



1506
UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI URBINO
CARLO BO

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI URBINO CARLO BO

DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMOLECOLARI

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN:

SCIENZE DELLA VITA, SALUTE E BIOTECNOLOGIE

CURRICULUM: BIOLOGIA DELLA CELLULA E DEGLI ORGANISMI

CICLO XXXIII

TITOLO TESI:

**ANALISI MORFOFUNZIONALI DELL'INTERAZIONE
TRA FIBRE MINERALI MICRO E NANOSTRUTTURATE
CON MATRICI CELLULARI**

SSD: BIO/16 ANATOMIA UMANA

Coordinatore: **Ch.mo Prof. MARCO BRUNO LUIGI ROCCHI**

Supervisore: **Ch.mo Prof. PIETRO GOBBI**

Co-Supervisore: **Prof. MICHELE MATTIOLI**

Dottorando: GIUSEPPE PIGNATARO

ANNO ACCADEMICO 2019/2020

Ringraziamenti

Per questo dottorato “Nel mezzo di camin di mia vita...” non posso non ringraziare i miei tutor, il Prof. Pietro Gobbi e il Prof. Michele Mattioli, per l’infinita pazienza e la possibilità di crescita personale concessami. Essenziali per competenza, conoscenza, supporto e costante disponibilità, la Dr. Sara Salucci e la Dr. Laura Valentini. Infine, ma non ultimi, il Prof. Michele Betti ed il Dr. Matteo Giordani che sono stati più che fondamentali per il lavoro svolto.

Un sentito ringraziamento all’agenzia ARPAM, per gli spazi e i tempi a me concessi, in particolare al mio Dirigente, la Dr. Patrizia Ammazzalorso.

Dedico questo lavoro alla mia famiglia, a mia moglie che mi ha supportato e sopportato, e a mio figlio.

A mio padre.

G.

INDICE

ABBREVIAZIONI	5
INTRODUZIONE	6
INTERAZIONE SISTEMI BIOLOGICI	9
Reattività a livello micro e nanodimensionale	9
Nanomateriali.....	10
Interazione delle NP con le barriere biologiche	11
La via respiratoria	12
Uptake e destino intracellulare	14
Liposomi	18
TECNICHE DI CARATTERIZZAZIONE	19
Microscopia Elettronico a Scansione (SEM)	21
Microscopia elettronico a trasmissione (TEM).....	22
Preparazione del campione per analisi in TEM	24
Spettrometria a Dispersione di Energia o Microanalisi (EDS)	26
Sensore Elettroni Secondari	26
Sensore Elettroni Retrodiffusi	27
Diametro Medio Geometrico Ponderato	27
Classificazione cancerogeni	28
Caratteristiche e composizione chimica di fibre inorganiche	30
Dispersione cromatica in microscopia ottica	31
Introduzione	32
Definizioni	33
Standard e Riferimenti.....	33
Principio del metodo	33
Campo di applicazione.....	33
DESCRIZIONE DEL METODO.....	34
FIBRE ANALIZZATE	39
Erionite	39
Asbestoferrite.....	50
Esaidrite	62
Sale di Epsom.....	66
Epsomite.....	69
Silicato	82
Silicato tremolite	95

Silicato crisotilo	103
Silicato amosite.....	108
INTERAZIONE CON MODELLO CELLULARE	117
Linea cellulare U937	117
Interazione con monociti U937	117
Interazione con macrofagi U937	121
CONCLUSIONI	125
ALLEGATI	128
Tabella fibre di amianto immerse in liquidi ad indice noto.....	128
Tabella diametri asbestoferrite	129
Tabella diametri epsomite.....	134
Tabella diametri silicato	135
Tabella diametri tremolite.....	135
Tabella diametri amosite.....	136
BIBLIOGRAFIA.....	138

ABBREVIAZIONI

AFM	Microscopia a Forza Atomica
ARPAM	Agenzia Regionale Protezione Ambiente per le Marche
DLS	Dynamic Light Scattering
DPI	Dispositivi Protezione Individuali
EDS	Spettrometria a Dispersione di Energia o Microanalisi
EDXS	Energy Dispersive X-ray Analysis
FAV	Fibre Artificiali Vetrose
FFF	Field Flow Fractionation
GSED	Gaseous Secondary Electron Detector
IARC	Agenzia internazionale per la ricerca sul cancro
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy
LIBD	Laser Induced Breakdown Detection
LFD	Large Field Detector
LUV	Large Unilamellar Vesicles
MCA	Materiali Contenenti Amianto
MLV	Multi-lamellar Vesicles
MODC	Microscopia Ottica in Dispersione Cromatica
NM	Nanomateriali
NP	Nanoparticelle
NTA	NP Tracking analysis
OMS	Organizzazione Mondiale della Sanità.
PC	Policarbonato
SEM	Microscopia Elettronica in Scansione
SLS	Light Scattering Spectroscopy
SMPS	Scanning Mobility Particle Size
SNC	Sistema Nervoso Centrale
SPR	Surface Plasmon Resonance
SUV	Small Unilamellar Vesicles
TEM	Microscopia Elettronica a Trasmissione
UFP	Particelle Ultra Fini
WHO	World Health Organization
XPS	X-Ray Photoelectron Spectroscopy

INTRODUZIONE

L'esposizione all'amianto e a fibre con caratteristiche simili all'amianto può indurre malattie respiratorie croniche, con patologie gravi che hanno un'incidenza epidemiologica ancora rilevante (6000 morti annue nel 2019, SIMA Società Italiana Medicina Ambientale), nonostante l'utilizzo dell'amianto sia stato messo al bando in Italia da oltre 25 anni.

Fin dall'antichità alcune di queste fibre, come l'amianto, hanno avuto e in parte hanno ancora rilevanza tecnologica ed industriale. La pericolosità è dovuta alla possibile inalazione, legata alla capacità che hanno queste fibre di dividersi longitudinalmente in fibre e fibrille sottili, e quindi alla persistenza nell'apparato respiratorio. Se per le fibre di amianto è oramai nota, accettata e normata da un punto di vista legislativo la pericolosità, o lo è almeno per i sei tipi di amianto più comuni (crisotilo, crocidolite, amosite, tremolite, actinolite e antofillite), per altre fibre minerali la pericolosità non è stata ancora sufficientemente indagata.

Per alcune fibre minerali ne è stata già riconosciuta la pericolosità, come ad esempio fluoroedenite ed erionite, fibre legate a patologie nell'uomo quali il mesotelioma pleurico, malattia considerata ancora da un punto di vista epidemiologico come "asbesto correlata" (Baris et al., 1978).

In particolare, la zeolite fibrosa erionite è un forte mutageno, considerato più cancerogeno delle fibre di amianto nell'uomo e nei roditori (Coffin et al., 1992). Le zeoliti sono ancora utilizzate nei materiali per l'edilizia e quindi l'esposizione si può verificare nei passaggi che vanno dall'estrazione all'utilizzo.

Oltre ad essere un problema sanitario, l'esposizione potenziale a fibre pericolose e/o potenzialmente pericolose è anche un problema di caratterizzazione e conseguente classificazione normativa.

Se per fibre come l'erionite è nota la pericolosità, per altre fibre è ancora in fase di studio. Un esempio è l'epsomite, fibra associata ad un sale tradizionalmente utilizzato nella farmacopea occidentale come Sale di Epsom, solfato di magnesio nella forma non fibrosa. Uno studio delle possibili modificazioni reciproche con modelli cellulari potrebbe spiegarne possibili meccanismi di interazione. Il solfato di magnesio ($MgSO_4$) viene utilizzato come additivo alimentare e anche come costituente di formulazioni di farmaci, e si presenta naturalmente come epsomite minerale. Per sintesi viene preparato mediante neutralizzazione di ossido di magnesio, idrossido di magnesio o carbonato di magnesio con acido solforico, seguita da evaporazione della soluzione risultante con precipitazione di cristalli. Questo sale è comunemente usato in gravidanza come agente anticonvulsivante o tocolitico, influisce

anche sulle funzionalità cardiache e del sistema nervoso centrale.

La potenziale tossicità del Solfato di Magnesio è stata studiata (Xia et al., 2019) tramite l'interazione con linee cellulari epiteliali da adenocarcinoma umano, rilevando che esercita un effetto anti-apoptosi tramite caspasi. È stato inoltre verificato che il sale $MgSO_4$ possa esercitare effetti tossici sui roditori (Katsumata et al., 1998).

Al momento i possibili meccanismi di interazione comprendono i seguenti fattori:

- Caratteristiche fisiche della particella: differenza tra particella e fibra, diametro, lunghezza.
- Caratteristiche chimico-fisiche e mineralogiche: reattività superficiale.
- Capacità di generare ROS (Reactive Oxygen Species).
- Persistenza nei sistemi biologici.

Lo scopo principale di questo lavoro è stato caratterizzare la natura fibrosa di fibre minerali potenzialmente pericolose sia da un punto di vista morfologico, che chimico, contestualmente allo studio dell'interazione con un modello cellulare in vitro mediante analisi ultrastrutturali.

Sono state analizzate fibre minerali di natura diversa, tra cui minerali già noti e caratterizzati come fibre di amianto (crisotilo, tremolite e amosite), un silicato fibroso in fase di caratterizzazione, asbestoferrite ed erionite. Queste fibre minerali sono state analizzate mediante microscopia elettronica a scansione ambientale.

L'analisi sia morfologica che chimica (analisi EDXS) è stata eseguita su aliquote di campione in condizioni di basso vuoto (0,80 mbar, senza alcuna preparazione). Per le caratterizzazioni di tipo morfologico è stato necessario lavorare anche in condizioni di alto vuoto con il campione metallizzato con uno strato di oro (40 nm).

Questo lavoro di ricerca si è avvalso di strumentazione condivisa tra l'Università di Urbino ed ARPAM, Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente Marche, tramite la struttura del Centro Regionale Amianto Marche che ha messo a disposizione la strumentazione scientifica.

Per la caratterizzazione delle fibre è stato adattato un protocollo di misura del Diametro Medio Geometrico Ponderato per la lunghezza (ECB/TM/1(00) rev.2 Draft 4), che si avvale dell'utilizzo della Microscopia Elettronica SEM. Questo protocollo, sviluppato nell'ambito della medicina occupazionale dal centro europeo "European Chemicals Bureau" (ECB), per le fibre artificiali vetrose permette di calcolare statisticamente il diametro medio della fibra ponderato per la lunghezza, parametro associato alla possibile pericolosità di queste fibre artificiali.

Tale protocollo di calcolo è stato applicato in questo lavoro per la misura del diametro medio di fibre minerali naturali in quanto trattasi di parametro strettamente correlato alla possibilità di inalazione delle fibre e quindi alla potenziale pericolosità anche nel caso delle fibre minerali.

Contestualmente, presso l'Università di Urbino è stata inoltre studiata l'interazione tra fibre minerali naturali (epsomite) ed un modello di linea cellulare (Monociti U937).

La linea cellulare monocita umana U937 è derivata da cellule maligne ottenute dal versamento pleurico di un paziente con linfoma istiocitico, ed è stata scelta per verificare l'internalizzazione e la potenziale tossicità dell'epsomite nelle cellule, diverse concentrazioni di fibre sono state testate su cellule U937 (5, 20 e 100nm) con diversi tempi di incubazione (24, 36 e 48 ore). La risposta cellulare dopo l'esposizione alla fibra è stata studiata tramite microscopia elettronica in trasmissione (TEM).

Concludendo, l'intenzione alla base di questo dottorato è stata quella di fornire una possibile base per un approccio generale e sistemico che possa essere strumento e criterio di valutazione della possibile pericolosità di una fibra minerale naturale non ancora classificata come pericolosa, necessità che può sorgere in svariati ambiti di indagine sia lavorativi (dall'estrazione di minerali fino ad attività di tipo manutentivo) che ambientali.

La strumentazione condivisa tra Università di Urbino ed ARPAM (Centro Regionale Amianto Marche) consiste in un sistema SEM "ESEM FEI Quanta 200 FEG" con possibilità di coating superficiale tramite lo sputter Quorum 150TS.

INTERAZIONE SISTEMI BIOLOGICI

Reattività a livello micro e nanodimensionale

Il concetto di nanoscienza fu formulato per la prima volta dal fisico Richard Feynman nel 1959 (Feynman, R. 1960) nel discorso intitolato **“There’s plenty of room at the bottom-An invitation to enter a new field of physics”**, durante il quale ipotizzò che nel futuro si sarebbero potuti costruire dispositivi di varia natura agendo direttamente sulla posizione degli atomi nella materia.

Secondo la Royal Society & The Royal Academy of Engineering (UK), “Nanoscience is the study of phenomena and manipulation of materials at atomic, molecular and macromolecular scales, where properties differ significantly from those at a larger scale” e, secondo la National Nanotechnology Initiative (NNI) USA, *“Nanotechnology is the understanding and control of matter at dimensions of roughly 1 to 100 nanometers, where unique phenomena enable novel applications... At this level, the physical, chemical, and biological properties of materials differ in fundamental and valuable ways from the properties of individual atoms and molecules or bulk matter”*.

Le nanoscienze costituiscono il punto di incontro di discipline diverse che vanno dalla fisica quantistica alla chimica supramolecolare, dalla scienza dei materiali alla biologia molecolare e rappresentano una realtà ormai affermata nel mondo della ricerca. Le nanotecnologie, che sono invece ancora

nella fase iniziale del loro sviluppo, puntano a sfruttare e ad applicare i metodi e le conoscenze derivanti dalle nanoscienze. Esse fanno riferimento ad un insieme di tecnologie, tecniche e processi che richiedono un approccio multidisciplinare e consentono la creazione e utilizzazione di materiali, dispositivi e sistemi con dimensioni a livello nanometrico. Le prospettive associate alle nanotecnologie derivano dal fatto che, a questi livelli di dimensioni, comportamenti e caratteristiche della materia cambiano drasticamente.

Numerosi prodotti oggi sono riconducibili all'utilizzo delle nanotecnologie, e spesso sono già disponibili sul mercato o in procinto di diventarlo, ed il loro numero cresce costantemente. Tra essi si possono citare, ad esempio, nanoparticelle per cosmetici, coatings e vernici, tessuti che non si stropicciano e non rilasciano odori, articoli sportivi; ma anche nanocompositi, “hard disks” con superfici nanostrutturate per registrazione dati ad altissima densità, “chips” di memoria con dimensioni inferiori a 100 nm, dispositivi fotonici, coloranti alimentari, superfici autopulenti.

Le nanoparticelle sono presenti sulla Terra sia come risultato di fenomeni naturali (per esempio emissioni vulcaniche), sia come originate da processi incontrollati (ad esempio combustioni, particolato urbano, ecc.) ed attività industriali. Questi particolati sono denominati anche particelle ultrafini (UFP).

Fra le UFP, per il particolato urbano, sono stati ampiamente studiati gli effetti dell'esposizione sulla salute umana; le analogie dimensionali, la sempre più crescente presenza di nuove particelle in scala nanometrica e delle relative applicazioni pongono ancora una volta la necessità di conoscere le conseguenze delle interazioni di tali strutture con il corpo umano.

Le attuali informazioni di ecotossicità sono ancora ampiamente limitate a causa della complessità delle interazioni chimiche, fisiche e biologiche nelle reali condizioni di vita che coinvolgono tali particelle, il loro comportamento dal momento del rilascio nell'ambiente, le interazioni con gli organismi e con ogni comparto dell'ecosistema.

Nanomateriali

Con il termine “nanomateriali” (NM) si identificano nanostrutture particolate, che possono avere varia forma, ma che hanno almeno una dimensione nella scala “nano”, ossia inferiore a 100 nanometri (nm) (fig. 1). I NM possono assumere forma sferica oppure tubulare, filamentosa o essere di forma irregolare, possono essere formate da vari materiali, e possono esistere allo stato disperso o in forma fusa, aggregata e agglomerata. Caratteristica comune delle NP è quella, a causa delle loro dimensioni, di possedere proprietà e caratteristiche differenti da quelle della specie chimica parentale. Le NP hanno, infatti, superficie esposta molto maggiore a parità di massa rispetto allo stesso materiale in forma di macroparticella e questo aumenta in modo esponenziale la loro reattività chimica e biologica.

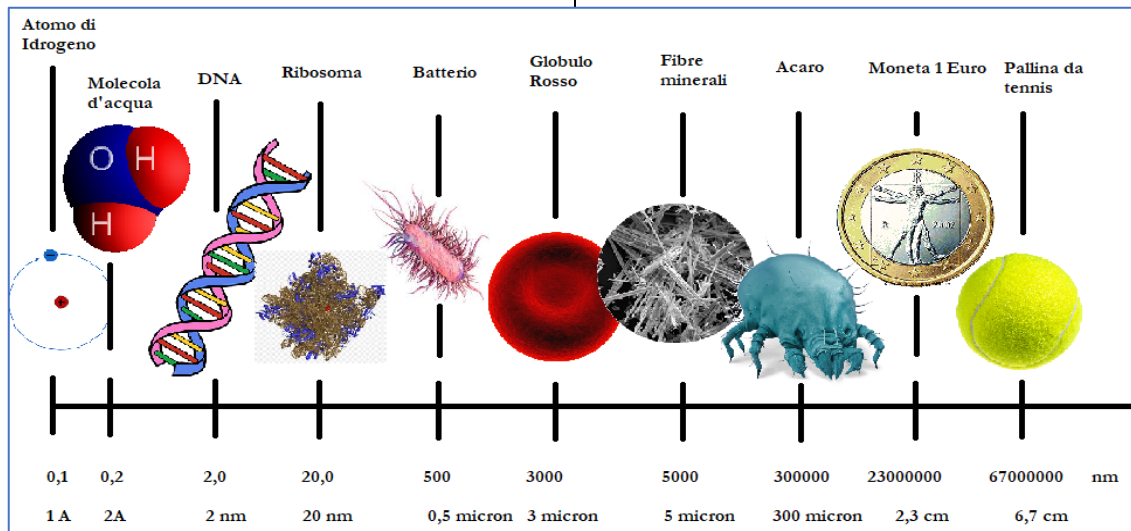


Figura 1: confronti dimensionali

Interazione delle NP con le barriere biologiche

Il corpo umano può venire a contatto con i NM di origine sintetica e naturale soprattutto mediante tre vie principali (Oberdöster et al., 2005):

- l'**inalazione** attraverso le vie respiratorie (Via inalatoria),
- l'**ingestione** attraverso il tratto gastrointestinale (Ingestione),
- l'**assorbimento** attraverso la via cutanea (Via dermica).

Via inalatoria: si riferisce a tutte le situazioni in cui le particelle aerodisperse possono penetrare nell'organismo attraverso l'apparato respiratorio. La deposizione delle particelle avviene in regioni differenti al variare delle dimensioni. Questo fenomeno è descritto dal modello matematico della Commissione di protezione radiologica (1994), ipotizzando che le particelle non diano luogo ad aggregati per un esteso intervallo di diametro delle particelle (dal nanometro fino a 100 micron).

La deposizione nei diversi distretti respiratori comporta diversi meccanismi di interazione e conseguenze sulla salute. Molti studi, che hanno analizzato l'incidenza di alcune patologie nella popolazione, indicano che l'esposizione a particolato fine e ultrafine possa essere correlata a patologie respiratorie e cardiovascolari.

Queste informazioni si integrano con gli studi sperimentali volti alla comprensione dei meccanismi biologici, degli organi target e le conseguenze

dell'esposizione, mediante test su animali ("in vivo") e su colture cellulari ("in vitro").

Al momento la IARC ha già classificato nel Gruppo 2B come possibili cancerogeni per l'uomo i nanotubi di carbonio a parete multipla del tipo MWCNT-7, mentre ha inserito nel Gruppo 3 (non classificabili come cancerogeni per l'uomo) gli altri tipi di nanotubi di carbonio sia a parete multipla che singola (IARC Monografia 111 – 2017).

Per **ingestione:** le situazioni di esposizione si possono attribuire a trasferimenti non intenzionali dalle mani alla bocca oppure per ingestione di alimenti contaminati.

Via dermica: la penetrazione delle particelle o fibre dipende da molteplici fattori: caratteristiche delle particelle, natura della cute e sua integrità e può costituire una via di accesso sistemica. Le valutazioni sono tutt'ora in corso, ma le prove su animali indicano l'insorgenza di fenomeni irritativi legati alla presenza di abrasioni.

Sono al momento poco noti, e legati soprattutto a fenomeni particolari di esposizione lavorativa o a somministrazione di farmaci, gli effetti dovuti all'assimilazione di materiale micro e nanostrutturato tramite le vie uditive o oculari.

Nel caso in cui le NP riescano a superare queste barriere, ulteriori barriere proteggono organi interni al corpo umano. Queste barriere interne o secondarie sono la barriera emato-encefalica, che protegge il cervello, la barriera emato-testicolare, che protegge

l'apparato riproduttivo maschile, e la placenta, che protegge l'embrione in via di sviluppo.

Parametri quali la dimensione, composizione chimica, struttura superficiale, solubilità, forma e stato di aggregazione possono modificare l'assorbimento e la traslocazione delle NP dal punto di entrata fino al sito target all'interno del corpo umano (Nel et al., 2006). Le micro e nanostrutture, una volta inalate, ingerite o anche somministrate topicamente possono

giungere fino alla circolazione sanguigna ed essere quindi trasportate ed accumulate a livello di vari organi. Studi condotti in vivo su animali hanno messo in rilievo che le NP possono localizzarsi a livello della circolazione sanguigna e del sistema nervoso centrale (SNC), inducendo reazioni infiammatorie a livello polmonare e problemi a livello cardiocircolatorio (Dailey et al., 2006), oltre ad accumularsi in vari organi quali fegato, milza, linfonodi e midollo osseo (Singh et al., 2007).

La via respiratoria

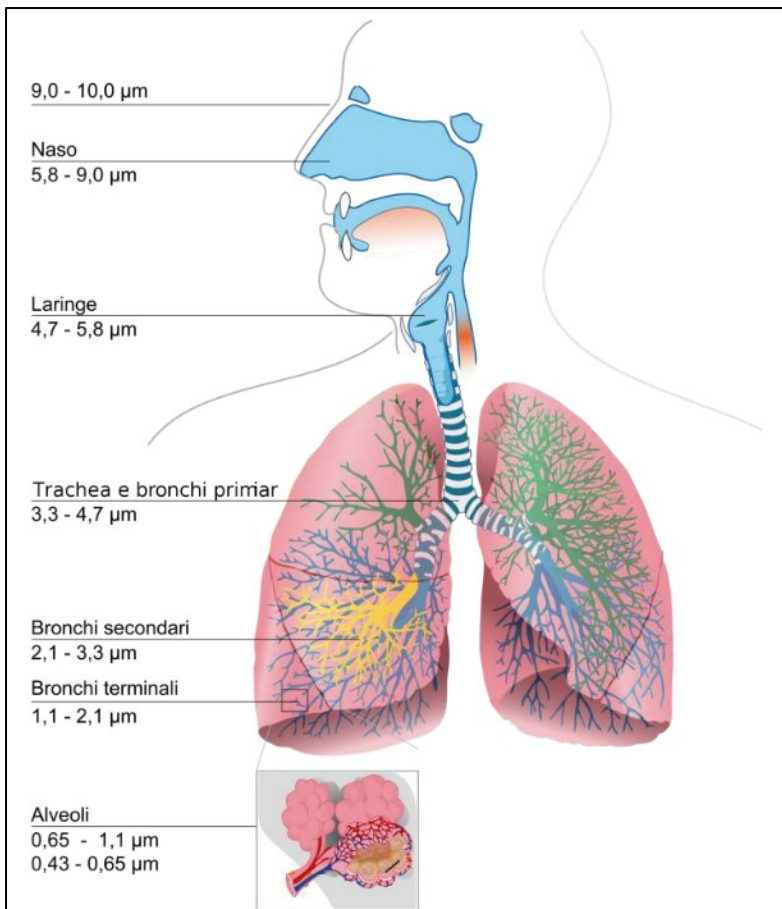


Figura 2: Apparato respiratorio

alveoli, tramite meccanismi diffusionali (Geiser et al., 2007): le particelle di piccole

Una delle principali vie attraverso cui volontariamente o accidentalmente entriamo in contatto con micro e nanostrutture potenzialmente pericolose è rappresentata dai polmoni. L'efficienza di deposizione delle polveri inalate dipende principalmente dal loro diametro e dalle caratteristiche aerodinamiche: infatti dimensioni e forma sono importanti per determinare quale compartimento del sistema respiratorio risulterà prevalentemente esposto tra le vie aeree superiori, le vie aeree inferiori o gli alveoli. Le particelle, in generale, si depositano efficientemente

nell'intero tratto respiratorio (Figura 2), dalla cavità nasale agli

dimensioni hanno la possibilità di procedere più profondamente nell'albero respiratorio, di depositarsi e di essere assorbite dall'epitelio polmonare entrando in circolo, mentre quelle di diametro superiore vengono fermate più facilmente a livello della cavità respiratoria superiore ed espulse tramite meccanismi di clearance mucociliare (Nel et al., 2006).

È evidente come le polveri e fibre più fini siano in grado di penetrare a fondo nell'organismo e, si sospetta, entrare addirittura nel circolo sanguigno penetrando poi nelle cellule.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità definisce (IARC, mono100C-12 e INAIL, 2017) "regolamentate" le fibre con lunghezza maggiore di 5 micron, perché potenzialmente biologicamente attive, e sezione inferiore a 3 micron, perché inalabili (Figura 3).

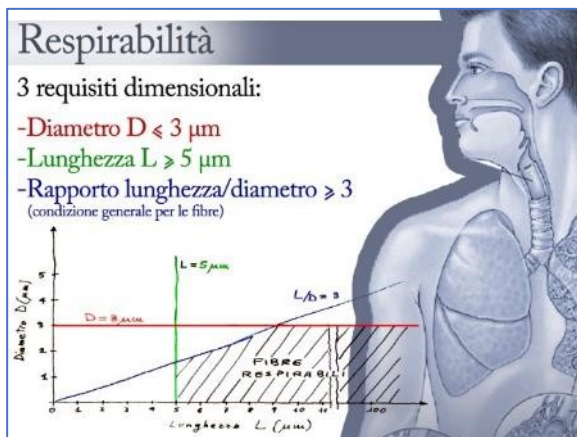


Figura 3: fibra e particella

La differenza tra una particella ed una fibra è nel rapporto tra lunghezza e diametro medio, se tale rapporto è uguale o maggiore di 3 allora l'oggetto è una fibra, altrimenti lo si considera come una particella (Figura 4).

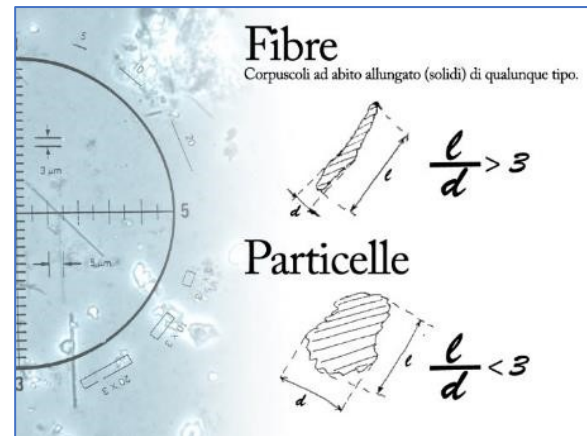


Figura 4: requisiti di respirabilità

La clearance polmonare dipende non solo dalla massa totale di nanoparticelle inalate ma anche dalla loro dimensione e dall'area superficiale (Oberdöster et al., 1994). Il trasporto muco-ciliare è fondamentale per la clearance delle vie respiratorie superiori, mentre a livello alveolare le particelle traslocano tramite trans-citosi attraverso l'epitelio del tratto respiratorio raggiungendo l'interstizio polmonare, dove in seguito possono essere fagocitate da macrofagi alveolari oppure entrare nel circolo sanguigno direttamente o tramite via linfatica (Hoet et al., 2004).

Recentemente, alcuni studi hanno dimostrato che è possibile la traslocazione di NP inalate a siti extra polmonari, come il sistema circolatorio, il cuore, il fegato e il cervello (Gwinn et al., 2006), anche se il meccanismo attraverso cui avviene la traslocazione non è stato del tutto chiarito. Alcuni studi suggeriscono come le NP inalate,

dopo essersi depositate nel polmone, eludano il controllo dei macrofagi alveolari e riescano ad infiltrarsi nello spazio interstiziale, mediante traslocazione dagli spazi alveolari attraverso l'epitelio (Borm et al., 2006).

I fattori che possono influenzare maggiormente la tossicità polmonare dei micro e nano materiali sono:

- 1) numero e dimensioni delle nanoparticelle
- 2) coating superficiale
- 3) grado di aggregazione/agglomerazione
- 4) cariche superficiali
- 5) metodo di sintesi

In teoria, le nanoparticelle aggregate possono anche disgregarsi, a contatto con liquidi particolari. Il grado di aggregazione o disgregazione delle nanoparticelle al momento dell'inalazione, o nelle fasi di deposizione nel tratto respiratorio, influisce sulle interazioni con le cellule polmonari. Infatti, se le particelle aggregate si disgregano durante l'interazione con i fluidi alveolari, possono comportarsi come nanoparticelle singole e traslocare agli organi interni.

Uptake e destino intracellulare

In letteratura sono disponibili ancora poche informazioni sui meccanismi coinvolti nell'uptake delle NP da parte delle cellule, tuttavia sembra che il meccanismo d'internalizzazione e quindi

il destino intracellulare di un sistema micro o nano strutturato sia influenzato da numerosi fattori:

- dalle proprietà chimico-fisiche del materiale con il quale esso è costruito (composizione chimica, dimensioni, forma e geometria, carica superficiale, stato di aggregazione, rivestimento superficiale) (Chithrani et al., 2007);
- dalle condizioni sperimentali adottate dagli esperimenti in vitro;
- dalle caratteristiche delle cellule utilizzate e quindi soprattutto dalla linea cellulare e dallo stato di differenziazione.

In particolar modo, le caratteristiche superficiali delle NP risultano un fattore cruciale, poiché, oltre a determinare la biocompatibilità, giocano un ruolo fondamentale nell'adesione cellulare (Gupta et al., 2005). Si è dimostrato che l'adesione tra cellule, matrice extracellulare e particelle è regolata soprattutto dalle integrine, una famiglia proteica di recettori coinvolti nell'adesione superficiale. La matrice citoscheletrica interagisce non solo con le integrine ma anche con proteine responsabili dei processi di internalizzazione cellulare, tra cui soprattutto l'endocitosi, che è il principale meccanismo d'ingresso delle NP.

In generale, una sostanza può entrare all'interno della cellula attraverso diffusione semplice o attraverso processi endocitici quali fagocitosi, macropinocitosi, endocitosi mediata da clatrina e endocitosi mediata da caveole.

La diffusione semplice è l'unico dei processi sopraelencati che non richiede energia, ma sfrutta semplicemente la presenza di un gradiente di concentrazione: solitamente sfruttano questo processo solo molecole di dimensioni molto ridotte e apolari, che diffondono attraverso il doppio strato fosfolipidico.

Con il termine endocitosi (Figura 5) si indica invece l'internalizzazione da parte di una cellula di macromolecole e soluti all'interno di vescicole membranose originatesi dall'invaginazione della membrana plasmatica.

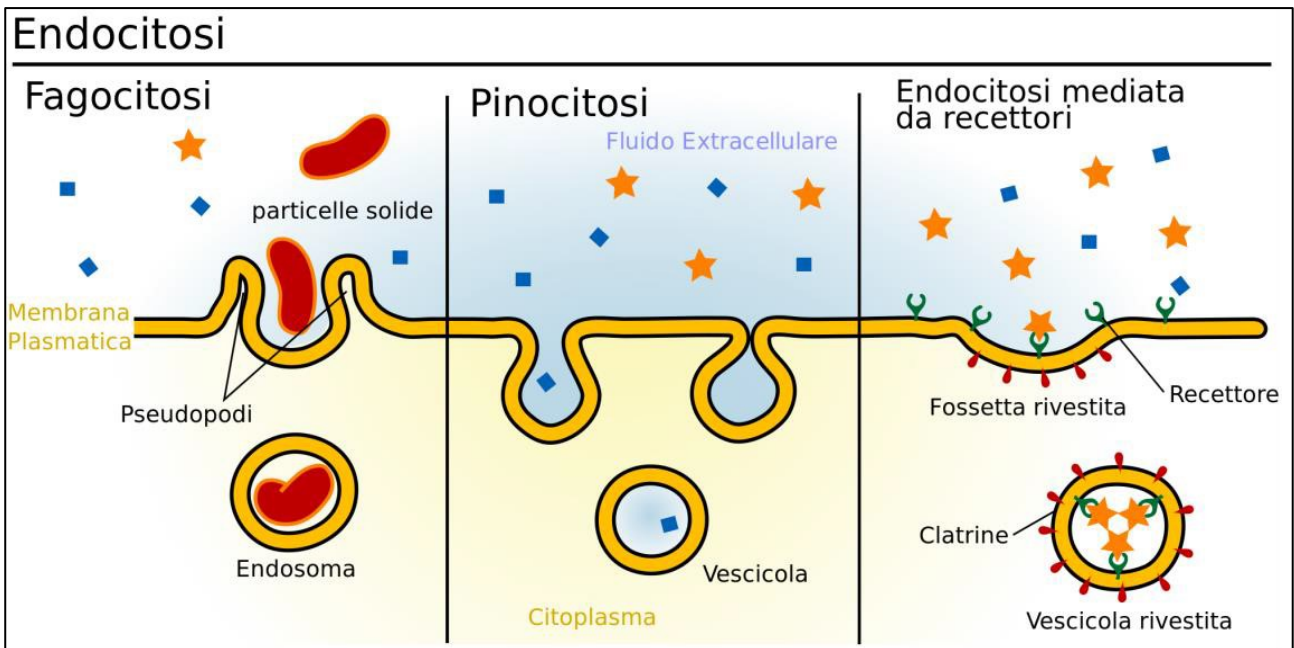


Figura 5: meccanismi di internalizzazione

La fagocitosi è possibile solo per alcuni tipi cellulari specializzati detti fagociti, quali i macrofagi, i monociti e i neutrofil, che sono in grado di rimuovere materiale di dimensioni anche maggiori di $0,5 \mu\text{m}$ (batteri, lieviti e detriti), attraverso un'interazione specifica tra i recettori della cellula fagocitica e i ligandi sulla superficie della particella, che porta a una conseguente invaginazione della membrana, favorita dalla proteina actina, e alla formazione di vescicole (i fagosomi) contenenti il materiale da eliminare.

La macropinocitosi consiste nella formazione di vescicole (i macropinosomi) di grandi dimensioni e di forma irregolare, generati anch'essi da un'invaginazione actina-dipendente della membrana plasmatica (Swanson et al., 1995). Il destino intracellulare dei macropinosomi è fortemente dipendente dal grado di specializzazione della cellula: nei macrofagi, ad esempio, si fondono con i lisosomi, mentre in altri tipi cellulari costituiscono una popolazione di vescicole distinte che non interagiscono con i compartimenti endocitici, ma che promuovono il riciclo

del contenuto verso la membrana plasmatica.

L'endocitosi mediata da clatrina (CME) è il percorso endocitico più frequente e viene normalmente utilizzato dalla cellula per il continuo apporto di nutrienti, antigeni e fattori di crescita (Takei et al., 2001). La CME è un tipo di endocitosi mediata da recettori: la fase iniziale consiste nel riconoscimento, da parte della cellula, della sostanza da internalizzare tramite l'interazione con specifici recettori di membrana.

La porzione citoplasmatica del recettore legato al suo ligando ha un'elevata affinità per la clatrina, una proteina citoplasmatica. Quando sulla membrana plasmatica si trova un numero sufficiente di recettori legati al ligando specifico e alla clatrina, questi tendono ad unirsi in un'unica regione per diffusione laterale: le molecole di clatrina formano così, legandosi tra loro, una sorta di rete che induce una flessione localizzata della membrana, formando la cosiddetta "coated pit" (fossetta rivestita).

Questa si approfondisce ulteriormente fino a chiudersi in sé, separandosi dalla membrana cellulare e formando una vera e propria vescicola rivestita. Queste vescicole si spostano verso le regioni più interne del citoplasma e ad un certo punto della loro progressione perdono il rivestimento clatrinico: la clatrina disassemblata viene riciclata, le vescicole nude si fondono tra loro dando luogo agli endosomi, all'interno dei quali il basso valore di pH favorisce la dissociazione tra i ligandi e i recettori, e infine il materiale endocitato può essere

accumulato all'interno della cellula, oppure andare incontro a degradazione lisosomiale o a transitosi.

L'endocitosi mediata da caveole è attiva soltanto in alcuni tipi di cellule, soprattutto endoteliali, muscolari e adipose. Le caveole prendono il nome dalla proteina che le origina, la caveolina, e consistono in piccole invaginazioni della membrana plasmatica ricche in glicosfingolipidi e colesterolo, e associate a particolari tipi di molecole, quali ad esempio proteine segnale (Shin et al., 2007). L'endocitosi mediata da caveole è una via di internalizzazione definita non-acida e non-digestiva, in quanto nelle caveole non si va incontro ad acidificazione del contenuto e in quanto non si ha la fusione delle vescicole con i lisosomi: il materiale endocitato può essere trasferito direttamente nell'apparato del Golgi o nel reticolo endoplasmatico. Gli esempi presenti in letteratura riguardo all'uptake delle nanostrutture mostrano come la cellula riesca ad utilizzare contemporaneamente anche più meccanismi diversi e come le caratteristiche delle nanostrutture influiscano notevolmente sul loro destino intracellulare. Oltre alle caratteristiche superficiali, che hanno un ruolo fondamentale nell'adesione cellulare, la carica superficiale è un'altra proprietà fondamentale nel determinare l'uptake cellulare delle NP: la membrana plasmatica presenta, infatti, una carica netta negativa per la presenza della fosfatidilserina nel foglietto interno ed inoltre la distribuzione degli ioni a cavallo della stessa membrana cellulare determina una polarizzazione positiva

verso l'ambiente esterno. Le NP anioniche sono quindi endocitate in quantità minore rispetto a quelle cationiche. L'influenza della presenza di cariche sulla superficie delle NP è stata comprovata anche da Roser (Roser et al., 1998), che ha dimostrato sperimentalmente come l'internalizzazione di NP, rivestite di albumina e caricate positivamente, da parte di monociti e macrofagi, risulta maggiore rispetto a quella del medesimo tipo di particelle ma prive di carica. In un'altra pubblicazione invece (Foged et al., 2005) è stato dimostrato come non ci sia un aumento dell'efficienza di internalizzazione da parte di cellule dendritiche di NP in polistirene caricate positivamente. L'evidente contraddizione presentata dai due diversi lavori supporta la tesi che non esistono regole fisse per i meccanismi utilizzati per l'uptake delle NP, ma semplicemente esiste una forte dipendenza dalle caratteristiche chimico-fisiche dei materiali e dal tipo di sistema cellulare utilizzato per gli esperimenti in vitro. Ad esempio, si è osservato come, a seconda del tipo cellulare con cui entrano in contatto le NP, vari la loro capacità di penetrare all'interno delle cellule: studi effettuati su macrofagi alveolari isolati da ratto dimostrano come NP di silice vengano rapidamente internalizzate grazie all'eccezionale capacità di tali cellule di fagocitare particelle esterne; al contrario, per le cellule di carcinoma polmonare umano (A549) la velocità di uptake risulta notevolmente inferiore (Jin et al., 2007). Queste cellule di origine polmonare possono essere coinvolte in meccanismi di internalizzazione diversi: tramite

diffusione semplice nel caso di microsferi fluorescenti di polistirene (Geiser et al., 2005), oppure tramite endocitosi mediata da clatrina, ad esempio per NP magnetiche rivestite di silice (Kim et al., 2006).

Numerosi lavori in letteratura si occupano dello studio di localizzazione di NP marcate con un fluoroforo o caricate con una sostanza fluorescente, mediante l'acquisizione di immagini al microscopio: il lavoro pubblicato da Savic dimostra come micelle di dimensioni nanometriche siano in grado di penetrare a livello di organelli citoplasmatici quali reticolo endoplasmatico (ER), Golgi, lisosomi e mitocondri, ma non a livello del nucleo (Savic et al., 2003).

In un altro lavoro (Godbey et al., 1999), invece, allo scopo di verificare se le NP siano effettivamente in grado di raggiungere il nucleo, è stato effettuato un legame con polietilammine fluorescenti (PEI). Questo complesso PEI-NP è in grado di attaccarsi a componenti della membrana cellulare ed entrare per endocitosi all'interno della cellula: qui si muove all'interno di vescicole verso il comparto nucleare, all'interno del quale viene infine rilasciato. Per definire le dimensioni massime che una NP deve avere per penetrare all'interno del nucleo attraverso il complesso del poro nucleare (NPC, nuclear pore complex) sono state scelte AuNP di dimensioni differenti (22, 26 e 36 nm). L'esperimento ha dimostrato che le NP più piccole sono in grado di entrare da sole nel nucleo, mentre quelle più grandi (fino a un

massimo di circa 39 nm) penetrano nei pori nucleari mediante il complesso

dell'importina (Panté et al., 2002).

Liposomi

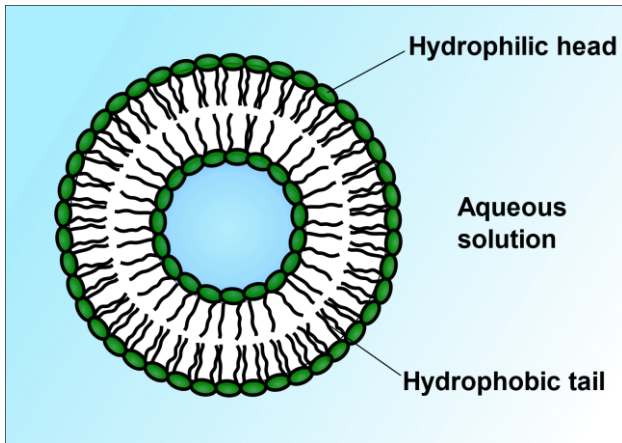


Figura 6: struttura liposoma

All'interno della cellula i liposomi sono vescicole fosfolipidiche di forma sferica (Figura 6) che possiedono una struttura molto simile alle membrane biologiche, con una fase acquosa centrale circondata da un doppio strato lipidico idrofobico. I liposomi vengono suddivisi in tre principali categorie in base alle dimensioni e alla lamellarità. I SUV (small unilamellar vesicles) hanno diametro compreso tra i 25 e i 50 nm e sono circondati da un unico strato lipidico; i LUV (large unilamellar vesicles) sono gruppi eterogenei di vescicole monostrato ma di dimensioni maggiori rispetto ai SUV; gli MLV (multi-lamellar vesicles) sono formati da numerosi strati lipidici separati tra loro da una soluzione acquosa.

TECNICHE DI CARATTERIZZAZIONE

La conoscenza di alcune caratteristiche basilari, inerenti morfologia, microstruttura, distribuzione di fase e composizione chimica, è essenziale per valutare le proprietà funzionali dei materiali. Per la caratterizzazione completa dei materiali micro e nano strutturati possono essere impiegate sia tecniche di imaging sia tecniche analitiche (Dini et al., 2015).

Fra le prime trovano larga applicazione la microscopia ottica, la microscopia elettronica a scansione (SEM) e la

microscopia elettronica in trasmissione (TEM).

Fra le seconde, alcuni tipi di spettroscopia e la Diffrazione a raggi X (XRD). Per ogni tipologia di materiale da caratterizzare la scelta della tecnica di elezione più appropriata è basata sulla tipologia dei dettagli che si vogliono ricavare e sulla loro scala.

In tabella 1 vengono riassunte le principali tecniche utilizzabili per la caratterizzazione.

Parametro	Tecnica
Dimensioni	TEM, SEM, AFM, SLS, DLS, FFF, NTRA, SEC, LD, UE, SMPS, FMPS
Forma	EM, DLS-SLS
Agglomerazione	TEM, SEM, AFM, SLS, DLS, FFF, NTA, SEX, LD
Composizione	ICP-AES, ICP-MS, SP ICP-MS, MS, F-AAS, Et-AAS, EM-EDX, EM-EELS
Concentrazione	FFF + Spettroscopia, EM, NTA, LIBD
Struttura cristallina	XRD, TEM-SAED
Area superficiale	BET
Carica superficiale	Titolazioni potenziometriche
Potenziale Zeta ζ	Misure elettrocinetiche
Potenziale redox superficiale	XPS
Funzionalizzazione della superficie	SPR

Tabella 1: tecniche di caratterizzazione

Le tecniche di imaging forniscono informazioni sulla morfologia e sulla nanostruttura dei nanomateriali (Oura et al., 2003). Tali tecniche richiedono l'utilizzo di un microscopio, che può

essere: ottico, e quindi basato sull'osservazione nell'ambito dello spettro elettromagnetico della luce in senso lato; elettronico, basato sull'utilizzo di una sorgente di elettroni; a

scansione di sonda, basato sull'esplorazione della superficie del campione con una sonda, o di altro tipo.

I microscopi ottici hanno una risoluzione molto inferiore rispetto alle altre due classi di microscopi menzionati, tuttavia i microscopi ottici confocale e a scansione in campo vicino (spesso indicato con le sigle NSOM Near-field scanning optical microscope o SNOM Scanning near-field optical microscope) hanno una risoluzione che li rende interessanti nell'ambito specifico dei NM, perché consentono in maniera semplice e veloce di ottenere informazioni riguardo la forma, le dimensioni e la topografia superficiale degli stessi NM. In campo biologico, per esempio, il microscopio ottico confocale consente di costruire un'immagine tridimensionale del campione analizzato

senza dover effettuare il sezionamento dello stesso (Pawley et al., 2006). Infatti, spostando il campione lungo l'asse verticale dopo ogni scansione, è possibile ottenere una serie di immagini successive corrispondenti a piani focali via via più profondi all'interno del medesimo campione.

La sovrapposizione ordinata di queste sezioni ottiche, eseguita via software, consente di ricostruire un'immagine complessiva dell'intero volume scansionato, in cui tutti i piani sono contemporaneamente a fuoco. La possibilità, quindi, di ricostruire un volume in maniera non distruttiva, rende il microscopio ottico confocale uno strumento molto interessante per l'analisi di materiali bulk e di coatings con strutture caratteristiche a livello nanometrico.

Microscopia Elettronica a Scansione (SEM)



Figura 7: Microscopio FEI QUANTA 200 FEG SEM
UNTURB-ARPAM

Il Microscopio Elettronico a Scansione (SEM) è spesso impiegato per studiare la morfologia e la microstruttura di NP, nanocompositi, film sottili, coatings e materiali massivi. Tale microscopio, infatti, è ottimale per analizzare dettagli di dimensioni variabili da pochi nanometri fino a 1 mm, fornendo informazioni riguardo la forma, la dimensione, la topografia, la disposizione e l'orientamento dei grani e la loro composizione. L'assenza d'aria, insieme al fatto che gli elettroni sono particelle cariche, comporta che i campioni analizzati subiscano dei forti effetti di caricamento che talora possono alterare il risultato dell'immagine.

Per questa ragione i campioni non conduttori vengono generalmente fissati

su un supporto metallico e metallizzati, cioè ricoperti con un sottile strato di materiale conduttivo, generalmente di oro o di carbone, a meno che non si utilizzi microscopia a bassa tensione o a basso vuoto.

Gli elettroni sono accelerati applicando un voltaggio generalmente da 1 a 30 kV e focalizzati, attraverso una serie di lenti magnetiche, sul campione. Il fascio di elettroni, detto primario, viene fatto muovere in modo da effettuare una scansione della superficie punto per punto, prendendo in considerazione una zona rettangolare della stessa.

Dall'interazione del fascio di elettroni con gli atomi che costituiscono il campione, vengono emessi fotoni ma soprattutto elettroni che possiedono diverse caratteristiche di direzionalità ed energia, a seconda del tipo di interazione che hanno avuto con la materia. Gli elettroni sono poi catturati da rivelatori speciali e convertiti in impulsi elettrici che sono inviati in tempo reale ad uno schermo, dove viene eseguita simultaneamente una scansione analogica. Il risultato è un'immagine in bianco e nero ad elevata risoluzione e grande profondità di campo, che ha caratteristiche simili a quelle di una immagine fotografica. Ciascun segnale fornisce una serie di informazioni di tipo morfologico e microstrutturale o composizionale (Figura 8).

Per le immagini dei campioni, il SEM utilizza gli elettroni secondari e gli elettroni retrodiffusi. I primi sono elettroni a bassa energia (circa 50 eV) che si generano quando un elettrone del

fascio primario scacca un elettrone da un atomo della superficie o sub-superficie del campione. Essi sono utilizzati per ottenere informazioni topografiche ad elevata risoluzione. L'interpretazione delle immagini è resa semplice dal fatto che il contrasto tra luci ed ombre, che si vede nell'immagine SEM (fatto salvo effetti di caricamento e contributi vari che possono alterare il contrasto), è molto simile a quello che si otterrebbe se il campione fosse illuminato con la luce. Gli elettroni retrodiffusi, invece, sono elettroni ad alta energia, prossima a quella del fascio primario. Sono generati dallo scattering elastico degli elettroni che rimbalzano indietro dal campione senza attraversarlo e vengono utilizzati per ricavare informazioni sulla densità atomica. La loro resa di emissione,

infatti, è sensibile al numero atomico medio dell'area che attraversano: più è alto il numero atomico medio, più intenso è il segnale.

Nell'immagine al microscopio elettronico, l'alta intensità del segnale si traduce in un'area di gradazione più chiara.

Tra i microscopi a scansione una particolare attenzione merita il microscopio elettronico a emissione di campo, in cui la definizione raggiunta è al livello subnanometrico (Field Emission Gun FESEM). Per le sue caratteristiche, questo tipo di microscopio è particolarmente indicato nello studio di materiali per cui sono richiesti alta definizione ed elevati ingrandimenti.

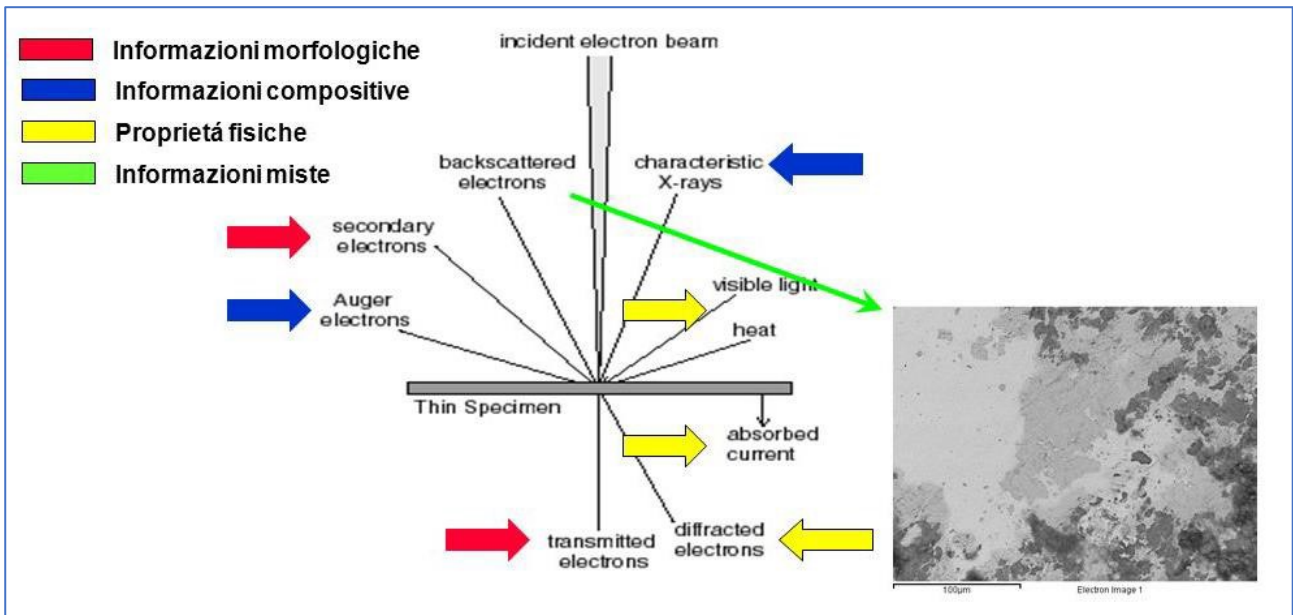


Figura 8: fasci elettroni ed informazioni

Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)

Il TEM utilizza gli stessi principi di funzionamento di un microscopio ottico solo che utilizza elettroni al posto della

luce, permettendo così ingrandimenti molto più elevati.

Il limite invalicabile del potere risolutivo del microscopio ottico è legato sostanzialmente alla lunghezza d'onda

della luce impiegata. Infatti, il potere risolutivo cresce proporzionalmente al decrescere della lunghezza d'onda della radiazione impiegata e la scoperta che gli elettroni possiedono una radiazione di bassissima lunghezza d'onda ha suggerito la possibilità di usare fasci di elettroni per ottenere poteri risolutivi assai elevati.

In linea di principio un microscopio elettronico opera come un normale microscopio ottico qualora si usasse luce con lunghezza d'onda bassissima. Poiché però i normali dispositivi ottici non deviano gli elettroni, si ricorre a lenti elettrostatiche o a lenti magnetiche che, agendo sulla carica elettrica degli elettroni, ne provocano la deviazione.

Il microscopio elettronico è essenzialmente composto da una sorgente elettronica di conveniente intensità (generalmente un filamento incandescente di tungsteno che emette elettroni per effetto termoelettronico) e da un dispositivo che imprime forti accelerazioni al fascio di elettroni emesso, sottoponendoli ad una elevata tensione in un range che va da 20 a 100 mila volt. Il fascio di elettroni accelerato attraversa un condensatore (elettrostatico o magnetico), incide sul campione, viene raccolto su un obiettivo (elettrostatico o magnetico) e passando attraverso un oculare va ad incidere o su uno schermo fluorescente o su una lastra fotografica formando l'immagine per l'osservazione visiva. Naturalmente

quanto descritto avviene nel vuoto ultraspinato assicurato da un sistema di pompe.

Come si è visto, il TEM risulta essere simile al SEM, in quanto entrambi impiegano un fascio di elettroni diretto sul campione. Questo significa che molte componenti come il cannone elettronico, le lenti condensatrici e il sistema di vuoto sono simili in entrambi gli strumenti. Tuttavia, i metodi con i quali queste immagini vengono prodotte ed ingrandite sono completamente differenti; mentre il SEM è principalmente utilizzato per lo studio delle superfici, il TEM fornisce informazioni circa la struttura interna del campione analizzato.

Lo spessore del campione deve essere sufficientemente sottile in modo da consentire che alcuni degli elettroni incidenti siano in grado di attraversarlo; durante tale attraversamento molti elettroni sono assorbiti ed altri, in corrispondenza a disuniformità di arrangemento atomico del cristallo, sono deviati irregolarmente.

Dopo che il fascio ha attraversato il campione, viene focalizzato da una lente "obiettivo" e quindi allargato e proiettato su uno schermo fluorescente. Le zone dello schermo che appaiono scure sono dovute appunto ad un'irregolare deviazione degli elettroni da parte delle dislocazioni della struttura cristallina del campione.

Quando il fascio incide sul campione, una parte degli elettroni del medesimo viene diffratta, deviando dalla direzione del fascio trasmesso, mentre la restante passa attraverso il provino indisturbata; sia il fascio trasmesso che quello diffratto passano attraverso una lente obiettivo che ha il compito di focalizzarli e creare così un segnale in grado di dare informazioni sul campione.



Figura 9: Microscopio TEM, Philips, CM 120

Utilizzando il microscopio, l'operatore può decidere di utilizzare il fascio diretto o quello diffratto, mediante un diaframma, per formare l'immagine sullo schermo; la cui riproduzione è dovuta a fenomeni di contrasto. Il termine contrasto si riferisce alle differenze di intensità che rendono distinguibili dallo sfondo le parti di un'immagine.

Il contrasto di diffrazione è dovuto all'uso del diaframma che permette il passaggio dei soli elettroni deviati secondo un certo angolo; questo significa che qualunque cosa crei delle alterazioni negli angoli del reticolo (presenza di dislocazioni, precipitati, inclusioni, difetti di vario genere) altera la diffrazione degli elettroni e crea fenomeni di contrasto che permettono di individuare la causa che ha creato la diffrazione sullo schermo. Dato che in assenza del provino l'immagine appare chiara, e che le imperfezioni reticolari (o i precipitati) che deformano il reticolo creano contrasti scuri, il modo di visualizzazione che usa il fascio diffratto si dice "campo chiaro" (BF = Bright Field). Analogamente si può posizionare il diaframma selezionando il passaggio del solo fascio diretto; così che ogni cosa che crei nel reticolo distorsioni altera le condizioni di diffrazione del fascio, dando origine a quei fenomeni di contrasto che permettono di vedere l'immagine sullo schermo.

In questo caso l'immagine appare scura e il contrasto provocato dal campione è chiaro; questa modalità di visualizzazione si dice "campo scuro" (DF = Dark Field).

Preparazione del campione per analisi in TEM

I passaggi per la preparazione del campione per la successiva analisi in TEM si possono riassumere secondo il seguente schema:

- 1) Campionamento. Il prelievo è l'operazione fisica con la quale si ottiene il campione da esaminare.

Deve essere eseguito da materiale biologico vivente.

- 2) Fissazione con aldeidi (Glutaraldeide in tampone fosfato pH 7.4, 2-4 ore, 4°C) o tetraossido di osmio. Le aldeidi formano crosslinks con gli amminoacidi del preparato, formando legami stabili e permanenti, ma non fissano i lipidi, per fissare le membrane è necessaria la postfissazione con tetraossido di osmio (OsO₄ pH 7.4, 2 ore a 4°C, al buio), che penetrando accentua le diverse densità e fornisce una prima colorazione, oltre a fissare i lipidi insaturi. La fissazione ha lo scopo di bloccare i processi degenerativi del tessuto prelevato, mantenere il più inalterata possibile la morfologia del campione, proteggere il campione da danni osmotici (swellingshrinking), limitare le alterazioni che potrebbero essere provocate dai successivi trattamenti (disidratazione, inclusione in resina...)
- 3) Deidratazione con lavaggi successivi in concentrazioni crescenti di etanolo, che permettono la sostituzione nel campione dell'acqua con liquidi con tensione superficiale minore.
- 4) Infiltrazione con solvente di transizione (ossido di propilene) miscibile con etanolo, acetone e resine epossidiche e reagendo diventa parte del polimero. La fase di infiltrazione consiste in una graduale sostituzione del

mezzo di transizione (acetone, ossido di propilene) in un mezzo di inclusione (resina). Il mezzo di transizione viene a poco a poco sostituito da soluzioni a concentrazione crescente di resina nel mezzo di transizione stesso, fino ad arrivare alla sola resina. Successivamente il campione è incluso in resina, un materiale abbastanza duro ed omogeneo tale da poter essere tagliato in fette molto sottili. Le resine epossidiche sono le più utilizzate per l'analisi ultrastrutturale.

