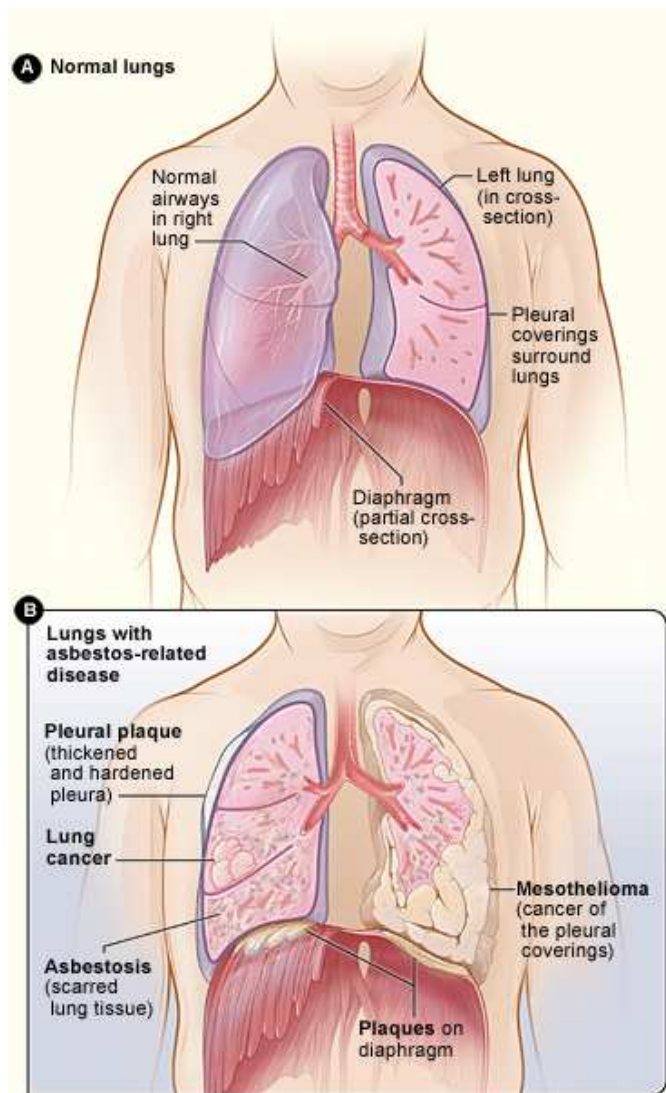


Figura 2.15: (a) Normali vie aeree nel corpo umano; (b) polmoni con malattie asbesto-correlate, incluse placche pleuriche, cancro del polmone, asbestosi, placche del diaframma e mesotelioma (da <http://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/asb/>)

Mentre per l'asbesto esiste una vasta letteratura scientifica che ha messo in evidenza la sua stretta correlazione con l'insorgenza di queste gravi patologie, esistono tuttavia numerose fasi minerali che possono presentare abito fibroso.

Queste fasi non sono state lavorate e commercializzate con la stessa proporzione delle fasi di asbesto. A livello locale, però, anche la presenza di alcune di queste fasi minerali sono apparse correlabili a picchi di insorgenza di malattie asbesto-correlate. In questi ultimi anni, l'attenzione della comunità scientifica si è rivolta di conseguenza allo studio anche di queste fasi minerali e delle cause scatenanti tali patologie.

Tra queste fasi compare l'erionite, di cui si tratta in questo lavoro.

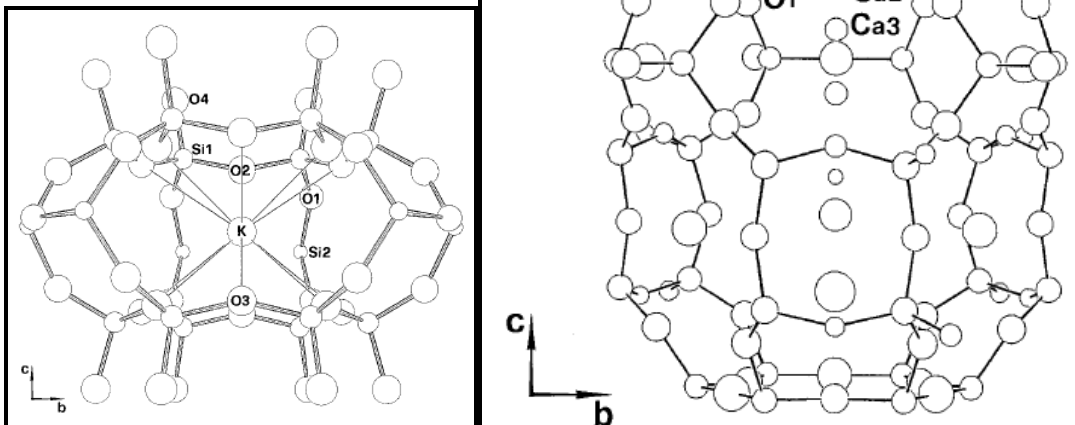
2.2 – L'erionite

L'erionite, tectosilicato appartenente al gruppo delle zeoliti, fu scoperta per la prima volta a Durkee, Oregon (U.S.A.), e fu definita da Eakle nel 1898 da materiali inviati all'università di Harvard (A.U. Dogan & M. Dogan, 2008). Essa risponde ad una composizione chimica media di $\text{Ca}_3\text{K}_2\text{Na}_2[\text{Al}_{10}\text{Si}_{26}\text{O}_{72}]\cdot 30\text{H}_2\text{O}$.

La struttura di questi minerali appare molto complessa, in quanto esistono due siti tetraedrici cristallograficamente indipendenti: uno va a formare l'anello doppio a sei vertici (D6R) e la base della gabbia cancrinitica (T1); l'altro forma l'anello singolo a sei vertici (S6R) e la base della gabbia di erionite (T2) (Gualtieri *et al.*, 1998).

Le gabbie cancrinitiche appaiono occupate in predominanza da potassio, mentre le gabbie erionitiche sono occupate da sodio, calcio e magnesio, distribuiti sulle posizioni cationiche e da molecole d'acqua (Kawathara & Curien, 1969; Gard & Tait, 1973). Siti cationici possono essere presenti anche vicino agli anelli a otto vertici condivisi da due gabbie erionitiche: questi siti possono essere interpretati come occupati da atomi di calcio e sodio (Gard & Tait, 1973), sebbene un particolare processo di scambio tra questa ultima posizione cationica ed il sito del potassio all'interno della gabbia cancrinitica può essere osservato in erionite deidratata (Schlenker *et al.*, 1977).

Figura 2.16: (a) Grafico di ORTEP della gabbia cancrinitica di erionite che mostra l'interazione del potassio con gli atomi di ossigeno di struttura; (b) grafico di ORTEP della gabbia di erionite che mostra la posizione dei cationi extra-struttura (non sono mostrate le molecole di acqua per migliore chiarezza della figura) (da Gualtieri *et al.*, 1998).



Nel 1997, l'erionite è stata elevata a serie mineralogica e da allora sono state definite le tre classi di Ca-erionite, Na-erionite e K-erionite (Coombs *et al.*, 1997; A.U. Dogan & M. Dogan, 2008).

L'erionite è stata osservata in molti paesi, quali l'Antartide, l'Austria, il Canada, la ex-Cecoslovacchia, le isole Fær Øer, la Francia, la Georgia, la Germania, l'Islanda, l'Italia, il Giappone, il Kenya, la Corea, la Nuova Zelanda, la Russia, la Scozia, la Tanzania e la Turchia (A. U. Dogan & M. Dogan, 2008).



Figura 2.17: Distribuzione nel mondo di erionite (da <http://updatingmdl.wordpress.com/luoghi-di-esposizione-naturale-alle-fibre-asbestiformi-2/>)

Per la prima volta, negli anni Settanta l'erionite della regione turca della Cappadocia fu riconosciuta come agente causante il mesotelioma, endemico per quella regione (Baris *et al.*, 1978; Baris *et al.*, 1979; Artvinli & Baris, 1979). Successivamente, nel 1987, la I.A.R.C. (*International Agency for Research on Cancer*) riportò che esistevano sufficienti evidenze per la sua carcinogenicità negli esperimenti sugli animali. Ulteriori evidenze emersero quando l'erionite fu trovata nei tessuti di mesotelioma pleurico derivanti da pazienti provenienti da tre villaggi della Cappadocia, dove ancora oggi esiste una alta incidenza di mortalità per mesotelioma maligno. In conseguenza di ciò, l'erionite fu inserita nella lista dei carcinogenici per l'uomo: come riportato da Guthrie, 1992, l'erionite può provocare il mesotelioma anche con livelli di esposizione molto inferiori rispetto a quelli degli amfiboli. Nello stesso studio, vengono inoltre riportati studi *in vivo*, in cui viene confermata la maggiore cancerogenicità dell'erionite rispetto agli asbesti, riportando la frase di Wagner *et al.*, 1985: “Nessuna altra polvere analizzata

ha prodotto una così alta incidenza di tumori, in particolare a seguito di inalazione”. Guthrie, infine, riporta che l’erionite si è dimostrata essere sia citotossica che genotossica anche durante gli studi effettuati *in vitro*.



Figura 2.18: Villaggio della Cappadocia, in cui le case sono costruite, o scavate in rocce contenenti erionite.

Oltre che in Turchia, l’erionite è distribuita anche negli stati occidentali degli Stati Uniti d’America: in questo caso, oltre al trasporto, dovuto ai venti, di fibre derivanti dalle rocce sedimentarie, il problema è originato dal fatto che con rocce contenenti questa fase minerale si sono eseguiti lavori di pavimentazione stradale.



Figura 2.19: Mappa del 1996 di distribuzione dell’erionite in rocce sedimentarie degli Stati Uniti (da <http://www.earthmagazine.org/article/dangerous-dust-erionite-asbestos-mineral-causing-cancer-epidemic-turkey-found-least-13>).

Osservando i dati relativi alla sua distribuzione nel mondo si può pensare che la causa del relativo ritardo con cui la comunità scientifica si è interessata allo studio delle correlazioni tra l'erionite ed il mesotelioma sia la diffusione di questa fase minerale circoscritta a determinate regioni. Ragionando quindi in termini di rischio, dato che l'esposizione a questa fase minerale appare più circoscritta, l'erionite, in confronto alle fasi definite "asbesto" per normativa, è stata oggetto di minori attenzioni. Ragionando però in fattore di pericolosità intrinseca delle fibre, le fibre di erionite risultano essere molto più carcinogeniche rispetto alle fibre normate: in alcuni studi su topi il mesotelioma si è sviluppato nel 100% dei casi (Wagner *et al.*, 1985).

Spesso però l'erionite nei dati medici appare essere non completamente e/o erroneamente caratterizzata, causando dubbi sulle conclusioni dai dati riportati (A.U. Dogan & M. Dogan, 2008). Gli studi *in vivo* ed *in vitro* dovrebbero essere condotti con campioni minerali che superino test di caratterizzazione sul tipo di erionite (di calcio, sodio o potassio) e sul chimismo associato. Per questa ragione, uno studio approfondito sulla correlazione tra fibre di erionite e lo sviluppo di malattie asbesto-correlate risulta essere di fondamentale importanza, al pari di una corretta caratterizzazione dei campioni di partenza utilizzati.

Nel tempo, diversi fattori hanno complicato gli studi finalizzati alla correlazione tra l'erionite e le malattie asbesto-correlate:

- la corretta caratterizzazione della composizione chimica della fase minerale (che spesso non permette una distinzione dell'erionite da altre fasi zeolitiche, quale l'offretite; A.U. Dogan & M. Dogan, 2008; Gualtieri *et al.*, 1998; Passaglia *et al.*, 1998);
- le associazioni dell'erionite con altre fasi minerali (anche asbesti, come riportato in Baris *et al.*, 1987);
- una non diretta correlazione dei picchi di mesotelioma con la distribuzione geografica dell'erionite in Turchia (Mumpton, 1979).

Nell'ottica di queste considerazioni, le tecniche di spettroscopia micro-Raman e VP-SEM/EDS sono state applicate allo studio di questa fase minerale.

3 – Materiali e metodi

3.1 – Spettroscopia micro-Raman

La spettroscopia Raman è una tecnica estremamente semplice da un punto di vista sperimentale: è sufficiente colpire il campione con un fascio laser e si ottiene uno spettro Raman caratteristico del campione in esame. Non è necessaria alcuna preparazione preventiva del campione da analizzare e quindi tale strumento si presta come veloce e sicuro metodo di riconoscimento dei minerali asbestiformi in un campione, una volta che lo spettro dei minerali “puri” sia stato definito ed utilizzato come spettro di confronto.

Nel 1928 il fisico indiano C. V. Raman aveva osservato che quando un materiale viene colpito da un fascio di radiazioni monocromatiche, una piccola parte della radiazione diffusa presenta una lunghezza d’onda diversa da quella della radiazione incidente. Notò anche che la lunghezza d’onda di questa parte di radiazione diffusa dipendeva dalla conformazione delle molecole responsabili della diffusione e che lo *shift* tra la radiazione incidente e la radiazione Raman rimaneva costante anche cambiando la lunghezza d’onda della radiazione incidente.

Essendo l’effetto Raman un effetto debole, nel migliore dei casi la potenza delle bande Raman è circa lo 0,001 % della potenza della sorgente eccitatrice.

La relazione che lega energia di una radiazione con la sua lunghezza d’onda e frequenza è:

$$E = h\nu = hc / \lambda$$

dove: E = energia

h = costante di Planck

ν = frequenza

c = velocità della luce

λ = lunghezza d’onda

La spettroscopia Raman si basa sul fatto che, colpendo con un fascio di radiazioni monocromatiche una sostanza, la radiazione diffusa dalla molecola differirà dalla radiazione incidente di una certa quantità di energia ΔE .

Si possono verificare due tipi di diffusione:

- diffusione elastica (effetto *Rayleigh*): l’energia della molecola rimane invariata e quindi frequenza e lunghezza d’onda del fotone incidente sono le stesse di quello del

fotone diffuso. La molecola si trova ad uno stato energetico di partenza, viene irradiata dal fascio incidente, passa temporaneamente a uno stato eccitato, per poi tornare allo stato iniziale emettendo un fotone di energia pari a quello incidente. Risulta questa la componente più probabile, e quindi più intensa, della luce diffusa, che dà origine al picco più alto posto in corrispondenza dell'origine degli assi, dove $\Delta E = 0$;

- diffusione anelastica (effetto *Raman*): è una componente minima della luce diffusa. L'energia della molecola viene modificata di una quantità ΔE , che può essere sia positiva sia negativa.

Per il principio di conservazione dell'energia si ha che:

$$h\nu_0 - h\nu = \Delta E$$

dove

ν_0 = frequenza della radiazione incidente

ν = frequenza della radiazione diffusa

Nel caso della diffusione anelastica, su cui si basa l'effetto Raman, si possono verificare due situazioni (figura 3.1):

- gli elettroni di legame aumentano di un determinato valore di energia ($\Delta E > 0$). Perché questo accada la frequenza della radiazione diffusa deve risultare minore della frequenza della radiazione incidente. La molecola si trova allo stato fondamentale, viene irradiata dal fascio incidente e passa ad un livello eccitato, per poi decadere fermandosi prima di ritornare allo stato fondamentale: questo fenomeno genera le *linee Stokes*;
- gli elettroni di legame cedono un determinato valore di energia ($\Delta E < 0$). Perché questo accada la frequenza della radiazione diffusa deve risultare maggiore della frequenza della radiazione incidente. La molecola si trova già ad un livello energetico superiore a quello fondamentale, viene irradiata dal fascio incidente e passa al livello eccitato per poi ritornare allo stato fondamentale: questo fenomeno genera le *linee anti-Stokes*.

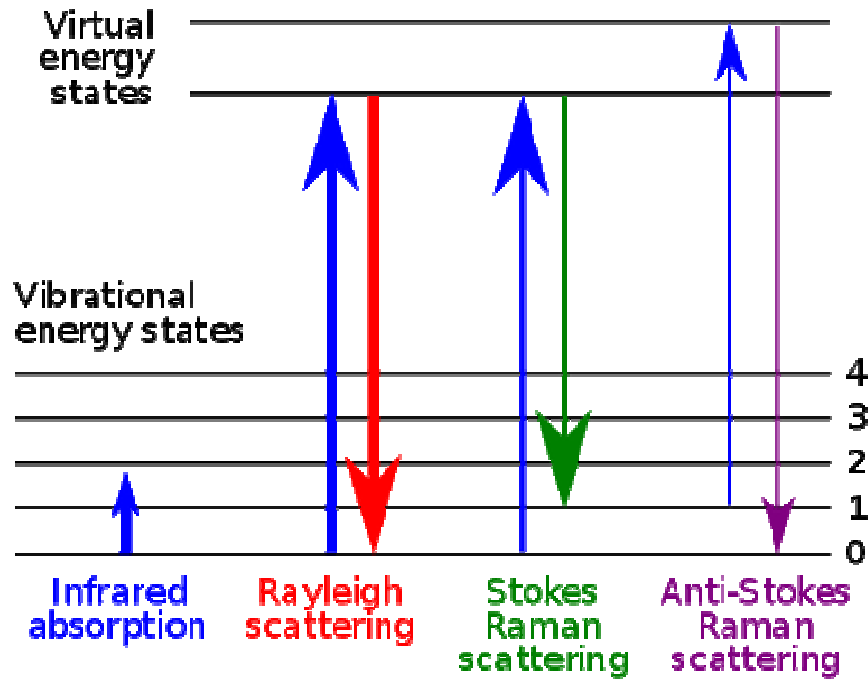


Figura 3.1: Diagramma dei livelli energetici delle diffusioni Raman e Rayleigh (da <http://www.azooptics.com/Article.aspx?ArticleID=381>).

Pertanto quando una radiazione incide con frequenza ν_0 su un campione, la radiazione che diffonde da questo con frequenza ν genera uno spettro Raman, costituito da una banda principale di massima intensità corrispondente alla più probabile diffusione *Rayleigh* ($\Delta\nu = \nu - \nu_0 = 0$ in quanto $\nu = \nu_0$) e da una serie di bande secondarie disposte simmetricamente rispetto alla banda principale corrispondenti alle *righe Stokes* ($\Delta\nu < 0$ in quanto $\nu < \nu_0$) e *anti-Stokes* ($\Delta\nu > 0$ in quanto $\nu > \nu_0$).

Poiché in condizioni normali di temperatura-ambiente, in accordo con la distribuzione di Boltzmann, la maggior parte delle molecole si trova allo stato energetico fondamentale, la diffusione *Stokes* è statisticamente favorita rispetto a quella *antiStokes*: a conferma di questo fatto le *righe Stokes* appaiono caratterizzate da maggiore intensità delle righe anti-Stokes e perciò sono proprio loro le bande che vengono prese in considerazione nel corso dell'analisi dei materiali (figura 3.2).

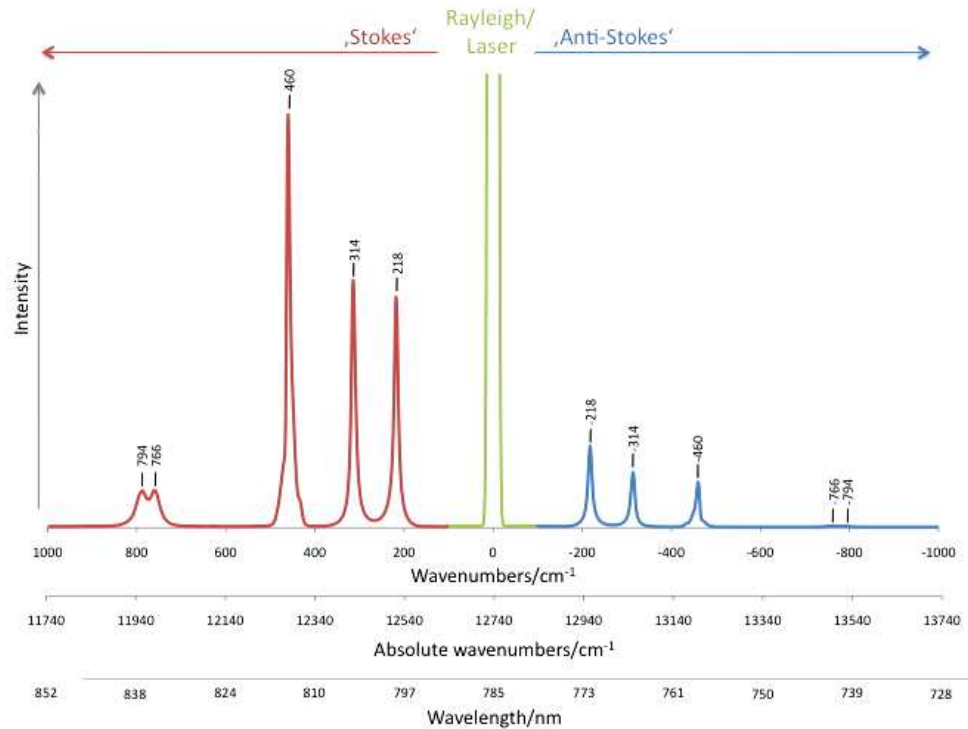


Figura 3.2: Spettro Raman di CCl₄ eccitato con una radiazione laser con $\lambda_0=785\text{nm}$ ($\nu_0=12740\text{ cm}^{-1}$, da <http://www.raman.de/htmlEN/basics/intensityEng.html>).

Per ottimizzare il rapporto segnale/rumore la riga *Rayleigh* viene eliminata per mezzo di un filtro ottico (filtro Notch o EDGE): si ricorre a questo artificio perché la riga Rayleigh non è utile al fine dell'analisi del campione in quanto ad essa non è associato alcuno scambio energetico e quindi nessuna transizione vibrazionale ed inoltre perché essa, essendo molto più intensa delle righe Raman, potrebbe saturare il rilevatore.

La differenza di energia tra radiazione incidente e radiazione diffusa è indipendente dalla lunghezza d'onda della sorgente luminosa: infatti, esaminando lo spettro di uno stesso campione ottenuto utilizzando due diverse frequenze eccitatrici, si potrà osservare che gli scarti ν_r tra la riga Rayleigh e le righe Raman rimangono costanti, essendo caratteristici della natura del campione. Per questo motivo negli spettri Raman si riporta in ascissa il valore di ν_r , espresso come numero d'onda n , dove $n = 1/\lambda$, misurato in cm^{-1} . Sull'asse delle ordinate viene riportata l'intensità dei picchi espressa in unità Raman, unità che, essendo relativa e non assoluta, non può essere utilizzata come termine di confronto tra spettri differenti.

L'intensità di una banda Raman dipende da molti fattori, come ad esempio la polarizzabilità della molecola, la potenza della sorgente e la concentrazione del gruppo attivo: questo limita fortemente l'utilizzo di tale tecnica per analisi di tipo quantitativo.

Il campo elettrico E , associato alla radiazione elettromagnetica incidente, può indurre un momento di dipolo in una molecola: si parla di molecola polarizzata da un campo elettrico esterno.

Dal punto di vista quantomeccanico l'origine dell'effetto Raman risiede nel fatto che ad ogni molecola è associata una grandezza α , chiamata polarizzabilità di legame, intesa come misura della deformabilità della nuvola degli elettroni di legame in prossimità di un campo elettrico.

Dall'interazione della molecola con un campo elettrico esterno si ha la generazione di un dipolo indotto, a cui è associato un momento di dipolo μ , proporzionale al campo applicato secondo la relazione $\mu = \alpha E$.

Il momento di dipolo genera una radiazione alla stessa frequenza della radiazione incidente (così si ottiene la diffusione *Rayleigh*), oltre a due serie di radiazioni a frequenze maggiori e minori (diffusione *Raman*) dovute al fatto che alcune vibrazioni della molecola modificano la polarizzabilità della molecola stessa.

Quando una sostanza è colpita dal fascio luminoso incidente si ha interazione tra materia e radiazione, con scambi energetici che determinano la vibrazione dei legami chimici delle molecole. Ad essere interessati dai moti vibrazionali sono sia i legami esistenti tra gli atomi di una singola molecola (legami intramolecolari), sia i legami esistenti tra molecola e molecola (legami intermolecolari), purché in grado di variare la loro polarizzabilità.

La grande quantità di differenti tipi di vibrazioni a cui una molecola è sottoposta fa sì che le posizioni degli atomi in una molecola non siano fissate esattamente, ma fluttuino in continuazione. Di solito per una semplice molecola biatomica o triatomica è possibile dedurre il numero e la natura di queste vibrazioni, ma così non è per le molecole costituite da numerosi atomi: esse non solo presentano numerosi centri vibrazionali, ma i vari centri possono anche interagire fra loro.

Le vibrazioni possono essere suddivise in due categorie fondamentali (figura 3.3): i modi di *stretching* (stiramento) e i modi di *bending* (piegamento).

Una vibrazione di stretching, che può essere sia simmetrico (gli atomi vibrano nella stessa direzione) sia asimmetrico (gli atomi vibrano in senso opposto), comporta il continuo cambiamento della distanza interatomica lungo l'asse di legame tra due atomi.

Le vibrazioni di bending sono caratterizzate da una variazione dell'angolo tra due legami e sono di quattro tipi: *rocking* (oscillazione nel piano), *scissoring* (a forbice nel piano),

wagging (ondeggio fuori del piano) e *twisting* (torsione fuori dal piano).

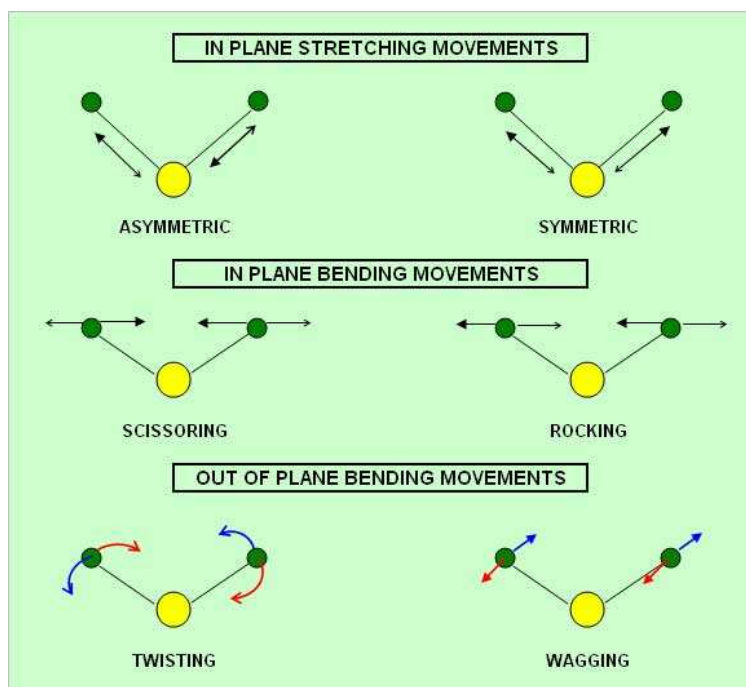


Figura 3.3: Tipi di vibrazione molecolare (da <http://www.ptli.com/testlopedia/tests/FTIR-E168andE1252-more.asp>).

Per le molecole complesse il discorso diventa meno agevole poiché esse contengono parecchi tipi di atomi e di legami, con conseguente aumento del numero di possibili vibrazioni. Infatti, oltre alle vibrazioni elencate si possono avere interazioni o accoppiamenti vibrazionali se le vibrazioni coinvolgono più legami con in comune lo stesso atomo centrale: la conseguenza è pertanto un cambiamento delle caratteristiche delle vibrazioni coinvolte.

Ogni legame chimico è dotato di un'energia opportunamente quantizzata e quindi in seguito ad eccitazione darà origine a un ben preciso tipo di vibrazione, a cui corrisponde una banda Raman caratteristica ad un certo numero d'onda. A seconda del tipo di molecole contenute nella sostanza e di come sono disposte reciprocamente nello spazio si ottiene quindi uno spettro Raman caratteristico del materiale. Poiché l'effetto Raman è un fenomeno molto debole (solo 10^{-6} - 10^{-9} dei fotoni incidenti vengono diffusi) questa tecnica d'indagine ha potuto trovare un notevole sviluppo esclusivamente a partire dagli anni '60 del XX secolo, grazie all'introduzione di sorgenti laser particolarmente energetiche, monocromatiche, stabili e puntiformi.

Altri limiti della tecnica sono l'incompletezza dei *database*, contenenti un numero inadeguato di spettri di confronto, e la possibile induzione di fluorescenza (soprattutto da parte di alcuni elementi come il ferro), che consiste in un'emissione particolarmente

intensa di fotoni che può coprire con gobbe parte dello spettro rendendo difficile la rilevazione delle bande Raman. Per ovviare a questo problema è possibile ricorrere all'utilizzo di una radiazione incidente con lunghezza d'onda maggiore: infatti la posizione delle bande rimane invariata, mentre la minore energia associata al fascio incidente è sufficiente per provocare solo l'effetto Raman (anche se meno intenso) ma non la fluorescenza.

Pur rimanendo essenzialmente un sistema d'analisi di tipo qualitativo e non quantitativo a causa della variabilità dell'intensità relativa delle bande, in funzione dell'orientazione dei monocristalli analizzati, la tecnica Raman ha comunque riscosso un grande successo in quanto comporta tutta una serie di vantaggi: può essere utilizzata indifferentemente su campioni allo stato gassoso, liquido o solido (sia cristallino che amorfo); è in grado di rilevare sostanze presenti nel campione anche in percentuali inferiori all'1%; inoltre non è distruttiva (permettendo così di esaminare in più punti lo stesso materiale rimasto integro e non ridotto in polvere come per la diffrattometria a raggi X) e non richiede alcun lavoro di preparazione del campione, dal momento che può essere applicata su minerali allo stato grezzo.

Inoltre la tecnica Raman, basandosi sui moti vibrazionali delle molecole, può trovare largo impiego nell'identificazione dei polimorfi, cioè di minerali che pur essendo dotati della stessa composizione chimica presentano differente struttura cristallina, a cui corrispondono spettri caratteristici con bande a diversi numeri d'onda.

3.2 – Microscopia Elettronica a Scansione

Il Microscopio Elettronico a Scansione (SEM) è uno strumento che permette, in seguito all'emissione di un fascio di elettroni, di analizzare i vari segnali prodotti dall'interazione degli elettroni del fascio con il campione in esame.

L'elaborazione di questi segnali consente di ottenere un'ampia gamma di informazioni, sia morfologiche che composizionali, relative al campione.

Il SEM è considerato uno strumento estremamente versatile, in quanto permette l'analisi di un'elevata varietà di campioni, differenti per natura (solo i materiali contenenti fluidi non sono analizzabili), forma e dimensioni.

A differenza del microscopio ottico, che fornisce un'immagine reale del preparato in esame, il SEM, grazie alla scansione del fascio elettronico, restituisce un'immagine virtuale, a partire dai segnali emessi dal campione dopo l'interazione con gli elettroni del fascio.

La scansione, infatti, consente al fascio di colpire la superficie del campione linea per linea, fino a coprire l'area da esaminare; i segnali così generati variano in intensità, punto per punto, in funzione delle anisotropie morfologiche, chimiche e strutturali del campione. I segnali vengono raccolti da appositi rivelatori e, da analogici, sono poi convertiti in segnali digitali dal software di interfaccia per poter essere elaborati.

Il SEM è costituito dai seguenti elementi:

1. la sorgente di elettroni;
2. un anodo verso cui sono accelerati gli elettroni;
3. due lenti elettromagnetiche per la focalizzazione degli elettroni;
4. una lente di scansione e di messa a fuoco del preparato, ove il fascio elettronico interagisce con il campione;
5. una camera da vuoto con tavolino portacampioni;
6. vari tipi di rivelatori, che acquisiscono i segnali dell'interazione fascio-campione e li trasferiscono agli elaboratori;
7. uno schermo, su cui si ricostruisce l'immagine.

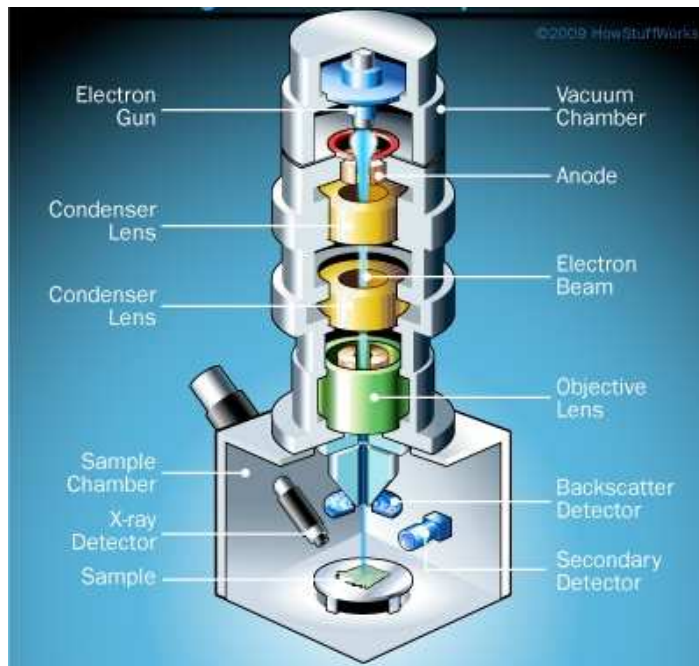


Figura 3.4: Rappresentazione schematica delle componenti costituenti un SEM. (da <http://science.howstuffworks.com/scanning-electron-microscope2.htm>)

La sorgente elettronica è sita nella parte apicale della colonna e genera il fascio elettronico. Essa consiste in un filamento metallico, comunemente di tungsteno o di esaboruro di lantanio, che produce elettroni per effetto termoionico. Gli elettroni vengono fatti accelerare ad energia variabile tra alcune centinaia ed alcune decine di migliaia di eV (in genere da 200 eV a 30 keV), grazie ad un anodo posto sotto il filamento. Il fascio che emerge dalla sorgente è divergente, ma viene fatto riconvergere ed è focalizzato da una serie di lenti elettromagnetiche e di fenditure all'interno della colonna. All'estremità inferiore della colonna, una serie di bobine di scansione deflette il fascio, fornendogli un movimento alternato lungo linee parallele ed equidistanti, in modo che, una volta raggiunta la superficie del campione, vada a ricoprirne un'area predefinita. Il fascio, infine, focalizzato dalla lente finale, esce dalla colonna e va a colpire il campione all'interno della camera da vuoto. Gli elettroni del fascio incidente penetrando all'interno del campione perdono energia, che viene riemessa dal campione sotto varie forme. Ogni tipo di emissione è potenzialmente un segnale rilevabile.

3.2.1 - La sorgente

La sorgente di elettroni rappresenta una delle parti più importanti in un microscopio elettronico a scansione. Essa normalmente è costituita da un emettitore di elettroni, quale un filamento di tungsteno (W) oppure di esaboruro di lantanio (LaB_6), dal quale gli elettroni vengono emessi per effetto termoionico.

Di recente sono state introdotte in commercio le sorgenti definite *Field-Emission Gun* (F.E.G.), che permettono di ottenere prestazioni molto più elevate del fascio di elettroni, sebbene esse siano comprensibilmente più complesse e deteriorabili rispetto ai più comuni filamenti.

Il filamento è alloggiato all'interno di un cilindro chiamato *Wehnelt*, che può essere polarizzato più o meno negativamente rispetto al filamento stesso.



Figura 3.5: Immagine dell'emettitore di elettroni (*Wehnelt*) con il filamento in primo piano (Fei - Quanta 200).

Gli elettroni, emessi in tutte le direzioni, sono costretti dal campo elettrico di polarizzazione del *Wehnelt* e dalla differenza di potenziale applicata fra questo e l'anodo, a convergere in una regione, chiamata *crossover*, dove si forma l'immagine della sorgente.

Quanto più sarà alta la polarizzazione negativa del *Wehnelt*, minore sarà il numero di elettroni che arriveranno nel punto di *crossover* e tanto più piccolo risulterà l'angolo di divergenza del fascio elettronico immediatamente dopo il punto di *crossover*.

La quantità di elettroni estratta dal filamento sarà, fondamentalmente, funzione della corrente che attraversa il filamento. In particolare si è osservato che vi sono due valori di corrente a cui la quantità di elettroni emessi si può considerare costante: questi due punti sono denominati *primo e secondo punto di saturazione* del filamento. A questi due punti corrispondono condizioni di buona stabilità in emissione del filamento e, conseguentemente, del fascio elettronico. In particolare, al secondo punto di saturazione vengono estratti meno elettroni che al primo, ma l'emissione risulta più stabile nel tempo rispetto alle condizioni del primo punto di saturazione.

Quando un filamento di tungsteno si consuma, il suo diametro diventa progressivamente minore e quindi la corrente necessaria a portarlo ad una certa temperatura, ovvero a un

certo grado di saturazione, risulta sempre più bassa (legge di Joule per i conduttori elettrici; Armigliato & Valdrè, 1980).

Dopo l'anodo, il fascio elettronico, anche se in parte già collimato, necessita di un passaggio su un totale di tre lenti elettromagnetiche, delle quali due per la collimazione, tali che regolino la larghezza del fascio, ed una per la messa a fuoco sulla distanza del campione.

Il passaggio sulle lenti porta nel fascio quattro aberrazioni, di cui l'operatore deve sempre tenere conto:

- *aberrazione sferica*: elettroni che si muovono a diversa distanza dall'asse vengono focalizzati in punti diversi;
- *aberrazione cromatica*: elettroni con diversa energia vengono focalizzati in punti diversi poiché la velocità degli elettroni nel fascio non è perfettamente uniforme;
- *aberrazione di diffrazione*: non tutte le onde arrivano all'interno della lente, a causa della natura ondulatoria dell'elettrone in contrapposizione alle dimensioni finite della lente;
- *astigmatismo*: varie imperfezioni (irregolarità di lavorazione nell'avvolgimento delle bobine, disomogeneità nei materiali, contaminazioni) inducono delle asimmetrie nei campi delle lenti; tuttavia lo strumento è dotato di un sistema di bobine di compensazione, noto come *stigmatori*, che consentono di minimizzare tale aberrazione.

Per quanto concerne invece l'aberrazione sferica e quella cromatica, esse sono correggibili diminuendo la lunghezza focale, ossia l'angolo di divergenza tra il fascio ed il campione, correzione che però aumenta l'aberrazione di diffrazione. Per lavorare nelle migliori condizioni di prestazione ottica bisogna quindi che l'operatore raggiunga un compromesso, che spesso ricade sulla scelta di diminuire la lunghezza focale delle lenti per arrivare a portare il campione all'interno del campo magnetico delle stesse. La scansione, da cui deriva il termine che dà nome al SEM, è effettuata grazie all'ausilio di due coppie di bobine poste vicino all'asse ottico.

3.2.2 - La camera portacampioni

La camera dei campioni può avere misure molto varie con tavolini portacampioni (*stage*), che conseguentemente possono avere ampia possibilità di muovere i preparati lungo le tre direzioni dello spazio, raggiungendo anche traslazioni di 15 cm lungo gli assi orizzontali x e y e fino a 5 cm lungo l'asse verticale z . È importante poter disporre di grande possibilità di movimento dei campioni qualora questi siano di grosse dimensioni o quando si debbano fare in contemporanea indagini su campioni che abbiano fra loro dimensioni molto diverse.

Durante le fasi operative in modalità “alto vuoto” (HV), la camera dei campioni viene mantenuta in condizioni di vuoto, poiché la presenza di molecole d'aria, a causa di possibili urti, danneggerebbe il segnale del fascio elettronico. Il sistema da vuoto di un microscopio elettronico a scansione prevede l'utilizzo di almeno due pompe di aspirazione: una pompa rotativa, che permette di raggiungere condizioni di vuoto di circa 1 Pascal, accoppiata ad una pompa turbomolecolare, che permette di raggiungere condizioni di vuoto di circa 10^{-4} Pascal (Acquafredda & Fiore, 2005).

Esiste poi un'altra serie di sistemi di pompaggio, più complessi, che sono stati ideati per permettere l'applicazione della microscopia elettronica su tutti quei campioni, come quelli biologici, che in condizioni di alto vuoto tenderebbero a disidratarsi e ad alterarsi da un punto di vista strutturale, oltre all'analisi dei campioni non conduttivi. In questi casi particolari quindi il sistema di pompaggio deve essere in grado di mantenere la camera in un *range* di pressioni che, a seconda delle necessità, può essere quella ambientale, mentre si mantiene molto bassa la pressione lungo la parte di colonna compresa tra l'emettitore e la lente di scansione ($10\text{Pa} < P < 3\text{Pa}$).