- 5) Inclusione nella resina.
- 6) Sezionamento tramite microtomo in modo da ottenere sezioni sottili che verranno poste su retini (griglie metalliche 0,5 - 2 µm).
- 7) Colorazione del campionamento. Le sezioni (0,5 - 2 µm) sono colorate con blu-toluidina, le sezioni ultrasottili (70 - 100nm) sono colorate con acetato di uranile e citrato di piombo. La colorazione è una tecnica che cerca di amplificare le differenti capacità di assorbire elettroni da parte delle diverse strutture biologiche attraversate dal fascio. Il tessuto viene trattato con dei metalli pesanti, sostanzialmente uranio e piombo, capaci di legarsi preferenzialmente ad alcune strutture, rendendole meglio visibili.
- 8) Osservazione al TEM

Spettrometria a Dispersione di Energia o Microanalisi (EDS)

Lo spettrometro a dispersione di energia è generalmente integrato nel microscopio elettronico, sia esso TEM o SEM, perché offre l'enorme vantaggio di poter determinare la composizione locale dei materiali osservati al microscopio, attraverso un'analisi qualitativa e quantitativa puntuale. La microanalisi a raggi X, infatti, fornisce informazioni specifiche circa la composizione degli elementi del campione, in termini di quantità e distribuzione. Il fascio elettronico che investe il campione durante un'osservazione al SEM promuove la ionizzazione degli elettroni che appartengono agli orbitali più interni dell'atomo. Dal rilassamento che ne consegue vengono emessi dei raggi X che sono caratteristici dell'atomo da cui scaturiscono e, quindi, degli elementi che compongono il campione. Questi raggi X opportunamente registrati e discriminati sulla base della loro lunghezza d'onda o energia, consentono di determinare la composizione elementare del materiale analizzato, nella regione in cui è posizionata la sonda. Inoltre, l'intensità di queste radiazioni caratteristiche è proporzionale alla concentrazione dell'elemento nel campione, da cui è possibile ottenere anche un'analisi semi-quantitativa. Lo spettro si presenta con una serie di picchi la cui posizione e altezza relativa è caratteristica di un dato elemento. Materiali composti produrranno spettri EDS che sono la convoluzione delle

righe caratteristiche degli elementi che li costituiscono. L'EDS viene generalmente usato a supporto dell'osservazione dei campioni con elettroni retrodiffusi, per determinare la composizione chimica elementare nelle aree che già nell'immagine SEM mostrano un contrasto di colore.

Con appositi software è possibile realizzare le mappature per ogni singolo elemento che costituisce il campione. Al singolo pixel dell'immagine corrisponde un punto sulla superficie del campione dal quale è stato raccolto il segnale. La gradazione di colore è indice del numero di conteggi dei fotoni provenienti da tale punto caratteristici dell'elemento selezionato.

Sensore Elettroni Secondari

Il sensore GSED (Gaseous Secondary Electron Detector) è un rilevatore standard con tutti i sistemi ESEM. Viene utilizzato per l'imaging a umido generale e per l'imaging ad alta pressione con gas ausiliari. L'immagine è costituita dal segnale di elettroni secondari, e da un piccolo contributo della componente dovuta agli elettroni retrodiffusi. La condizione di vuoto utilizzata solitamente è di circa 0,8 mbar, ottenuta con vapore acqueo. Gli elettroni secondari danno un'informazione prevalentemente di tipo morfologico.

Sensore Elettroni Retrodiffusi

Anche il sensore LFD (Large Field Detector) è un rilevatore standard su tutti i sistemi ESEM ed è utilizzato per l'imaging della maggior parte dei campioni. Questo rilevatore viene

utilizzato nell'intervallo di bassa pressione da 0,1 Torr (14 Pa) a circa 1,5 Torr (200 Pa). Il segnale ottenuto dal sensore LFD è costituito principalmente da elettroni retrodiffusi (backscattered), così l'informazione restituita è principalmente di tipo chimico.

Diametro Medio Geometrico Ponderato

Il Regolamento CEN 761/2009 del 23 luglio 2009 pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea L220/1 del 24/8/2009 è reperibile presso il link web:

<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:220:0001:0094:IT:PDF>

Tale regolamento fornisce in Allegato II, A.22 un metodo semplificato per la determinazione del diametro medio geometrico ponderato rispetto alla

lunghezza (DMGPL o DLG 2ES) qui per brevità chiamato "metodo europeo" che recepisce la metodica ECB/TM/1(00) rev.2

Secondo i principi previsti dalla normativa europea vigente (All. VI del regolamento CLP) le fibre che hanno un diametro medio geometrico ponderato per la lunghezza $\leq 6 \mu\text{m}$ possono essere cancerogene di classe 1B (*Sostanze di cui si presumono effetti cancerogeni per l'uomo*) oppure di classe 2 (*Sostanze di cui si sospettano effetti cancerogeni per l'uomo*), a seconda del loro contenuto di ossidi alcalini ed alcalino terrosi:

All. VI del regolamento CLP, classificazione fibre potenzialmente cancerogene	
Categoria	Condizione
1B	se % ossidi alcalino-alcalino terrosi $\leq 18\%$ (fibre minerali)
2	se % ossidi alcalino-alcalino terrosi $> 18\%$ (lane minerali)

Si riporta il testo della Nota Q e della Nota R, come introdotte dalla Direttiva 97/69/CE e confermate da tutte le successive modifiche ed integrazioni.

Nota Q: *la classificazione "cancerogeno" non si applica se è possibile dimostrare che la sostanza in questione rispetta una delle seguenti condizioni:*

-una prova di persistenza biologica a breve termine mediante inalazione ha mostrato che le fibre di lunghezza superiore a $20 \mu\text{m}$ presentano un tempo di dimezzamento ponderato inferiore a 10 giorni

-una prova di persistenza biologica a breve termine mediante instillazione intra tracheale ha mostrato che le fibre di lunghezza superiore a $20 \mu\text{m}$ presentano un tempo di dimezzamento inferiore a 40 giorni

-un'adeguata prova intraperitoneale non ha rilevato un'eccessiva cancerogenicità

-una prova di inalazione appropriata a lungo termine ha portato alla conclusione che non ci sono effetti patogeni significativi o alterazioni neoplastiche.

Nota R: la classificazione "cancerogeno" non si applica alle fibre il cui diametro geometrico medio ponderato rispetto alla lunghezza meno due errori standard risulti maggiore di 6 µm."

Classificazione cancerogeni

Esistono diverse classificazioni delle sostanze come cancerogene, formulate da Enti che, sia a livello nazionale che a livello internazionale, si occupano di identificare e classificare i rischi di cancerogenicità. Tra questi:

- Commissione dell'Unione Europea (UE)
- International Agency for Research on Cancer (IARC), che pubblica le *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*
- US National Toxicology Program (Ntp), che pubblica con cadenza biennale il *Report on Carcinogens*

In Italia, il sistema di classificazione vigente a livello nazionale è quello dell'Unione Europea, stabilito dal regolamento (CE) n. 1272/2008 (CLP), che classifica le sostanze cancerogene e quelle mutagene in tre Categorie:

Categoria 1A	Sostanze di cui sono noti effetti cancerogeni per l'uomo
Categoria 1B	Sostanze di cui si presumono effetti cancerogeni per l'uomo
Categoria 2	Sostanze di cui si sospettano effetti cancerogeni per l'uomo

Mentre IARC individua 5 categorie:

- **Gruppo 1:** 'Cancerogeni umani': categoria riservata alle sostanze con sufficiente evidenza di cancerogenicità per l'uomo;
- **Gruppo 2:** è diviso a sua volta in due sottogruppi, denominati A e B:

Sottogruppo 2A – ‘Probabili cancerogeni umani’: categoria è riservata alle sostanze con limitata evidenza di cancerogenicità per l’uomo e sufficiente evidenza per gli animali. In via eccezionale anche sostanze per le quali sussiste o solo limitata evidenza per l’uomo o solo sufficiente evidenza per gli animali purché supportata da altri dati di rilievo.

Sottogruppo 2B – ‘Sospetti cancerogeni umani’: usato per le sostanze con limitata evidenza per l’uomo in assenza di sufficiente evidenza per gli animali o per quelle con sufficiente evidenza per gli animali ed inadeguata evidenza o mancanza di dati per l’uomo. In alcuni casi possono essere inserite in questo gruppo anche le sostanze con solo limitata evidenza per gli animali purché questa sia saldamente supportata da altri dati rilevanti.

- **Gruppo 3:** ‘Sostanze non classificabili per la cancerogenicità per l’uomo’: in questo gruppo sono inserite le sostanze che non rientrano in nessun’altra categoria prevista.
- **Gruppo 4:** ‘Non cancerogeni per l’uomo’: sostanze con evidenza di non cancerogenicità sia per l’uomo che per gli animali. In alcuni casi, possono essere inserite in questa categoria le sostanze con inadeguata evidenza o assenza di dati per l’uomo ma con provata mancanza di cancerogenicità per gli animali, saldamente supportata da altri dati di rilievo”.

Caratteristiche e composizione chimica di fibre inorganiche

Le fibre possono essere classificate in funzione della propria composizione chimica come organiche o inorganiche, in funzione della propria struttura fisica come amorfe o cristalline ed in funzione della propria origine, come naturali o sintetiche (ISO 14966:2002). Lo sviluppo di una determinata morfologia in un materiale può essere definito da varie cause.

Fibre di amianto

“Asbesto” o “Amianto” sono termini utilizzati per indicare un gruppo di fibre minerali, silicati cristallini, caratterizzati da un abito fibroso. Possono presentarsi naturalmente sia come singole fibre che in fasci. Le fibre di amianto possono essere classificate da un punto di vista mineralogico in amianti serpentini (crisotilo) e amianti anfiboli.

Composizione chimica dei tipi di amianto (% frazione di massa)

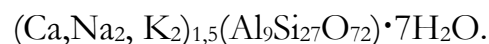
	Crisotilo	Amosite	Crocidolite	Antofillite	Tremolite	Actinolite
SiO₂	36-44	49-53	49-56	53-60	55-60	51-56
MgO	38-42	1-7	0-3	17-34	20-26	12-20
FeO	0-3	34-44	13-21	0-20	0-5	5-15
Fe₂O₃	0-5	0-5	13-20	0-5	0-5	0-5
Al₂O₃	0-2	0-1	0-1	0-3	0-3	0-3
CaO	0-2	0-2	0-3	0-3	10-15	10-13
K₂O	0-1	0-1	0-1	0-1	0-1	0-1
Na₂O	0-1	0-1	4-9	0-1	0-2	0-2
H₂O	12-14	2-5	2-5	1-6	1-3	1-3

Altre fibre minerali

Oltre le fibre di amianto esistono altre fibre minerali naturali caratterizzati da un reticolo cristallino che in particolari condizioni di morfogenesi porta ad un abito fibroso, come silicati (mullite Al₆Si₂O₁₃, willemite Zn₂SiO₄, sillimanite Al₂SiO₅, dumortierite

Al₇O₃(BO₃)(SiO₄)₃, pseudo-wollastonite CaSiO₃).

Sempre tra i silicati fibrosi vi sono numerose fibre del gruppo delle zeoliti, tra cui l'erionite:



Altre fibre minerali naturali sono i solfati, tra cui l'epsomite MgSO₄·7H₂O.

Dispersione cromatica in microscopia ottica

Il DM 6/9/94 fornisce un metodo per l'identificazione qualitativa delle fibre di amianto mediante la tecnica della dispersione cromatica in microscopia ottica. La tecnica della dispersione cromatica in microscopia ottica è particolarmente utile nell'identificazione delle particelle minerali. Il principio ottico su cui si fonda è la variazione dell'indice di rifrazione dei minerali in funzione della lunghezza d'onda della luce che li attraversa; con l'aumentare di questa generalmente l'indice di rifrazione diminuisce. Quando gli indici di rifrazione del minerale e del liquido in cui viene immerso, sono prossimi, in luce bianca, si producono fenomeni cromatici tanto più evidenti quanto più grande è la variazione dell'indice di rifrazione del liquido rispetto a quella del minerale.

Le fibre di amianto, ad eccezione dell'antofillite che cristallizza nel sistema ortorombico, cristallizzano nel sistema monoclinico e sono birifrangenti. Le fibre di amianto hanno generalmente indice di rifrazione n_γ parallelo alla direzione allungata della fibra, mentre l'indice di rifrazione minore n_α si trova nella direzione perpendicolare, ad eccezione della crocidolite che indici invertiti. Di conseguenza, immergendo le fibre in liquidi ad indice di rifrazione nota, in luce polarizzata, si potranno osservare effetti cromatici caratteristici di ogni singolo indice di rifrazione. Per identificare i diversi tipi di amianto si utilizzano indici di rifrazione specifici

(vedere tabella Indici di dispersione, allegati). Questo tipo di preparazione è realizzabile sia in campo chiaro che in campo scuro.

Il limite del potere risolutivo ($0,25 \mu\text{m}$) della tecnica rende difficile la valutazione di fibre con diametro inferiore a $0,5 \mu\text{m}$, inoltre la profondità di campo limitata rende complicato focalizzare fibre non perfettamente poste sul piano del microscopio o tra loro aggregate con sovrapposizione di aloni, tale limite non rappresenta un problema nella maggior parte dei casi (Cavariani, 2010), in quanto i componenti fibrosi estratti dalla matrice dei più diffusi materiali contenenti amianto MCA (come amianto-cemento, freni/frizioni, coibenti, cartoni, ecc.) hanno diametri molto maggiori, mentre in casi diversi come fasci di fibre naturali aggregati nella matrice rocciosa, o anche per casi di utilizzo tecnologico particolari (pavimenti in vinil amianto, con fibre molto piccole), può essere più utile ricorrere a tecniche di microscopia elettronica che utilizzare preparative complesse per estrarre e fibre e prepararle per la lettura, anche considerando la relativa tossicità.

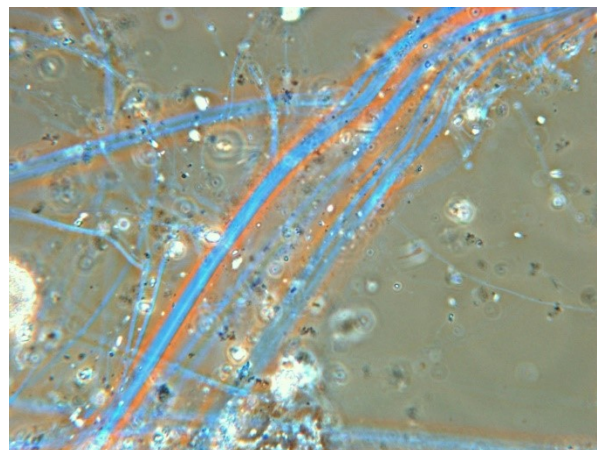


Figura 10: Fibre di crisotilo in campo chiaro (concessa da ARPAM)

SVILUPPO METODO MISURA DIAMETRO MEDIO GEOMETRICO PONDERATO

Introduzione

Questo metodo descrive una procedura per misurare il diametro medio geometrico medio rispetto alla lunghezza (DLGS-2ES) di fibre minerali. Il valore DLGS ha 95% di probabilità di ricadere nell'intervallo $DLGS \pm 2 SE$ (Standard Error). Il valore ottenuto con questo metodo sarà il limite inferiore di tale intervallo, ovvero il valore statisticamente più cautelativo. Questo metodo è basato su un aggiornamento del Giugno 1994 di una bozza di protocollo concordato in ambito della sicurezza sui luoghi di lavoro tra ECFIA (European Ceramic Fibres Industry Association) e l'agenzia britannica HSE (Health and Safety Executive). Tale bozza è stata sviluppata tramite un confronto interlaboratorio (Burdett, 1994). Tale metodo, nato per la caratterizzazione dimensionale delle FAV (Fibre Artificiali Vetrose) è stato qui implementato anche per la caratterizzazione di fibre minerali naturali, che possono avere anche diametri medi inferiori, caratteristica che può rendere necessarie variazioni nei passaggi.

Ponderare per la lunghezza ha lo scopo di compensare l'effetto della distribuzione dei diametri dovuta alla rottura delle fibre, conseguenza del campionamento e della manipolazione del campione. Statistiche geometriche

sono utilizzate per misurare la distribuzione del diametro, in quanto questi diametri solitamente hanno una distribuzione che si approssima con la distribuzione log normale. Infatti, in generale i diametri delle fibre non hanno una distribuzione normale, tuttavia è possibile ottenere una distribuzione che si avvicina a quella normale effettuando una trasformazione logaritmica.

Misurare la lunghezza di fibre, naturali e sintetiche, può richiedere notevole dispendio di tempo e di risorse, ma se queste fibre toccano una linea centrale, infinitamente sottile, posizionata centralmente rispetto al campo visivo del SEM, allora la probabilità di selezionare una determinata fibra è in prima approssimazione proporzionale alla sua lunghezza. In questo modo l'unica misura richiesta è quella del diametro ed il DLGS-2S può essere calcolato come descritto successivamente.

In questo lavoro, la conferma metrologica dei risultati e delle misure è stata effettuata utilizzando come riferimento il reticolo certificato Geller MRS-3.1-XY, s.n. R30-189.

Definizioni

Particella: Un oggetto con un rapporto lunghezza/larghezza < 3

Fibra: Un oggetto con un rapporto lunghezza/larghezza ≥ 3

Standard e Riferimenti

Non sono necessari standard di riferimento dimensionali, ma il laboratorio deve disporre di una griglia dimensionale di riferimento e procedere con la norma ISO 16700: 2016 “Microbeam analysis — Scanning electron microscopy — Guidelines for calibrating image magnification” per la calibrazione dell’ingrandimento.

Principio del metodo

Una certa quantità di materiale fibrosa rappresentativa viene prelevata per la caratterizzazione dimensionale. Le fibre sfuse sono ridotte in lunghezza utilizzando una procedura di frantumazione e quindi una sub aliquota rappresentativa viene dispersa in acqua. Successivamente la soluzione ottenuta viene filtrata tramite filtri in polycarbonato (PC) con dimensione dei pori di $0,2 \mu\text{m}$. Quindi il campione ottenuto viene preparato per l'esame

tramite SEM. I diametri delle fibre sono misurati con un ingrandimento dello schermo fino a $10000\times$. Per fibre con diametro di circa $6\mu\text{m}$ può essere sufficiente un ingrandimento di circa $5000\times$.

Si conteggiano e misurano solo le fibre che intersecano una linea sottilissima centrale rispetto al campo visivo dell’immagine SEM (linea che divide il campo di visione in due parti orizzontalmente). Si misura il diametro nel punto più vicino possibile al punto di intersezione.

L’intervallo di confidenza inferiore al 95% (basato su un test unilaterale) viene calcolato per fornire una stima del valore più basso del diametro geometrico medio delle fibre del materiale.

Campo di applicazione

Il metodo è progettato per caratterizzare le distribuzioni di diametro che hanno diametri medi da $0,5 \mu\text{m}$ a $6 \mu\text{m}$. Per diametri maggiori si possono utilizzare ingrandimenti SEM inferiori, mentre il metodo risulta limitato per le fibre più sottili, con un diametro inferiore ai $5 \mu\text{m}$, per i quali può essere necessario ricorrere a misure tramite TEM.

DESCRIZIONE DEL METODO

Precauzioni

Occorre limitare l'esposizione personale alle fibre aerodisperse, che deve essere ridotta al minimo. Per la manipolazione è necessario utilizzare una cappa chimica con filtri assoluti, o meglio una cappa a flusso laminare. Si raccomanda l'utilizzo di DPI adeguati (Maschere FFP3, guanti, occhiali protettivi). Le fibre devono essere spostate tra aree di campionamento, preparativa e analisi tramite contenitori chiusi.

Deve essere effettuato un monitoraggio periodico dell'esposizione personale e degli ambienti per determinare l'efficacia del controllo dei metodi, anche al fine di evitare problematiche di tipo “cross-contamination”.

Strumentazione necessaria

- Pressa (capace di produrre pressione di almeno 10 Mpa).
- Filtri da 0,2 μm , sotto filtri da 5 μm . Il diametro dei filtri consigliato è tra 25 mm e 47 mm.
- Sistema di filtraggio adeguato ai filtri impiegati.
- Acqua ultrapura appena prodotta, o in caso filtrata tramite filtri 0,2 μm per evitare la presenza di microorganismi.
- Metallizzatore (sputter con oro o oro/palladio).
- Spatole, pinzette da microscopia, bisturi, colla con grafite, dischetti biadesivi per stub da SEM, stub da SEM.
- Bagno ad ultrasuoni

Procedimento

Campionamento

Pressione 10 MPa

Il campionamento non è parte dello sviluppo di questo metodo di misura, ma deve essere effettuato in modo rappresentativo del campione da caratterizzare.

Una quantità di qualche grammo di campione viene preparata e sottoposta ad una pressione di circa 10 MPa per un tempo di 10 minuti, l'operazione può essere anche ripetuta, avendo cura di mischiare tra i passaggi le fibre con una spatola.

Preparazione del campione

0,200 g-0,500 g

Se è necessario rimuovere parte organica, si può ricorrere all'utilizzo di muffola, inceneritori al plasma o stufe. Il campione può essere sottoposto ad una temperatura di 450°C per 60 minuti. Occorre valutare se la temperatura può cambiare la morfologia e la composizione chimica delle fibre.

100 ml H₂O

Utilizzando una spatola, aggiungere una piccola quantità (<0,5 g) di campione a 100 ml di acqua ultrapura filtrata. Disperdere completamente utilizzando una sonda a ultrasuoni funzionante a 100 W di potenza e regolata in modo che avvenga la cavitazione. Al termine di questa operazione il campione deve essere conservato in una beuta con tappo.

Aliquote 1 – 5 ml

Nel minor tempo possibile prelevare dalla soluzione volumi variabili di questa, da 1 ml a 5 ml per il successivo filtraggio. Il volume prelevato è funzione della concentrazione di fibre nella soluzione. Una concentrazione troppo elevata di fibre può rendere difficoltosa l'analisi in SEM e richiedere quindi volumi inferiori da filtrare, al contrario una soluzione con una bassa concentrazione può rendere necessario aumentare i volumi di campionamento.

Filtraggio

Filtrare tramite filtri da 0,2 μm posizionati su sotto filtri con pori da 5 μm . Il filtraggio deve essere lento, in modo che le fibre possano distribuirsi in modo omogeneo sulla superficie del filtro. Al termine dell'operazione rimuovere il filtro e posizionarla in un portafiltro per la successiva essiccazione in essiccatore.

Il filtro può essere letto successivamente nella sua interezza o se preferibile letto in una sua parte ottenuta tramite taglio con bisturi. Le parti rimanenti possono essere lette successivamente e conservate per precauzione.

Metallizzazione

Il filtro, o sua parte, viene posto su uno stub di alluminio per la successiva lettura al SEM. Tra stub e filtro si può usare colla conduttiva alla grafite o dischetto biadesivo di grafite. Lo stub con il filtro sopra posizionato deve essere metallizzato con uno strato di oro (o oro/platino) di 40-50 nm. **La metallizzazione può non essere necessaria per le fibre di diametro medio maggiore, a meno del manifestarsi di problemi di carica elettrostatica durante la visione in SEM.**

Controllo SEM

Preparazione SEM

Il corretto funzionamento del SEM e del sistema di ingrandimento deve essere controllato con opportuna frequenza tramite reticolo di misura certificato (accettabilità del $\pm 2\%$ rispetto al valore certificato). Il SEM deve poter risolvere almeno 0,2 μm a 2000x.

L'ingrandimento opportuno (almeno 5000x), la velocità di scansione (per esempio 5 secondi per frame), la tensione del fascio elettronico (10-30 kV), la dimensione di spot, e le condizioni di vuoto devono essere valutate in modo da avere un'immagine sufficientemente nitida per il successivo calcolo dimensionale. Ciascuna immagine

ottenuta (ovvero, ciascun campo visivo) non deve contenere un numero eccessivo di fibre per permetterne la distinzione accurata ed il conteggio.

Analisi SEM

Raccolta Immagini

Occorre valutare la densità delle fibre a bassi ingrandimenti. In caso di aggregazione eccessiva si consiglia di preparare un nuovo campione. Per l'accuratezza statistica è necessario misurare un numero minimo di fibre sebbene un'elevata densità di fibre possa sembrare desiderabile, poiché l'esame dei campi vuoti richiede tempo e non contribuisce all'analisi. Tuttavia, se il filtro è sovraccarico, diventa difficile misurare tutte le fibre misurabili e, poiché le fibre piccole possono essere oscurate da quelle più grandi, possono essere perse.

Una sovrastima del diametro medio può derivare da densità delle fibre superiori a 150 fibre per millimetro lineare. D'altra parte, basse concentrazioni di fibre aumenteranno il tempo di analisi ed è spesso conveniente preparare un campione con una densità di fibre maggiore. La densità ottimale delle fibre dovrebbe fornire una media di circa 3 o 4 fibre numerabili per campo visivo a 5000x, ma queste valutazioni sono funzione del tipo di fibra e anche dell'esperienza dell'operatore oltre che conseguenza della distribuzione dimensionale naturale del campione.

Misura dei diametri

Conteggio

Vengono contate solo quelle fibre che toccano (o attraversano) una linea (infinitamente) sottile tracciata sullo schermo del SEM. Ogni fibra che tocca o attraversa questo punto ha il suo diametro misurato e conteggiato.

Maggiore è il numero di fibre conteggiate e migliore è la validità del dato ottenuto. In microscopia elettronica l'area del filtro ispezionata è solitamente 1 mm², area che si può ottenere leggendo per esempio 52 campi con ingrandimento 2000x, 104 a 4000x e così via. Ogni fibra viene misurata solo una volta nel punto più vicino possibile al punto di intersezione con la linea.

Il dimensionamento può essere effettuato on-line o off-line su immagini o fotografie archiviate. Ogni fibra deve essere misurata una sola volta per campo visivo.

Elaborazione dei dati

Elaborazione

Calcolare la media aritmetica ($\overline{\ln D}$) e la deviazione standard ($SD_{\ln D}$) dei valori logaritmici in base e ($\ln D$) dei diametri (D) delle n fibre:

$$(1) \overline{\ln D} = \frac{\sum \ln D}{n}$$

$$(2) SD_{\ln D} = \sqrt{\frac{\sum (\ln D - \overline{\ln D})^2}{n-1}}$$

La deviazione standard è divisa per la radice quadrata del numero di misurazioni effettuate (n) per ottenere l'errore standard ($ES_{\ln D}$):

$$(3) ES_{\ln D} = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

Sottrarre due volte l'errore standard della media e calcolare l'esponenziale di questo valore (media meno due errori standard) per ottenere la media geometrica meno due errori standard geometrici:

$$(4) DMGOPL - 2ES = e^{(\overline{\ln D} - 2ES_{\ln D})}$$

Confronto Dati

Per il calcolo del diametro medio della fibra di asbestoferrite, sono state misurate 406 fibre, per verificare nello stesso campione di lettura, in modo indipendente dalla preparativa, sono state selezionate in modo casuale (algoritmo Mersenne Twister del software Microsoft Excel) un numero crescente N di letture di fibre diverse tra quelle lette, ottenendo i seguenti valori:

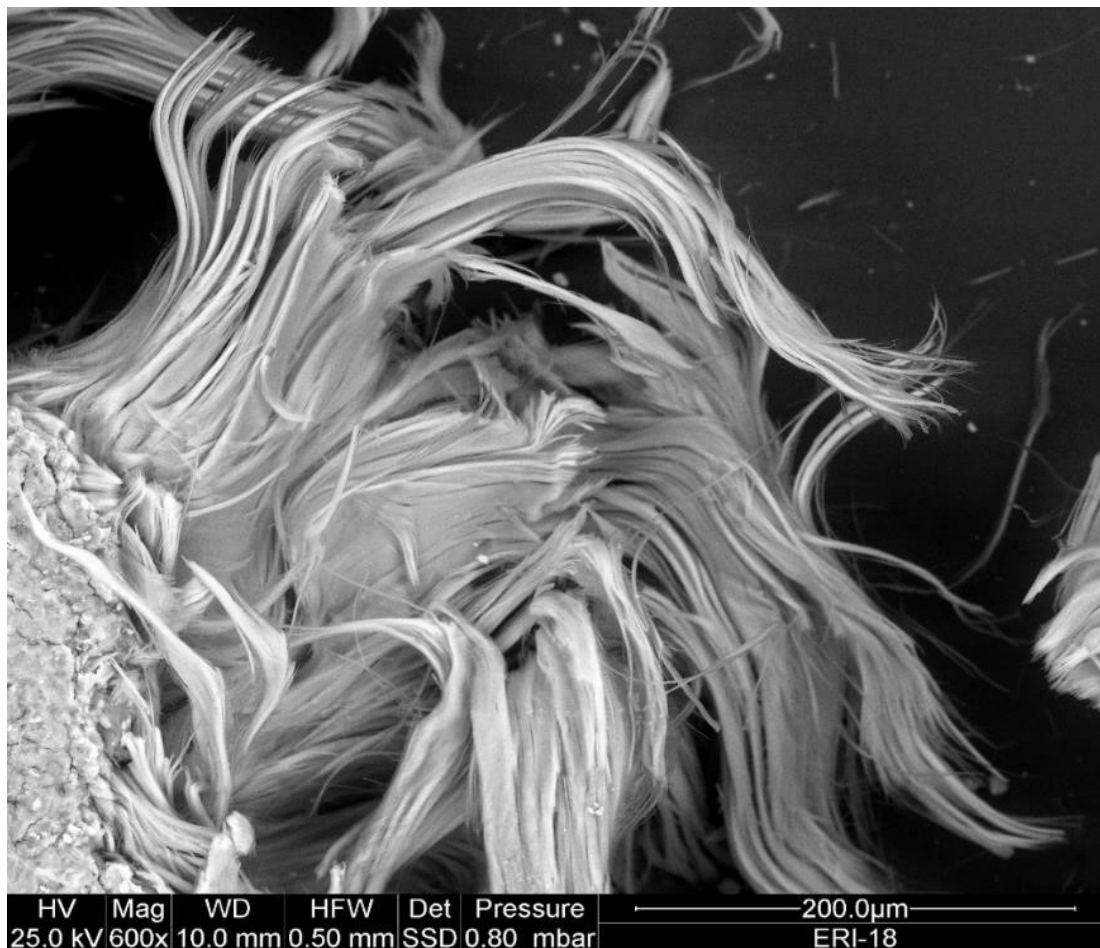
N (numero fibre)	ES Errore Standard ln(D)	DMGPL-2ES (micron)	2Δ Doppio scarto tipo composto (micron)
100	0.080	0.955	0.152
200	0.056	0.971	0.109
300	0.048	0.992	0.095
406	0.039	1.015	0.080

Dal confronto dei dati si evince come a parità di condizioni di lettura e di preparativa, il numero di letture non influisca in modo importante sulla lettura finale, a conferma di ciò si può prendere come limite di accettabilità per lo scarto il 10% del valore limite di riferimento (6 micron), ottenendo quindi come primo criterio di accettabilità il valore 0,6 micron che risulta sempre superiore al valore 2Δ (doppio scarto tipo composto, ottenuto dal prodotto tra il valore del DMGPL-2ES e il valore ES). Tale valore 2Δ è preso come riferimento per l'errore sulla misura.

Per quanto detto, sempre confrontandosi con il valore di riferimento, può non essere necessario conteggiare un elevato numero di fibre.

FIBRE ANALIZZATE

Erionite



Erionite 600x – Immagine d'insieme, condizioni di basso vuoto, sensore Backscattered Electron Detector SSD-BSD

L'erionite (numero di registro CAS: 66733-21-9) è un minerale fibroso presente in natura che appartiene a un gruppo di minerali idratati di silicato di alluminio chiamati zeoliti. La sua formula cristallografica è $(\text{Na}_2, \text{K}_2, \text{Ca}, \text{Mg})_{4.5}\text{Al}_9\text{Si}_{27}\text{O}_{72} \cdot 27\text{H}_2\text{O}$ (IARC, 1987a).

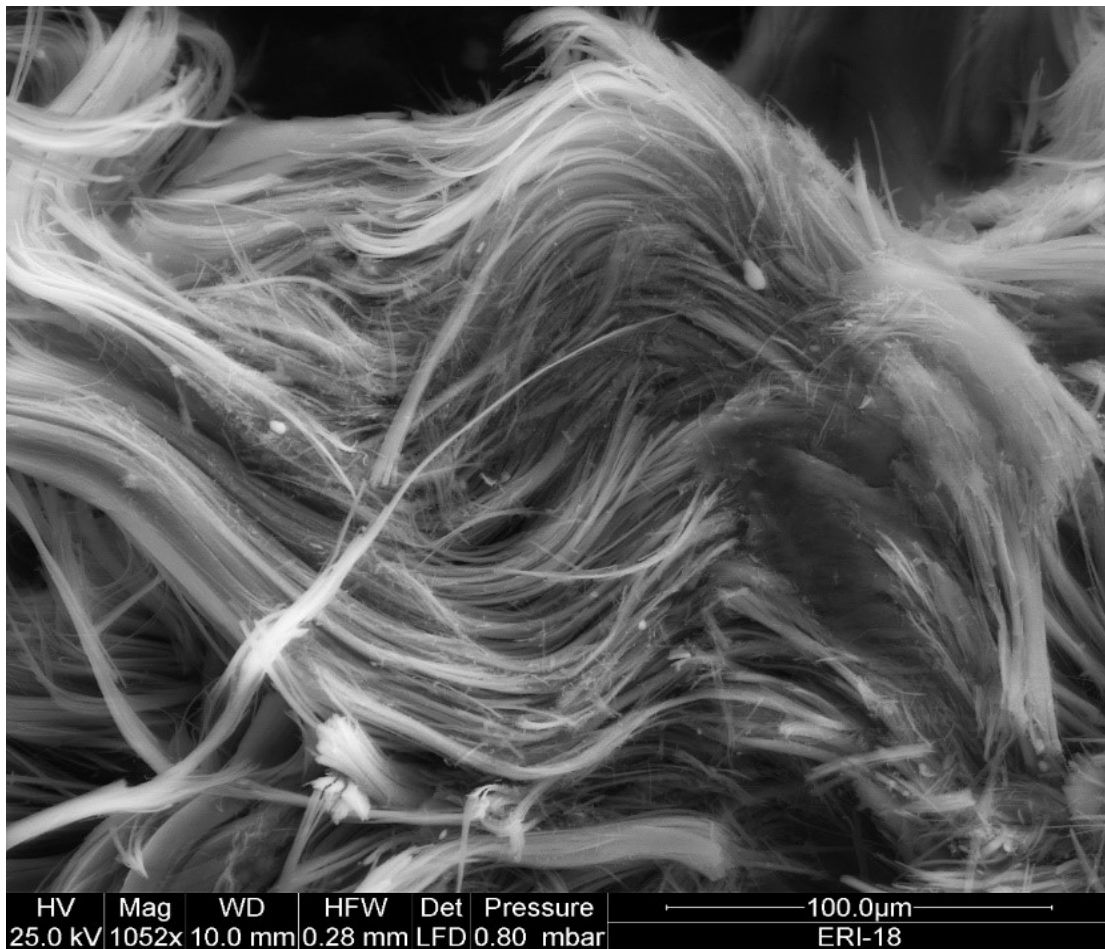
Depositi di erionite sono stati registrati in Antartide, Europa (Austria, Repubblica Ceca, Francia, Germania, Italia), Africa (Kenya, Repubblica Unita di Tanzania), Asia (Repubblica di Corea,

Giappone), Nord America (USA, Canada, Messico), così come Georgia, Islanda, Nuova Zelanda, Federazione Russa, Scozia e Turchia. In Italia, l'erionite è stata segnalata in Sardegna e Veneto. L'erionite investigata in questo lavoro proviene da Lander County, Nevada, USA.

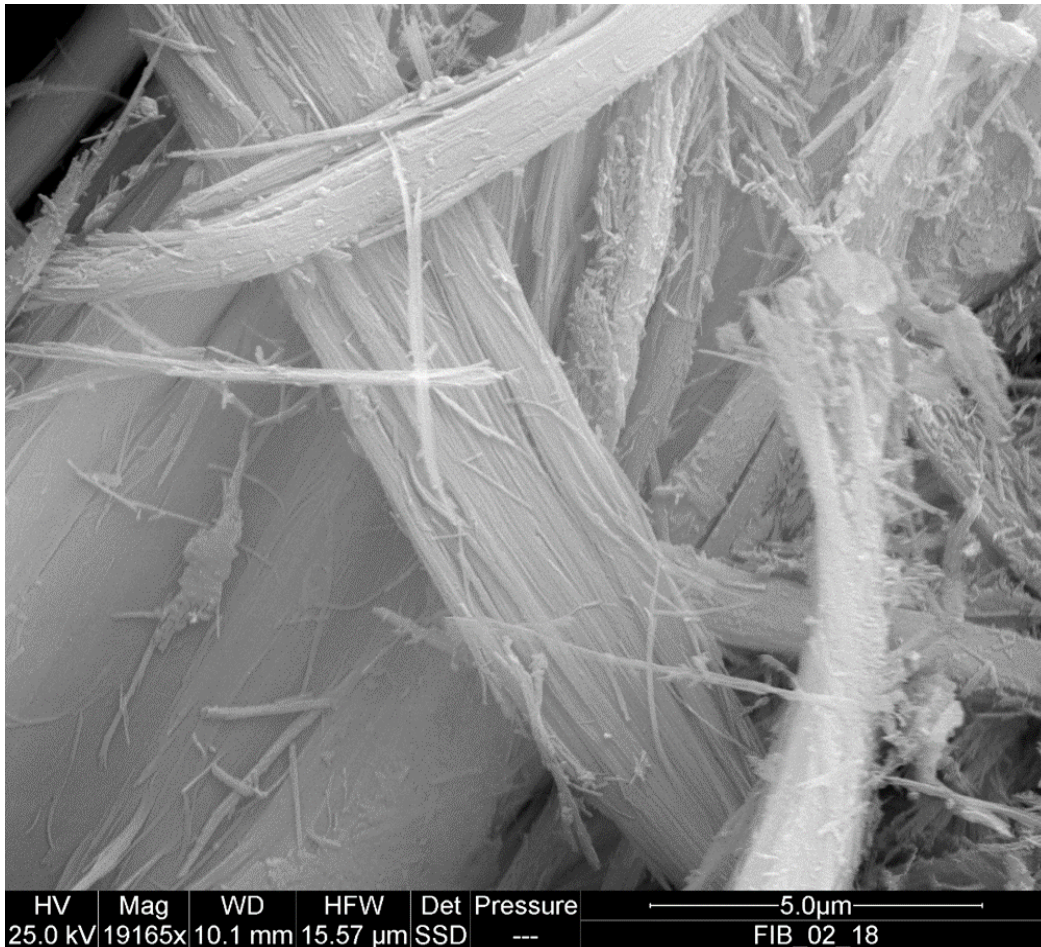
L'erionite ha una morfologia simile a quella dell'amianto anfibolo, ma proprietà chimiche e fisiche differenti.

La morfologia dei "fasci" di erionite costituiti da molte "fibre" che a loro volta si dividono in "fibrille" più sottili migliora drasticamente il rapporto superficie-area-volume. L'erionite è stata analizzata mediante microscopia elettronica a scansione ambientale (ESEM, FEI Quanta 200 FEG).

È stata raccolta una prima di serie di immagini in condizioni di basso vuoto, poiché la struttura è caratterizzata da fibre estremamente sottili anche con bassi potenziali di accelerazione del fascio non si possono raggiungere elevati ingrandimenti.



Erionite 1052x – Immagine d'insieme, condizioni di basso vuoto, sensore Large Field Detector (LFD)



Erionite 19165x – particolare, condizioni di alto vuoto vuoto, sensore SSD

La metallizzazione del campione, nell'immagine soprastante, permette di raggiungere ingrandimenti maggiori in condizioni di alto vuoto.

Per l'Organizzazione Mondiale della Sanità (World Health Organization) si considera come "fibra regolamentata" una parte di materia avente rapporto

lunghezza/diametro $L/\varnothing \geq 3$ (definizione di fibra), con una lunghezza $L \geq 5 \mu\text{m}$ ed un diametro $\varnothing < 3 \mu\text{m}$. [OMS: Determination of airborne fibre number concentrations, 1997].

Lunghezza fibre > 4 μm	Spessore fibre < 1 μm
8-32%	97-100%
[La fibra è persistente in sistemi biologici]	[La fibra è inalabile]

Caratteristiche dimensionali Erionite (IARC Monographs (2012) Vol. 100C Erionite)

Le condizioni comuni di analisi in SEM sono state:

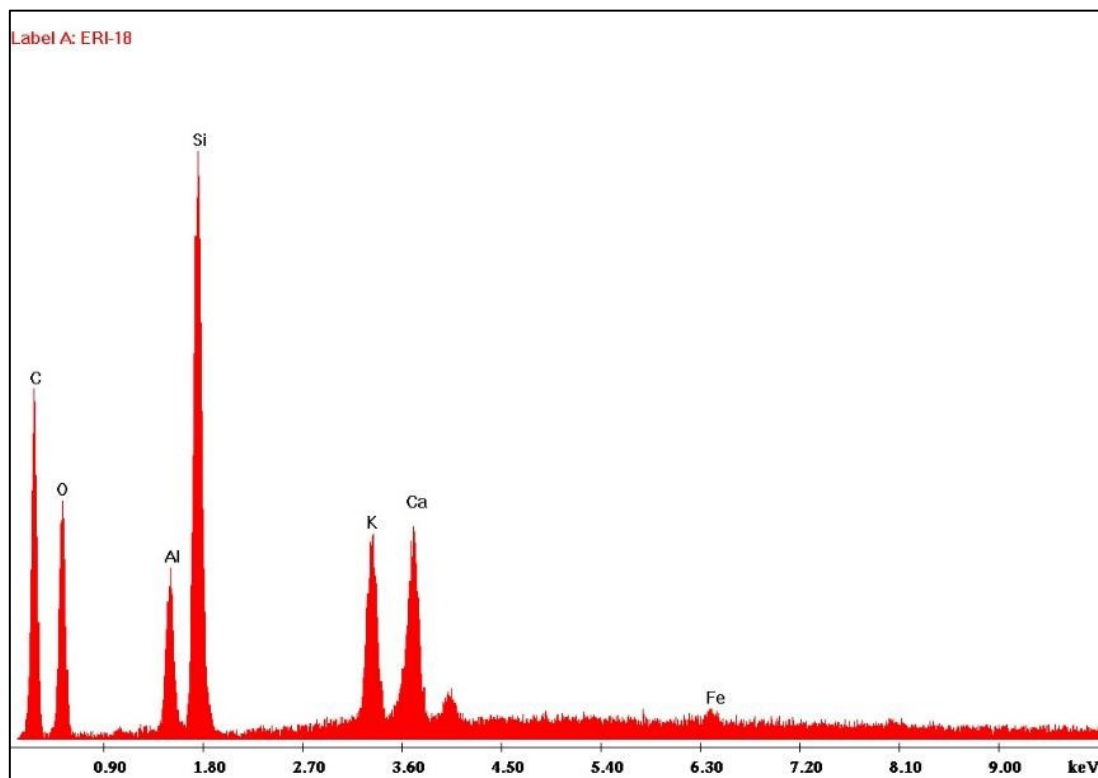
- working distance: 10 mm,
- tilt angle: 0°

La caratterizzazione chimica tramite EDX è stata eseguita operando in

condizioni di basso vuoto con potenziali di accelerazione tra i 10 ed i 25 kV (informazione chimica).

In condizioni di alto vuoto con potenziali fino a 25 kV si sono ottenute immagini ad ingrandimenti maggiori (informazione morfologica).

Caratterizzazione chimica



Spettro EDXS dell'Erionite

L'analisi chimica elementare è stata effettuata su aree diverse del campione tal quale, per considerare tra loro conformi i risultati sono stati accettati

solo i punti con un rapporto Si/Al simile (media $\pm 3\sigma$ con σ = deviazione standard):

Erionite	Area 1	Area 2	Area 3	Area 4	Media	Deviazione Standard
Element	At %	At %	At %	At %	At %	
C	65,17	21,08	11,33	9,48	26,77	
O	23,99	52,39	40,75	50,94	42,02	
Mg	0,00	0,00	0,54	0,00	0,14	
Al	1,59	5,46	8,16	7,35	5,64	
Si	5,39	18,46	30,76	26,50	20,28	
K	1,76	1,35	4,20	3,08	2,60	
Ca	1,86	1,26	3,79	2,64	2,39	

Erionite	Area 1	Area 2	Area 3	Area 4	Media	Deviazione Standard
Fe	0,25	0,00	0,47	0,00	0,18	
Si/Al	3,39	3,38	3,77	3,61	3,54	0,19
Tot	100,01	100,00	100,00	99,99	/	/

Da cui si ottiene la seguente percentuale di ossidi:

Ossido	%
MgO	0,31
Al ₂ O ₃	16,1
SiO ₂	68,4
K ₂ O	6,9
CaO	7,5
Fe ₂ O ₃	0,8

La formula cristallografica dell'erionite prevede un contenuto di acqua pari a circa il 18,5%, introducendo questo contributo si ottiene la seguente composizione in ossidi:

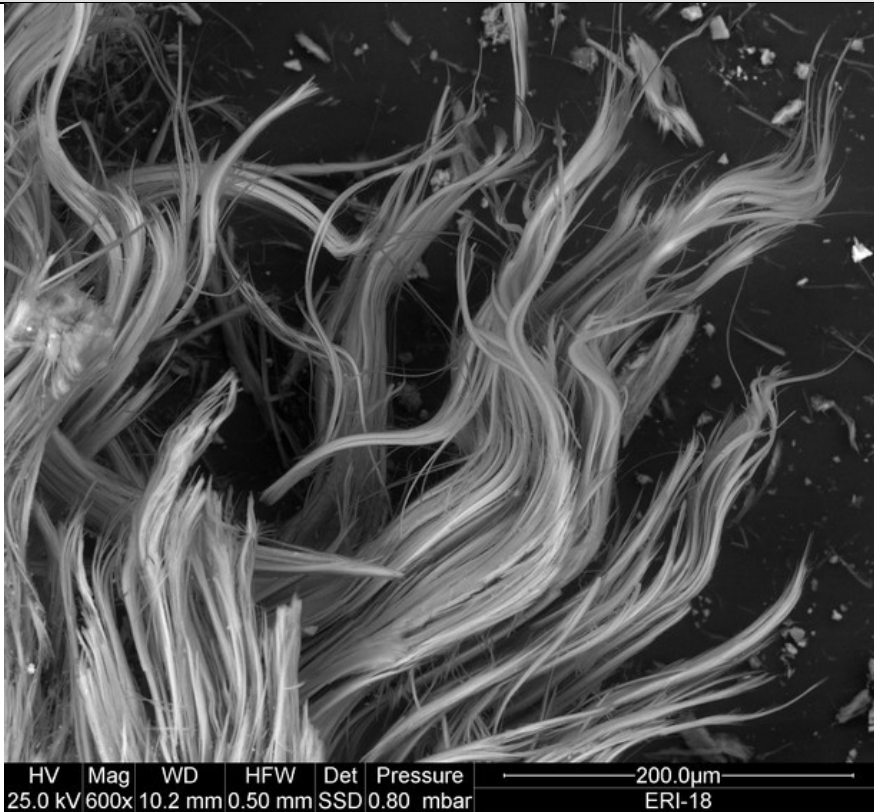
Ossido	%
MgO	0,3
Al ₂ O ₃	13,2
SiO ₂	55,7
K ₂ O	5,6
CaO	6,1
Fe ₂ O ₃	0,7
H ₂ O	18,5 (teorico)

La caratterizzazione morfologica dell'erionite, tramite ESEM, ha confermato la distribuzione attesa della dimensione delle fibre e del diametro medio a causa del loro potenziale rischio cancerogeno.

L'erionite è caratterizzata da un abito estremamente fibroso con fibre lanose, di diametro di circa 1 µm e lunghezze variabili, e con fibrille di circa 0,1 µm di diametro. Le loro piccole dimensioni ne possono favorire la profonda penetrazione nel sistema biologico. La distribuzione di ossidi media è compatibile con la forma Erionite-Ca.

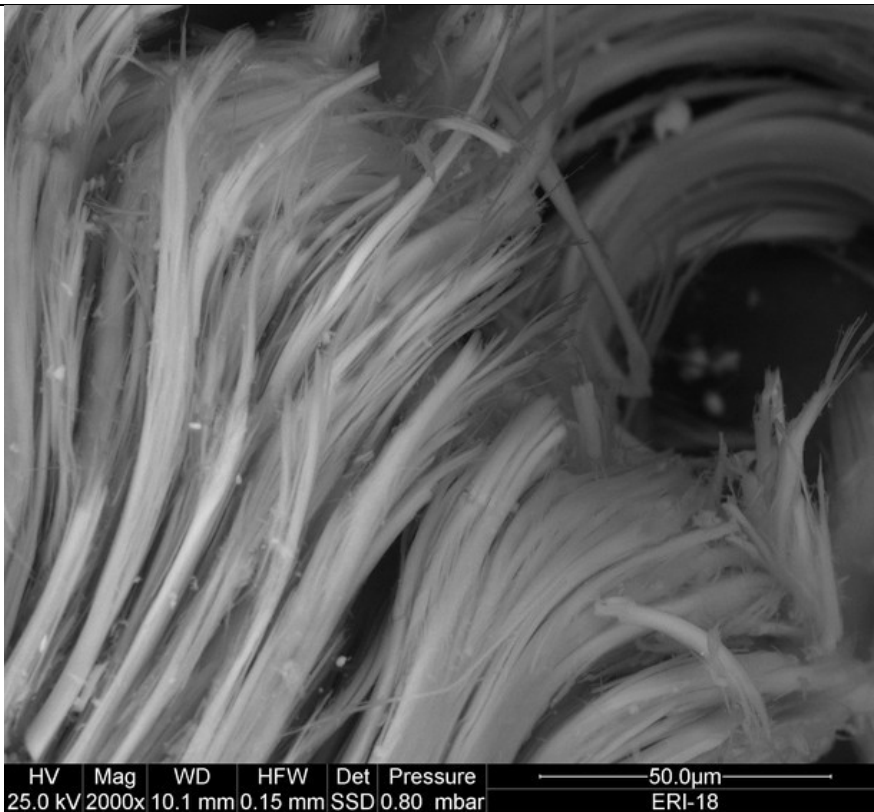
Il protocollo per il calcolo del diametro medio ponderato per la lunghezza non è applicabile alla fibra, in quanto caratterizzata da abito fibroso estremamente fine, e quindi richiedente l'utilizzo di microscopia a trasmissione (TEM) per la misura accurata.

Immagini Erionite



Erionite-Figura 1, 600x:

visione d'insieme; l'aspetto della fibra è naturalmente lanoso; basso vuoto; SSD, campione tal quale non metallizzato.



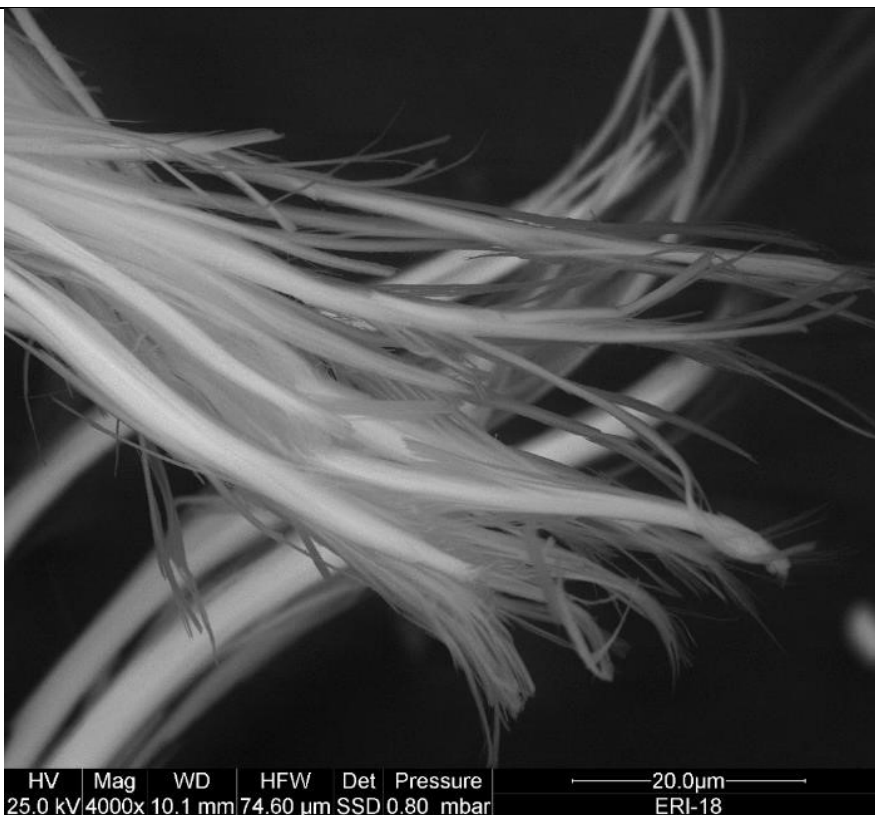
Erionite-Figura 2, 2000x:

fibrille; basso vuoto; SSD, campione tal quale non metallizzato.