I microscopi elettronici di ultima generazione sono dotati di una completa movimentazione elettrica del portacampioni secondo 5 assi (x , y , l , rotazione, *tilt*), e offrono la possibilità di memorizzare qualunque posizione di osservazione e/o di analisi (Acquafredda & Fiore., 2005).

3.2.3 - Interazione tra gli elettroni ed il campione

Gli elettroni del fascio (elettroni primari), interagendo con il campione, generano una serie di fenomeni fisici (figura 3.6).

Gli elettroni possono rimbalzare elasticamente rispetto ai nuclei degli atomi di cui è costituito il campione, e prendono quindi il nome di elettroni retrodiffusi (BSE: *Back-Scattered Electrons*), o possono scalzare elettroni degli orbitali più interni degli atomi

del campione stesso che si sta osservando, con conseguente emissione di elettroni secondari (SE: *Secondary Electrons*); il riequilibrio energetico degli atomi a cui sono stati estratti elettroni secondari provoca l'emissione di raggi X raccolti da rivelatori a dispersione di energia (EDS: *Energy Dispersive Spectrometer*) o a dispersione di lunghezza d'onda (WDS: *Wavelength Dispersive Spectrometer*). Tali rivelatori sono posizionati in modo tale da formare rispetto al piano orizzontale un angolo (angolo di *take off*) che varia da 30° a 60°).

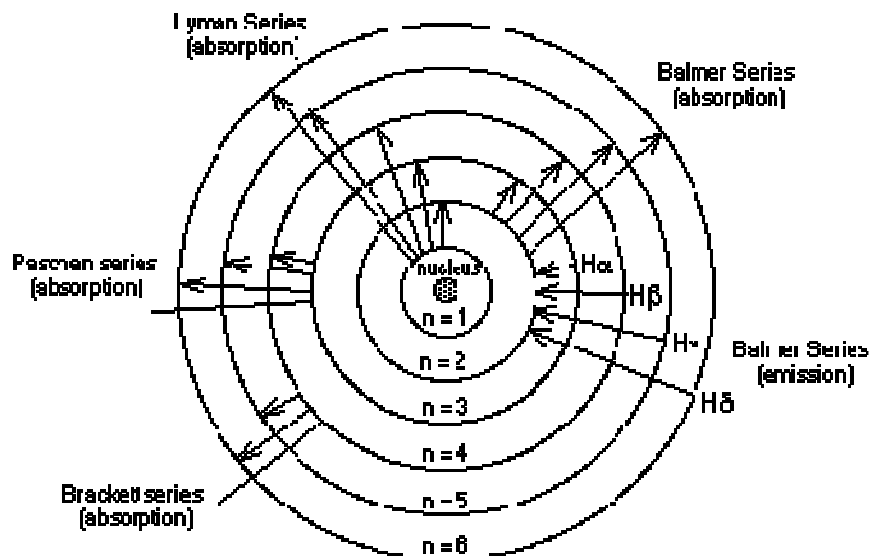


Figura 3.6: Rappresentazione schematica dell'atomo secondo Bohr e principali effetti che si generano nell'interazione tra elettroni del fascio primario e campione (da <http://socphysics.blogspot.it/>).

Gran parte degli elettroni che colpiscono il preparato vengono scaricati a massa; l'intensità di queste correnti è proporzionale alla conduttività del campione, che varia da punto a punto, e può essere quantificata da un misuratore di corrente di campione. Ognuno dei fenomeni fisici descritti è convertito in segnale da rivelatori (SE *detector*, CMA, SCM, EDS o WDS ecc.) e quindi riprodotta su uno schermo il cui pennello elettronico sia in fase con quello della colonna del SEM, rielaborata mediante opportuni pacchetti *software* per ottenere dati chimici qualitativi o quantitativi, mappe raggi X, etc. Gli elettroni secondari (SE), emessi dagli strati più superficiali del campione (~10nm), sono dotati di un'energia compresa tra 0 e 50 eV. Essi sono elettroni dei livelli atomici più esterni, che ricevono dal fascio incidente un'energia sufficiente ad allontanarli. Essi ci permettono uno studio della morfologia superficiale del campione.

Gli elettroni retrodiffusi (BSE) sono la porzione di elettroni del fascio riflessa con energia compresa tra 50 eV e quella di incidenza. I segnali permettono l'analisi di

composizione e morfologica (topografici) e provengono da profondità massime di alcuni μm . La quantità di BSE raccolta dipende, oltre che dalla morfologia della superficie, dal numero atomico medio del materiale presente nel piccolo volume irradiato dal fascio. L'immagine BSE rispecchia quindi la variazione del numero atomico medio all'interno del campione, evidenziando differenze di composizione delle diverse parti del campione.

I raggi X, caratteristici degli elementi che compongono il campione in esame, possono essere registrati e discriminati sulla base della lunghezza d'onda (WDS) o dell'energia (EDS). L'intensità di queste radiazioni è proporzionale alla concentrazione dell'elemento nel campione. La microanalisi ai raggi X quindi ci permette di acquisire informazioni circa la composizione degli elementi nel campione in analisi, in termini sia di quantità che di distribuzione.

Bisogna considerare che l'interazione fra elettroni e campione è piuttosto complessa; nonostante che la superficie d'impatto del fascio primario sia sufficientemente piccola, il volume di campione coinvolto è considerevolmente più grande (figura 3.7). Infatti il volume di interazione tra fascio e campione sarà direttamente proporzionale alla tensione di accelerazione degli elettroni e inversamente proporzionale alla matrice (Z medio) del campione. Sono stati elaborati vari modelli matematici che possano prevedere il comportamento di un elettrone del fascio primario all'interno del campione (per es. il metodo Monte Carlo).

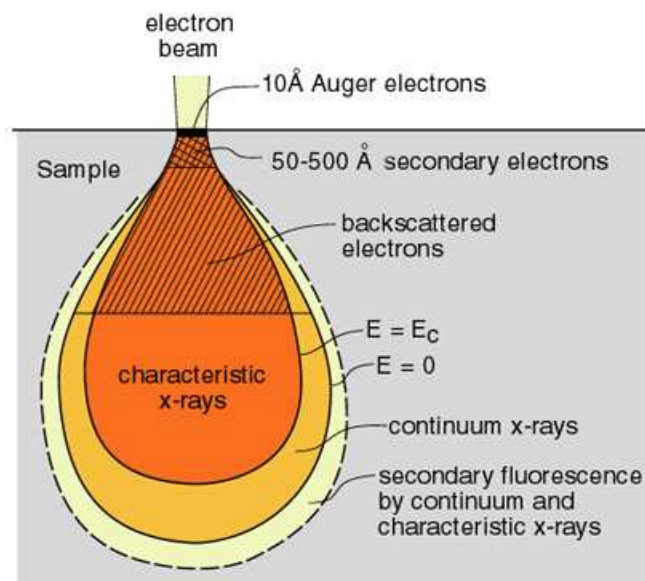


Figura 3.7: Zone del campione in cui si originano alcuni tipi di segnale (da <http://www4.nau.edu/microanalysis/Microprobe-SEM/Signals.html>).

Le immagini ottenute con gli elettroni secondari e gli elettroni retrodiffusi sono spesso indirizzate su un secondo monitor ad alta risoluzione per permettere la registrazione fotografica di quanto si può osservare sul monitor principale (Acquafredda & Fiore, 2005).

Per ciascun segnale emesso dal campione in risposta al fascio incidente esiste un rivelatore in grado di raccoglierlo.

➤ **Rilevatore di elettroni secondari (SE)**



Figura 3.8: Rilevatore di elettroni secondari nel microscopio elettronico utilizzato durante il lavoro di tesi (Fei - Quanta 200).

Gli elettroni secondari sono elettroni a bassa energia (fino a poche decine di eV) e provengono dalla porzione più superficiale del campione (pochi nm); è questo il motivo per il quale, normalmente, devono essere raccolti ad un basso angolo e il rivelatore deve essere posto a tensione elevata (10 kV) perché possano essere attratti verso di esso. A bassi angoli di raccolta vi saranno una gran quantità di elettroni secondari e pochi elettroni retrodiffusi.

La proprietà principale di questo tipo di segnale è quella di essere fortemente dipendente dalla morfologia del campione, pertanto l'immagine risultante sarà un'immagine in scala di grigi dell'area interessata dalla scansione del fascio, il contrasto delle tonalità metterà in risalto l'aspetto tridimensionale dell'oggetto in esame.

➤ **Rilevatore di elettroni retrodiffusi (BSD)**



Figura 3.9: Rilevatore di elettroni retrodiffusi (Fei - Quanta 200).

Gli elettroni retrodiffusi sono elettroni ad alta energia (da 50 eV all'energia degli elettroni del fascio) prodotti anche da una certa profondità del campione (pochi micron). La loro energia dipende direttamente dall'energia del fascio incidente e dalla composizione chimica (più precisamente dal peso atomico medio) del materiale di cui è costituito il campione, quindi l'immagine risultante sarà un'immagine in scala di grigi dell'area interessata dalla scansione del fascio. Il contrasto delle tonalità metterà in risalto la diversità di composizione chimica delle diverse parti che compongono il campione. In particolare, risulteranno relativamente più chiare le parti composte da un materiale a peso atomico medio/elevato e più scure le parti a peso atomico medio/inferiore.

Gli elettroni retrodiffusi sono caratterizzati da energia molto elevata, circa uguale a quella degli elettroni del fascio primario e sono raccolti ad un angolo molto alto. Per questo un rivelatore specifico per elettroni BS è posizionato esattamente al di sotto della lente di scansione, co-assialmente rispetto alla colonna del microscopio.

Per quanto concerne i microscopi con camera ambientale o a pressione variabile, fintanto che non sono stati costruiti rivelatori quali i VP-SE, gli unici rivelatori che potevano permettere di ottenere immagini in presenza di gas erano i BSD; infatti soltanto l'elevata energia degli elettroni retrodiffusi permette loro di attraversare in numero sufficientemente elevato da avere un segnale, in presenza di gas, lo spazio fra il campione e il rivelatore (Acquafredda & Fiore, 2005).

➤ **Rilevatore in dispersione di energia (EDS)**



Figura 3.10: Rilevatore in dispersione di energia (EDS) (Fei - Quanta 200; EDAX).

A differenza dei primi due tipi di segnale (elettroni), la radiazione X non fornisce un'immagine legata ad un contrasto topografico (SE) o compositivo (BSE) dell'area interessata dalla scansione. Infatti lo scopo della microanalisi RX è quello di ottenere un'analisi chimica puntuale di un campione in esame. Per questo motivo viene interrotta la scansione del fascio, che può essere quindi posizionato a piacere su un qualsiasi punto dell'area da analizzare. L'immagine risultante sarà uno spettro di Raggi X da cui si può risalire alla composizione chimica del materiale analizzato, dal momento che ogni picco dello spettro è riconducibile ad una ben precisa specie atomica.

Le radiazioni X emesse sono caratteristiche dell'atomo che le ha prodotte e ne consentono il riconoscimento. Poiché il bombardamento elettronico genera non solo lo spettro caratteristico, ma anche uno spettro continuo (radiazione di fondo), dovuto all'interazione fra gli elettroni primari e i nuclei degli atomi (*Bremsstrahlung*, figura 3.11), è necessario far uso di opportuni sistemi di rivelazione, che permettano di analizzare e separare le diverse energie delle radiazioni, per poterne poi fare una misura da cui infine sarà possibile ricavare la composizione del campione.

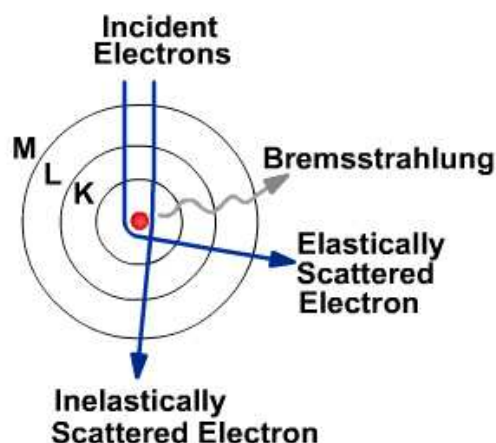


Figura 3.11: Produzione dei raggi X caratteristici e radiazione di *Bremsstrahlung* (da <http://www.ndt-ed.org/EducationResources/CommunityCollege/Radiography/Physics/xrays.htm>).

Esiste inoltre la possibilità di acquisire la radiazione X permettendo al fascio elettronico un movimento di scansione su un'area. In questo caso la radiazione, raccolta dallo spettrometro punto per punto, fornisce una mappa della distribuzione per ogni elemento chimico considerato sotto forma di immagine (a toni di colore) dell'area esaminata (*mapping*). Nella mappa così visualizzata l'intensità della radiazione X, quindi la concentrazione dell'elemento, è proporzionale alla luminosità del punto riprodotto sullo schermo, quindi la variazione della concentrazione dell'elemento chimico corrisponde alla variazione delle intensità di colore, risultando più chiare le aree più ricche nell'elemento considerato.

Scendendo nel dettaglio, un rivelatore di raggi X in dispersione di energia è un rivelatore allo stato solido. E' costituito da un monocristallo di silicio drogato superficialmente con litio - contatore Si(Li) - o da un monocristallo di germanio con opportuni difetti reticolari (figura 3.12). Questo contatore ha la possibilità di analizzare in tempo reale tutto lo spettro di raggi X emesso dal campione (il sistema viene definito multicanale) e non prevede disposizioni geometriche complicate: è sufficiente che si tenga costante la distanza sorgente-campione-contatore e che l'angolo di raccolta dei raggi X (angolo di *take off*, figura 3.12) sia sempre lo stesso.

Gli inconvenienti sono legati essenzialmente a tre cause:

- 1) il contatore deve essere tenuto costantemente a temperature molto basse (-190°C) con azoto liquido per evitare la diffusione del litio nel silicio o che vengano compromesse le posizioni dei difetti reticolari del germanio;
- 2) la bassa risoluzione in energia (113-150 eV) spesso non permette di separare sufficientemente alcune righe spettrali;

- 3) non è possibile irraggiare con alte potenze il campione in quanto all'aumentare dei raggi X che arrivano sul contatore aumenta anche il tempo morto del contatore stesso, il che si traduce in pochi conteggi in uscita dalla catena di amplificazione: avere meno conteggi equivale ad avere un errore maggiore nella misura.

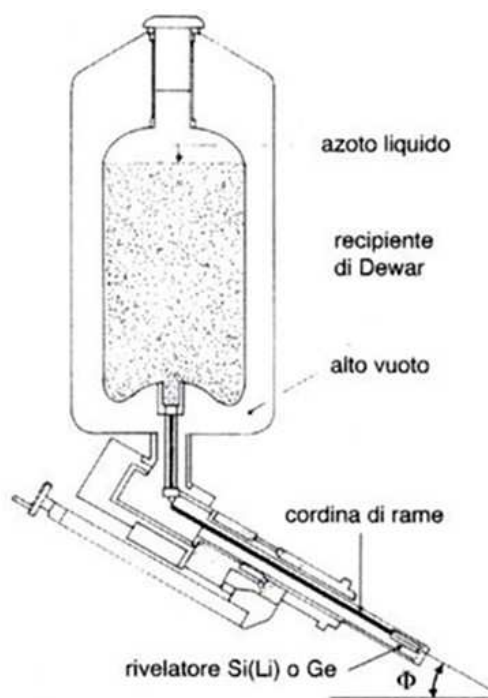


Figura 3.12: Schema di un rivelatore a dispersione di energia. Quando è in funzione, il rivelatore deve essere raffreddato, tramite una cordina di rame, da azoto liquido. Φ è l'angolo di take off (da Armigliato & Valdrè, 1980).

Si tenga presente, inoltre, che quando il tempo morto del contatore supera il 50% il rivelatore non si può più considerare proporzionale e che per intensità di raggi X particolarmente elevate, esso resta completamente abbagliato, cioè non fornisce neanche più informazioni qualitative sulla composizione del campione.

Tutto questo rende i contatori EDS particolarmente utili per analisi qualitative ma di più difficile utilizzo per analisi quantitative, in quanto spesso righe spettrali di tipo L di elementi pesanti tendono a sovrapporsi a righe spettrali di tipo K di elementi leggeri, ovvero serie di righe di tipo L di elementi pesanti contigui nella tavola periodica di Mendeleev tendono a sovrapporsi fra loro. La radiazione X deriva dalla ionizzazione dell'atomo nelle orbite più interne da parte del fascio incidente. Un elettrone primario può espellere un elettrone dell'orbita K, L o M dell'atomo, perdendo allo stesso tempo, per diffusione anelastica, l'energia E_K , E_L , E_M , corrispondente all'orbita dell'elettrone con cui ha interagito (figura 3.13). L'atomo ionizzato potrà riacquisire la stabilità

scendendo a livelli energetici inferiori, sia mediante l'occupazione della lacuna da parte di elettroni più esterni, con concomitante emissione del fotone X corrispondente, sia mediante l'emissione di un altro elettrone che assorbe l'energia appena liberata. Le radiazioni X così emesse sono caratteristiche dell'atomo che le hanno prodotte e ne consentono il riconoscimento (Severin, 2004).

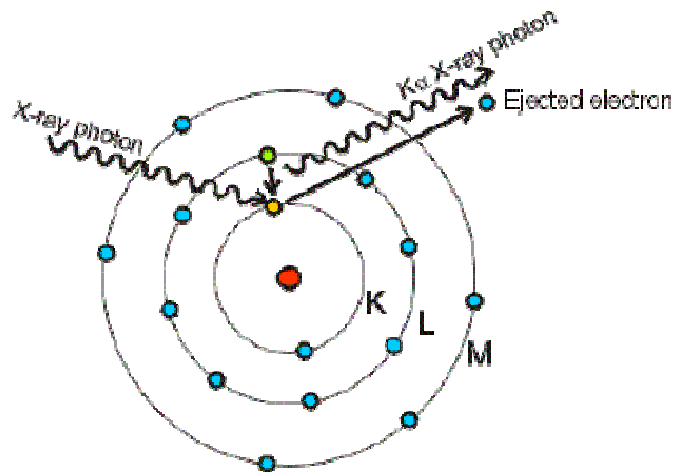


Figura 3.13: Generazione della radiazione $K\alpha$ (da <http://projects.exeter.ac.uk/geomincentre/estuary/Main/fluorescence.htm>).

Negli ultimi anni, comunque, le microanalisi quantitative mediante spettrometria ED si stanno diffondendo sempre di più grazie all'utilizzo di pacchetti *software* che permettono una più accurata deconvoluzione dei picchi di emissione dei raggi X.

Le concentrazioni minime che è possibile leggere con un contatore EDS, sono influenzate da molti fattori: in genere, comunque, non si scende mai al di sotto di 2.000 ppm.

3.2.4 - Le diverse modalità operative

Il microscopio può operare in tre modalità di vuoto:

- **Modalità “ad alto vuoto” (HV):** la pressione, dell’ordine di 10^{-6} Pa, permette di osservare campioni conduttivi e/o metallizzati, secchi.
- **Modalità “a basso vuoto” (LV, detta anche “a bassa pressione” – LP, o “a pressione variabile” – VP):** tramite un sistema di pompaggio differenziale, mentre la colonna rimane in condizioni di alto vuoto, la pressione in camera può variare da 0 Pa a 130 Pa. Essa consente di osservare materiali che sarebbero poco stabili in condizioni di alto vuoto, e soprattutto consente di osservare materiali non conduttivi, ma tendenzialmente secchi, quindi campioni allo stato naturale senza bisogno di metallizzazione che li renda conduttivi.
- **Modalità “ambientale” ESEM:** la pressione in camera può raggiungere 8 torr nominali. In queste condizioni è possibile operare in presenza di acqua liquida, nonché in atmosfera controllata in presenza di gas vari. E’ quindi possibile:
 - a) osservare senza modificazione o preparazione materiali umidi, campioni biologici, sali idrati ecc.;
 - b) osservare in tempo reale le modificazioni indotte sui campioni da variazioni di pressione e/o composizione dell’atmosfera della camera.

È ideale per l’osservazione di campioni con alto contenuto di acqua, umidi o addirittura conservati in acqua. Infatti impostando all’interno della camera una determinata temperatura e pressione, possiamo controllare l’umidità relativa che si viene a creare nella camera, mantenendo il campione umido. Lavorare in modalità ESEM è molto utile soprattutto in quanto è un metodo che non richiede una preparazione del campione e poco invasivo riuscendo a mantenere pressoché inalterate le caratteristiche strutturali del campione stesso.

Operando in modalità LV o ESEM bisogna comunque tenere in considerazione il fatto che le prestazioni strumentali sono progressivamente più ridotte rispetto alle analisi effettuate in alto vuoto.

3.3 - Diffrattometria a raggi X in luce di sincrotrone

Una parte del presente lavoro di dottorato è stata effettuata presso l'installazione E.S.R.F. (*European Synchrotron Radiation Facility*) di Grenoble (Francia).

La luce sincrotrone è prodotta quando degli elettroni ad alta energia, circolanti in un anello di stoccaggio, vengono deviati da campi magnetici. Il primo fascio di luce sincrotrone fu osservato nel 1947.

Nell'estremità del LINAC (Linear Accelerator), gli elettroni vengono emessi da un cannone a elettroni, raggruppati sotto forma di “pacchetti” e progressivamente accelerati da un campo elettrico, all'interno di una camera sotto vuoto, nella quale raggiungono molto rapidamente una velocità prossima a quella della luce (figura 3.14).

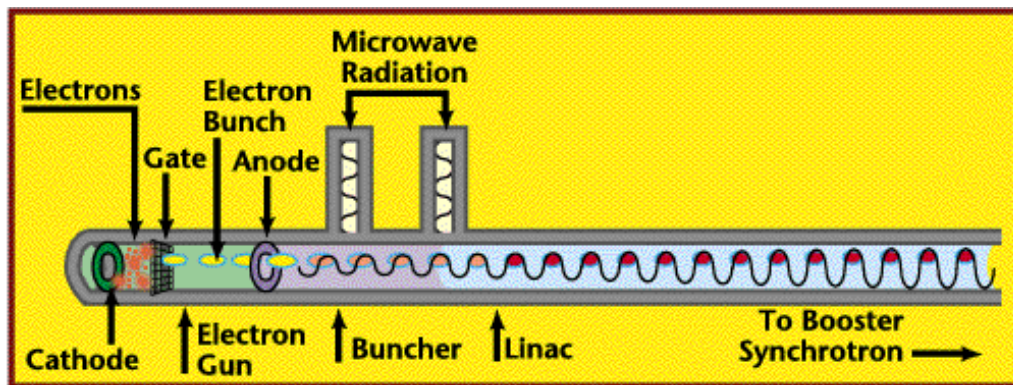


Figura 3.14: Schema del LINAC (da http://www.lbl.gov/MicroWorlds/ALSTool/ALS_Components/Linac/).

Prima di entrare nell'anello di stoccaggio (figura 3.15), gli elettroni devono raggiungere la loro energia finale, 6 miliardi di elettronvolt (GeV). Questa accelerazione viene ottenuta in un acceleratore di 300 metri di circonferenza, chiamato *booster sincrotrone*.

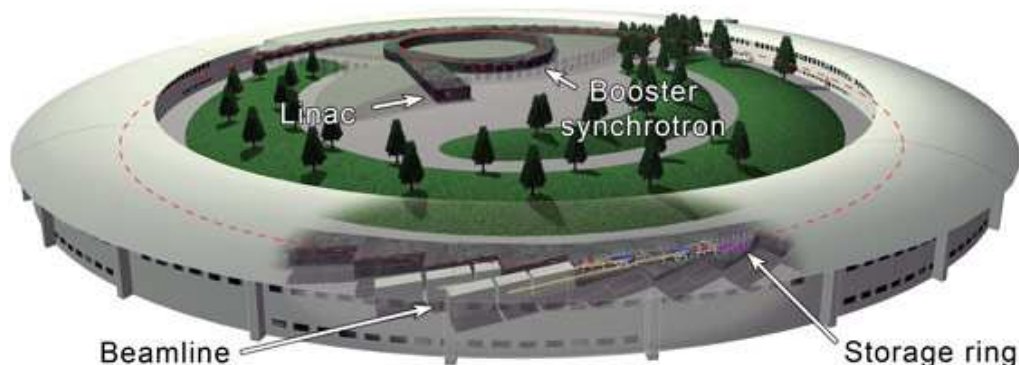


Figura 3.15: Schematizzazione dell'anello (da <http://www.esrf.eu/Accelerators/Accelerators>).

Questo booster contiene delle cavità acceleratrici nonché dei magneti di curvatura. I magneti forzano gli elettroni a seguire una traiettoria curva. La forza del campo magnetico deve essere aumentata progressivamente in modo sincronizzato con la salita in energia degli elettroni, il che spiega il nome “sincrotrone” dato a questo tipo di acceleratore.

Quando gli elettroni raggiungono l’energia di 6 GeV - in soli 50 millisecondi - sono inviati nell’anello di stoccaggio.

L’anello di stoccaggio, di 844 metri di circonferenza, è il luogo in cui gli elettroni circolano per ore alla velocità della luce all’interno di un tubo sottovuoto (circa 10^{-9} mbar).

Durante il loro viaggio nell’anello, gli elettroni passano in diversi tipi di magneti: magneti di curvatura, ondulatori e magneti di focalizzazione.

Ci sono 64 magneti di curvatura nell’anello di stoccaggio. La loro funzione principale, come nel booster, è di forzare gli elettroni a seguire una traiettoria curva. I magneti di curvatura sono anche una sorgente di luce sincrotrone. Secondo la teoria di Maxwell, quando degli elettroni vengono sottoposti ad una accelerazione, emettono onde elettromagnetiche. Per il fatto che gli elettroni sono dotati di altissima energia la luce viene emessa tangenzialmente alla curvatura dei fasci di elettroni, sotto forma di un fascio stretto e molto intenso. Questo fascio è diretto verso una “linea di luce”, ovvero la *beam-line* dove avvengono gli esperimenti.

I magneti di focalizzazione - ugualmente chiamati lenti magnetiche - sono utilizzati per concentrare il fascio di elettroni allo scopo di renderlo il più sottile possibile.

Gli ondulatori sono strutture magnetiche formate da una serie di piccoli magneti permanenti a polarità alternata. Ciò forza gli elettroni a seguire una traiettoria a zig zag. I fasci di luce emessi ad ogni curva si ricoprono ed interferiscono gli uni con gli altri, generando così un fascio finale molto più intenso del fascio prodotto da un singolo magnete. Ne risulta che i fotoni emessi sono concentrati su delle energie specifiche (il fondamentale e gli armonici), il che aumenta considerevolmente la brillantezza del fascio. Aprendo o chiudendo il traferro dell’ondulatore, è possibile regolare la brillantezza massima all’energia desiderata.

L’esperimento effettuato ha usufruito della *beam-line* BM01A, stazione intergestita Svizzera-Norvegia, ove è possibile effettuare esperimenti di diffrazione X su cristallo singolo o su polveri. Di seguito si riportano le caratteristiche tecniche:

Range di energia: 8-22 keV.

Grandezza del fascio: Minimo (H x V) 100 x 100 μm ;

Massimo (H x V) 1 x 1 mm.

Detectors: X-ray CCD detector (Titan);

Image plate (Mar345);

Scintillation counter.

3.4 - Specifiche tecniche della strumentazione utilizzata

Di seguito si riportano in breve le caratteristiche ed i dati tecnici specifici relativi alla strumentazione impiegata durante le fasi di analisi del presente lavoro di tesi.

Microscopio Ottico a luce polarizzata Zeiss Axiostar Plus 50 60 Hz 65 VA T0.8A, dotato di videocamera Axiocam MRc con interfaccia software Axiovision 4AC.

Spettroscopio micro-Raman Jobin Yvon - HR800 LabRam, laser He-Ne 20mW e 632.8 nm di lunghezza d'onda, con annesso microscopio ottico a luce polarizzata Olympus modello BX-41 e rilevatore CCD *air-cooled*. Software di interfaccia Labspec5. La corretta calibrazione dello strumento è stata ottenuta verificando, prima di ogni sessione di lavoro, intensità e frequenza della banda del silicio standard di riferimento, a $520,65 \pm 0,05 \text{ cm}^{-1}$. Per bilanciare il rapporto segnale-rumore le analisi sono state effettuate acquisendo almeno 50 cicli, ognuno da 10 sec.

Microscopio Elettronico a Scansione E-SEM FEI Quanta 200, con annessa microsonda elettronica EDAX. Software di interfaccia Genesis. L'osservazione è stata effettuata in modalità *Low Vacuum* (LV), operando con una Pressione Variabile (VP) in camera compresa tra 60 e 90 Pa, in modo da non applicare nessun tipo di metallizzazione sul campione. Le analisi sono state effettuate (salvo casi particolari successivamente riportati) operando a 20kV di voltaggio di accelerazione, 15 nA di corrente di fascio. Le analisi EDS sono state effettuate considerando come parametri fissi 80 Lsec, in modo da non sollecitare eccessivamente i tessuti, ed un Death Time compreso tra 15 e 35%.

Per quanto concerne la fase di elaborazione dei dati spettroscopici delle fasi inorganiche riscontrate, sono stati utilizzati il software di analisi tecnica di dati e grafica scientifica ORIGIN 6.0, per estrapolare gli spettri Raman dal programma di controllo remoto, ed il programma OPUS per effettuare la deconvoluzione di bande asimmetriche, indice della possibile compresenza di più bande Raman molto vicine.

3.5 - I campioni

3.5.1 – Campioni pre-iniezione

I campioni di fibre analizzate, inviati dalla *University of Hawai'i Cancer Center* di Honolulu (Hawaii, U.S.A.), consistono in campioni di fibre di erionite dalla Cappadocia (Turchia) e dall'Oregon (U.S.A.).

Secondo quanto indicato dal centro, i campioni della Cappadocia sono stati arricchiti in fibre, ma non è stato possibile eliminare completamente la parte particellare, mentre i campioni americani risultavano composti pressoché soltanto da materiale fibroso.

Un terzo campione di fibre consisteva in fibre di crocidolite standard, acquistato presso l'*Union for International Cancer Control* (U.I.C.C.).

Prima dell'iniezione nei topi, le fibre di erionite e di crocidolite sono state disperse in un tampone fosfato (*Phosphate Buffered Saline*, P.B.S.) in una concentrazione 2.0 mg/ml.

3.5.2 – Sezioni istologiche di topo

I tre tipi di campioni presentati nella sezione 3.5.1 sono stati successivamente iniettati intraperitonealmente in tre gruppi di 15 topi BALB/c presso la *University of Hawai'i Cancer Center* di Honolulu (Hawaii, U.S.A.). Una quantità totale di 4 mg è stata suddivisa in dieci dosi, che veniva somministrata ogni due settimane in 500 µl di P.B.S.. Un ulteriore gruppo di 15 topi è stato trattato con il solo tampone. Gli animali sono stati monitorati per i successivi 28 mesi e, nel caso presentassero asciti, veniva praticata loro eutanasia. I noduli tumorali sono stati preparati per la successiva analisi istologica.

In questo studio sono state analizzate sezioni istologiche provenienti da topi trattati tramite la metodologia riportata.

Tali campioni sono stati preparati a partire dai vari tessuti in cui è stata evidenziata la presenza di mesotelioma, selezionati dal centro di ricerca americano. I tessuti sono stati inglobati in paraffina e successivamente sono state tagliate le sezioni pari a 5 µm di spessore, fatte aderire al vetrino con l'ausilio di una goccia d'acqua deionizzata.

Successivamente le sezioni sono state sparaffinate in stufa a 60°C.

Tale procedura di preparazione è esattamente quella riportata per la preparazione dei campioni da sottoporre alle analisi anatomopatologiche, da cui si differenzia

esclusivamente per il fatto che le sezioni utilizzate nelle fasi analitiche del presente studio non sono state colorate in ematossilina & eosina. Tali coloranti infatti presentano attività Raman nell'intervallo $200-1200\text{ cm}^{-1}$ e quindi possono inficiare o rendere particolarmente complessa l'interpretazione delle bande.

3.5.3 – Sezioni istologiche umane

Sezioni istologiche di pleure e polmoni di pazienti turchi colpiti da mesotelioma maligno sono state preparate con la stessa metodologia applicata per la preparazione dei tessuti da topi. Un totale di dieci casi e di quaranta sezioni istologiche sono state analizzate.

Parallelamente, sono state analizzate sezioni istologiche provenienti da soggetti italiani, su tre tipologie di supporto: oltre al classico vetrino portacampioni, infatti, i tessuti sono stati adesi su *carbon disc* o su supporti plastici in polipropilene. Nel caso dei pazienti italiani, le sezioni analizzate totali sono state trentasei su vetro e sette su plastica. I casi totali analizzati, in questo caso, sono stati quindici.

3.5.4 – Metodologia di analisi

La metodologia di analisi applicata prevede, innanzi tutto, un'approfondita osservazione in Microscopia Ottica delle sezioni istologiche. Successivamente, tramite una metodologia messa a punto presso il Gruppo di Ricerca di Mineralogia Ambientale dell'Università del Piemonte Orientale, è possibile applicare la spettroscopia micro-Raman e la Microscopia Elettronica a Scansione in pressione variabile con annessa microsonda EDS sulla stessa particella/fibra esaminata, accoppiando così le informazioni vibrazionali e quelle chimiche. I passaggi previsti da questa metodologia sono stati presentati e discussi nelle tesi di dottorato in scienze ambientali (acque interne ed agroecosistemi) del Dott. Allegrina Mario (XXIII ciclo) della Dott.ssa Musa Maya (XXIV ciclo) ed in diversi lavori del Gruppo di Ricerca pubblicati su riviste internazionali (Rinaudo *et al.*, 2010a, 2010b; Musa *et al.*, 2012).

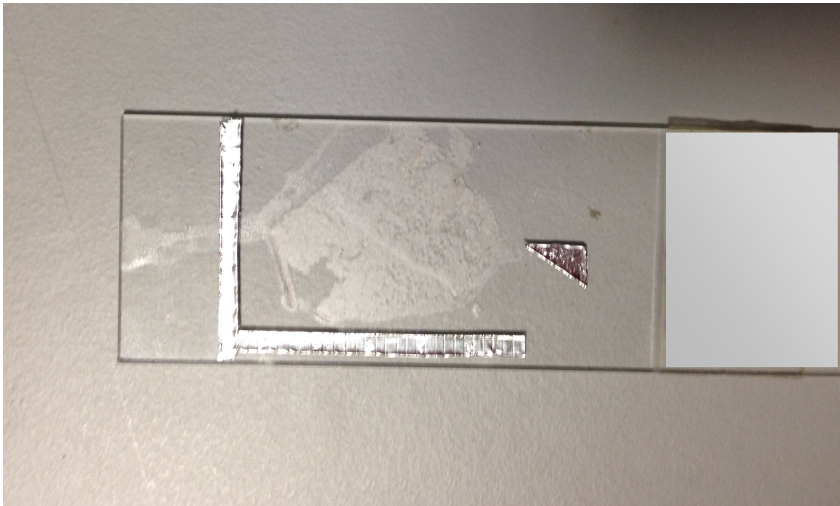


Figura 3.16: Sezione istologica su vetrino.

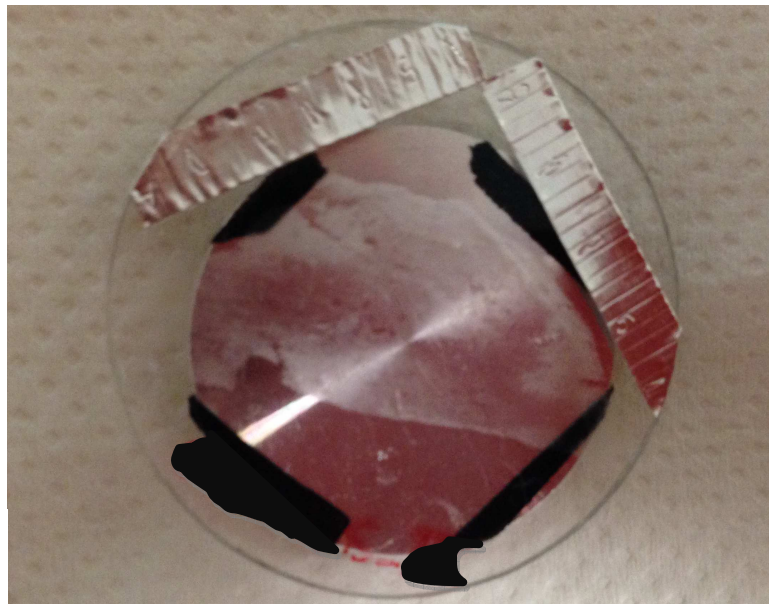


Figura 3.17: Sezione istologica su supporto in polipropilene.

4 - Risultati

4.1 – Caratterizzazione delle fasi naturali di erionite pre-inoculo

Durante la prima fase del lavoro è stata effettuata un'approfondita caratterizzazione delle fasi naturali prima dell'inoculo nei topi tramite la spettroscopia micro-Raman e la microscopia elettronica a scansione a pressione variabile con annessa microsonda in dispersione di energia (VP-SEM/EDS). I campioni forniti al gruppo di ricerca di Mineralogia Ambientale dalla *University of Hawai'i Cancer Center* di Honolulu (Hawaii, U.S.A.) sono stati:

- erionite americana;
- erionite turca.

I campioni di erionite americana sono uno standard di riferimento proveniente da Rome, Oregon (U.S.A.), mentre l'erionite turca è un campione di origine naturale proveniente dal villaggio di Karlik, in Cappadocia, Turchia.

Inoltre un terzo campione di anfibolo crocidolite, acquistata presso l'*Union for International Cancer Control* (U.I.C.C.) e fornito dallo stesso centro di ricerca, è stato oggetto di studio. Di quest'ultima fase, la caratterizzazione in microscopia elettronica ed in spettroscopia micro-Raman- sia sulle fasi pre-inoculo che in quelle riscontrate nelle sezioni istologiche- è stata descritta nella tesi di dottorato in scienze ambientali (acque interne ed agroecosistemi) della Dott.ssa Musa Maya (XXIV ciclo). In questo lavoro si è approfondito lo studio dei dati diffrattometrici ottenuti in luce di sincrotrone in relazione alle risposte registrate in spettroscopia micro-Raman.

I campioni sono stati adagiati su un bi-scotch conduttivo in carbonio, adeso su vetrini portacampioni ed i medesimi campioni sono stati analizzati applicando le due tecniche sopra-citate.

4.1.1 - Caratterizzazione morfologica e chimica

4.1.1.1 - Caratterizzazione morfologica

Dall'analisi morfologica dei due diversi campioni, effettuata tramite VP-SEM/EDS, è stato possibile evidenziare come l'erionite Oregon sia costituita da fasci fibrosi di dimensioni maggiori rispetto all'erionite turca, figure 4.1a e 4.1b. In entrambi i tipi di erionite inoltre è stato possibile osservare presenza di altro materiale con abito

particellare, soprattutto nelle zone in cui il materiale, morfologicamente, si presentava più massiccio.



Figura 4.1a: Erionite Oregon osservata in SEM tramite rivelatore di elettroni retrodiffusi.

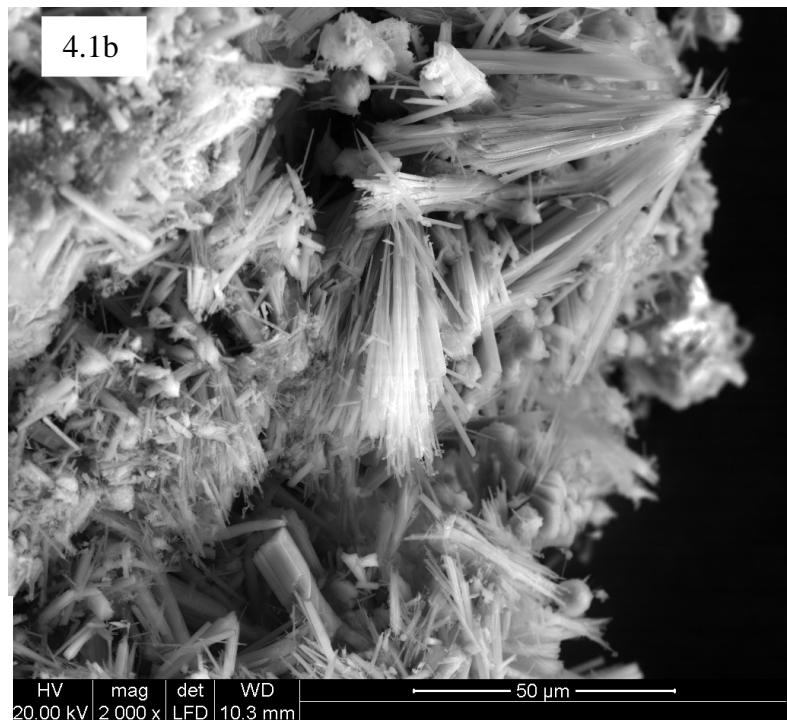


Figura 4.1b: Erionite turca osservata in SEM tramite rivelatore di elettroni secondari.