Immagini Erionite

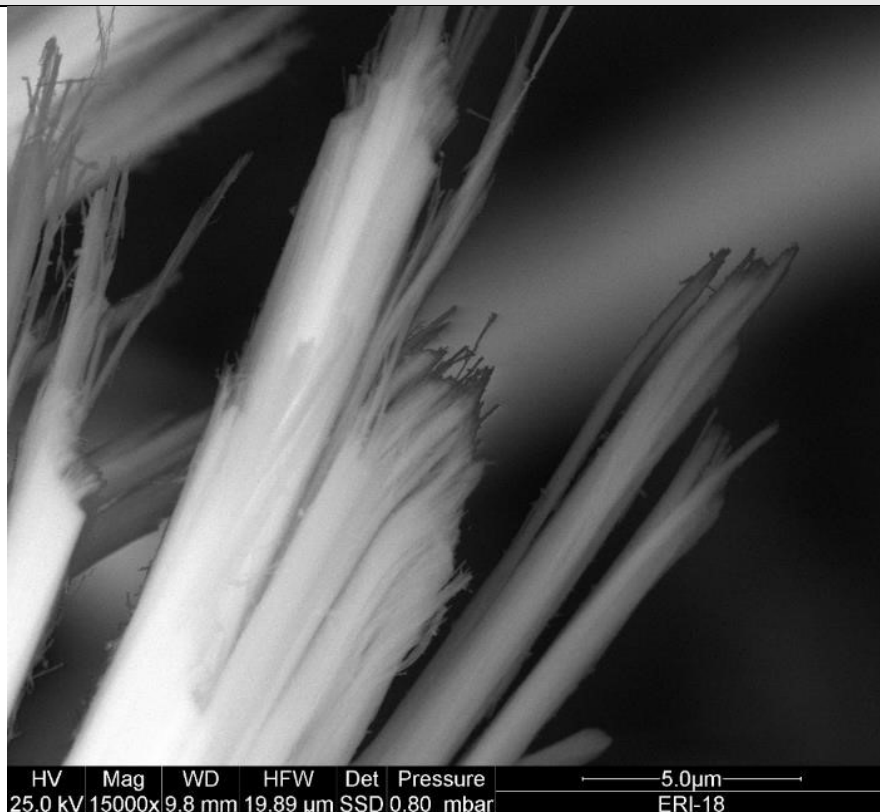


*Erionite-Figura 3, 2500x:
fibrille; basso vuoto; SSD,
campione tal quale non
metallizzato.*

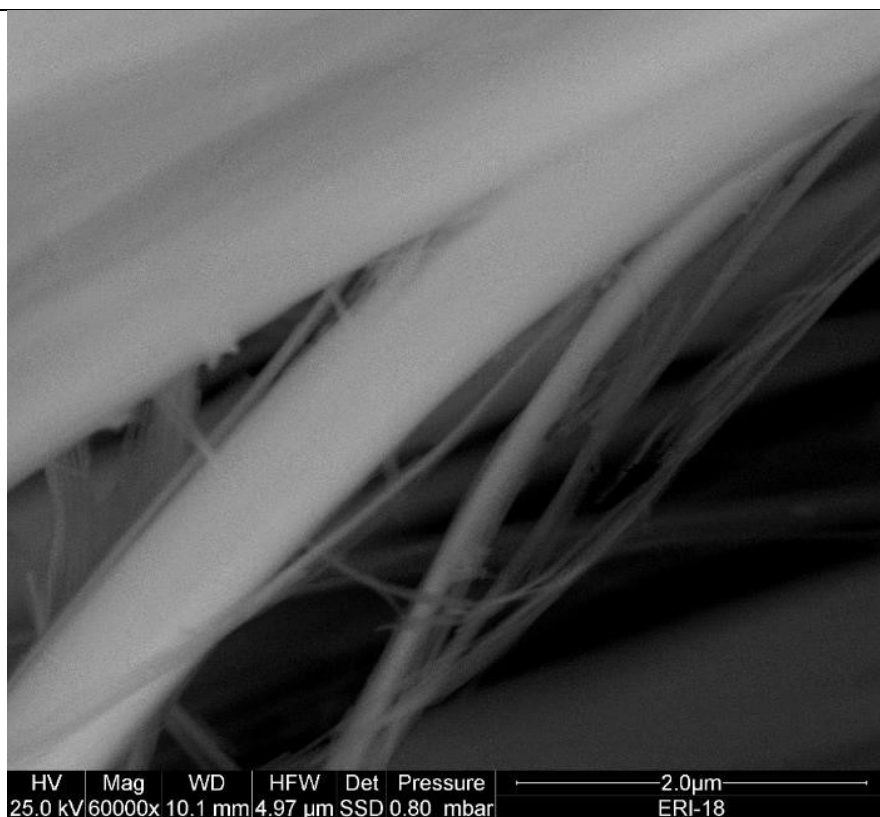


*Erionite-Figura 4, 4000x:
fibrille; basso vuoto; SSD,
campione tal quale non
metallizzato.*

Immagini Erionite

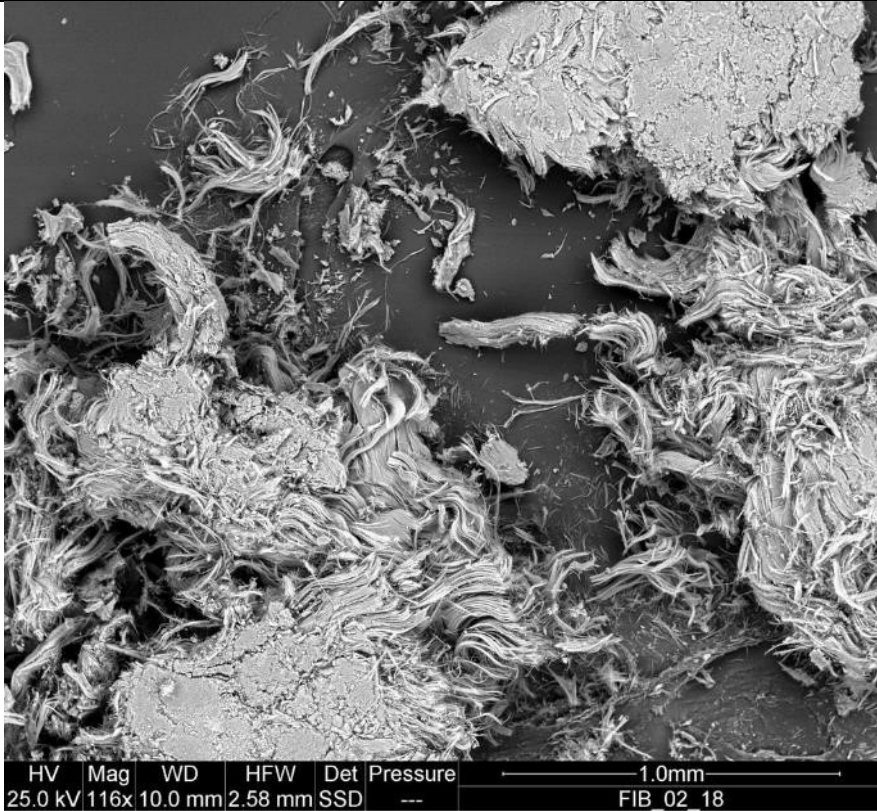


*Erionite-Figura 5, 15000x:
fibrille; basso vuoto; SSD,
campione tal quale non
metallizzato.*

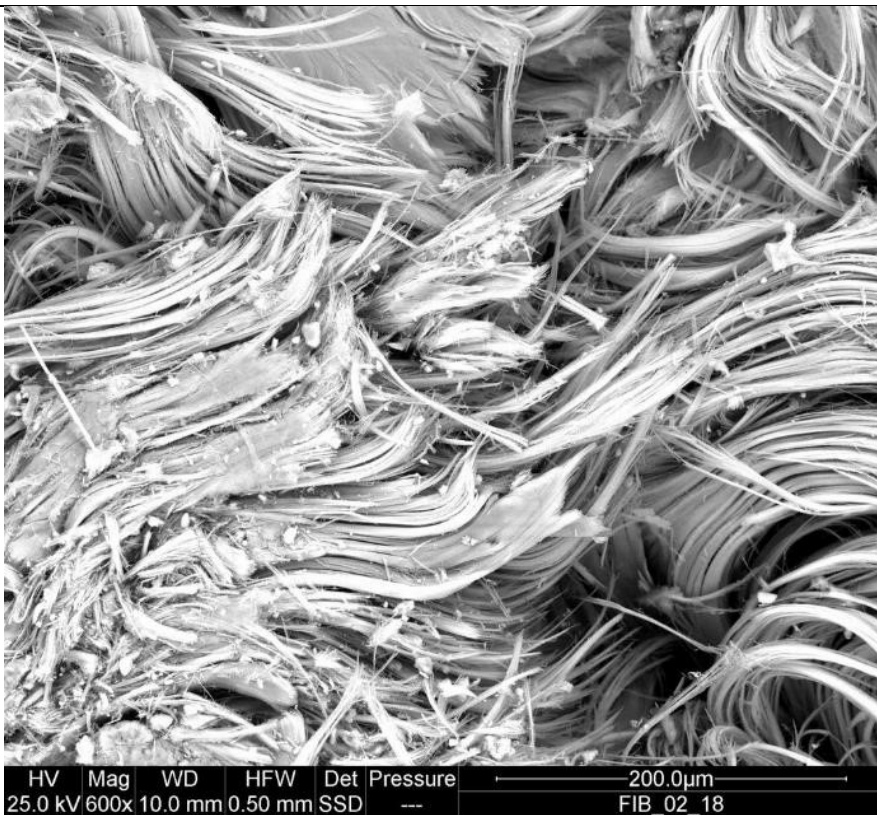


*Erionite-Figura 6, 60000x:
fibrille nell'ordine della frazione
di micron; basso vuoto; SSD,
campione tal quale non
metallizzato.*

Immagini Erionite

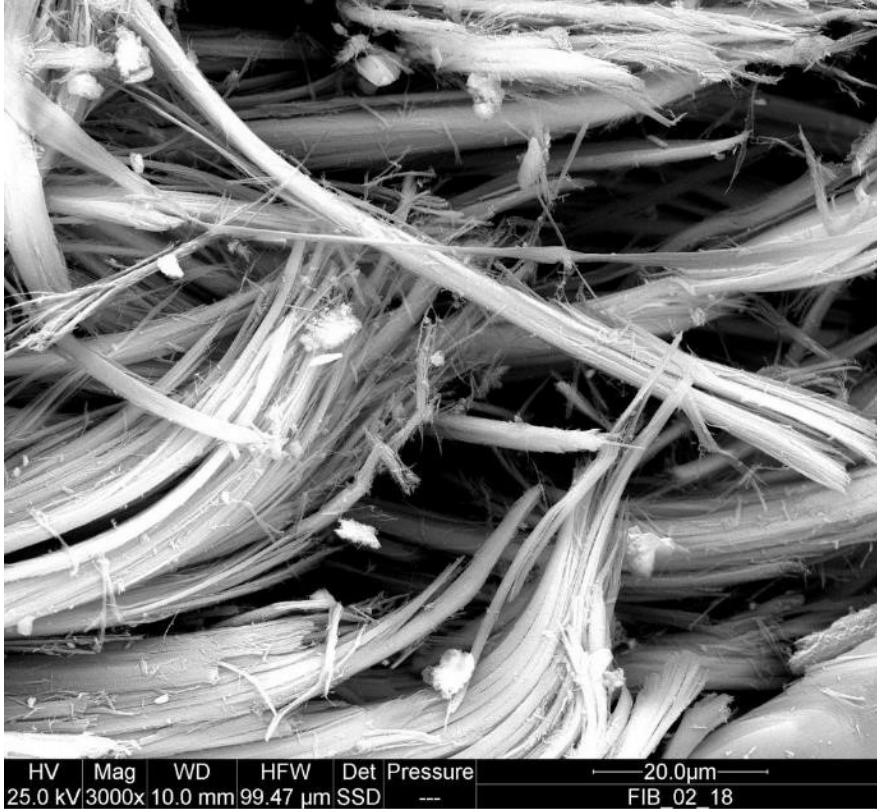


*Erionite-Figura 7, 116x:
immagine d'insieme; alto vuoto;
SSD, campione metallizzato.*

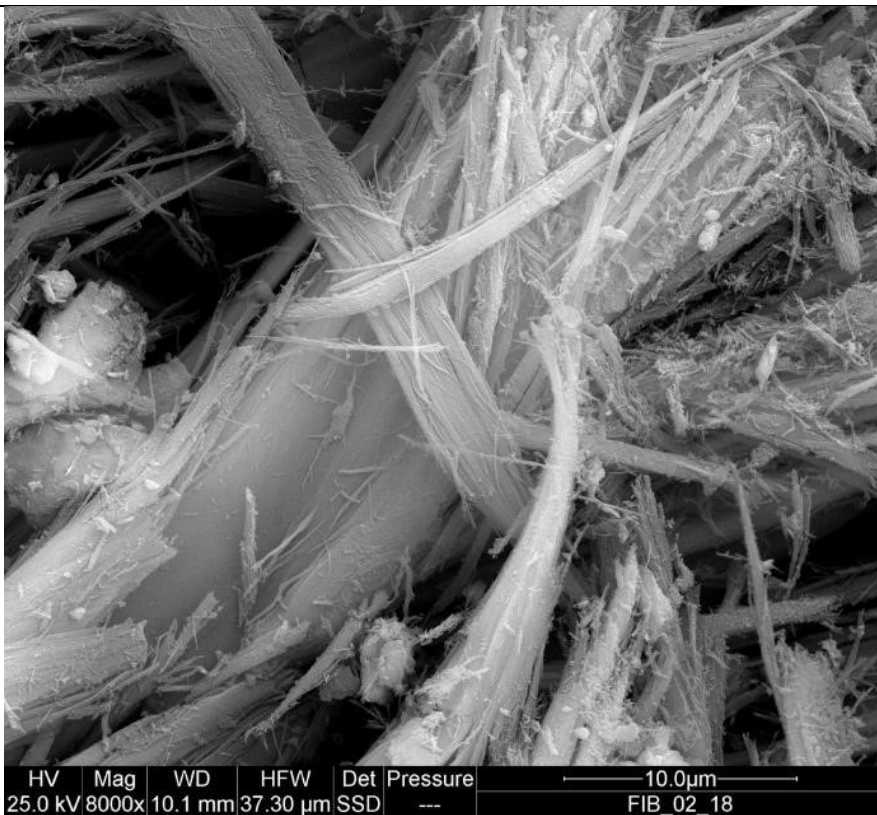


*Erionite-Figura 8, 600x:
immagine d'insieme; alto vuoto;
SSD, campione metallizzato.*

Immagini Erionite



*Erionite-Figura 9, 3000x:
fibre e fibrille; alto vuoto; SSD,
campione metallizzato.*

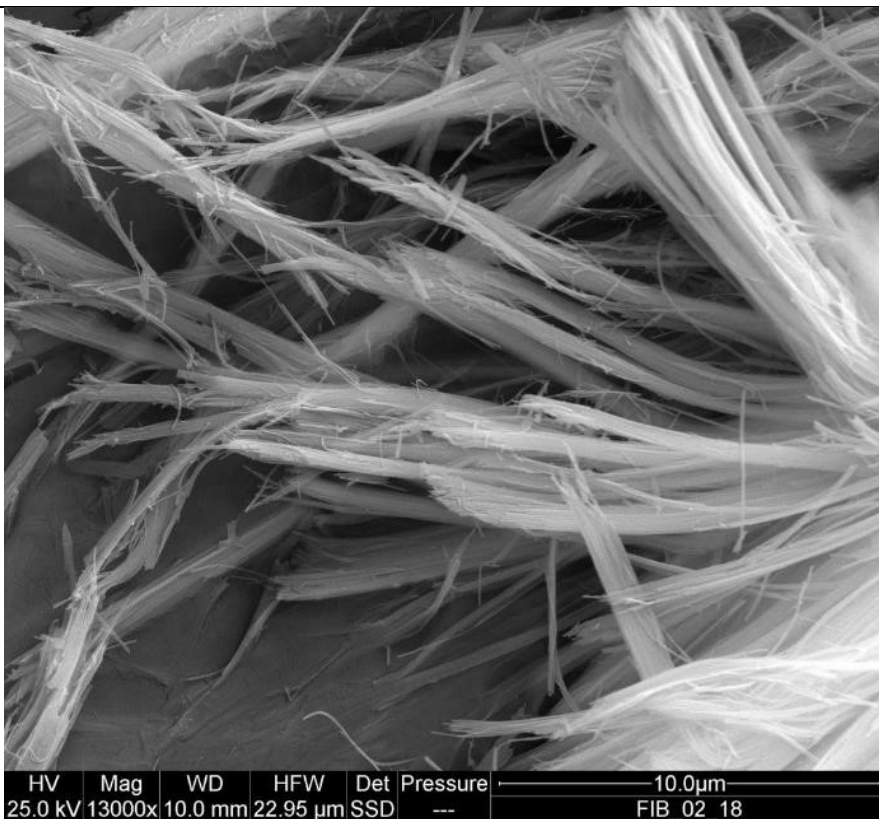


*Erionite-Figura 10, 8000x:
fasci di fibre e fibrille; alto vuoto;
SSD, campione metallizzato.*

Immagini Erionite



*Erionite-Figura 11, 9281x:
fibrille; alto vuoto; SSD,
campione metallizzato.*



*Erionite-Figura 12, 13000x:
fibrille; alto vuoto; SSD,
campione metallizzato.*

Asbestoferrite



Asbestoferrite 500x - basso vuoto – SSD - Immagine d'insieme

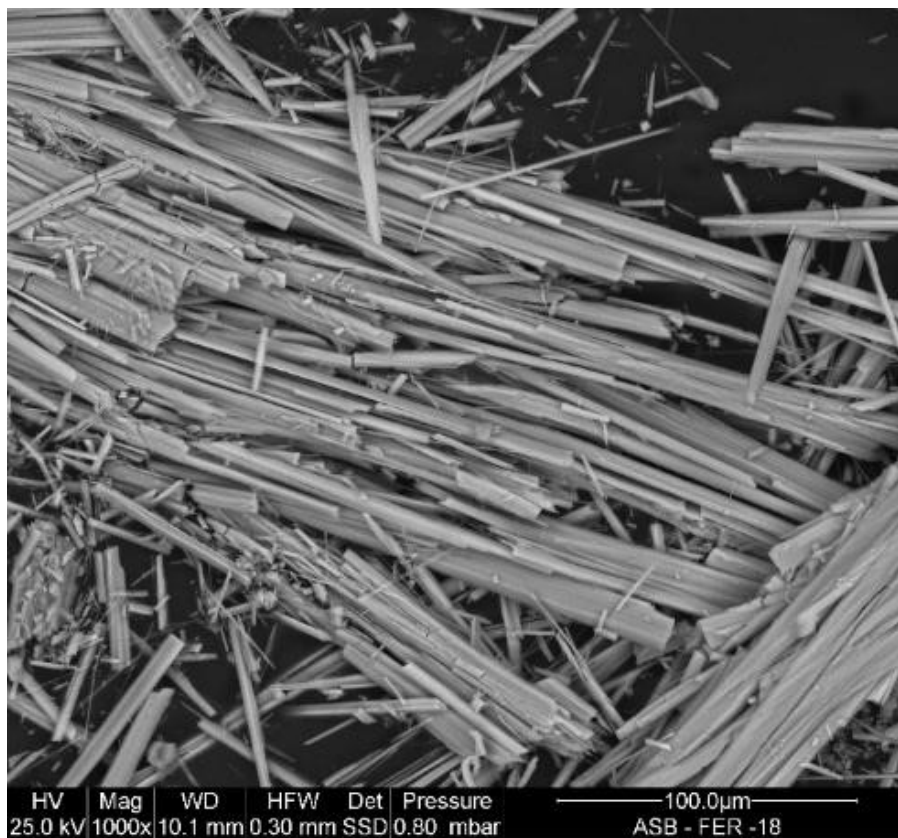
L'asbestoferrite è una fibra di tipo anfibolo, dal colore bianco grigiastro, avente formula chimica $(\text{Fe}, \text{Mg}, \text{Mn})_7\text{Si}_8\text{O}_{22}(\text{OH})_2$. Il campione studiato proviene da Brunnsjögruvan, Örebro County, Sweden, ed è caratterizzato dalla presenza di manganese e ferro, con uno spettro EDAX simile a quello dell'amosite $(\text{Mg}, \text{Fe})_7\text{Si}_8\text{O}_{22}(\text{OH})_2$, ma con presenza di calcio.

Le condizioni comuni di analisi in SEM sono state:

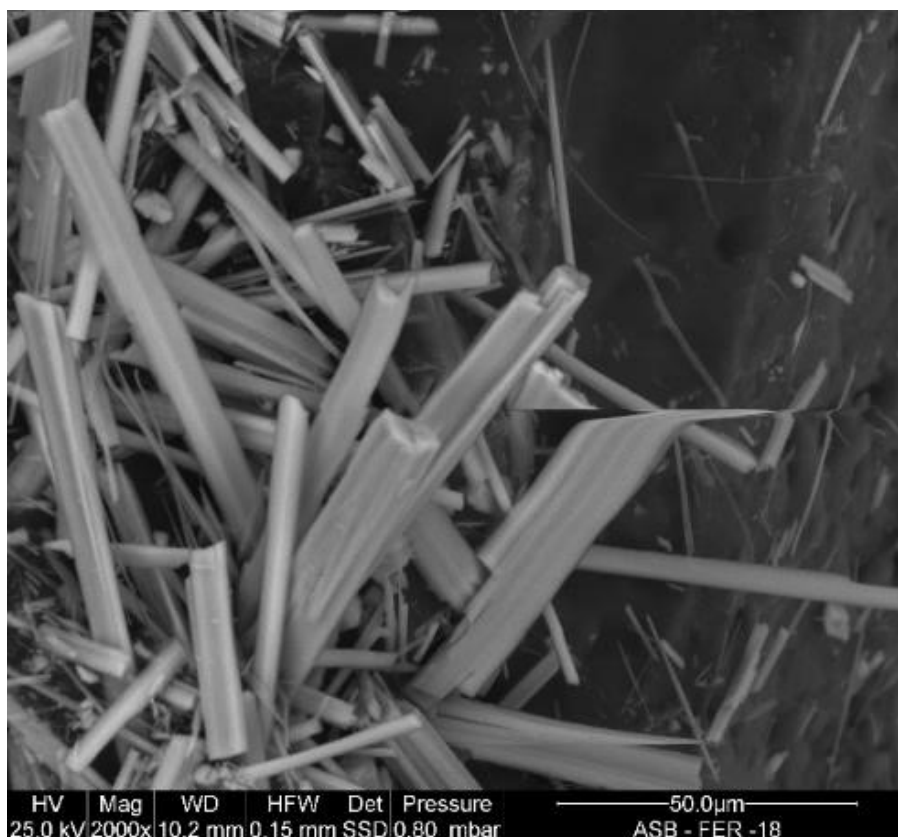
- working distance: 10 mm,
- tilt angle: 0°

La caratterizzazione chimica tramite EDX è stata eseguita operando in condizioni di basso vuoto con potenziali di accelerazione tra i 10 ed i 25 kV (informazione chimica).

In condizioni di alto vuoto con potenziali fino a 25 kV si sono ottenute immagini ad ingrandimenti maggiori (informazione morfologica).

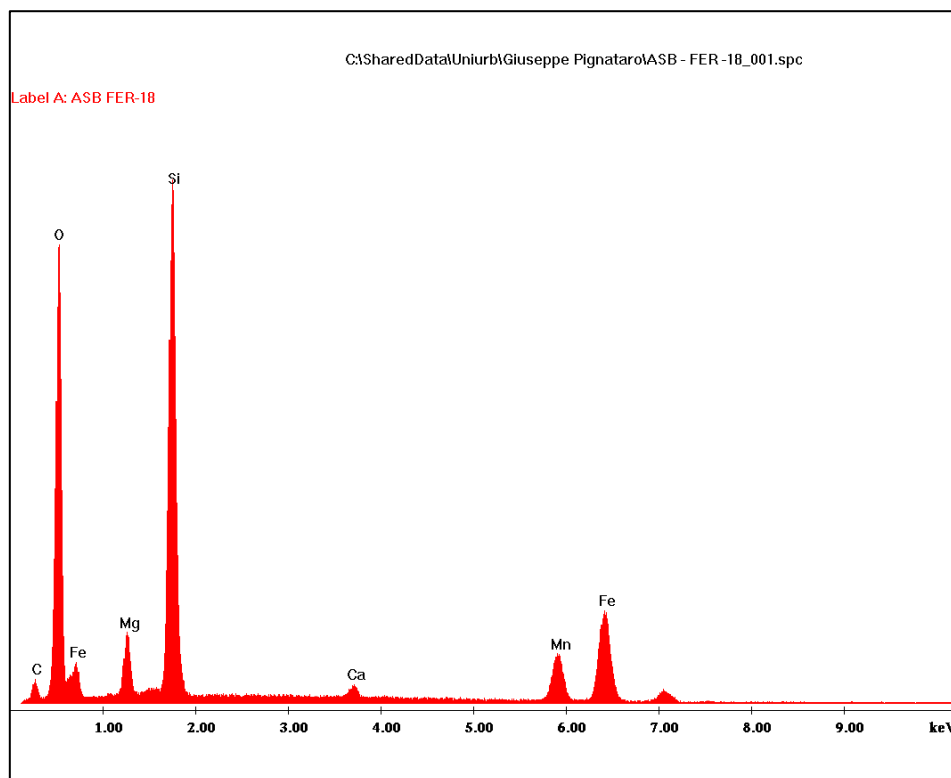


Asbestoferrite 1000x - basso vuoto – SSD



Asbestoferrite 2000x - basso vuoto – SSD

Caratterizzazione chimica



Spettro EDXS dell'Asbestoferrite

Asbestoferrite	Area 1	Area 2	Area 3	Area 4	Area 5	Area 6	Area 7	MEDIA	σ
Element	At %	At %	At %	At%	At%	At%	At%	At%	
Mg	9,36	9,73	4,65	12,32	9,79	10,48	8,88	9,31	
Si	46,73	48,63	22,53	55,32	52,35	53,48	45,34	46,34	
Ca	1,65	0,00	2,79	9,85	1,13	1,19	1,45	2,58	
Mn	13,34	13,27	20,56	0,00	11,70	10,73	13,57	11,88	
Fe	28,92	28,38	49,48	22,51	25,04	24,13	30,77	29,89	
Tot	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	
Si/Mg	4,99	5,00	4,85	4,49	5,35	5,10	5,11	4,99	0,27

L'analisi elementare EDXS è stata effettuata su aree diverse del campione, ottenendo i valori riportati nella tabella soprastante, per considerare tra loro conformi i valori ottenuti sono stati accettati solo in punti con un rapporto Si/Mg simile (media $\pm 3\sigma$ con σ = deviazione standard).

Dai risultati sopra riportati si ottiene la seguente percentuale media di ossidi:

Ossido	%
MgO	6,0
SiO ₂	44,2
CaO	2,3
MnO	13,4
FeO	34,1

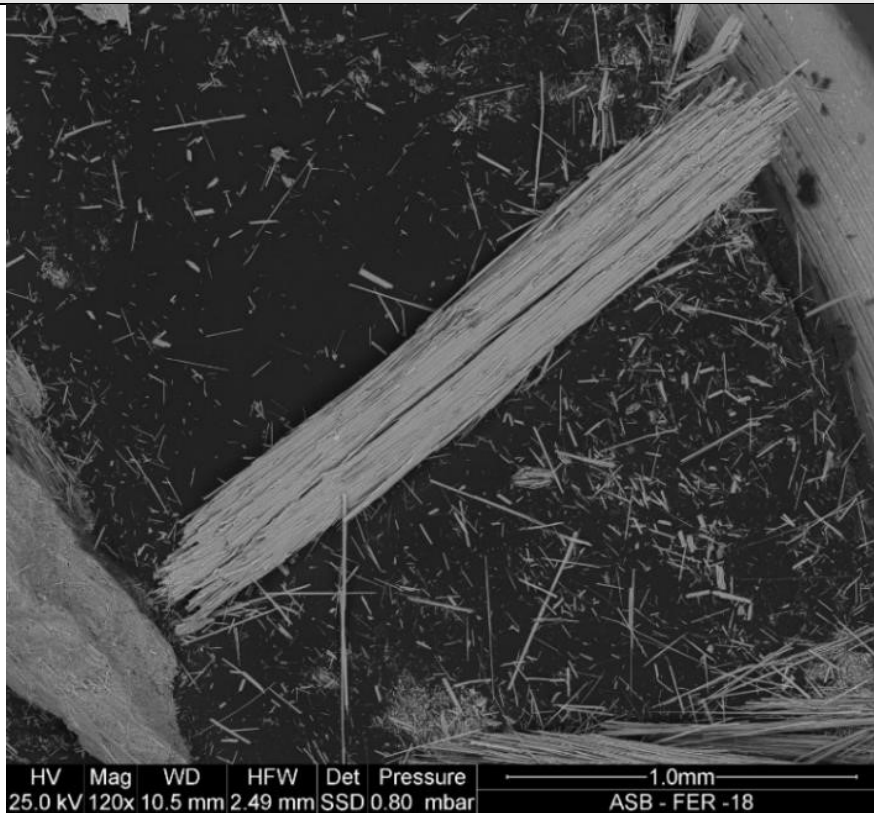
La somma degli ossidi alcalino/alcalino terrosi è 6,6%, inferiore al 18% che, confrontato con le fibre artificiali vetrose, includerebbe l'asbestoferrite

nella classificazione di cancerogenità 1B (*Sostanze di cui si presumono effetti cancerogeni per l'uomo*).

L'asbestoferrite è caratterizzata da un abito fibroso, con un diametro medio di circa 1 micron con fibrille che possono arrivare ad un diametro di circa 0,1 micron. Queste dimensioni possono favorire la penetrazione in sistemi biologici.

Inoltre, su questa fibra, tramite spettrometria di massa ICP-MS (ICP-MS Agilent 7700) è stata effettuata l'analisi elementare per la ricerca di metalli in tracce, utile sia ai fini della caratterizzazione di provenienza che per eventuali possibili interazioni: i metalli riscontrati sono nel range dello 0,1%: Al, B, Cu, Mo, Ni, Sb, Se.

Immagini Asbestoferrite



Asbestoferrite-Figura 1, 120x:

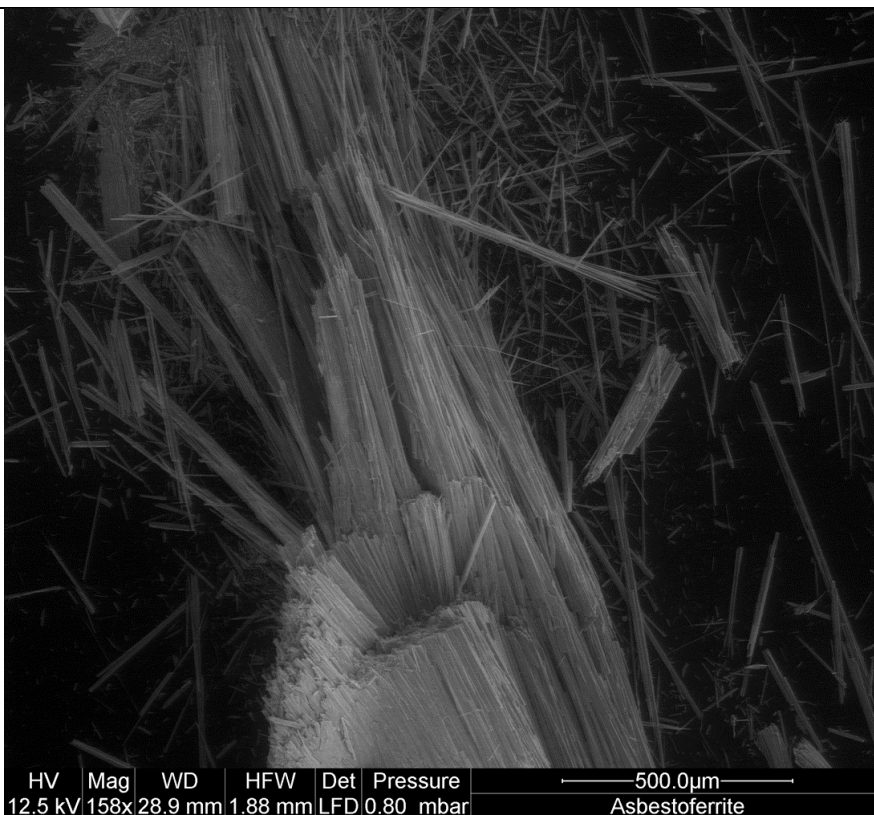
visione d'insieme; la struttura delle fibre è agbjforme (di tipo anfibolo) basso vuoto; SSD; campione tal quale non metallizzato.

Immagini Asbestoferrite



Asbestoferrite-Figura 2, 150x:

visione d'insieme; la struttura delle fibre è agbiforme (anfibola) basso vuoto; SSD; campione tal quale non metallizzato.



Asbestoferrite-Figura 3, 158x:

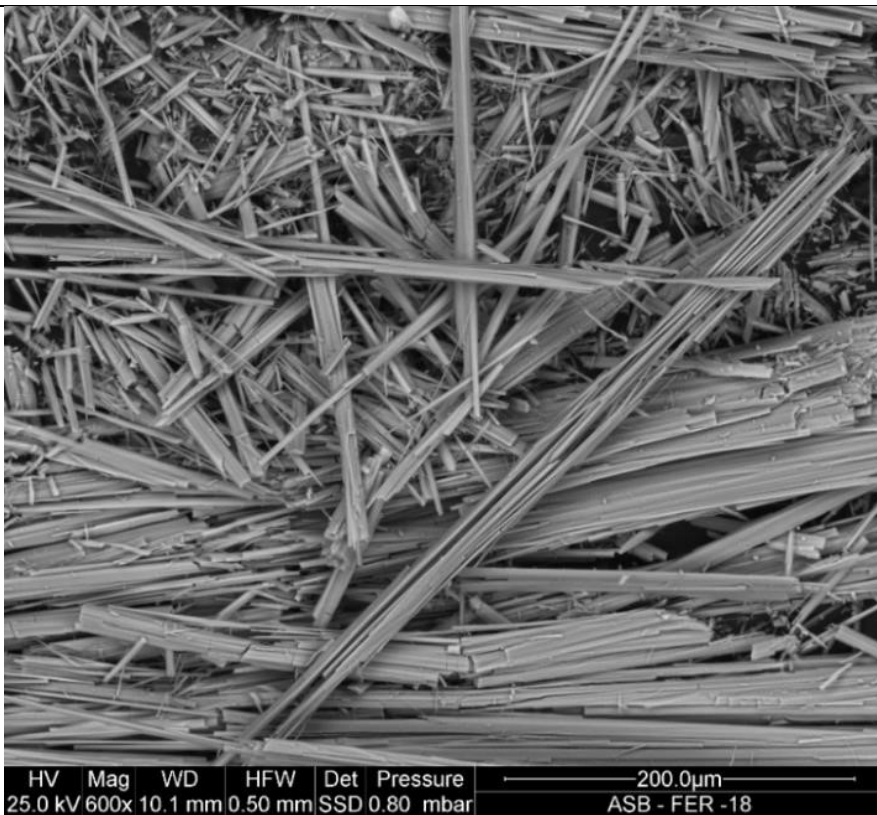
visione d'insieme; la struttura delle fibre è agbiforme (tipo anfibolo) basso vuoto; SSD; campione tal quale non metallizzato.

Immagini Asbestoferrite



Asbestoferrite-Figura 4, 199x:

visione d'insieme; la struttura delle fibre è aghiforme (anfibola) basso vuoto; SSD; campione tal quale non metallizzato.



Asbestoferrite-Figura 5, 600x:

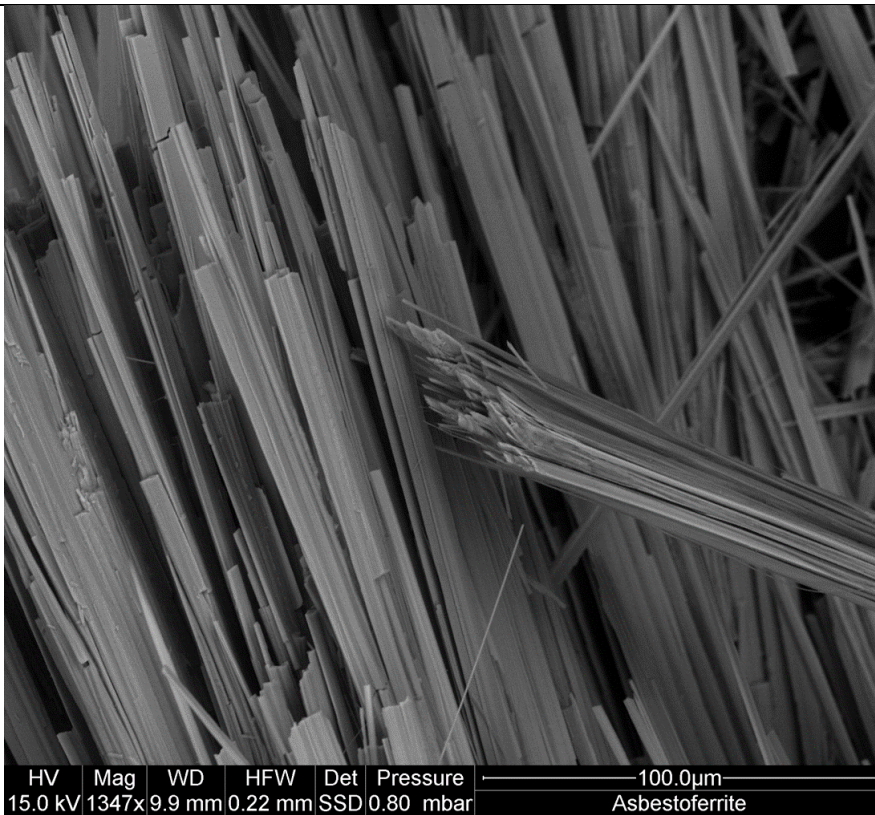
fibre; la struttura delle fibre è aghiforme (tipo anfibolo) basso vuoto; SSD; campione tal quale non metallizzato.

Immagini Asbestoferrite



Asbestoferrite-Figura 6, 1000x:

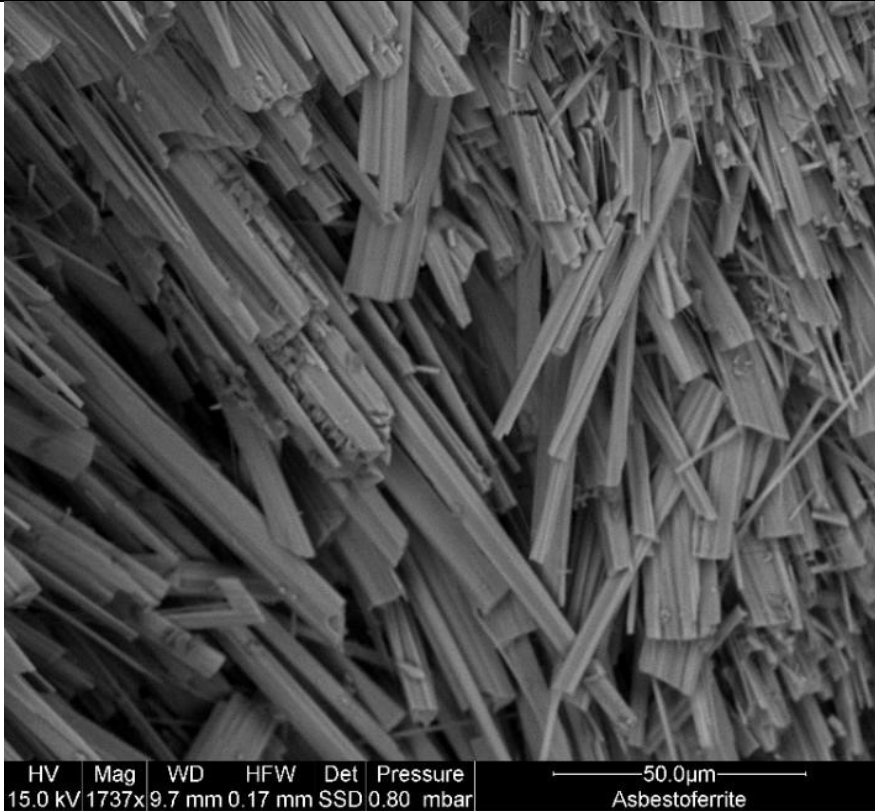
fibre; la struttura delle fibre è aghiforme (anfibola) basso vuoto; SSD; campione tal quale non metallizzato.



Asbestoferrite-Figura 7, 1347x:

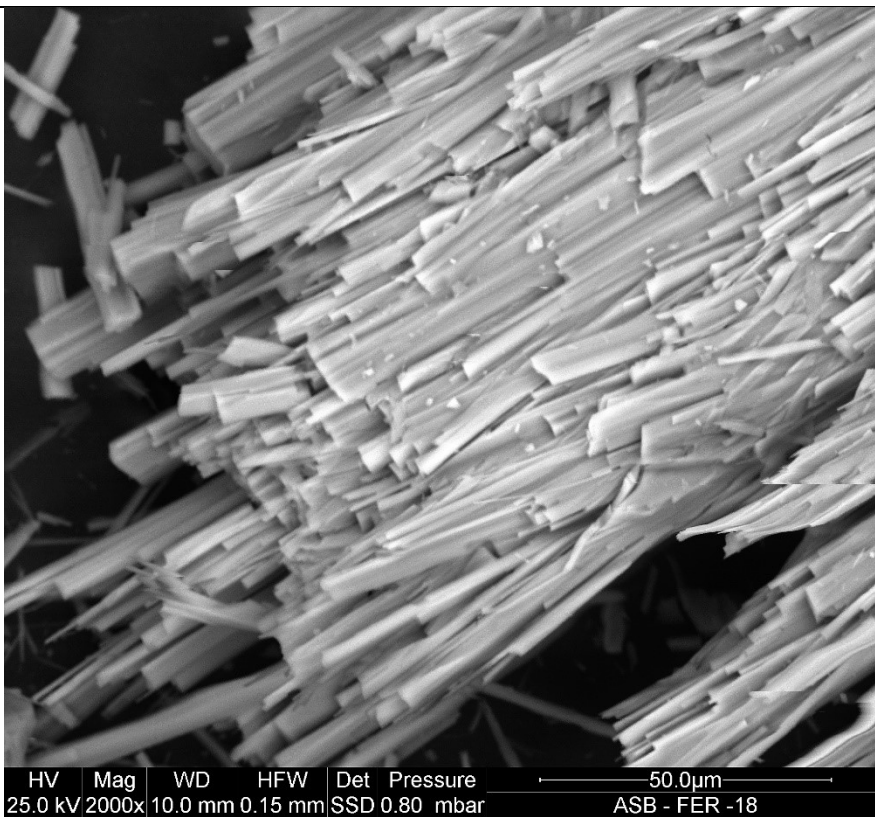
fibre; la struttura delle fibre è aghiforme (tipo anfibolo) basso vuoto; SSD; campione tal quale non metallizzato.

Immagini Asbestoferrite



Asbestoferrite-Figura 8, 1737x:

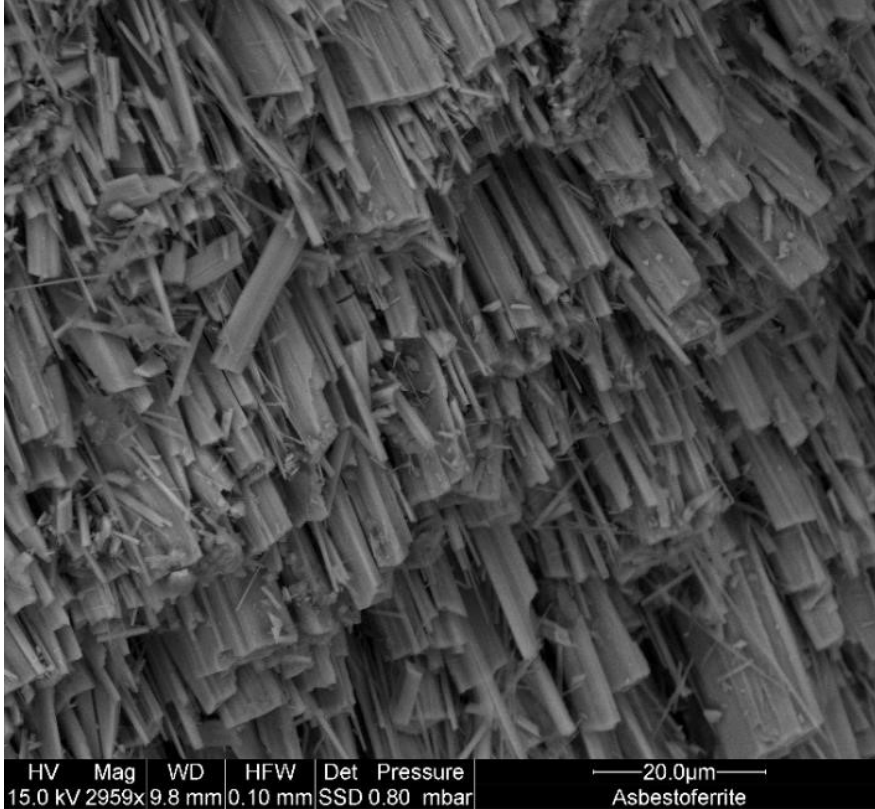
fibre; la struttura delle fibre è aghiforme (tipo anfibolo) basso vuoto; SSD; campione tal quale non metallizzato.



Asbestoferrite-Figura 9, 2000x:

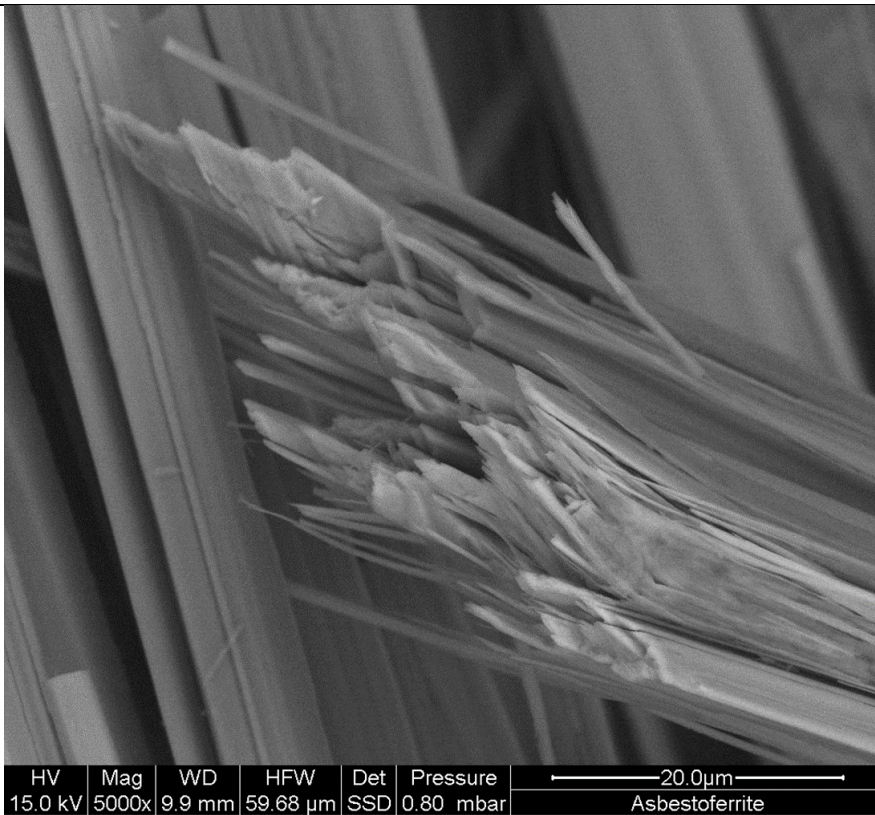
fibre; la struttura delle fibre è aghiforme (tipo anfibolo) basso vuoto; SSD; campione tal quale non metallizzato.

Immagini Asbestoferrite



Asbestoferrite-Figura 10, 2959x:

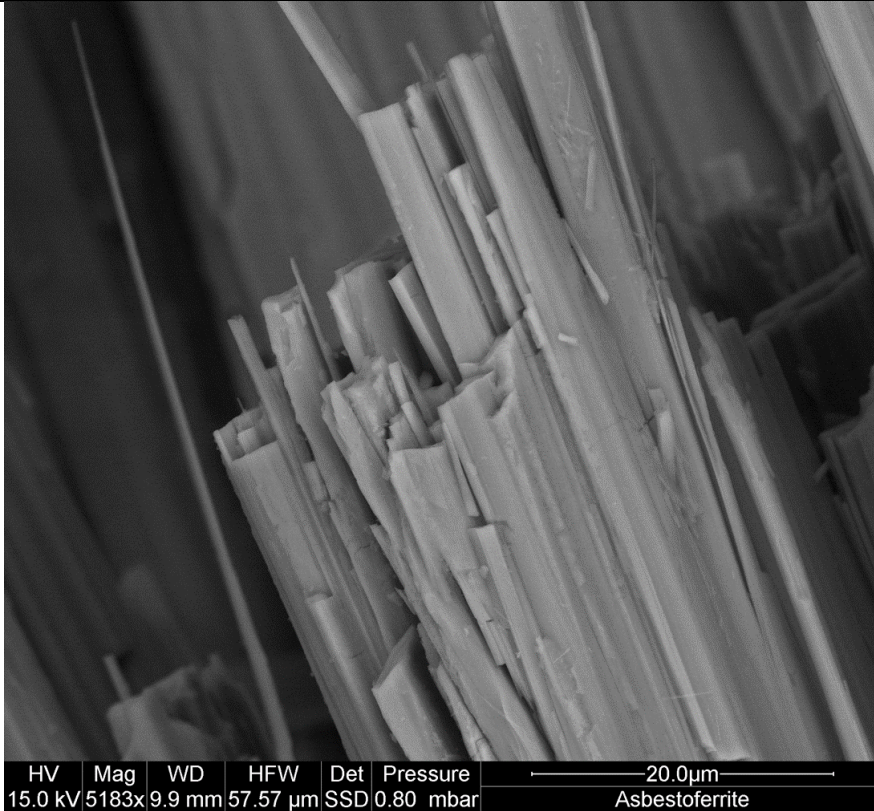
fibre; la struttura delle fibre è aghiforme (tipo anfibolo) basso vuoto; SSD; campione tal quale non metallizzato.



Asbestoferrite-Figura 11, 5000x:

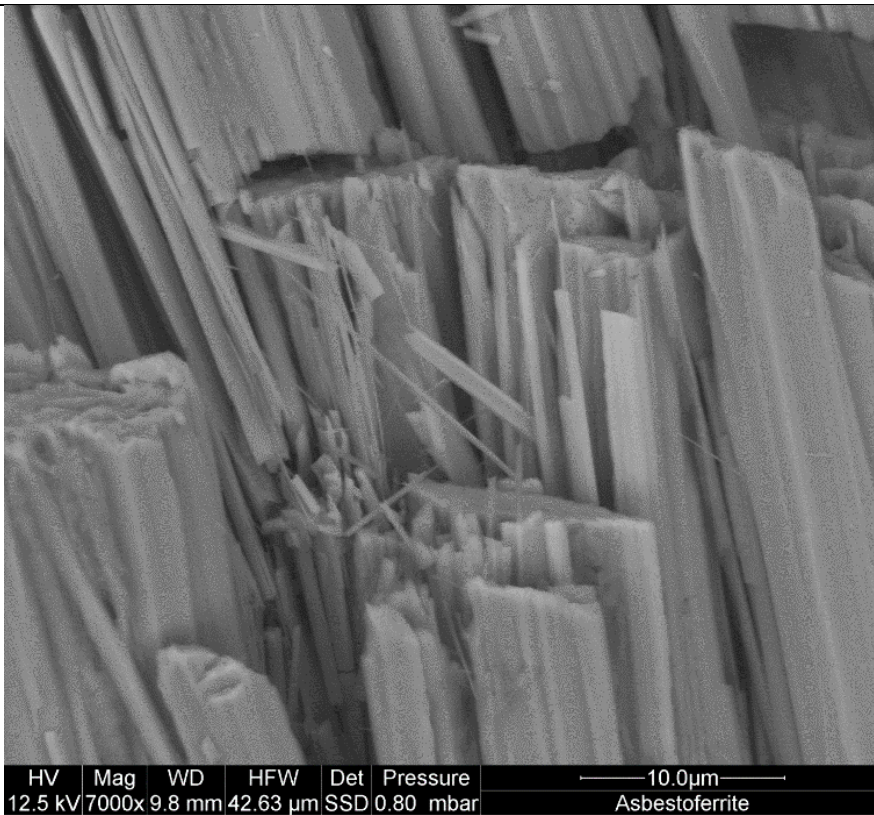
fibre; la struttura delle fibre è aghiforme (tipo anfibolo) basso vuoto; SSD; campione tal quale non metallizzato.

Immagini Asbestoferrite



Asbestoferrite-Figura 12, 5183x:

fibre; la struttura delle fibre è aghiiforme (tipo anfibolo) basso vuoto; SSD; campione tal quale non metallizzato.



Asbestoferrite-Figura 13, 7000x:

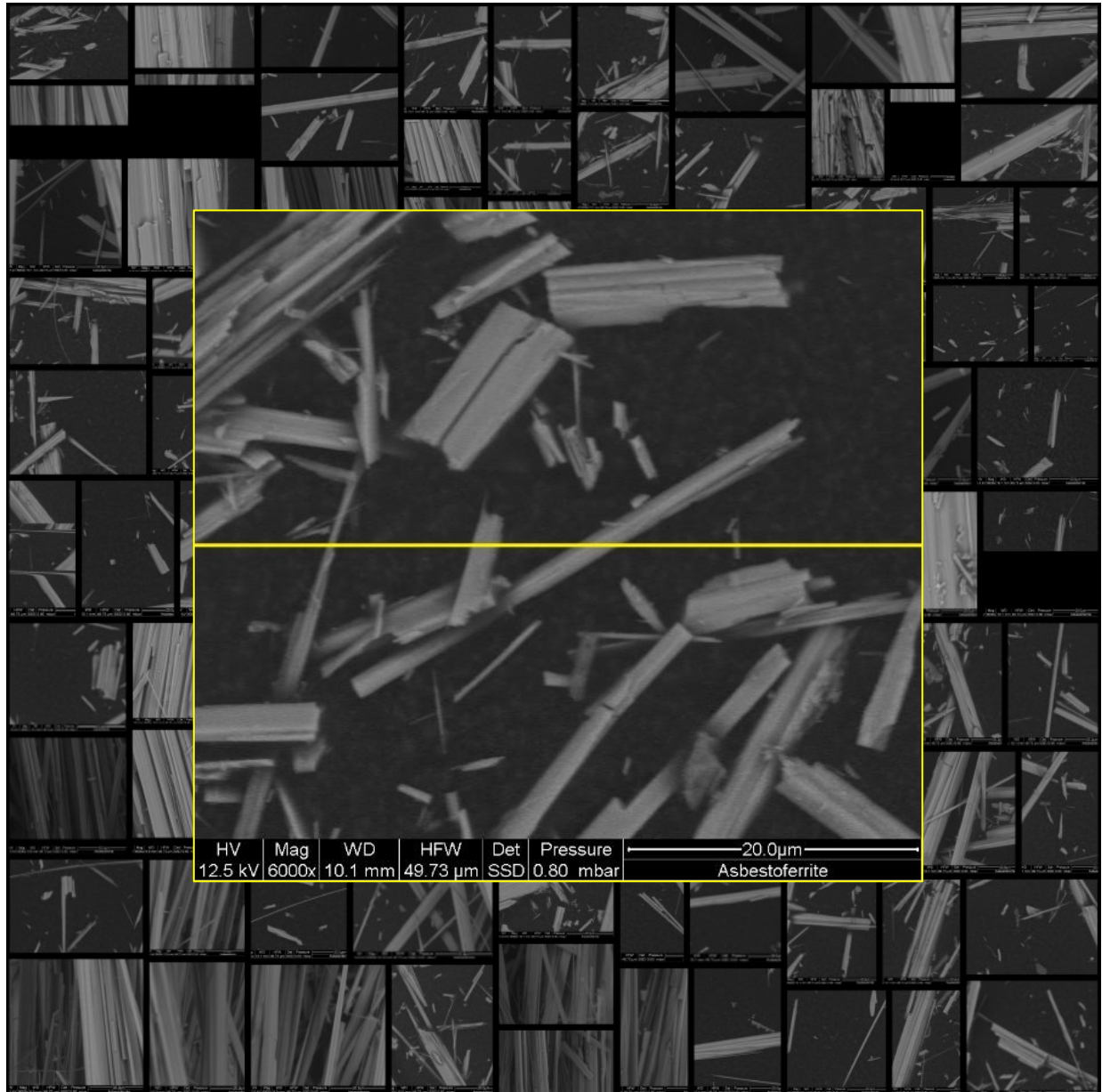
fibre; la struttura delle fibre è aghiiforme (tipo anfibolo) basso vuoto; SSD; campione tal quale non metallizzato.

Calcolo del diametro geometrico medio

Dall'analisi di 406 fibre, con un ingrandimento 6000x, si è ottenuto:

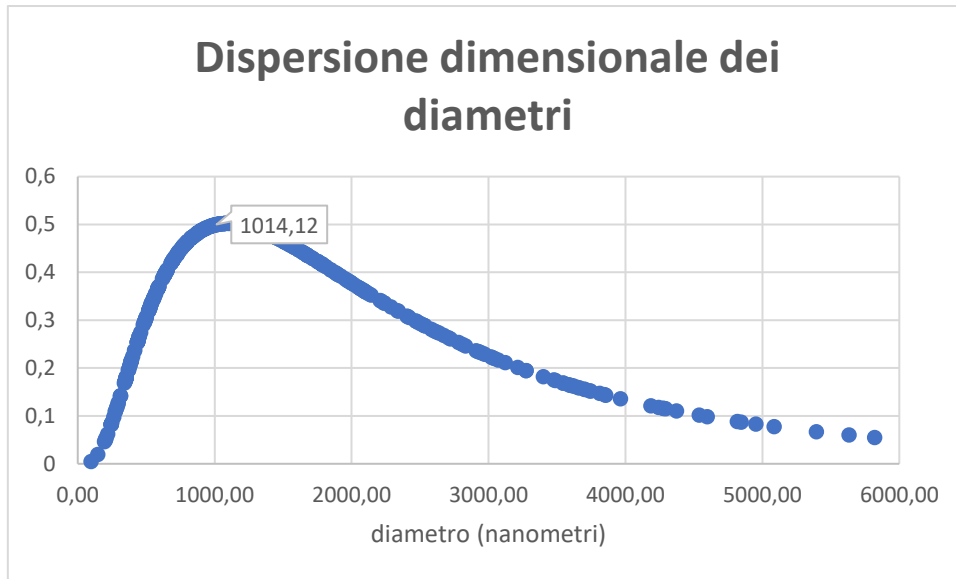
DMGOPL-2ES = 1,01 micron (con errore $2\Delta=0,08$ micron)

Tale valore, inferiore a 6 micron, rende la fibra misurata potenzialmente pericolosa in quanto inalabile per analogia con le fibre artificiali vetrose.

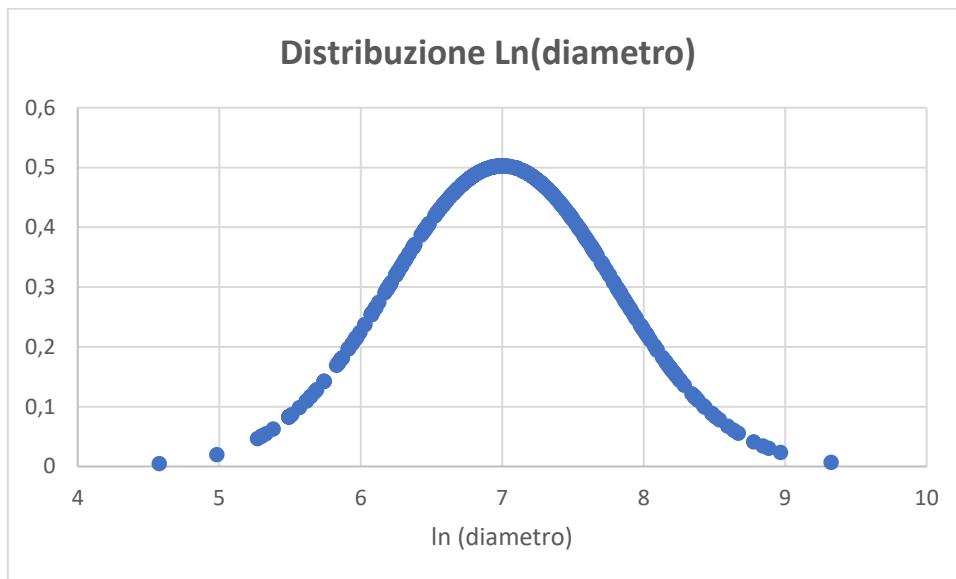


Asbestoferrite 6000x: Le immagini ottenute sono state selezionate in modo che le fibre intersecanti la linea centrale fossero misurabili e distinguibili tra loro.

Le misure ottenute sono riportate in allegato (Tabella diametri asbestoferrite).



Il grafico soprastante riporta la dispersione dimensionale dei diametri misurati dell'asbestoferrite, come premesso nella descrizione del metodo di misura utilizzato tale andamento non ha una distribuzione normale.



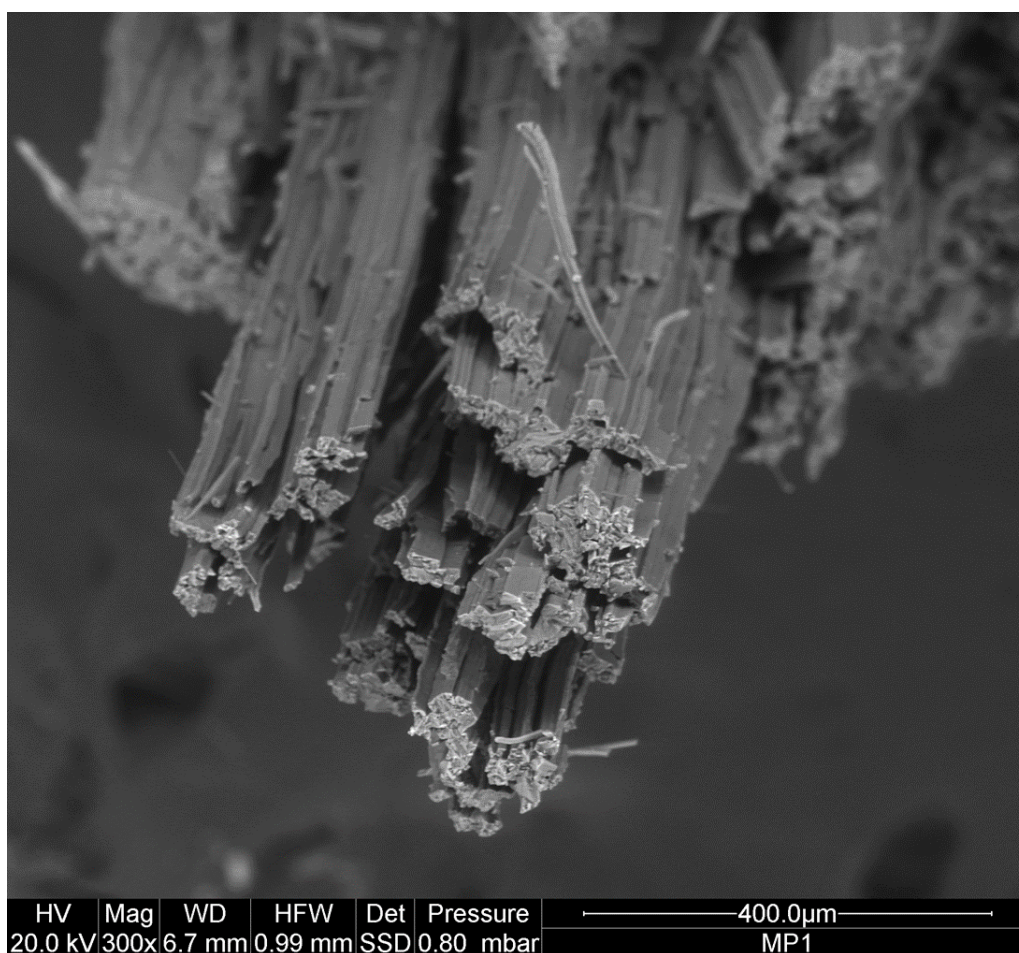
Nel grafico soprastante si riporta la dispersione del logaritmo naturale del diametro misurato, verificando come premesso nel protocollo di misura una distribuzione normale. (media $\ln(\text{diametro}) = 7,0$; deviazione std = 0,79)

Esaidrite

L'esaidrite è una fibra minerale, chimicamente si tratta di un solfato esaidrato di magnesio $MgSO_4 \cdot 6(H_2O)$ appartenente al gruppo omonimo. Descritta per la prima volta da R. Johnston nel 1911. Si ritrova in zone di ossidazione dei giacimenti di pirite e come deposizione nelle sorgenti termali in paragenesi soprattutto con l'epsomite.