4.1.1.2 - Caratterizzazione chimica

L'analisi in spettroscopia in dispersione di energia (EDS), eseguita per ottenere una composizione chimica relativa ai due tipi di erionite, è stata effettuata selezionando nei campioni fasci di fibre il più possibile isolati da eventuali cristalli con morfologia non fibrosa, in modo da poter escludere l'apporto chimico derivante dalle impurezze contenute ed essere certi della composizione chimica associata alle fibre.

Per poter ottenere una composizione chimica affidabile, pur con analisi di tipo qualitativo, su ogni fascio di fibre è stato eseguito un numero statisticamente significativo di analisi puntuali a "transetto", lungo l'asse di allungamento.

Per ogni fascio fibroso è stata anche effettuata una serie di analisi nell'area circostante. In tal modo si è potuto sottrarre l'apporto derivante dal substrato (OUT) alle analisi ottenute sulle diverse fibre (IN). Nella figura 4.2b (erionite Oregon) è riportato un esempio della metodologia di analisi.

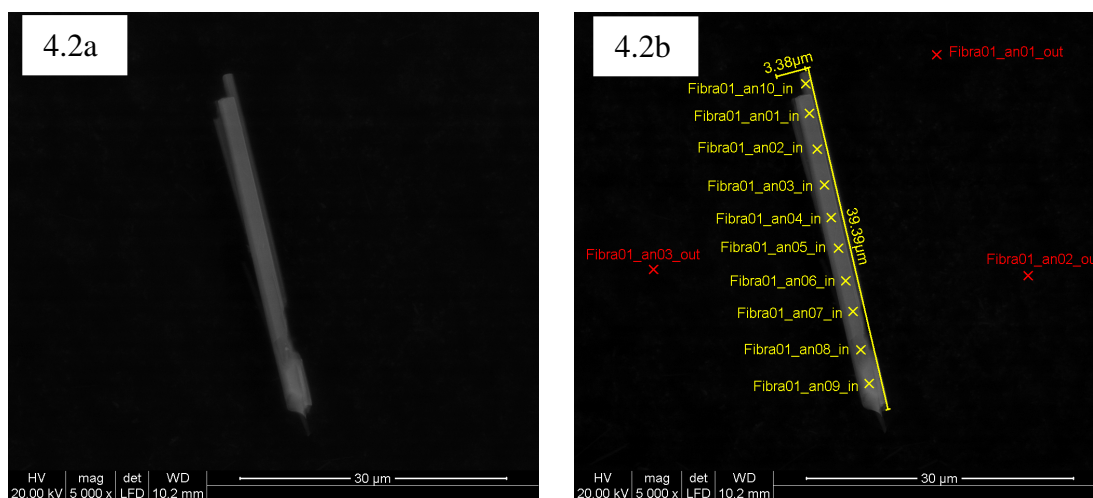
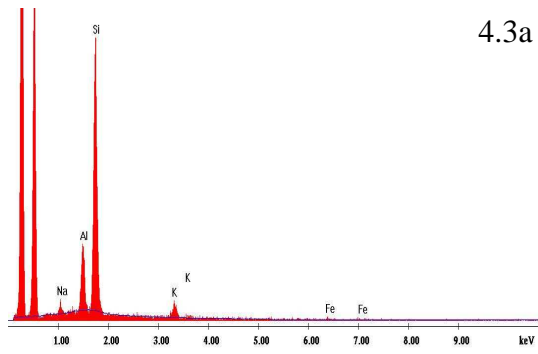
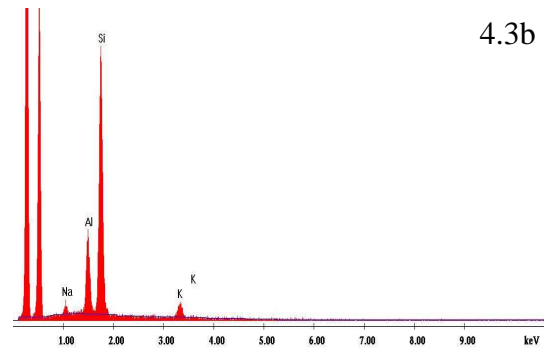


Figura 4.2: (a) Erionite Oregon osservata tramite rivelatore di elettroni secondari. Su questa fibra sono state effettuate le analisi chimiche puntuali riportate nella figura (b). In (b) sono riportate anche le posizioni delle analisi effettuate sul substrato, costituito da biscotch conduttivo in carbonio.

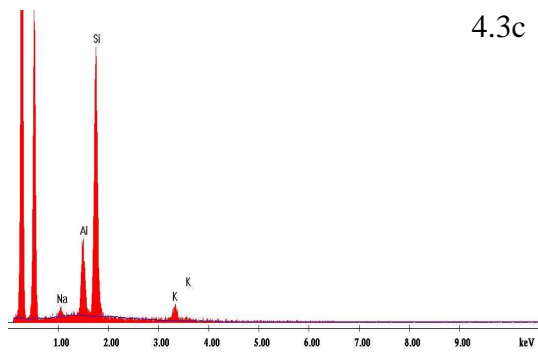
Di seguito vengono riportati, a titolo di esempio, gli spettri EDS ottenuti sulla fibra di figura 4.2.



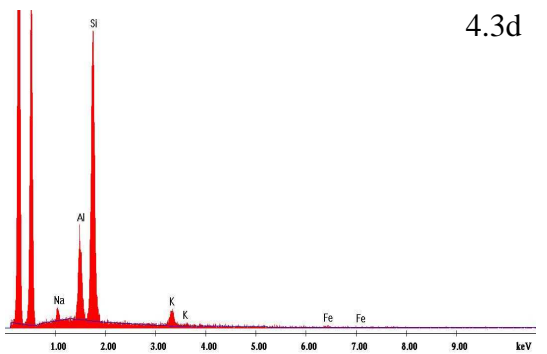
4.3a



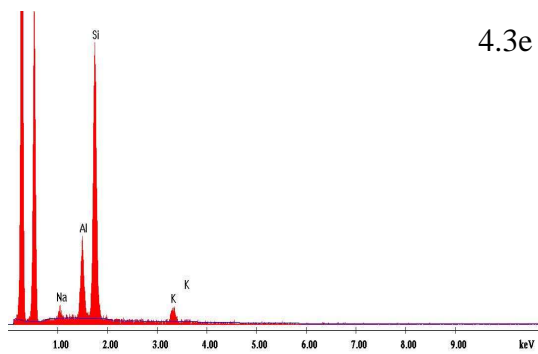
4.3b



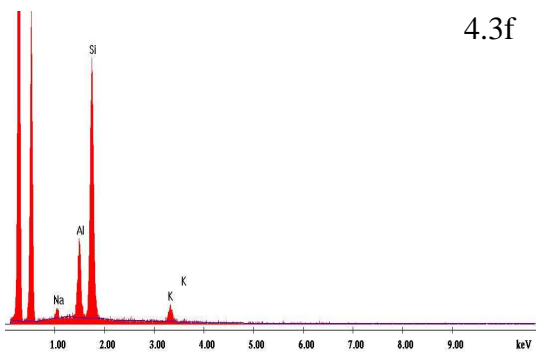
4.3c



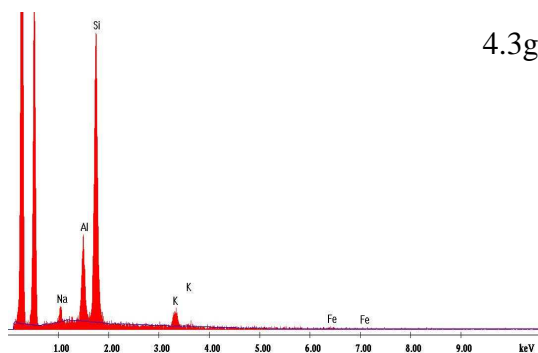
4.3d



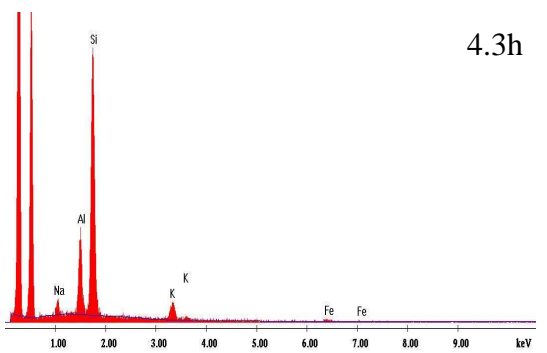
4.3e



4.3f



4.3g



4.3h

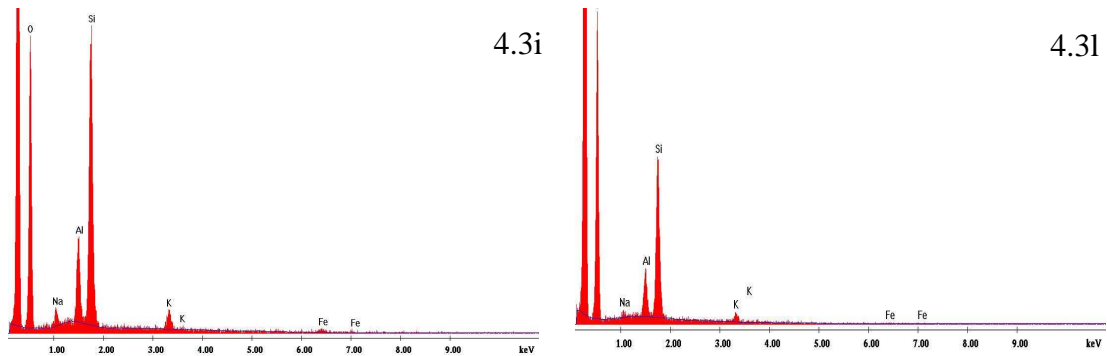


Figura 4.3: (a)-(l) Spettri EDS ottenuti sul fascio di fibre in figura 4.2. Come si può osservare il rapporto tra le intensità dei diversi picchi risulta pressoché costante.

4.1.1.2.1 - Erionite Oregon

Nella tabella 4.1 sono riportati i valori ottenuti, espressi in percentuale atomica, nelle analisi effettuate sul fascio fibroso riportato in figura 4.2.

	% atomica						
	C	O	Si	Al	Na	K	Fe
E_Oregon_An01_in	72,29	24,20	2,49	0,66	0,17	0,15	0,04
E_Oregon_An02_in	71,33	24,65	2,79	0,85	0,20	0,18	0,00
E_Oregon_An03_in	71,43	24,46	2,89	0,85	0,18	0,20	0,00
E_Oregon_An04_in	71,73	24,19	2,83	0,81	0,22	0,18	0,04
E_Oregon_An05_in	71,78	24,10	2,90	0,84	0,20	0,18	0,00
E_Oregon_An06_in	71,96	23,94	2,83	0,86	0,21	0,19	0,00
E_Oregon_An07_in	72,95	23,10	2,69	0,80	0,24	0,18	0,06
E_Oregon_An08_in	73,44	22,67	2,57	0,80	0,26	0,20	0,07
E_Oregon_An09_in	77,90	18,45	2,42	0,71	0,26	0,18	0,08
E_Oregon_An10_in	78,68	19,39	1,33	0,40	0,09	0,08	0,03
E_Oregon_Fibra01_media_in	72,76	23,31	2,71	0,80	0,22	0,18	0,03
E_Oregon_An01_out	91,29	8,50	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00
E_Oregon_An02_out	91,86	7,96	0,18	0,00	0,00	0,00	0,00
E_Oregon_An03_out	90,89	8,85	0,18	0,08	0,00	0,00	0,00
E_Oregon_media_out	91,35	8,44	0,19	0,03	0,00	0,00	0,00
	C	O	Si	Al	Na	K	Fe
E_Oregon_Diff medie	/	14,87	2,52	0,77	0,22	0,18	0,03

Tabella 4.1: Composizione chimica qualitativa, in percentuale atomica, ottenuta sui 10 punti di analisi effettuati sulla fibra di figura 4.2 (IN). Alla media delle analisi IN, in giallo, viene sottratta la media delle analisi OUT, in verde: la risultante differenza dei valori medi (in azzurro) rappresenta la composizione chimica della fibra esaminata. Delle dieci analisi IN, non è stata considerata l'analisi E_Oregon_An10_in, in quanto effettuata in un punto troppo periferico del fascio fibroso.

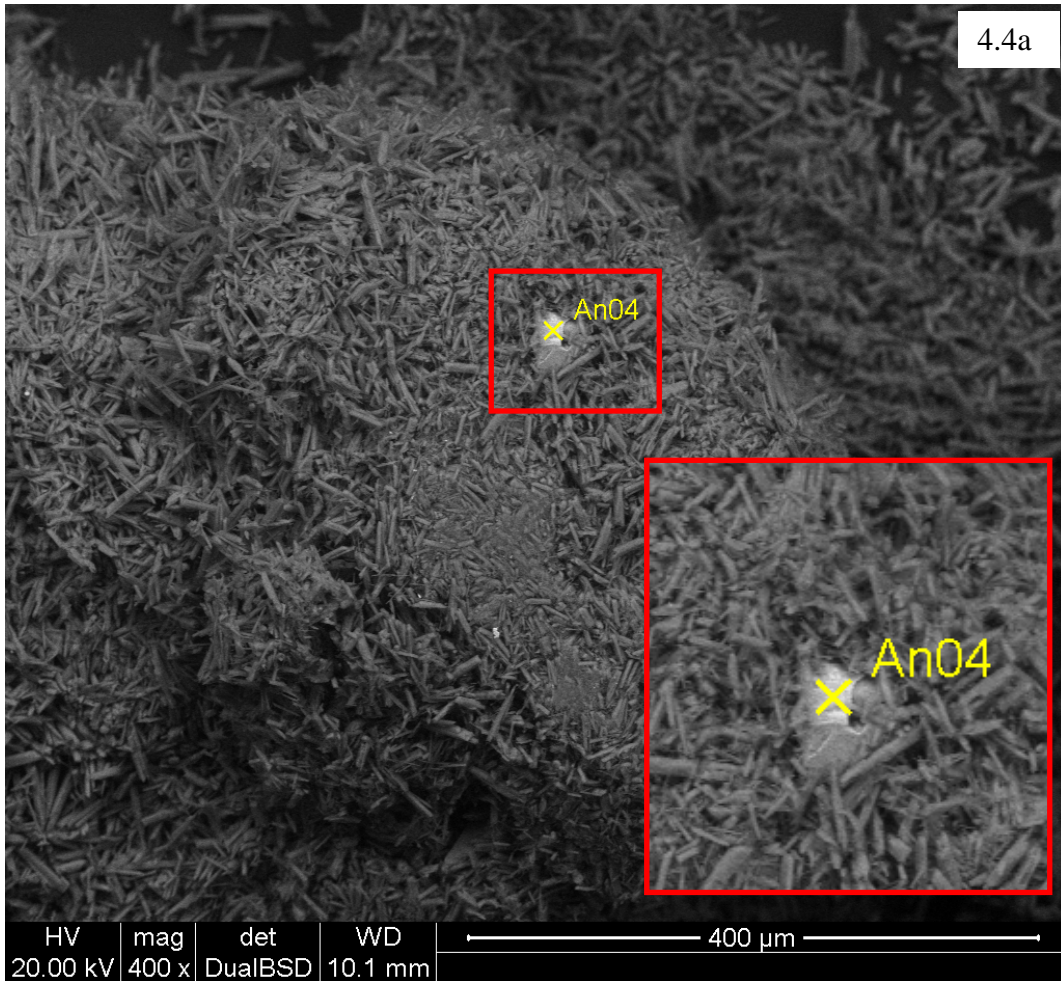
La stessa procedura di analisi è stata applicata ad un numero statisticamente significativo di fasci di fibre; di seguito vengono riportate le tabelle riassuntive delle analisi chimiche medie ottenute sui diversi fasci fibrosi analizzati, a cui sono stati sottratti i dati relativi al substrato.

	% atomica				
	Si	Al	Na	K	Fe
E_Oregon_Fibra01_Diff_medie_IN-OUT	2,53	0,77	0,22	0,18	0,03
E_Oregon_Fibra02_Diff_medie_IN-OUT	2,39	0,73	0,16	0,21	0,04
E_Oregon_Fibra03_Diff_medie_IN-OUT	2,04	0,69	0,18	0,14	
E_Oregon_Fibra04_Diff_medie_IN-OUT	2,52	0,84	0,20	0,17	
E_Oregon_Fibra05_Diff_medie_IN-OUT	1,62	0,55	0,07	0,10	
E_Oregon_Fibra06_Diff_medie_IN-OUT	3,51	1,08	0,29	0,27	
E_Oregon_Fibra07_Diff_medie_IN-OUT	3,74	1,13	0,42	0,30	0,01
E_Oregon_Fibra08_Diff_medie_IN-OUT	1,67	0,54	0,20	0,11	
E_Oregon_Fibra09_Diff_medie_IN-OUT	4,92	1,55	0,63	0,39	
E_Oregon_Fibra10_Diff_medie_IN-OUT	5,08	1,60	0,52	0,38	0,02
E_Oregon_Fibra11_Diff_medie_IN-OUT	2,05	0,66	0,17	0,12	

Tabella 4.2: Composizione chimica qualitativa media dei fasci di fibre di erionite Oregon, a cui è stato sottratto il relativo apporto del substrato: come si può osservare, i cationi rilevati sono, in ordine decrescente: Si, Al, Na e K.

I valori della tabella 4.2 evidenziano una composizione chimica qualitativa comprendente, oltre i costituenti delle gabbie zeolitiche, silicio ed alluminio, sodio, potassio e tracce di ferro. Tali dati ottenuti sull'erionite dell'Oregon sono differenti rispetto ai dati riportati in bibliografia e riguardanti fasi di erionite provenienti dagli Stati Uniti (Ballirano *et al.*, 2009; A.U. Dogan & M. Dogan, 2008; Dogan *et al.*, 2006). Nei dati di bibliografia, oltre a potassio e sodio, anche calcio, magnesio risultano essere presenti nelle posizioni esterne alle gabbie formate da silicio e alluminio. Tuttavia bisogna considerare che i dati di bibliografia sono ottenuti su polvere, mentre quelli riportati in questo lavoro sono ottenuti su fasci fibrosi.

L'analisi in microscopia elettronica ha permesso di evidenziare zone che presentavano un aspetto più massiccio, un esempio viene riportato nella figura 4.4a.



4.4b

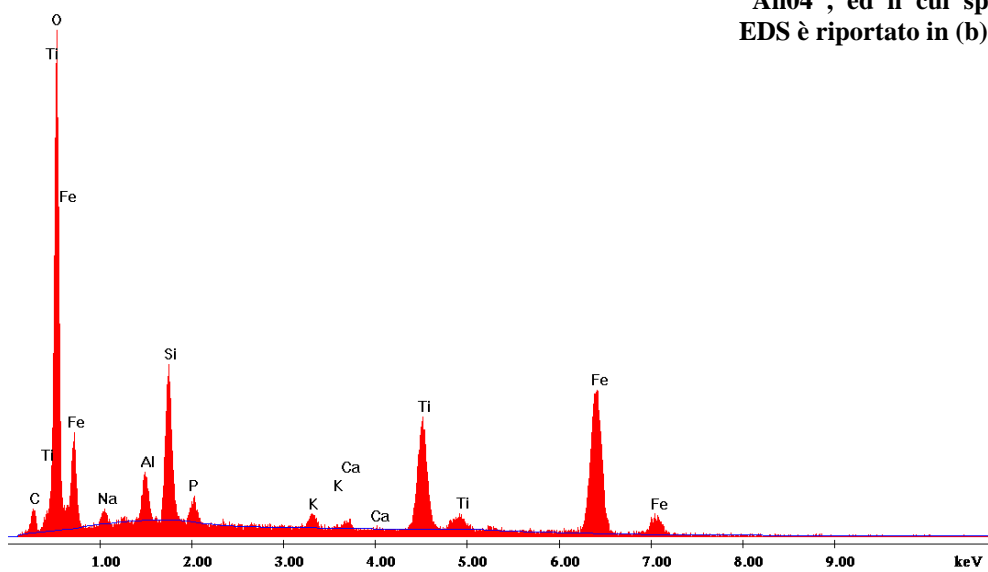


Figura 4.4: (a) Particella in erionite Oregon su cui è stata effettuata l'analisi, indicata dalla dicitura "An04", ed il cui spettro EDS è riportato in (b).

Effettuando l'analisi chimica su tali parti dei campioni, sono state rilevate presenze di ioni non identificate nelle analisi sui fasci fibrosi. La particella di figura 4.4a, ad esempio, ha mostrato presenza di ferro, titanio e fosforo, tali elementi possono essere associabili alla presenza di una fasi diverse da erionite e possono quindi rendere conto delle differenze riportate in questo lavoro rispetto ai dati di letteratura.

4.1.1.2.2 - Erionite Karlik

Per quanto riguarda l'erionite proveniente dal villaggio di Karlik, Cappadocia, applicando la stessa metodologia analitica prima descritta, sono stati ottenuti i valori chimici riportati nella tabella 4.3. Un esempio di spettro EDS è presentato in Fig. 4.5.

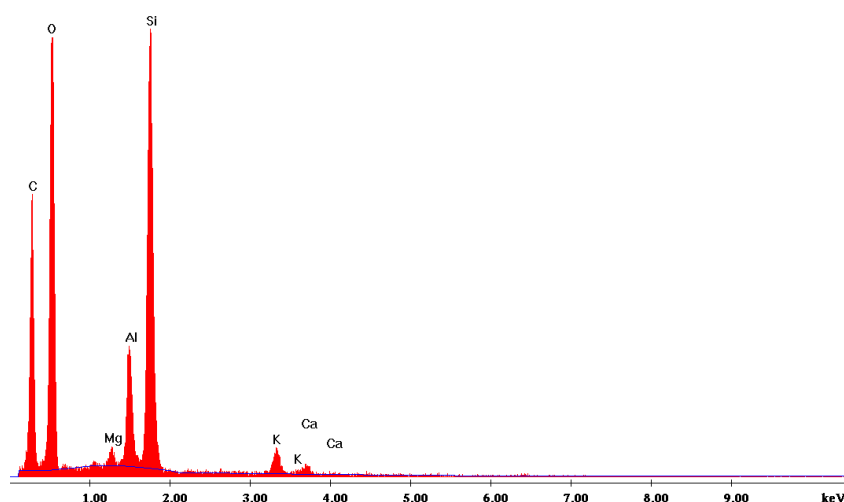


Figura 4.5: Spettro EDS ottenuto in un punto di un fascio di fibre di erionite Karlik.

	% atomica				
	Si	Al	Mg	Ca	K
E_Karlik_Fibra01_Diff_medie_IN-OUT	2,49	0,65	0,09	0,06	0,17
E_Karlik_Fibra02_Diff_medie_IN-OUT	3,66	1,06	0,15	0,13	0,20
E_Karlik_Fibra03_Diff_medie_IN-OUT	1,60	0,46	0,00	0,00	0,05
E_Karlik_Fibra04_Diff_medie_IN-OUT	2,81	0,79	0,09	0,00	0,15
E_Karlik_Fibra05_Diff_medie_IN-OUT	1,21	0,37	0,00	0,00	0,03
E_Karlik_Fibra06_Diff_medie_IN-OUT	6,63	1,76	0,28	0,23	0,49
E_Karlik_Fibra07_Diff_medie_IN-OUT	2,48	0,78	0,12	0,01	0,14
E_Karlik_Fibra08_Diff_medie_IN-OUT	4,91	1,46	0,31	0,17	0,36

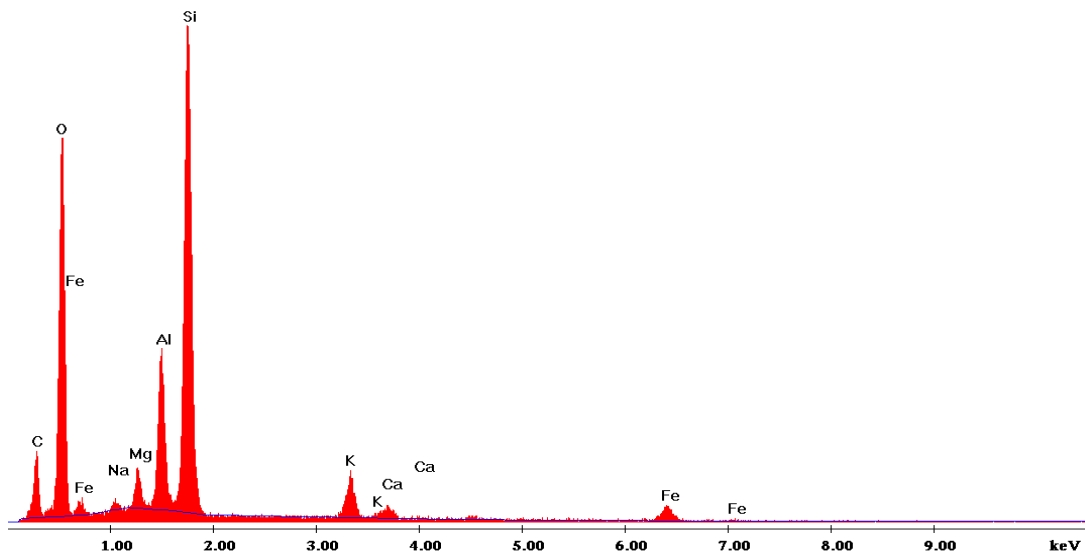
Tabella 4.3: Composizione chimica qualitativa di fasci di fibre di erionite Karlik, a cui è stato sottratto il relativo apporto del substrato: come si può osservare, i cationi rilevati sono Si, Al, K, Ca e Mg.

Come si può osservare, in questo caso i cationi che occupano le posizioni esterne alle gabbie silicatiche risultano essere, in proporzioni variabili, potassio, magnesio e calcio. Rispetto ai dati bibliografici (Dogan *et al.*, 2006; Dogan *et al.*, 2008; A.U. Dogan & M. Dogan, 2008), anche in questo caso sono state evidenziate differenze riguardo gli ioni esterni alle gabbie silicatiche: non è stato rilevato sodio, presente nei dati di letteratura, ma soltanto magnesio, potassio e calcio. Risulta comunque confermata l'appartenenza di questa erionite alla famiglia delle K-erioniti. Anche in questo caso, le differenze osservate rispetto ai dati di letteratura possono essere attribuite alla differente procedura di analisi, che in questo lavoro considera fasci di fibre isolati dal resto della polvere. Anche nel caso dell'erionite Karlik, tra i fasci fibrosi sono state evidenziate zone con morfologia più isodiametrica. Di seguito, figure 4.6a e 4.6b, viene riportato un esempio.



Figura 4.6: (a) Particella in erionite Karlik su cui è stata effettuata l'analisi, indicata nel riquadro, ed il cui spettro EDS è riportato in (b).

4.6b



Come si può osservare dallo spettro EDS di figura 4.6b, la composizione chimica della particella è confrontabile, per quanto riguarda l'andamento di silicio, alluminio, magnesio, potassio e calcio, con quello osservato sui singoli fasci fibrosi di erionite Karlik. In questo caso è stata però rilevata anche presenza di sodio e ferro. Le particelle, anche in questo caso, hanno evidenziato presenza di ferro, seppur in maniera minore rispetto alle particelle osservate nell'erionite proveniente dall'Oregon (figura 4.4b).

4.1.1.2.3 - Discussione sui dati chimici

Sulla base delle analisi chimiche ottenute sulle fibre di erionite delle due provenienze studiate, eseguendo l'analisi sui fasci fibrosi e non su polvere è possibile affermare che la presenza di sodio permette di attribuire alla fase minerale erionite la provenienza dall'Oregon, mentre la presenza di calcio e magnesio permette di attribuire la provenienza dal villaggio di Karlik. Il potassio risulta essere un catione comune per questi due tipi di campioni.

L'analisi morfologica ha permesso di mettere in evidenza zone che presentavano un aspetto più massiccio, sia nell'erionite americana che in quella della Cappadocia. Effettuando l'analisi chimica su tali parti dei campioni, sono state osservate, oltre ai

fasci fibrosi di erionite, fasi con composizione chimica differente.

In entrambe le erioniti analizzate, le particelle hanno mostrato la presenza di ferro, elemento sempre riportato anche nelle analisi di erionite di uguale provenienza riportate in letteratura (Dogan *et al.*, 2006; Dogan *et al.*, 2008; A.U. Dogan & M. Dogan, 2008; Passaglia *et al.*, 1998): le differenze di composizione chimica osservate in questo lavoro rispetto a quanto riportato in letteratura potrebbero essere dunque imputabili alla diversa procedura di analisi adottata dagli autori, che hanno analizzato polveri, mentre in questo lavoro si è scelto di analizzare i singoli fasci fibrosi.

4.1.2 - Caratterizzazione chimica di offretite

Siccome le fasi naturali caratterizzate sono state usate per l'inoculo nei topi, al fine di poter stabilire un nesso certo tra mesotelioma e fibre di erionite è stato necessario assicurarsi circa la purezza dei campioni utilizzati per l'inoculo. Una fase cristallina con composizione chimica molto simile all'erionite è l'offretite, che può presentare anch'essa morfologia fibrosa e che spesso è associata all'erionite. Si è quindi proceduto alla caratterizzazione di campioni puri di offretite naturale concessi dal Professor Alessandro Gualtieri dell'Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia per identificarne lo spettro Raman associato.

Si è dapprima iniziata la caratterizzazione chimica del campione mediante VP-SEM/EDS per definire la composizione chimica che nella famiglia delle zeoliti, a causa delle sostituzioni cationiche Si - Al all'interno dei siti tetraedrici, mostra una notevole variabilità. Per quanto concerne le due fasi, erionite ed offretite, come dimostrato da Passaglia *et al.*, 1998, lo spazio compositivo relativo al rapporto Si/Al tra i campi cristallografici delle due fasi può anche sovrapporsi e non può essere utilizzato come discriminante tra le due fasi minerali.

In figura 4.7 viene riportata la morfologia del campione analizzato.

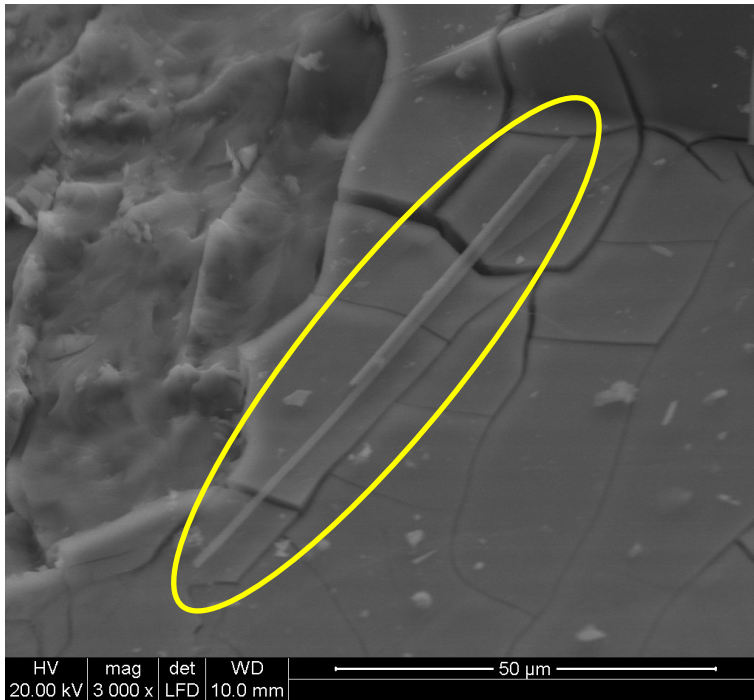


Figura 4.7: Fibra su cristallo, cerchiata in giallo, su cui è stata effettuata l'analisi ed il cui spettro EDS è riportato in 4.8. Immagine ottenuta tramite rivelatore di elettroni secondari.

Come si può osservare nella figura 4.7, sullo stesso campione sono state osservate diverse morfologie: grandi cristalli e fasci fibrosi.

Se si confronta uno spettro EDS acquisito sulla fibra in figura 4.7 e riportato in figura 4.8 con lo spettro relativo all'erionite Karlik riportato in figura 4.5, si evince come la distinzione tra le due fasi zeolitiche risulti impossibile dalla sola osservazione degli spettri EDS.

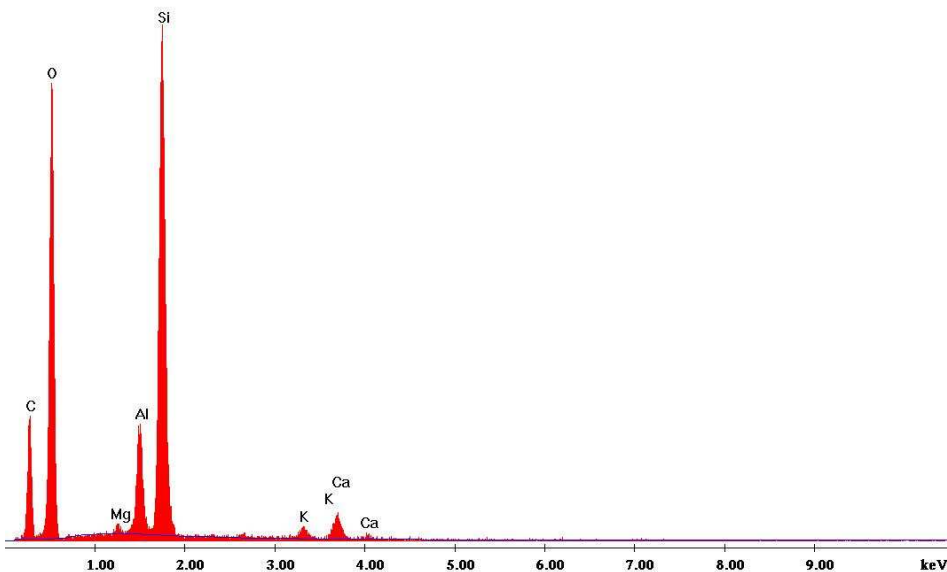


Figura 4.8: Spettro EDS ottenuto sulla fibra cerchiata in giallo in figura 4.7.

Molte analisi chimiche sono state eseguite sulle fibre e sui cristalli di figura 4.7 ed i dati

acquisiti sono riportati in tabella 4.4.

CRISTALLI	% atomica							
	Si	Al	Mg	K	Ca	Na	Cl	S
Cristallo01_an_IN_media	10,20	4,64	0,06	0,42	1,40	0,00	0,18	0,00
Cristallo02_an_IN_media	8,89	3,77	0,00	0,34	1,08	0,00	0,00	0,00
Cristallo03_an_IN_media	10,53	3,38	0,00	0,31	1,08	0,00	0,00	0,06

FASCI DI FIBRE	% atomica							
	Si	Al	Mg	K	Ca	Na	Cl	S
Fibra01_an_IN_media	10,52	4,61	0,61	0,68	0,99	0,00	0,00	0,00
Fibra02_an_IN_media	9,16	2,08	0,26	0,22	0,56	0,00	0,00	0,00
Fibra03_an_IN_media	6,79	2,43	0,32	0,38	0,70	0,13	0,00	0,16

Tabella 4.4: Composizione chimica qualitativa dei cristalli e delle fibre osservate nei campioni di offretite. Qualitativamente, come si può osservare, i cationi rilevati sulle fibre sono, in ordine decrescente: Si, Al e, in maniera variabile, K, Ca e Mg; solo in un caso è stato rilevato anche Na.

In letteratura, la distinzione tra erionite ed offretite è proposta in base al rapporto Si/Al. In particolare, sulla base di questo rapporto, Wise & Tschernich (1976) hanno definito l'erionite come il minerale che mostra $Si/Al > 3.0$ (e offretite per $Si/Al < 3.0$), mentre Rinaldi (1976) ha definito l'erionite come il minerale che mostra un valore di $Si/Al > 2.4$ (e offretite per valori inferiori).

Nel caso delle analisi in tabella 4.4, la media di rapporto Si/Al tra tutte le analisi risulta essere 2.9, quindi classificabile come offretite secondo la regola di Wise & Tschernich (1976), ma non è così considerando quella di Rinaldi (1976). Più nello specifico, il rapporto Si/Al medio ottenuto sui fasci di fibre risulta essere 3.2, mentre su quelli di erionite Karlik lo stesso rapporto è pari a 3.5.

A conseguenza dell'incertezza nei dati, si è quindi applicato il rapporto $R = Si/(Si+Al)$ riportato da Wise & Tschernich (1976) e Passaglia *et al.* (1998) come discriminante per la distinzione tra erionite ed offretite: la fase minerale risulta essere offretite nel caso di $R < 0.73-0.75$, erionite per $R > 0.73-0.75$.

Applicando questo rapporto sui dati chimici ottenuti sui campioni di erionite Karlik e di offretite analizzati in questo lavoro, si ottengono valori di R di 0.78 e 0.73 rispettivamente. Sulla base di questo rapporto e considerando l'errore derivante da un'analisi chimica qualitativa quale quella effettuata in questo lavoro, i valori ottenuti, seppur rispondenti a ciò che è presente nei dati di bibliografia, risultano non essere sufficienti per distinguere inequivocabilmente le due zeoliti.

Successivamente sugli stessi campioni è stata applicata la spettroscopia micro-Raman.

4.1.3 – Caratterizzazione spettroscopica di erionite e offretite

La spettroscopia micro-Raman è stata applicata agli stessi campioni caratterizzati in microscopia elettronica a scansione. Su ognuno dei due campioni di erionite sono state effettuate analisi su un numero statisticamente significativo di fasci di fibre, in modo da poter valutare la ripetitività delle analisi spettroscopiche.

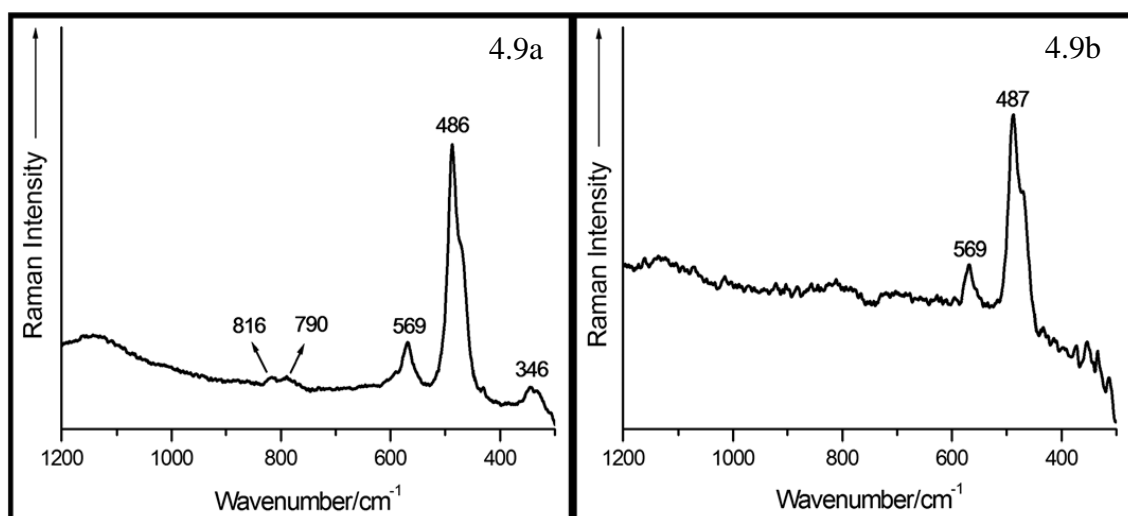


Figura 4.9a: Spettro Raman di erionite Oregon, U.S.A..

Figura 4.9b: Spettro Raman di erionite proveniente da Karlik, Turchia.

Come si può vedere dalle figure 4.9a e 4.9b, l'erionite fornisce uno spettro molto povero in bande Raman, ma tuttavia caratteristico per questa fase minerale: indipendentemente dall'orientazione dei fasci fibrosi rispetto alla polarizzazione del fascio laser, nello spettro è sempre presente una banda molto intensa a circa 490 cm^{-1} ed un'altra banda di minore intensità a circa 570 cm^{-1} per entrambe le fasi; inoltre una banda a circa 345 cm^{-1} è stata rilevata nell'erionite proveniente dall'Oregon.

Considerando che, nella famiglia delle zeoliti, la struttura cristallina è costituita da gabbie di tetraedri $(\text{Si,Al})\text{O}_4$, collegati gli uni agli altri da cationi K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} o Na^+ la banda più intensa a circa 490 cm^{-1} è attribuibile ai modi vibrazionali di bending dei legami $(\text{Si,Al})\text{-O}$ (Mozgawa, 2001; Yu *et al.*, 2001; de Man & van Santen, 1992).

La banda a circa 490 cm^{-1} appare asimmetrica, si è quindi proceduto alla deconvoluzione della stessa mediante il programma OPUS per identificarne le bande componenti.

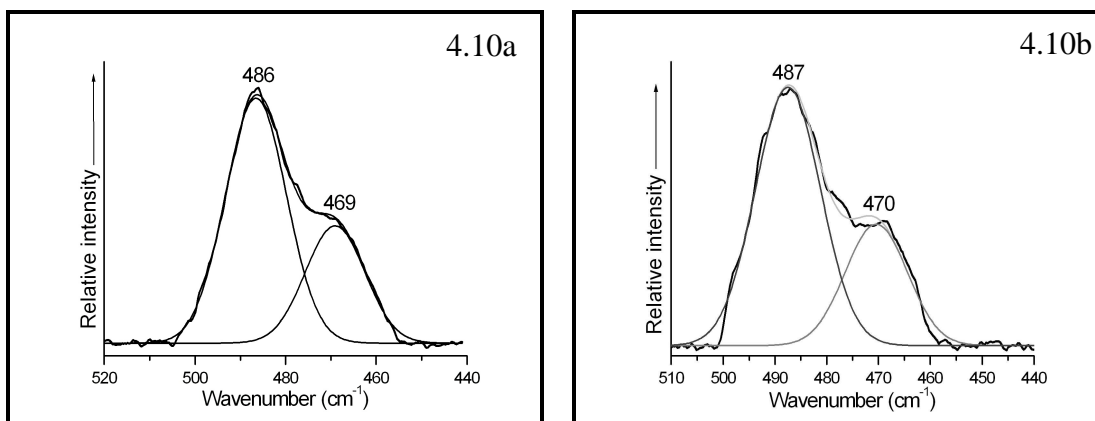


Figura 4.10a: Deconvoluzione della banda più intensa a circa 490 cm^{-1} osservata nello spettro Raman di erionite proveniente da Rome, Oregon, U.S.A.

Figura 4.10b: Deconvoluzione della banda più intensa a circa 490 cm^{-1} osservata nello spettro Raman di erionite proveniente dalla Turchia.

In figura 4.10a e 4.10b si può osservare come sia nell'erionite Oregon che nell'erionite Karlik, la banda intensa sia costituita da due componenti: a 486 e 469 cm^{-1} nell'erionite Oregon ed a 487 e 470 cm^{-1} nell'erionite Karlik.

Sugli stessi campioni di offretite trattati nella sezione precedente è stata applicata la spettroscopia micro-Raman, ottenendo spettri come quello riportato in figura 4.11a.

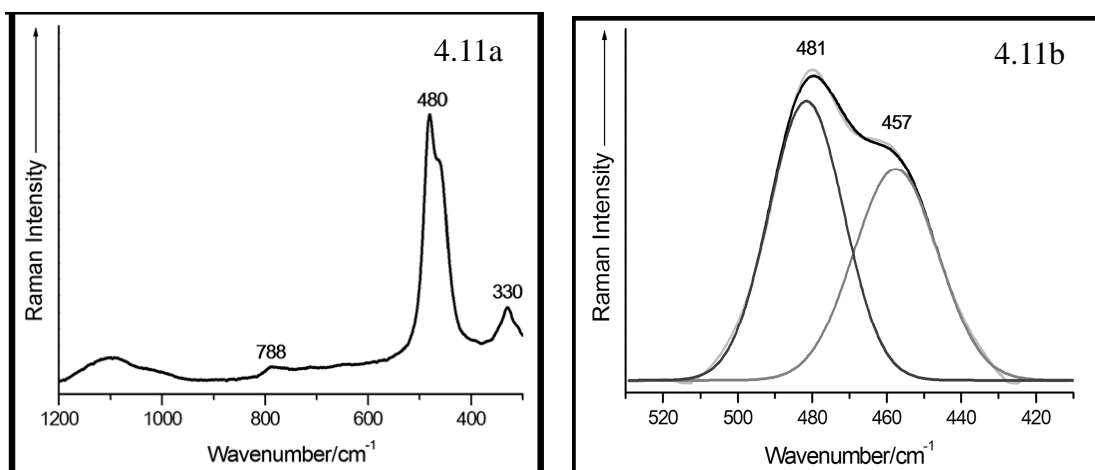


Figura 4.11a: Spettro Raman di offretite.

Figura 4.11b: Deconvoluzione della banda più intensa a circa 480 cm^{-1} osservata nello spettro Raman di offretite.

Seppur chimicamente molto simili, la struttura cristallina dell'offretite presenta alcune differenze rispetto all'erionite. Pur presentando anch'essa gabbie cancriniche come l'erionite, infatti, l'offretite presenta una prima differenza strutturale nell'orientazione di tali gabbie. Esse nell'offretite sono tutte orientate nello stesso modo, mentre

nell'erionite sono alternativamente ruotate di 60° . Inoltre, nelle gabbie più ampie, l'offretite presenta delle gabbie gmelinitiche (14-hedra) e ampi canali paralleli all'asse c delimitati da anelli a dodici vertici (l'erionite invece ha gabbie 23-hedra e anelli a otto vertici). La sequenza degli anelli a sei vertici lungo c risulta essere AABAAC nell'erionite, mentre per l'offretite è AABAAB (Gualtieri *et al.*, 1998). La risposta Raman differente dell'offretite risulterebbe correlabile a queste differenze strutturali, e, in particolare, lo shift vibrazionale delle bande più intense ad un differente moto vibrazionale derivante dai moti di bending dei legami (Si,Al)-O (Mozgawa, 2001; Yu *et al.*, 2001; de Man & van Santen, 1992).

Per quanto concerne l'attribuzione delle bande Raman osservate su erionite e offretite, secondo i dati di letteratura esse vanno interpretate considerando le unità T-O-T (T è l'atomo al centro del tetraedro, silicio o alluminio in questo caso), come le unità elementari generanti le bande Raman, invece di considerare il tetraedro (Si,Al)O₄ come oscillatore fondamentale. La banda a circa 490 cm^{-1} e le altre bande minori deriverebbero sostanzialmente dai modi vibrazionali intra- ed intertetraedrici dei legami chimici costituenti le gabbie.

Considerando la struttura dell'erionite, essa è costituita da colonne di gabbie cancriniche formate da doppi anelli a sei vertici di tetraedri SiO₄ (prisma esagonale, D_{6R}), connesse lungo la direzione c ; le diverse gabbie cancriniche adiacenti sono unite formando anelli singoli a sei vertici di tetraedri (S_{6R}). L'erionite, risulta perciò essere formata da grandi gabbie (23-hedra, occupate da Na, Ca, Mg e molecole di acqua, distribuiti in diverse posizioni cationiche lungo l'asse di simmetria) in cui le aperture più ampie sono formate da anelli a otto vertici (Ballirano *et al.*, 2009; Gualtieri *et al.*, 1998). L'osservazione di due bande convolute a circa 490 e 470 cm^{-1} può essere messa in relazione alla presenza dei due tipi di siti tetraedrici precedentemente descritti. La banda Raman a circa 345 cm^{-1} risulta attribuibile a modi di bending dei legami T-O-T, mentre le bande a circa 800 cm^{-1} sono riconducibili a modi di stretching simmetrico dei legami T-O-T. Nell'offretite tutto lo spettro Raman risulta shiftato verso più bassi numeri d'onda, relazionabile alla maggiore larghezza delle gabbie zeolitiche che la costituiscono.

Concludendo, le analisi effettuate sui campioni naturali utilizzati per l'inoculo nei topi hanno dimostrato l'importanza di abbinare la spettroscopia micro-Raman con la

microscopia elettronica a scansione con annessa microsonda EDS. L'applicazione di una sola delle due tecniche non permetterebbe di ottenere:

- la provenienza dell'erionite, nel caso di applicazione della sola spettroscopia micro-Raman;
- la inequivocabile distinzione tra erionite di Karlik e offretite, nel caso si effettuasse solo un'analisi VP-SEM/EDS.

Sulla base degli spettri Raman, inoltre, si è potuta escludere la presenza di offretite nei campioni di erionite Oregon ed erionite Karlik, nei limiti di rilevabilità della metodologia applicata.

Dimostrata l'effettiva applicabilità delle due tecniche per l'identificazione della fase minerale erionite, si è passati all'applicazione della metodologia, sviluppata presso il gruppo di ricerca di Mineralogia Ambientale e descritta in Rinaudo *et al.* (2010a, 2010b) e (Musa *et al.*, 2012) per la localizzazione e la caratterizzazione delle fibre all'interno delle sezioni di topo in cui si è sviluppato mesotelioma peritoneale, a seguito di inoculo di erionite.

4.2 – Analisi di fibre in tessuti di topo

Le tecniche di spettroscopia micro-Raman e di microscopia elettronica a scansione in pressione variabile con annessa microsonda EDS (VP-SEM/EDS) sono state applicate all'analisi di sezioni istologiche di topi, in cui i campioni analizzati come fasi iniziali sono state iniettate (presso la *University of Hawai'i Cancer Center* di Honolulu, HI), causando mesotelioma peritoneale a livello di differenti organi. I topi in esame in questo studio hanno sviluppato asciti nei tessuti relativi a tre organi:

- pancreas,
- fegato,
- milza.

Obiettivo finale dell'applicazione delle suddette tecniche è stato, oltre alla localizzazione ed identificazione dell'erionite all'interno dei campioni, l'osservazione della formazione di eventuali corpuscoli ferruginosi oppure di altre modifiche, chimiche o spettroscopiche, delle fibre a contatto con i tessuti.

Nel caso di analisi di fibre in tessuti umani, il lungo e non noto tempo di interazione delle fibre di asbesto con l'ambiente cellulare ed i molteplici fattori che intervengono rendono difficoltosa la correlazione tra modifiche nelle fibre minerali e interazioni fibra/cellula. Per questi motivi si è proceduto all'analisi di sezioni istologiche di topo trattati con fibre di crocidolite, o erionite. I topi, infatti, sono sopravvissuti al massimo due anni dopo le prime evidenze di sviluppo della malattia (nell'uomo il tempo di interazione può arrivare a quarant'anni). Inoltre nei topi non ci sono stati ulteriori interventi dopo l'iniezione delle fibre.

4.2.1 – Localizzazione delle fibre e caratterizzazione spettroscopica

➤ **Fibre di erionite in pancreas**

Per quanto riguarda l'erionite Oregon, lo screening in microscopia ottica ha permesso di localizzare in grande quantità fasci di fibre nelle cellule peritoneali che avvolgono il pancreas (figura 4.12). Questi fasci fibrosi risultano formati da fibre libere, ovvero non

ricoperti da materiale ferruginoso, come normalmente succede intorno alle fibre di asbesto (Fig.4.13).

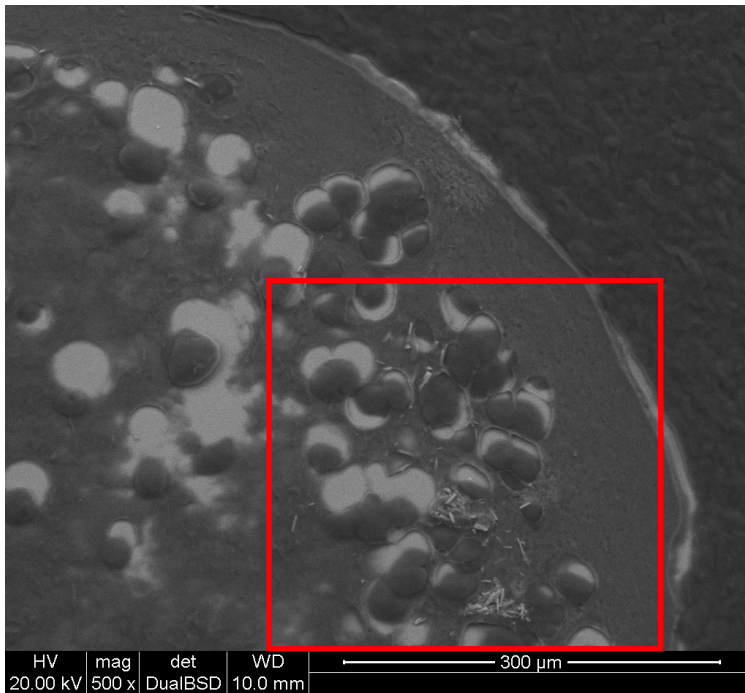


Figura 4.12: Immagine SEM ottenuta tramite rilevatore di elettroni retrodiffusi: il riquadro rosso evidenzia la zona in cui si sono accumulate le fibre.

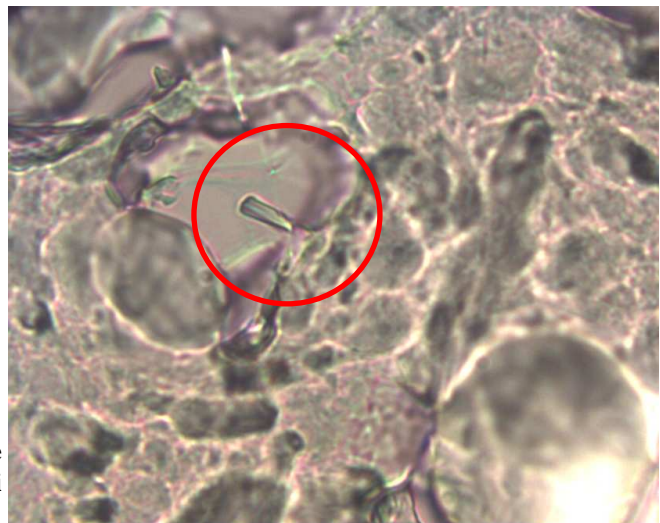


Figura 4.13: Fibra di erionite Oregon osservata all'interno dei tessuti di pancreas, obiettivo 100x.

Sulle fibre riscontrate nei tessuti nel parenchima pancreatico sono stati acquisiti molti spettri Raman. I risultati ottenuti si possono così schematizzare:

- a) una prima tipologia di fibre ha fornito spettri Raman con bande di intensità relativa paragonabile a quelle osservate sugli spettri della fase naturale pre-inoculo descritta nel paragrafo 4.1.3 (figura 4.14).

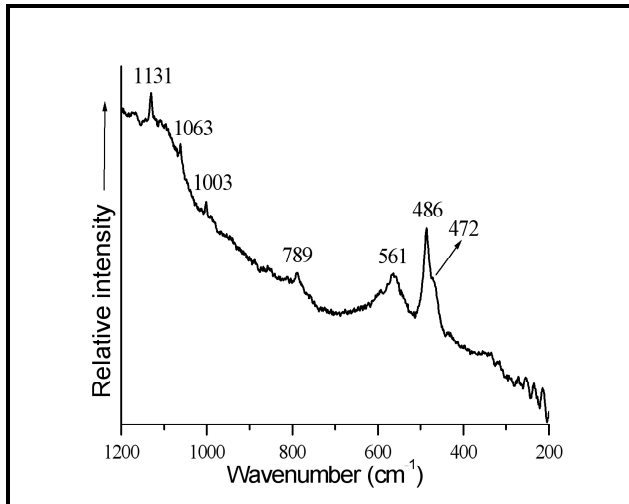


Figura 4.14: Spettro Raman di erionite Oregon in cui le intensità relative delle bande ascrivibili all'erionite sono paragonabili a quelle osservate sulle fibre naturali. Le bande a 1003, 1063 e 1131 cm^{-1} sono riconducibili alla paraffina con cui è trattato il tessuto.

Tale risposta spettroscopica permette di ipotizzare che la struttura cristallina non abbia subito importanti modificazioni rispetto a quella dell'erionite pre-iniezione e quindi che tali fibre di erionite abbiano instaurato un'interazione molto limitata con i tessuti.

Tale fenomeno può essere messo in relazione con tempi di interazione più brevi (infatti fibre sono state iniettate in dieci dosi successive a distanza di due settimane l'una dall'altra, per un tempo totale di circa cinque mesi) o a caratteristiche morfologiche o strutturali dei fasci fibrosi analizzati (ad esempio, dimensioni, limitato numero di difetti reticolari...);

b) in un secondo gruppo di fibre, lo spettro Raman ha mostrato variazioni nei rapporti relativi tra le intensità delle bande a circa 490 cm^{-1} e 565 cm^{-1} (figura 4.15);

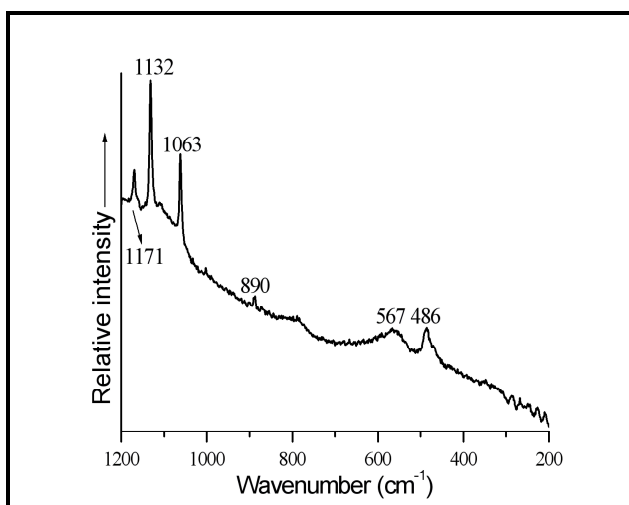


Figura 4.15: Spettro Raman di erionite Oregon in tessuto pancreatico mostranti una variazione di intensità relativa tra le differenti bande Raman rispetto a quelli osservati nella fase naturale. Le bande a 890, 1063, 1132 e 1171 cm^{-1} sono riconducibili alla paraffina con cui è trattato il tessuto.

c) in un terzo gruppo di fibre, infine, lo spettro Raman ha mostrato importanti variazioni dei rapporti relativi tra le intensità delle bande Raman rispetto a quelli osservati nelle fibre pre-iniezione, in particolare la banda a 487 cm^{-1} appare con intensità molto debole (Fig. 4.16).

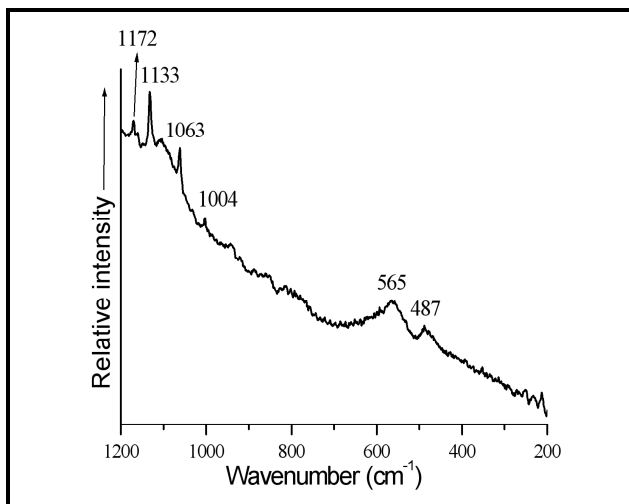


Figura 4.16: Spettro Raman di erionite Oregon in cui è visibile un' importante variazione di intensità della banda principale a circa 490 cm^{-1} . Le bande a 1004 , 1063 , 1133 e 1172 cm^{-1} sono riconducibili alla paraffina con cui è trattato il tessuto.

Bisogna sottolineare che l'effetto Raman è un fenomeno che, soprattutto nei minerali che sono dotati di struttura cristallina, può risentire dell'orientazione del campione rispetto alla direzione del fascio laser, con conseguente variazione dei rapporti di intensità relativa tra le bande. Per verificare se i fenomeni di orientazione potessero spiegare i fenomeni descritti in b) e c), sono state effettuate acquisizioni con orientazioni dei fasci fibrosi rispetto alla polarizzazione del fascio a 0° , 45° , 90° e 135° . Di seguito vengono riportati, come esempio, gli spettri Raman acquisiti su uno stesso fascio di fibre posizionato con diverse orientazioni rispetto alla direzione del fascio laser. Si è scelto di operare su un campione che presentasse, con orientazione 0° rispetto alla direzione del fascio laser, rapporti di intensità tra le bande a circa 490 e 565 cm^{-1} simili a quelli riscontrati nelle fibre di figura 4.14.

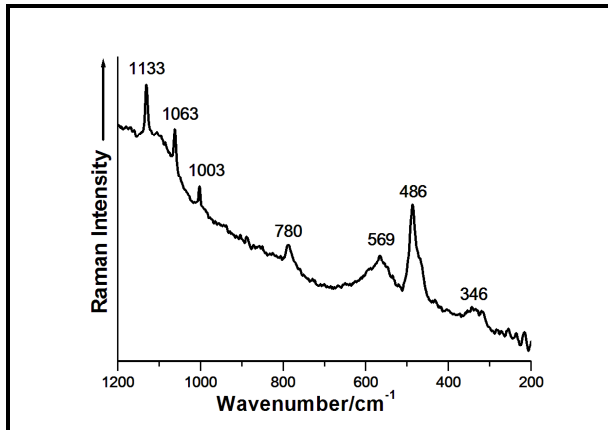


Figura 4.17: Spettro Raman ottenuto su erionite Oregon in pancreas con orientazione di 0° rispetto alla polarizzazione del fascio laser incidente. Le bande a 1003, 1063 e 1133 cm^{-1} sono riconducibili alla paraffina con cui è trattato il tessuto.

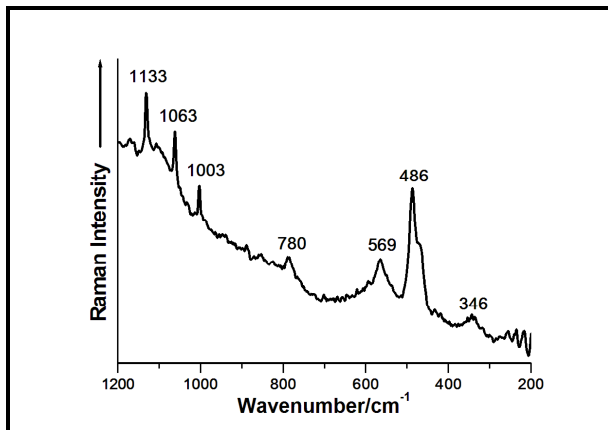


Figura 4.18: Spettro Raman ottenuto sullo stesso fascio di fibre di erionite Oregon in pancreas con orientazione di 45° rispetto alla polarizzazione del fascio laser incidente. Le bande a 1003, 1063 e 1133 cm^{-1} sono riconducibili alla paraffina con cui è trattato il tessuto.

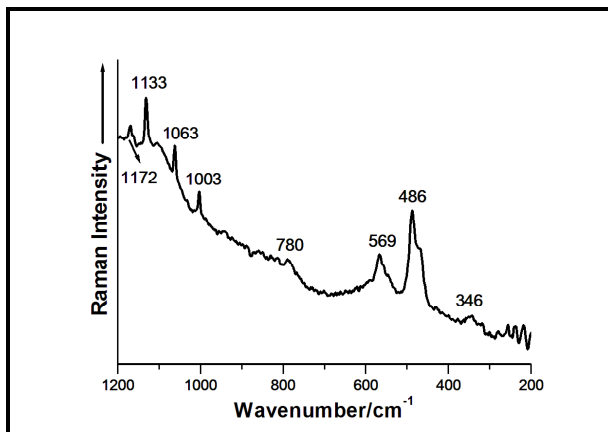


Figura 4.19: Spettro Raman ottenuto sullo stesso fascio di fibre erionite Oregon in pancreas con orientazione di 90° rispetto alla polarizzazione del fascio laser incidente. Le bande a 1003, 1063, 1133 e 1172 cm^{-1} sono riconducibili alla paraffina con cui è trattato il tessuto.

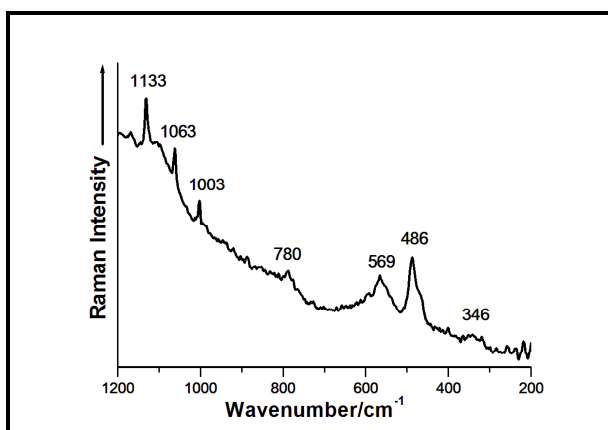


Figura 4.20: Spettro Raman ottenuto sullo stesso fascio di fibre erionite Oregon in pancreas con orientazione di 135° rispetto alla polarizzazione del fascio laser incidente. Le bande a 1003, 1063 e 1133 cm^{-1} sono riconducibili alla paraffina con cui è trattato il tessuto.

Come si può osservare mettendo a confronto le figure 4.17, 4.18, 4.19 e 4.20, l'intensità relativa della banda a 486 cm^{-1} non risulta mai confrontabile con quella di Figura 4.16.

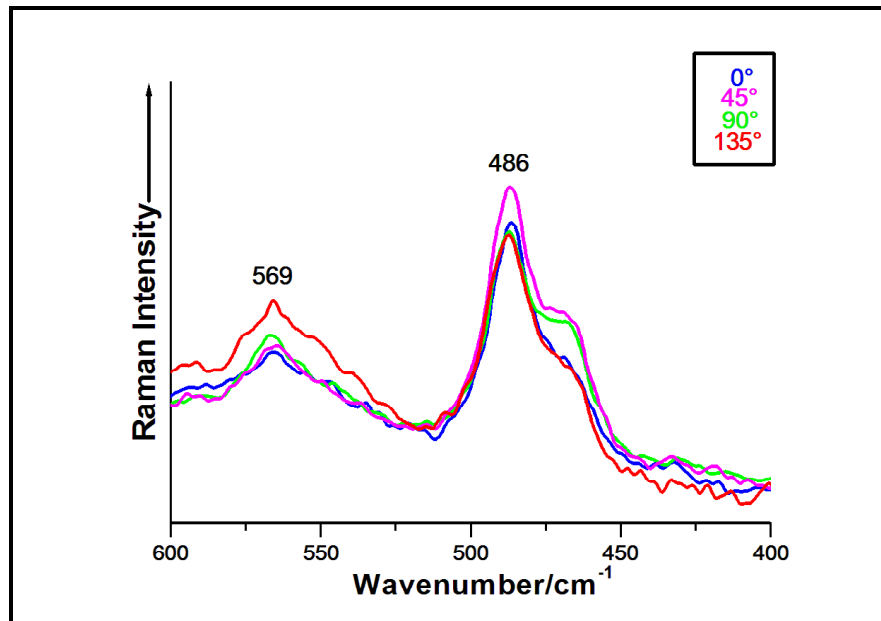
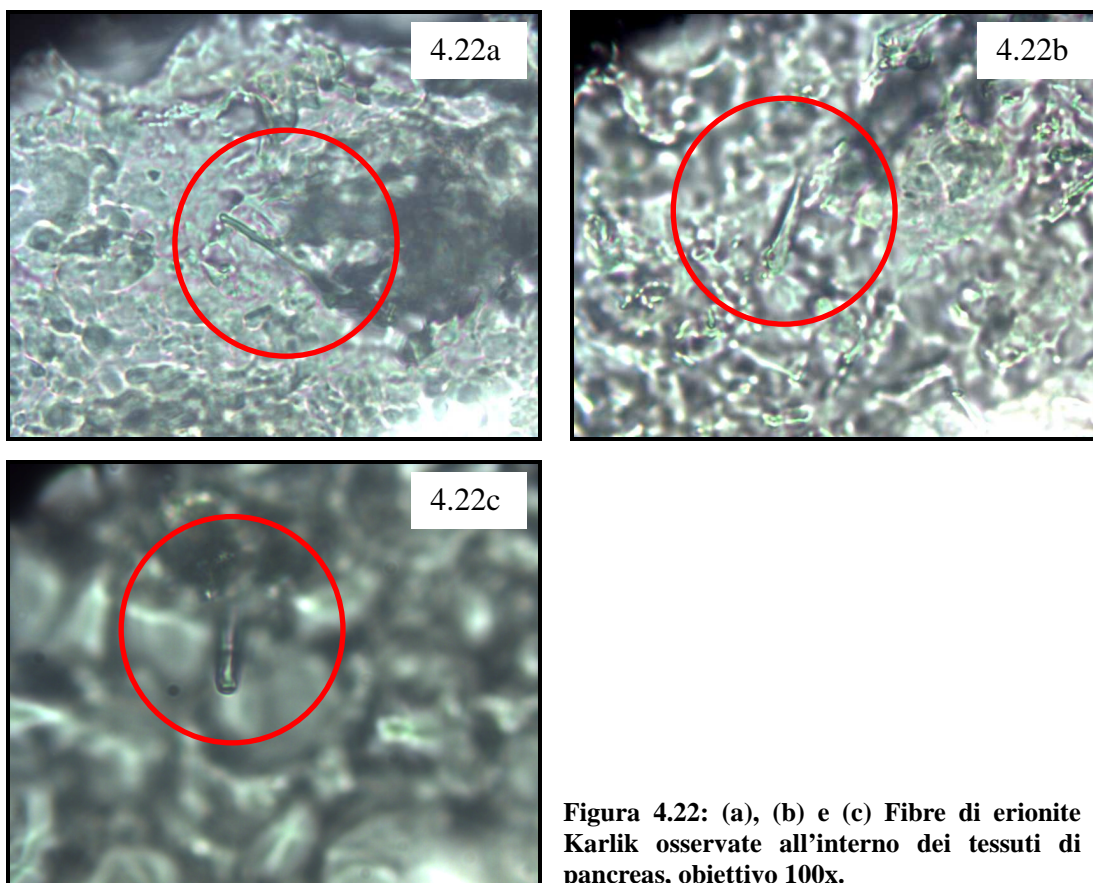


Figura 4.21: Sovrapposizione degli spettri Raman ottenuti orientando la fibra a 0° , 45° , 90° e 135° , normalizzati rispetto al rumore di fondo.

Per ancor meglio mettere in evidenza i rapporti di intensità delle banda a 486 cm^{-1} e 569 cm^{-1} , in figura 4.21 i quattro spettri rappresentati nelle Figure 4.17-4.20, normalizzati rispetto al rumore di fondo, sono stati sovrapposti. É quindi evidente che la netta diminuzione dell'intensità della banda a circa 490 cm^{-1} , osservata nelle fibre all'interno dei tessuti di topo, non è ascrivibile alla orientazione delle fibre rispetto al fascio laser, ma piuttosto ad un deterioramento della struttura cristallina.

Si può quindi ipotizzare che, a contatto con i tessuti biologici, le fibre di erionite subiscano una modificazione a livello delle gabbie silicatiche, in quanto la banda a circa 490 cm^{-1} è ascrivita ai moti di bending dei legami (Si,Al)-O.

L'erionite Karlik osservata all'interno delle sezioni istologiche di topo è risultata localizzata nella stessa tipologia di tessuto in cui è stata identificata l'erionite Oregon. Di seguito vengono riportati alcuni esempi di fibre osservate in microscopia ottica (figure 4.22 a, b e c).



L'erionite Karlik all'interno di cellule pancreatiche ha presentato risposte in spettroscopia micro-Raman paragonabili a quelle presentate relativamente all'erionite dell'Oregon.

In figura 4.23 viene riportato uno spettro Raman in cui il rapporto tra le intensità relative delle bande osservate risulta paragonabile a quello osservato nelle fibre del campione naturale pre-iniezione.

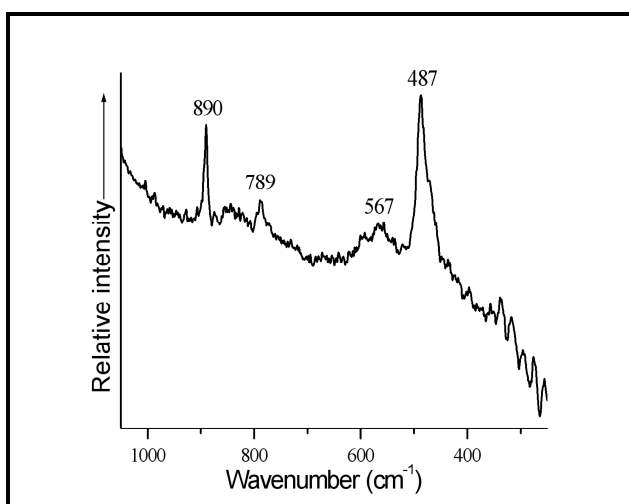


Figura 4.23: Spettro Raman di erionite Karlik con variazioni nulle dei rapporti tra le intensità relative tra le bande Raman rispetto quelli osservati nella fase naturale. La banda a 890 cm^{-1} è riconducibile alla paraffina con cui è trattato il tessuto.

In figura 4.24 è riportato uno spettro Raman in cui i rapporti tra le intensità relative delle bande a circa 490 cm^{-1} e quella a circa 570 cm^{-1} presentano una variazione limitata dello stesso rapporto.

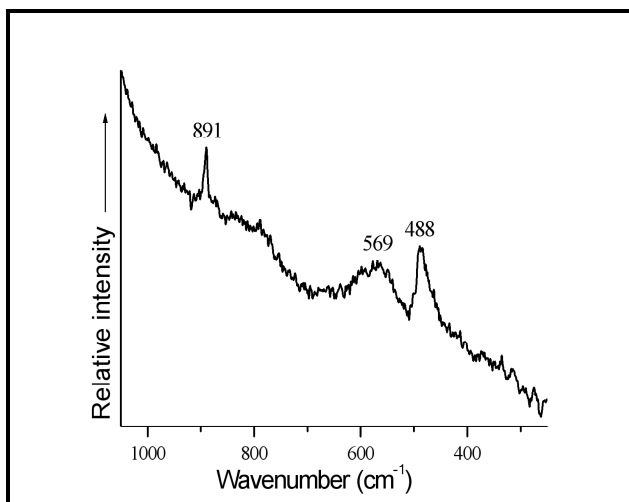


Figura 4.24: Spettro Raman di erionite Karlik con limitate variazioni dei rapporti tra le intensità relative delle bande. La banda a 891 cm^{-1} è riconducibile alla paraffina con cui è trattato il tessuto.

Infine, come nell'erionite proveniente dall'Oregon, una terza tipologia di risposta è stata osservata in fibre che presentavano una notevole variazione del rapporto tra le intensità relative della banda a 490 cm^{-1} e di quella a circa 570 cm^{-1} , come mostrato in figura 4.25.

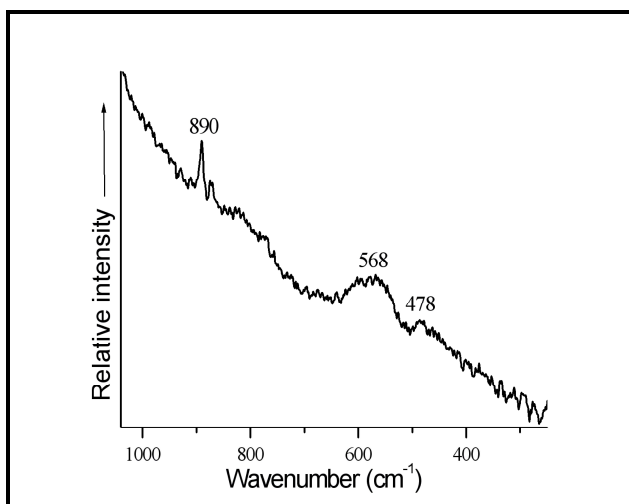


Figura 4.25: spettro Raman di erionite Karlik con decise variazioni nell'intensità delle bande rispetto alle fibre caratterizzate nella fase naturale. La banda a 890 cm^{-1} è riconducibile alla paraffina con cui è trattato il tessuto.

Come discusso per l'erionite Oregon, una disgregazione della struttura cristallina nelle fibre riscontrate nei tessuti pancreatici è dimostrata dall'applicazione della spettroscopia Raman su un grande numero di fibre. Viste le affinità delle risposte spettroscopiche dell'erionite Oregon e dell'erionite Karlik, si è proceduto all'applicazione della

spettroscopia micro-Raman alle sezioni istologiche di topo derivanti da fegato e milza, in modo da osservare altre eventuali somiglianze di risposta nelle analisi tra i due tipi di erionite.

➤ **Fibre di erionite in fegato**

Per quanto riguarda l'erionite Oregon all'interno delle sezioni istologiche di fegato di topo, le fibre sono state osservate, anche in questo caso, nella zona peritoneale all'intorno della ghiandola. Di seguito vengono riportate alcune immagini SEM, ottenute tramite rilevatore di elettroni retrodiffusi, di fibre di erionite Oregon osservate nelle sezioni istologiche di topo, figure 4.26 a, b, c e d.

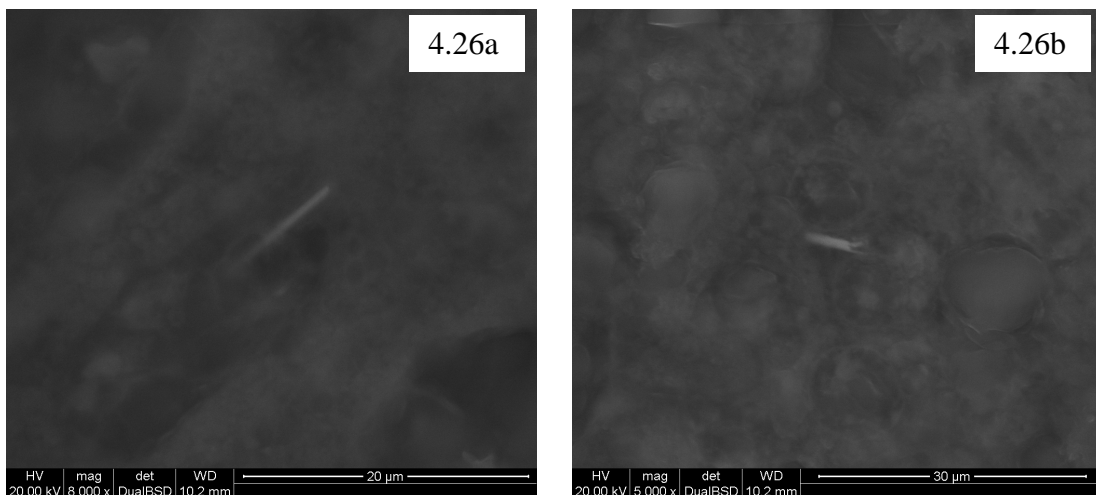
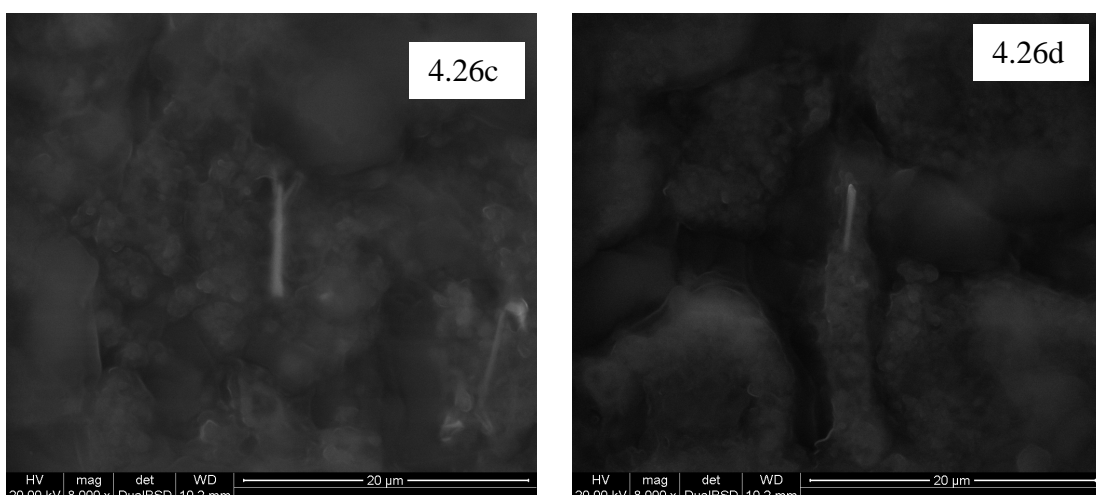


Figura 4.26: (a), (b), (c) e (d) Fibre di erionite Oregon osservate in sezioni istologiche di fegato di topo osservate tramite rilevatore di elettroni retrodiffusi.