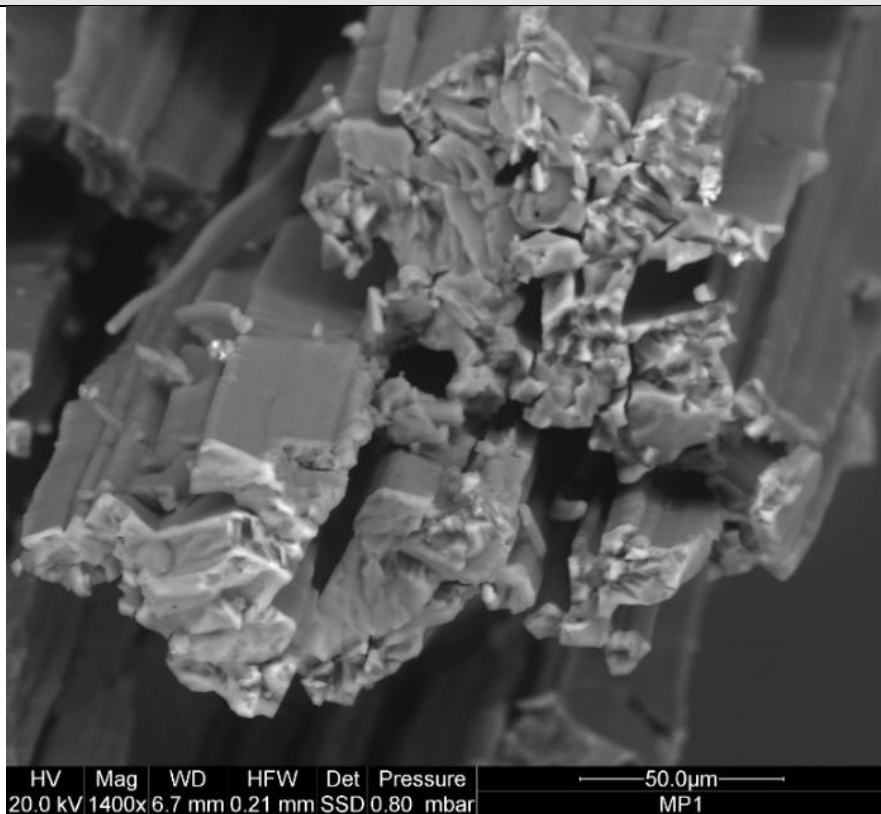
Il campione studiato in questo lavoro proviene dalla antica miniera di zolfo di Perticara, Emilia-Romagna, Italia.

All'aria assorbe molecole di acqua trasformandosi in epsomite con formula $MgSO_4 \cdot 7(H_2O)$, è solubile in acqua.



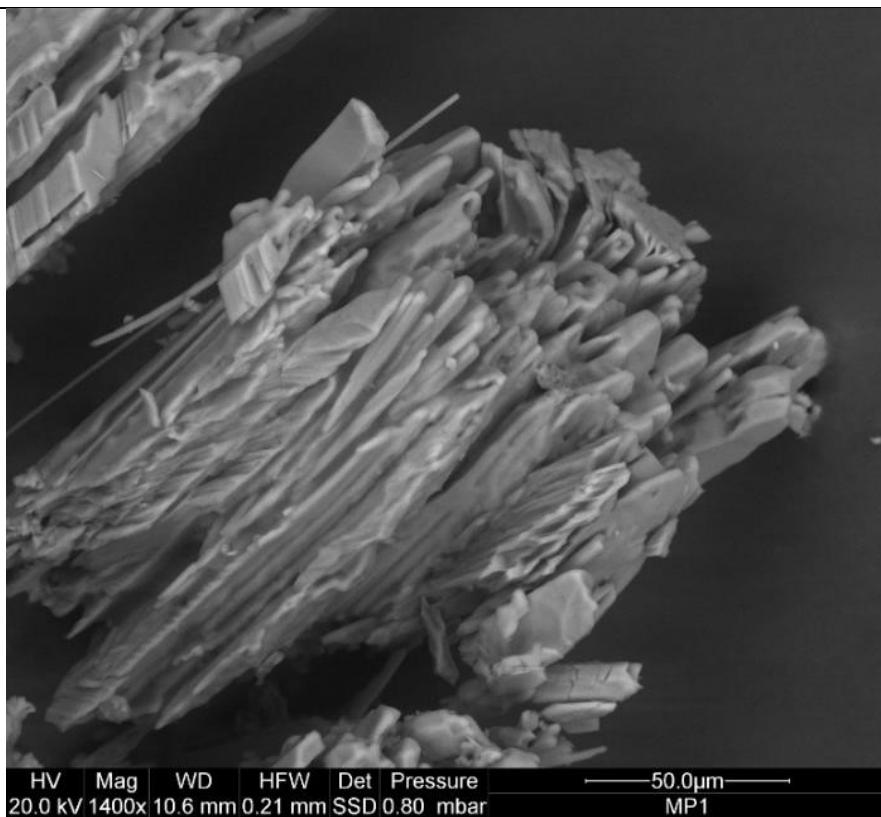
Esaidrite 300x - basso vuoto – SSD

Immagini Esaidrite



Esaidrite-Figura 1, 1400x:

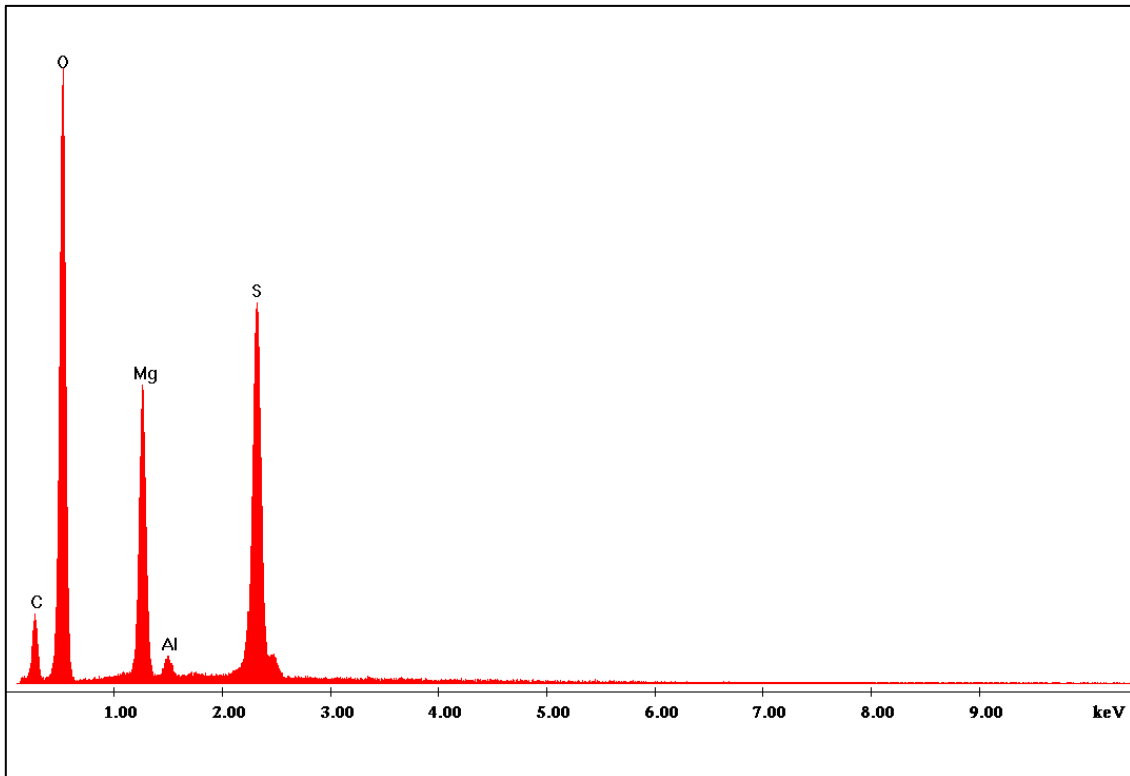
fibre; SSD; basso vuoto; campione tal quale non metallizzato.



Esaidrite-Figura 2, 1400x:

sezione fibre; SSD; basso vuoto; campione tal quale non metallizzato.

Caratterizzazione chimica



Esaidrite: Lo spettro EDXS mostra l'esclusiva presenza di Zolfo e Magnesio (Solfato di Magnesio), gli altri segnali presenti sono dovuti allo stub porta campioni.

Le condizioni comuni di analisi in SEM sono state:

- working distance: 10 mm,
- tilt angle: 0°

La caratterizzazione chimica tramite EDX è stata eseguita operando in condizioni di basso vuoto con potenziali di accelerazione tra i 10 ed i 25 kV (informazione chimica).

L'analisi EDAX conferma l'esaidrite come solfato di magnesio, nello spettro la presenza di carbonio ed alluminio è dovuta all'utilizzo dello stub porta

campioni in alluminio e al dischetto di grafite biadesivo dove è appoggiato il campione.

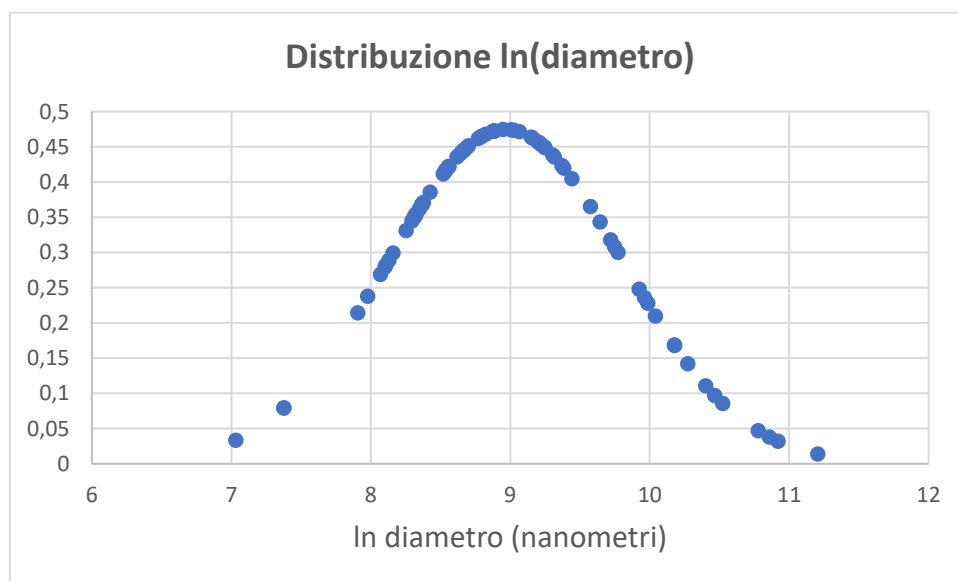
Caratterizzazione dimensionale

La misura dei diametri medi del campione di esaidrite è stata effettuata utilizzando ingrandimenti fino a 1500x, in quanto i valori dei diametri risultano di dimensioni medie non potenzialmente pericolosi (diametro medio: 11,67 micron).

Diametro	Misura (micron)	Diametro	Misura (micron)	Diametro	Misura (micron)
1	20.419	29	3389	57	10966
2	28.943	30	5207	58	4112
3	3.835	31	4112	59	10008
4	21.701	32	4073	60	5114

Diametro	Misura (micron)	Diametro	Misura (micron)	Diametro	Misura (micron)
5	8.324	33	11096	61	6801
6	4.282	34	5207	62	4073
7	4.343	35	3293	63	5648
8	4.211	36	7232	64	7682
9	2.712	37	4112	65	7188
10	4.000	38	15425	66	1130
11	51.923	39	10306	67	6003
12	12.602	40	8639	68	4073
13	26.331	41	5207	69	1597
14	22.936	42	5759	70	4301
15	32.915	43	4301	71	4301
16	16.632	44	5815	72	21202
17	3494	45	9879	73	9401
18	11719	46	5051	74	47870
19	35095	47	4301	75	37156
20	5524	48	10103	76	11891
21	3315	49	6610	77	17534
22	9504	50	3195	78	14395
23	7203	51	5114	79	2914
24	5002	52	4553	80	5901
25	10381	53	7144	81	17105
26	5759	54	1597	82	73454
27	6439	55	26254	83	55266
28	8145	56	6586	MEDIA	11,67

Esaidrite – Tabella diametri misurati e contati in micron



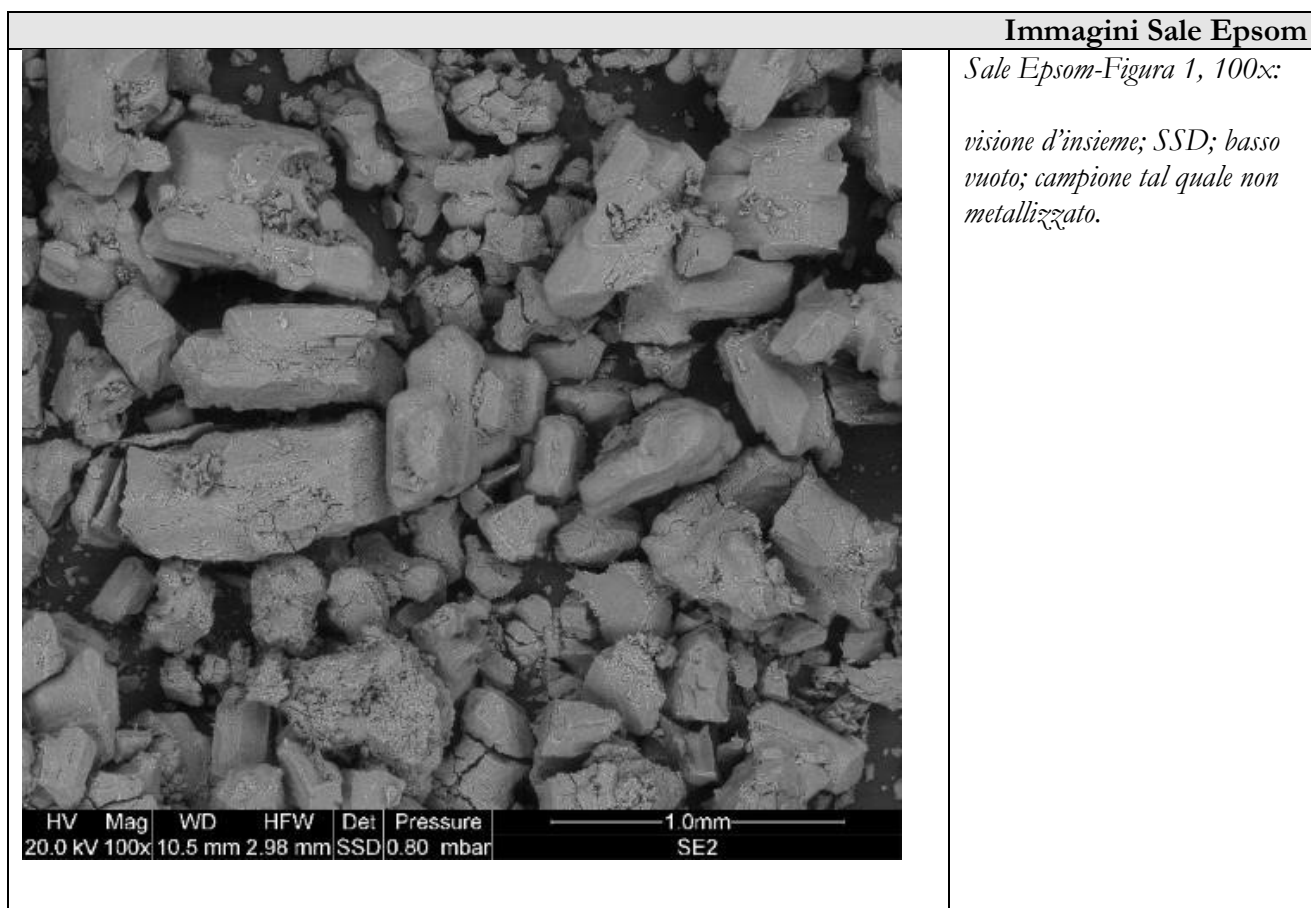
Nel grafico soprastante si verifica l'andamento della distribuzione normale del logaritmo naturale dei diametri misurati della fibra esaidrite. (media $\ln(\text{diametro}) = 9,0$; deviazione standard = 0,84)

Sale di Epsom

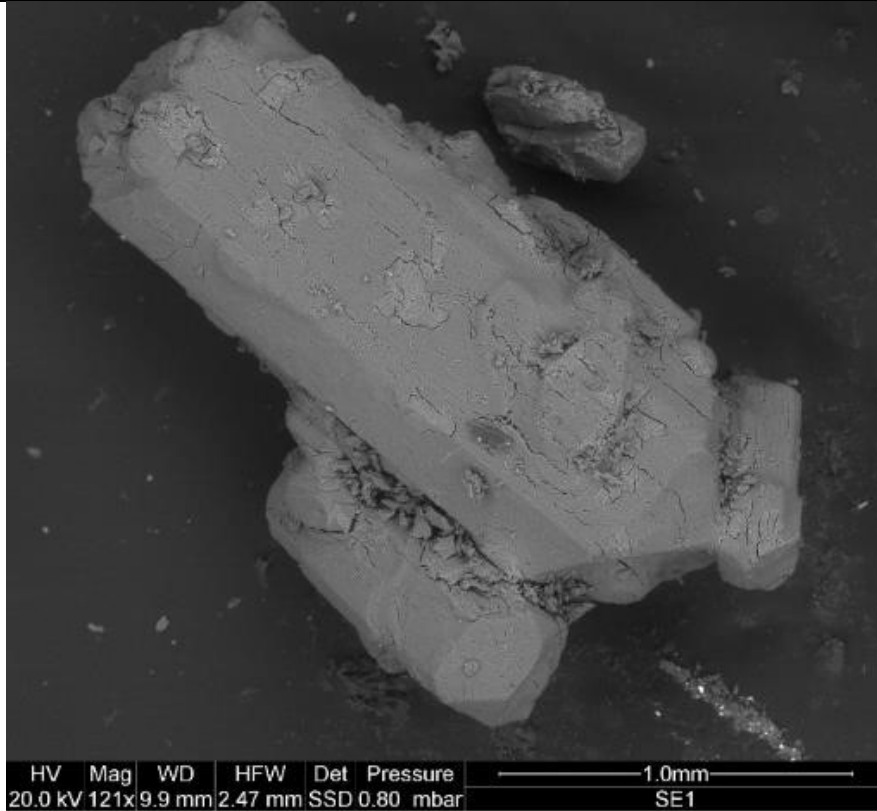
Il sale di Epsom è un minerale appartenente al gruppo dell'epsomite, chimicamente è magnesio solfato eptaidrato ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), reperibile in natura e prodotto artificialmente. È anche noto come sale inglese o sale amaro. Il nome deriva dalla località di origine, la città di Epsom, in Gran

Bretagna. Descritto da François Sulpice Beudant (1824). Nella farmacopea viene utilizzato come lassativo, grazie all'effetto osmotico che ha nell'intestino.

Il Sale di Epsom si differenzia dall'epsomite **per la natura cristallina e non fibrosa.**

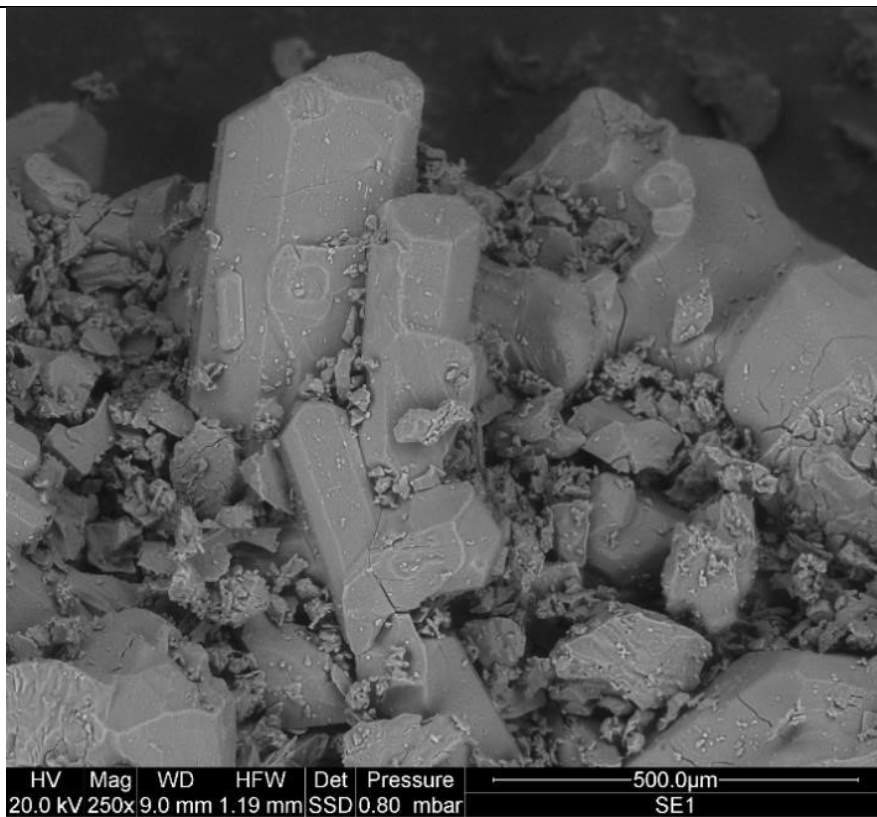


Immagini Sale Epsom



Sale Epsom-Figura 2, 121x:

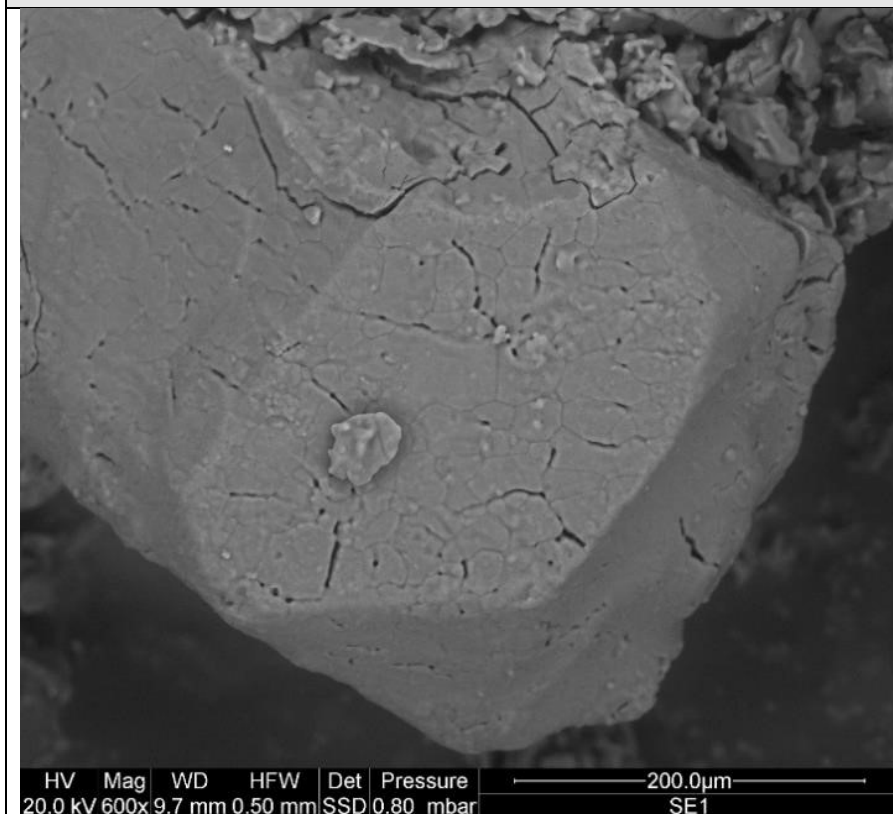
visione d'insieme; SSD; basso vuoto; campione tal quale non metallizzato.



Sale Epsom-Figura 3, 250x:

visione d'insieme; SSD; basso vuoto; campione tal quale non metallizzato.

Immagini Sale Epsom



Sale Epsom-Figura 4, 600x:

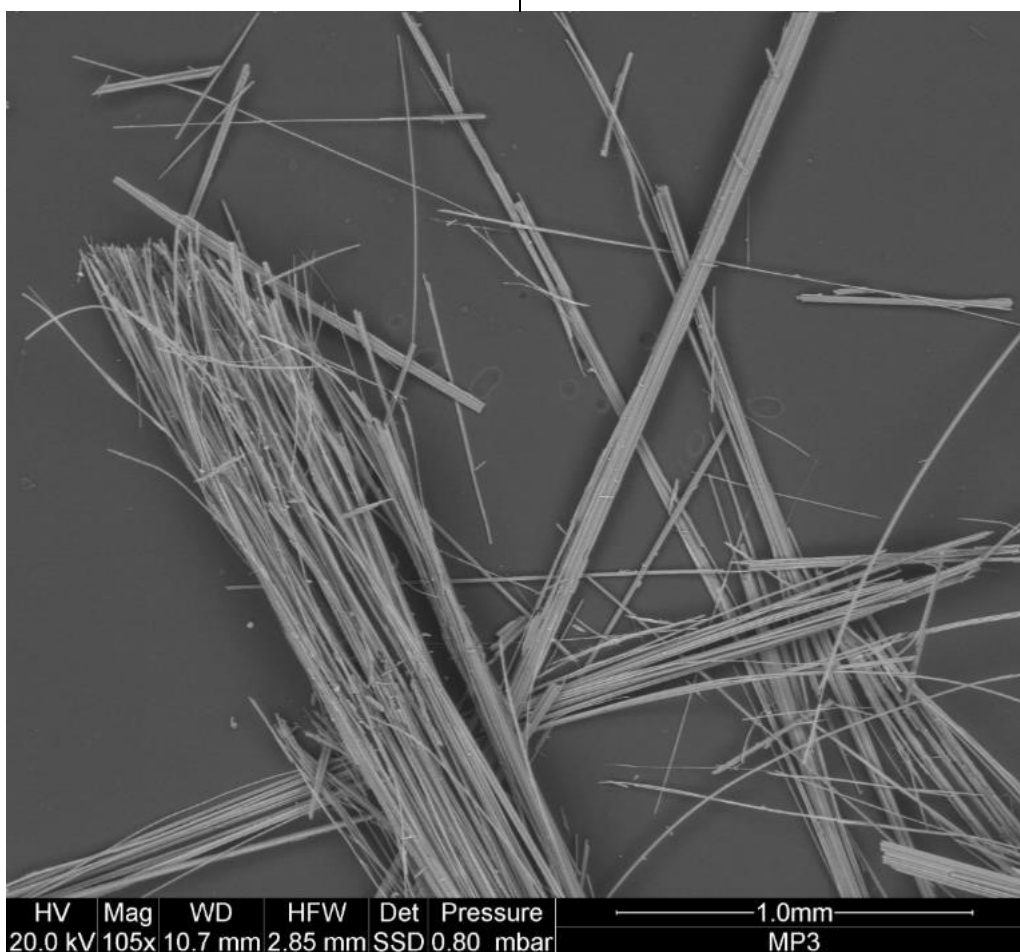
particolare cristallo; SSD; basso vuoto; campione tal quale non metallizzato.

Epsomite

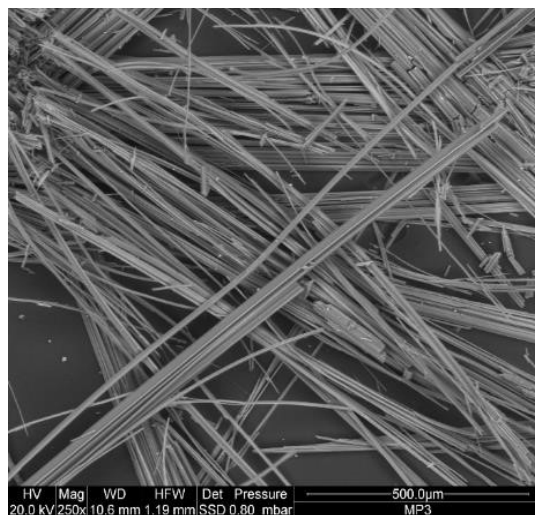
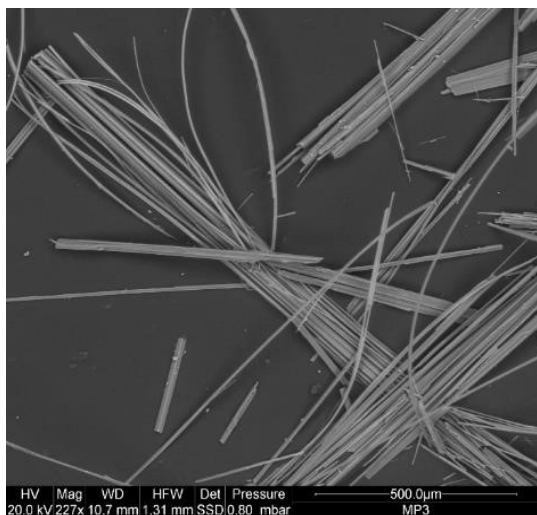
L'epsomite, forma fibrosa del Sale di Epsom, chimicamente è magnesio solfato eptaidrato $MgSO_4 \cdot 7(H_2O)$; si presenta come fibre aghiformi. Il minerale proviene da depositi di salgemma, da efflorescenze capillari nelle regioni calcaree o dolomitiche; oppure

dalla deposizione in sorgente termale o dalle zone di ossidazione dei giacimenti di pirite.

Anche il campione di epsomite studiato in questo lavoro proviene dalla antica miniera di zolfo di Perticara, Emilia-Romagna, Italia.



Epsomite 105x - basso vuoto - SSD

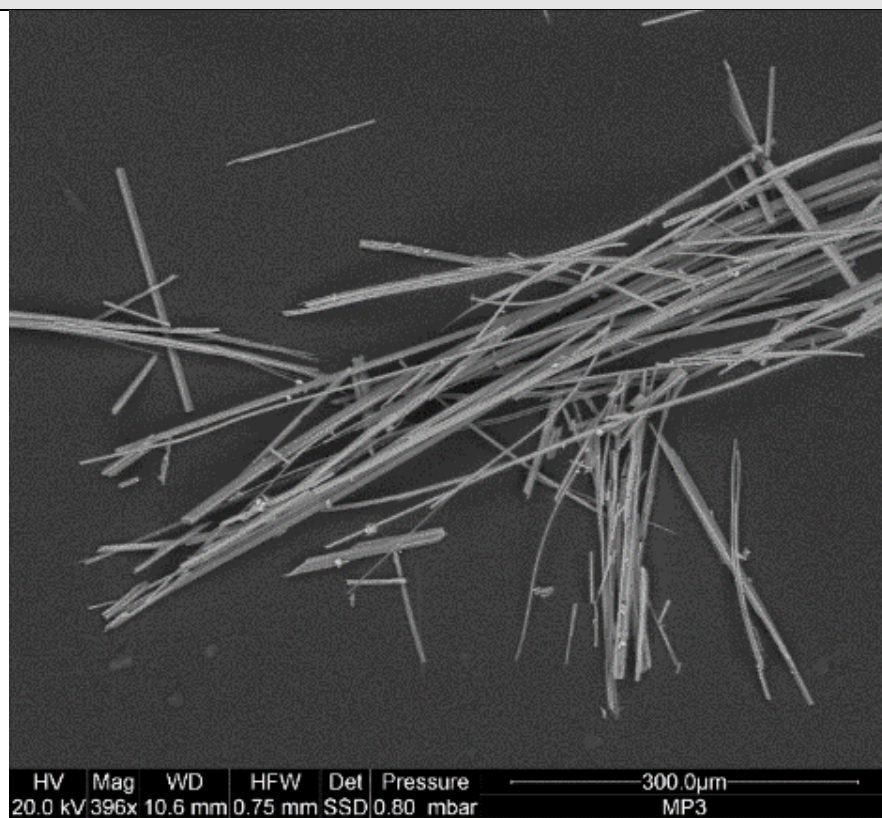


Epsomite 227x e 250x - basso vuoto - SSD

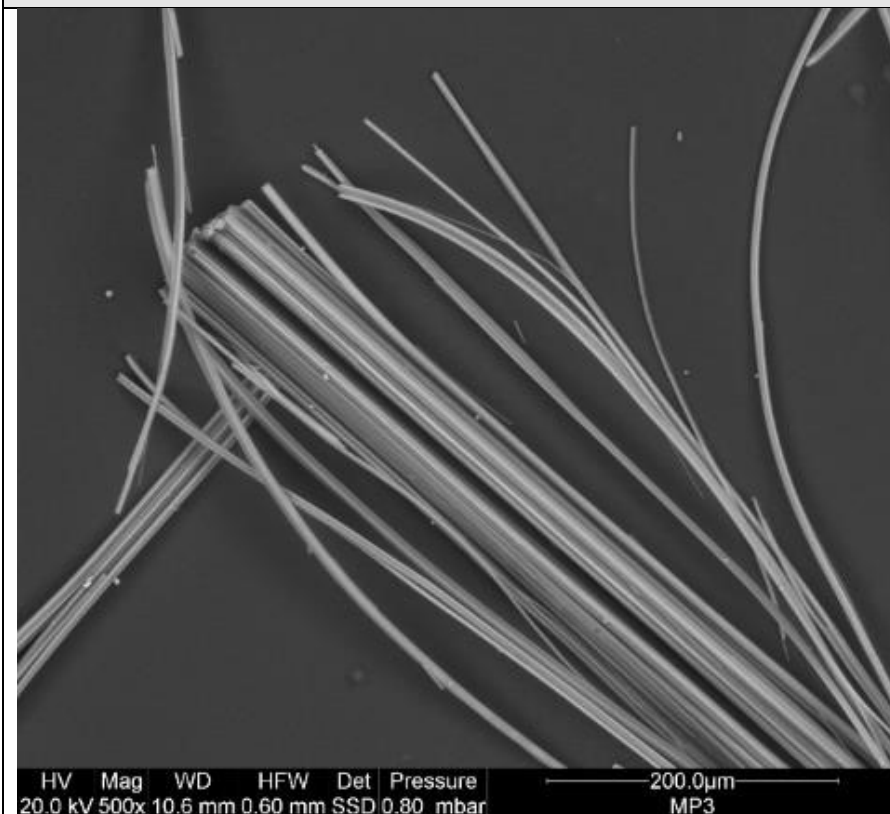
Immagini Epsomite

Epsomite-Figura 1, 396x:

visione d'insieme; SSD; basso vuoto; campione tal quale non metallizzato.

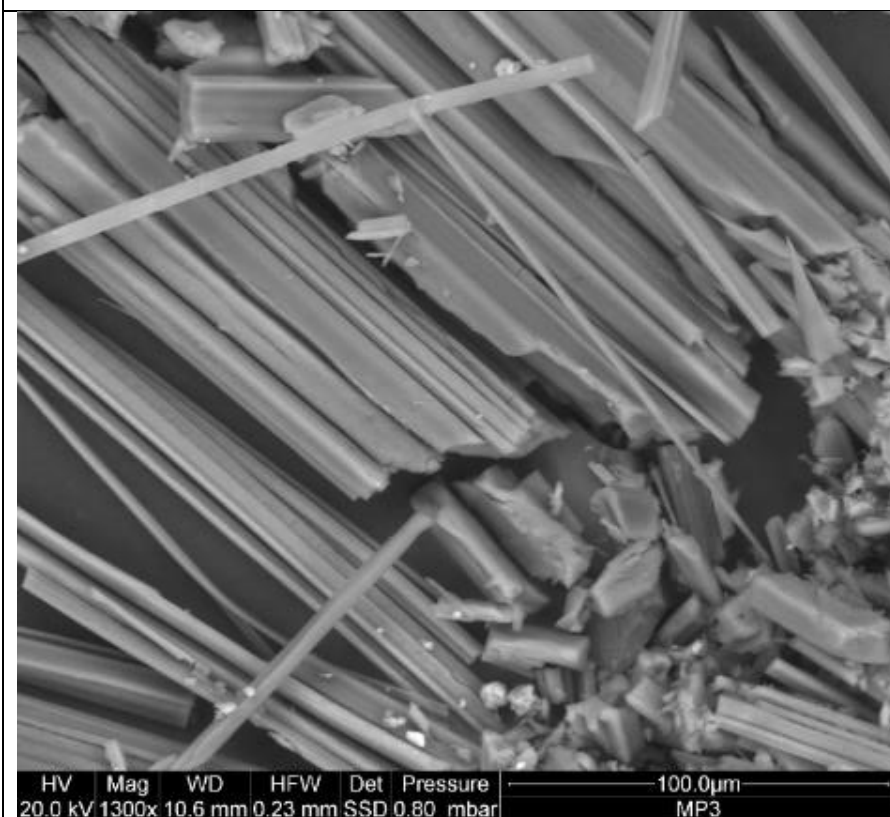


Immagini Epsomite



Epsomite-Figura 2, 500x:

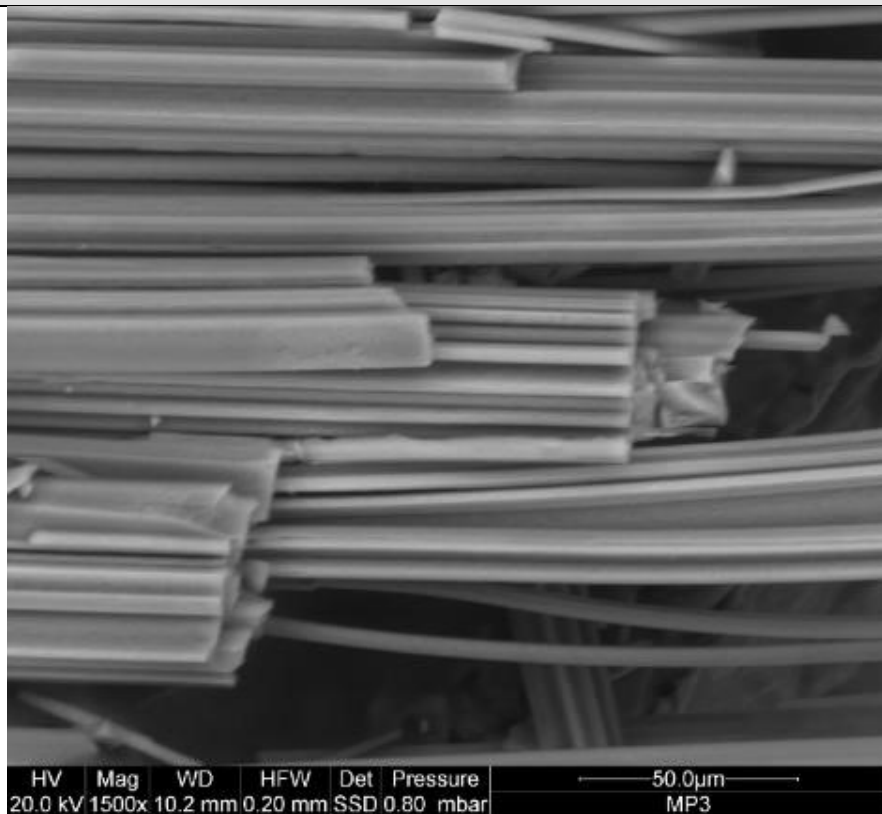
*fibre; SSD; basso vuoto;
campione tal quale non
metallizzato.*



Epsomite-Figura 3, 1300x:

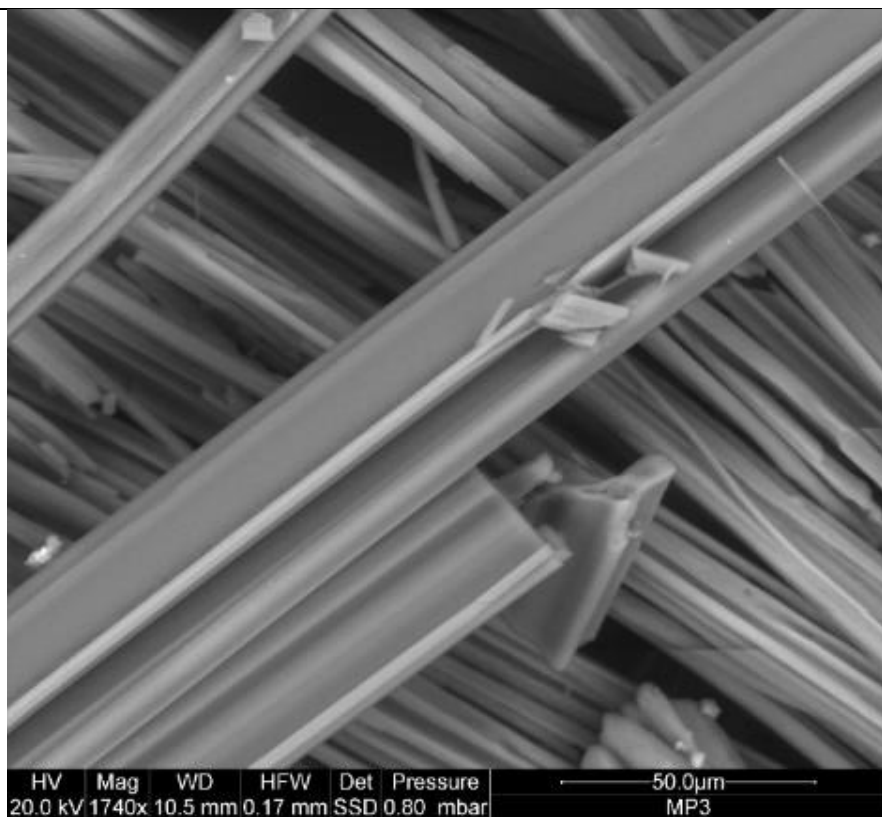
*fibre; SSD; basso vuoto;
campione tal quale non
metallizzato.*

Immagini Epsomite



Epsomite-Figura 4, 1500x:

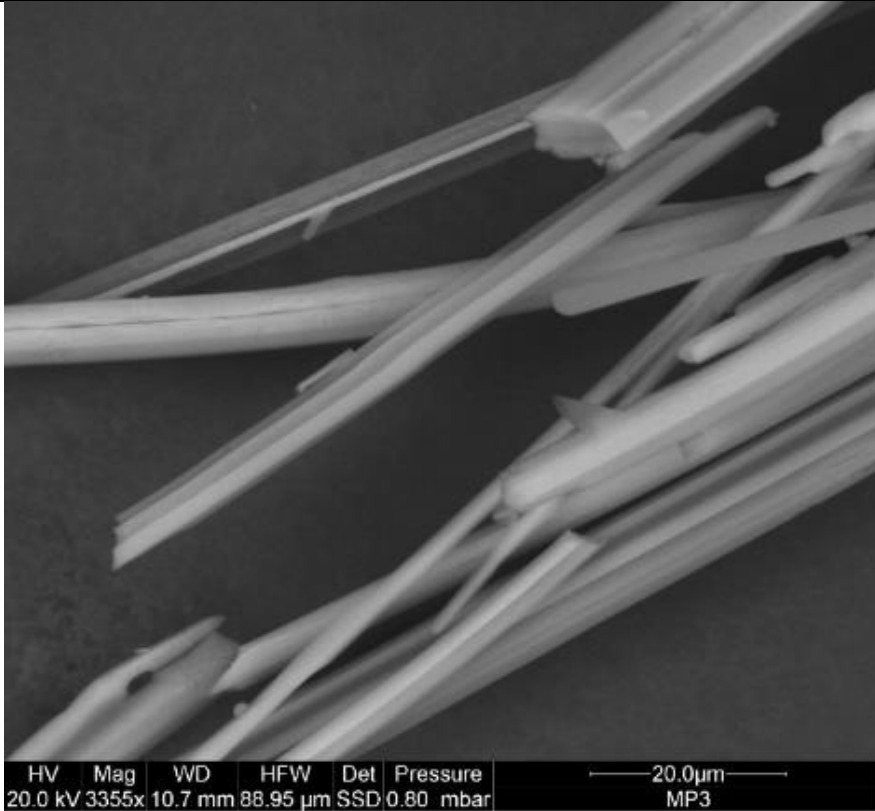
*fibre; SSD; basso vuoto;
campione tal quale non
metallizzato.*



Epsomite-Figura 5, 1740x:

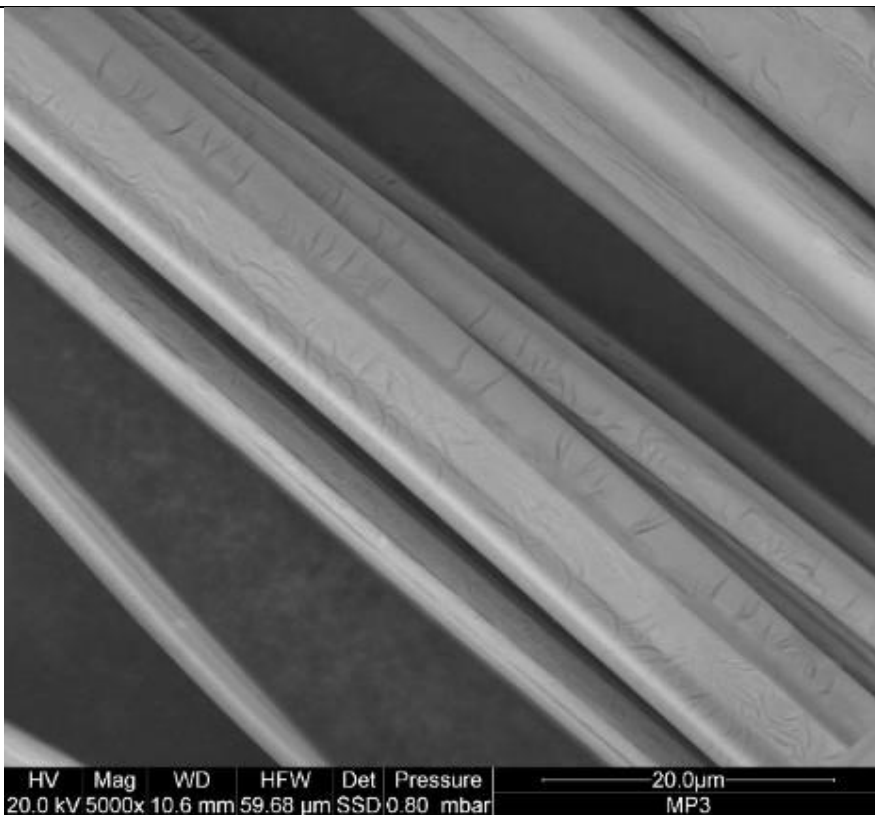
*fibre; SSD; basso vuoto;
campione tal quale non
metallizzato.*

Immagini Epsomite



Epsomite-Figura 6, 3355x:

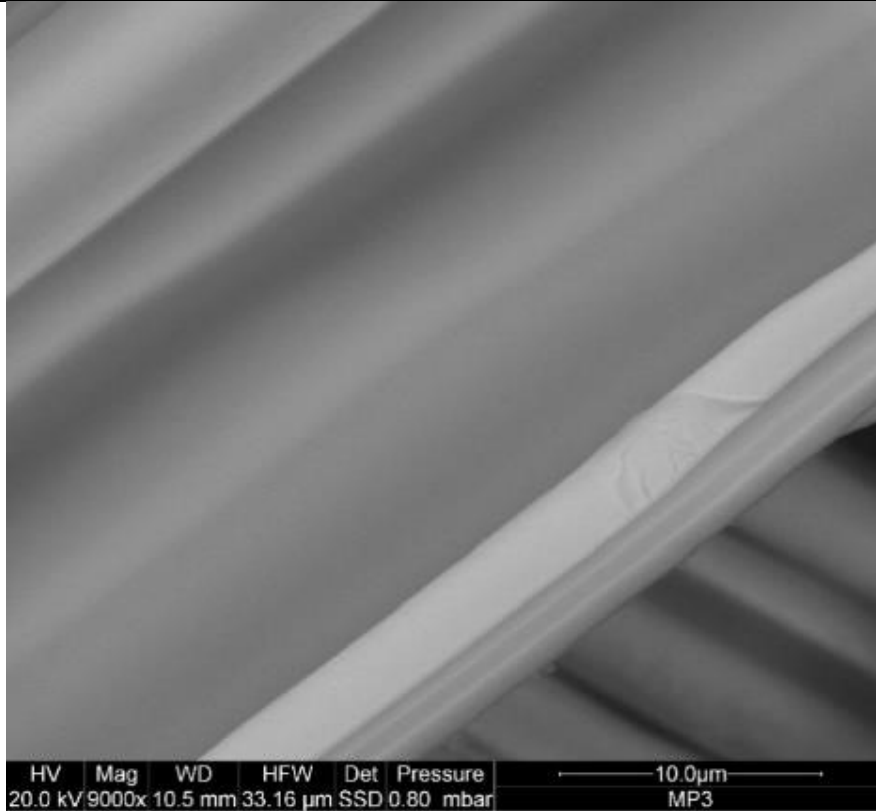
*fibre; SSD; basso vuoto;
campione tal quale non
metallizzato.*



Epsomite-Figura 7, 5000x:

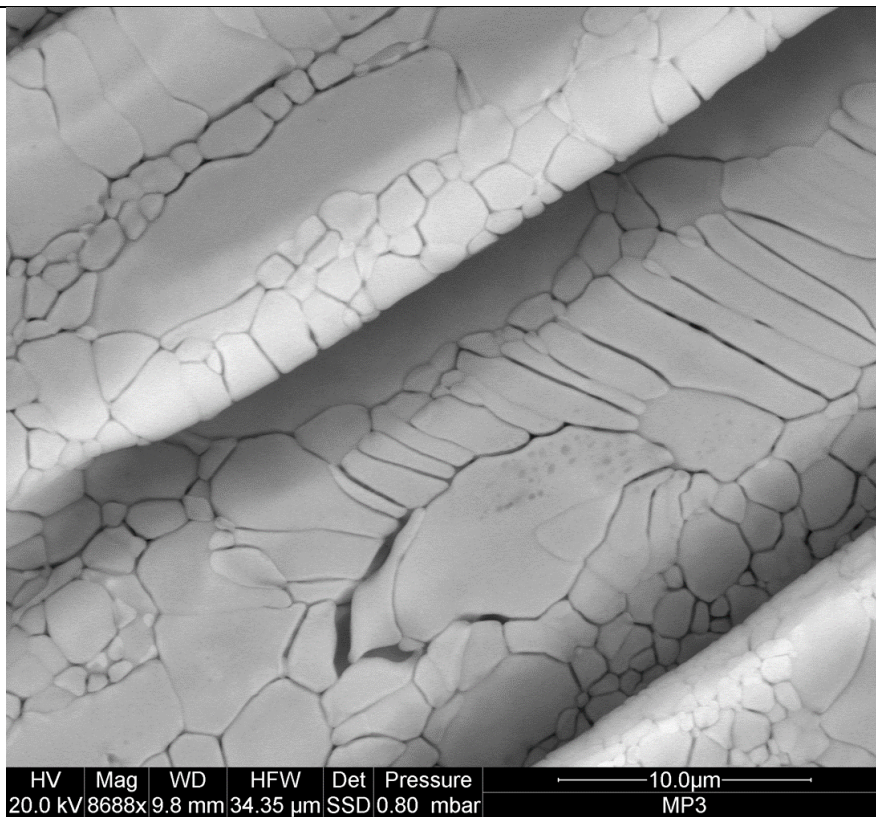
*fibre, si notano fenomeni di
cracking superficiale; SSD;
basso vuoto; campione tal quale
non metallizzato.*

Immagini Epsomite



Epsomite-Figura 8, 9000x:

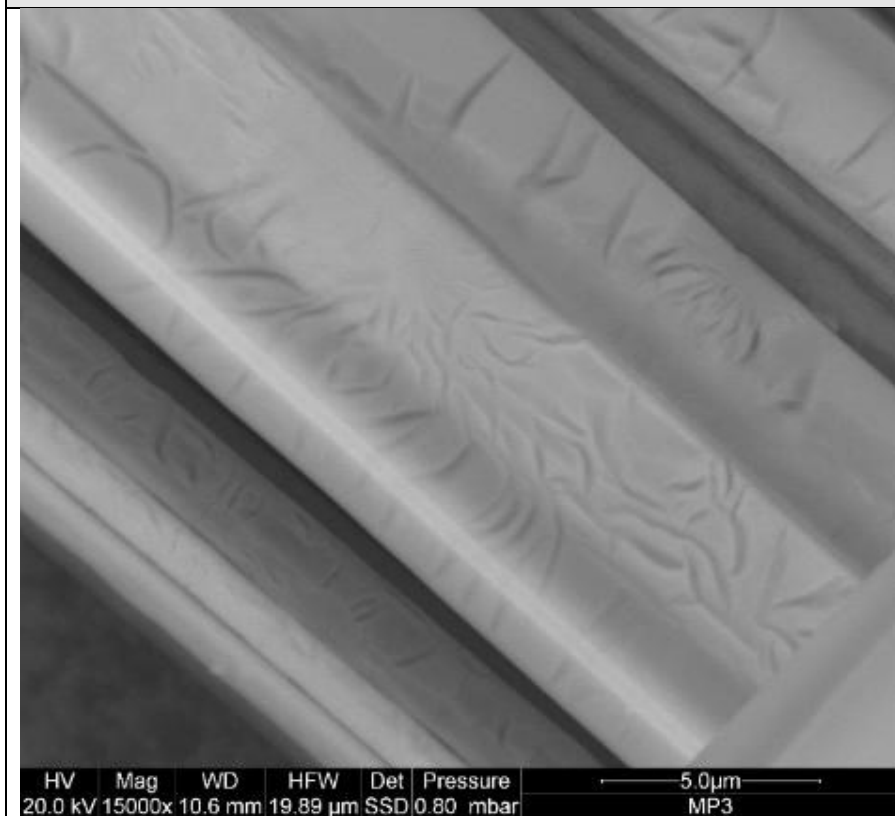
fibre, si notano fenomeni di cracking superficiale; SSD; basso vuoto; campione tal quale non metallizzato.



Epsomite-Figura 9, 8688x:

fibre, si notano fenomeni di cracking superficiale; SSD; basso vuoto; campione tal quale non metallizzato.

Immagini Epsomite



Epsomite-Figura 10, 15000x:

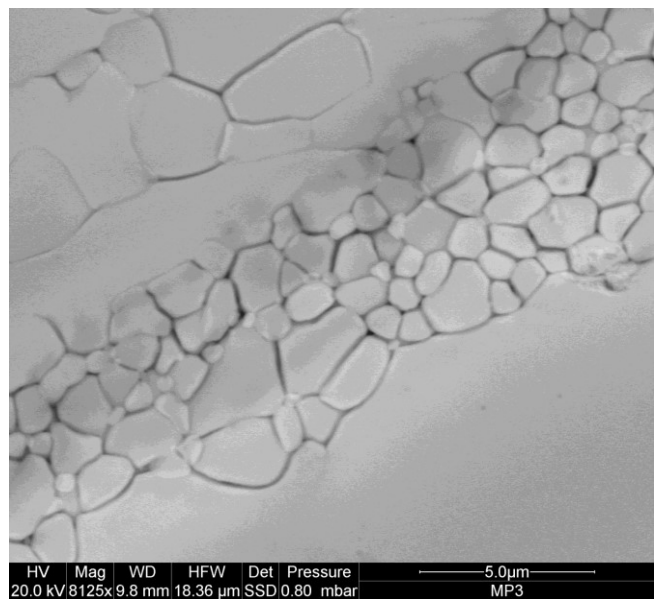
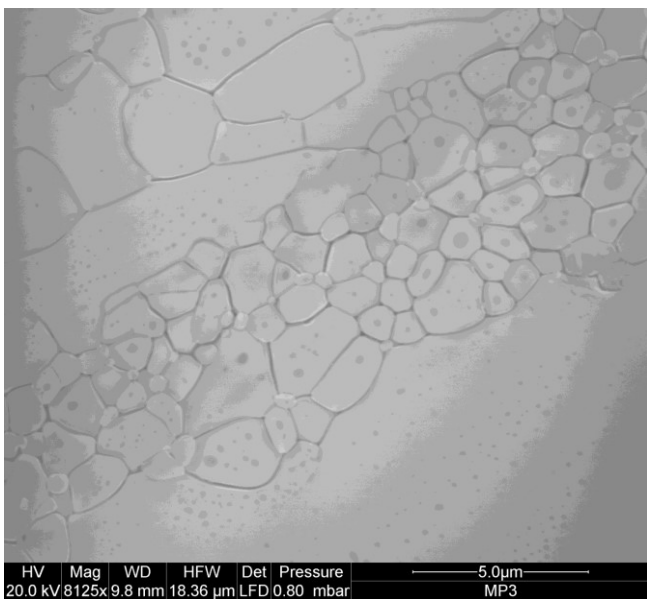
fibre, si notano fenomeni di cracking superficiale; SSD; basso vuoto; campione tal quale non metallizzato.

Cracking Superficiale Epsomite

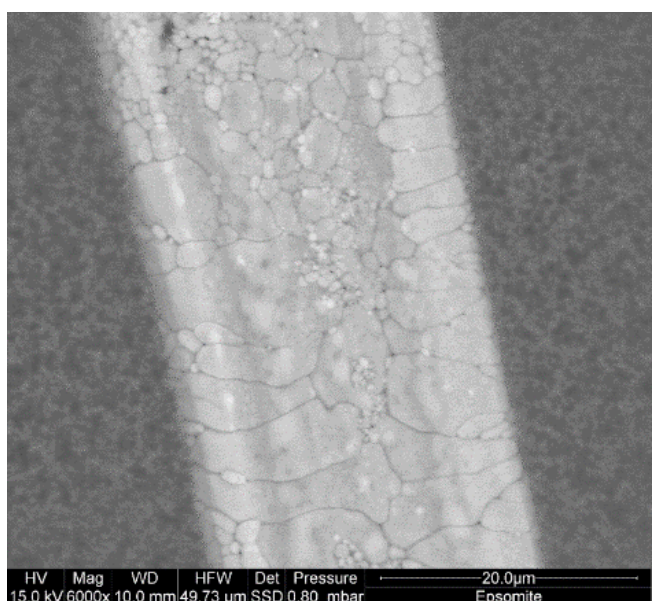
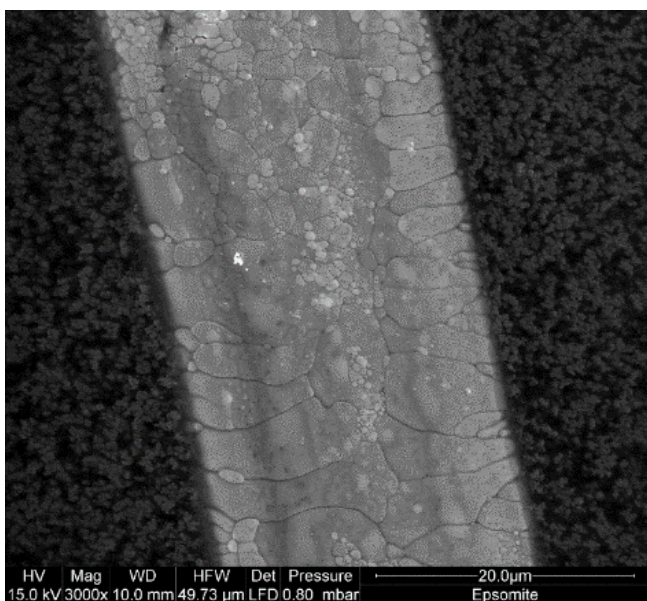
Con osservazioni fatte in n tempi diversi, si sono riscontrati a distanza di tempo evidenti fenomeni di cracking superficiale. Un possibile effetto boudinage, non riscontrato, era stato ipotizzato come possibile meccanismo di interazione con matrici biologiche, ipotizzando una biosolubilità con matrici

organiche dovute alla presenza sulle fibre di materia organica. “Boudinage” è un termine geologico che indica strutture formate in estensione, in cui un corpo tabulare rigido come si sviluppa deformato in una matrice diversa.