Come si può osservare nelle immagini sopra riportate, anche in questa ghiandola le fibre osservate presentano dimensioni che ne permettono la classificazione tra le “fibre respirabili”.

Per quanto riguarda l'applicazione della spettroscopia micro-Raman sulle fibre osservate nelle sezioni istologiche di fegato, indirizzando il fascio laser sulle fasi minerali, non è stata osservata nessuna banda Raman. Sono state effettuate caratterizzazioni anche con sorgenti laser di differenti lunghezze d'onda, a 514 e 785 nm, per escludere che la mancata risposta Raman durante la caratterizzazione dell'erionite all'interno delle sezioni istologiche dipendesse dalla lunghezza d'onda della sorgente eccitatrice. In nessun caso è stato possibile registrare attività Raman. In questi casi, quindi, per l'attribuzione della fase minerale associata ai fasci di fibre, la tecnica VP-SEM/EDS è risultata essere di fondamentale importanza.

Come nella sezione istologica di fegato di topi trattati con erionite Oregon, anche nel caso dell'erionite Karlik le fibre sono state localizzate nei tessuti peritoneali ai confini dei tessuti parenchimatici della ghiandola epatica, come si può osservare dalle figure di seguito riportate.

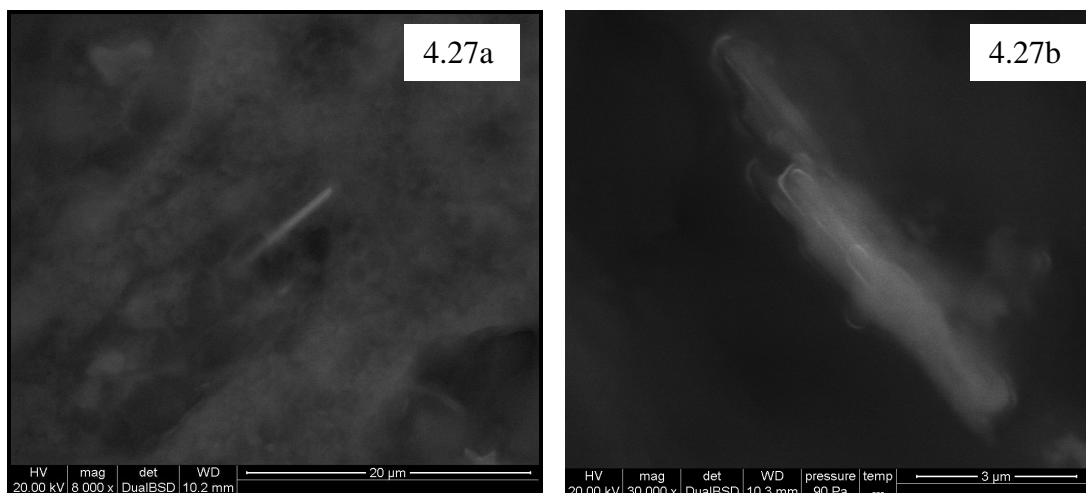
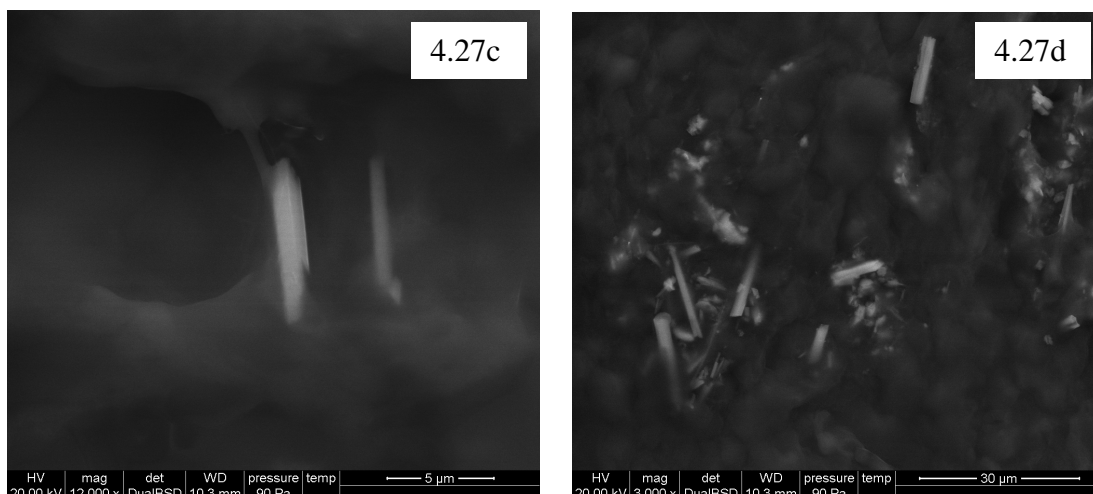


Figura 4.27: (a), (b), (c) e (d) Fibre di erionite Karlik osservate in sezioni istologiche di fegato di topo osservate tramite rilevatore di elettroni retrodiffusi.



Durante la fase di caratterizzazione spettroscopica, soltanto una fibra ha fornito uno spettro Raman (figura 4.28a). Come si può osservare dalla figura 4.28b, il microscopio ottico abbinato allo strumento ha permesso inoltre di osservare come la fibra fosse immersa in parte nel tessuto epatico.

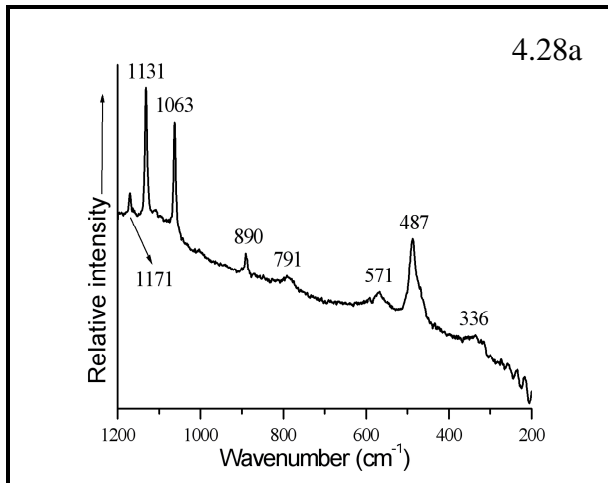


Figura 4.28a: Spettro Raman di erionite Karlik registrato nella sezione istologica ottenuta dai tessuti epatici. Le bande a 890, 1063, 1131 e 1171 cm^{-1} sono riconducibili alla paraffina con cui è trattato il tessuto.



Figura 4.28b: Fibra di erionite Karlik (nel cerchio rosso) osservata in fegato e su cui è stato ottenuto lo spettro Raman di Fig. 4.28a, obiettivo 50x.

Anche in questo caso sono state effettuate acquisizioni di spettri Raman di altre fibre osservate, utilizzando diverse sorgenti eccitatrici, 514 e 785 nm, ma come per l'erionite Oregon, neanche in questo caso è stato possibile registrare attività Raman sulle fibre analizzate.

➤ **Fibre di erionite in milza**

La terza tipologia di tessuti analizzata ha riguardato i tessuti di milza e relativo intorno peritoneale, interessati da mesotelioma a seguito dell'iniezione con erionite proveniente dall'Oregon o con erionite di Karlik.

In questo caso, né l'applicazione della spettroscopia micro-Raman né l'analisi in VP-SEM/EDS hanno permesso di evidenziare la presenza di eventuali fibre di erionite Oregon, contrariamente a quanto ottenuto dalle iniezioni di fibre di crocidolite e descritte nella tesi di Musa Maya.

4.2.2 – Caratterizzazione chimica

➤ **Fibre di erionite in pancreas**

A seguito dello studio in spettroscopia micro-Raman si è potuta ipotizzare una disgregazione della struttura cristallina con conseguente possibile rottura dei legami chimici all'interno delle fibre. Al fine di evidenziare eventuali perdite di elementi chimici all'interno delle fibre iniettate, si è proceduto ad effettuare l'analisi chimica sulle stesse fibre tramite VP-SEM/EDS. Come già descritto precedentemente, alla media delle analisi effettuate sulla fibra (IN) è stata sottratta la media delle acquisizioni ottenute nel tessuto all'intorno della stessa fibra (OUT). Per meglio valutare il chimismo delle fibre, essendo le sezioni istologiche adagate su vetrino portacampione, al fine di definire la composizione chimica dell'insieme tessuto+vetrino, in assenza di fibre, sono stati preventivamente acquisiti spettri EDS su un'area di tessuto adagiata su vetrino. Un esempio viene presentato in figura 4.29a ed il relativo spettro EDS viene riportato in figura 4.29b.

Si sottolinea come i seguenti elementi chimici – silicio, sodio, calcio, magnesio, fosforo e zolfo – fanno parte della composizione chimica relativa al tessuto+vetro, quindi dell'OUT.

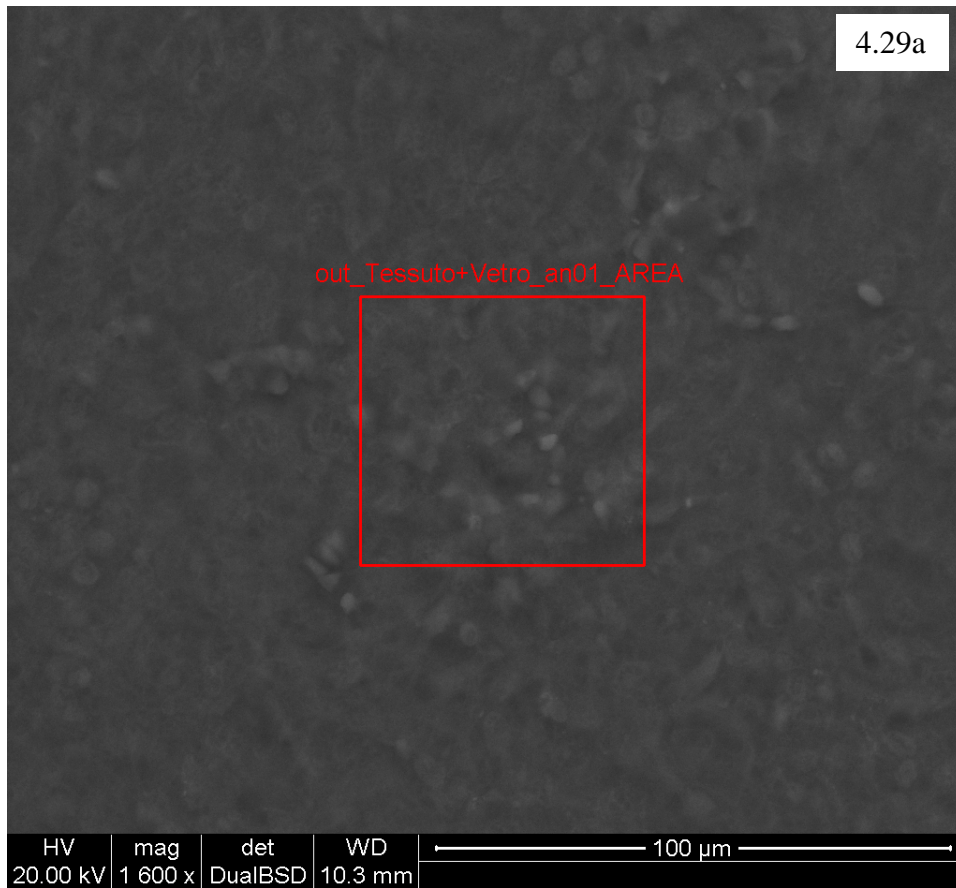


Figura 4.29a: Area di analisi del substrato formato da tessuto e vetrino portacampioni, il cui spettro EDS è riportato in figura 4.29b.

4.29b

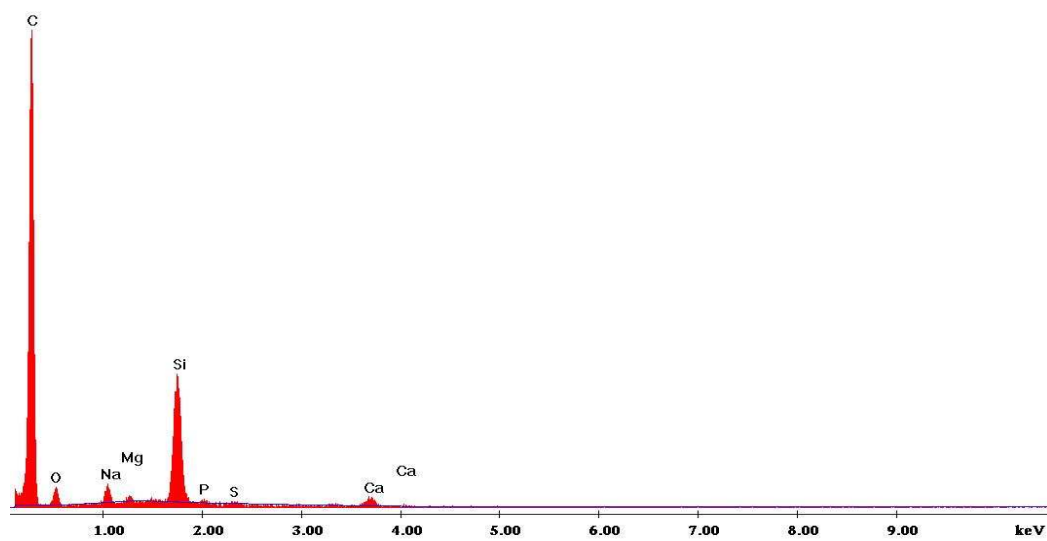


Figura 4.29b: Spettro EDS ottenuto analizzando l'area indicata dal riquadro in figura 4.29a.

Una volta determinato il chimismo associato al supporto si è proceduto all'acquisizione degli spettri EDS delle fibre prima caratterizzate con la spettroscopia micro-Raman.

In tabella 4.5, vengono riportati i valori chimici ottenuti su un campione rappresentativo di fibre di erionite Oregon analizzate in una sezione istologica di pancreas.

	% atomica								
	Si	Al	Mg	Fe	Ti	Ca	K	Na	P
Pancreas_FibraA_Diff_medie	1,13	0,70	/	0,02	/	/	0,10	/	/
Pancreas_FibraB_Diff_medie	1,50	0,68	/	/	/	/	0,10	/	/
Pancreas_FibraC_Diff_medie	0,36	0,52	/	0,02	/	/	0,07	/	/
Pancreas_FibraD_Diff_medie	/	0,38	/	/	0,01	/	0,01	/	0,03
Pancreas1_FibraE_Diff_medie	1,42	0,74	/	0,04	/	/	0,16	/	/
Pancreas1_FibraF_Diff_medie	0,06	0,29	/	0,03	/	/	0,05	/	0,01
Pancreas1_FibraG_Diff_medie	0,54	0,53	/	0,02	/	/	0,07	/	/
Pancreas_FibraH_Diff_medie	1,51	0,55	/	0,01	/	/	0,10	/	/
Pancreas1_FibraI_Diff_medie	0,36	0,20	/	/	/	/	0,04	/	/

Tabella 4.5: Composizione chimica qualitativa in percentuale atomica di fibre di erionite Oregon, osservate in sezioni istologiche di pancreas di topo, a cui è stato sottratto il relativo apporto medio del substrato (vetrino + tessuto).

Pur considerando gli eventuali errori derivanti da un'analisi qualitativa, come quella operata in questo lavoro, si può osservare comunque la totale assenza di Na rispetto a quanto osservato nelle fibre del campione naturale (Tabella 4.2).

Inoltre, la bassa quantità di ferro rilevata nelle analisi EDS, peraltro in quantità paragonabili a quelle rilevate sui campioni naturali, permette di escludere la presenza di una copertura ferro-proteica, propria dei corpuscoli dell'asbesto.

Incrociando i dati spettroscopici e chimici, quindi, si possono ipotizzare:

- una modificazione a livello delle gabbie zeolitiche;
- una variazione della quantità di alcuni elementi chimici, principalmente il sodio, costituenti i fasci fibrosi;
- la totale assenza di copertura ferro-proteica caratteristica dei corpuscoli ferruginosi dell'asbesto.

➤ **Fibre di erionite in fegato**

Di seguito viene riportata una tabella riassuntiva di analisi chimiche effettuate su fibre di erionite Oregon osservate nei tessuti di fegato di topo, tabella 4.6.

	% atomica								
	Si	Al	Mg	Fe	Ca	K	Na	P	S
Fegato_Fibra1_Diff_medie	0,97	0,35	/	/	/	0,04	0,07	0,05	/
Fegato_Fibra2_Diff_medie	1,15	0,26	0,07	/	0,01	0,06	0,14	/	/
Fegato_Fibra3_Diff_medie	1,01	0,34	0,07	/	/	0,06	0,04	/	/
Fegato_Fibra4_Diff_medie	0,79	0,25	0,02	/	/	0,07	/	/	/
Fegato_Fibra5_Diff_medie	1,15	0,37	0,07	/	/	0,08	0,11	/	/
Fegato_Fibra6_Diff_medie	0,64	0,38	/	/	/	0,05	0,08	0,04	0,01
Fegato_Fibra7_Diff_medie	0,21	0,18	0,02	/	/	0,04	/	0,02	0,11
Fegato_Fibra8_Diff_medie	1,37	0,41	/	/	0,03	0,08	0,15	/	/
Fegato_Fibra9_Diff_medie	0,15	0,21	0,04	/	/	0,04	/	0,02	/
Fegato_Fibra10_Diff_medie	0,72	0,22	/	/	/	0,09	0,20	/	/

Tabella 4.6: Composizione chimica qualitativa di fibre di erionite Oregon, osservate in sezioni istologiche di fegato di topo, a cui è stato sottratto il relativo apporto medio del substrato (vetrino + tessuto).

Considerando anche in questo caso le analisi puramente qualitative ed i relativi errori dovuti alla sottrazione della media di composizione del substrato tessuto+vetrino, si osservano comunque variazioni rispetto alla fase pre-iniezione.

Come già osservato nelle fibre di erionite Oregon in pancreas, si può mettere in evidenza una minore quantità di sodio, una variabilità del potassio, pur presente in tutte le fibre, che risulta in minore percentuale rispetto all'erionite di partenza.

Per quanto riguarda il sodio, a differenza dello stesso tipo di fibre analizzate intorno ai tessuti pancreatici, è stato riscontrato in sette fibre analizzate su dieci. Considerando che questo elemento chimico è anch'esso uno dei componenti del vetrino portacampioni e soggetto ad un notevole errore nella valutazione della sua concentrazione reale, una delle ipotesi potrebbe che esso sia meno soggetto al rilascio nell'ambiente del fegato rispetto a quello del pancreas. A conferma, si può correlare questo dato all'andamento del silicio, presente in percentuali analoghe sia nelle fibre nei tessuti di pancreas che in quelle nei tessuti di fegato. Questo permette di escludere un errore derivante dalla sottrazione della componente substrato+vetrino. Queste evidenze dimostrano una diversa interazione delle fibre con questo medium biologico rispetto a quello del pancreas, confermando i dati spettroscopici da cui era stata ipotizzata una disgregazione delle gabbie silicatiche nell' ambiente del fegato.

Infine, risulta importante porre in evidenza la totale assenza di ferro, il che permette di escludere la presenza di copertura ferro-proteica.

Sulle fibre di erionite Karlik analizzate tramite la spettroscopia micro-Raman in fegato sono state effettuate analisi EDS, per evidenziare eventuali modificazioni chimiche ed eventuali somiglianze rispetto alle analisi chimiche effettuate sulle fibre di erionite Oregon osservate nella stessa tipologia di tessuto (tabella 4.7).

	% atomica								
	Si	Al	Mg	Fe	Ca	K	Na	P	S
Fegato_Fibra1_Diff_medie	1,48	0,49	0,01	/	/	0,16	0,04	/	/
Fegato_Fibra2_Diff_medie	0,35	0,28	/	/	/	0,05	/	/	/
Fegato_Fibra3_Diff_medie	1,38	0,41	0,04	/	/	0,10	0,12	/	/
Fegato_Fibra4_Diff_medie	0,91	0,26	/	/	/	0,04	0,14	0,01	0,07
Fegato_Fibra5_Diff_medie	2,04	0,59	/	/	/	0,15	0,23	/	/
Fegato_Fibra6_Diff_medie	1,65	0,49	0,05	/	0,03	0,11	0,18	/	/
Fegato_Fibra7_Diff_medie	2,03	0,55	0,07	/	0,02	0,15	0,25	/	/
Fegato_Fibra8_Diff_medie	0,82	0,24	0,02	0,03	0,03	0,04	0,07	0,01	/
Fegato_Fibra9_Diff_medie	1,29	0,36	/	/	0,04	0,10	0,19	/	0,01
Fegato_Fibra10_Diff_medie	1,15	0,30	0,19	/	0,01	0,07	0,17	/	0,02

Tabella 4.7: Composizione chimica qualitativa di fibre di erionite Karlik, osservate in sezioni istologiche di pancreas di topo, a cui è stato sottratto il relativo apporto medio del substrato (vetrino + tessuto).

Ponendo a confronto i dati ottenuti sull'erionite Karlik nei tessuti con quelli dello stesso tipo di fibre pre-inoculo, si evidenziano alcune differenze. Nell'erionite Karlik naturale, infatti, nessuna evidenza di sodio era stata osservata dall'analisi chimica, mentre il calcio risultava essere presente nella maggioranza delle fibre studiate. Nel caso delle fibre analizzate nei tessuti, invece, il sodio risulta essere nella maggioranza dei casi presente, il potassio sempre determinato, mentre il calcio è riscontrato per lo più come elemento in traccia.

Si può quindi dedurre che, l'ambiente cellulare del fegato sia più aggressivo nei confronti delle fibre di erionite, sia Oregon che Karlik, confermando i dati della spettroscopia micro-Raman che non ha evidenziato spettri con bande riconducibili a questa fase.

4.3 – Caratterizzazione di fibre di erionite in sezioni istologiche di polmone umano

Dopo avere verificato la reale efficacia della metodologia di analisi atta al riconoscimento di fibre di erionite all'interno delle sezioni istologiche di topi trattati con due tipologie di questa fase minerale ed aver valutato quali modifiche possano subire al contatto con diverse matrici biologiche, si è passati all'analisi delle sezioni polmonari umane derivanti da pazienti affetti da mesotelioma e residenti in Cappadocia. Rispetto alle sezioni istologiche di topo, in questo caso ci sono due fattori di incognita molto importanti, rilevanti ai fini dell'analisi:

- il tempo di interazione con la matrice biologica;
- la possibile presenza di diverse fasi minerali e di eventuali altre sostanze che possono avere dato luogo alla formazione di pseudo-corpuscoli ferruginosi.

La fase di osservazione preliminare in microscopia ottica delle sezioni polmonari ha permesso di localizzare fibre come quelle riportate nelle figure 4.30a e 4.30b, che otticamente non presentavano evidenze di copertura ferro-proteica.

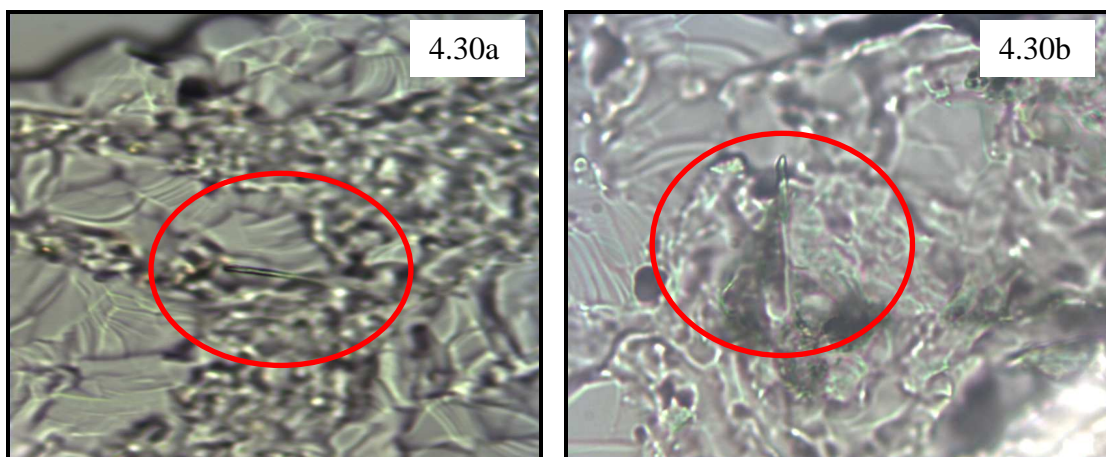


Figura 4.30: (a) e (b) fibre osservate nella sezione polmonare umana, cerchiare in rosso, osservate con obiettivo 50x.

Applicando la spettroscopia micro-Raman è stato possibile identificare fibre di erionite all'interno di sezioni istologiche di polmone derivanti da persone residenti nella regione della Cappadocia. In una prima tipologia di fibre, è stato possibile ottenere spettri

Raman come quello riportato in figura 4.31.

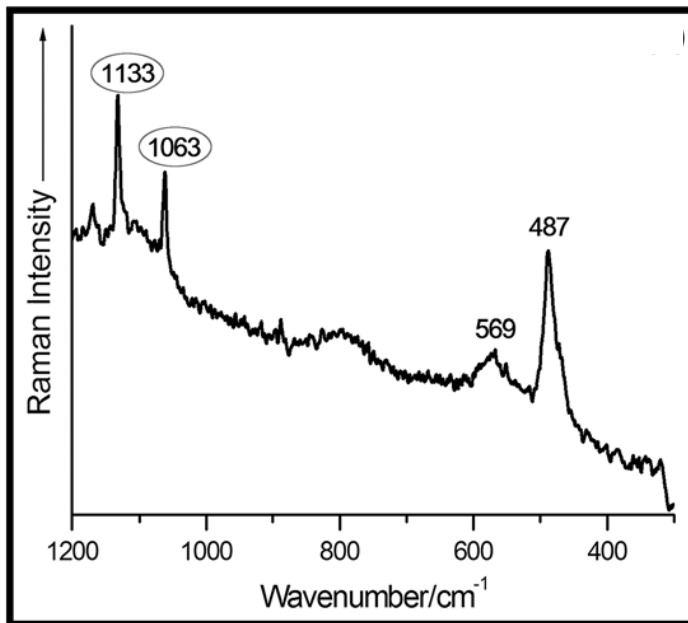


Figura 4.31: Spettro Raman di erionite registrato sulla fibra di figura 4.30a, osservata all'interno della sezione polmonare umana. Le bande a 1063 e 1133 cm⁻¹ sono riconducibili alla paraffina con cui è trattato il tessuto.

Nello spettro riportato in figura 4.31, relativo alla fibra in 4.30a, è stato possibile osservare bande Raman riconducibili con sicurezza alla fase minerale erionite. Lo spettro, inoltre, non presenta variazioni di intensità relativa, così come era stato osservato nei fasci di fibre in tessuti di pancreas di topo (sezione 4.2.1).

Per completare il dato ottenuto tramite la spettroscopia micro-Raman, sulla stessa fibra sono state effettuate batterie di analisi chimica in VP-SEM/EDS, parimenti a quanto effettuato sulle fibre riscontrate nelle sezioni istologiche di topo. Nella tabella 4.8 vengono riportati i valori chimici ottenuti.

	% atomica						
	Si	Al	Mg	Ca	K	Na	S
Umano_fibra1_An01_in	1,46	0,32	0,03	0,05	0,09	0,16	0,00
Umano_fibra1_An02_in	1,48	0,31	0,04	0,05	0,09	0,12	0,00
Umano_fibra1_An03_in	1,45	0,33	0,06	0,04	0,07	0,13	0,00
Umano_fibra1_An04_in	1,44	0,32	0,04	0,05	0,08	0,12	0,00
Umano_fibra1_An05_in	1,46	0,35	0,05	0,04	0,10	0,18	0,00
Umano_fibra1_An06_in	1,66	0,37	0,09	0,06	0,13	0,20	0,00
Umano_fibra1_An07_in	1,91	0,42	0,08	0,10	0,13	0,21	0,00
Umano_fibra1_An08_in	2,22	0,48	0,11	0,09	0,17	0,27	0,00
Umano_fibra1_media_in	1,64	0,36	0,06	0,06	0,11	0,17	0,00
Umano_fibra1_An01_out	0,54	0,00	0,06	0,05	0,00	0,18	0,00
Umano_fibra1_An02_out	0,57	0,00	0,09	0,08	0,00	0,19	0,00
Umano_fibra1_An03_out	0,58	0,00	0,00	0,05	0,00	0,17	0,00
Umano_fibra1_An04_out	0,51	0,00	0,08	0,05	0,00	0,16	0,00
Umano_fibra1_An05_out	0,43	0,00	0,04	0,05	0,00	0,15	0,00
Umano_fibra1_An06_out	0,66	0,00	0,08	0,04	0,00	0,24	0,00
Umano_fibra1_media_out	0,56	0,00	0,05	0,05	0,00	0,19	0,00
Umano_fibra1_Diff_medie	1,08	0,36	0,01	0,01	0,11	/	0,00

Tabella 4.8: Composizione chimica qualitativa, in percentuale atomica, ottenuta sulla fibra di figura 4.30a. Alla media delle analisi IN, riportata in giallo, viene sottratta la media delle analisi OUT, riportata in verde: la risultante differenza dei valori medi (in azzurro) rappresenta la composizione chimica media della fibra esaminata.

Come si può osservare dalla tabella 4.8, ponendo a confronto i dati ottenuti da questa fibra con quelli delle fasi naturali trattati nella sezione 4.1, si può attribuire questa fibra all'erionite Karlik, in quanto il potassio risulta essere il catione predominante. Rispetto alla fase naturale ed a quanto osservato nelle sezioni istologiche di topo, però, in questo caso risultano pressoché quasi assenti il magnesio ed il calcio rispetto alla fase naturale. A differenza di quanto osservato nei topi, inoltre, in questo caso il sodio non appare all'interno della fibra. Di seguito, in figura 4.32b vengono riportati uno spettro OUT, sovrapposto ad uno spettro IN, che permette una maggiore comprensione dei dati riportati in tabella 4.8.

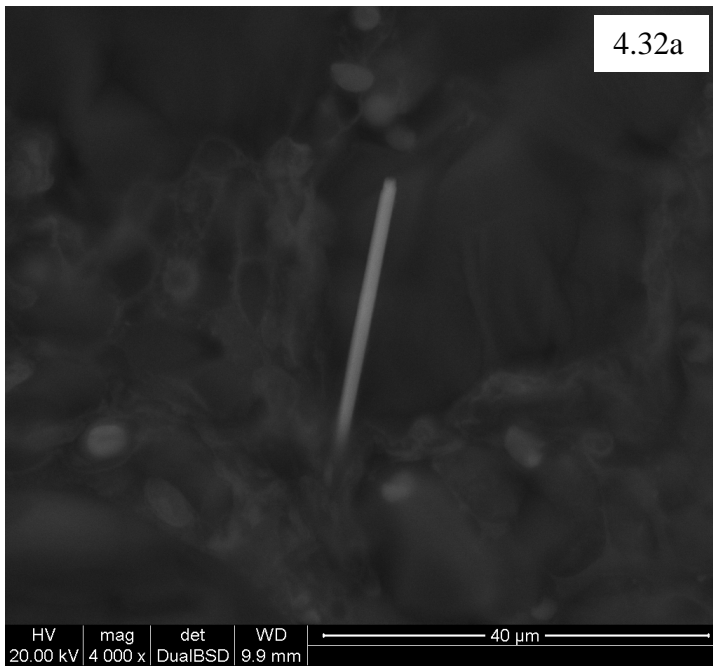
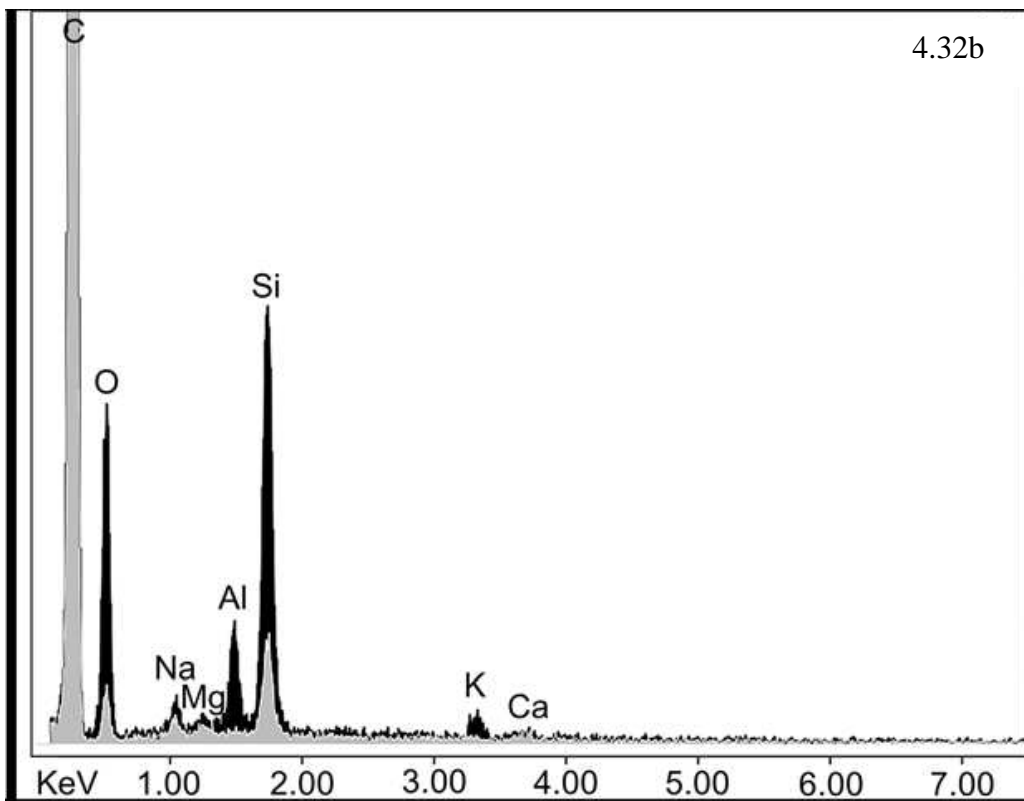


Figura 4.32: (a) Immagine SEM della fibra in figura 4.30a osservata tramite rivelatore di elettroni retrodiffusi. L'immagine risulta ruotata di 90° a causa del posizionamento del vetrino all'interno della camera porta campioni. (b) Spettri EDS ottenuti sulla stessa fibra: in nero è riportata la composizione chimica ottenuta sulla fibra, mentre in grigio è riportata l'analisi effettuata sul tessuto al suo intorno.



Correlando il dato spettroscopico a quello chimico, è stato possibile identificare la fibra di figura 4.30a come un'erionite Karlik. Inoltre, con la metodologia di analisi combinata è stato possibile osservare come questa tipologia di risposta spettroscopica fosse relazionata ad una composizione chimica relativamente poco modificata dall'interazione con il tessuto polmonare.

In una seconda tipologia di fibre, l'applicazione della spettroscopia micro-Raman non ha permesso di registrare uno spettro in cui fossero visibili bande. Un esempio di questo tipo di fibre è rappresentato dalla fibra riportata in figura 4.30b.

Successivamente all'analisi in spettroscopia micro-Raman, parimenti alla fibra di figura 4.30a, si è proceduto all'analisi in VP-SEM/EDS.

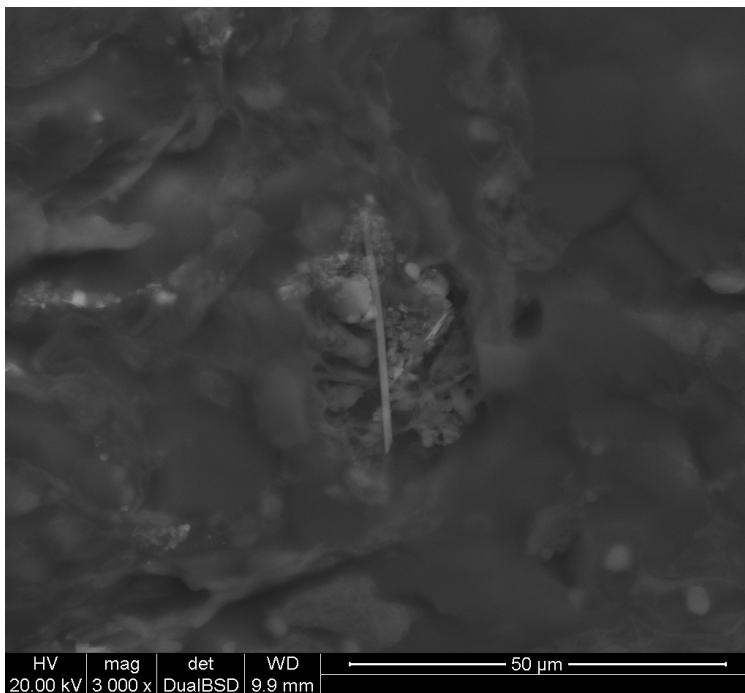


Figura 4.33: Immagine SEM della fibra in figura 4.30b osservata tramite rivelatore di elettroni retrodiffusi.

I dati chimici ottenuti sulla fibra di figure 4.30b e 4.33 vengono riportati nella tabella seguente.

	% atomica								
	Si	Al	Mg	Fe	Ca	K	Na	P	S
Umano_fibra2_An01_in	2,10	0,39	0,13	0,07	0,14	0,10	0,25	0,00	0,00
Umano_fibra2_An02_in	2,46	0,39	0,11	0,09	0,14	0,08	0,30	0,00	0,05
Umano_fibra2_An03_in	2,15	0,37	0,10	0,08	0,13	0,09	0,20	0,00	0,00
Umano_fibra2_An04_in	2,70	0,46	0,11	0,09	0,18	0,12	0,26	0,00	0,00
Umano_fibra2_An05_in	2,31	0,52	0,16	0,00	0,12	0,08	0,24	0,00	0,06
Umano_fibra2_An06_in	1,90	0,45	0,07	0,00	0,11	0,12	0,25	0,00	0,10
Umano_fibra2_An07_in	2,00	0,65	0,14	0,00	0,10	0,18	0,30	0,00	0,08
Umano_fibra2_An08_in	1,93	0,59	0,08	0,09	0,09	0,19	0,25	0,00	0,11
Umano_fibra2_media_in	2,19	0,48	0,11	0,05	0,13	0,12	0,26	0,00	0,05
Umano_fibra2_An01_out	0,90	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00	0,23	0,09	0,07
Umano_fibra2_An02_out	0,72	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	0,13	0,00	0,00
Umano_fibra2_An03_out	0,47	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00
Umano_fibra2_An04_out	1,08	0,00	0,08	0,00	0,11	0,00	0,26	0,05	0,00
Umano_fibra2_An05_out	1,30	0,00	0,00	0,00	0,09	0,00	0,28	0,00	0,00
Umano_fibra2_An06_out	0,96	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	0,23	0,05	0,07
Umano_fibra2_media_out	0,91	0,00	0,01	0,00	0,09	0,00	0,21	0,03	0,02
Umano_fibra2_Diff_medie	1,28	0,48	0,10	0,05	0,04	0,12	0,05	/	0,03

Tabella 4.9: Composizione chimica qualitativa, in percentuale atomica, ottenuta sulla fibra di figura 4.30b. Alla media delle analisi IN, in giallo, viene sottratta la media delle analisi OUT, riportata in verde: la risultante differenza dei valori medi (in azzurro) rappresenta la composizione chimica media della fibra esaminata.

L'attribuzione della fibra a erionite Karlik è risultata comunque possibile ponendo a confronto i dati ottenuti su questa fibra con quelli ottenuti nella sezione istologica di fegato di topo trattata con questa fase naturale. La presenza di questi elementi chimici, infatti, era stata rilevata anche all'interno delle fibre osservate in questa tipologia di tessuti (tabella 4.7).

La presenza di ferro, potrebbe lasciare ipotizzare ad una presenza di copertura ferro-proteica, ma la bassa quantità e la contemporanea assenza di fosforo permette di escludere questa possibilità. Nelle capsule ferro-proteiche, infatti, ad una determinata concentrazione di ferro nei gruppi eme corrisponde una certa quantità di fosfato, che nella ferritina dei mammiferi risulta essere circa 20 Fe/P_i, come riportato in Dubrovsky, 2006 e in Chasteen & Harrison 1999.

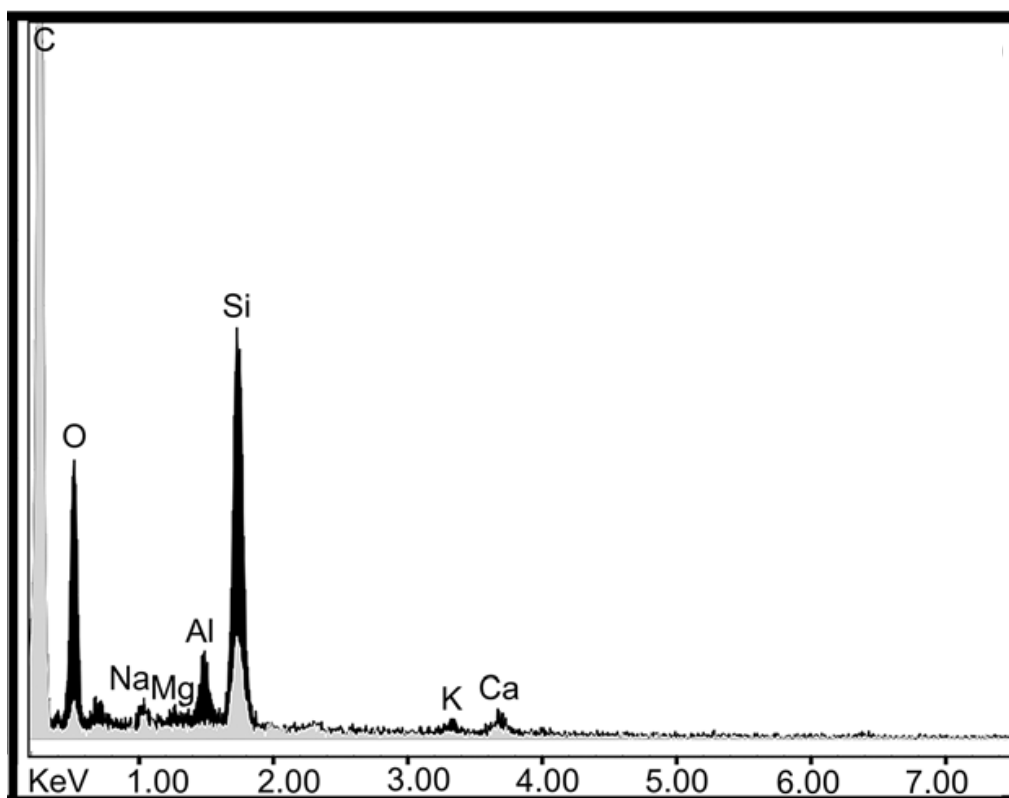


Figura 4.34: Spettri EDS ottenuti sulla fibra di figure 4.30b e 4.33: in nero è riportata la composizione chimica ottenuta sulla fibra, mentre in grigio è riportata l'analisi effettuata sul tessuto al suo intorno.

In figura 4.34 sono riportati uno spettro IN ottenuto sulla fibra di figure 4.30b e 4.33 ed uno spettro OUT sovrapposti, che mettono ancora meglio in evidenza come la fibra analizzata sia simile alla fibra che ha fornito lo spettro Raman ed i cui spettri sovrapposti sono riportati in figura 4.32b. L'assenza di attività Raman in questo tipo di fibre può essere correlata con una parziale o totale disgregazione della struttura cristallina.

Analizzando più approfonditamente i dati chimici ottenuti sulle due fibre di figure 4.30a e 4.30b, ed in particolare applicando il rapporto Si/Al con cui è possibile attribuire la fase zeolitica in esame ad erionite oppure ad offretite, si ottengono i valori di 3.0 per la fibra 1 e di 2.7 per la fibra 2. Risulterebbe così che la fibra che ha fornito lo spettro Raman sia classificabile come erionite anche sulla base dei dati chimici. La fibra 2, invece, appare possedere un rapporto tale per cui non è possibile una distinzione certa tra offretite ed erionite. Applicando invece il rapporto $\text{Si}/(\text{Si}+\text{Al})$ si ottengono i valori di 0.75 per la fibra 1 e di 0.73 per la fibra 2.

Il dato chimico della fibra 2 viene attribuito comunque ad erionite Karlik grazie alla

bassa quantità di calcio rilevata, che appare rispondente a quanto osservato nelle sezioni di topo trattati con queste fibre. I rapporti potrebbero risentire di una sottostima del silicio a causa della possibile perdita in elementi chimici della fibra oppure per la presenza del supporto in vetro. In casi come questo è evidente come la spettroscopia micro-Raman rappresenti un valido e risolutivo strumento di supporto ad analisi di questo tipo.

A livello spettroscopico, anche nei tessuti umani sono state osservate fibre in cui l'intensità relativa della banda a circa 490 cm^{-1} risultava molto differente rispetto a quella riscontrata nella fase naturale.



Figura 4.35a: Fibra osservata in sezione polmonare umana, cerchiata in rosso, osservata con obiettivo 100x.

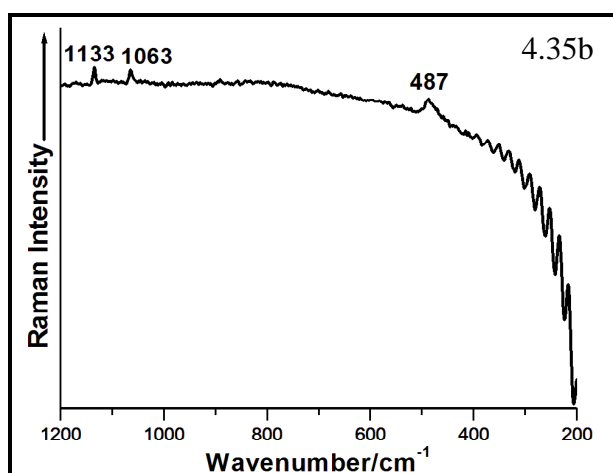


Figura 4.35b: Spettro Raman di erionite registrato sulla fibra di figura 4.41a, osservata all'interno di una sezione polmonare umana. Le bande a 1063 e 1133 cm^{-1} sono riconducibili alla paraffina con cui è trattato il tessuto.

Le risposte spettroscopiche e le analisi chimiche ottenute sulle sezioni istologiche umane, mostrano chiare correlazioni con i dati ottenuti sulle fibre analizzate nelle

sezioni istologiche di topo, in cui i tempi di interazione sono stati più brevi ed in cui l'unica causa scatenante il mesotelioma è riconducibile a questa fase minerale. In particolare:

- le bande Raman riconducibili ai moti vibrazionali di bending dei legami (Si,Al)-O risultano essere variabili a seguito dell'interazione con i tessuti;
- una certa variabilità nella composizione chimica delle fibre dopo interazione con il mezzo biologico è stata evidenziata alle analisi SEM/EDS, soprattutto per quanto riguarda il tenore di sodio;
- il ferro, anche se rilevato in alcuni casi in tracce, non risulta essere implicato nella formazione dei corpuscoli ferruginosi sulle fibre di erionite.

Dai risultati ottenuti, si può concludere che l'applicazione combinata della spettroscopia micro-Raman e della microscopia elettronica VP-SEM/EDS risulta essere una metodologia valida per la caratterizzazione della zeolite erionite, oltre che nelle sezioni di topo - in cui questa fase è stata iniettata - anche in tessuti polmonari umani, nei quali risultano essere presenti anche fasi minerali differenti, oltre a quella oggetto di studio.

I dati fin qui presentati sono stati oggetto di una recente pubblicazione sulla rivista internazionale *Journal of Raman Spectroscopy*: A. CROCE, M. MUSA, M. ALLEGRINA, C. RINAUDO, Y. I. BARIS, A. U. DOGAN, A. POWERS, Z. RIVERA, P. BERTINO, H. YANG, G. GAUDINO, M. CARBONE, (2013) Micro-Raman spectroscopy identifies crocidolite and erionite fibers in tissue sections, *Journal of Raman Spectroscopy*, Vol. 44, 1440-1445 (cfr. la sezione allegati).

4.4 - Caratterizzazione di fasi minerali definite “asbesto” per normativa in sezioni istologiche di polmone umano

Parallelamente alla caratterizzazione delle fibre di erionite all'interno delle sezioni istologiche di pazienti provenienti dalla Turchia, si è proseguito anche lo studio di sezioni istologiche derivanti da pazienti che hanno subito un'esposizione certa, professionale o ambientale, alle fasi definite “asbesto” per normativa.

In studi precedenti del gruppo di ricerca di Mineralogia Ambientale dell'Università degli Studi del Piemonte Orientale, erano state applicate le tecniche di spettroscopia micro-Raman e di VP-SEM/EDS alle fasi fibrose di asbesto in sezioni istologiche di pazienti affetti da malattie asbesto-correlate (Rinaudo *et al.*, 2010a; Rinaudo *et al.*, 2010b; Musa *et al.*, 2012).

L'applicazione combinata di queste due tecniche per la caratterizzazione delle fasi di asbesto all'interno dei corpuscoli ferruginosi era risultata difficoltosa per diverse ragioni:

- la spettroscopia micro-Raman, sulla maggior parte dei corpuscoli, provocava una cristallizzazione di ematite nel rivestimento proteico, che impediva così il riconoscimento della fase all'interno della capsula proteica (Rinaudo *et al.*, 2010b); soltanto su determinate zone del corpuscolo, così, era stato possibile ottenere spettri Raman con bande associabili ad una fase “asbesto” (Musa *et al.*, 2012);
- in caso di assenza di spettro Raman, la caratterizzazione chimica effettuata su sezioni istologiche poste su vetrino portacampioni presentava un fattore di errore che poteva anche precludere il riconoscimento della fase minerale;
- la fase minerale all'interno dei corpuscoli ferruginosi poteva potenzialmente mostrare differenze rispetto alle fasi minerali contenute nel data-base di riferimento o, in qualunque caso, fornire spettri EDS che presentavano notevoli tenori di ferro derivante dal rivestimento proteico.

Per ovviare a questi problemi e per cercare di dare una risposta certa alla questione posta nel terzo punto di cui sopra, è stato necessario sviluppare una metodologia che permettesse di escludere il contributo del vetrino portacampioni e che mettesse in grado di determinare il contributo del ferro proteico nelle analisi chimiche effettuate sui

corpuscoli dell'asbesto.

Sulla base di recenti studi effettuati da Pascolo *et al.*, 2011 e 2013, si è elaborata una metodologia applicata ai corpuscoli dell'asbesto che prevede di effettuare le analisi EDS lungo transetti, sulle diverse parti del corpuscolo, in maniera normale rispetto all'asse di accrescimento della fibra, in modo da evidenziare la composizione chimica della fibra nel *core*.

Nel corso di questo studio, le analisi chimiche in VP-SEM/EDS sono state effettuate in maniera puntuale lungo linee, analizzando così l'intero corpuscolo, sia nei punti dove è localizzabile morfologicamente la fibra, che nelle aree più esterne.

Inizialmente, la tecnica è stata applicata sulle sezioni istologiche su vetro. Nelle figure 4.36a, 4.36b e 4.36c è riportato un corpuscolo studiato su questo tipo di supporto.

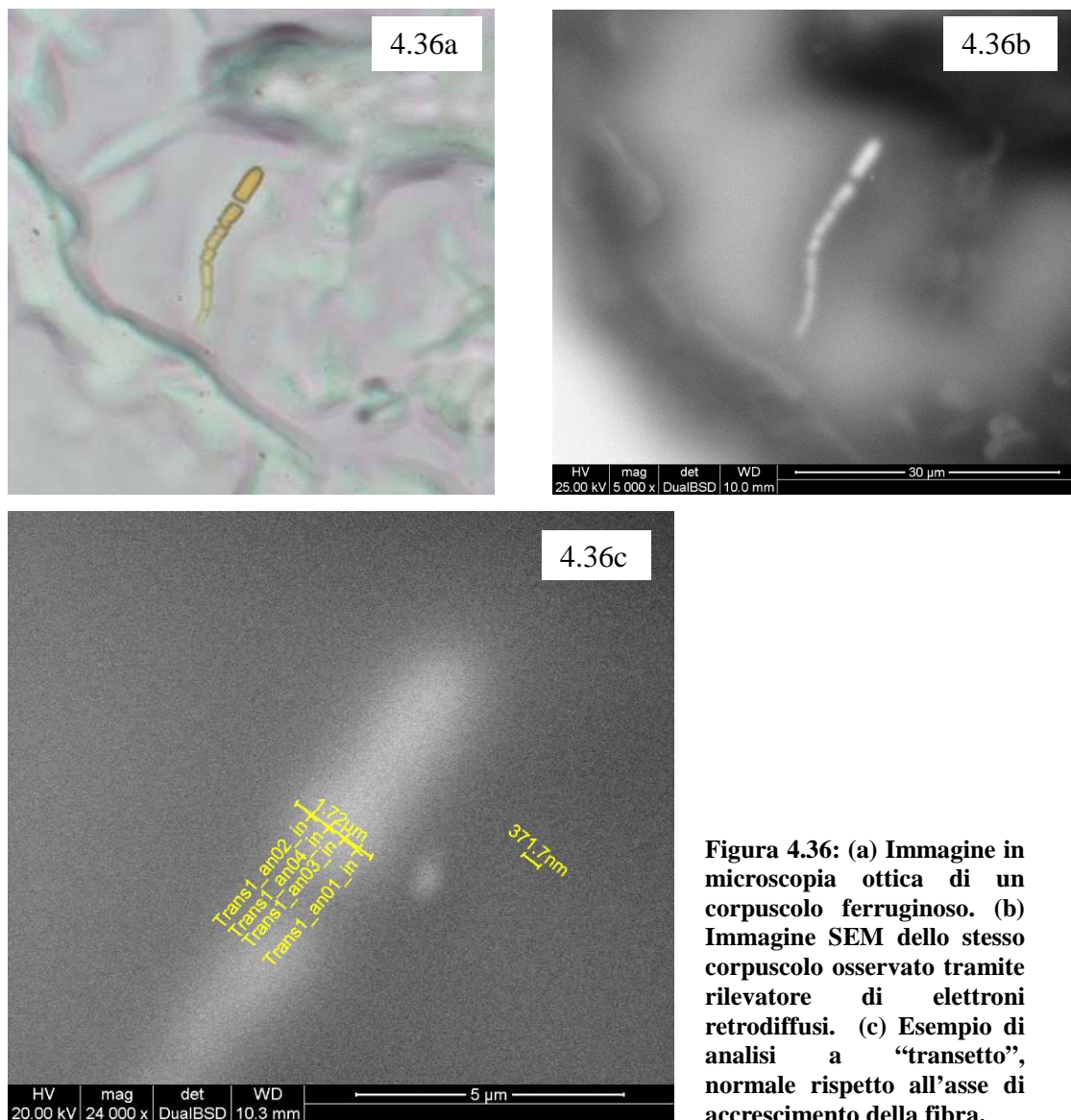


Figura 4.36: (a) Immagine in microscopia ottica di un corpuscolo ferruginoso. (b) Immagine SEM dello stesso corpuscolo osservato tramite rilevatore di elettroni retrodiffusi. (c) Esempio di analisi a “transetto”, normale rispetto all’asse di accrescimento della fibra.

Sul corpuscolo riportato in figura 4.36 sono stati effettuati in totale 7 transetti trasversali, come quello riportato in figura 4.36c. A questi sono stati sottratti i valori OUT mediati da diversi punti all'esterno del corpuscolo in zone distanti da esso e situate fuori dal campo visivo di figura 4.36c, costituiti da tessuto+vetrino. In tabella 4.10 sono riportati i risultati ottenuti.

	% atomica								
	Si	Al	Mg	Fe	Ca	K	Na	P	S
Transetto1_media_IN	2,91	0,06	0,21	0,47	0,28	0,05	0,64	0,05	0,00
Transetto2_media_IN	2,56	0,05	0,18	0,21	0,25	0,05	0,54	0,02	0,00
Transetto3_media_IN	2,63	0,06	0,19	0,21	0,24	0,05	0,54	0,03	0,00
Transetto4_media_IN	2,54	0,04	0,19	0,27	0,24	0,05	0,50	0,04	0,00
Transetto5_media_IN	3,60	0,07	0,25	0,32	0,36	0,07	0,69	0,05	0,00
Transetto6_media_IN	3,03	0,06	0,21	0,15	0,28	0,05	0,60	0,02	0,00
Transetto7_media_IN	3,19	0,07	0,23	0,12	0,29	0,06	0,64	0,01	0,00
media OUT	4,79	0,10	0,31	0,00	0,64	0,11	0,91	0,73	0,09
Differenza transetto 1-out	/	/	/	0,47	/	/	/	/	/
Differenza transetto 2-out	/	/	/	0,21	/	/	/	/	/
Differenza transetto 3-out	/	/	/	0,21	/	/	/	/	/
Differenza transetto 4-out	/	/	/	0,27	/	/	/	/	/
Differenza transetto 5-out	/	/	/	0,32	/	/	/	/	/
Differenza transetto 6-out	/	/	/	0,15	/	/	/	/	/
Differenza transetto 7-out	/	/	/	0,12	/	/	/	/	/

Tabella 4.10: Composizione chimica qualitativa, in percentuale atomica, ottenuta sulla fibra di figura 4.36. Alla media delle analisi IN, viene sottratta la media delle analisi OUT.

Come si può osservare dai dati della tabella 4.10, applicando la metodologia su vetrino portacampioni, difficile è risultato quantificare in maniera inequivocabile il contributo degli elementi costituenti il supporto all'analisi, sia per quanto riguarda il silicio che per quanto riguarda gli altri elementi costituenti (sodio, magnesio, calcio), che sono, con il ferro, anche elementi costituenti le fasi di asbesto. Infatti, la fibra all'interno dei corpuscoli ferruginosi appariva molto deteriorata ed una sottrazione IN-OUT, a differenza di quanto osservato nel caso dell'erionite trattata nelle sezioni precedenti, portava ad ottenere valori negativi di tutti gli elementi, tranne che del ferro, su tutte le sezioni del corpuscolo ferruginoso.

Risultati analoghi sono stati ottenuti su diversi corpuscoli ferruginosi osservati su vetrini portacampioni.

D'altra parte nei casi analizzati il tessuto intorno al corpuscolo, sotto il fascio elettronico, presentava buchi e lacerazioni: questo induce a sovrastimare il contributo degli elementi chimici costituenti il vetrino portacampioni nelle analisi OUT e quindi a compromettere il chimismo proponibile per il corpuscolo e/o per la fibra incorporata.

Per poter proporre chimismi più attendibili per le fasi inorganiche incorporate nei corpuscoli si è quindi dovuto modificare il materiale di supporto delle sezioni istologiche.

Un primo materiale testato per eseguire analisi di questa tipologia è stato il *carbon disc*, un supporto circolare di 2.5 centimetri di diametro e spesso 3 millimetri su cui viene applicato il campione per le analisi SEM.

In un campione analizzato sono state osservate fibre che morfologicamente presentavano diversi gradi di incapsulamento ferro-proteico. Nel caso della fibra di figura 4.37, ad esempio, il rivestimento appare molto sottile.

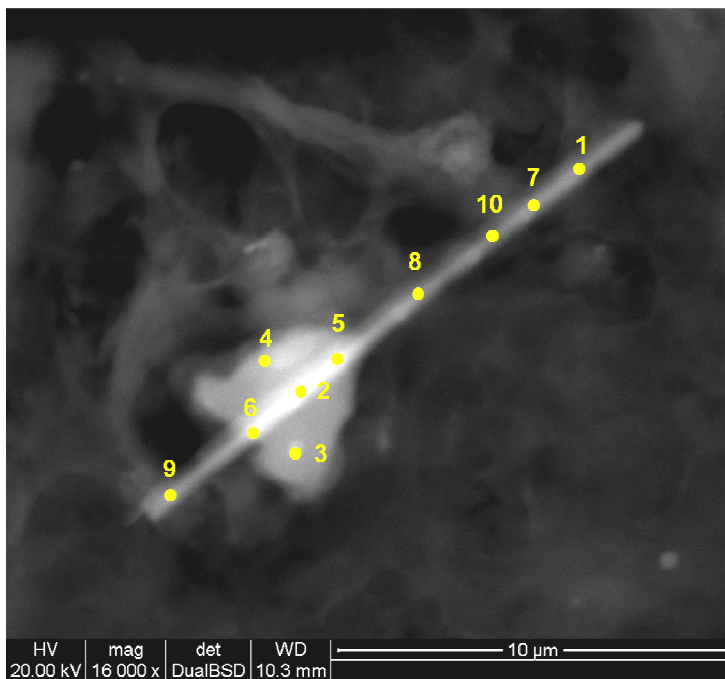


Figura 4.37: Immagine SEM di un corpuscolo osservato tramite rivelatore di elettroni retrodiffusi. Sono riportati in giallo i punti di analisi.

Su questa tipologia di fibre rivestite è stato possibile ottenere il chimismo associato alla fibra senza dover effettuare le analisi puntuali a transetto, in quanto il materiale proteico all'intorno risulta essere di spessore minimo.

In corpuscoli ferruginosi che presentavano tale morfologia sono state effettuate analisi chimiche puntuali lungo l'asse di accrescimento della fibra.

	% atomica					
	Si	Al	Mg	Fe	Na	K
An01	0,55	0,00	0,00	0,27	0,00	0,00
An02	1,80	1,02	0,21	0,29	0,21	0,36
An05	1,31	0,66	0,15	0,27	0,21	0,23
An06	1,66	0,81	0,17	0,33	0,23	0,30
An07	0,50	0,00	0,00	0,25	0,19	0,00
An08	0,53	0,00	0,09	0,24	0,22	0,00
An09	0,70	0,08	0,01	0,33	0,27	0,00
An10	0,52	0,00	0,09	0,30	0,21	0,00
An03	1,42	1,06	0,00	0,00	0,00	0,38
An04	1,32	0,91	0,12	0,00	0,00	0,34

Tabella 4.11: Composizione chimica qualitativa, in percentuale atomica, ottenuta sul corpuscolo di figura 4.37.

Considerando i risultati delle analisi nei punti 3 e 4 che indicano presenza di Si, Al e K si può desumere che i punti di analisi 2, 5 e 6 sono fortemente influenzati dal materiale sottostante. Ai fini della definizione della fase mineralogica sono stati considerati solo i valori relativi ai punti 1, 7, 8, 9 e 10, che permettono di identificare la fase crocidolite. Si può dunque riorganizzare la tabella 4.11 nella maniera riportata di seguito in tabella 4.12.

	% atomica					
	Si	Al	Mg	Fe	Na	K
An01	0,55	0,00	0,00	0,27	0,00	0,00
An07	0,50	0,00	0,00	0,25	0,19	0,00
An08	0,53	0,00	0,09	0,24	0,22	0,00
An09	0,70	0,08	0,01	0,33	0,27	0,00
An10	0,52	0,00	0,09	0,30	0,21	0,00
MEDIA	0,56	0,02	0,04	0,28	0,18	0,00

Tabella 4.12: Composizione chimica qualitativa, in percentuale atomica, ottenuta sul corpuscolo di figura 4.37.

Interessante è osservare la mancanza di fosforo, che è proprio della copertura ferro-proteica.

In figura 4.38 viene riportata una fibra che morfologicamente appare rivestita dal materiale ferro-proteico. I dati sono presentati nella tabella 4.13.

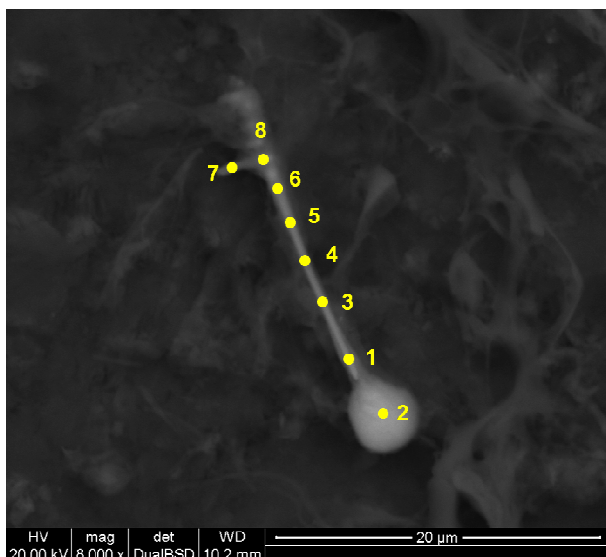


Figura 4.38: Immagine SEM di corpuscolo osservato tramite rivelatore di elettroni retrodiffusi. Sono riportati in giallo i punti di analisi.

	% atomica						
	Si	Mg	Fe	Ca	Na	S	P
An01	0,46	0,10	0,51	0,00	0,22	0,00	0,06
An03	0,49	0,07	0,41	0,00	0,21	0,00	0,00
An04	0,43	0,08	0,39	0,00	0,21	0,00	0,00
An05	0,38	0,07	0,48	0,00	0,17	0,04	0,07
An06	0,29	0,06	0,57	0,00	0,16	0,05	0,08
An08	0,17	0,00	0,80	0,00	0,00	0,00	0,15
MEDIA	0,37	0,06	0,53	0,00	0,16	0,02	0,06

	% atomica						
	Si	Mg	Fe	Ca	Na	S	P
An02	0,00	0,00	1,43	0,12	0,00	0,00	0,28
An07	0,52	0,00	0,73	0,00	0,17	0,00	0,00

Tabella 4.13: Composizione chimica qualitativa, in percentuale atomica, ottenuta sul corpuscolo di figura 4.38 organizzata secondo la localizzazione dei punti di analisi.

In questo caso, ai fini della definizione della fase mineralogica e in analogia con quanto sopra riportato, sono stati considerati i valori relativi ai punti 1, 3, 4, 5, 6 e 8.

Pur presentando rivestimento ferro-proteico, le analisi riportate in tabella 4.13 mostrano come gli elementi costituenti della fibra siano silicio, ferro, sodio e magnesio, permettendo il riconoscimento della fase fibrosa come crocidolite.

Osservando tutti i punti di analisi, è possibile fare delle ulteriori considerazioni. Nelle analisi 1, 5, 6 e 8 si può osservare la presenza di fosforo: questo aspetto, come detto in precedenza, è legata alla presenza del materiale proteico e la contemporanea maggiore presenza di ferro conferma che la fibra risulta essere rivestita dal materiale ferro-proteico.

In questo caso sono stati anche riscontrati corpuscoli dell'asbesto di morfologia tale da richiedere l'analisi a transetto, figura 4.39.

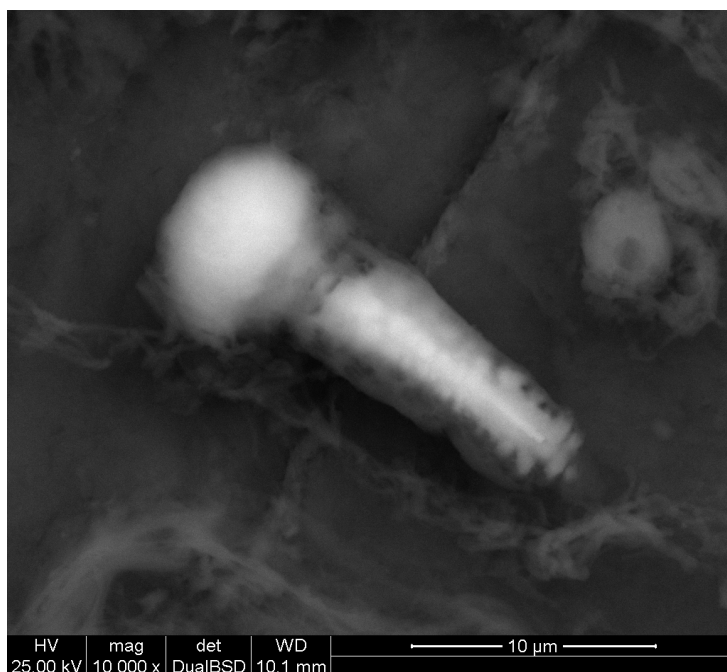


Figura 4.39: Immagine SEM di un corpuscolo osservato tramite rivelatore di elettroni retrodiffusi.

Su questo corpuscolo sono state effettuate due analisi a transetto, figure 4.40a e b.

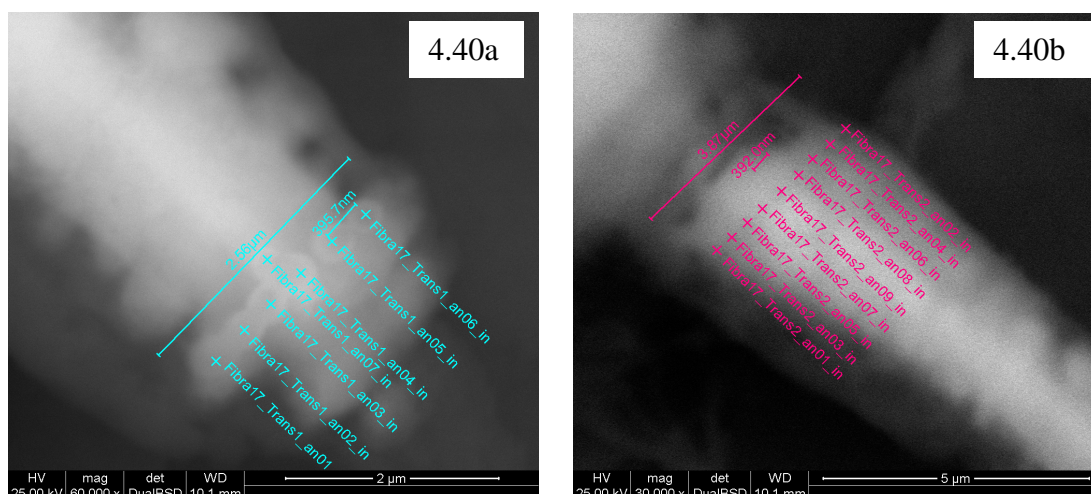


Figura 4.40: (a) e (b) Analisi a “transetto” eseguite sul corpuscolo di figura 4.39.

	% atomica						
	Si	Mg	Fe	Na	Ca	S	P
Transetto1_media_CENTRALI	0,19	0,05	0,56	0,14	0,02	0,01	0,10
Transetto1_media_PERIFERICHE	0,04	0,00	0,46	0,08	0,04	0,03	0,08
Differenza_CENTRALI-PERIFERICHE	0,15	0,05	0,10	0,06	/	/	0,02
	% atomica						
	Si	Mg	Fe	Na	Ca	S	P
Transetto2_media_CENTRALI	0,08	0,04	1,01	0,14	0,06	0,05	0,17
Transetto2_media_PERIFERICHE	0,04	0,00	0,67	0,10	0,05	0,04	0,11
Differenza_CENTRALI-PERIFERICHE	0,04	0,04	0,34	0,04	0,01	0,01	0,06

Tabella 4.14: Composizione chimica qualitativa, in percentuale atomica, ottenuta sul corpuscolo di figura 4.39 e 4.40 (a) e (b).

Osservando i dati riportati in tabella 4.14, si può osservare che gli elementi costituenti la fibra sono silicio, ferro, sodio e magnesio. Gli elementi chimici rilevati permettono di attribuire alla fase crocidolite la fibra costituente il *core* di questo corpuscolo.

Essendo la fibra completamente rivestita dalla capsula ferro-proteica, inoltre, il dato del fosforo è sempre rilevato.

La stessa metodologia è stata applicata ad una fibra che si presentava particolarmente coperta dal materiale ferro-proteico, come nel caso del corpuscolo riportato in figura 4.41.

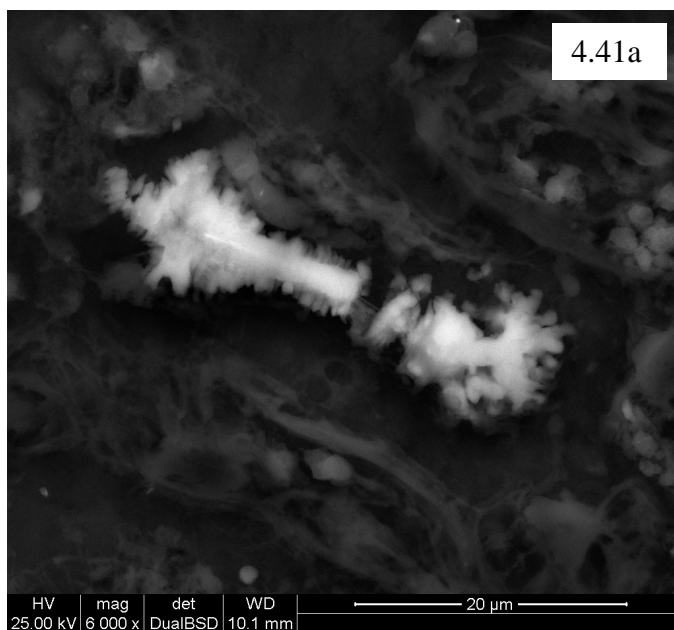
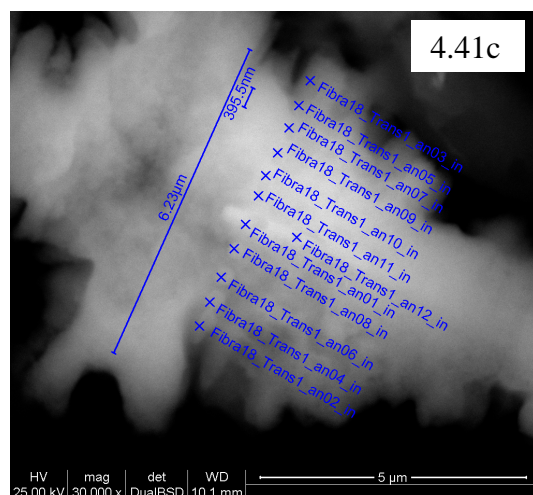
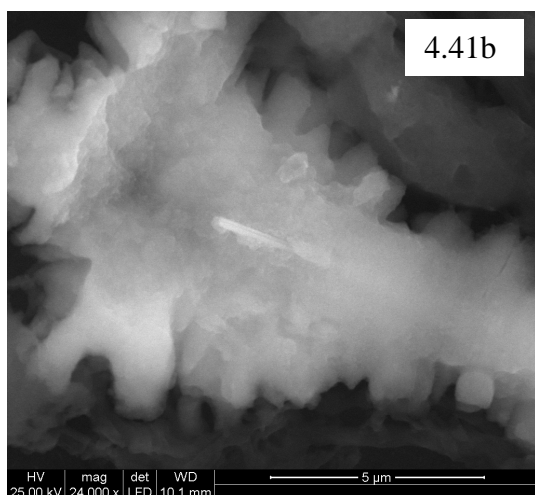


Figura 4.41: (a) Immagine SEM di un corpuscolo osservato tramite rivelatore di elettroni retrodiffusi. (b) Lo stesso corpuscolo osservato tramite rivelatore di elettroni secondari. (c) Analisi a transetto effettuate sul corpuscolo.



I dati ottenuti dal transetto riportato in figura 4.41c sono riassunti nella tabella 4.15.

	% atomica							
	Si	Al	Mg	Fe	Na	Ca	S	P
Transetto_media_an_centrali	0,23	0,02	0,09	2,02	0,28	0,09	0,06	0,30
Transetto_media_an_periferiche	0,02	0,00	0,00	1,89	0,18	0,08	0,05	0,26
Transetto_Differenza medie	0,21	0,02	0,09	0,13	0,10	0,01	0,01	0,04

Tabella 4.15: Composizione chimica qualitativa, in percentuale atomica, ottenuta sul corpuscolo di figura 4.41.

Anche in questo caso, la sottrazione della media delle analisi periferiche a quella delle analisi eseguite nell'area in cui appare localizzata la fibra ha permesso comunque il riconoscimento della fase minerale associata. Dalla differenza si osserva come siano rilevati silicio, ferro, sodio e magnesio: la presenza di questi elementi permette la classificazione della fibra incorporata come crocidolite.

In figura 4.42 viene riportato un corpuscolo su cui sono state eseguite diverse analisi a transetto.

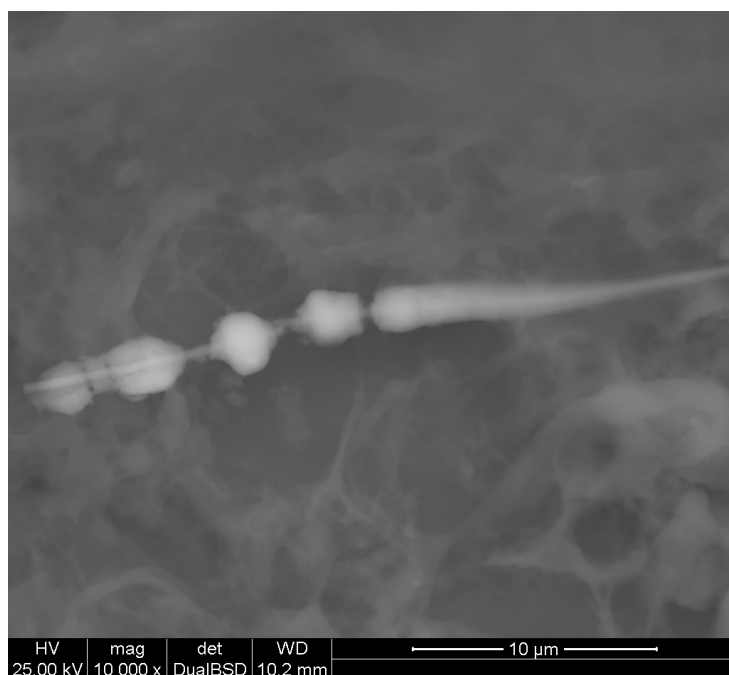


Figura 4.42: Immagine SEM di un corpuscolo osservato tramite rivelatore di elettroni retrodiffusi.

Dall'immagine SEM si può osservare distintamente la zona in cui è localizzabile la fibra costituente il *core*, figura 4.43a. In figura 4.43b e 4.43c sono riportate le analisi a transetto che sono riassunte nella tabella 4.16.

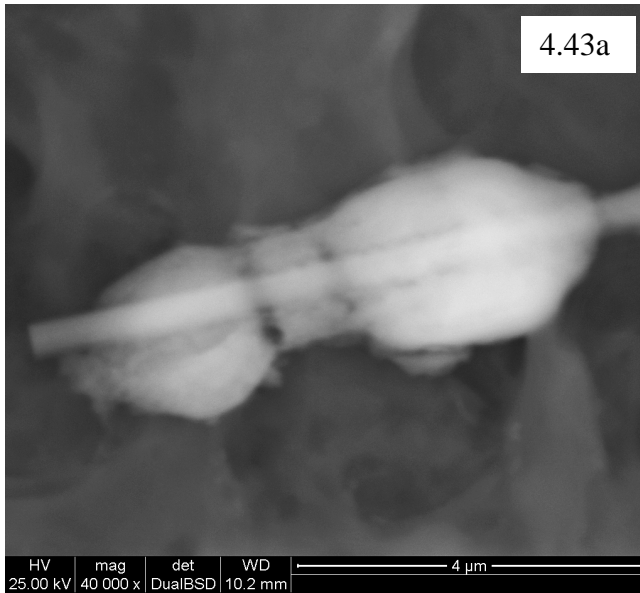
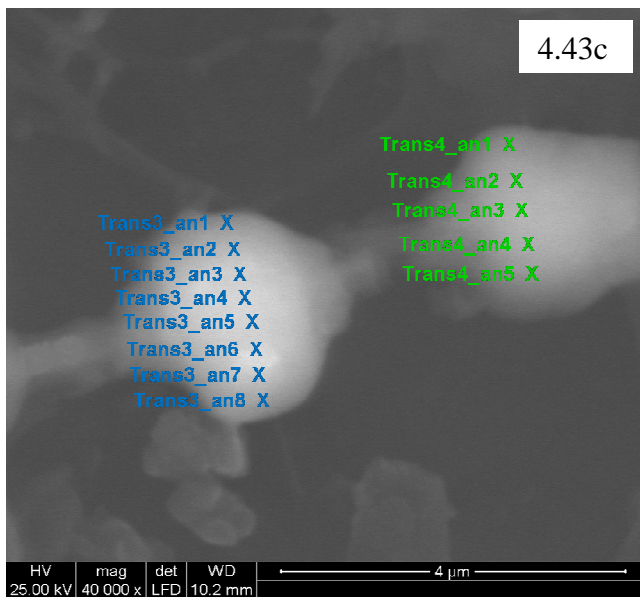
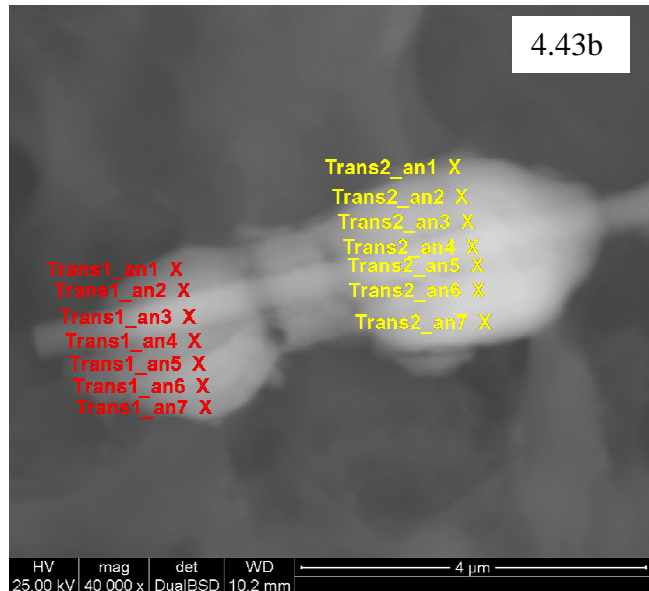


Figura 4.43: (a) Particolare del corpuscolo di figura 4.42 osservato tramite rivelatore di elettroni retrodiffusi. (b) Punti di analisi dei transetti 1 e 2 (c) Punti di analisi dei transetti 3 e 4.