Dopo una settimana dalla prima analisi si evidenziano cracking da rottura sulle fibre:



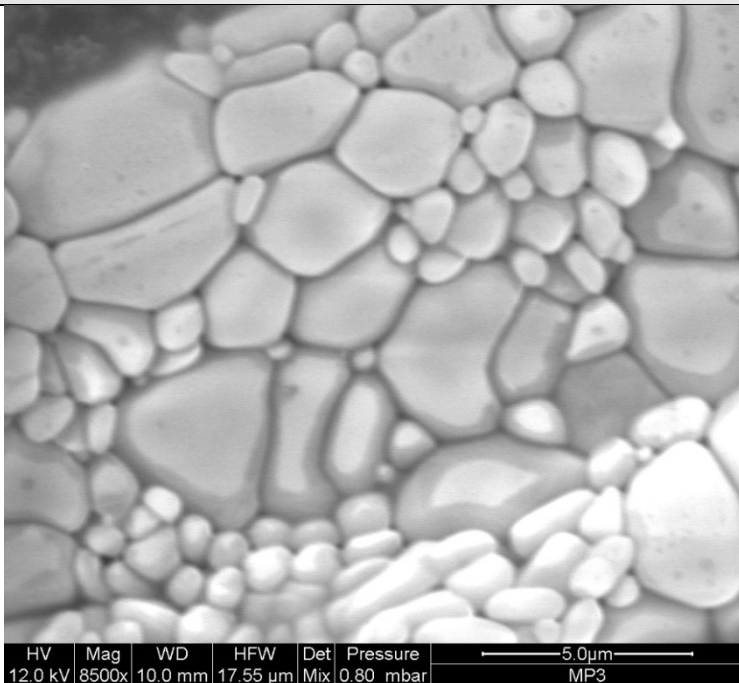
Dopo due mesi, le fratture sono evidenti anche ad ingrandimenti minori.



Da notare, come nelle immagini precedenti ad una stessa scala corrispondano ingrandimenti diversi, nell'immagine a sinistra (3000x) è stato utilizzato il sensore LFD, mentre in quella a destra (6000x) è stato utilizzato il sensore SSD, sempre in condizioni di basso vuoto.

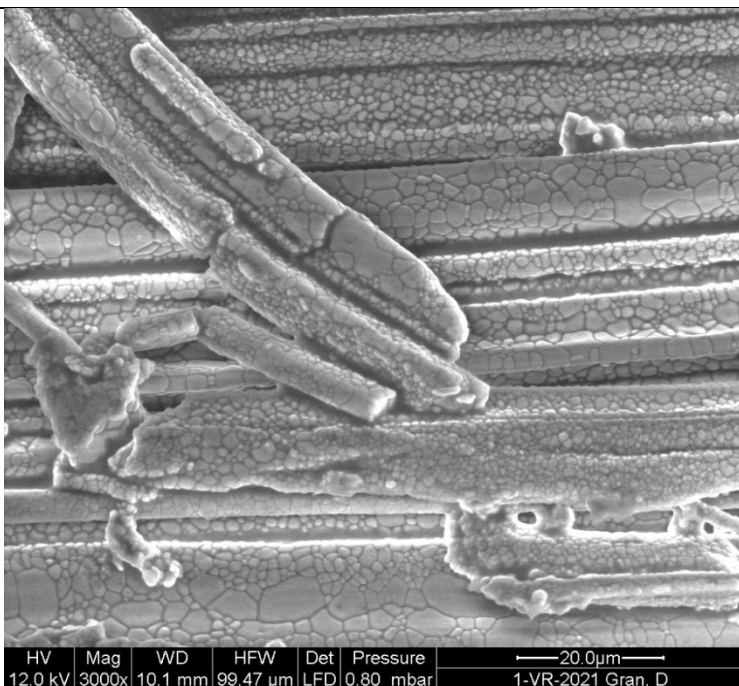
Lo stesso stub analizzato, conservato in atmosfera non protetta, è stato osservato nuovamente a distanza di 18 mesi, verificando che il fenomeno del cracking è progredito, come mostrato nelle immagini seguenti (Epsomite, figure 11 e 12).

Immagini Epsomite



Epsomite-Figura 11, 8500x:

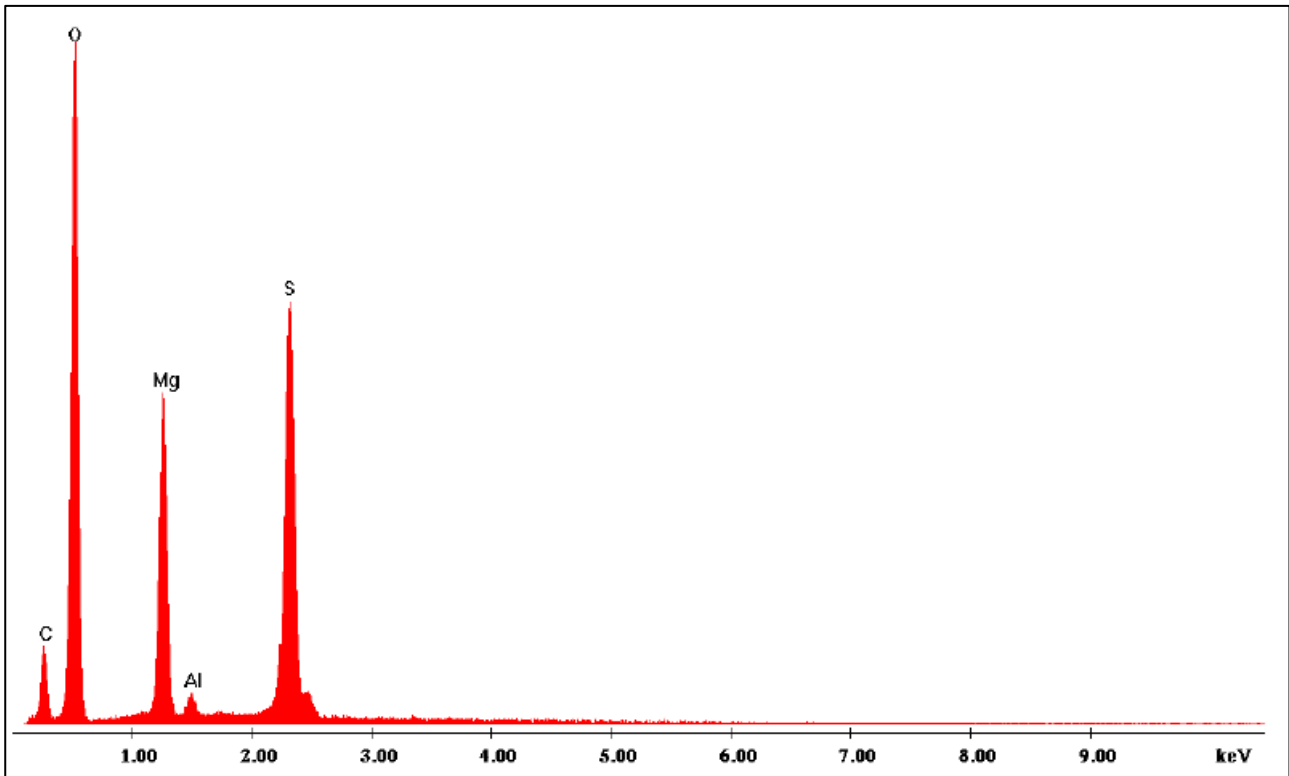
Cracking superficiale, dettaglio ottenuto dal segnale mixato (50% LFD e 50% SSD, 8500x)



Epsomite-Figura 12, 3000x:

fascio di fibre, il cracking è diffuso sulle fibre in modo uniforme; LFD; basso vuoto; campione tal quale non metallizzato.

Caratterizzazione chimica

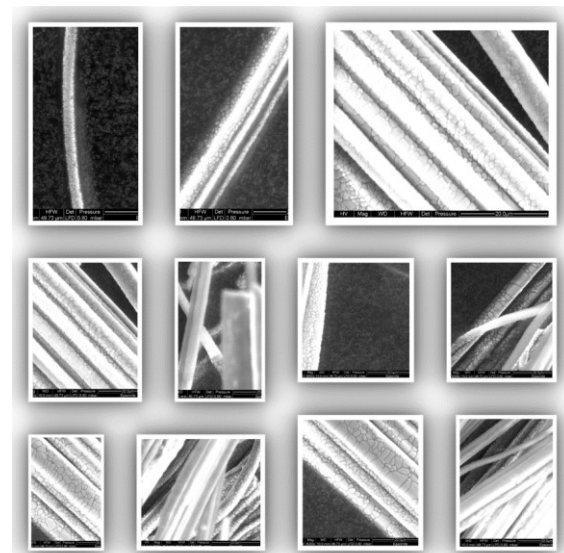


Esame EDXS Epsomite, la composizione è $MgSO_4$

Le fibre di epsomite, un solfato di magnesio con formula $MgSO_4$, hanno diametri maggiori (fino a circa $2-3 \mu m$), ma sono caratterizzate da una maggiore reattività superficiale nei fenomeni di cracking superficiale, e questo potrebbe essere correlato alla possibile biosolubilizzazione delle fibre nelle strutture cellulari. La formazione di superfici di fessure fratturate potrebbe probabilmente essere correlata a reazioni di idratazione con conseguenti variazioni strutturali.

Le condizioni comuni di analisi in SEM sono state:

- working distance: 10 mm,
- tilt angle: 0°



La caratterizzazione chimica tramite EDX è stata eseguita operando in condizioni di basso vuoto con potenziali di accelerazione tra i 10 ed i 25 kV (informazione chimica).

Calcolo del diametro geometrico medio

Dall'analisi preliminare di 36 fibre, con un ingrandimento 6000x, si è ottenuto:

DMGOPL-2ES = 4,33 micron

Tale valore, inferiore a 6 micron, rende la fibra misurata potenzialmente pericolosa in quanto inalabile per analogia con quanto normato le fibre artificiali vetrose.

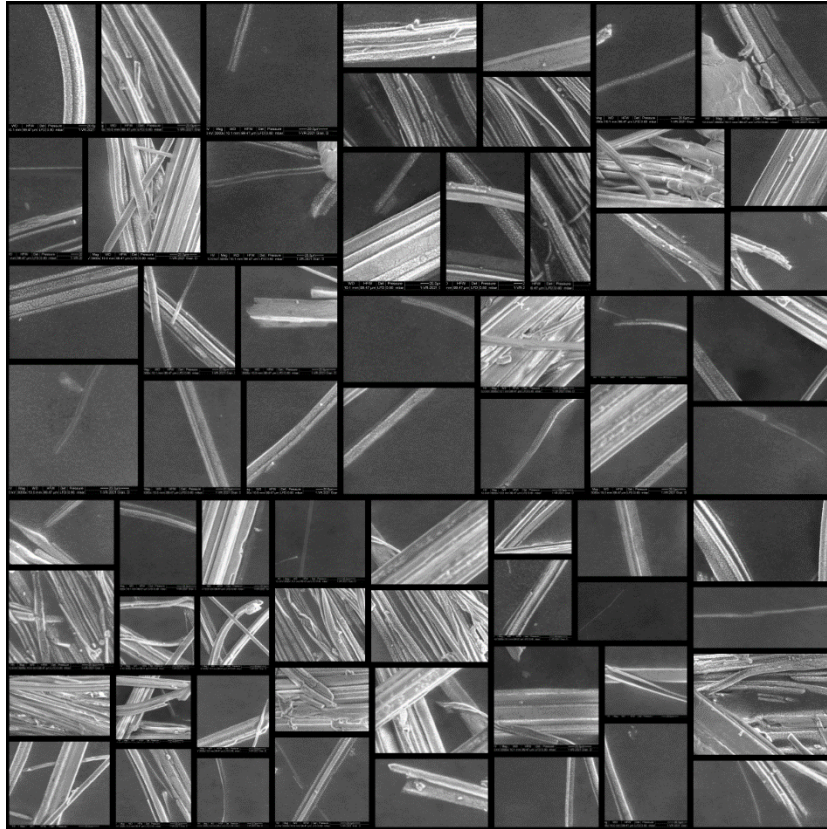
	Length		Length		Length		Length
	Micron		Micron		Micron		Micron
1	3,14942	10	6,01083	19	19,57574	28	6,03902
2	5,35061	11	6,73254	20	9,52038	29	3,45787
3	3,6568	12	5,90732	21	3,57328	30	5,21396
4	2,01073	13	8,00778	22	3,85188	31	6,54386
5	9,72567	14	7,63765	23	2,2006	32	11,84544
6	5,56519	15	7,58434	24	7,26067	33	5,52307
7	7,00723	16	7,08656	25	13,39359	34	7,04834
8	6,3194	17	14,29987	26	2,77814	35	7,05888
9	6,44049	18	7,05035	27	3,74948	36	2,52599

Misura preliminare diametri

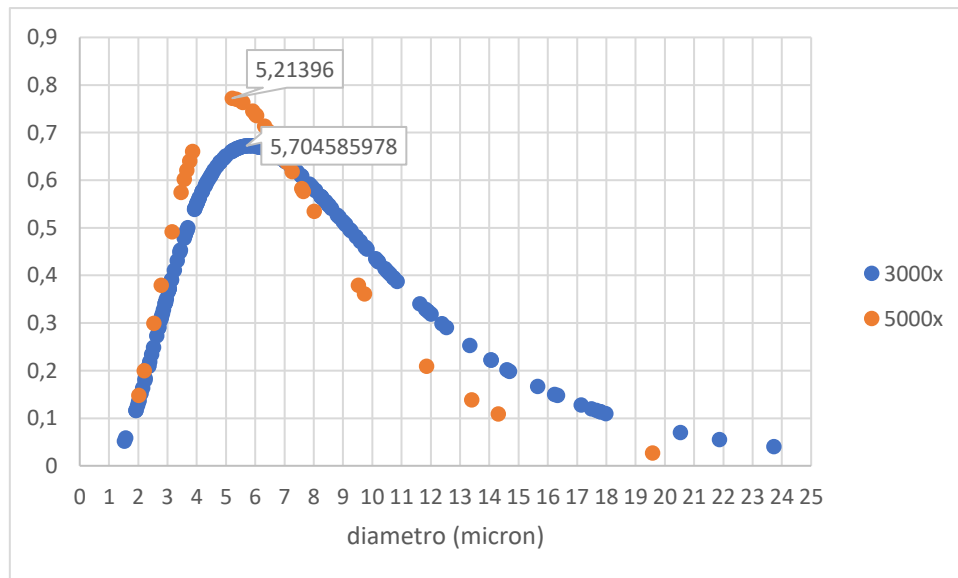
La misura è stata ripetuta diminuendo l'ingrandimento (3000x) ed aumentando il numero di fibre (178) elaborate, ottenendo:

DMGOPL-2ES = 5,31 micron (con errore $2\Delta=0,47$ micron)

Le misure ottenute sono riportate in allegato (Tabella diametri epsomite).



Diametri Epsomite, 3000x

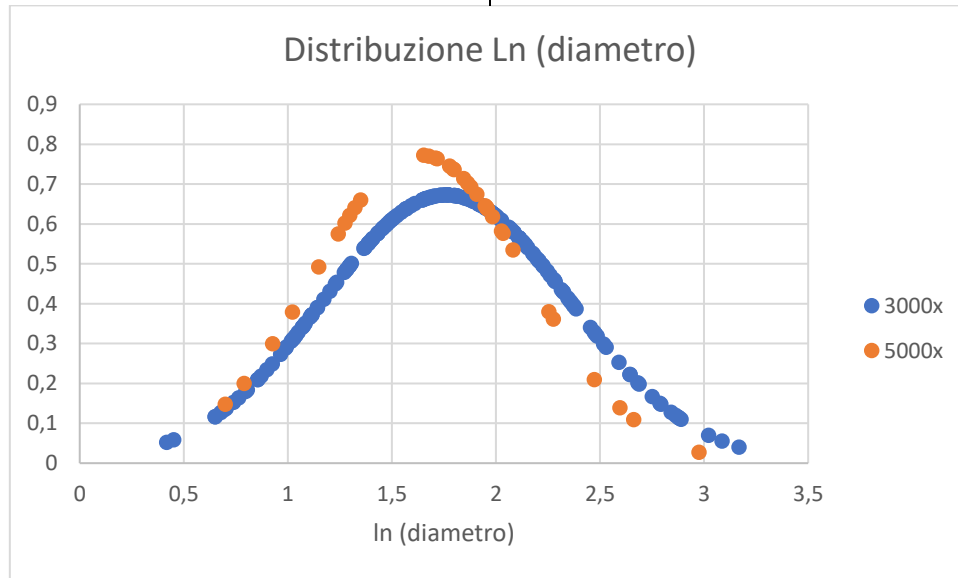


Distribuzione dimensionale dei diametri

Nel grafico “Distribuzione dimensionale dei diametri”, la distribuzione normale dei diametri ottenuti dalle letture, a 3000x e a 5000x, l'andamento non è gaussiano (valore medio $\ln(\text{diametro})$): 1,76 a 3000x, 1,64 a 5000x; deviazione

standard: 0,59 a 3000x, 0,51 a 5000x). Le deviazioni standard dei logaritmi del diametro sono tra loro confrontabili, a dimostrazione di come una maggiore precisione nella lettura a 5000x compensi il numero basso di letture ottenute nella

prima prova. Nella lettura a 5000x rispetto a quello a 3000x si sono sovrastimati i diametri inferiori nel conteggio.

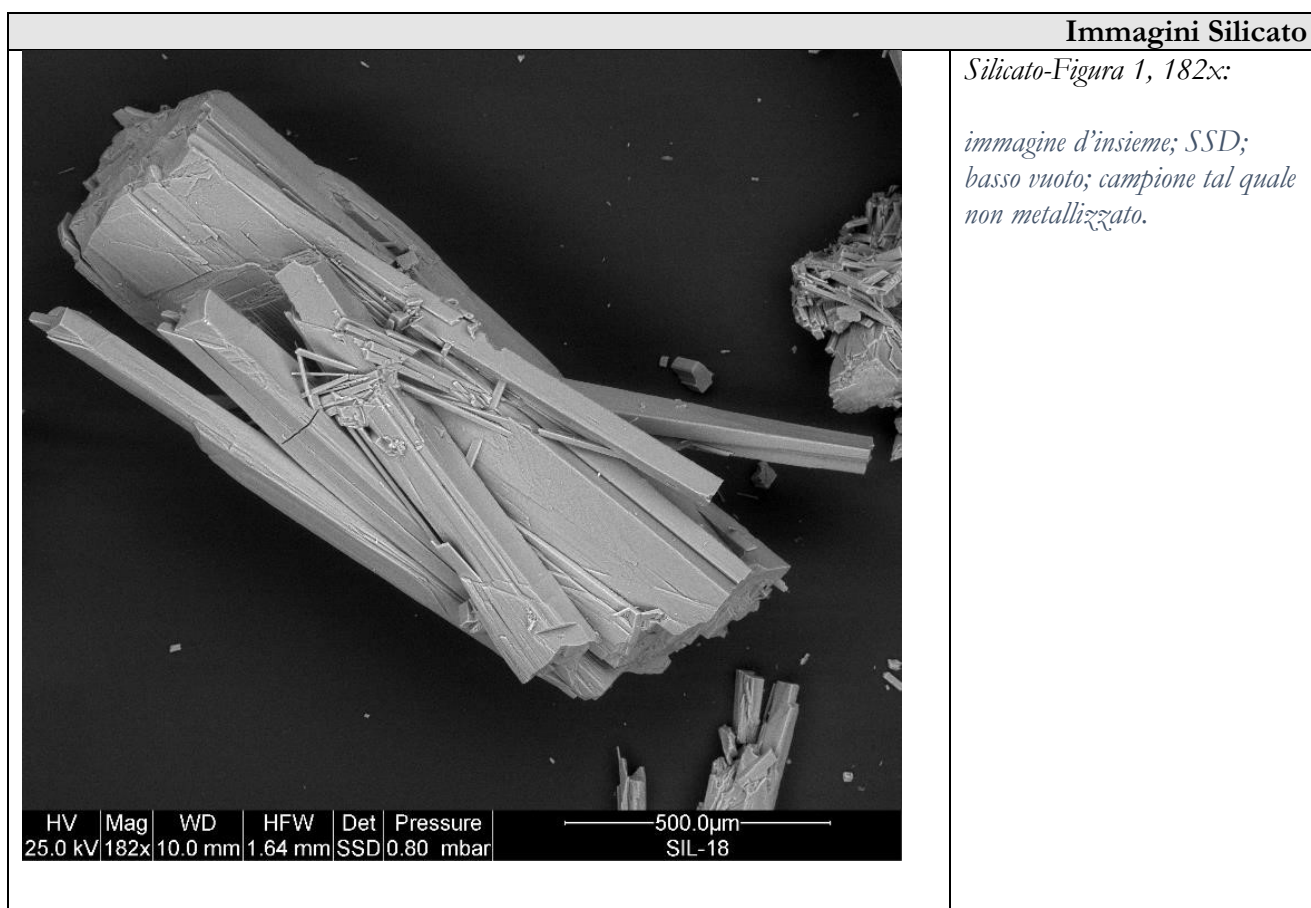


Nel grafico soprastante, la distribuzione normale del logaritmo naturale dei diametri ottenuti dalle letture, l'andamento è gaussiano, come aspettato

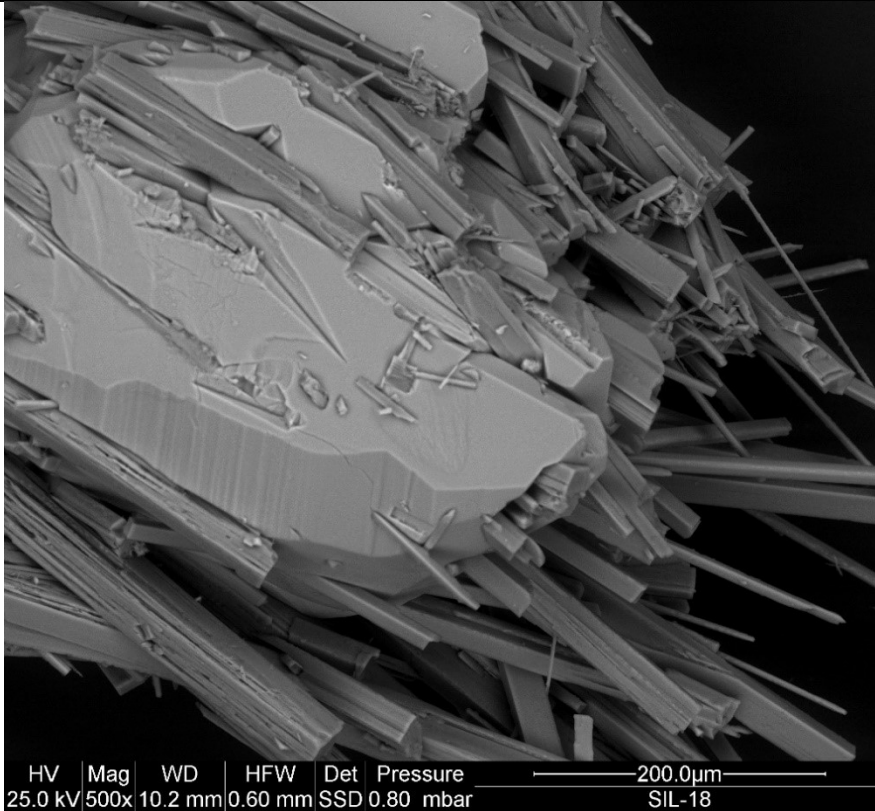
dall'applicazione del metodo per il calcolo del diametro geometrico ponderato.

Silicato

È stato analizzato un gruppo di fibre appartenenti al gruppo dei silicati, si tratta di un minerale fibroso in corso di caratterizzazione. Il campione è proveniente dai Monti Lessini, Provincia Vulcanica Veneta, Italia settentrionale.

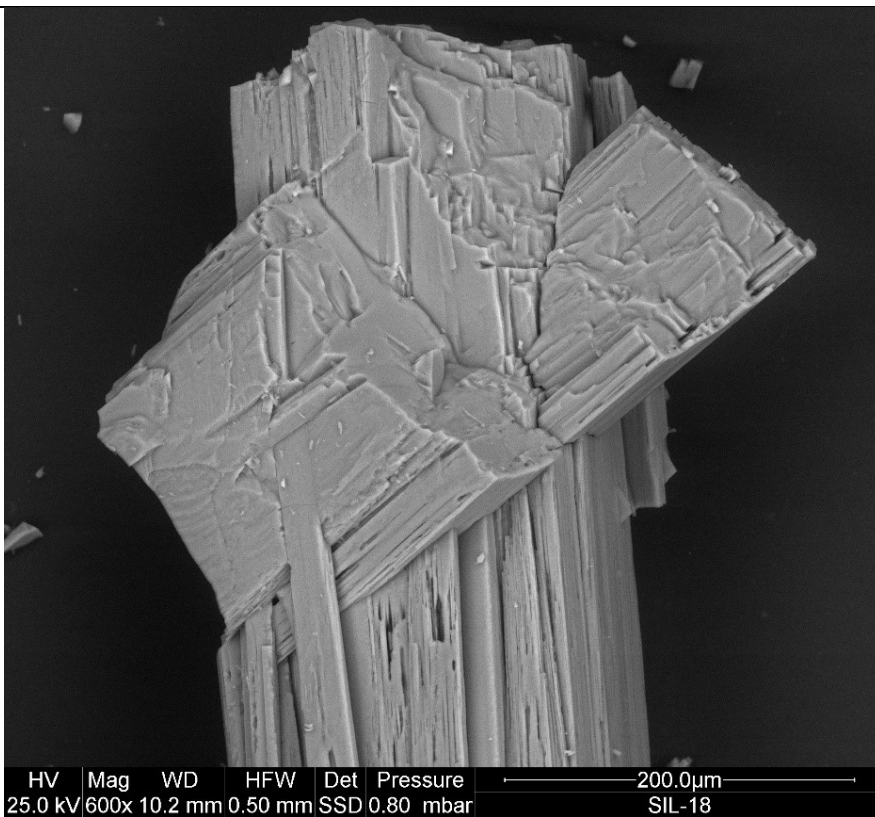


Immagini Silicato



Silicato-Figura 2, 500x:

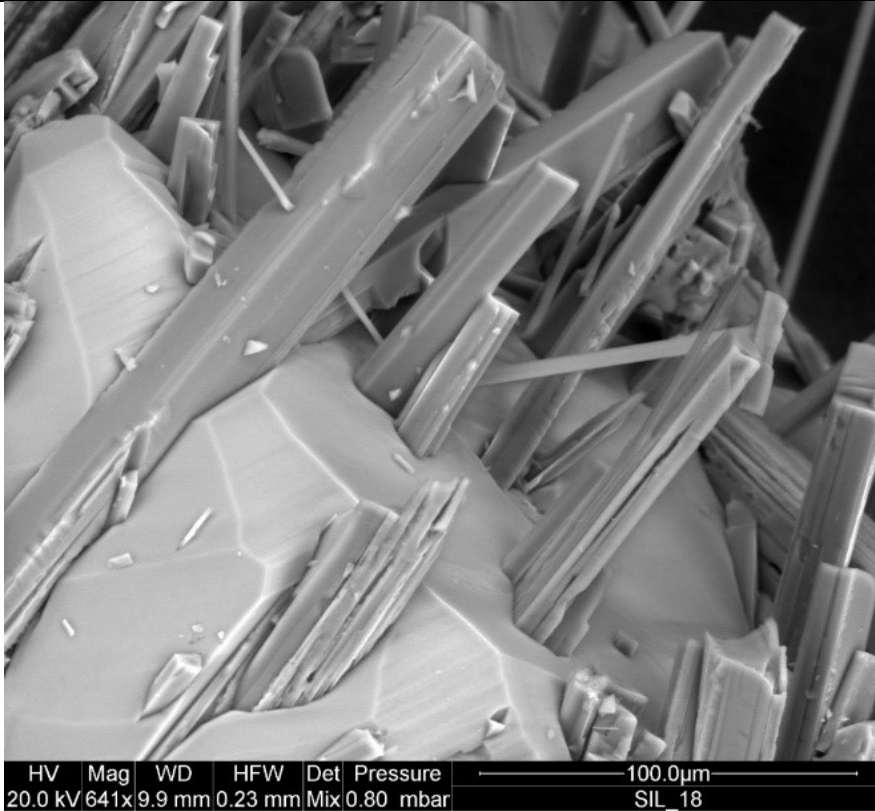
*immagine d'insieme; SSD;
basso vuoto; campione tal quale
non metallizzato.*



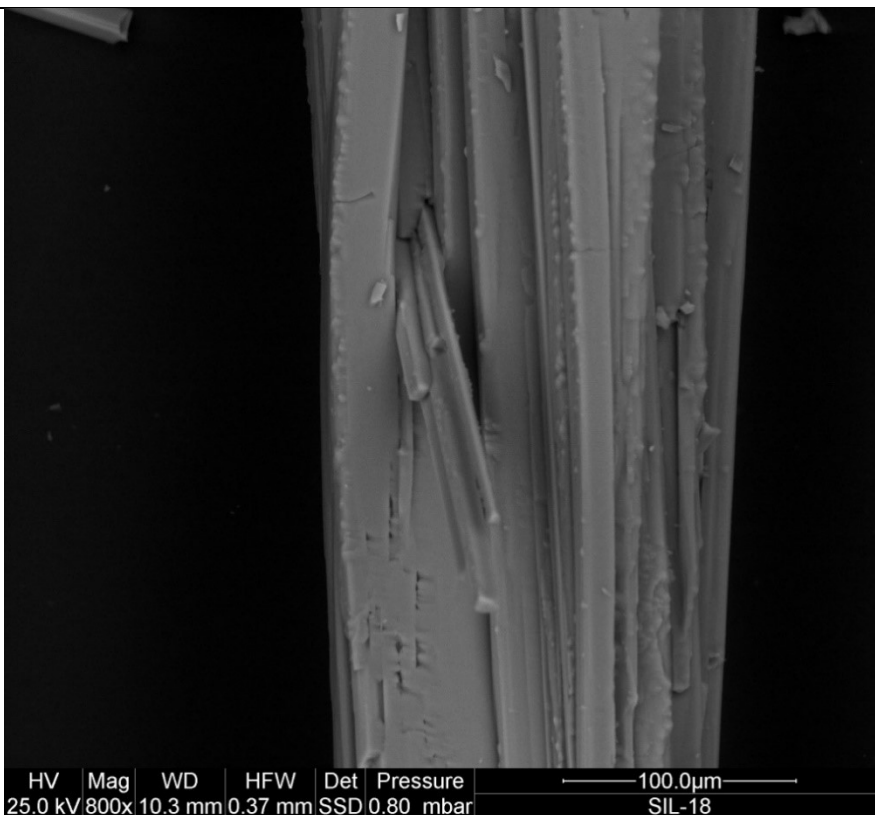
Silicato-Figura 3, 600x:

*immagine d'insieme; SSD;
basso vuoto; campione tal quale
non metallizzato.*

Immagini Silicato

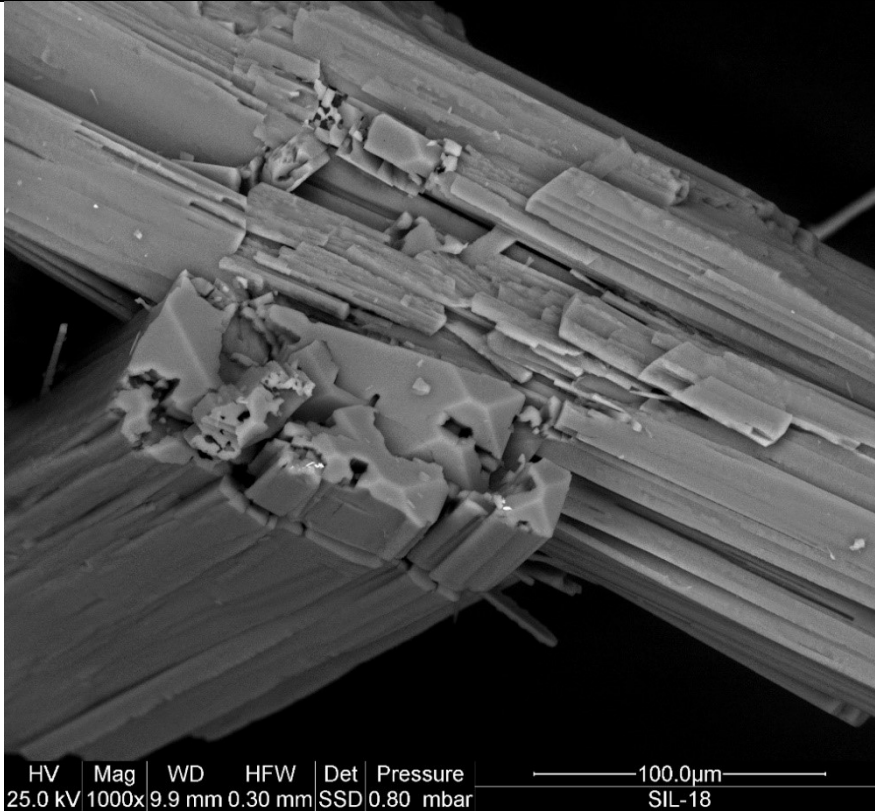


*Silicato-Figura 4, 641x:
fibre; Mix; basso vuoto;
campione metallizzato*



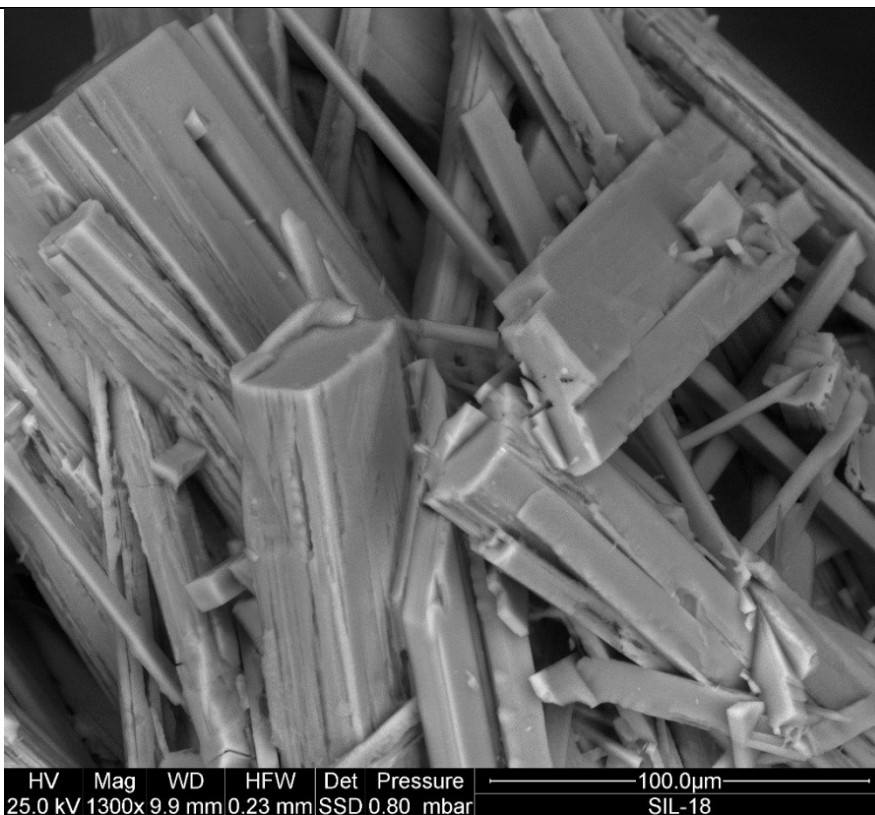
*Silicato-Figura 5, 800x:
fibre; SSD; basso vuoto;
campione tal quale non
metallizzato.*

Immagini Silicato



Silicato-Figura 6, 1000x:

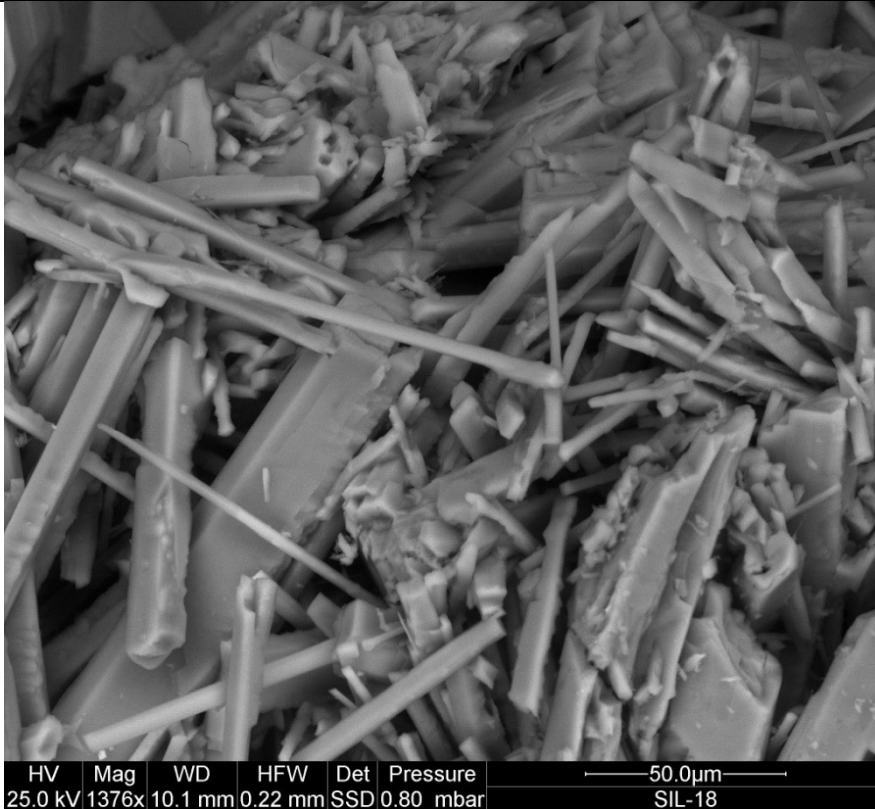
*fibre; SSD; basso vuoto;
campione tal quale non
metallizzato.*



Silicato-Figura 7, 1300x:

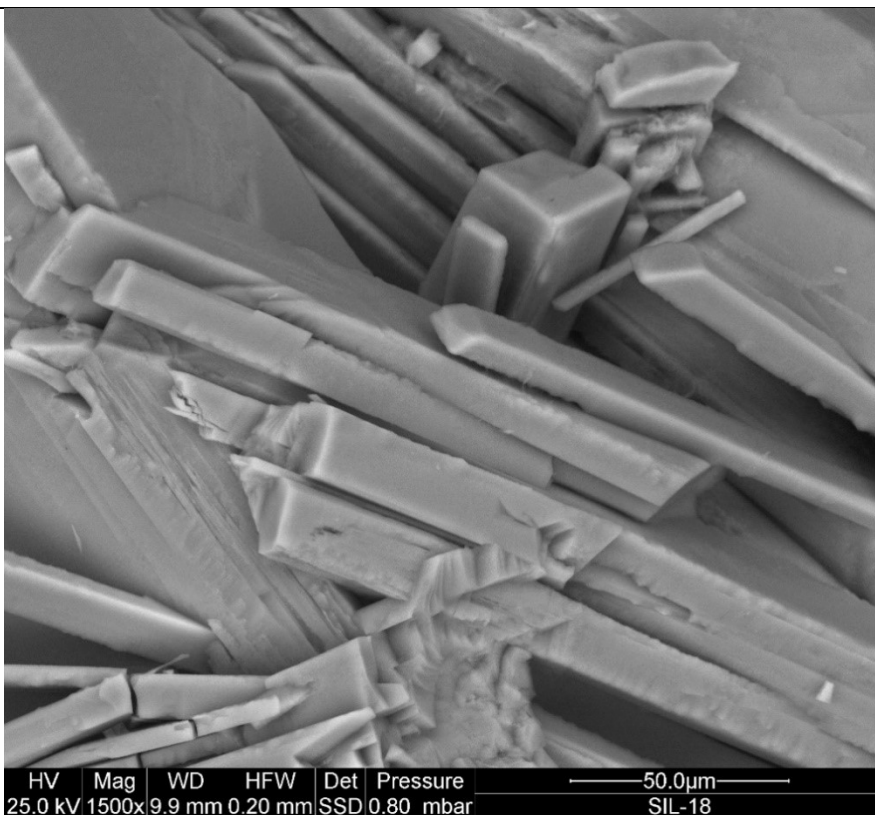
*fibre; SSD; basso vuoto;
campione tal quale non
metallizzato.*

Immagini Silicato



Silicato-Figura 8, 1376x:

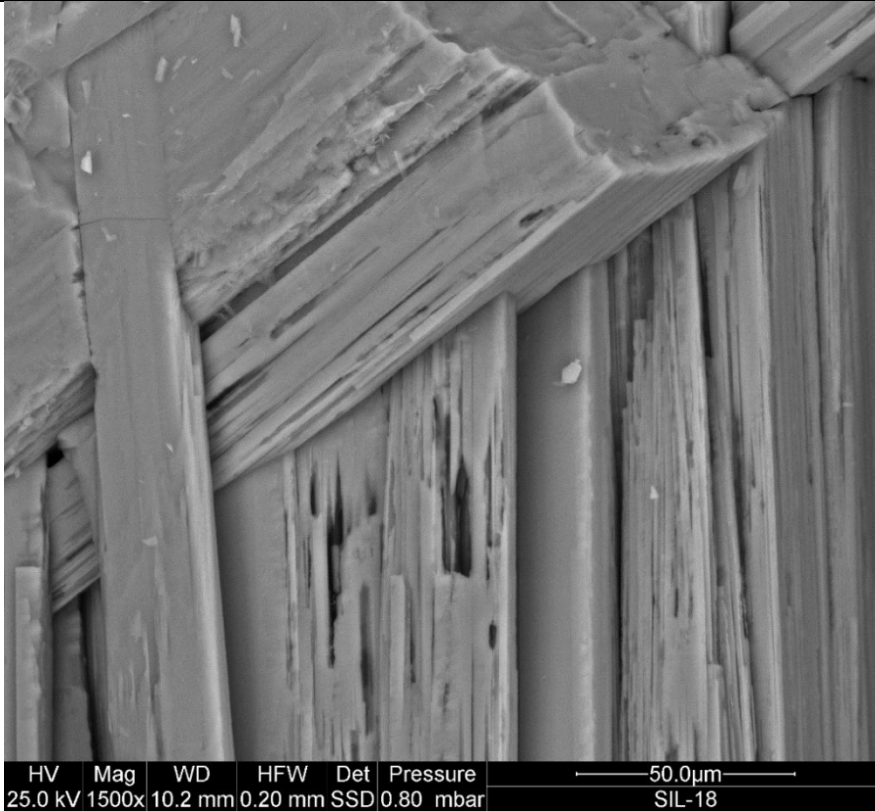
*fibre; SSD; basso vuoto;
campione tal quale non
metallizzato.*



Silicato-Figura 9, 1500x:

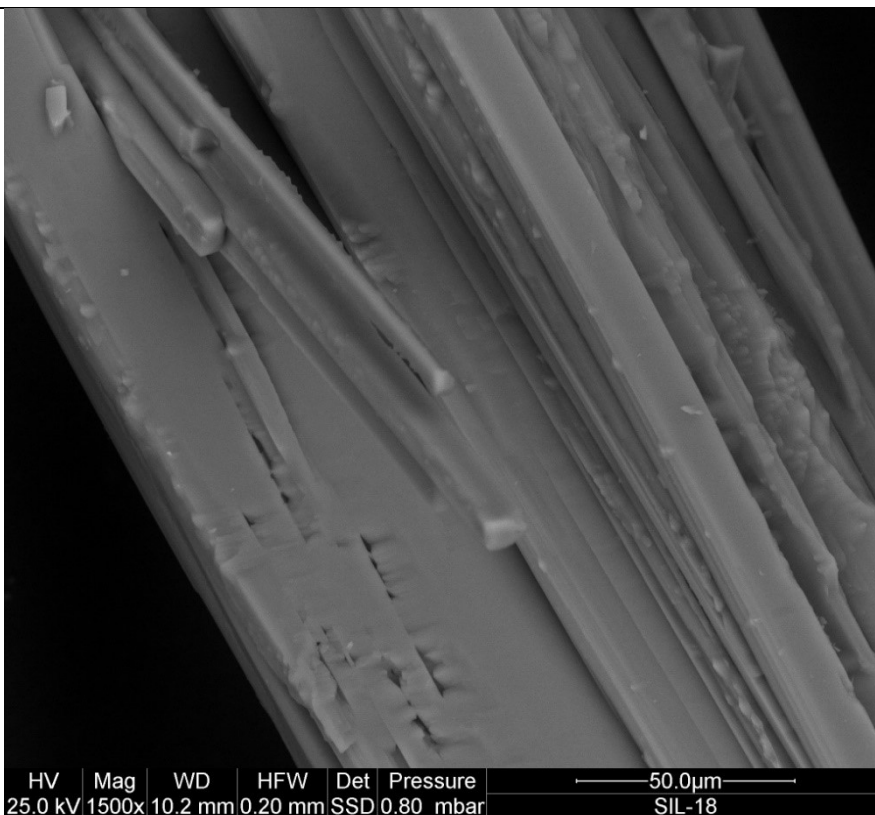
*fibre; SSD; basso vuoto;
campione tal quale non
metallizzato.*

Immagini Silicato



Silicato-Figura 10, 1500x:

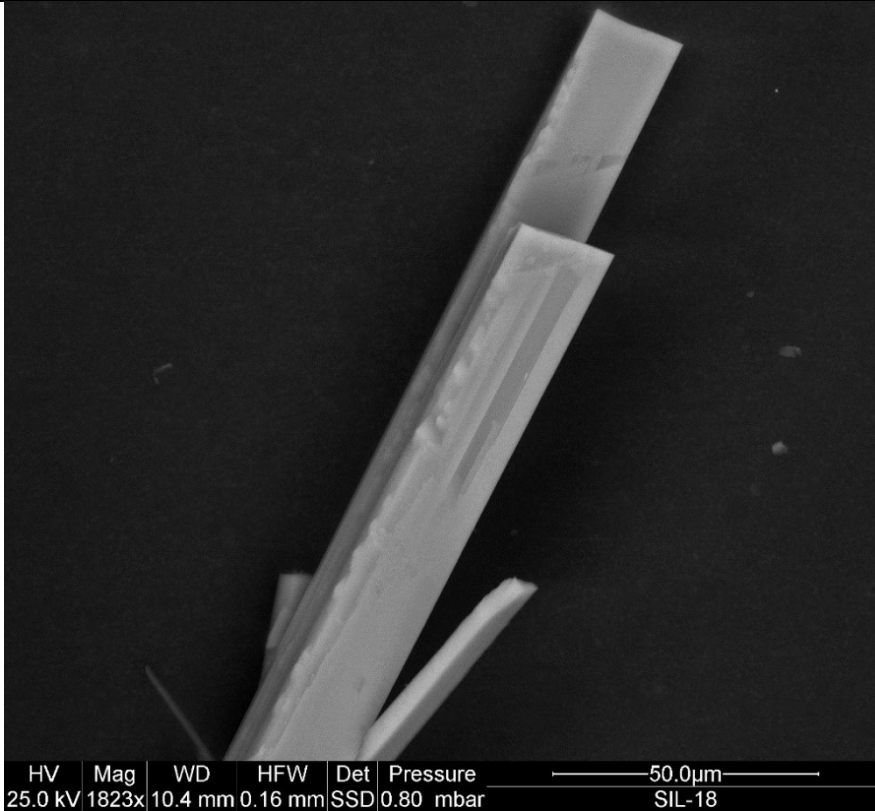
*fibre; SSD; basso vuoto;
campione tal quale non
metallizzato.*



Silicato-Figura 11, 1500x:

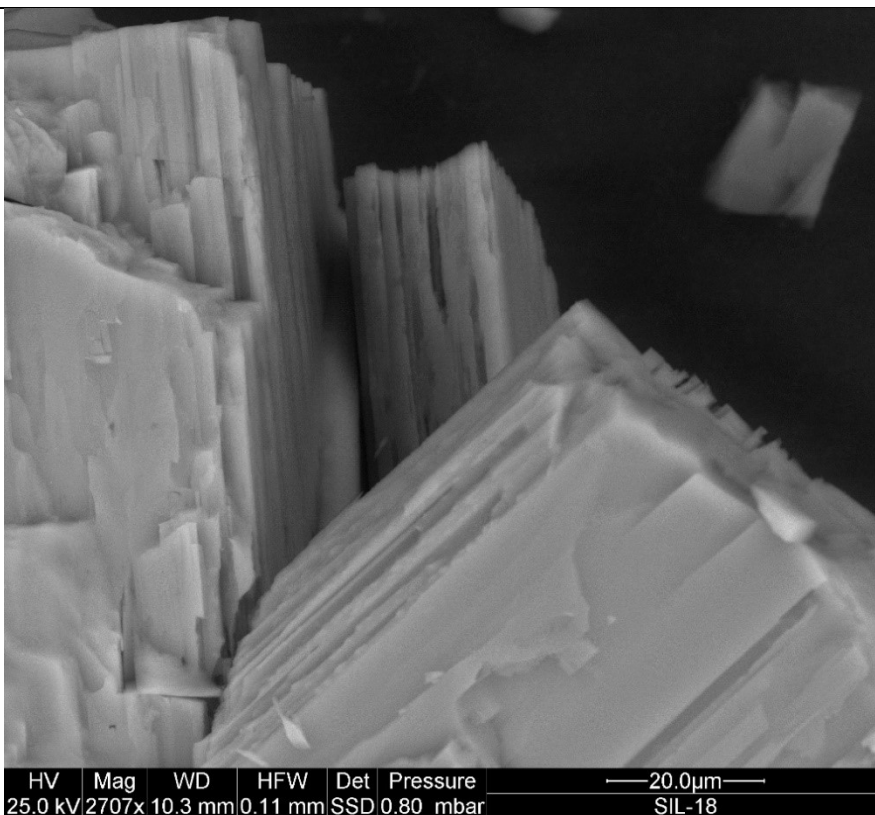
*fibre; SSD; basso vuoto;
campione tal quale non
metallizzato.*

Immagini Silicato



Silicato-Figura 12, 1823x:

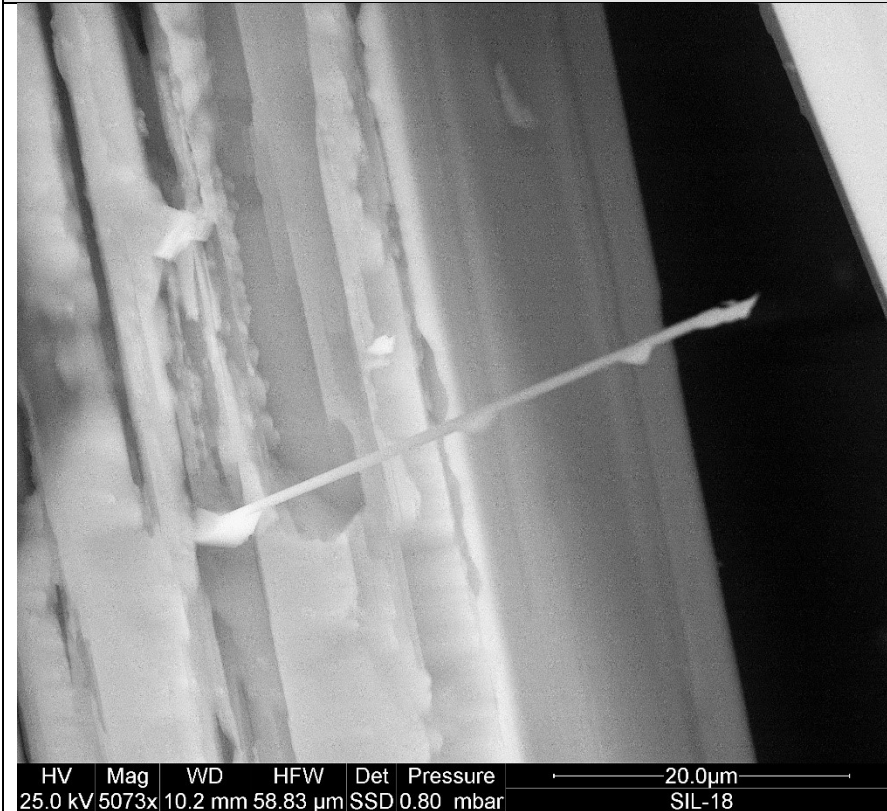
*fibre; SSD; basso vuoto;
campione tal quale non
metallizzato.*



Silicato-Figura 13, 2707x:

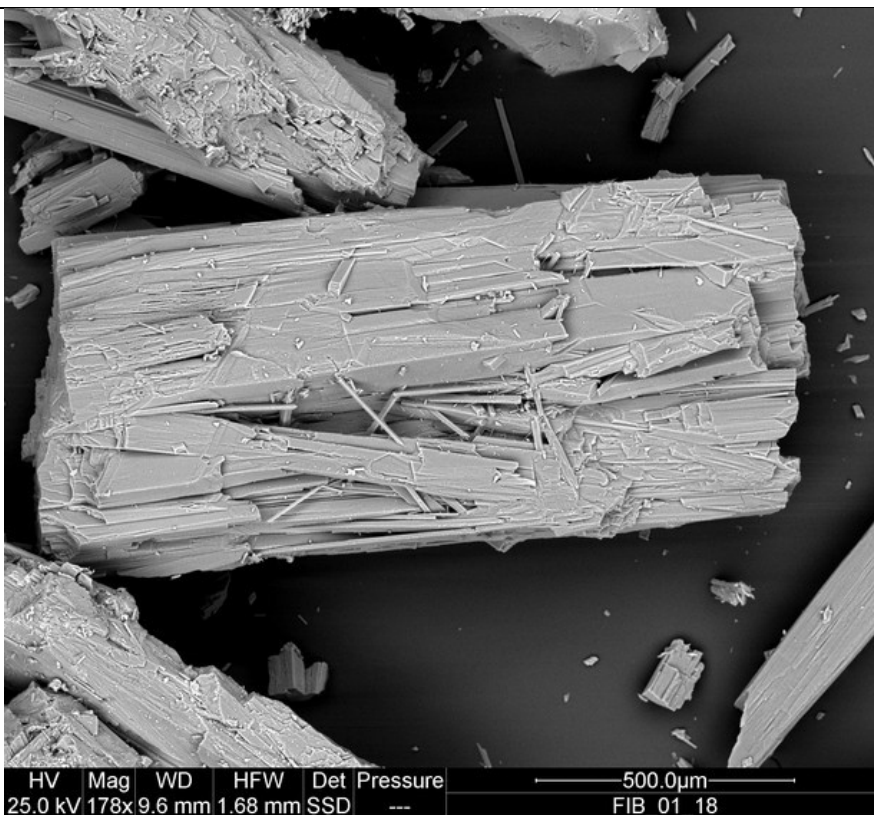
*fibre; SSD; basso vuoto;
campione tal quale non
metallizzato.*

Immagini Silicato



Silicato-Figura 14, 5073x:

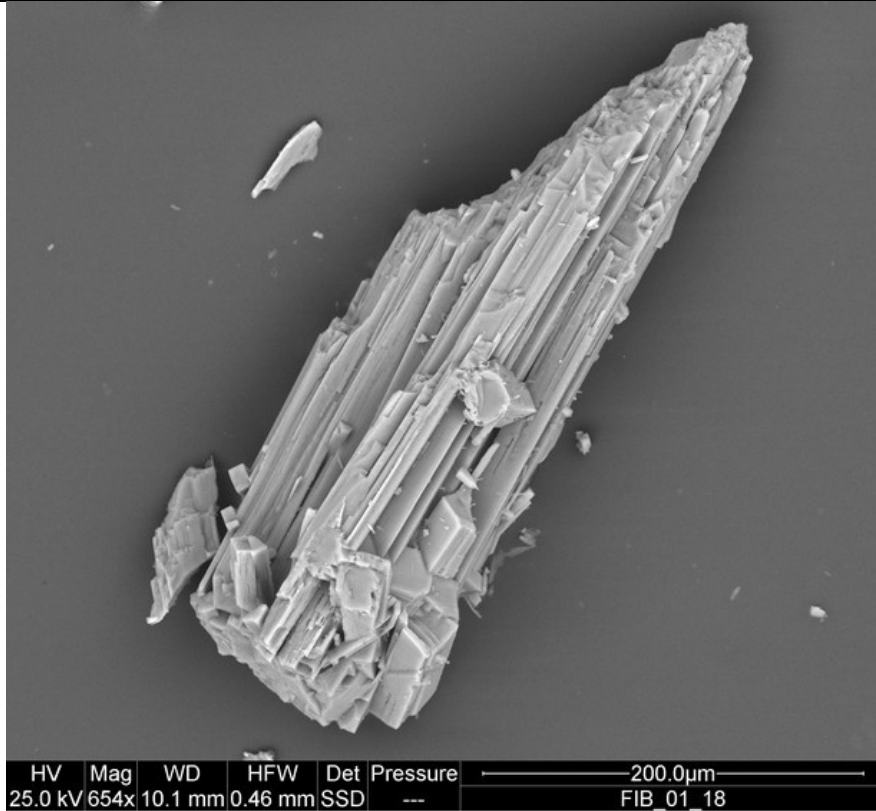
fibra singola; SSD; basso vuoto; campione tal quale non metallizzato.



Silicato-Figura 15, 178x:

immagine d'insieme; SSD; alto vuoto; campione metallizzato.

Immagini Silicato



Silicato-Figura 16, 654x:

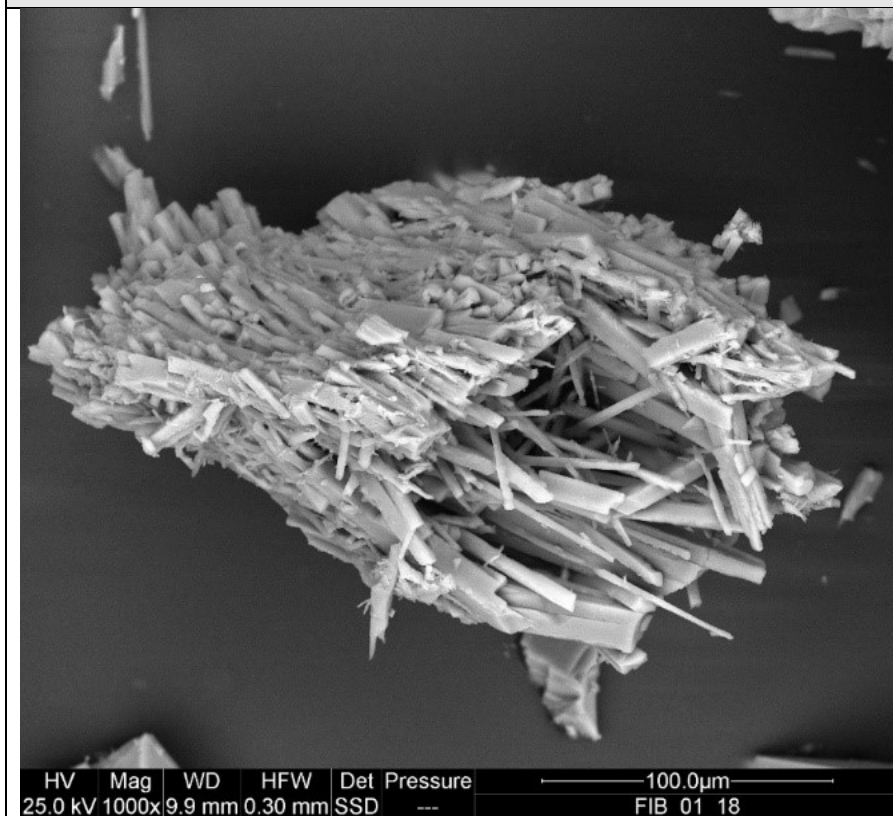
*fibre; SSD; alto vuoto;
campione metallizzato*



Silicato-Figura 17, 721x:

*fibre; SSD; alto vuoto;
campione metallizzato*

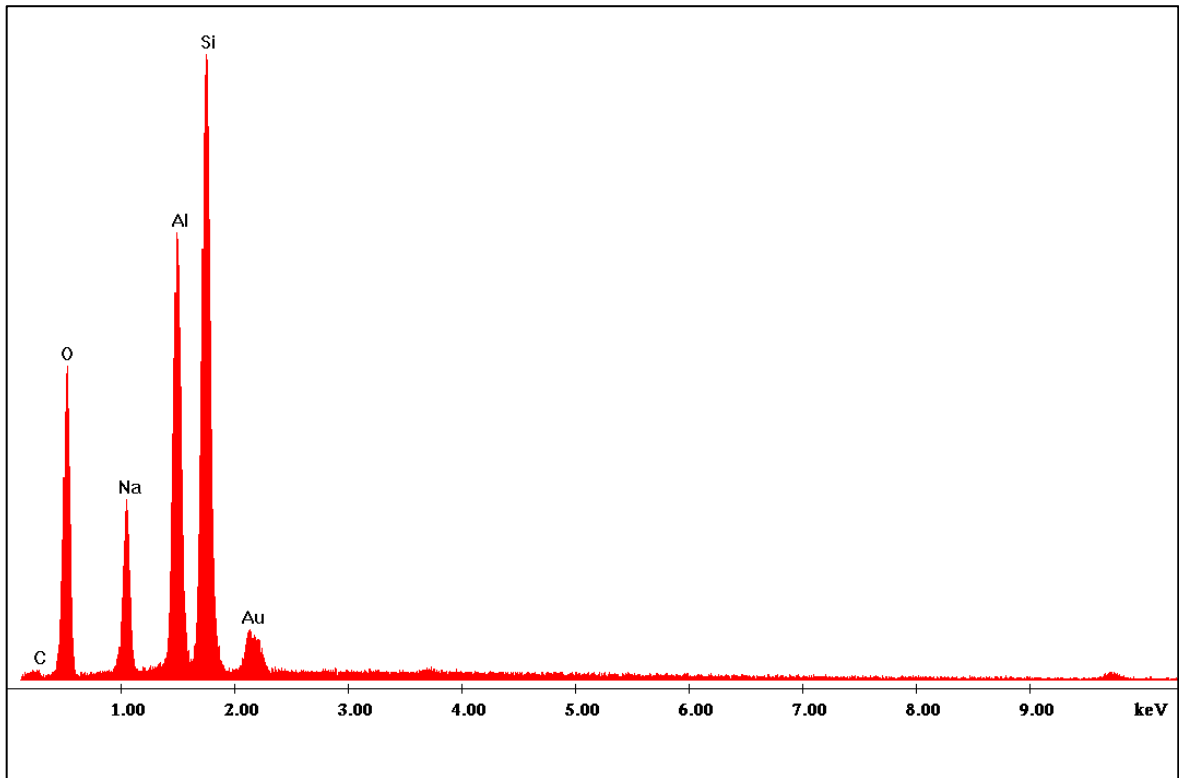
Immagini Silicato



Silicato-Figura 18, 1000x:

*fibre; SSD; alto vuoto;
campione metallizzato*

Caratterizzazione chimica



Spettro esame EDXS il picco dell'oro (Au) presente è dovuto al processo di metallizzazione.

Le condizioni comuni di analisi in SEM sono state:

- working distance: 10 mm,
- tilt angle: 0°

La caratterizzazione chimica tramite EDX è stata eseguita operando in condizioni di basso vuoto con potenziali

di accelerazione tra i 10 ed i 25 kV (informazione chimica). Dall'esame elementare si è ottenuta la seguente composizione in ossidi (media su 6 aree di misura con rapporto di controllo Si/Al costante, media 1,45, con deviazione standard 0,05):

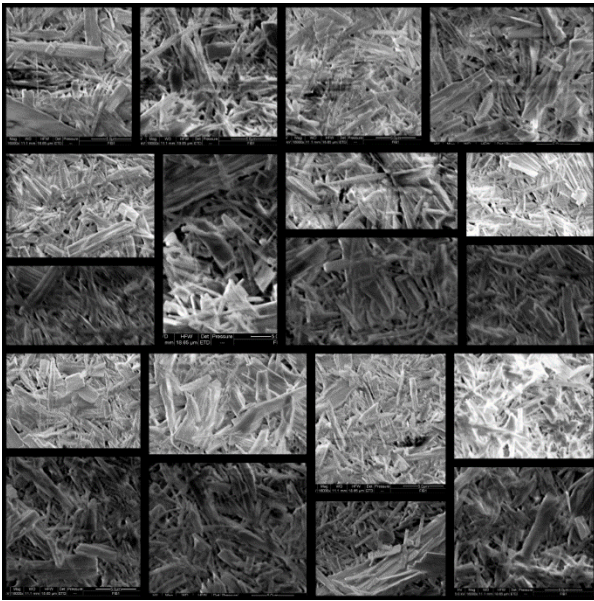
% At	Area 1	Area 2	Area 3	Area 4	Area 5	Area 6		MEDIA (%)
Na	5,98	5,11	4,68	3,95	4,26	6,84	Na ₂ O	16,9
Al	5,78	6,3	5,86	4	4,05	7,87	Al ₂ O ₃	30,6
Si	8,18	9,13	8,87	5,52	5,79	11,78	SiO ₂	52,5
Percentuale atomica nelle aree selezionate							Percentuale in ossidi	

Composizione media in ossidi della fibra

Calcolo del diametro geometrico medio

Dall'analisi di 73 fibre, con un ingrandimento 16000x, si è ottenuto:

DMGOPL-2ES = 5,65 micron (con errore $2\Delta=1.1$ micron)



Silicato 16000x – alto vuoto – SSD

Calcolando direttamente la media dei diametri su 35 fibre analizzate singolarmente a diversi ingrandimenti (fino a 9000x) si ottiene come media **8,46 micron**.

Le immagini ottenute per il calcolo del DMGOPL-2ES in questo caso risultano troppo cariche di fibre e quindi l'utilizzo non è corretto da protocollo, mentre risulta più attendibile il calcolo diretto per i seguenti motivi:

Tale valore, inferiore a 6 micron, rende la fibra misurata potenzialmente pericolosa in quanto inalabile per analogia con le fibre artificiali vetrose. L'errore di misura non è trascurabile rispetto alla media ottenuta.

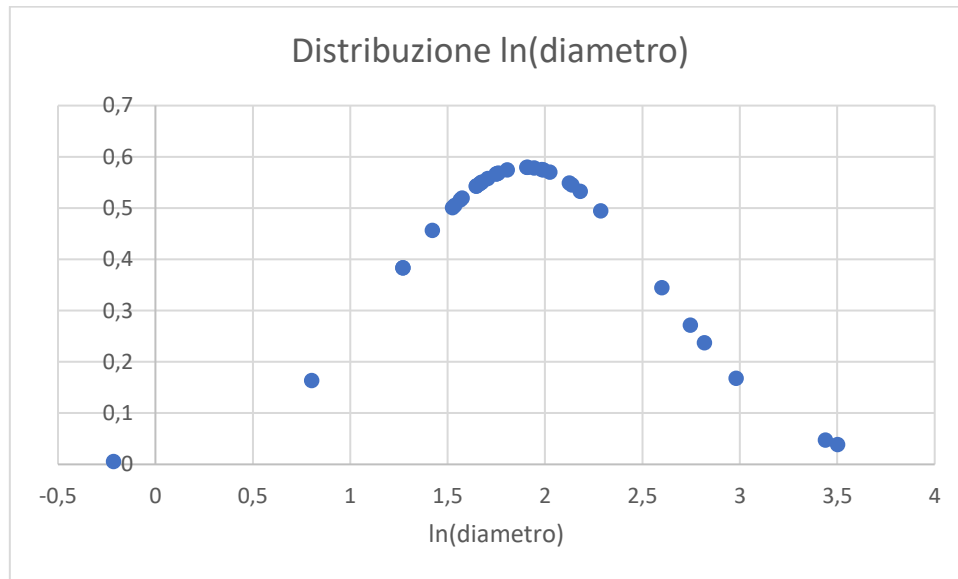
Le misure ottenute sono riportate in allegato (Tabella diametri silicato).

- si tratta di fibra con diametro medio nell'ordine dei 6 micron, senza la presenza di microfibrille e di conseguenza sono sufficienti ingrandimenti minori.
- dato il diametro medio maggiore di 6 micron non è necessario classificare con maggiore accuratezza il protocollo del DMGOPL-2ES.

Diametro	Misura (micron)	Diametro	Misura (micron)	Diametro	Misura (micron)
1	5,741	13	8,359	25	4,642
2	8,849	14	7,262	26	5,198
3	3,561	15	5,272	27	31,148
4	6,084	16	6,984	28	13,450
5	6,718	17	4,777	29	5,812
6	5,768	18	5,313	30	16,734

Diametro	Misura (micron)	Diametro	Misura (micron)	Diametro	Misura (micron)
7	7,570	19	6,754	31	19,701
8	2,229	20	0,806	32	9,827
9	3,561	21	33,169	33	4,827
10	4,140	22	15,565	34	8,478
11	4,593	23	5,342	35	5,503
12	5,184	24	7,328		
				MEDIA	8,46

Fibra silvato 9000x – Tabella misura diretta diametri misurati e contati in micron



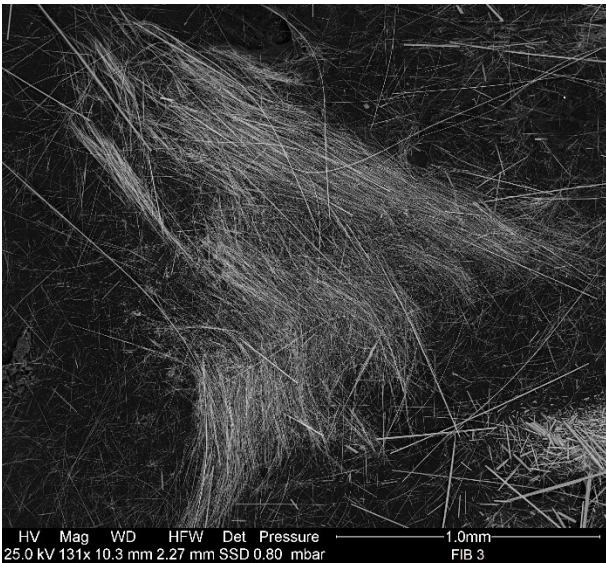
Distribuzione gaussiana ln(diametro)

Nel grafico soprastante si riporta comunque l'andamento della distribuzione normale del logaritmo naturale dei diametri misurati della fibra di silicato, evidenziando che anche in questo caso, con un basso numero di punti misurati, si può verificare il corretto andamento gaussiano dei dati, nonostante la deviazione standard abbia un valore alto rispetto alla media calcolata (media $\ln(\text{diametro}) = 1,90$, deviazione standard = 0,68).

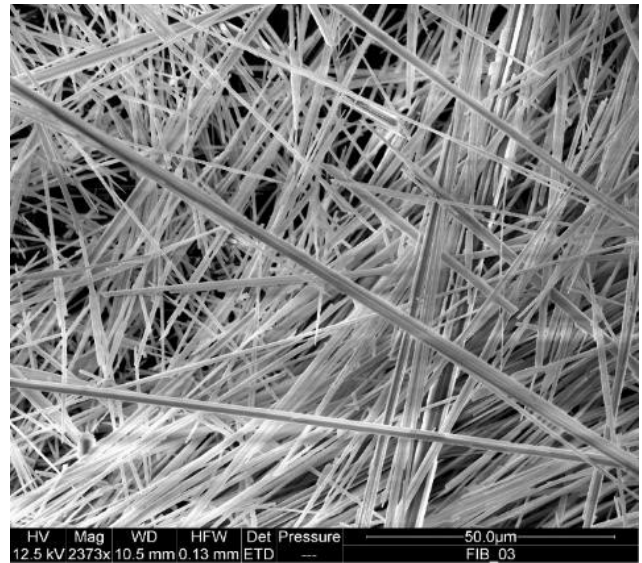
Silicato tremolite

È stato analizzato un campione di fibre appartenenti al gruppo dei silicati, si tratta di un minerale fibroso in corso di caratterizzazione. La morfologia non appare quella caratteristica del crisotilo di tipo serpentino, come in un primo

momento considerato dopo il campionamento, ma più simile a quella aghiforme degli amianti di tipo anfibolo. Il campione investigato proviene dalle rocce ofiolitiche della Liguria, Italia.

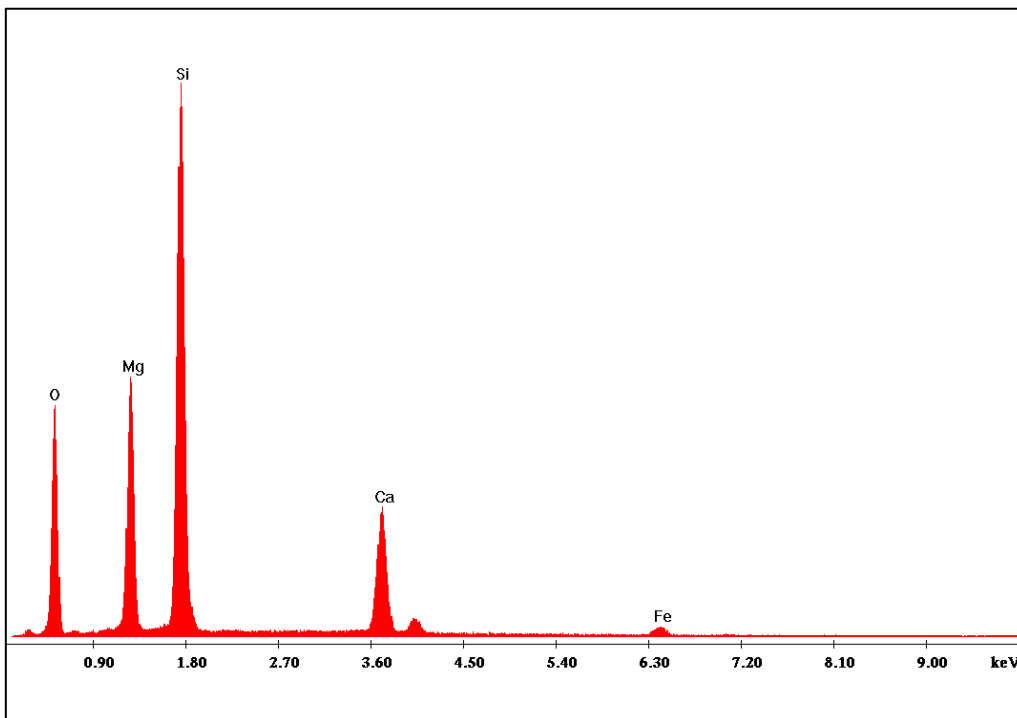


Silicato 131x – basso vuoto – SSD immagine d'insieme



Silicato 2373x – basso vuoto – SSD immagine d'insieme

Caratterizzazione chimica



Silicato Analisi EDXS, il rapporto tra le intensità dei picchi dei segnali Mg e Si è invertito rispetto a quello standard del crisotilo

Le condizioni comuni di analisi in SEM sono state:

- working distance: 10 mm,
- tilt angle: 0°

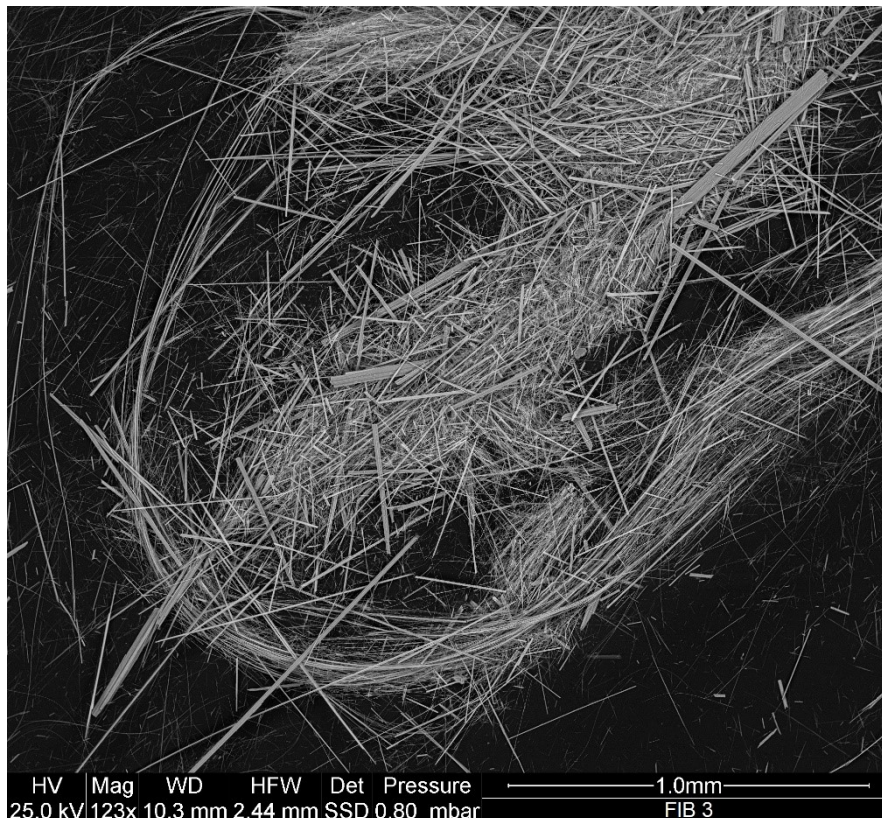
La caratterizzazione chimica tramite EDX è stata eseguita operando in

condizioni di basso vuoto con potenziali di accelerazione tra i 10 ed i 25 kV (informazione chimica). L'analisi elementare ottenuta tramite EDX dà come risultato per i cationi presenti in presenza di atomi (At%), con la conseguente distribuzione in ossidi:

Metallo	At% media	Ossido	% Ossidi media	ISO 14966
Mg	8.25%	MgO	27,6%	20-26%
Si	12.01%	SiO ₂	59,8%	51-56%
Ca	2.17%	CaO	10,1%	10-13%
Fe	0.39%	Fe ₂ O ₃	2,6%	0-5%

Confrontando la distribuzione ottenuta con l'allegato C della norma ISO 14966, la fibra risulta compatibile per

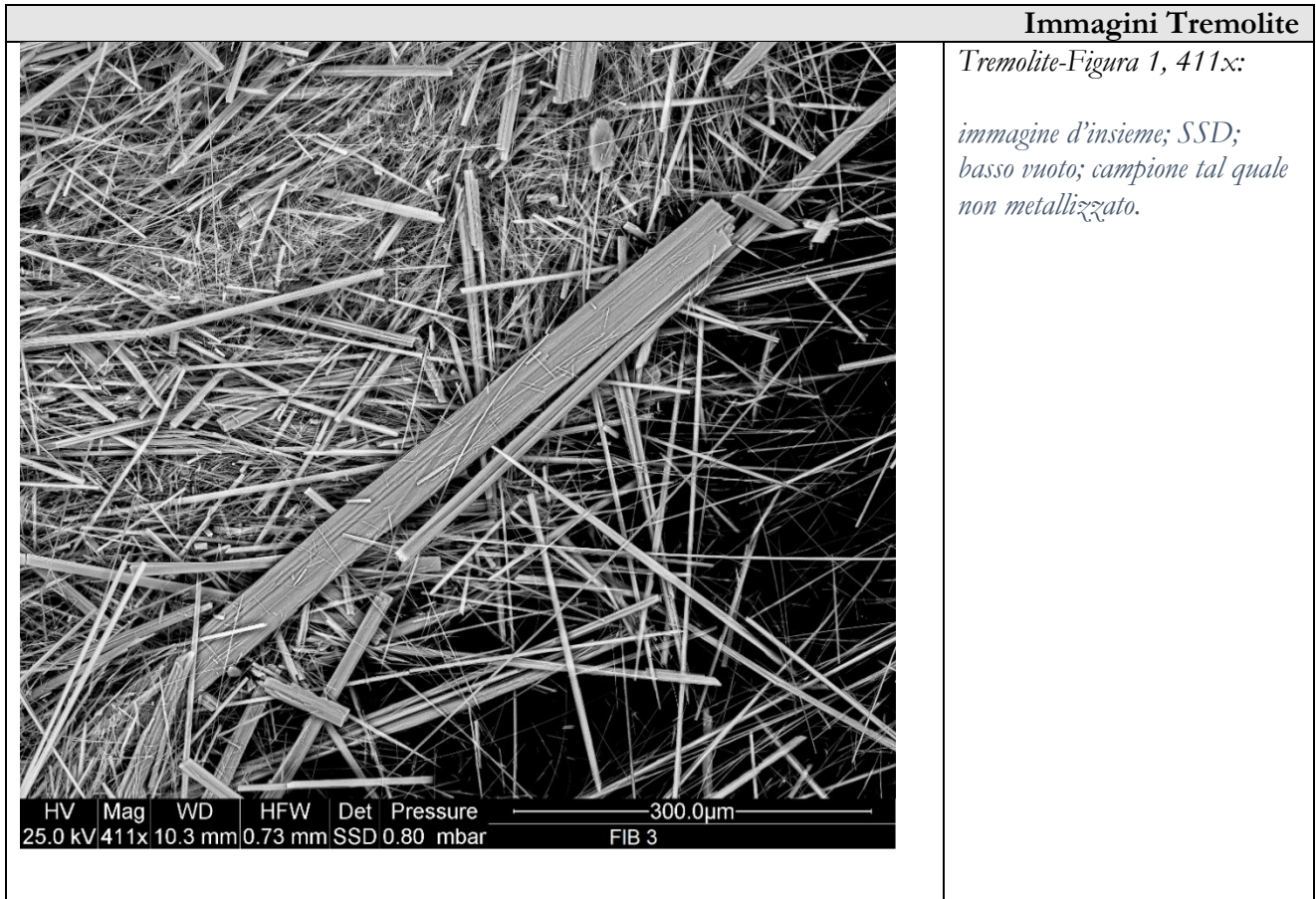
morfologia aghiforme e per composizione media con l'amianto di tipo tremolite.



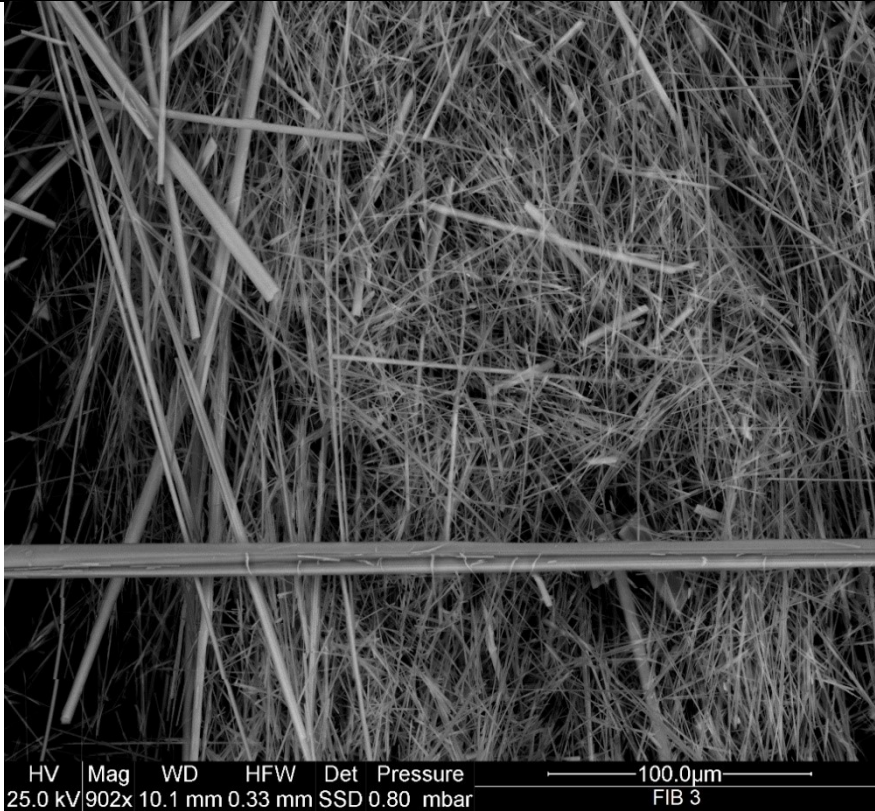
Silicato 123x – basso vuoto – SSD immagine d'insieme, a bassi ingrandimenti il campione presenta un andamento simil serpentiforme in alcuni fasci, ma la presenza di fasci e fibre aghiforme non è compatibile con il crisotilo.

La tremolite è un inosilicato, ovvero un anfibolo appartenente al sottogruppo degli anfiboli di calcio, strutturato con una doppia catena di tetraedri (SiO_4) i

quali condividono tre dei quattro ossigeni (2CaO , 5MgO , 8SiO_2 , H_2O ; CAS 77536-68-6).

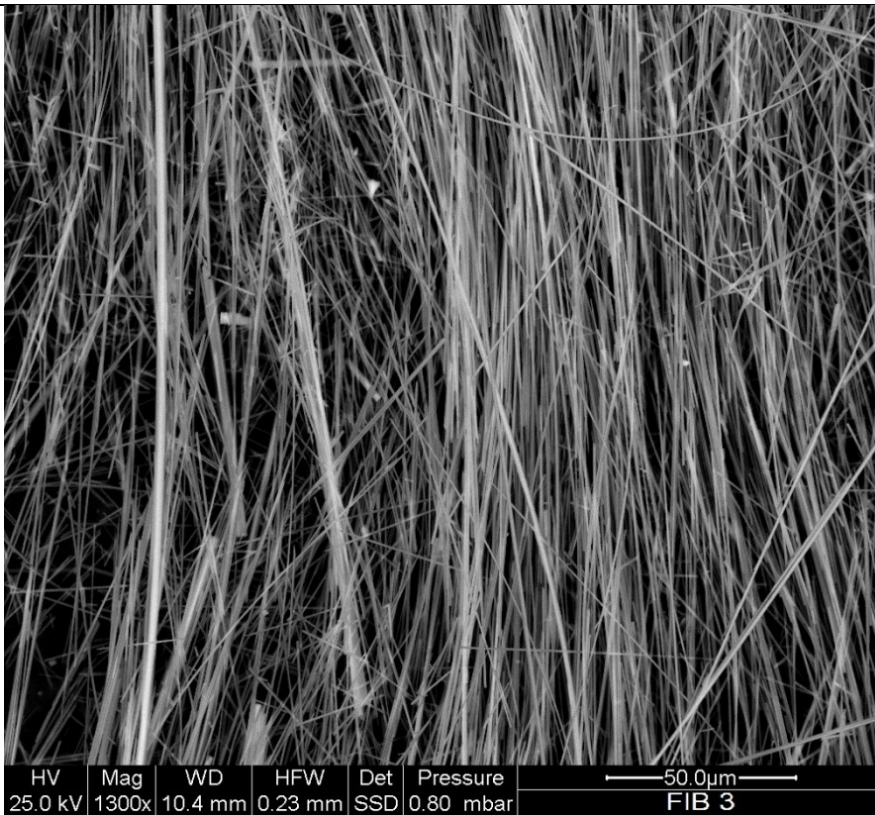


Immagini Tremolite



Tremolite-Figura 2, 902x:

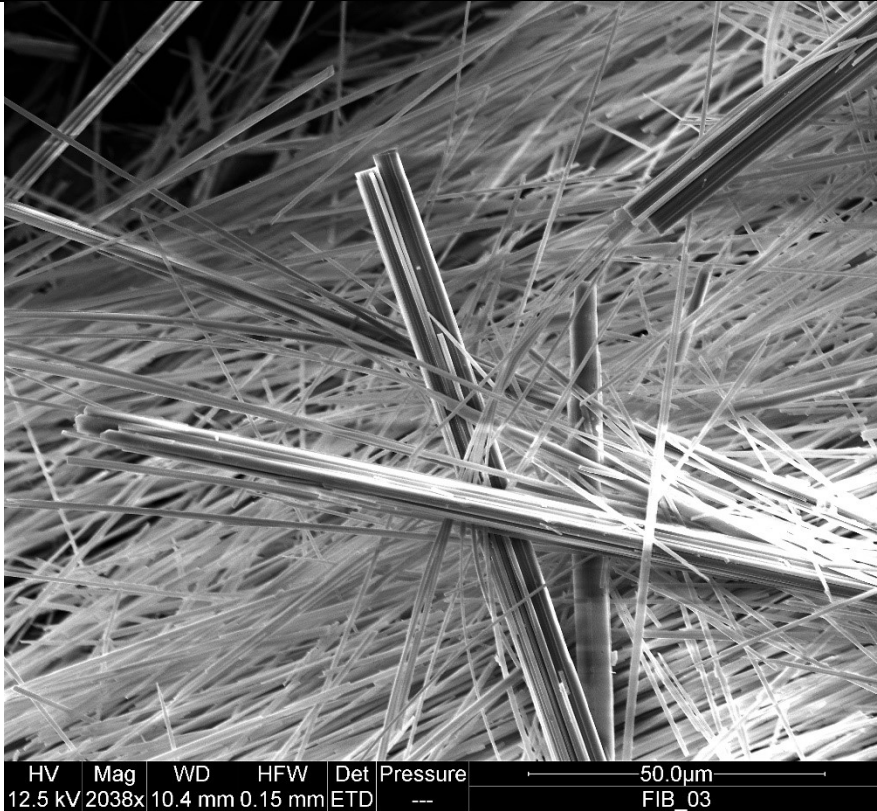
*immagine d'insieme; SSD;
basso vuoto; campione tal quale
non metallizzato.*



Tremolite-Figura 3, 1300x:

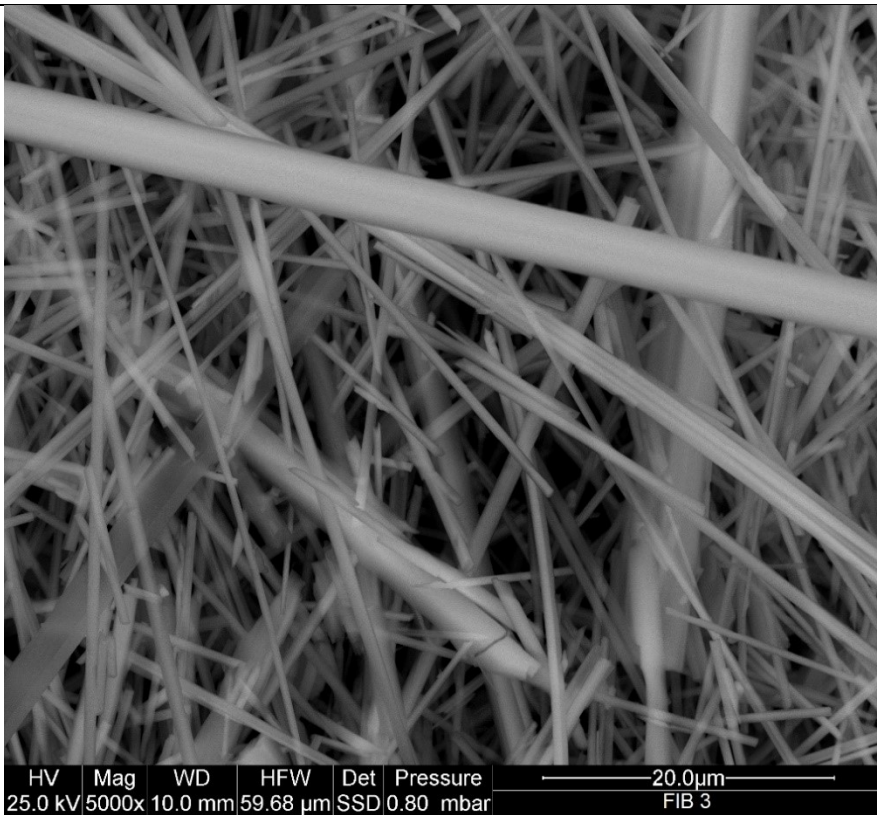
*immagine d'insieme; SSD;
basso vuoto; campione tal quale
non metallizzato.*

Immagini Tremolite



Tremolite-Figura 4, 2038x:

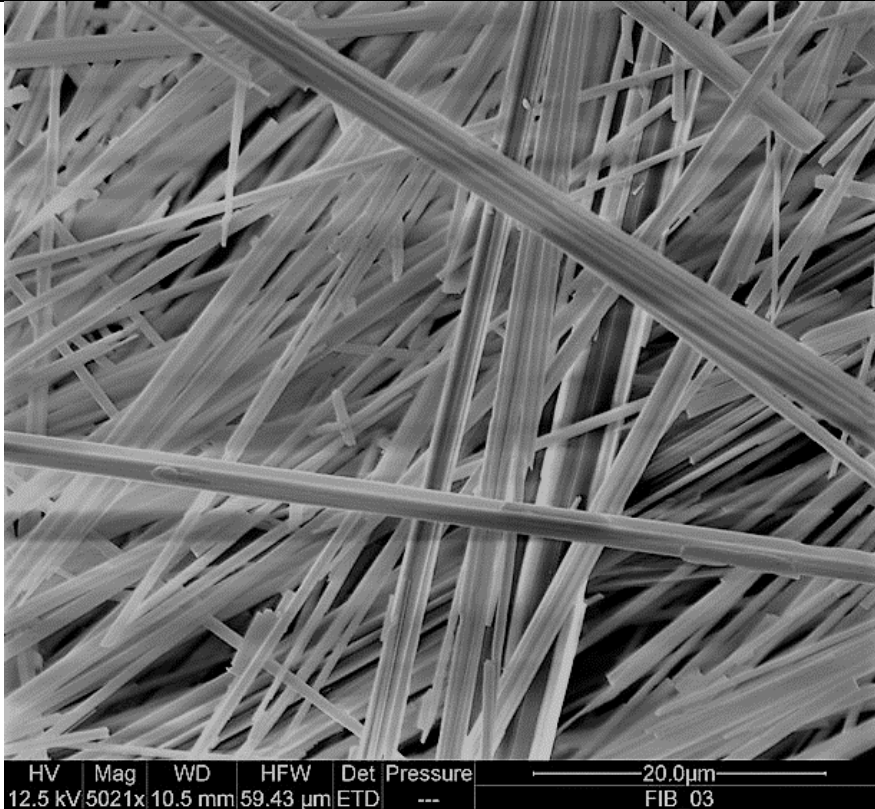
immagine d'insieme; SSD; alto vuoto; campione metallizzato.



Tremolite-Figura 5, 5000x:

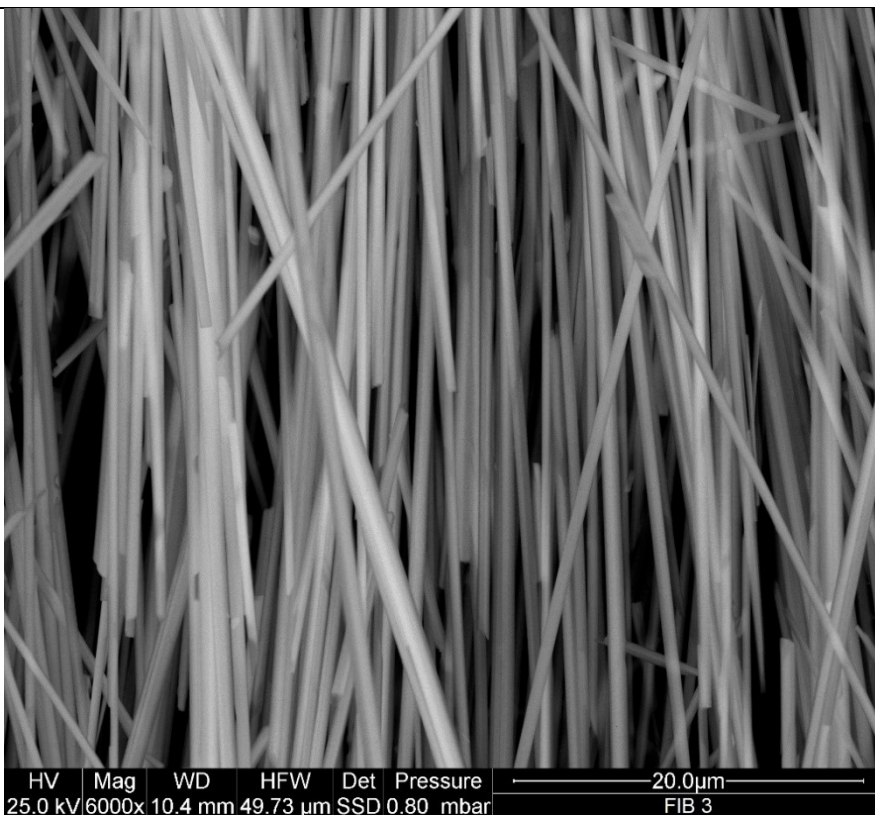
fibre; SSD; basso vuoto; campione metallizzato.

Immagini Tremolite



Tremolite-Figura 6, 5021x:

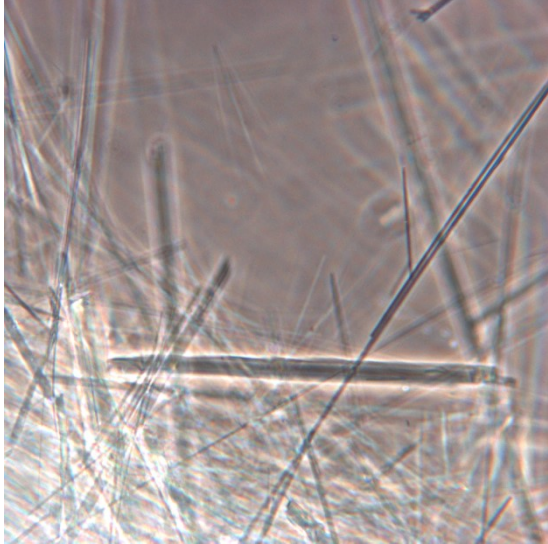
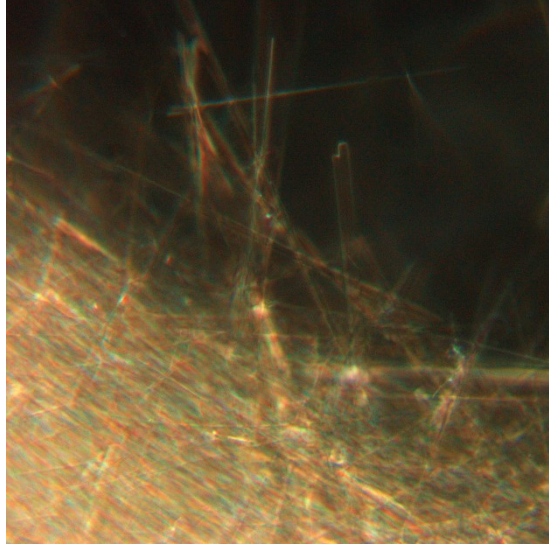
*fibre; SSD; basso vuoto;
campione metallizzato.*



Tremolite-Figura 7, 6000x:

*fibre; SSD; basso vuoto;
campione metallizzato.*

Caratterizzazione tramite MODC

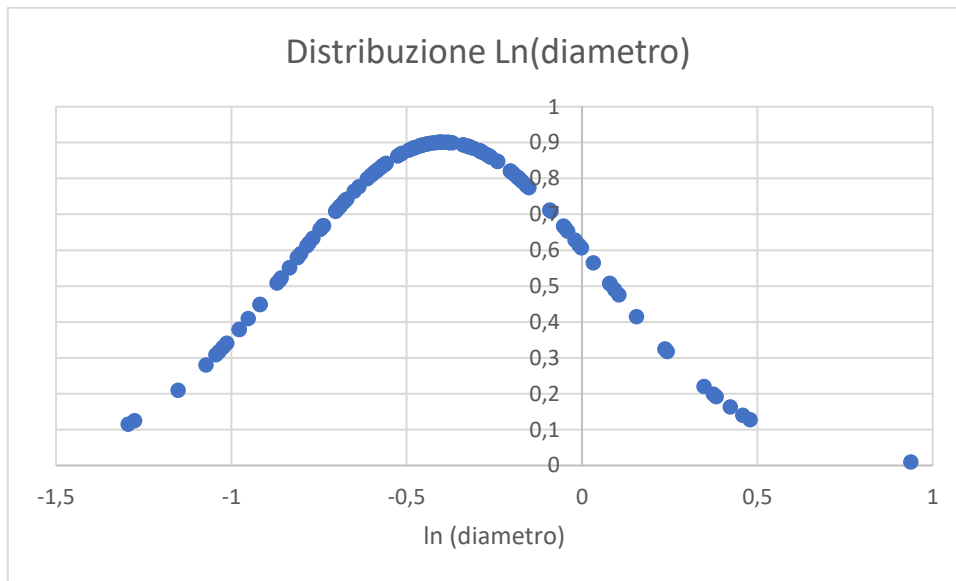
Identificazione tramite dispersione cromatica in microscopia ottica: tremolite	
	
Fibre analizzate in campo chiaro, il colore risulta tra il grigio scuro nero con aloni chiari.	Fibre analizzate in campo scuro, il colore varia tra il giallo e l'arancio con birifrangenza debole.
Microscopio Leitz Diaplan, ingrandimento 500x, liquido di dispersione: 1,580 (Prod. Cargille)	
Le colorazioni ottenute sono compatibili con quelle delle fibre di tremolite immerse nel liquido con indice di rifrazione 1,580	

Calcolo del diametro geometrico medio

Dalla misura diretta di 133 fibre, con un ingrandimento fino a 5000x, si è ottenuto un diametro medio di 0,757 micron:

Le misure ottenute sono riportate in allegato (Tabella diametri tremolite).

La deviazione standard pari a 0,499 micron è correlata all'elevata incertezza (66% rispetto al valore medio) e al metodo di misura applicato, per fibre con questo diametro è necessario ricorrere ad imaging da microscopia TEM.



Nel grafico soprastante si riporta comunque l'andamento della distribuzione normale del logaritmo naturale dei diametri misurati della fibra di tremolite, evidenziando che anche in questo caso, con un basso numero di punti misurati, si può verificare il corretto andamento gaussiano dei dati, nonostante la deviazione standard abbia un valore alto rispetto alla media calcolata (media $\ln(\text{diametro}) = -0,40$, deviazione standard = 0,44).

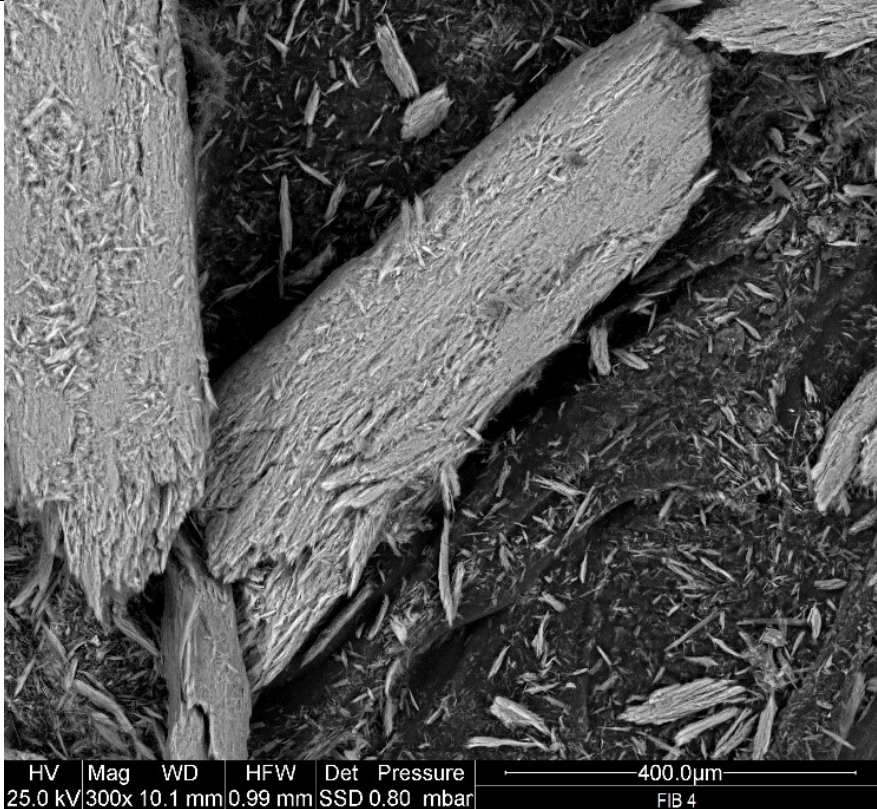
Silicato crisotilo

È stata analizzata una fibra appartenente al gruppo dei silicati, si tratta di un minerale fibroso in corso di caratterizzazione. La morfologia appare

quella caratteristica del crisotilo di tipo serpentino.

Anche questo campione è di provenienza ligure, in Italia.

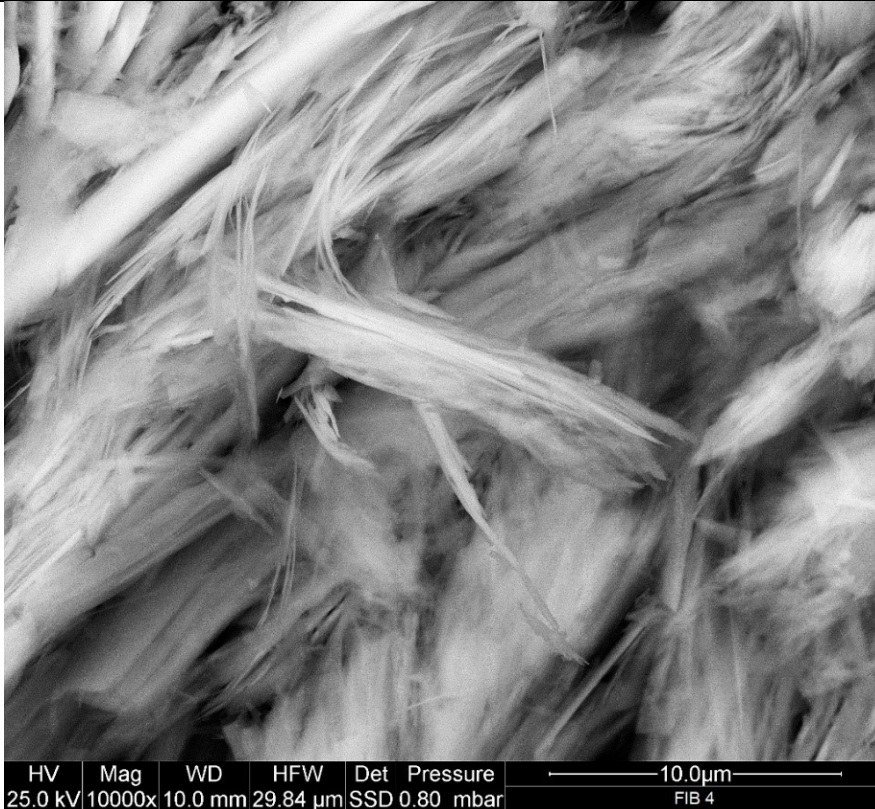
Immagini Crisotilo



Crisotilo-Figura 1, 300x:

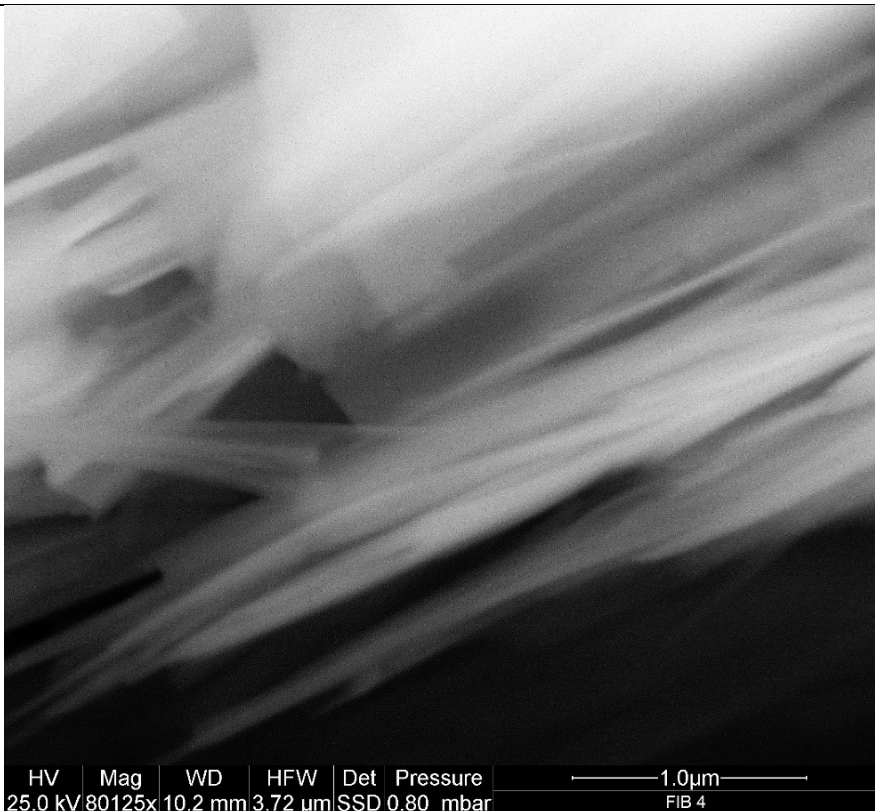
*immagine d'insieme; SSD;
basso vuoto; campione tal quale
non metallizzato.*

Immagini Crisotilo



Crisotilo-Figura 2, 10000x:

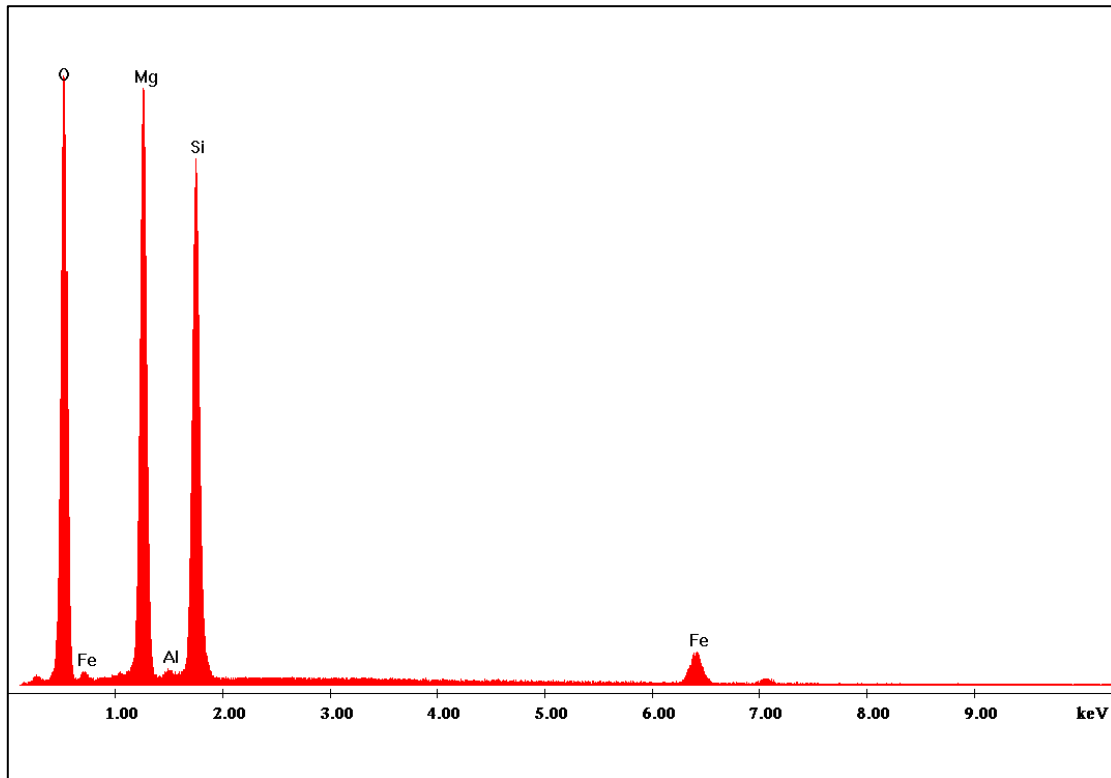
*fibre; SSD; basso vuoto;
campione tal quale non
metallizzato.*



Crisotilo-Figura 3, 80125x:

*fibre; SSD; basso vuoto;
campione tal quale non
metallizzato. L'immagine non è
ottimale in quanto il campione
presenta forti fenomeni di
accumulo di carica elettrostatica.*

Caratterizzazione chimica



Analisi EDXS Crisotilo

Le condizioni comuni di analisi in SEM sono state:

- working distance: 10 mm,
- tilt angle: 0°

La caratterizzazione chimica tramite EDX è stata eseguita operando in condizioni di basso vuoto con potenziali di accelerazione tra i 10 ed i 25 kV (informazione chimica).

In condizioni di alto vuoto con potenziali fino a 25 kV si sono ottenute immagini ad ingrandimenti maggiori (informazione morfologica).

L'analisi elementare ottenuta tramite EDAX dà come risultato per i cationi presenti in presenza di atomi (At%), con la conseguente distribuzione in ossidi:

Metallo	At% media	Ossido	% Ossidi media	ISO 14966
Mg	21.27%	MgO	42,9%	38-42%
Si	17.07%	SiO ₂	51,3%	36-44%
Al	0.3%	Al ₂ O ₃	0,8%	0-2%
Fe	1.28%	Fe ₂ O ₃	5,1%	0-5%

Confrontando la distribuzione ottenuta con l'allegato C della norma ISO 14966, la fibra risulta compatibile per

morfologia serpentiforme e per composizione media con l'amianto di tipo crisotilo.

Calcolo del diametro geometrico medio

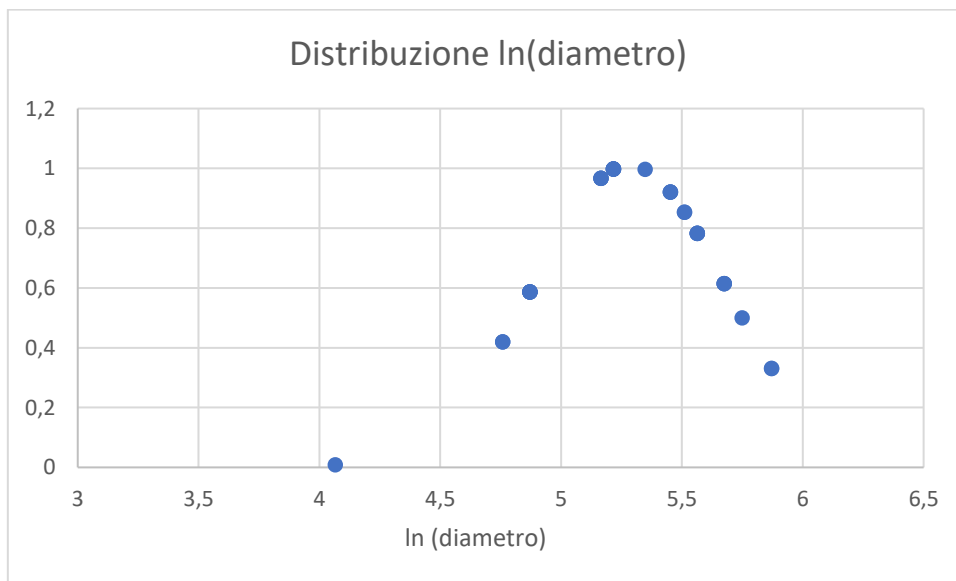
Le misure di diametro, nell'ordine del micron, fino a 0,1 micron, rendono necessario l'utilizzo del TEM e non applicabile il protocollo utilizzato per il calcolo del diametro medio, anche per il manifestarsi di fenomeni di carica

elettrostatica sulle fibre, anche applicando bassi potenziali di analisi (10 kV) sul campione metallizzato. Dalla misura diretta dalle immagini, tramite software SCANDIUM per l'analisi dimensionale, si è ottenuta la stima approssimativa, da 35 fibre, di 0,210 micrometri.

Diametro	Misura (nm)	Diametro	Misura (nm)	Diametro	Misura (nm)	Diametro	Misura (nm))
1	174,84	10	130,32	19	291,41	28	291,41
2	184,30	11	184,30	20	233,12	29	247,27
3	174,84	12	130,32	21	184,30	30	313,85
4	260,64	13	174,84	22	260,64	31	233,12
5	130,32	14	116,56	23	291,41	32	130,32
6	184,30	15	116,56	24	354,51	33	260,64
7	174,84	16	130,32	25	184,30	34	210,14
8	184,30	17	354,51	26	247,27	35	58,28
9	174,84	18	260,64	27	233,12		
				Media = 210 nm con deviazione standard = 73 nm			

Tabella con misure dirette da immagini a 5000x

Nella tabella soprastante la deviazione standard, come primo indicatore dell'errore di misura è circa il 34% della misura riscontrata, ad ulteriore dimostrazione che la tecnica di indagine non è di elezione per la misura della fibra in oggetto.

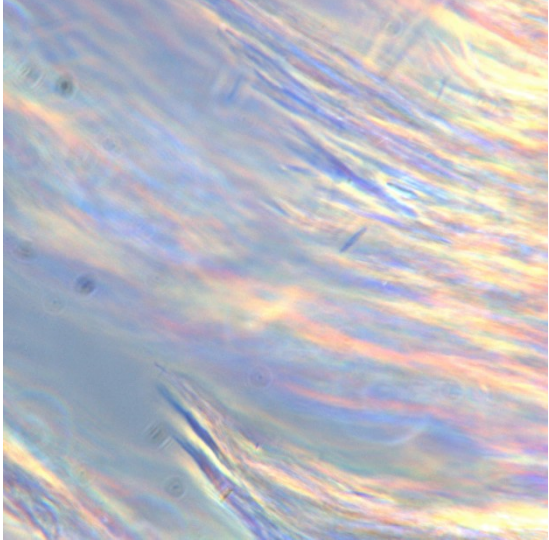
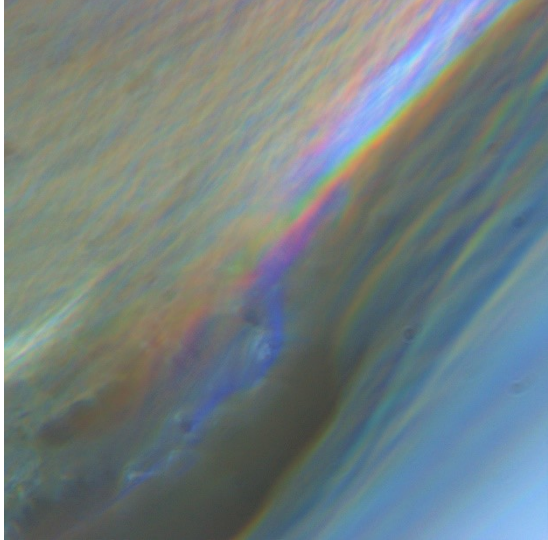


Distribuzione ln(diametro(nm))

Nel grafico soprastante si riporta comunque l'andamento della distribuzione normale del logaritmo naturale dei diametri misurati della fibra di crisotilo, evidenziando che anche in questo caso, con un basso numero di punti misurati, si può verificare il corretto

andamento gaussiano dei dati, nonostante la deviazione standard abbia un valore alto rispetto alla media calcolata (media $\ln(\text{diametro}) = 5,28$, deviazione standard = 0,39).