Transetto 1	% atomica						
	Si	Mg	Fe	Na	Ca	S	P
Transetto1_an01	0,03	0,05	0,34	0,07	0,03	0,03	0,07
Transetto1_an02	0,06	0,05	0,52	0,07	0,03	0,03	0,09
Transetto1_an03	0,20	0,11	0,60	0,05	0,04	0,03	0,06
Transetto1_an04	0,06	0,05	0,68	0,06	0,05	0,03	0,10
Transetto1_an05	0,06	0,05	0,68	0,05	0,05	0,05	0,11
Transetto1_an06	0,04	0,04	0,69	0,03	0,04	0,03	0,10
Transetto1_an07	0,04	0,05	0,62	0,08	0,06	0,04	0,09
Transetto1_core	0,20	0,11	0,60	0,05	0,04	0,03	0,06
Transetto1_periferia	0,04	0,05	0,48	0,08	0,05	0,04	0,08
Transetto1_differenza	0,16	0,06	0,12	/	/	/	/
Transetto 2	% atomica						
	Si	Mg	Fe	Na	Ca	S	P
Transetto2_an01	0,01	0,07	0,19	0,04	0,04	0,03	0,09
Transetto2_an02	0,02	0,04	0,55	0,05	0,04	0,03	0,08
Transetto2_an03	0,04	0,06	0,64	0,06	0,04	0,03	0,10
Transetto2_an04	0,20	0,08	0,62	0,07	0,04	0,02	0,08
Transetto2_an05	0,13	0,06	0,76	0,05	0,04	0,03	0,10
Transetto2_an06	0,06	0,01	0,85	0,02	0,05	0,04	0,12
Transetto2_an07	0,03	0,04	0,80	0,05	0,06	0,03	0,13
Transetto2_core	0,17	0,07	0,69	0,06	0,04	0,03	0,09
Transetto2_periferia	0,02	0,06	0,50	0,05	0,05	0,03	0,11
Transetto2_differenza	0,15	0,01	0,19	0,01	/	0,00	/
Transetto 3	% atomica						
	Si	Mg	Fe	Na	Ca	S	P
Transetto3_an01	0,03	0,08	0,54	0,07	0,04	0,02	0,08
Transetto3_an02	0,04	0,06	0,78	0,08	0,04	0,03	0,11
Transetto3_an03	0,07	0,10	0,93	0,09	0,04	0,03	0,13
Transetto3_an04	0,11	0,08	0,95	0,07	0,04	0,03	0,13
Transetto3_an05	0,12	0,10	1,03	0,09	0,04	0,03	0,11
Transetto3_an06	0,06	0,08	0,95	0,07	0,05	0,03	0,14
Transetto3_an07	0,05	0,07	0,87	0,04	0,05	0,03	0,16
Transetto3_an08	0,05	0,07	0,73	0,05	0,06	0,03	0,11
Transetto3_core	0,12	0,09	0,99	0,08	0,04	0,03	0,12
Transetto3_periferia	0,05	0,04	0,68	0,06	0,04	0,02	0,09
Transetto3_differenza	0,07	0,05	0,31	0,02	0,00	0,01	0,03
Transetto 4	% atomica						
	Si	Mg	Fe	Na	Ca	S	P
Transetto4_an01	0,03	0,04	0,61	0,08	0,04	0,02	0,08
Transetto4_an02	0,05	0,07	0,82	0,07	0,05	0,03	0,10
Transetto4_an03	0,12	0,06	0,91	0,05	0,04	0,02	0,11
Transetto4_an04	0,09	0,05	0,94	0,05	0,04	0,02	0,11
Transetto4_an05	0,06	0,04	0,75	0,03	0,04	0,02	0,10
Transetto4_core	0,12	0,06	0,91	0,05	0,04	0,02	0,11
Transetto4_periferia	0,05	0,04	0,68	0,06	0,04	0,02	0,09
Transetto4_differenza	0,07	0,02	0,23	/	0,00	0,00	0,02

Tabella 4.16: Composizione chimica qualitativa, in percentuale atomica, ottenuta sul corpuscolo di figura 4.42 e 4.43. In rosso i valori ottenuti sulla fibra costituente il core.

Dai dati ottenuti, appare evidente come la fibra costituente il *core* del corpuscolo sia composta in primo luogo da silicio e ferro ed in quantità minore di magnesio. Nei transetti 2 e 3, inoltre, anche tracce di sodio risultano essere rilevate nella fase minerale all'interno della capsula ferro-proteica e quindi potrebbero essere attribuite alla fase minerale all'interno del corpuscolo. Prendendo in considerazione tutte le analisi su uno stesso transetto tale elemento non risulta rilevato in quantità diverse nella parte esterna rispetto a quella centrale (vedere tabella 4.16). Quindi, tenendo conto delle basse quantità rilevate, i valori di sodio generati dalla mera differenza delle analisi periferiche da quelle centrali non permettono di attribuire questo elemento chimico alla fibra incorporata. Le proporzioni tra gli elementi indicano perciò che la fase minerale all'interno del corpuscolo è amosite.

Le analisi effettuate sul supporto *carbon disc* hanno dimostrato come questo materiale fosse ideale per l'analisi in microscopia elettronica. Essendo costituito in materiale opaco, però, le sezioni preparate su questo supporto non potevano essere osservate in microscopia ottica in luce trasmessa. Si è quindi modificato nuovamente il supporto portacampione e si è inquadrato come materiale ideale per questa tipologia di analisi il polipropilene, in quanto risulta essere trasparente e l'unico elemento rilevabile al VP-SEM/EDS è il carbonio, elemento non presente nelle fibre studiate.

Inoltre, per eventuali analisi micro-Raman, il polipropilene non ha mostrato bande apprezzabili nei *range* 1150-1000 e 700-600 cm^{-1} , in cui sono rilevabili i moti vibrazionali simmetrici e antisimmetrici dei legami Si-O-Si utili per il riconoscimento delle fasi di asbesto (Rinaudo *et al.*, 2003; Rinaudo *et al.*, 2004).

Con questa tipologia di supporto, quindi, non è stato necessario modificare la metodologia di analisi messa a punto presso il gruppo di ricerca di Mineralogia Ambientale.

In figura 4.44a viene riportato un corpuscolo ferruginoso osservato su questa tipologia di portacampione, presente in una sezione istologica proveniente da un paziente affetto da mesotelioma pleurico.

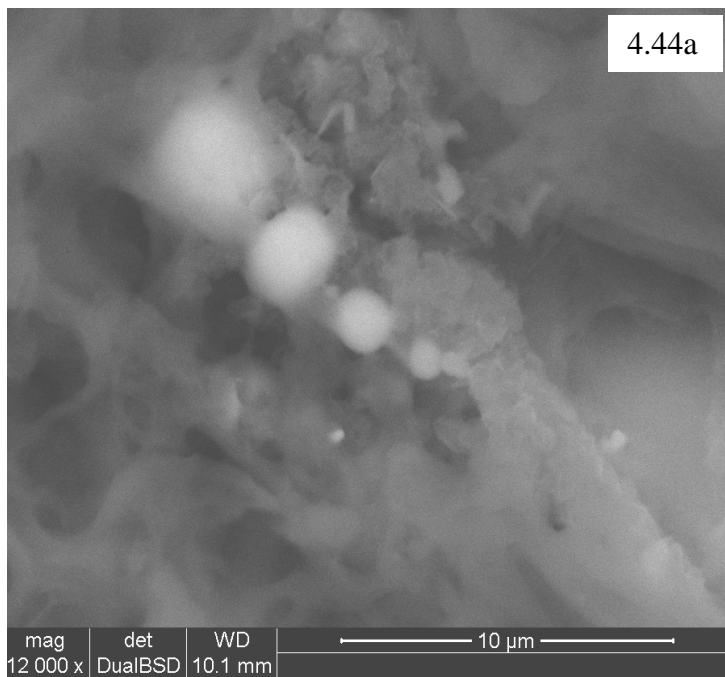
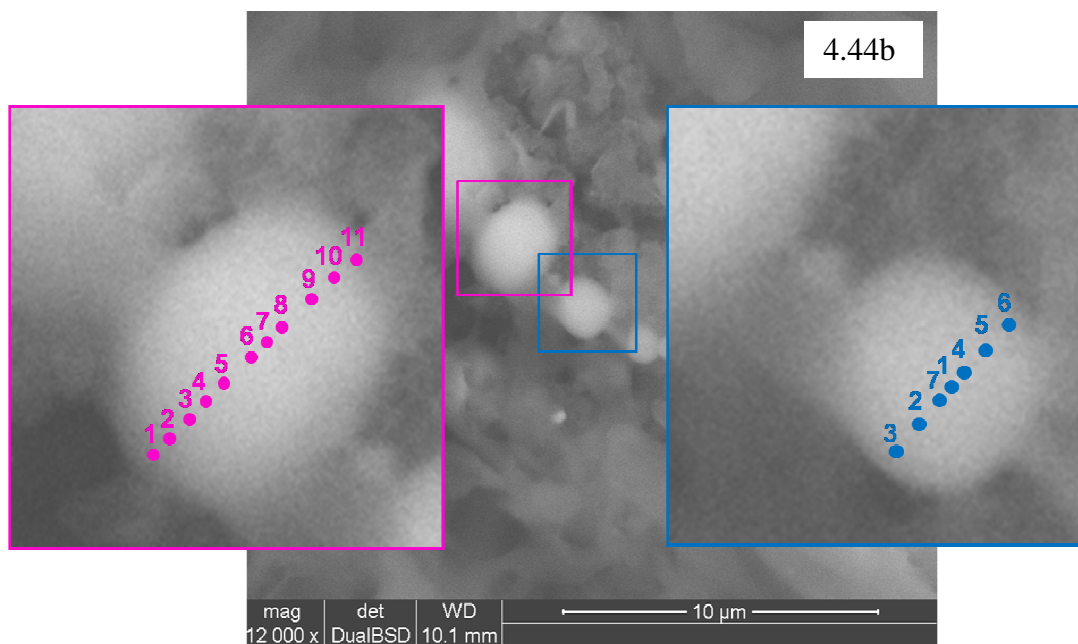


Figura 4.44: (a) Immagine SEM di un corpuscolo osservato tramite rilevatore di elettroni retrodiffusi in una sezione istologica su supporto in polipropilene. (b) Analisi a transetto eseguite sulle aree del corpuscolo.



Sulle diverse sezioni costituenti il corpuscolo di figura 4.44, si è proceduto quindi ad effettuare le analisi a transetto trasversale, con acquisizioni più ravvicinate nella zona dove presumibilmente è posizionata la fibra, come eseguito sui corpuscoli riscontrati nelle sezioni istologiche su carbon disc.

Le acquisizioni, anche in questo caso, sono state suddivise in due gruppi: in uno sono accomunate tutte le analisi eseguite dove si presume sia localizzata la fibra, mentre il secondo gruppo racchiude le analisi effettuate nella parte periferica del corpuscolo. In

questo modo, sottraendo la media delle analisi periferiche a quelle centrali, si ricava il valore qualitativo degli elementi che compongono la fibra. Questa operazione è molto importante soprattutto per distinguere la quantità di ferro appartenente alla fibra da quella che invece è propria del rivestimento ferro-proteico.

Nelle figure 4.45 vengono riportati spettri EDS ottenuti su diversi punti di analisi dei transetti.

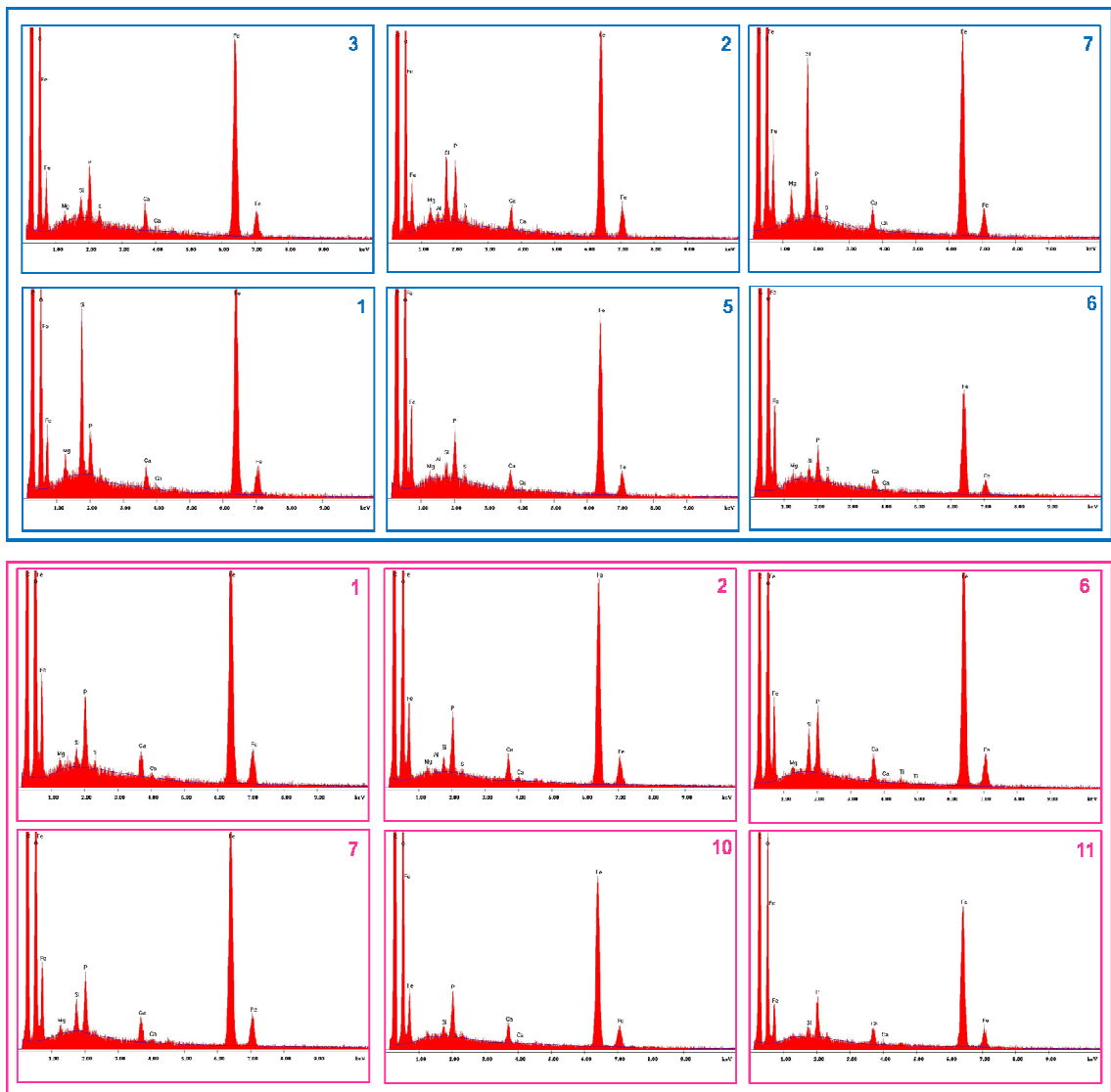


Figura 4.45: Spettri EDS del transetto 1 (in blu) e del transetto 2 (in fucsia).

Di seguito, verranno riportate le analisi dei due transetti effettuati sui diversi segmenti del corpuscolo riportato in figura 4.44a e 4.44b: ogni tabella sarà riquadrata secondo i colori riportati nella figura 4.44b per facilitare la comprensione dei dati.

	% atomica						
ANALISI CENTRALI	Si	Al	Mg	Fe	Ca	P	S
Corpuscolo1_Transetto1_An01	0,58	0,00	0,12	1,62	0,07	0,16	0,00
Corpuscolo1_Transetto1_An02	0,24	0,03	0,09	1,63	0,09	0,20	0,04
Corpuscolo1_Transetto1_An07	0,59	0,00	0,21	1,43	0,07	0,13	0,01
Corpuscolo1_Transetto1_media CENTRALI	0,47	0,01	0,14	1,56	0,08	0,16	0,02
Corpuscolo1_Transetto1_An03	0,09	0,00	0,06	1,53	0,10	0,18	0,03
Corpuscolo1_Transetto1_An04	0,10	0,02	0,06	1,53	0,09	0,19	0,03
Corpuscolo1_Transetto1_An05	0,05	0,02	0,04	1,30	0,08	0,17	0,02
Corpuscolo1_Transetto1_An06	0,05	0,00	0,04	0,84	0,06	0,12	0,03
Corpuscolo1_Transetto1_media PERIFERICHE	0,07	0,01	0,05	1,30	0,08	0,16	0,03
Differenza CENTRALI-PERIFERICHE	0,40	0,00	0,09	0,26	0,00	0,00	/

	% atomica						
ANALISI CENTRALI	Si	Al	Mg	Fe	Ca	P	S
Corpuscolo1_Transetto2_An06	0,20	0,00	0,09	2,28	0,12	0,32	0,00
Corpuscolo1_Transetto2_An07	0,20	0,00	0,05	2,26	0,13	0,30	0,00
Corpuscolo1_Transetto2_An08	0,17	0,00	0,07	2,20	0,12	0,29	0,00
Corpuscolo1_Transetto2_media CENTRALI	0,19	0,00	0,07	2,25	0,12	0,30	0,00
Corpuscolo1_Transetto2_An01	0,06	0,00	0,00	1,89	0,11	0,25	0,00
Corpuscolo1_Transetto2_An02	0,07	0,00	0,07	1,79	0,09	0,24	0,03
Corpuscolo1_Transetto2_An03	0,08	0,00	0,06	2,06	0,11	0,28	0,00
Corpuscolo1_Transetto2_An04	0,11	0,02	0,07	2,12	0,12	0,28	0,00
Corpuscolo1_Transetto2_An05	0,16	0,00	0,09	2,25	0,13	0,32	0,03
Corpuscolo1_Transetto2_An09	0,13	0,02	0,06	2,18	0,12	0,28	0,04
Corpuscolo1_Transetto2_An10	0,07	0,02	0,06	1,95	0,12	0,28	0,02
Corpuscolo1_Transetto2_An11	0,06	0,00	0,00	1,70	0,11	0,23	0,00
Corpuscolo1_Transetto2_media PERIFERICHE	0,09	0,01	0,05	1,99	0,11	0,27	0,02
Differenza CENTRALI-PERIFERICHE	0,10	/	0,02	0,26	0,01	0,03	/

Tabella 4.17: Composizione chimica qualitativa, in percentuale atomica, ottenuta sul corpuscolo di figura 4.44a e b.

In base ai risultati ottenuti nei vari transetti, sia nelle analisi centrali che in quelle periferiche sono stati rilevati gli stessi elementi chimici.

Calcio, fosforo e zolfo, che non mostrano variazioni nelle diverse analisi effettuate, possono essere ascrivibili al rivestimento ferro-proteico.

Per quanto riguarda il ferro, le analisi chimiche EDS a transetto hanno permesso di valutarne il quantitativo attribuibile al rivestimento ferro-proteico e quello relativo alla fase fibrosa. Questo valore si ottiene sottraendo la media delle analisi periferiche alla media delle analisi centrali. In tutti i transetti si ottiene un risultato positivo attribuibile alla fase fibrosa.

In tutti i transetti analizzati risulta evidente un aumento dell'intensità dei picchi associati a Si e Mg nelle analisi acquisite nella zona del corpuscolo in cui l'analisi morfologica permetteva di intravedere la fibra.

La analisi effettuate indicano quindi che la fase silicatica contenuta all'interno del corpuscolo ferruginoso contiene una quantità maggiore di ferro rispetto al magnesio e, sempre considerando l'errore dovuto ad una possibile sovrastima del ferro a causa delle

condizioni analitiche, si può quindi associare la fibra alla fase di asbesto amosite.

Un altro corpuscolo analizzato è stato descritto in una recente pubblicazione (Croce *et al.*, 2013, cfr. la sezione allegati).

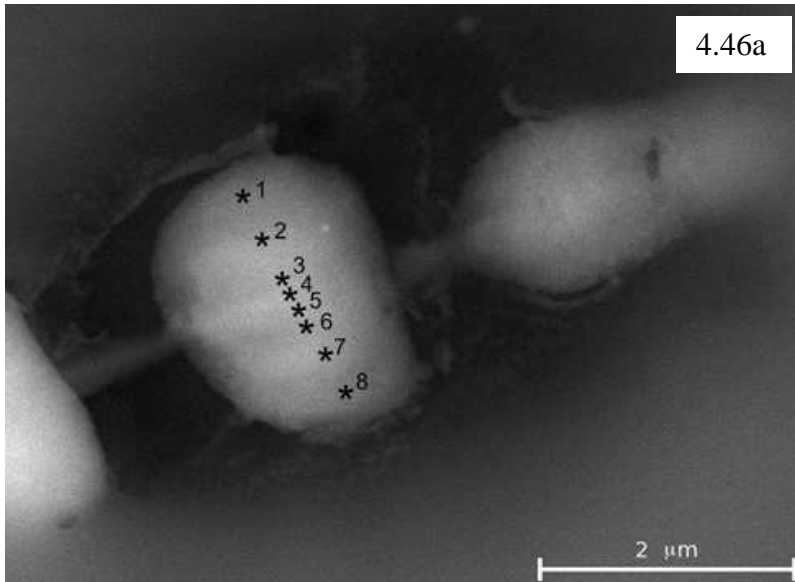
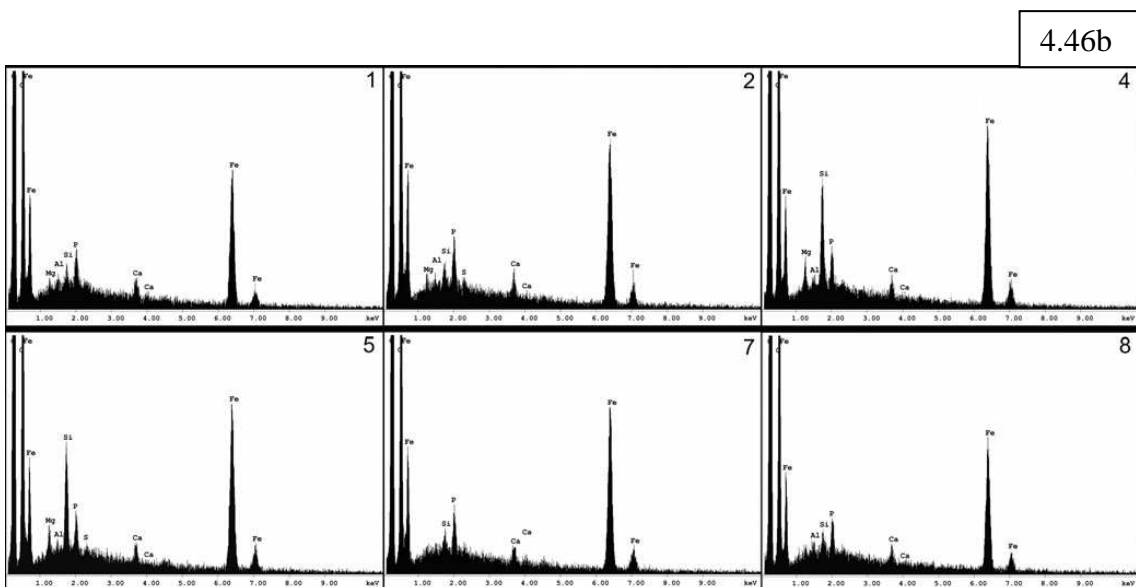


Figura 4.46: (a) Transetto eseguito sul corpuscolo; (b) spettri EDS ottenuti nel transetto riportato in figura 4.44a (da Croce *et al.*, 2013).



In tabella 4.18 vengono riportati i valori numerici, in percentuale atomica, ottenuti dall'analisi a transetto sulla parte di corpuscolo riportata in figura 4.46a.

	% atomica						
	Si	Al	Mg	Fe	Ca	S	P
Analisi1	0,06	0,02	0,06	0,82	0,05	0,03	0,12
Analisi2	0,08	0,04	0,06	0,79	0,06	0,01	0,11
Analisi3	0,16	0,00	0,10	0,75	0,05	0,00	0,10
Analisi4	0,20	0,00	0,10	0,76	0,05	0,02	0,09
Analisi5	0,20	0,00	0,09	0,68	0,05	0,02	0,08
Analisi6	0,19	0,03	0,10	0,83	0,06	0,03	0,10
Analisi7	0,06	0,03	0,06	0,54	0,05	0,00	0,08
Analisi8	0,05	0,04	0,00	0,77	0,05	0,00	0,10
MEDIA CORE	0,19	0,01	0,10	0,76	0,05	0,02	0,09
MEDIA COPERTURA	0,06	0,03	0,05	0,73	0,05	0,01	0,10
DIFFERENZA MEDIE CORE-COPERTURA	0,13	/	0,05	0,03	/	0,01	/

Tabella 4.18: Composizione chimica qualitativa, in percentuale atomica, ottenuta dall'analisi a transetto riportata in figura 4.46a.

Di seguito viene riportata inoltre un'immagine, figura 4.47, in cui sono stati sovrapposti uno spettro EDS ottenuto su un'area in cui è localizzata la fibra (lo spettro 4 in figura 4.46b) ed uno relativo alla copertura ferro-proteica (lo spettro 8 in figura 4.46b).

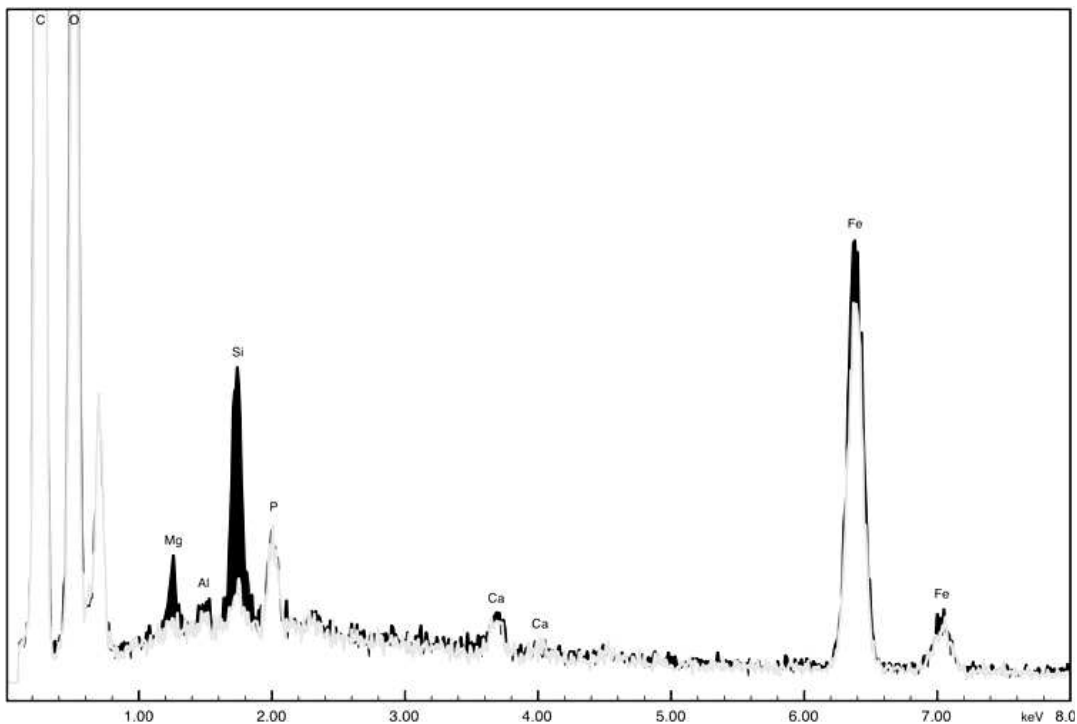


Figura 4.47: Sovrapposizione dello spettro EDS ottenuto nel punto 4 (in nero) e nel punto 8 (in grigio): l'area in nero sono attribuibili alla fibra del core (da Croce *et al.*, 2013).

Dai dati ottenuti dalla sottrazione dei valori chimici medi relativi all'area costituita dal solo corpuscolo da quelli dell'area in cui è localizzata la fibra (tabella 4.18), si osserva

che il silicio è l'elemento predominante, seguito dal magnesio e quindi dal ferro. Il dato viene confermato dalla sovrapposizione degli spettri EDS, riportata in figura 4.47, ottenuti nel punto 4 e nel punto 8 del transetto di figura 4.46a.

Gli elementi, in queste proporzioni, indicano che la fibra all'interno è antofillite d'amianto.

I dati presentati in questa sezione sono una parte dei dati ottenuti sulle sezioni istologiche di polmoni derivanti da pazienti affetti da mesotelioma maligno causato da esposizione all'asbesto, che ben rappresentano ciò che è stato ottenuto con l'applicazione del VP-SEM/EDS all'analisi dei corpuscoli ferruginosi.

È stato dimostrato, in questo modo, come la tecnica VP-SEM/EDS permetta l'identificazione delle fasi di asbesto direttamente nelle sezioni istologiche, anche qualora siano inglobate in rivestimento ferro-proteico.

Oltre che per i fini di studio, questa metodologia potrebbe risultare un valido supporto nelle questioni medico-legali, in quanto i tempi di analisi risultano relativamente brevi ed i campioni analizzati possono essere riutilizzati per analisi successive o controperizie anche per mezzo di altri strumenti.

Inoltre, le potenzialità delle sezioni in polipropilene possono, in futuro essere applicate anche per l'analisi di altre fasi minerali (come l'erionite trattata nella sezione precedente) oppure per fasi di asbesto che possono avere interessato organi differenti da quelli dell'apparato respiratorio (ad esempio, del tratto gastro-intestinale o dell'apparato urinario). Le sezioni in materiale plastico, infatti, non presentano alcun problema anche nell'analisi di particelle molto piccole (anche inferiori a 1 μm) e l'unico limite è rappresentato dal limite strumentale del VP-SEM/EDS.

La metodologia presentata è stata oggetto di una recente pubblicazione sulla rivista internazionale *Microscopy and Microanalysis*: A. CROCE, M. MUSA, M. ALLEGRINA, P. TRIVERO, C. RINAUDO, (2013) Environmental scanning electron microscopy technique to identify asbestos phases inside ferruginous bodies, *Microscopy and Microanalysis*, Vol. 19, pp. 420-424.

4.5 – Crocidolite in tessuti derivanti da milza e pancreas di topo

A seguito del lavoro della Dott.ssa Musa Maya sulla fase crocidolite sia pre-inoculo che in sezioni sottili di topi trattati secondo la metodologia descritta nella sezione 3.5.2 presso la *University of Hawai'i Cancer Center* di Honolulu (HI), le fibre, sia naturali che in sezioni di milza e pancreas, sono state sottoposte ad analisi in diffrazione a raggi X in luce di sincrotrone.

Preventivamente la fase naturale e le stesse sezioni erano state analizzate in spettroscopia micro-Raman.

A partire da questi dati, bisogna sottolineare che lo spettro Raman riportato in Fig. 4.48 è stato ottenuto mediando spettri ottenuti su cinque fibre della fase pre-inoculo, mantenendo la stessa orientazione delle fibre rispetto alla polarizzazione del fascio laser, a 135°.

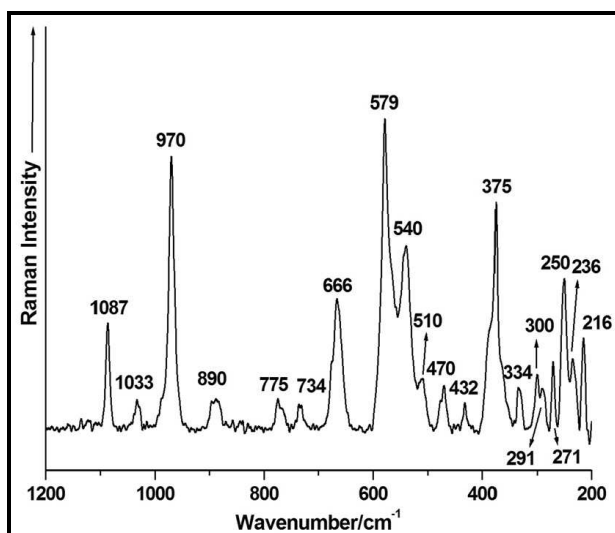


Figura 4.48: Spettro Raman di fibre di crocidolite pre-inoculo. Lo spettro è ottenuto mediando gli spettri Raman ottenuti su differenti fibre, mantenendo la stessa orientazione e quindi calcolando il valore medio per ogni banda.

L'interpretazione delle bande Raman e l'attribuzione ai diversi modi vibrazionali delle diverse bande osservate nello spettro della crocidolite è riportato in Rinaudo *et al.*, 2004.

Per lo studio delle fibre nei tessuti di topo, la microscopia ottica ha permesso di localizzare fibre e corpuscoli dell'asbesto soprattutto nei tessuti peritoneali all'intorno degli organi in cui erano state osservate asciti.

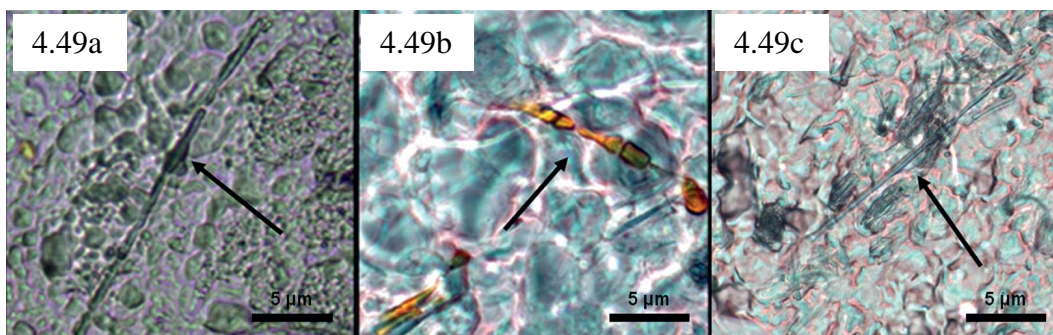


Figura 4.49: (a) Immagine in microscopia ottica di una fibra di crocidolite, in cui la freccia indica un primo step di formazione del rivestimento ferro-proteico; (b) caratteristica morfologia di un corpuscolo dell'asbesto, in uno stadio avanzato di copertura proteica; (c) fibre di crocidolite, libere dalla copertura ferro-proteica (indicate dalla freccia), scelte per le successive analisi in spettroscopia micro-Raman.

Come si può osservare nelle figure 4.49a, 4.49b e 4.49c i fasci di fibre otticamente si presentano con diversi gradi di copertura ferro-proteica, tipica dei “corpuscoli dell'asbesto”. In questo studio la caratterizzazione in spettroscopia micro-Raman si è concentrata sulle fibre che risultavano, all'analisi ottica, libere da rivestimento proteico (come quella riportata in figura 4.49c). Questa scelta è legata al fatto che, come dimostrato da Rinaudo *et al.*, (2010b) la copertura ferro-proteica tende, sotto l'azione del fascio laser, a cristallizzare formando ematite, rendendo più complicata l'osservazione delle bande Raman caratteristiche delle fasi minerali definite asbesti.

Nel caso dei topi, molti fasci di fibre si presentavano liberi o solo parzialmente coperti da materiale ferro-proteico.

Per escludere variazioni di intensità e posizione delle bande legate a fenomeni di orientazione, i fasci di fibre sono stati analizzati mantenendo la stessa orientazione utilizzata nei campioni pre-inoculo e mediando i dati ottenuti su diverse fibre.

Lo spettro Raman medio acquisito su fibre incorporate in tessuti di milza è riportato in figura 4.50.

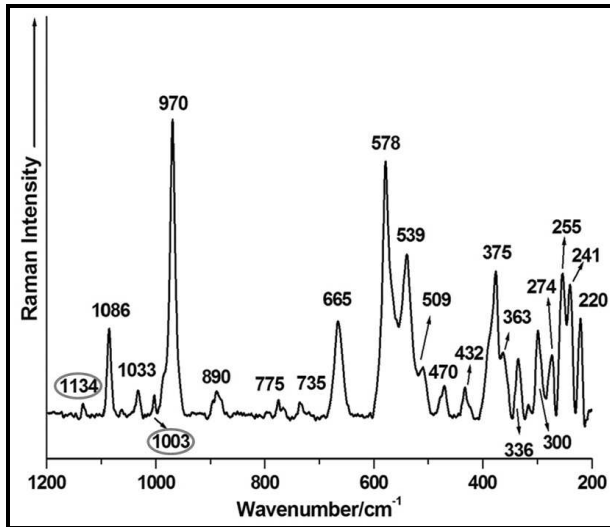


Figura 4.50: Spettro Raman di fibre di crocidolite in sezione istologica di milza. Lo spettro è ottenuto mediando spettri Raman ottenuti su diverse fibre, mantenendo la stessa orientazione e quindi calcolando il valore medio per ogni banda. Le bande cerchiato sono prodotte dalla paraffina con cui la sezione istologica è trattata.

La stessa metodologia è stata applicata ai dati ottenuti sui fasci di fibre in sezioni istologiche dei tessuti di pancreas, figura 4.51.

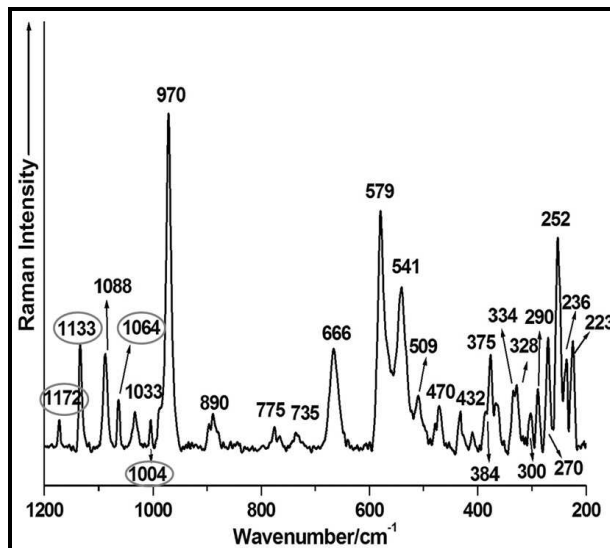


Figura 4.51: Spettro Raman di fibre di crocidolite in sezione istologica di pancreas. Lo spettro è ottenuto mediando gli spettri Raman ottenuti su diverse fibre, mantenendo la stessa orientazione e quindi calcolando il valore medio per ogni banda. Le bande cerchiato sono prodotte dalla paraffina con cui la sezione istologica è trattata.

Ponendo a confronto gli spettri Raman di figure 4.48, 4.50 e 4.51 è possibile osservare differenze negli spettri Raman ottenuti sui fasci di fibre di crocidolite, osservate a livello pancreatico o della milza, rispetto alla fase pre-inoculo.

Paragonando lo spettro Raman di figura 4.50, ottenuto da fibre in tessuti di milza, con lo spettro della fase pre-inoculo, figura 4.48, è possibile evidenziare che:

- la banda a circa 580 cm^{-1} risulta di intensità minore rispetto alla stessa banda osservata nella crocidolite di partenza, dove la stessa banda ha intensità maggiore rispetto alla banda a 970 cm^{-1} ;
- la banda a circa 375 cm^{-1} appare chiaramente costituita da due componenti,

rispettivamente a 375 e 363 cm^{-1} ;

- la regione spettrale tra i 250 ed i 230 cm^{-1} mostra bande con *shift* vibrazionali di 4-5 cm^{-1} .

Le fibre incorporate nei tessuti pancreatici si presentavano più sparse nel tessuto peritoneale e più raramente spettri sono stati registrati con bande intense e ben definite. Tuttavia, è stato possibile registrare anche buoni spettri da cui è stato possibile ricavare lo spettro medio riportato in figura 4.51. Anche in questo caso, è stato possibile mettere in evidenza alcune differenze rispetto alla fase minerale di partenza (confrontare la figura 4.51 con la figura 4.48):

- nelle bande nel *range* spettrale 400 e 200 cm^{-1} si è osservata una riduzione delle intensità relative;
- a circa 375 cm^{-1} la banda mostra tre componenti a 375, 384 e 365 cm^{-1} ;
- la banda a 335 cm^{-1} appare splittata in due componenti a 334 e 328 cm^{-1} .