Caratterizzazione tramite MODC

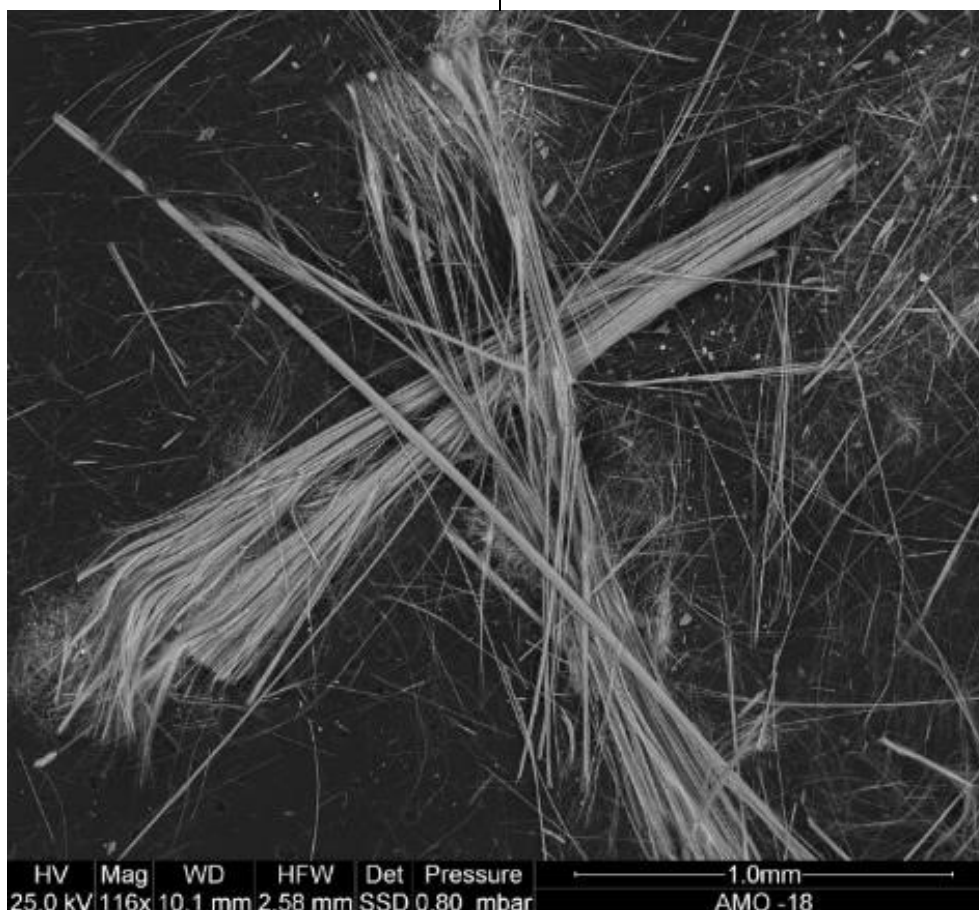
Identificazione tramite dispersione cromatica in microscopia ottica: crisotilo	
	
<p>Fibre analizzate in campo chiaro, il colore varia tra il celeste chiaro ed il celeste scuro con birifrangenza debole. L'alone arancio è molto intenso, le fibre risultano aggregate in una matrice compatta.</p>	<p>Fibre analizzate in campo scuro, il colore varia tra il viola ed il blu con birifrangenza debole. Le fibre risultano aggregate in una matrice compatta, che produce un intenso alone giallo/arancio.</p>
<p>Microscopio Leitz Diaplan, ingrandimento 500x, liquido di dispersione: 1,550 (Prod. Cargille)</p>	
<p>Le colorazioni ottenute sono compatibili con quelle delle fibre di crisotilo immerse nel liquido con indice di rifrazione 1,550</p>	

Silicato amosite

L'amosite è una varietà fibrosa di grunerite ed è caratterizzata da una struttura di tipo anfibolo (aghiforme), silicato appartenente al sottogruppo degli anfiboli di magnesio-ferro-manganese. Secondo la normativa italiana, l'amosite è uno dei sei tipi di amianto classificati come cancerogeni e la cui presenza qualitativa è sufficiente, senza un limite minimo di presenza quantitativa, per definire come pericolo, perché cancerogeno, un materiale o un rifiuto (Normativa italiana: D. Lgs 152/2006, parte IV).

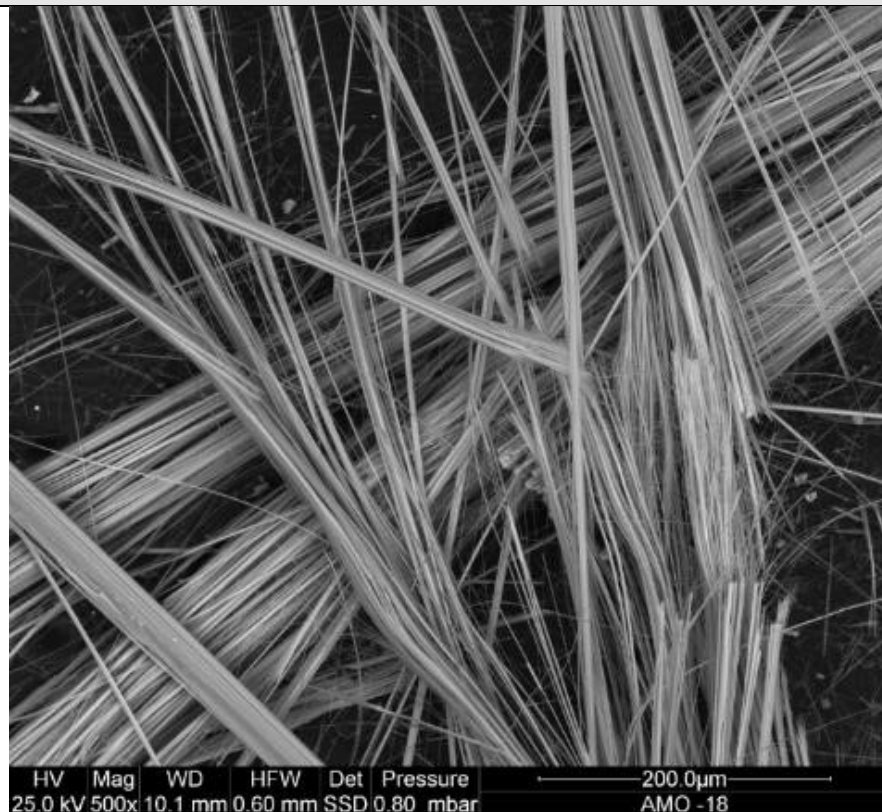
L'amosite, detta anche amianto bruno, è a fibra molto lunga ed ha un colore grigio o verdiccio. Il nome amosite deriva dalla sigla “AMOSA” (Asbestos Mines of South Africa). Numero CAS 12172-73-5

Il campione studiato proviene proprio dalla località tipo per questo minerale, che è una miniera nella municipalità di Lepele-Nkumpi, in Sud Africa.



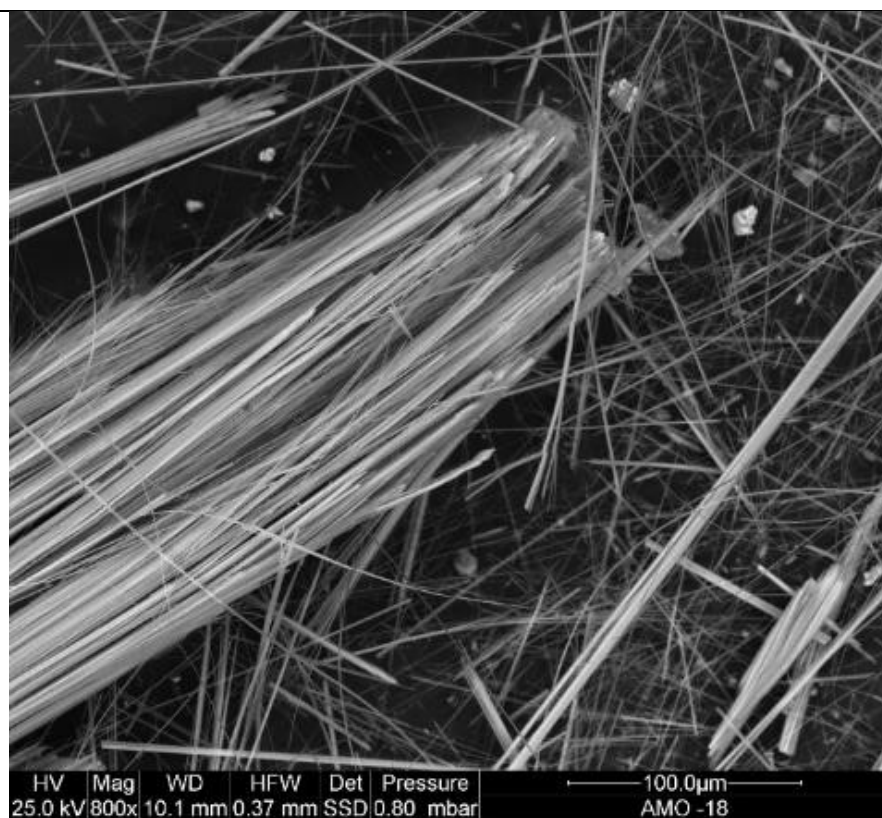
Amosite 116x – basso vuoto, campione tal quale

Immagini Amosite



Amosite-Figura 1, 500x:

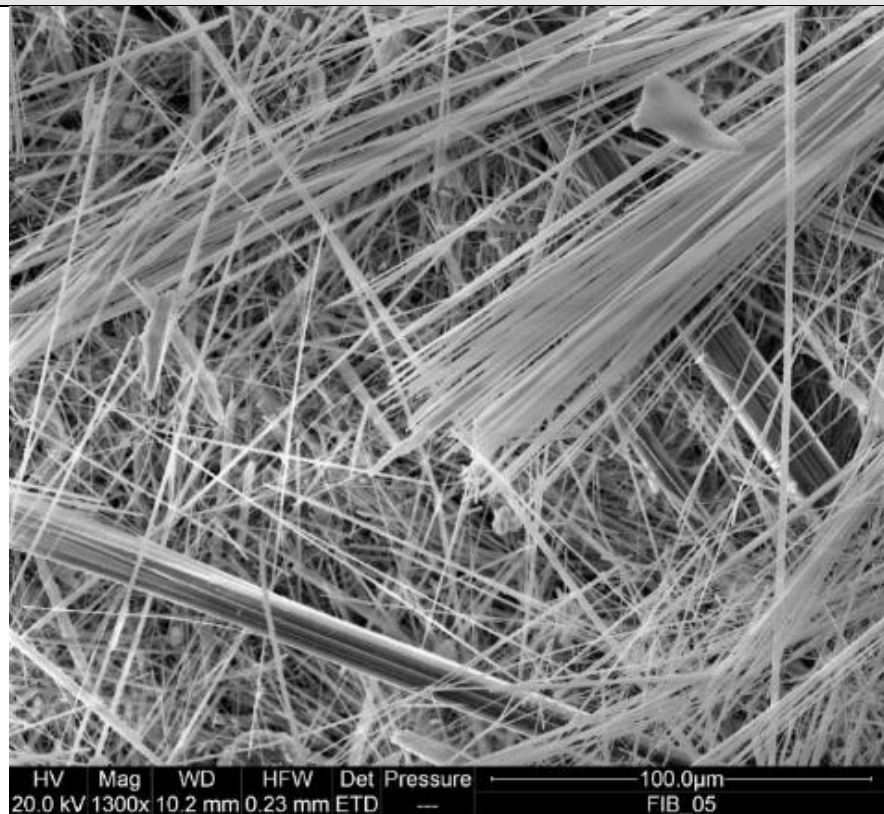
immagine d'insieme; SSD; basso vuoto; campione tal quale non metallizzato.



Amosite-Figura 2, 800x:

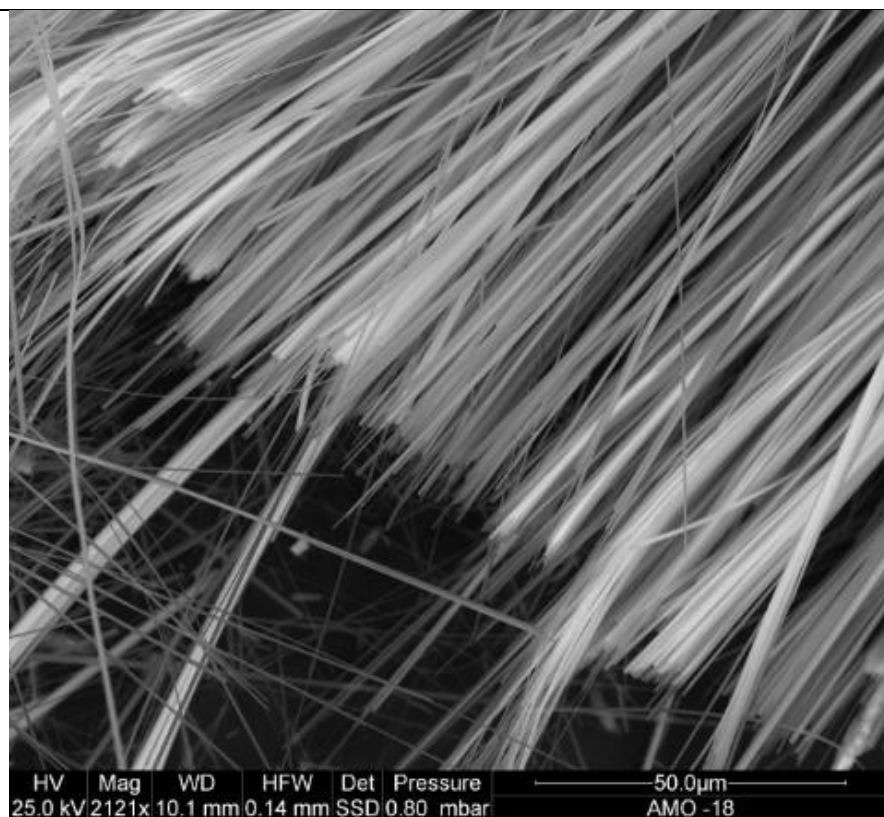
fascio di fibre; SSD; basso vuoto; campione tal quale non metallizzato.

Immagini Amosite



Amosite-Figura 3, 1300x:

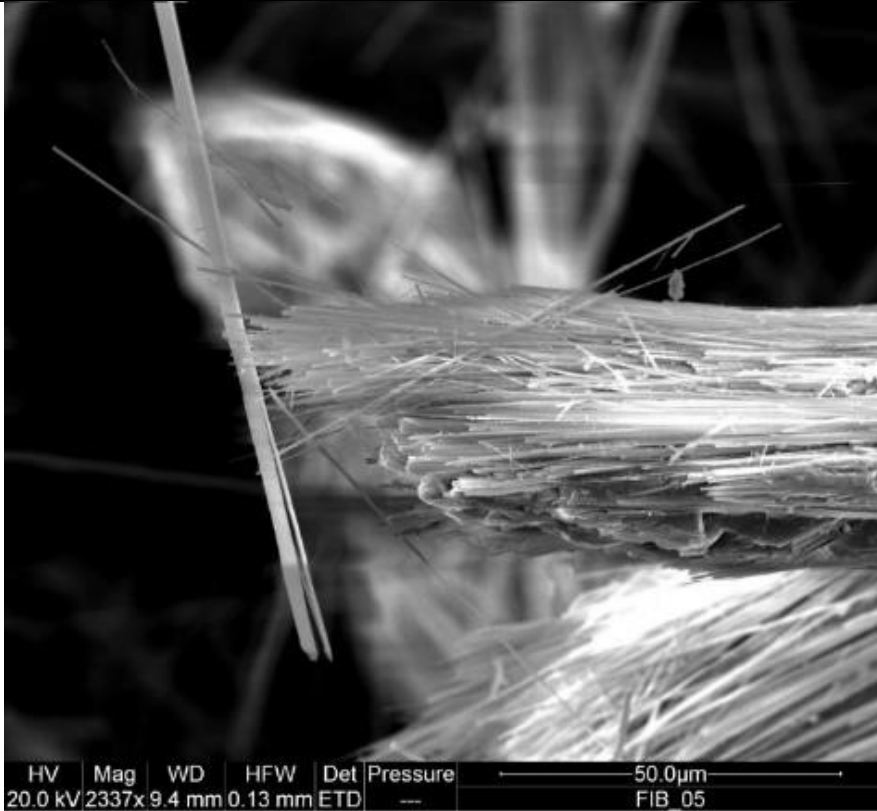
*fascio di fibre; SSD; alto vuoto;
campione metallizzato.*



Amosite-Figura 4, 2121x:

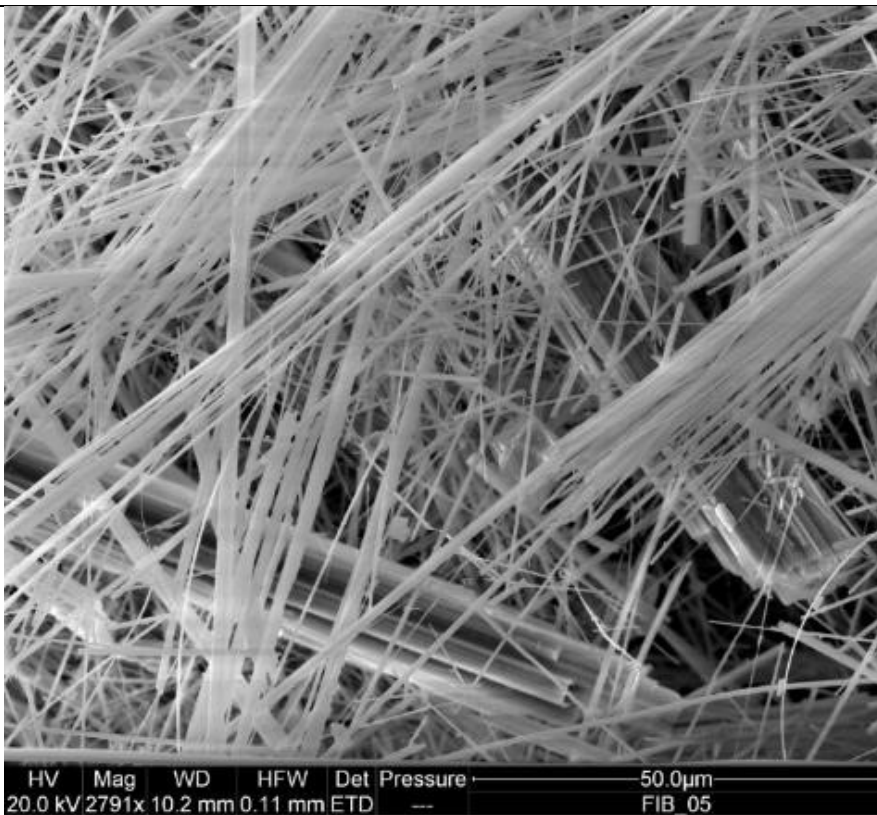
*fascio di fibre; SSD; alto vuoto;
campione metallizzato.*

Immagini Amosite



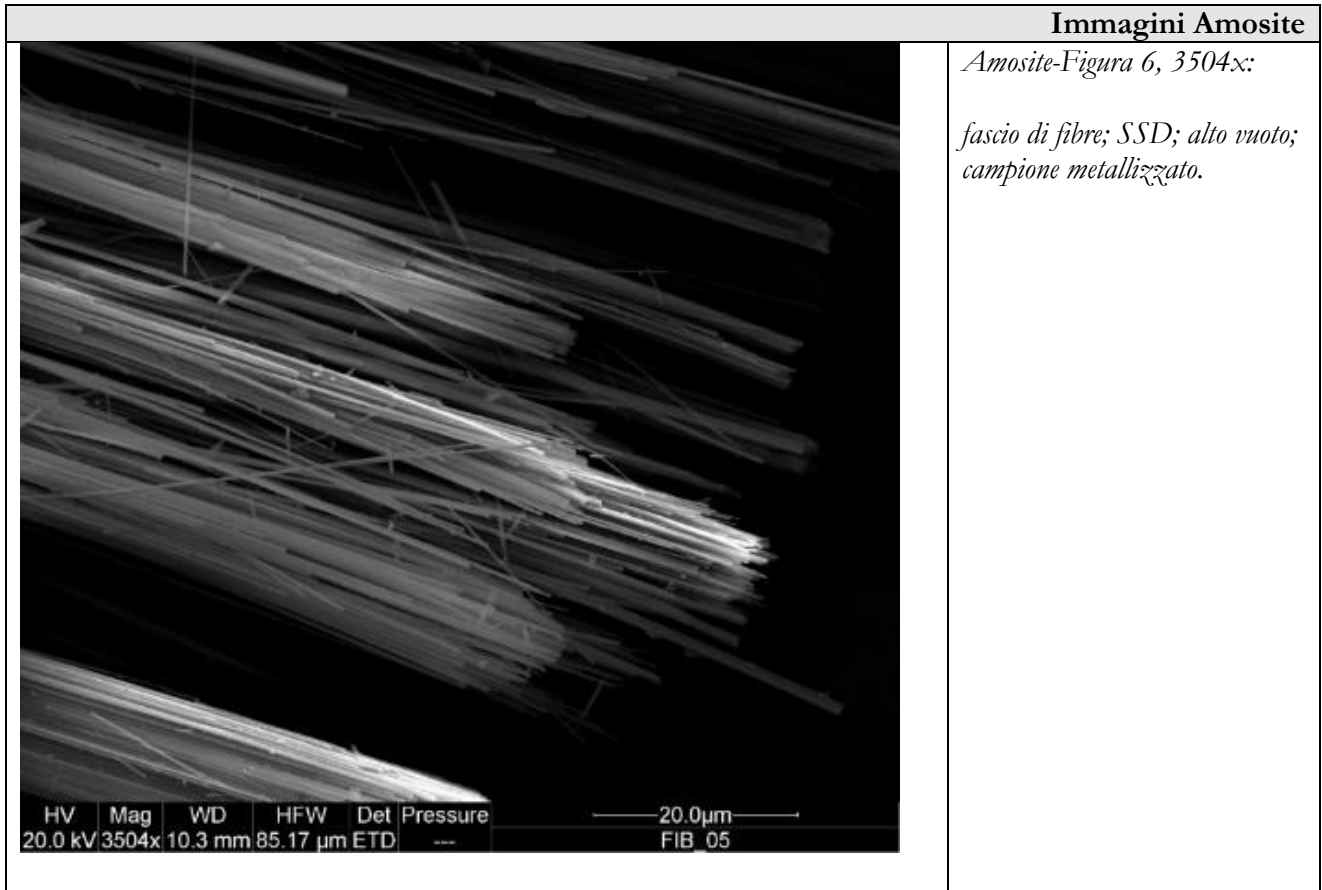
Amosite-Figura 5, 2337x:

*fascio di fibre; SSD; alto vuoto;
campione metallizzato.*

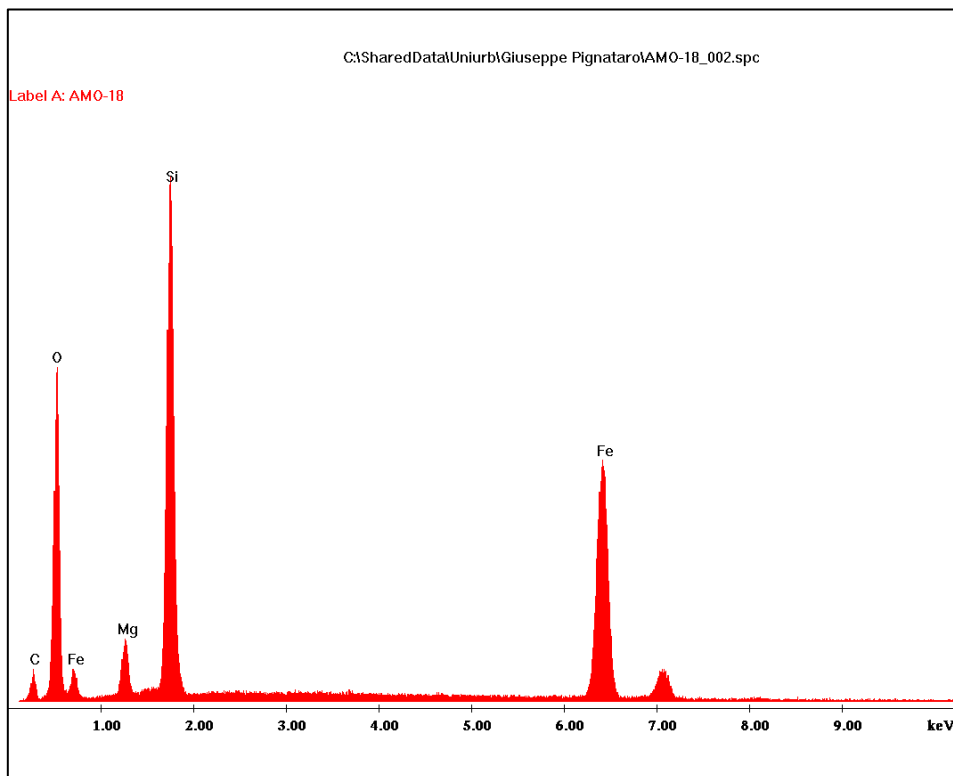


Amosite-Figura 6, 2791x:

*fascio di fibre; SSD; alto vuoto;
campione metallizzato.*



Caratterizzazione chimica



Amosite, spettro EDXS

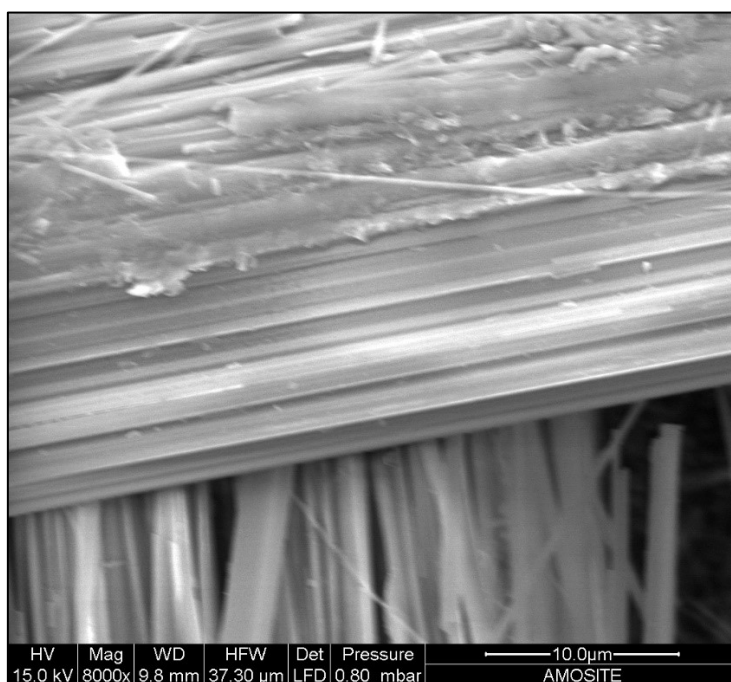
Le condizioni comuni di analisi in SEM sono state:

- working distance: 10 mm,
- tilt angle: 0°

La caratterizzazione chimica tramite EDX è stata eseguita operando in condizioni di basso vuoto con potenziali di accelerazione tra i 10 ed i 25 kV (informazione chimica).

In condizioni di alto vuoto con potenziali fino a 25 kV si sono ottenute immagini ad ingrandimenti maggiori (informazione morfologica).

L'analisi elementare ottenuta tramite EDAX dà come risultato per i cationi presenti in presenza di atomi (At%), con la conseguente distribuzione in ossidi:



L'analisi EDAX è stata eseguita su 7 punti, ad ingrandimento 8000x

Metallo	Media At%	Ossido	% Ossidi	% Ossidi (standard MR64)	ISO 14966
Mg	2.40%	MgO	5.5%	5.1%	1-7%
Si	11.23%	SiO ₂	38.3%	44.39%	49-53%
Fe	6.90%	FeO + Fe ₂ O ₃	62.5%	78.99%	0-49%

Confrontando la distribuzione ottenuta con l'allegato C della norma ISO 14966, la fibra risulta compatibile per morfologia aghiforme e per composizione media con l'amianto di

tipo amosite, nei limiti della variabilità naturale.

Disponendo di standard di riferimento messo a disposizione dal Centro Regionale Amianto ARPAM (Analytical Standard Sample UICC, Brand Amosite

Asbestos, Rif. ARPAM MR64), confrontando i risultati ottenuti si nota come le percentuali degli ossidi di Magnesio e Silicio siano confrontabili,

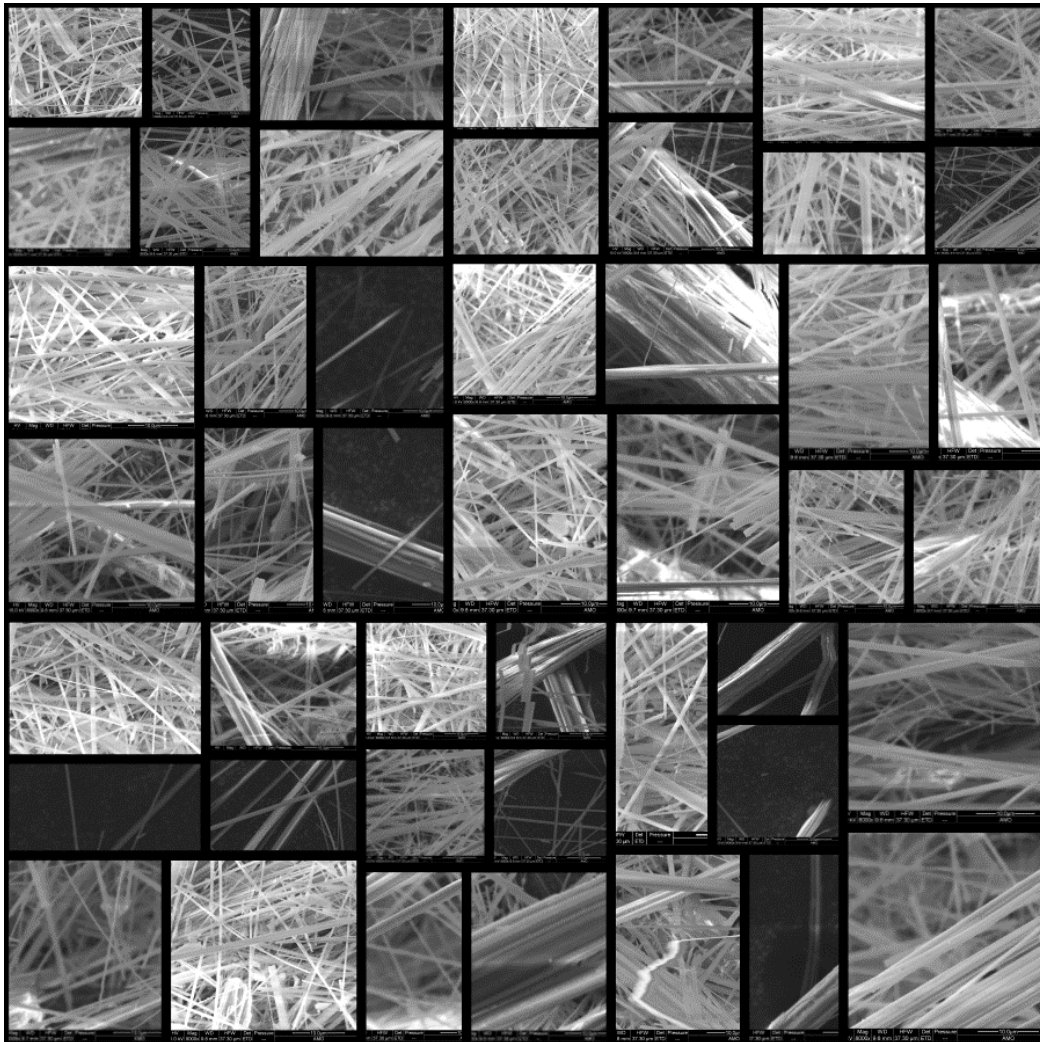
ma come anche in questo caso la somma degli ossidi ferroso e ferrico sia superiore a quella riportata nella norma ISO 14966.

Calcolo del diametro geometrico medio

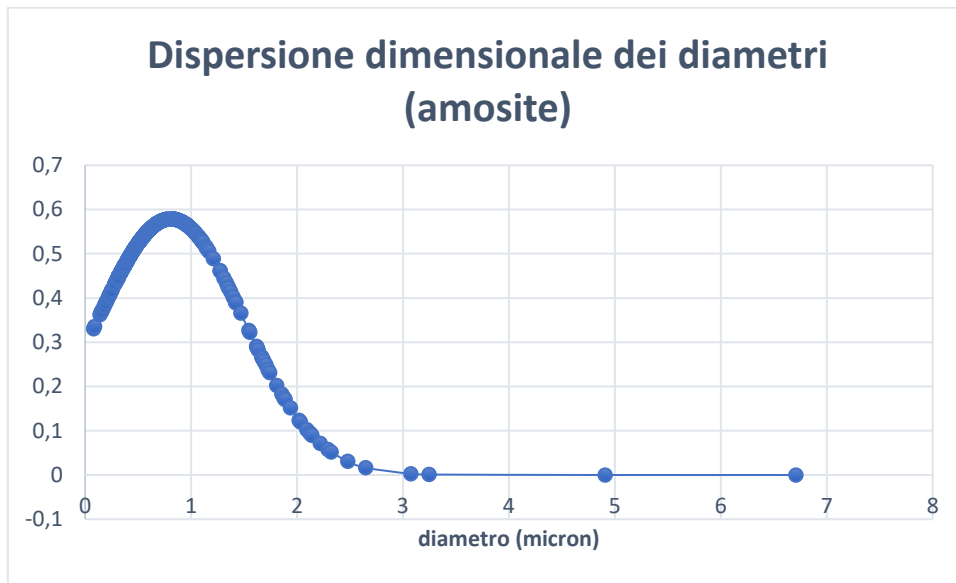
Dall'analisi di 277 fibre, con un ingrandimento 8000x, si è ottenuto:

DMGOPL-2ES = 0,59 micron (con errore $2\Delta=0,047$ micron)

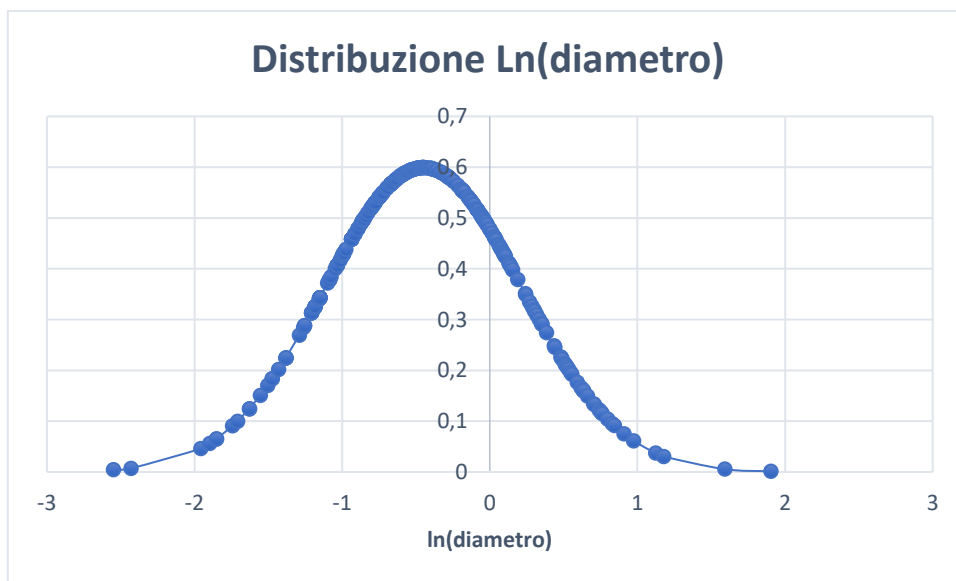
Tale valore, inferiore a 6 micron, rende la fibra misurata potenzialmente pericolosa in quanto inalabile per analogia con le fibre artificiali vetrose.



Le misure ottenute sono riportate in allegato (Tabella diametri amosite).

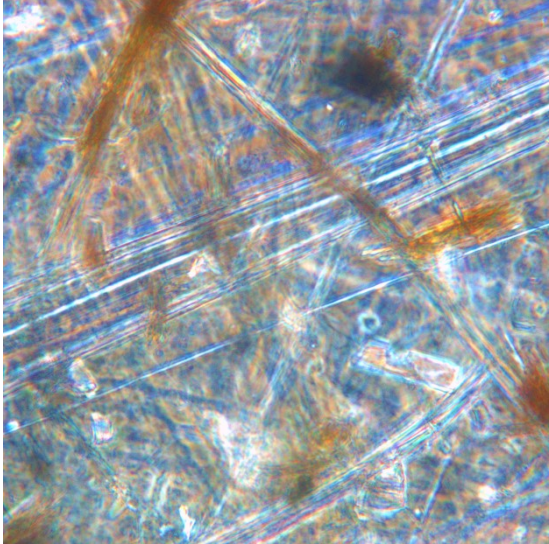
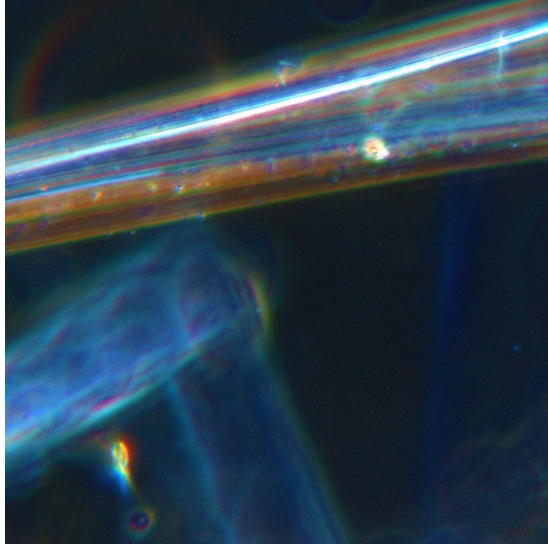


Nel grafico soprastante, la distribuzione normale dei diametri ottenuti dalle letture, l'andamento non è gaussiano (valore medio = 0,81 micron; deviazione standard = 0,70 micron).



Nel grafico soprastante, la distribuzione normale del logaritmo normale dei diametri ottenuti dalle letture, l'andamento è gaussiano, come aspettato dall'applicazione del metodo per il calcolo del diametro geometrico ponderato.

Caratterizzazione tramite MODC

Identificazione tramite dispersione cromatica in microscopia ottica: amosite	
	
Fibre analizzate in campo chiaro, il colore varia tra il grigio ed il blu/celestino. L'alone arancione è molto intenso, le fibre risultano aggregate.	Fibre analizzate in campo scuro, il colore varia tra il giallo arancione ed il blu con birifrangenza intensa (cambio evidente di colore).
Microscopio Leitz Diaplan, ingrandimento 500x, liquido di dispersione: 1,670 (Prod. Cargille)	
Le colorazioni ottenute sono compatibili con quelle delle fibre di crisotilo immerse nel liquido con indice di rifrazione 1,670	

INTERAZIONE CON MODELLO CELLULARE

Linea cellulare U937

Le cellule U937 sono linee cellulari (pro) monocitiche, sono state isolate da un paziente maschio di 37 anni affetto da linfoma e sono utilizzate per studiare il comportamento e la differenziazione dei monociti. Anche in vitro, possono essere differenziate in vari tipi di macrofagi.

Le cellule U937 maturano e si differenziano in risposta a diversi stimoli, adottando morfologia e caratteristiche di macrofagi maturi.

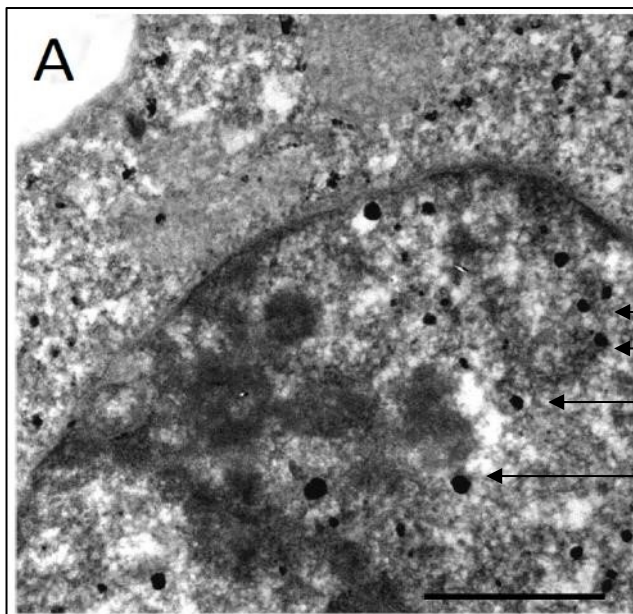
Interazione con monociti U937

La tossicità del particolato e delle fibre minerali può essere studiata e verificata attraverso studi in vitro su vari modelli cellulari.

L'interazione tra fibre e cellule U937 è stata scelta per verificare l'internalizzazione e la tossicità dell'epsomite nelle cellule, diverse concentrazioni di fibre sono state testate su cellule U937 (5, 20 e 100 nm) con diversi tempi di incubazione (24, 36 e 48 ore). La risposta cellulare dopo l'esposizione alla fibra è stata studiata tramite microscopia TEM (Philips, MC 120).

Le cellule sono state incubate sia in assenza che in presenza di epsomite.

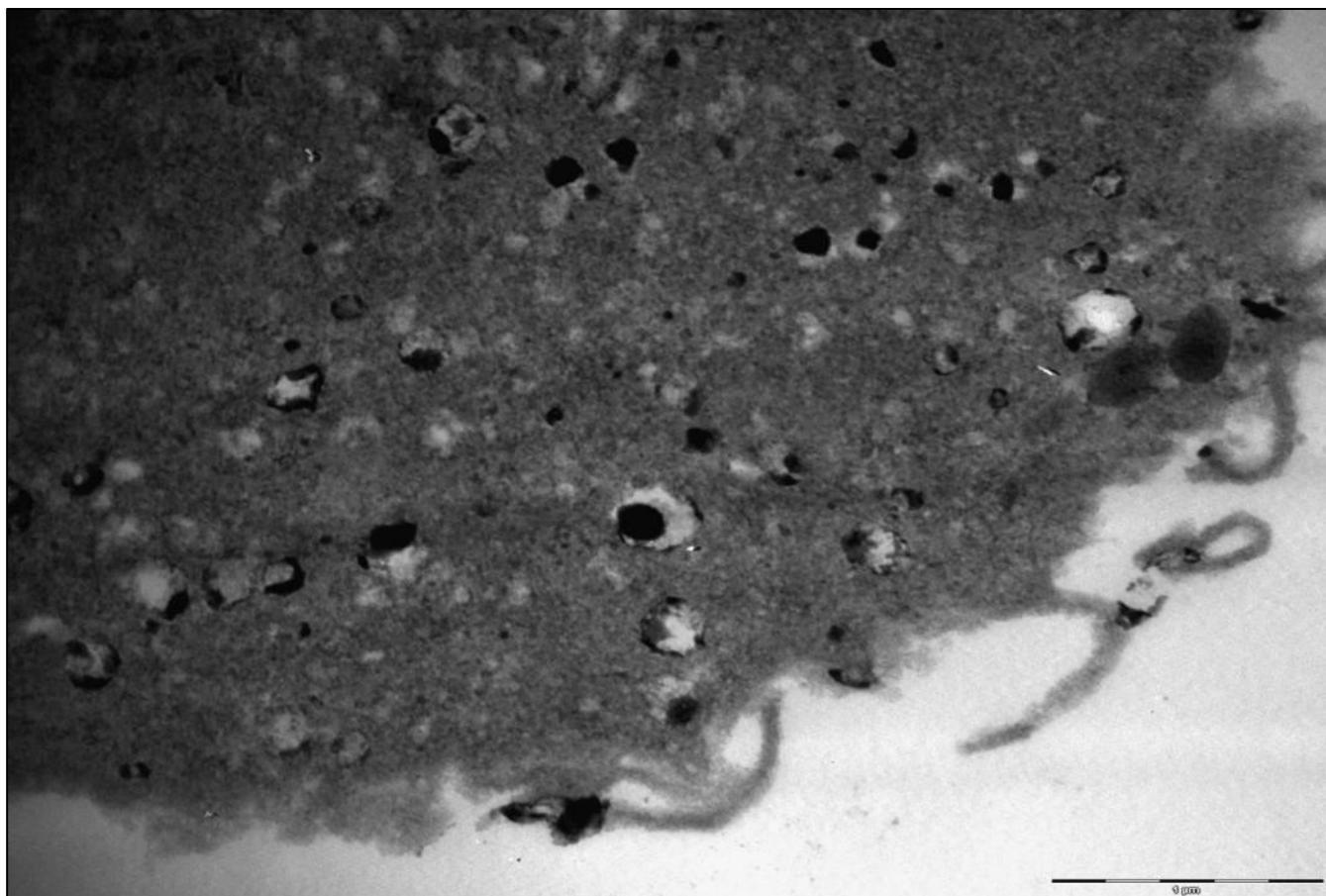
L'internalizzazione delle fibre nelle cellule è diventata apprezzabile alle dosi più elevate e la sua presenza può essere già rivelata a partire da 24 ore di trattamento senza alcun danno cellulare.



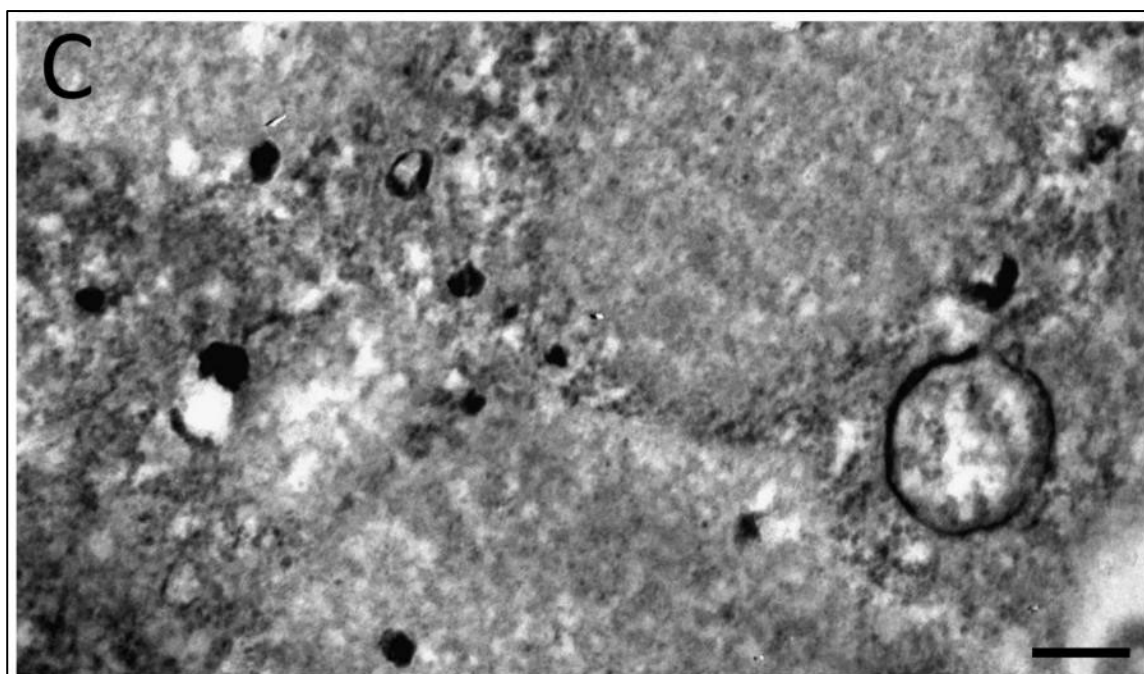
Le immagini TEM mostrano che le fibre epsomite erano in gran parte interiorizzate dalle cellule, sia nel nucleo (Fig. A) che nel citoplasma (Fig. A, B), dove formano strutture circolari dense di elettroni (Fig. D).

Le fibre sono internalizzate dalle cellule, sia nel citoplasma che nel nucleo

(Fig. A, la barra è 1 micron)



Fibre internalizzate nel citoplasma (la barra è 1 micron)

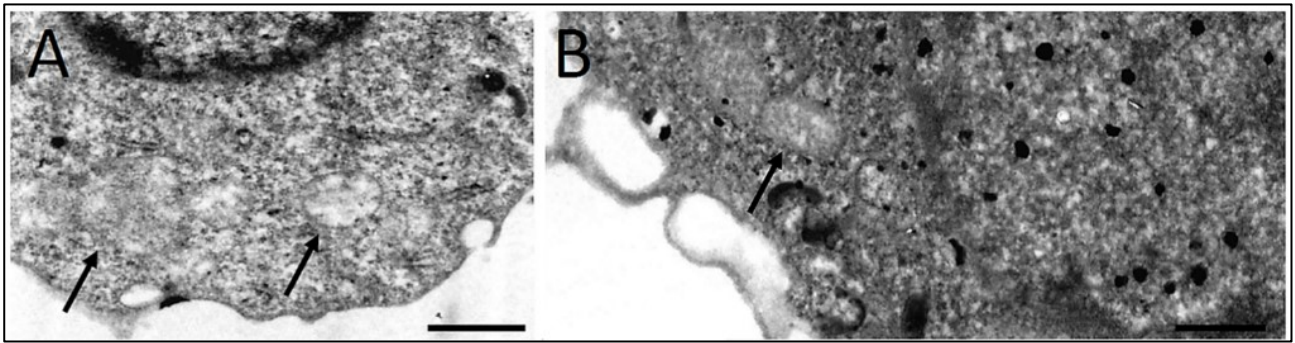


In figura C le fibre sono strutture elettron dense circolari (la barra è 200 nm)

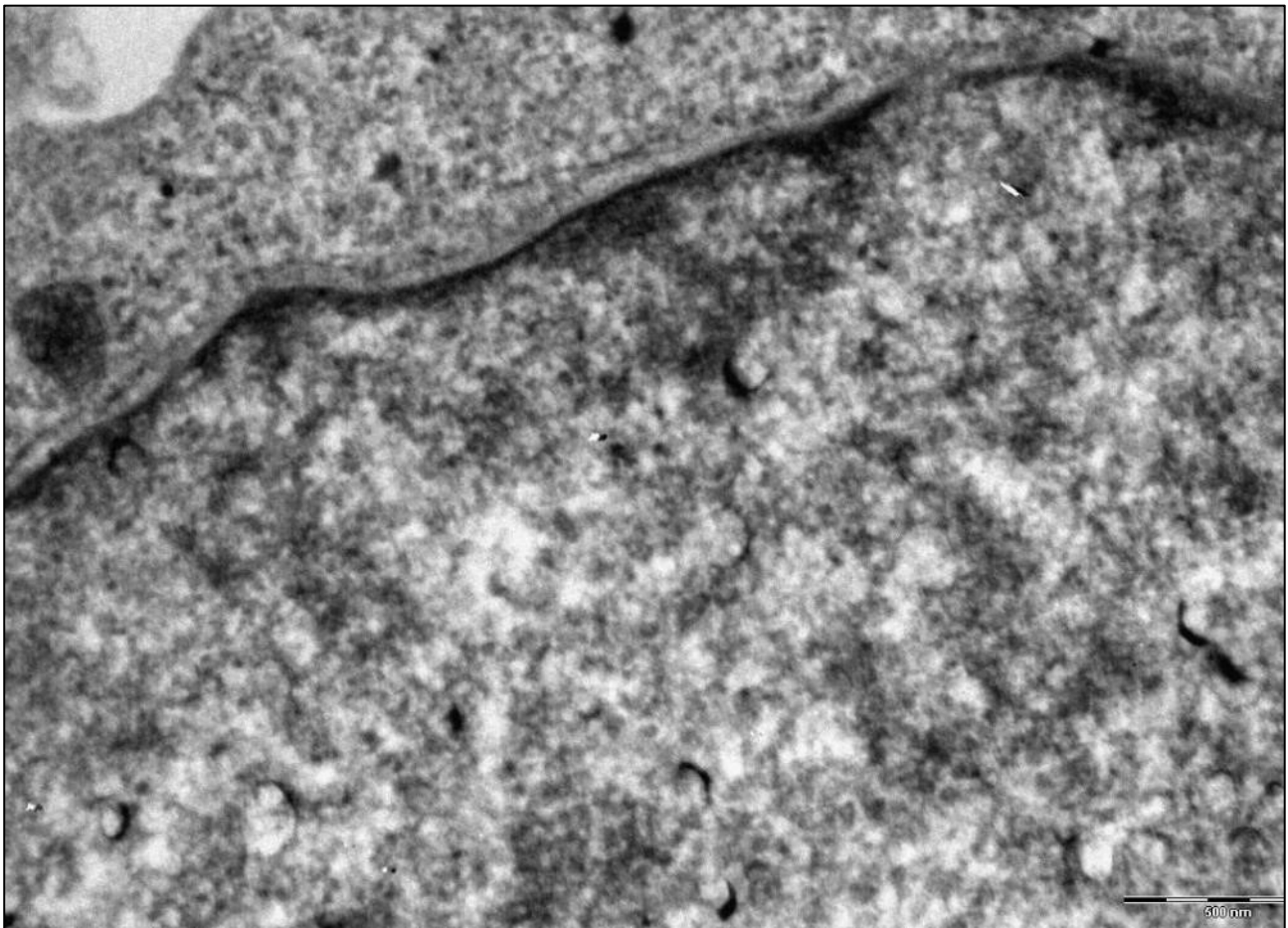
Nelle immagini TEM, le fibre appaiono in sezione e quindi come cerchi di materiale elettrondenso.

Aumentando l'esposizione a 48 ore, la dimensione delle fibre di epsomite diminuisce e un parziale danno cellulare,

caratterizzato da alterazioni mitocondriali, può essere rilevato. (Fig. A-B, frecce).

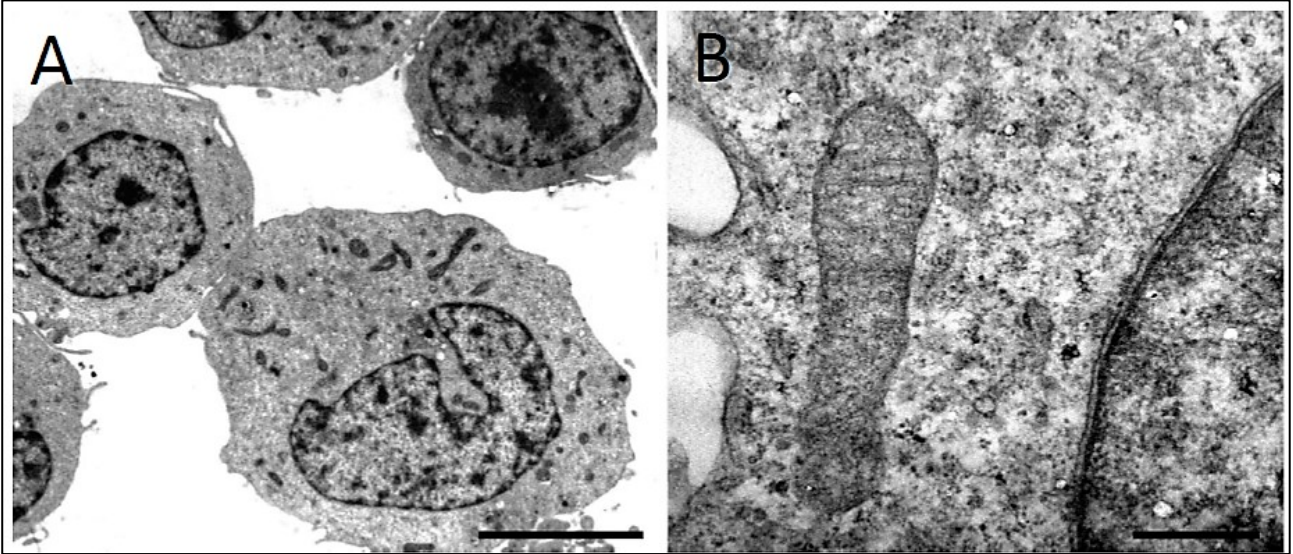


Cellule dopo 48 ore di esposizione all'epsomite (le barre sono 1 μ m per A, B)



Fibre di epsomite internalizzate dalle cellule (nucleo) (barra = 0,5 micron)

Controllo: Come controllo, osservazioni TEM mostrano in campioni non esposti alle fibre, la presenza di cellule integre con strutture subcellulari preservate, quali mitocondri e componenti nucleari.



Cellule di controllo U937 al TEM. Barre: 5 μ m per A e 500nm per B

Questi risultati mostrano che l'epsomite mostra una bassa citotossicità per quello che concerne l'induzione della morte cellulare. Tuttavia, un significativo numero di mitocondri disfunzionali può essere rilevato dopo l'esposizione alle fibre, suggerendo il coinvolgimento di fenomeni di stress ossidativo.

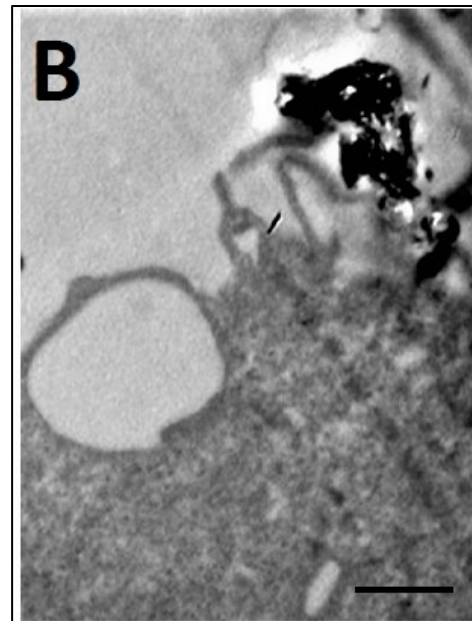
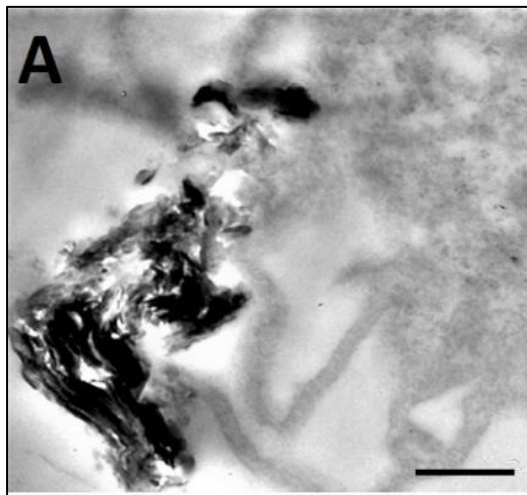
Interazione con macrofagi U937

La potenziale tossicità della epsomite è stata successivamente studiata tramite l'interazione con colture di macrofagi ottenuti da monociti U937.