Tutte queste osservazioni supportano l'ipotesi di una degradazione o modificazione della struttura cristallina della crocidolite, a contatto con i tessuti, che va ad interessare principalmente i poliedri a coordinazione cubica od ottaedrica.

Gli stessi campioni sono stati successivamente caratterizzati per mezzo della diffrazione a raggi X in luce di sincrotrone presso lo *European Synchrotron Radiation Facility* (E.S.R.F.) di Grenoble, con l'obiettivo di evidenziare modificazioni a livello strutturale nei fasci fibrosi. Il raffinamento dei dati ottenuti sulla crocidolite pre-inoculo, a cui sono stati opportunamente rimossi i picchi derivanti dal portacampione, è riportato in figura 4.52.

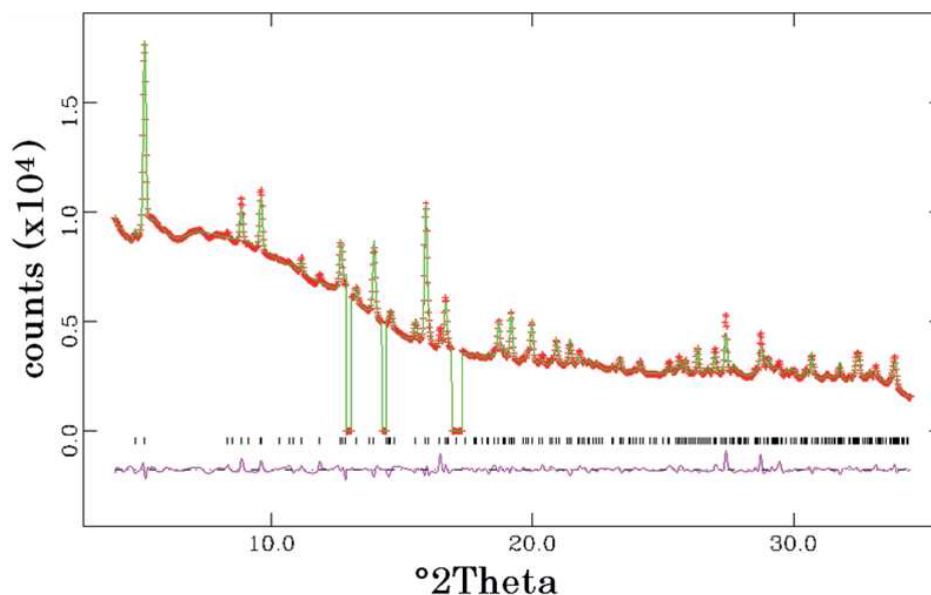


Figura 4.52: Output grafico dal raffinamento della crocidolite pre-inoculo (da Gualtieri *et al.*, 2013).

A partire da questo dato, è stato possibile calcolare i parametri di struttura riportati in tabella 4.19.

Sito	x/a	y/b	z/c	Catione	Occupanza	$U_{iso}(\text{Å}^2)^{**}$
T1	0,2945(13)	0,0852(7)	0,3051(25)	Si	1,0	0,02245
T2	0,2731(14)	0,1704(7)	0,7946(29)	Si	1,0	0,02245
O1	0,1269(18)	0,0945(16)	0,232(6)	O	1,0	0,1695
O2	0,1047(19)	0,1764(14)	0,731(6)	O	1,0	0,1695
O-H3	0,106(4)	0,0	0,701(9)	O	1,0	0,1695
O4	0,3426(28)	0,2505(10)	0,788(6)	O	1,0	0,1695
O5	0,3455(27)	0,1336(12)	0,079(4)	O	1,0	0,1695
O6	0,3562(27)	0,1239(11)	0,597(4)	O	1,0	0,1695
O7	0,2636(31)	0,0	0,410(6)	O	1,0	0,1695
M1	0,0	0,0921(10)	0,5	Mg	0,125*	0,01109
M1	0,0	0,0921(10)	0,5	Fe ²⁺	0,59(2)	0,01109
M2	0,0	0,1814(6)	0,0	Fe ³⁺	1,0	0,01109
M3	0,0	0,0	0,0	Fe ²⁺	1,0	0,01109
M4	0,0	0,2808(15)	0,5	Na	0,83(4)	0,01967
Am	-0,013(11)	0,5	0,155(23)	Na+Ca	0,182(26)	0,01967

Tabella 4.19: Parametri di struttura calcolati dal raffinamento Rietveld della crocidolite pre-inoculo. (* = popolazione fissata al valore dall'analisi chimica; ** = è stato affinato un parametro globale per ciascuna specie chimica).

A partire dal raffinamento è stata calcolata la composizione chimica della crocidolite pre-inoculo: $(\text{Na,Ca})_{0.37}\text{Na}_{1.66}(\text{Mg}_{0.50}\text{Fe}^{2+}_{2.36}\text{Fe}^{3+}_2)\text{Si}_8\text{O}_{22}(\text{OH})_2$. Rispetto alla composizione chimica riportata da Kohyama *et al.* (1996) è osservata una piccola sovrastima di Na+Ca: in questo caso risulta essere 2.03, mentre nel lavoro citato è 1.77.

Di seguito si riportano le distanze interatomiche:

T1-O1 = 1.591(14)	M2-O1 = 2.186(27)	M4-O2 = 2.341(29)
T1-O5 = 1.652(13)	M2-O1 = 2.186(27)	M4-O2 = 2.341(29)
T1-O6 = 1.677(14)	M2-O2 = 1.941(27)	M4-O4 = 2.466(34)
T1-O7 = 1.681(12)	M2-O2 = 1.941(27)	M4-O4 = 2.466(34)
	M2-O4 = 2.074(23)	M4-O5 = 2.840(30)
T2-O2 = 1.594(13)	M2-O4 = 2.074(23)	M4-O5 = 2.840(30)
T2-O4 = 1.595(13)		M4-O6 = 2.343(31)
T2-O5 = 1.648(14)	M3-O1 = 2.284(26)	M4-O6 = 2.343(31)
T2-O6 = 1.689(13)	M3-O1 = 2.284(26)	
	M3-O1 = 2.284(26)	Am-O5 = 2.75(5)
M1-O1 = 2.090(27)	M3-O1 = 2.284(26)	Am-O5 = 2.75(5)
M1-O1 = 2.090(27)	M3-O-H3 = 2.09(4)	Am-O6 = 2.92(9)
M1-O2 = 2.062(27)	M3-O-H3 = 2.09(4)	Am-O6 = 2.92(9)
M1-O2 = 2.062(27)		Am-O7 = 2.958(23)
M1-O-H3 = 2.107(24)		Am-O7 = 3.06(14)
M1-O-H3 = 2.107(24)		Am-Am = 1.31(17)

Le distanze interatomiche calcolate sono molto simili rispetto a quelle riportate da Hawthorne (1978) per la fluoro-riebeckite, l'unica differenza riguarda la distanza media M3-O che in questo caso è 2.217 Å, mentre nella fluoro-riebeckite la stessa distanza è di 2.113 Å. La distanza M-O media minore riscontrata per il sito M2 (2.068 Å nel campione esaminato, mentre per la fluoro-riebeckite è di 2.027 Å), può confermare l'occupazione di Fe³⁺ in quel sito.

Nella tabella 4.20 vengono riportati i dati relativi al contenuto cationico nella crocidolite pre-inoculo ed in quella osservata nei tessuti di milza e di pancreas.

Sito	x/a	y/b	z/c	Catione	Occupanza crocidolite pre-inoculo	Occupanza crocidolite in milza	Occupanza crocidolite in pancreas	U _{iso} (Å ²)**
M1	0,0	0,0921(10)	0,5	Mg	0,125*	0,125*	0,125*	0,01109
M1	0,0	0,0921(10)	0,5	Fe ²⁺	0,59(1)	0,84(6)	0,77(3)	0,01109
M2	0,0	0,1814(6)	0,0	Fe ³⁺	1,0	0,82(11)	0,92(6)	0,01109
M3	0,0	0,0	0,0	Fe ²⁺	1,0	1,0	1,0	0,01109
M4	0,0	0,2808(15)	0,5	Na	0,83(4)	0,92(8)	0,94(8)	0,01967
Am	-0,013(11)	0,5	0,155(23)	Na+Ca	0,182(26)	0,10(5)	0,09(5)	0,01967

Tabella 4.20: Distribuzione cationica nei siti in crocidolite pre-inoculo, in milza ed in pancreas. (* = popolazione fissata al valore dall'analisi chimica; ** = è stato affinato un parametro globale per ciascuna specie chimica).

Sebbene non sia possibile proporre un modello micro-strutturale, per ottenere il quale sarebbe necessario uno studio tramite microscopia elettronica a trasmissione, si può ottenere un'evidenza indiretta della riduzione della cristallinità delle fibre dai valori calcolati in tabella 4.20. Osservando i dati di raffinamento strutturale operato con il metodo Rietveld sui dati registrati presso lo *European Synchrotron Radiation Facility*, si è osservata una maggiore occupanza del sito M1 da parte del ferro rispetto ai valori registrati sulle fibre pre-inoculo e si è potuto proporre una migrazione del ferro dal sito cristallografico M2 al sito M1 e di sodio dal sito Am al sito M4.

Sulla base di questi dati non è però possibile stabilire se il ferro che migra in M1 sia Fe³⁺ oppure Fe²⁺ a causa della qualità del segnale rilevata.

Riassumendo schematicamente le ipotesi fin qui avanzate, si può perciò proporre il modello di migrazione cationica che ha luogo nella crocidolite a contatto con i tessuti secondo lo schema riportato in figura 4.53.

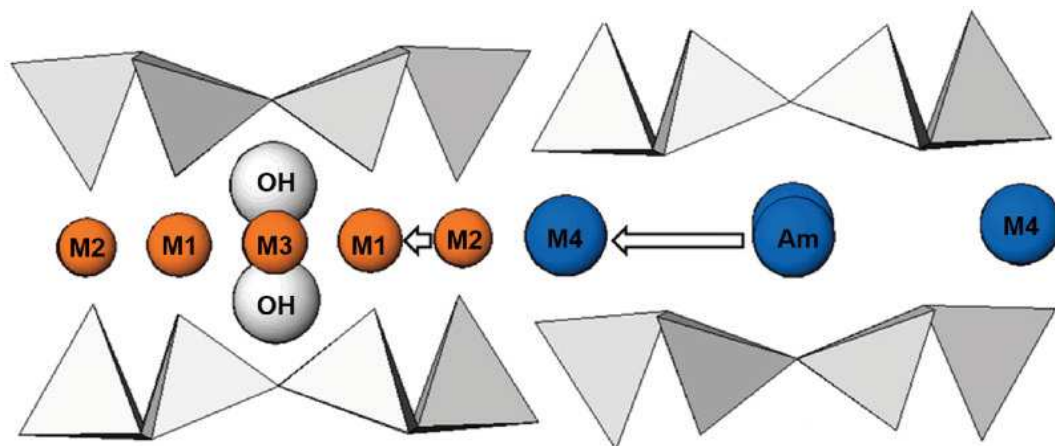


Figura 4.53: Modifiche strutturali in milza e pancreas evidenziate dagli spettri a raggi X (metodo Rietveld) ottenuti in luce di sincrotrone.

Correlando i dati spettroscopici con quelli diffrattometrici, è stato così possibile confermare una modificazione parziale della struttura delle fibre di crocidolite a contatto con la matrice biologica. I risultati ottenuti durante questo studio sono in accordo con il lavoro di Pascolo *et al.*, (2013), che ipotizzano una mobilitazione dei cationi componenti le fibre di asbesto – principalmente il ferro - durante l'interazione tra fibre e tessuti biologici.

I dati presentati sono stati oggetto di una recente pubblicazione sulla rivista internazionale *Periodico di Mineralogia*: A.F. GUALTIERI, C. GIACOBBE, C. RINAUDO, A. CROCE, M. ALLEGRINA, G. GAUDINO, H. YANG, M. CARBONE, (2013) Preliminary results of the spectroscopic and structural characterization of mesothelioma inducing crocidolite fibers injected in mice, *Periodico di Mineralogia*, Vol. 82 n.2, pp.299-312.

5 – Conclusioni

La metodologia di analisi combinata della spettroscopia micro-Raman e del VP-SEM/EDS su campioni di erionite di diversa provenienza ha permesso di risolvere alcune delle problematiche analitiche che spesso si presentano nello studio di questa fase minerale, come già indicato nella sezione 2.2 del presente lavoro.

Infatti, nella fase di analisi preliminare è stato possibile:

- identificare, con estrema sicurezza, la fase minerale "erionite";
- distinguerla inequivocabilmente, sulla base della risposta in spettroscopia micro-Raman, dall'offretite e valutare la purezza dell'erionite, nei limiti della tecnica applicata, iniettata nei topi;
- sulla base della composizione chimica qualitativa, in correlazione con la risposta Raman, distinguere erioniti delle due provenienze sottoposte ad analisi.

Applicando le stesse tecniche alle fibre nei tessuti di topi trattati è stato dimostrato come sia possibile osservare alcune differenze rispetto alle fibre pre-iniezione. In particolare, sono state osservate:

- differenze nelle risposte Raman, che lasciano supporre una disgregazione della struttura cristallina soprattutto a livello delle gabbie zeolitiche;
- differenze a livello chimico qualitativo nei diversi tipi di tessuto analizzati, che spiegherebbero le differenti risposte Raman osservate.

Inoltre, si è evidenziata una differente risposta dell'organismo, in quanto nelle sezioni istologiche di topo analizzate, in cui sono state iniettate le fibre di erionite pure, non sono stati evidenziati corpuscoli ferruginosi, tipici degli asbesti.

L'applicazione dell'analisi combinata in spettroscopia micro-Raman e VP-SEM/EDS ha permesso inoltre di riconoscere l'erionite all'interno di sezioni istologiche umane, provenienti da pazienti turchi affetti da mesotelioma pleurico.

In questi campioni, inoltre, l'applicazione della stessa metodologia ha consentito di distinguere questa fase dalle altre presenti (dati non presentati in questo lavoro) e di escludere la presenza di copertura ferro-proteica all'intorno delle fibre identificate come erionite.

Sviluppo futuro, sia per quanto riguarda i campioni derivanti da topi che da soggetti umani, sarà l'applicazione della stessa metodologia descritta in questo lavoro su sezioni

in plastica, per approfondire lo studio del chimismo delle fibre senza alcuna interferenza da parte degli elementi costituenti il vetrino di supporto (silicio *in primis*) e la successiva analisi in diffrazione a raggi X in luce di sincrotrone.

Questa preparazione di campione, infatti, è stata ampiamente applicata soprattutto nell'ultimo anno del dottorato di ricerca, in quanto solitamente le sezioni istologiche vengono preparate su vetro per l'analisi anatomopatologica di routine. Il bisogno di effettuare analisi, che permettessero la distinzione degli elementi chimici all'interno dei corpuscoli ferruginosi per riconoscere le fasi di asbesto presenti all'interno, ha indotto a sviluppare questa procedura alternativa di preparazione delle sezioni istologiche di pazienti italiani, in cui il fine era la distinzione delle diverse fasi di asbesto.

Dai dati ottenuti tramite spettroscopia micro-Raman e diffrazione a raggi X in luce di sincrotrone su fibre di crocidolite non rivestite da materiale ferro-proteico in tessuti di topo sono state evidenziate differenze che portano ad ipotizzare una parziale modifica della struttura cristallina a contatto con il *medium* biologico. La migrazione di elementi ipotizzata sulla base delle analisi diffrattometriche potrebbe essere correlabile con il deposito di componenti contenenti ferro o il rilascio di ferro dalla fibra, dovuto a possibili processi degradativi ipotizzati nello studio di Pascolo *et al.*, 2013.

Un'ulteriore conferma dei risultati esposti dovrà essere ottenuta tramite l'applicazione della diffrazione a raggi X in luce di sincrotrone con fascio di dimensioni inferiori rispetto a quello utilizzato negli esperimenti descritti: in tal modo sarà possibile acquisire spettri da fibre singole e poter meglio valutare differenze rispetto alle fibre naturali.

Il quadro generale delineato dai risultati ottenuti nel presente lavoro, lascia supporre che le fibre reagiscano a contatto con i tessuti biologici, che indurrebbero modificazioni cristallo-chimiche.

L'applicazione combinata delle tecniche di spettroscopia micro-Raman e di microscopia elettronica a scansione con annessa microsonda in dispersione di energia in pressione variabile, pur lavorando in entrambi i casi al limite strumentale, ha permesso finora di osservare diverse tipologie di interazione e risposta delle fibre. I dati esposti potranno essere implementati dall'applicazione della diffrazione a raggi X in luce di sincrotrone oppure dalla microscopia elettronica a trasmissione sulle stesse tipologie di campioni.

In questo lavoro, che ha rappresentato una continuazione di quanto descritto nelle tesi di dottorato in scienze ambientali (acque interne ed agroecosistemi) del Dott. Allegrina Mario (XXIII ciclo) della Dott.ssa Musa Maya (XXIV ciclo) si è ulteriormente provato come la metodologia di analisi combinata Raman e VP-SEM/EDS permetta di identificare correttamente le fibre all'interno delle sezioni istologiche, anche nel caso di fasi minerali di difficile identificazione quale l'erionite, e di osservarne le modificazioni a livello chimico.

I dati descritti nella presente tesi di dottorato di ricerca sono stati oggetto di presentazioni a congressi e di pubblicazioni su riviste scientifiche internazionali (Croce *et al.*, 2013a; Croce *et al.*, 2013b; Gualtieri *et al.*, 2013).

Lo sviluppo ulteriore delle metodologie di analisi combinate potrà, in futuro, fornire informazioni che potrebbero contribuire alla comprensione dei meccanismi carcinogenici delle fibre minerali e dare un contributo alla soluzione di questioni irrisolte, quali:

- la possibilità che le fibre di asbesto possano provocare mesotelioma anche a livello di altri apparati nell'uomo (quale, ad esempio, l'apparato digerente nel tratto gastro-intestinale);
- somiglianze/differenze delle reazioni che le fibre instaurano con l'ambiente cellulare, per poter correlare queste alle cause scatenanti lo sviluppo delle malattie asbesto-correlate.

Durante gli anni del dottorato di ricerca, inoltre, si è dimostrata la potenzialità della spettroscopia micro-Raman applicata a svariate tipologie di campioni, di interesse:

- ambientale, quali cementi-amianto termotrasformati (vedere la sezione allegati, Viani *et al.*, 2013), sezioni sottili di rocce serpentinitiche del monte Reventino, Calabria (sezione allegati, Bloise *et al.*, 2014), fasi naturali di asbesto (PRIN 2011); inoltre, in collaborazione con l'Università degli studi La Sapienza di Roma è stato possibile analizzare apatiti, pure e modificate da arsenico dopo interazione con liquidi metasomatici (dati di prossima pubblicazione), derivanti dalle lave del monte Calvario (Sicilia);
- gemmologico, quali diamanti modificati a seguito di trattamento in rodio (i cui risultati sono stati oggetto di presentazione a congresso, CIGES 2012);

- artistico, quali pigmenti derivanti da affreschi del complesso cluniacense di Castelletto Cervo (in collaborazione con il Dipartimento di Lettere dell'Università degli Studi del Piemonte Orientale);
- sanitario, quali calcoli renali di differente composizione minerale (in collaborazione con l'IMAA-CNR).

Il VP-SEM/EDS è stato applicato, inoltre, per ottenere la distribuzione dimensionale delle fibre di crocidolite e di crisotilo iniettate in topi: i dati relativi a questo studio, oggetto della collaborazione con la *University of Hawai'i Cancer Center* di Honolulu, HI, sono stati pubblicati nella recente pubblicazione: Qi *et al.*, 2013 (vedere la sezione allegati). La stessa tecnica, infine, è stata utilizzata anche per analizzare il diametro geometrico medio ponderato rispetto alla lunghezza e la distribuzione dimensionale di fibre sostitutive dell'amianto.

BIBLIOGRAFIA

- P. Acquafredda & S. Fiore, “Analisi di materiali argillosi per diffrazione di raggi X e microscopia elettronica a scansione. Teoria ed Applicazioni”, *Argille e Minerali delle Argille*, vol. V, p. 143 (2005).
- M. Allegrina, “Caratterizzazione di fibre e particelle inorganiche, in ambiente biologico e particolato atmosferico, con tecnica ESEM e μ -Raman”, tesi di Dottorato di Ricerca in Scienze Ambientali (acque interne e agroecosistemi) – XXIII ciclo.
- A. Armigliato & U. Valdrè, *Microscopia elettronica a scansione e microanalisi*. Lo Scarabeo, Bologna, Vol. 1 e 2, (1980).
- K.J. Arul & P.F. Holt, *Brit. J. Ind. Med.* **37**, 273 (1980).
- P. Ballirano, G.B. Andreozzi, M. Dogan e A.U. Dogan, *Am. Mineral.* **94**, 1262 (2009).
- Y.I. Baris, M. Artvinli e A.A. Sahin, *Ann. NY Acad. Sci.* **330**, 423 (1979).
- Y.I. Baris, A.A. Sahin, M. Ozesmi, I. Kerse, E. Ozen, B. Kolacan, M. Altinors e A. Goktepli, *Thorax* **33**, 181 (1978).
- Y.I. Baris, L. Simonato, M. Artvinli, F. Pooley, R. Saracci, J. Skidmore e C. Wagner, *Int. J. Cancer* **39**, 10 (1987).
- J.E. Below, N.J. Cox, N.K. Fukagawa, A. Hirvonen e J.R. Testa, *J. Toxicol. Env. Heal. B* **14**, 246 (2011).
- P. Bertino, A. Marconi, IL. Palumbo, B.M. Bruni, D. Barbone, S. Germano, A.U. Dogan, G.F. Tassi, C. Porta, L. Mutti e G. Gaudino, *Int. J. Cancer* **121**, 12 (2007).
- C. Bianchi & T. Bianchi, *Ind. Health* **45**, 379 (2007).
- A.R. Brody, *Environ. Health Persp.* **100**, 21 (1993).
- G. Cairo, *Caleidoscopio italiano* **117**, 5 (1997), 5th ed.
- M. Carbone, Y.I. Baris, P. Bertino, B. Brass, S. Comertpay, A.U. Dogan, G. Gaudino, S. Jube, S. Kanodia, C.R. Partridge, H.I. Pass, Z.S. Rivera, I. Steele,

- M. Tuncer, S. Way, H. Yang e A. Miller, *P. Natl. Acad. Sci. USA* **108(33)**, 13618 (2011).
- M. Carbone, B.H. Ly, R.F. Dodson, I. Pagano, P.T. Morris, U.A. Dogan, A.F. Gazdar, H.I. Pass e H. Yang, *J. Cell. Physiol.* **227(1)**, 44 (2012).
 - V. Cardile, M. Renis, C. Scifo, L. Lombardo, R. Gulino, B. Mancari e A.M. Panico, *Int. J. Biochem. Cell B.* **36**, 849 (2004).
 - N.D. Chasteen & P.M. Harrison, *J. Struct. Biol.* **126**, 182 (1999).
 - A. Churg, *Am. J. Pathol.* **109**, 88 (1982).
 - D.L. Coffin, P.M. Cook e J.P. Creason, *Inhal. Toxicol.* **4**, 273 (1992).
 - W.E. Cooke, *Brit. Med. J.* **26**, 147 (1924).
 - W.E. Cooke, *Brit. Med. J.* **3**, 1024 (1927).
 - W.E. Cooke, *Brit. Med. J.* **28**, 578 (1929).
 - D.S. Coombs, A. Alberti, T. Armbruster, G. Artioli, C. Cocella, E. Galli, J.D. Grice, F. Liebau, J.A. Mandarino, H. Minato, E.H. Nickel, E. Passaglia, D.R. Peacor, S. Quartieri, R. Rinaldi, M. Ross, R.A. Sheppard, E. Tillmanns e G. Vezzalini, *Can. Mineral.* **33**, 1571 (1997).
 - A. Croce, M. Musa, M. Allegrina, P. Trivero e C. Rinaudo, *Microsc. Microan.* **19**, 420 (2013a).
 - A. Croce, M. Musa, M. Allegrina, C. Rinaudo, Y.I. Baris, A.U. Dogan, A. Powers, Z. Rivera, P. Bertino, H. Yang, G. Gaudino e M. Carbone, *J. Raman Spectrosc.* **44**, 1440 (2013b).
 - Decreto Legislativo 152 (2006) – Norme in materia ambientale, GUI 88.
 - Decreto Legislativo 81 (2008) – Attuazione dell'articolo 1 della legge 3 Agosto 2007 n.123, in materia di tutela della salute e della sicurezza nei luoghi di lavoro, GUI 101.
 - Decreto Ministeriale del 06/09/1994 (1994) – Normative e metodologie tecniche di applicazione dell'art.6, comma 3, e dell'art.12, comma 2, della legge 27 marzo 1992, n. 257, relativa alla cessazione dell'impiego dell'amianto, GUI – Supplemento Ordinario n°220.

- W.A. Deer, R.A. Howie e J. Zussman, Introduzione ai minerali che costituiscono le rocce. (Zanichelli, Bologna, 1994), 2nd ed.
- A.J.M. de Man & R.A. van Santen, *Zeolites* **12**, 269 (1992).
- Directive 2003/18/EC (2003) of the European Parliament and of the Council of 27 March 2003 amending Council Directive 83/477/EEC on the protection of workers from the risks related to exposure to asbestos at work, OJ L 97, 2003, 48–52.
- R.F. Dodson, M. O’Sullivan, C.J. Corn, J. G.N. Garcia, J.M. Stocks e D.E. Griffith, *Br. J. Ind. Med.* **50**, 1032 (1993).
- A.U. Dogan, Y.I. Baris, M. Dogan, S. Emri, I. Steele, A.G. Elmishad e M. Carbone, *Cancer Res.* **66**, 5063 (2006).
- A.U. Dogan & M. Dogan, *Environ. Geochem. Health* **30**, 355 (2008).
- A.U. Dogan, M. Dogan e J.A. Hoskins, *Environ. Geochem. Health* **30**, 367 (2008).
- K. Donaldson & A. Seaton, *Particle and Fibre Toxicology* **9(13)**, (2012).
- I. Dubrovsky, Nanotechnology Project, Mineralization in ferritin (2006).
- P. Dumortier, L. Çopliü, I. Broucke, S. Emri, T. Selcuk, V. de Maertelaer, P. De Vuyst e Y.I. Baris, *Occup. Environ. Med.* **58**, 261 (2001).
- A.S. Eakle, *Am. J. Sci.* **6**, 66 (1898).
- M.M. Filkelstein, *Am. Rev. Resp. Dis.* **125**, 496 (1982).
- H. Fujiwara, T. Kamimori, K. Morinaga, Y. Takeda, N. Kohyama, Y. Miki, K. Inai e S. Yamamoto, *Ind. Health* **43**, 346, (2005).
- J.A. Gard & J.M. Tait, *Proceedings of the 3rd International Conference on Molecular Sieves*, 94 (1973).
- A.J. Ghio, A. Churg e V.L. Roggli, *Toxicol. Pathol.* **32**, 643 (2004).
- A. Gualtieri, G. Artioli, E. Passaglia, S. Bigi, A. Viani e J.C. Hanson, *Am. Mineral.* **83**, 590 (1998).

- A.F. Gualtieri, C. Giacobbe, C. Rinaudo, A. Croce, M. Allegrina, G. Gaudino, H. Yang e M. Carbone, *Period. Mineral.* **82(2)**, 299 (2013).
- G.D. Guthrie, *Am. Mineral.* **77**, 225 (1992).
- F.C. Hawthorne, *Can. Mineral.* **16**, 187 (1978).
- R.J. Hill, R.E. Edwards e P. Carthew, *J. Exp. Pathol. (Oxford)* **71**, 105 (1990).
- B.D. Hogg, P.K. Dutta e J.F. Long, *Anal. Chem.* **68**, 2309 (1996).
- P.F. Holt, *Environ. Health Persp.* **9**, 205 (1974).
- I.A.R.C., *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. Suppl.* **7**, 1 (1987).
- Z. Kartaloglu, A. Ilvan, R. Aydilek, K. Cerrahoglu, K. Tahaoglu, H. Baloglu e Z. Misirli, *Yonsei Med. J.* **44**, 169 (2003).
- A. Kawahara & H. Curien, *B. Soc. Fr. Mineral. Cr.* **92**, 650 (1969).
- K.T. Kelsey, E. Yano, H.L. Liber e J.B. Little, *Br. J. Cancer* **54**, 107 (1986).
- E.V. Kleymenova, G. Horeovsky, L.N. Pylev e J. Everitt, *Cancer Lett.* **147**, 55 (1999).
- H.K. Koerten, J. Hazekamp, M. Kroon e W.T. Daems, *Am. J. Pathol.* **136**, 141 (1990).
- N. Kokturk, P. Firat, H. Akay, C. Kadilar, C. Ozturk, F. Zorlu, Y. Gungen e S. Emri, *Lung Cancer* **50**, 189 (2005).
- N. Kohyama, Y. Shinohara e Y. Suzuki, *Am. J. Ind. Med.* **30**, 515 (1996).
- L. Lambertini, M. Padovani, D. Santini e M. Soffritti, *Eur. J. Oncol.* **8**, 215 (2003).
- Legge 257 del marzo 1992 “Norme relative alla cessazione dell’impiego dell’amianto. S. Ord. alla G. U. N. 087 Serie Generale Parte Prima del 13/04/1992 Supplemento 064 del 13/04/1992 - Legge 27 marzo 1992, n. 257”.
- A.J. Lanza, W.J. McConnell e J.W. Fehnel, *Public Health Rep.* **50(1)**, 1 (1935).
- D.E. Lilienfeld, *Am. J. Public Health* **81(6)**, 791 (1991).

- L.G. Lund, M.G. Williams, R.F. Dodson e A.E. Aust, *Occupational Environ. Med.* **51**, 200 (1994).
- F. Mollo, E. Pira, G. Piolatto, D. Bellis, P. Burlo, A. Andreozzi, S. Bontempi e E. Negri, *Int. J. Cancer* **60**, 289 (1995).
- B. Mossman, W. Light e E. Wei, *Annu. Rev. Pharmacol.* **23**, 595 (1983).
- W. Mozgawa, *J. Mol. Struct.* **596**, 129 (2001).
- F.A. Mumpton, U.S. Geological Survey, Open-file Report 79-954, 55 (1979).
- M. Musa, “Sviluppo di metodologie di studio del particolato atmosferico, delle relazioni con le sorgenti, e di fasi inorganiche di interesse per la mineralogia medica”, tesi di Dottorato di Ricerca in Scienze Ambientali (acque interne e agroecosistemi) – XXIV ciclo.
- M. Musa, A. Croce, M. Allegrina, C. Rinaudo, E. Belluso, D. Bellis, F. Toffalorio e G. Veronesi, *Vib. Spectrosc.* **61**, 66 (2012).
- L. Pascolo, A. Gianoncelli, B. Kaulich, C. Rizzardi, M. Schneider, C. Bottin, M. Polentarutti, M. Kiskinova, A. Longoni e M. Melato, *Particle and Fibre Toxicology* **8**:7 (2011).
- L. Pascolo, A. Gianoncelli, G. Schneider, M. Salomé, M. Schneider, C. Calligaro, M. Kiskinova, M. Melato e C. Rizzardi, *Scientific Reports*, **3**:1123 (2013).
- E. Passaglia, G. Artioli e A. Gualtieri, *Am. Mineral.* **83**, 577 (1998).
- C. Pelucchi, M. Malvezzi, C. La Vecchia, F. Levi, A. Decarli e E. Negri, *Br. J. Cancer* **90**, 1022 (2004).
- J. Peto, A. Decarli, C. La Vecchia, F. Levi e E. Negri, *Br. J. Cancer* **79**, 666 (1999).
- A. Poole, R.C. Brown, C.J. Turver, J.K. Skidmore e D.M. Griffiths, *Br. J. Cancer* **47**, 697 (1983).
- F. Qi, G. Okimoto, S. Jube, A. Napolitano, H.I. Pass, R. Laczko, R. DeMay, G. Khan, M. Tiirikainen, C. Rinaudo, A. Croce, H. Yang, G. Gaudino e M. Carbone, *Am. J. Pathol.* **183**(5), 1654 (2013).

- Report of an ILSI Risk Science Institute Working Group, “Testing of fibrous particles: short-term assays and strategies”, *Inhal. Toxicol.* **17**, 497 (2005).
- C. Rinaudo, M. Allegrina, E. Fornero M. Musa, A. Croce e D. Bellis, *J. Raman Spectrosc.* **41(1)**, 27 (2010a).
- C. Rinaudo, E. Belluso e D. Gastaldi, *Mineral. Mag.* **68**, 455 (2004).
- C. Rinaudo, A. Croce, M. Musa, E. Fornero, M. Allegrina, P. Trivero, D. Bellis, D. Sferch, F. Toffalorio, G. Veronesi e G. Pelosi, *Appl. Spectrosc.* **64(6)**, 571 (2010b).
- C. Rinaudo, D. Gastaldi e E. Belluso, *Can. Mineral.* **41**, 883 (2003).
- C. Rinaudo, D. Gastaldi e E. Belluso, *Siti Contaminati*, **2**, 116 (2003).
- J.L. Schlenker, J.J. Pluth e J.V. Smith, *Acta Crystallogr.* **B33**, 3265 (1977).
- K.P. Severin, Energy dispersive spectrometry of common rock forming minerals, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands, 2004.
- M. Soffritti, F. Minardi, L. Bua, D. Degli Esposti e F. Belpoggi, *Eur. J. Oncol.* **9**, 169, (2004).
- Y. Suzuki, *Environ. Health Persp.* **9**, 241 (1974).
- A. Tannapfel, Malignant Mesothelioma. Bochum, Germany: Springer Verlag (2011).
- J.R. Testa, M. Carbone, A. Hirvonen, K. Khalili, B. Krynska, K. Linnainmaa, F.D. Pooley, P. Rizzo, V. Rusch e G.H. Xiao, *Cancer Res.* **58**, 4505 (1998).
- C.R. Timblin, G.D. Guthrie, Y.W.M. Janssen, E.S. Walsh, P. Vacek e B.T. Mossman, *Toxicol. Appl. Pharm.* **151**, 88 (1998).
- J.C. Wagner, J.W. Skidmore, R.J. Hill e D.M. Griffiths, *Br. J. Cancer* **51(5)**, 727, (1985).
- A.J. Werner, M.F. Hochella, G.D. Guthrie, J.A. Hardy, A.E. Aust e J.D. Rimstidt, *Am. Mineral.* **80**, 1093 (1995).
- W.S. Wise & R.W. Tschernich, *Am. Mineral.* **61**, 853 (1976).

- World Health Organization (WHO), Environmental Health Criteria 53 – Asbestos and Other Natural Mineral Fibres, International programme for chemical safety, Geneva (1986).
- Y. Yu, G. Xiong, C. Li e F.S. Xiao, *Micropor. Mesopor. Mat.* **46**, 23 (2001).
- P.A. Zucali, G.L. Ceresoli, F. De Vincenzo, M. Simonelli, E. Lorenzi, L. Gianoncelli e A. Santoro, *Cancer Treat. Rev.* **37**, 543 (2011).

SITOGRAFIA

- <http://www.againwiththecomics.com/>
- www.arp.at.toscana.it
- <http://www.azooptics.com/Article.aspx?ArticleID=381>
- http://banasbestosindia.blogspot.it/2010_11_01_archive.html
- <http://www.costaman.it>
- <http://www.earthmagazine.org/article/dangerous-dust-erionite-asbestos-mineral-causing-cancer-epidemic-turkey-found-least-13>
- <http://www.esrf.eu/Accelerators/Accelerators>
- <http://www.flickr.com>
- http://www.lbl.gov/MicroWorlds/ALSTool/ALS_Components/Linac/
- <http://www.mesothelioma-lawyersblog.com>
- <http://www4.nau.edu/microanalysis/Microprobe-SEM/Signals.html>
- <http://www.ndt-ed.org/EducationResources/CommunityCollege/Radiography/Physics/xrays.htm>
- <http://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/asb/>
- <http://www.nonsoloaria.com/asbca.htm>
- <http://projects.exeter.ac.uk/geomincentre/estuary/Main/fluorescence.htm>
- <http://www.ptli.com/testlopedia/tests/FTIR-E168andE1252-more.asp>
- <http://reviews.ebay.com>
- <http://science.howstuffworks.com/scanning-electron-microscope2.htm>
- <http://socphysics.blogspot.it/>
- <http://updatingmdl.wordpress.com/luoghi-di-esposizione-naturale-alle-fibre-asbestiformi-2/>
- <http://vittime-amianto.blogspot.it/>
- <http://en.wikipedia.org/wiki/Asbestos>

RINGRAZIAMENTI

Per il supporto tecnico, scientifico e per la disponibilità più volte dimostrata desidero ringraziare tutte le persone che mi hanno accompagnato in questi anni. Tra questi, un ringraziamento particolare va:

- allo staff della *University of Hawai'i Cancer Center* di Honolulu, e in particolare ai Proff. Carbone, Gaudino, Yang e Qi, che hanno fornito i materiali utilizzati in questa ricerca;
- alla Dott.ssa Bellis dell'Ospedale Martini di Torino per le sezioni istologiche dei pazienti umani;
- allo *European Synchrotron Radiation Facility* di Grenoble;
- al Prof. Gualtieri ed ai suoi collaboratori dell'Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia per i campioni di offretite;
- alle persone che ho incontrato in questo percorso di crescita, che mi hanno permesso di migliorare dal punto di vista sia professionale che umano.

ALLEGATI

- 1) A. BLOISE, T. CRITELLI, M. CATALANO, C. APOLLARO, D. MIRIELLO, A. CROCE, E. BARRESE, F. LIBERI, E. PILUSO, C. RINAUDO, E. BELLUSO, (2014) Asbestos and other fibrous minerals contained in the serpentinites of the Gimigliano-Mount Reventino Unit (Calabria, S-Italy), *Environmental Earth Sciences*, in press (DOI: 10.1007/s12665-013-3035-2).
- 2) F. QI, G. OKIMOTO, S. JUBE, A. NAPOLITANO, H.I. PASS, R. LACZKO, R. DEMAY, G. KHAN, M. TIIRIKAINEN, C. RINAUDO, A. CROCE, H. YANG, G. GAUDINO, M. CARBONE, (2013) Continuous exposure to chrysotile asbestos can cause transformation of human mesothelial cells via HMGB1 and TNF- α signaling, *American Journal of Pathology*, Vol. 183 n.5, 1654-1666.
- 3) A.F. GUALTIERI, C. GIACOBBE, C. RINAUDO, A. CROCE, M. ALLEGRINA, G. GAUDINO, H. YANG, M. CARBONE, (2013) Preliminary results of the spectroscopic and structural characterization of mesothelioma inducing crocidolite fibers injected in mice, *Periodico di Mineralogia*, Vol. 82 n.2, pp.299-312.
- 4) A. CROCE, M. MUSA, M. ALLEGRINA, C. RINAUDO, Y. I. BARIS, A. U. DOGAN, A. POWERS, Z. RIVERA, P. BERTINO, H. YANG, G. GAUDINO, M. CARBONE, (2013) Micro-Raman spectroscopy identifies crocidolite and erionite fibers in tissue sections, *Journal of Raman Spectroscopy*, Vol. 44, 1440-1445.
- 5) A. CROCE, M. MUSA, M. ALLEGRINA, P. TRIVERO, C. RINAUDO, (2013) Environmental scanning electron microscopy technique to identify asbestos phases inside ferruginous bodies, *Microscopy and Microanalysis*, Vol. 19, pp. 420-424.
- 6) A. VIANI, A.F. GUALTIERI, S. POLLASTRI, C. RINAUDO, A. CROCE, G. URSO, (2013) Crystal chemistry of the high temperature product of transformation of cement-asbestos, *Journal of Hazardous Materials*, Vol. 248-249, pp.69-80.

- 7) M. MUSA, A. CROCE, M. ALLEGRINA, C. RINAUDO, E. BELLUSO, D. BELLIS, F. TOFFALORIO, G. VERONESI, (2012) The use of Raman spectroscopy to identify inorganic phases in iatrogenic pathological lesions of patients with malignant pleural mesothelioma, *Vibrational Spectroscopy*, Vol. 61, pp.66-71.