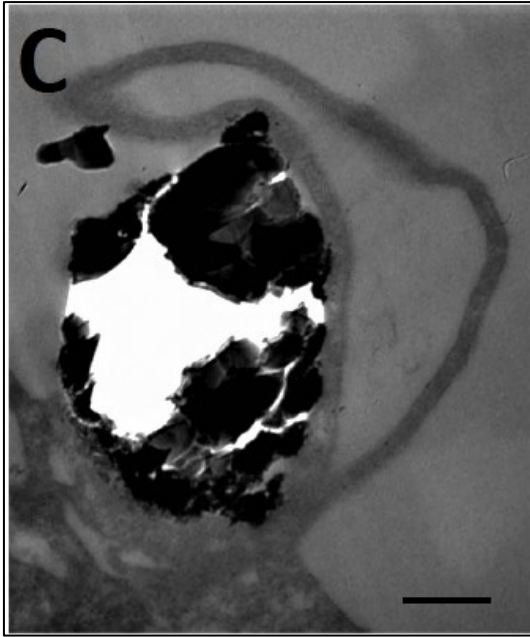
La linea cellulare U937 è stata trattata con PMA (100 ng/ml forbolo 12-miristato 13-acetato), un estere di forbolo che regola l'aderenza delle cellule alla superficie della flask (bottiglietta), per convertire i monociti in macrofagi. Successivamente, le cellule sono state incubate con dosaggi crescenti

di fibre (5, 10 e 20 nM) e tempi di esposizioni diversi (24 e 48 ore), infine preparate per l'osservazione tramite TEM.

Le prime osservazioni tramite TEM hanno rilevato la capacità anche dei macrofagi di internalizzare le fibre, che possono essere rilevate vicino alla superficie cellulare, dentro invaginazioni della membrana o del citoplasma, dove alcune fibre sono internalizzate in granuli lisosomiali.



(la barra è 500 nm per (A, B))

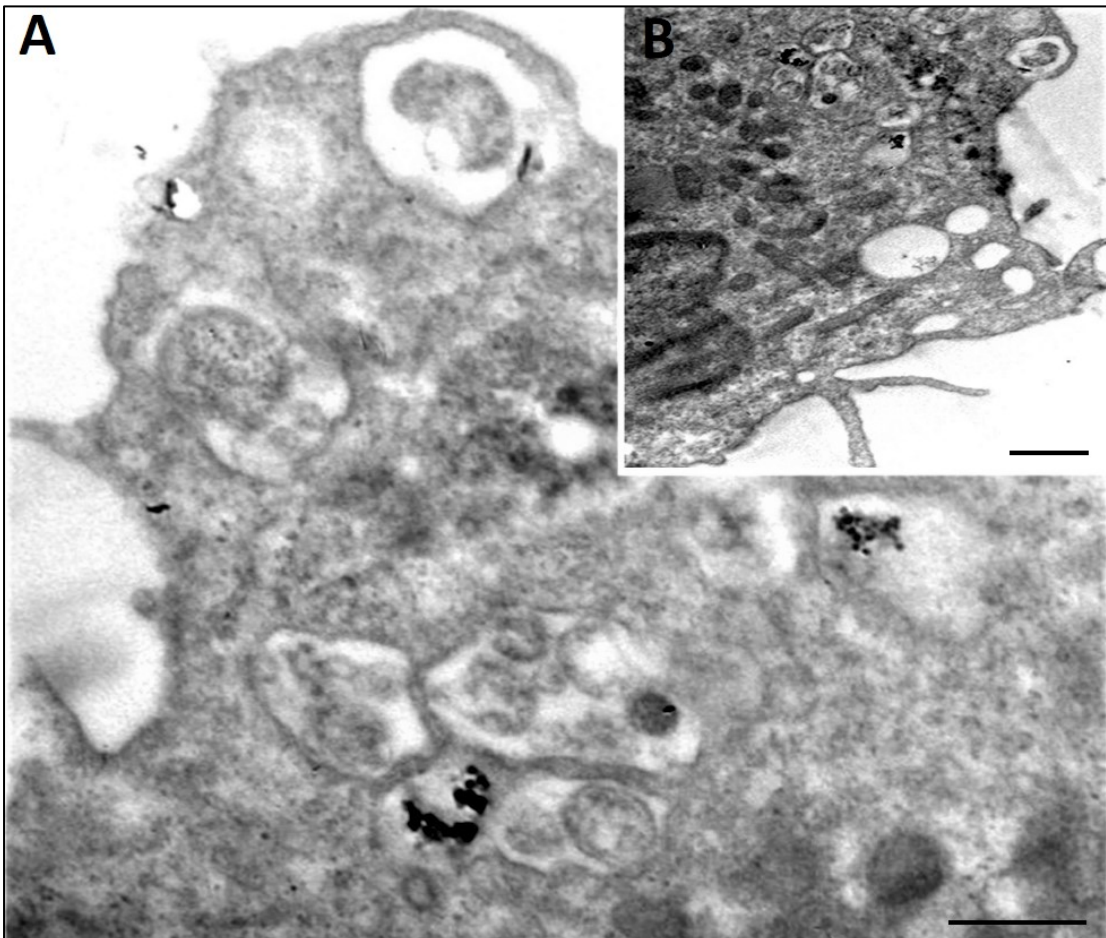


I macrofagi esposti all'epsomite sono stati esposti a dosi e tempi crescenti, sono capaci di internalizzare le fibre.

(la barra è 1 micron per C)

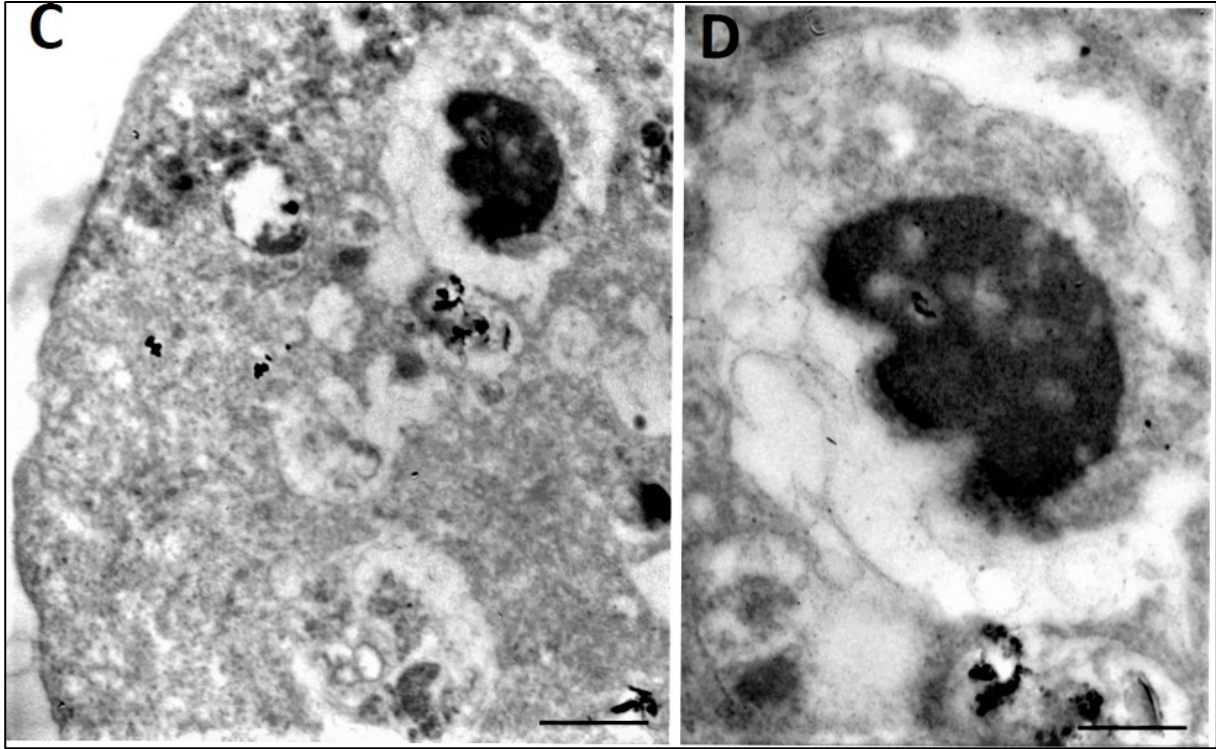
Aumentando l'esposizione a 48 ore, fibre con dimensioni maggiori possono essere osservate nel citoplasma, dove non possono essere correttamente consumate. Quest'ultimo evento porta

ad un impoverimento del sistema lisosomiale, seguito da danni mitocondriali e successivamente dalla morte cellulare.

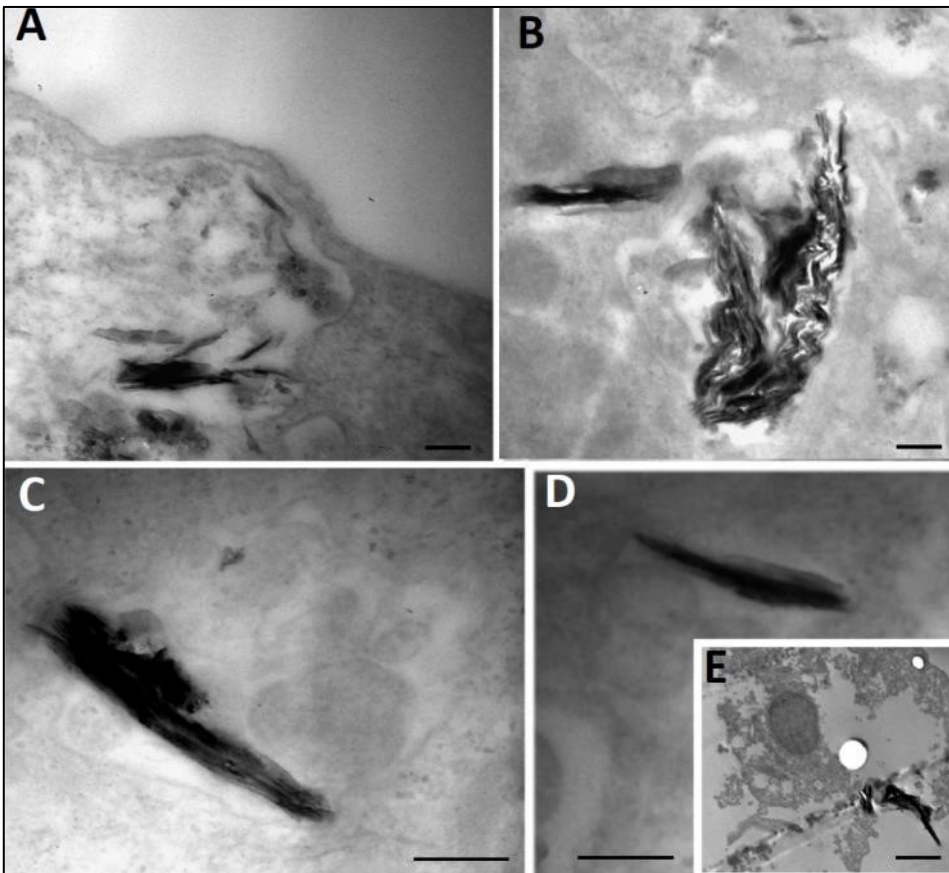


Piccole parti di fibre di epsomite internalizzate, fagocitate e degradate dalle cellule tramite il sistema lisosomiale.

(la barra è 500 nm (A, B))

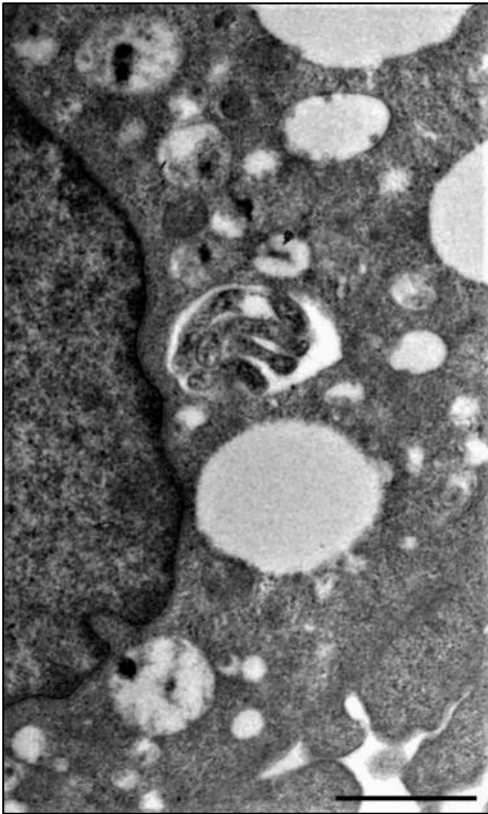


Piccole parti di fibre di epsomite internalizzate, fagocitate e degradate dalle cellule tramite il sistema lisosomiale. (la barra è 100 nm (C), 500 nm(D))

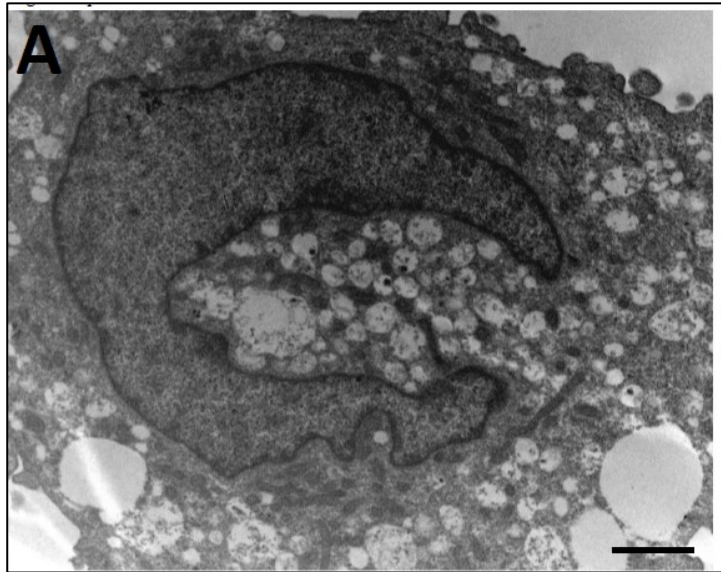


Fibre di dimensioni maggiori sono internalizzate nei vacuoli. L'esposizione all'epsomite di cellule U937 convertite in macrofagi induce citotossicità che sembra avere un ruolo fondamentale per la patogenesi.

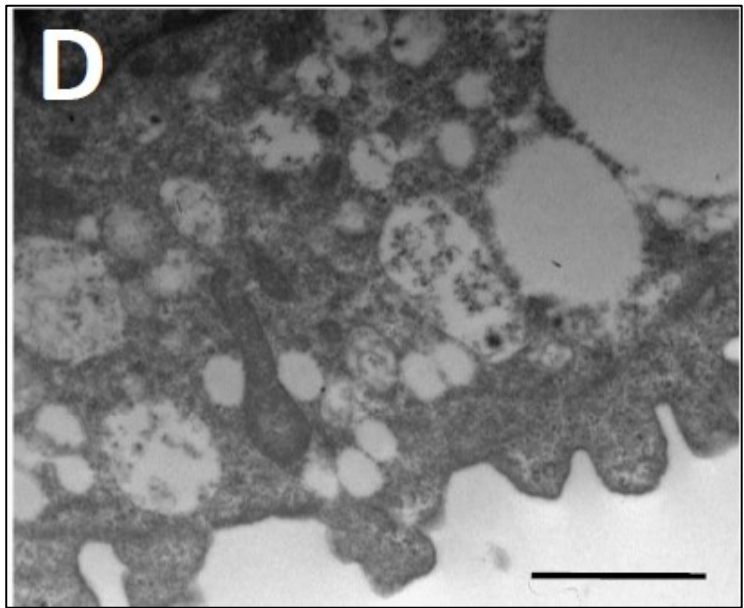
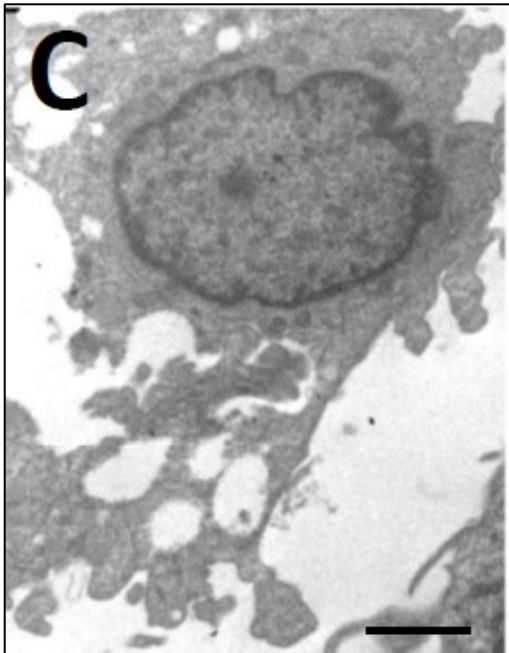
barra 200 nm (A-D);
2 micron (E)



Controllo: Come controllo, macrofagi non esposte a fibre di epsomite, non hanno mostrato danni alle strutture cellulari.



La barra è 2 micron



CONCLUSIONI

Come noto, la potenziale tossicità delle fibre minerali, e probabilmente non solo minerali, è dovuta non solo alle caratteristiche chimico fisiche, ma anche alle caratteristiche morfologiche. La particolare distribuzione dimensionale,

caratterizzata nelle fibre caratterizzate da un diametro di pochi micron, è una condizione sufficiente per l'inalazione, ma non è l'unica condizione necessaria e determinante per la pericolosità della fibra.

Fibra	Diametro medio (micron)	Metodo calcolo
Erionite	1-0,1	Calcolo diretto
Asbestoferrite	1,01	DMGOPL-2ES
Esaidrite	11,67	Calcolo diretto
Epsomite	4,33-5,31	DMGOPL-2ES
Silicato	8,46	Calcolo diretto
Tremolite	0,757	Calcolo diretto
Crisotilo	0,210	Calcolo diretto
Amosite	0,59	DMGOPL-2ES

(Tabella diametri fibre minerali caratterizzate)

Nella tabella soprastante sono riportati i diametri delle fibre minerali analizzate.

Nel caso dell'erionite abbiamo verificato l'attesa distribuzione della dimensione delle fibre e del diametro medio a causa del loro potenziale rischio cancerogeno. L'erionite è caratterizzata da un abito estremamente fibroso con fibre di tipo "wooly" lanose, di diametro circa 1 μm e lunghezze variabili, con fibrille di circa 0,1 μm di diametro. Le dimensioni molto ridotte ne confermano la possibile inalabilità e pericolosità.

Per le fibre di asbestoferrite ed epsomite il protocollo di calcolo del diametro si è rilevato adatto e di immediato utilizzo, anche in funzione della dimensione del diametro relativamente grande, ma al contempo inferiore ai 6 micron considerati come riferimento. Il protocollo si è rilevato utilizzabile anche

nel caso della fibra di amosite caratterizzata, in quanto nonostante il diametro inferiore al micron non ha mostrato segni di accumulo di cariche elettrostatiche.

In particolare, l'epsomite è caratterizzata da una grande reattività superficiale, che si manifesta anche in fenomeni di cracking superficiale, e questo potrebbe essere collegato con fenomeni di biosolubilizzazione delle fibre nelle strutture cellulari, meccanismo che potrebbe essere collegato a fenomeni di deidratazione/idratazione con le conseguenti variazioni strutturali.

Se per morfologia l'epsomite è assimilabile a fibre artificiali vetrose, lo è anche per composizione in ossidi

alcalino/alcalino terrosi (MgO), la cui presenza la definisce come fibra “biosolubile”, quindi assimilabile e con possibili conseguenze sul target cellulare.

L'interazione tra ioni calcio o magnesio, come nello specifico caso dell'epsomite, e membrane costituite da materiale fosfolipidico (Molina, 2012), potrebbe essere uno dei meccanismi che favorisce l'internalizzazione di queste strutture fibrose. Tuttavia, confrontando gli effetti dell'esposizione dei modelli cellulari sia all'epsomite che al sale di Epsom, aventi la stessa composizione chimica $MgSO_4$, ma con diversa morfologia, può essere ipotizzato che anche la morfologia sia importante nel meccanismo di interazione.

Le osservazioni TEM hanno rivelato la capacità delle cellule di interiorizzare il minerale fibroso, nel caso dell'epsomite, già nei tempi e nelle concentrazioni più basse. L'internalizzazione è risultata significativa ai dosaggi più alti di minerali, e la fibra si ritrova sia nel citoplasma che nel nucleo dove induce il danno cellulare.

In questo possibile pathway, in cui la morfologia è fondamentale, la dimensionalità della fibra può essere determinata con un protocollo relativamente semplice che sfrutta le potenzialità della microscopia SEM per discriminare la potenziale tossicità di fibre minerali.

Applicando il protocollo ai risultati ottenuti le fibre di erionite, le fibre di amianto analizzate (crisotilo, erionite e tremolite) si confermano come fibre

respirabili e che possono penetrare anche oltre la laringe (frazione toracica).

Le fibre di esaidrite e del silicato proveniente dai Monti Lessini hanno un diametro maggiore del riferimento scelto (6 micron), quindi a parità di eventuali specifiche interazioni di tipo biochimico la respirabilità sarà meno probabile.

L'epsomite ha un diametro che la rende respirabile e tramite modello cellulare si è osservata, inoltre, una tossicità dovuta all'internalizzazione delle fibre nelle strutture cellulari.

L'utilizzo del protocollo per il calcolo del diametro medio geometrico ponderato per la lunghezza, tramite microscopia SEM, si è rilevato uno strumento utile per le fibre di tipo “aghiforme” (anfibolo), dove la geometria pressoché cilindrica permette un'applicazione diretta del metodo, mentre nel caso di fibre “lanose”, come crisotilo o erionite, l'applicazione è più difficoltosa, in quanto ad alti ingrandimenti si osservano effetti elettrostatici, in parte risolti con la metallizzazione, e la stessa preparazione del campione risente della naturale tendenza all'aggregazione in aggregati difficilmente frazionabili, ma è opportuno osservare che in questi casi la dimensione del diametro è nell'ordine di 1-3 micron, con fibrille fino a 0,1 micron, quindi si tratta di fibre certamente “potenzialmente pericolose” per inalabilità e respirabilità.

L'approccio contestuale di caratterizzazione morfologica e dimensionale con test di tossicità, su opportuni modelli cellulari, potrebbe rivelarsi uno strumento utile per la

caratterizzazione e discriminazione di “pericolosità” o “non pericolosità” di fibre minerali naturali che per particolari situazioni di morfogenesi non sono classificabili direttamente come fibre pericolose, ma che potrebbero essere potenzialmente tossiche.

Un “diametro medio geometrico ponderato per la lunghezza” superiore a 6 micron potrebbe escludere la caratteristica di respirabilità della fibra, mentre per fibre con diametro minore si potrebbe ricorrere ad ulteriori test specifici con modelli cellulari per confermarne o non confermarne la possibile tossicità.

ALLEGATI

Tabella fibre di amianto immerse in liquidi ad indice noto

TABELLA I

Tipo di asbesto	Indici di rifrazione n_D 25°C														
	1.550			1.580			1.670			1.700					
	Campo scuro // (1) ↓ (2)	Contr. fase // ↓	Cont. fase // ↓	Campo scuro // ↓	Contr. fase // ↓	Cont. fase // ↓	Campo scuro // ↓	Contr. fase // ↓	Cont. fase // ↓	Campo scuro // ↓	Contr. fase // ↓	Cont. fase // ↓			
Amosite,	(BIANCO)	colore scuro alone chiaro		(BIANCO)	grigio scuro nero (piccole)		giallo arancio	blu viola	grigio blu	alone arancio		indaco blu	celesti blu	celesti alone senape viola scuro giallo	bianco alone viola scuro giallo
Antofillite	—	—	—	giallo	grigio scuro nero (piccole) (alone chiaro)	—	blu	blu chiaro	—	—	—	—	—	—	—
Crocidolite	(BIANCO)	Colore scuro nero (piccole) (alone chiaro)		(BIANCO)	grigio scuro nero (piccole)		giallo arancio	giallo arancio	blu grigio	blu violetto		—	rosa porpora	blu (alone arancio)	blu viola (alone arancio)
Cristallo	viola porpora	celesti scuro (alone arancio)	celesti chiaro (alone arancio)	blu chiaro	(BIANCO) (alone scuro)		(BIANCO) (riflessi celesti)	(BIANCO) (riflessi celesti)	(bruno) (chiaro)			(BIANCO) riflessi celesti		(BIANCO)	(BIANCO)
Tremolite	—	—	—	giallo	grigio scuro nero (piccole) (alone chiaro)	—	blu	blu chiaro	—	—	—	—	—	—	—

(1) Polarizzatore parallelo all'asse della fibra: //
 (2) Polarizzatore perpendicolare all'asse della fibra: ↓

Tabella diametri asbestoferrite

Asbestoferrite, 6000x	Length (nm)		Length (nm)	
Asbestoferrite_Measure_050	2287,33		Asbestoferrite_Measure_047	835,59
Asbestoferrite_Measure_050	2060,55		Asbestoferrite_Measure_047	391,57
Asbestoferrite_Measure_050	1781,85		Asbestoferrite_Measure_047	1950,58
Asbestoferrite_Measure_050	553,76		Asbestoferrite_Measure_048	283,20
Asbestoferrite_Measure_050	478,34		Asbestoferrite_Measure_048	1101,11
Asbestoferrite_Measure_050	1448,91		Asbestoferrite_Measure_048	956,67
Asbestoferrite_Measure_050	2971,77		Asbestoferrite_Measure_048	1021,08
Asbestoferrite_Measure_050	864,72		Asbestoferrite_Measure_048	1154,44
Asbestoferrite_Measure_050	647,97		Asbestoferrite_Measure_048	934,22
Asbestoferrite_Measure_050	3651,63		Asbestoferrite_Measure_048	495,30
Asbestoferrite_Measure_050	2467,41		Asbestoferrite_Measure_048	827,08
Asbestoferrite_Measure_050	875,57		Asbestoferrite_Measure_048	437,11
Asbestoferrite_Measure_050	1554,93		Asbestoferrite_Measure_048	566,39
Asbestoferrite_Measure_002	350,23		Asbestoferrite_Measure_049	391,57
Asbestoferrite_Measure_002	976,20		Asbestoferrite_Measure_049	388,54
Asbestoferrite_Measure_002	1581,25		Asbestoferrite_Measure_049	1271,14
Asbestoferrite_Measure_002	895,54		Asbestoferrite_Measure_049	495,30
Asbestoferrite_Measure_002	783,13		Asbestoferrite_Measure_049	1390,77
Asbestoferrite_Measure_002	1581,25		Asbestoferrite_Measure_049	458,19
Asbestoferrite_Measure_002	1098,96		Asbestoferrite_Measure_053	1359,90
Asbestoferrite_Measure_002	868,81		Asbestoferrite_Measure_053	242,84
Asbestoferrite_Measure_003	4275,06		Asbestoferrite_Measure_053	242,84
Asbestoferrite_Measure_003	7211,61		Asbestoferrite_Measure_053	2238,86
Asbestoferrite_Measure_003	2954,26		Asbestoferrite_Measure_053	1266,49
Asbestoferrite_Measure_003	3042,37		Asbestoferrite_Measure_053	1573,02
Asbestoferrite_Measure_003	3398,35		Asbestoferrite_Measure_053	1126,52
Asbestoferrite_Measure_003	1014,12		Asbestoferrite_Measure_053	200,25
Asbestoferrite_Measure_004	1676,82		Asbestoferrite_Measure_053	1813,34
Asbestoferrite_Measure_004	1886,03		Asbestoferrite_Measure_054	353,58
Asbestoferrite_Measure_005	4184,72		Asbestoferrite_Measure_054	353,58
Asbestoferrite_Measure_005	2831,96		Asbestoferrite_Measure_054	434,40
Asbestoferrite_Measure_005	350,23		Asbestoferrite_Measure_054	907,32
Asbestoferrite_Measure_005	343,43		Asbestoferrite_Measure_054	1285,90
Asbestoferrite_Measure_005	983,42		Asbestoferrite_Measure_054	5819,21
Asbestoferrite_Measure_006	488,10		Asbestoferrite_Measure_054	3487,42
Asbestoferrite_Measure_007	242,84		Asbestoferrite_Measure_054	206,06
Asbestoferrite_Measure_007	310,99		Asbestoferrite_Measure_055	633,25
Asbestoferrite_Measure_008	1109,64		Asbestoferrite_Measure_055	2407,90
Asbestoferrite_Measure_008	485,68		Asbestoferrite_Measure_055	2487,88
Asbestoferrite_Measure_008	434,40		Asbestoferrite_Measure_055	350,23
Asbestoferrite_Measure_008	2108,64		Asbestoferrite_Measure_055	247,65
Asbestoferrite_Measure_008	1065,17		Asbestoferrite_Measure_056	447,77
Asbestoferrite_Measure_008	434,40		Asbestoferrite_Measure_056	525,34
Asbestoferrite_Measure_009	2535,31		Asbestoferrite_Measure_056	5392,76

Asbestoferrite, 6000x	Length (nm)			Length (nm)
Asbestoferrite_Measure_009	758,65		Asbestoferrite_Measure_056	3211,35
Asbestoferrite_Measure_010	525,34		Asbestoferrite_Measure_056	3744,76
Asbestoferrite_Measure_010	350,23		Asbestoferrite_Measure_056	369,88
Asbestoferrite_Measure_010	5632,18		Asbestoferrite_Measure_056	891,58
Asbestoferrite_Measure_011	400,50		Asbestoferrite_Measure_058	638,81
Asbestoferrite_Measure_011	3542,78		Asbestoferrite_Measure_058	875,57
Asbestoferrite_Measure_012	1401,75		Asbestoferrite_Measure_058	1325,64
Asbestoferrite_Measure_012	145,70		Asbestoferrite_Measure_058	695,38
Asbestoferrite_Measure_012	631,38		Asbestoferrite_Measure_059	838,41
Asbestoferrite_Measure_012	2525,52		Asbestoferrite_Measure_059	722,01
Asbestoferrite_Measure_013	922,79		Asbestoferrite_Measure_060	1643,43
Asbestoferrite_Measure_013	310,99		Asbestoferrite_Measure_060	379,33
Asbestoferrite_Measure_013	261,55		Asbestoferrite_Measure_061	1632,63
Asbestoferrite_Measure_014	2721,96		Asbestoferrite_Measure_061	2085,59
Asbestoferrite_Measure_014	274,74		Asbestoferrite_Measure_061	1480,32
Asbestoferrite_Measure_015	4291,58		Asbestoferrite_Measure_061	827,08
Asbestoferrite_Measure_015	827,08		Asbestoferrite_Measure_061	907,32
Asbestoferrite_Measure_015	1765,22		Asbestoferrite_Measure_062	895,54
Asbestoferrite_Measure_015	932,96		Asbestoferrite_Measure_062	3845,45
Asbestoferrite_Measure_015	1972,23		Asbestoferrite_Measure_062	1749,11
Asbestoferrite_Measure_015	3015,89		Asbestoferrite_Measure_062	638,81
Asbestoferrite_Measure_016	3702,63		Asbestoferrite_Measure_062	553,76
Asbestoferrite_Measure_016	796,57		Asbestoferrite_Measure_063	447,77
Asbestoferrite_Measure_016	11199,36		Asbestoferrite_Measure_063	2807,28
Asbestoferrite_Measure_017	1400,91		Asbestoferrite_Measure_063	1066,28
Asbestoferrite_Measure_017	1781,18		Asbestoferrite_Measure_063	1107,51
Asbestoferrite_Measure_017	1551,89		Asbestoferrite_Measure_063	912,50
Asbestoferrite_Measure_017	1046,18		Asbestoferrite_Measure_064	434,40
Asbestoferrite_Measure_018	2086,15		Asbestoferrite_Measure_064	283,20
Asbestoferrite_Measure_018	274,74		Asbestoferrite_Measure_064	295,43
Asbestoferrite_Measure_018	5084,55		Asbestoferrite_Measure_064	217,20
Asbestoferrite_Measure_018	3583,49		Asbestoferrite_Measure_064	1032,56
Asbestoferrite_Measure_018	1781,18		Asbestoferrite_Measure_064	516,28
Asbestoferrite_Measure_021	584,83		Asbestoferrite_Measure_064	549,48
Asbestoferrite_Measure_021	4596,52		Asbestoferrite_Measure_064	516,28
Asbestoferrite_Measure_021	523,09		Asbestoferrite_Measure_065	434,40
Asbestoferrite_Measure_022	414,96		Asbestoferrite_Measure_065	695,38
Asbestoferrite_Measure_023	200,25		Asbestoferrite_Measure_065	651,60
Asbestoferrite_Measure_023	964,04		Asbestoferrite_Measure_065	1408,46
Asbestoferrite_Measure_023	895,54		Asbestoferrite_Measure_065	343,43
Asbestoferrite_Measure_024	6927,50		Asbestoferrite_Measure_065	618,17
Asbestoferrite_Measure_025	7841,09		Asbestoferrite_Measure_065	932,96
Asbestoferrite_Measure_026	1442,39		Asbestoferrite_Measure_066	1072,90
Asbestoferrite_Measure_026	679,95		Asbestoferrite_Measure_066	2042,15
Asbestoferrite_Measure_027	536,45		Asbestoferrite_Measure_067	1651,30
Asbestoferrite_Measure_029	2093,49		Asbestoferrite_Measure_067	961,59

Asbestoferrite, 6000x	Length (nm)			Length (nm)
Asbestoferrite_Measure_029	824,22		Asbestoferrite_Measure_067	2207,56
Asbestoferrite_Measure_029	516,28		Asbestoferrite_Measure_067	439,80
Asbestoferrite_Measure_029	653,41		Asbestoferrite_Measure_068	1845,57
Asbestoferrite_Measure_029	1904,08		Asbestoferrite_Measure_068	1277,62
Asbestoferrite_Measure_030	97,14		Asbestoferrite_Measure_069	369,88
Asbestoferrite_Measure_030	2215,56		Asbestoferrite_Measure_070	2924,16
Asbestoferrite_Measure_030	722,01		Asbestoferrite_Measure_070	3856,47
Asbestoferrite_Measure_030	414,96		Asbestoferrite_Measure_071	2419,63
Asbestoferrite_Measure_031	1121,27		Asbestoferrite_Measure_071	1019,92
Asbestoferrite_Measure_031	621,97		Asbestoferrite_Measure_071	1000,07
Asbestoferrite_Measure_031	4372,44		Asbestoferrite_Measure_071	568,47
Asbestoferrite_Measure_032	4240,99		Asbestoferrite_Measure_072	1133,82
Asbestoferrite_Measure_032	2909,61		Asbestoferrite_Measure_072	242,84
Asbestoferrite_Measure_032	4276,72		Asbestoferrite_Measure_073	6481,92
Asbestoferrite_Measure_032	2403,00		Asbestoferrite_Measure_073	310,99
Asbestoferrite_Measure_032	2014,83		Asbestoferrite_Measure_073	242,84
Asbestoferrite_Measure_032	1889,15		Asbestoferrite_Measure_073	2141,94
Asbestoferrite_Measure_032	3626,68		Asbestoferrite_Measure_074	739,76
Asbestoferrite_Measure_032	2933,83		Asbestoferrite_Measure_074	1259,96
Asbestoferrite_Measure_032	1876,00		Asbestoferrite_Measure_074	1438,29
Asbestoferrite_Measure_032	1091,42		Asbestoferrite_Measure_074	1717,13
Asbestoferrite_Measure_032	1014,12		Asbestoferrite_Measure_074	777,08
Asbestoferrite_Measure_032	796,57		Asbestoferrite_Measure_074	1607,88
Asbestoferrite_Measure_032	631,38		Asbestoferrite_Measure_074	447,77
Asbestoferrite_Measure_032	990,59		Asbestoferrite_Measure_074	943,01
Asbestoferrite_Measure_032	977,41		Asbestoferrite_Measure_074	1060,73
Asbestoferrite_Measure_032	722,01		Asbestoferrite_Measure_075	868,81
Asbestoferrite_Measure_033	777,08		Asbestoferrite_Measure_075	1050,68
Asbestoferrite_Measure_033	584,83		Asbestoferrite_Measure_076	1039,39
Asbestoferrite_Measure_033	434,40		Asbestoferrite_Measure_076	875,57
Asbestoferrite_Measure_033	777,08		Asbestoferrite_Measure_076	633,25
Asbestoferrite_Measure_033	1411,81		Asbestoferrite_Measure_076	2535,31
Asbestoferrite_Measure_033	1222,90		Asbestoferrite_Measure_076	437,11
Asbestoferrite_Measure_033	582,81		Asbestoferrite_Measure_076	1486,68
Asbestoferrite_Measure_033	1533,54		Asbestoferrite_Measure_077	388,54
Asbestoferrite_Measure_033	1669,06		Asbestoferrite_Measure_077	1696,40
Asbestoferrite_Measure_033	1277,62		Asbestoferrite_Measure_077	1428,42
Asbestoferrite_Measure_033	1367,68		Asbestoferrite_Measure_077	1479,52
Asbestoferrite_Measure_033	990,59		Asbestoferrite_Measure_078	353,58
Asbestoferrite_Measure_033	934,22		Asbestoferrite_Measure_078	194,27
Asbestoferrite_Measure_033	1343,32		Asbestoferrite_Measure_078	1966,84
Asbestoferrite_Measure_033	1133,82		Asbestoferrite_Measure_078	369,88
Asbestoferrite_Measure_033	1266,49		Asbestoferrite_Measure_078	755,54
Asbestoferrite_Measure_033	1325,64		Asbestoferrite_Measure_079	2070,83
Asbestoferrite_Measure_033	1295,95		Asbestoferrite_Measure_079	1435,01
Asbestoferrite_Measure_033	1319,40		Asbestoferrite_Measure_080	3596,96

Asbestoferrite, 6000x	Length (nm)			Length (nm)
Asbestoferrite_Measure_033	1222,90		Asbestoferrite_Measure_080	2473,62
Asbestoferrite_Measure_033	982,22		Asbestoferrite_Measure_080	4843,40
Asbestoferrite_Measure_033	2097,43		Asbestoferrite_Measure_080	1717,13
Asbestoferrite_Measure_033	1781,18		Asbestoferrite_Measure_080	739,76
Asbestoferrite_Measure_033	1469,93		Asbestoferrite_Measure_080	1448,91
Asbestoferrite_Measure_033	1321,18		Asbestoferrite_Measure_081	590,85
Asbestoferrite_Measure_034	1849,40		Asbestoferrite_Measure_081	1154,44
Asbestoferrite_Measure_034	1215,16		Asbestoferrite_Measure_083	695,38
Asbestoferrite_Measure_034	1174,70		Asbestoferrite_Measure_083	1206,40
Asbestoferrite_Measure_034	582,81		Asbestoferrite_Measure_085	3030,33
Asbestoferrite_Measure_034	590,85		Asbestoferrite_Measure_085	4952,24
Asbestoferrite_Measure_034	1507,95		Asbestoferrite_Measure_086	1381,41
Asbestoferrite_Measure_034	1518,08		Asbestoferrite_Measure_086	3274,27
Asbestoferrite_Measure_034	1001,25		Asbestoferrite_Measure_087	2778,99
Asbestoferrite_Measure_034	2060,55		Asbestoferrite_Measure_087	2236,22
Asbestoferrite_Measure_034	379,33		Asbestoferrite_Measure_088	3069,39
Asbestoferrite_Measure_034	801,00		Asbestoferrite_Measure_088	2506,77
Asbestoferrite_Measure_034	536,45		Asbestoferrite_Measure_088	1751,13
Asbestoferrite_Measure_035	1508,73		Asbestoferrite_Measure_089	868,81
Asbestoferrite_Measure_035	1214,19		Asbestoferrite_Measure_089	495,30
Asbestoferrite_Measure_035	3699,12		Asbestoferrite_Measure_090	584,83
Asbestoferrite_Measure_035	2624,45		Asbestoferrite_Measure_090	1354,68
Asbestoferrite_Measure_035	2603,25		Asbestoferrite_Measure_090	3120,83
Asbestoferrite_Measure_035	1460,27		Asbestoferrite_Measure_091	434,40
Asbestoferrite_Measure_036	4817,02		Asbestoferrite_Measure_091	1676,82
Asbestoferrite_Measure_036	2333,27		Asbestoferrite_Measure_091	1755,17
Asbestoferrite_Measure_036	1993,64		Asbestoferrite_Measure_091	722,01
Asbestoferrite_Measure_036	801,00		Asbestoferrite_Measure_092	1982,37
Asbestoferrite_Measure_036	3810,01		Asbestoferrite_Measure_092	982,22
Asbestoferrite_Measure_036	1996,60		Asbestoferrite_Measure_092	1086,01
Asbestoferrite_Measure_036	516,28		Asbestoferrite_Measure_092	2639,24
Asbestoferrite_Measure_036	1659,85		Asbestoferrite_Measure_096	1218,07
Asbestoferrite_Measure_036	3610,05		Asbestoferrite_Measure_096	892,91
Asbestoferrite_Measure_036	1072,90		Asbestoferrite_Measure_096	1676,82
Asbestoferrite_Measure_036	1295,95		Asbestoferrite_Measure_096	291,41
Asbestoferrite_Measure_036	1363,36		Asbestoferrite_Measure_096	543,00
Asbestoferrite_Measure_036	707,16		Asbestoferrite_Measure_096	790,62
Asbestoferrite_Measure_036	3475,90		Asbestoferrite_Measure_096	690,28
Asbestoferrite_Measure_039	801,00		Asbestoferrite_Measure_097	728,52
Asbestoferrite_Measure_039	3545,77		Asbestoferrite_Measure_097	790,62
Asbestoferrite_Measure_039	1506,38		Asbestoferrite_Measure_097	2705,88
Asbestoferrite_Measure_039	783,13		Asbestoferrite_Measure_097	874,22
Asbestoferrite_Measure_039	339,97		Asbestoferrite_Measure_097	553,76
Asbestoferrite_Measure_039	1030,28		Asbestoferrite_Measure_097	767,92
Asbestoferrite_Measure_040	2672,55		Asbestoferrite_Measure_099	860,62
Asbestoferrite_Measure_040	767,92		Asbestoferrite_Measure_099	730,13

Asbestoferrite, 6000x	Length (nm)			Length (nm)
Asbestoferrite_Measure_040	695,38		Asbestoferrite_Measure_099	633,25
Asbestoferrite_Measure_040	848,20		Asbestoferrite_Measure_099	485,68
Asbestoferrite_Measure_041	827,08		Asbestoferrite_Measure_099	707,16
Asbestoferrite_Measure_041	1609,34		Asbestoferrite_Measure_051	2581,87
Asbestoferrite_Measure_041	1429,24		Asbestoferrite_Measure_051	1029,13
Asbestoferrite_Measure_041	523,09		Asbestoferrite_Measure_051	1543,51
Asbestoferrite_Measure_041	586,85		Asbestoferrite_Measure_051	1367,68
Asbestoferrite_Measure_044	536,45		Asbestoferrite_Measure_051	388,54
Asbestoferrite_Measure_044	3663,24		Asbestoferrite_Measure_051	1921,34
Asbestoferrite_Measure_045	730,13		Asbestoferrite_Measure_051	1797,66
Asbestoferrite_Measure_045	343,43		Asbestoferrite_Measure_051	2102,48
Asbestoferrite_Measure_046	500,04		Asbestoferrite_Measure_051	1311,33
Asbestoferrite_Measure_046	485,68		Asbestoferrite_Measure_051	2124,25
Asbestoferrite_Measure_046	1321,18		Asbestoferrite_Measure_051	874,22
Asbestoferrite_Measure_046	3734,98		Asbestoferrite_Measure_051	827,08
Asbestoferrite_Measure_046	2339,33		Asbestoferrite_Measure_051	1896,63
Asbestoferrite_Measure_047	848,20		Asbestoferrite_Measure_051	681,68
Asbestoferrite_Measure_047	3274,27		Asbestoferrite_Measure_051	647,97
Asbestoferrite_Measure_047	3963,55		Asbestoferrite_Measure_051	921,51
Asbestoferrite_Measure_047	434,40		Asbestoferrite_Measure_051	1791,09
Asbestoferrite_Measure_047	4537,90		Asbestoferrite_Measure_051	1676,82

Asbestoferrite – Tabella diametri misurati e contati in nanometri

Tabella diametri epsomite

Epsomite 3000x	Length (micron)		Length (micron)		Length (micron)		Length (micron)
Measure_002	4,080843	Measure_020	2,78323	Measure_042	4,591125	Measure_054	10,1807
Measure_002	6,038823	Measure_020	1,91581	Measure_042	5,880504	Measure_055	20,5234
Measure_002	5,39517	Measure_020	3,132523	Measure_042	6,858199	Measure_055	3,04237
Measure_002	5,282058	Measure_020	6,457861	Measure_042	2,622656	Measure_056	10,84485
Measure_003	9,079952	Measure_020	4,172302	Measure_042	1,913345	Measure_056	21,8641
Measure_003	7,38804	Measure_021	6,820261	Measure_042	2,145791	Measure_056	5,357438
Measure_003	6,064548	Measure_022	8,606218	Measure_042	4,004995	Measure_057	2,928596
Measure_003	9,441641	Measure_022	2,796757	Measure_042	8,50864	Measure_058	10,42612
Measure_003	7,849358	Measure_023	14,04841	Measure_043	2,914062	Measure_058	2,351399
Measure_004	5,461221	Measure_024	23,72372	Measure_043	5,256991	Measure_058	14,5991
Measure_004	4,194855	Measure_025	11,81703	Measure_043	3,651309	Measure_058	7,211608
Measure_004	5,374143	Measure_025	10,7272	Measure_043	3,412205	Measure_059	9,754735
Measure_005	5,841869	Measure_026	12,00595	Measure_043	6,764698	Measure_059	10,21077
Measure_005	6,122613	Measure_026	17,78533	Measure_043	7,566592	Measure_059	4,397992
Measure_005	7,352194	Measure_026	8,80081	Measure_044	2,236225	Measure_059	6,995098
Measure_005	2,954258	Measure_027	8,38971	Measure_044	2,002498	Measure_059	11,61895
Measure_007	7,445921	Measure_027	9,77213	Measure_044	7,029409	Measure_060	4,184721
Measure_008	2,686632	Measure_027	4,301464	Measure_045	5,2534	Measure_060	5,657251
Measure_009	3,686029	Measure_027	5,18834	Measure_046	4,040179	Measure_060	8,049941
Measure_010	3,928884	Measure_028	8,247362	Measure_046	4,085465	Measure_060	7,220108
Measure_011	14,06083	Measure_028	8,244501	Measure_046	4,349454	Measure_060	5,777719
Measure_011	9,818366	Measure_028	7,579674	Measure_046	1,966842	Measure_060	10,71928
Measure_012	5,777719	Measure_029	7,91579	Measure_047	5,481914	Measure_060	8,40151
Measure_013	6,629447	Measure_029	6,614486	Measure_047	8,244501	Measure_061	3,563806
Measure_013	2,698896	Measure_029	8,992241	Measure_047	4,687727	Measure_061	3,050665
Measure_013	5,173771	Measure_029	14,68384	Measure_048	6,025527	Measure_062	7,300034
Measure_013	3,022144	Measure_029	9,229397	Measure_048	2,092361	Measure_062	10,51981
Measure_013	6,11336	Measure_030	3,651309	Measure_048	5,641385	Measure_062	11,90335
Measure_013	3,322542	Measure_031	12,37895	Measure_048	2,914062	Measure_062	2,021257
Measure_014	17,80018	Measure_032	9,584464	Measure_048	6,04585	Measure_063	6,534116
Measure_014	3,599257	Measure_032	17,1347	Measure_049	4,908943	Measure_063	4,481933
Measure_014	8,495878	Measure_032	17,9753	Measure_049	4,52801	Measure_063	2,761107
Measure_015	6,151057	Measure_032	5,53757	Measure_049	4,798135	Measure_063	2,51991
Measure_015	4,275061	Measure_033	17,48572	Measure_049	8,049941	Measure_063	10,10815
Measure_015	3,605804	Measure_034	8,862774	Measure_049	7,270246	Measure_063	5,864437
Measure_016	12,53047	Measure_035	9,272743	Measure_050	6,777935	Measure_064	3,22893
Measure_016	16,23208	Measure_036	6,899349	Measure_050	5,880504	Measure_064	2,349392
Measure_018	5,704586	Measure_037	4,995631	Measure_050	3,933684	Measure_064	3,132523
Measure_018	13,32562	Measure_038	6,388084	Measure_050	3,915653	Measure_064	9,079432
Measure_019	7,949688	Measure_038	3,993198	Measure_050	4,449183	Measure_064	3,048566
Measure_019	6,302583	Measure_039	15,64966	Measure_051	4,783364	Measure_064	2,219284
Measure_020	10,59845	Measure_040	16,3199	Measure_052	6,332453	Measure_064	2,856838
Measure_020	3,434255	Measure_040	2,389215	Measure_053	4,798135	Measure_065	1,517303
Measure_020	1,56927	Measure_040	2,457353	Measure_053	3,996741		
Measure_020	2,823618	Measure_041	17,65969	Measure_054	8,272492		

Epsomite – Tabella diametri misurati e contati in micron

Tabella diametri silicato

Silicato 16000x	Length (nm)		Length (nm)		Length (nm)		Length (nm)
1	5039	20	4964	39	2607	58	12503
2	4474	21	7538	40	5650	59	11822
3	613	22	5807	41	12551	60	3312
4	509	23	4161	42	11330	61	4659
5	6262	24	7718	43	5131	62	10616
6	5054	25	7387	44	20363	63	5723
7	13276	26	8465	45	3743	64	11514
8	8839	27	10079	46	7264	65	16501
9	10701	28	10300	47	2795	66	12745
10	16474	29	10579	48	6168	67	2210
11	49226	30	2741	49	8222	68	7274
12	4255	31	36747	50	4786	69	4333
13	2132	32	2636	51	18097	70	6917
14	969	33	1976	52	8149	71	12471
15	10776	34	11046	53	2023	72	8342
16	24539	35	36248	54	5970	73	4794
17	9922	36	6857	55	7486		
18	12650	37	8948	56	26566		
19	11718	38	4372	57	5590		

Silicato – Tabella DMGOPL diametri misurati e contati in nanometri

Tabella diametri tremolite

Diametro	Misura (micron)	Diametro	Misura (micron)	Diametro	Misura (micron)	Diametro	Misura (micron)
1	1,168	36	0,859	71	0,831	106	1,453
2	0,660	37	0,684	72	0,279	107	0,610
3	0,634	38	0,422	73	0,376	108	0,771
4	0,444	39	0,598	74	0,399	109	0,495
5	1,267	40	0,522	75	0,629	110	0,836
6	0,650	41	0,355	76	0,542	111	0,733
7	0,685	42	0,274	77	0,444	112	0,464
8	0,822	43	0,748	78	0,749	113	1,083
9	0,444	44	0,509	79	0,564	114	0,563
10	0,745	45	3,679	80	1,081	115	0,596
11	0,679	46	0,667	81	0,448	116	0,852
12	0,673	47	0,666	82	0,641	117	0,786
13	1,097	48	0,752	83	0,644	118	0,497
14	0,816	49	0,684	84	0,502	119	0,567
15	0,620	50	0,748	85	0,558	120	0,616
16	0,753	51	0,386	86	0,399	121	0,724
17	0,359	52	0,998	87	0,912	122	0,724
18	1,110	53	0,666	88	0,363	123	0,767
19	0,786	54	0,554	89	0,424	124	0,712
20	0,620	55	0,511	90	0,456	125	0,572

Diametro	Misura (micron)	Diametro	Misura (micron)	Diametro	Misura (micron)	Diametro	Misura (micron)
21	0,630	56	0,948	91	0,342	126	0,842
22	0,854	57	0,316	92	0,723	127	0,634
23	0,591	58	0,478	93	0,477	128	1,466
24	0,570	59	0,570	94	0,501	129	0,980
25	0,621	60	1,268	95	0,723	130	1,032
26	0,713	61	0,96	96	0,419	131	0,991
27	0,656	62	0,352	97	0,434	132	0,550
28	0,556	63	0,478	98	0,762	133	0,459
29	0,547	64	0,376	99	2,553		
30	0,558	65	0,507	100	0,915		
31	0,832	66	0,529	101	0,953		
32	0,691	67	1,615	102	1,415		
33	4,009	68	0,474	103	0,766		
34	1,525	69	0,434	104	0,815		
35	1,275	70	0,474	105	1,581		
						MEDIA	0,757±0,499

Tremolite - tabella diametri misurati e contati in micron

Tabella diametri amosite

	Length (micron)		Length (micron)		Length (micron)		Length (micron)		Length (micron)		Length (micron)		Length (micron)
1	1,419	41	2,019	81	0,409	121	0,620	161	0,472	201	0,557	241	0,314
2	0,568	42	2,127	82	1,808	122	0,485	162	1,044	202	0,299	242	0,915
3	0,554	43	0,424	83	0,400	123	0,337	163	0,599	203	0,566	243	0,839
4	0,674	44	0,392	84	0,316	124	0,196	164	1,372	204	0,196	244	0,285
5	0,718	45	0,239	85	0,545	125	0,496	165	0,472	205	0,671	245	0,805
6	0,572	46	0,211	86	0,720	126	0,620	166	0,457	206	0,337	246	0,511
7	1,633	47	1,672	87	0,781	127	2,291	167	2,031	207	0,370	247	0,961
8	0,764	48	0,422	88	0,392	128	0,980	168	1,875	208	0,251	248	0,667
9	0,426	49	0,677	89	0,961	129	0,583	169	0,877	209	0,306	249	2,478
10	0,825	50	0,355	90	0,251	130	0,555	170	1,886	210	0,526	250	0,613
11	0,150	51	0,222	91	0,943	131	0,634	171	0,896	211	2,119	251	0,583
12	1,031	52	0,613	92	0,698	132	0,599	172	0,955	212	2,218	252	0,511
13	0,305	53	0,827	93	1,153	133	1,109	173	2,092	213	0,620	253	0,860
14	0,368	54	0,838	94	0,653	134	0,471	174	0,392	214	0,613	254	0,477
15	0,305	55	0,511	95	0,355	135	0,157	175	0,316	215	1,855	255	0,459
16	0,377	56	0,695	96	0,283	136	0,355	176	0,824	216	0,871	256	0,447
17	0,341	57	0,355	97	0,175	137	0,275	177	1,143	217	0,629	257	0,316
18	0,510	58	0,533	98	0,337	138	0,299	178	0,392	218	2,141	258	0,561
19	0,460	59	0,894	99	0,316	139	0,533	179	0,571	219	0,431	259	0,955
20	0,368	60	0,510	100	0,422	140	0,088	180	0,969	220	0,694	260	0,749
21	0,181	61	0,533	101	0,675	141	0,583	181	0,832	221	0,510	261	1,137
22	1,098	62	0,561	102	0,362	142	0,969	182	0,923	222	0,370	262	1,077

	Length (micron)		Length (micron)		Length (micron)		Length (micron)		Length (micron)		Length (micron)		Length (micron)
23	0,544	63	0,918	103	1,038	143	0,285	183	0,754	223	0,998	263	0,737
24	0,516	64	0,472	104	1,355	144	1,621	184	0,141	224	0,316	264	2,322
25	1,271	65	0,832	105	1,032	145	0,510	185	0,400	225	0,438	265	0,370
26	0,676	66	0,526	106	0,949	146	1,554	186	1,468	226	0,588	266	0,392
27	1,015	67	1,665	107	0,333	147	0,306	187	0,881	227	0,511	267	0,392
28	1,742	68	1,703	108	0,299	148	0,229	188	0,424	228	0,372	268	0,943
29	0,746	69	1,062	109	1,396	149	0,355	189	0,980	229	1,110	269	0,555
30	1,080	70	0,632	110	1,349	150	0,392	190	0,351	230	1,332	270	0,316
31	0,452	71	1,686	111	0,392	151	0,754	191	0,831	231	0,638	271	4,908
32	2,648	72	1,617	112	0,935	152	1,208	192	1,545	232	0,757	272	1,936
33	1,422	73	0,590	113	0,557	153	1,090	193	1,070	233	0,372	273	0,229
34	0,637	74	1,166	114	0,337	154	0,546	194	0,299	234	1,417	274	6,707
35	0,559	75	0,588	115	0,417	155	0,409	195	0,516	235	0,078	275	0,949
36	0,548	76	0,721	116	1,101	156	0,675	196	0,546	236	0,251	276	3,246
37	0,500	77	0,915	117	1,883	157	0,647	197	0,157	237	0,447	277	0,561
38	0,483	78	0,720	118	1,727	158	3,074	198	0,516	238	0,620		
39	0,452	79	0,599	119	0,511	159	0,671	199	1,000	239	0,316		
40	1,275	80	1,309	120	0,316	160	0,716	200	0,526	240	0,479		

Amosite – Tabella diametri misurati e contati in micron

BIBLIOGRAFIA

- Baris, et al. (1978) An outbreak of pleural mesothelioma and chronic fibrosing pleurisy in the village of Karain/Urgüp in Anatolia. *Thorax* 33: 181-192.
- Borm PJA, Robbins D, Haubold S, Kuhlbusch T, Fissan H, Donaldson K, Schins R, Stone V, Kreyling W, Lademann J, Krutmann J, Warheit D, Oberdorster E. *The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC*. Particle and Fibre Toxicology 2006. 3:11.
- G. Burdett and G. Revell. Development of a standard method to measure the length-weighted geometric mean fibre diameter: Results of the Second inter-laboratory exchange. IR/L/MF/94/07. Project R42.75 HPD. Health and Safety Executive. Research and Laboratory Services Division. 1994.
- Cangiotti et al. (2017) Electron paramagnetic resonance and transmission electron microscopy study of the interactions between asbestiform zeolite fibers and model membranes. *J Toxicol Environ Health A*. 80(3):171-187; Cangiotti et al. (2018) EPR, TEM and cell viability study of asbestiform zeolite fibers in cell. *Colloids Surf B Biointerfaces*.
- Cangiotti et al. (2018) EPR, TEM and cell viability study of asbestiform zeolite fibers in cell. *Colloids Surf B Biointerfaces*.
- Cavariani et al. (2010); *Italian Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 2010 (1)
- Chithrani BD e Chan WC. *Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes*. *Nano letters* 2007 7: 1542-1550.
- Coffin et al., (1992) Relative mesothelioma induction in rats by mineral fibers: comparison with residual pulmonary mineral fiber number and epidemiology. *Inhal. Toxicol.* 4: 273-300.
- Dailey LA, Jekel N, Fink L, Gessler T, Schmehl T, Wittmar M, Kissel T, Seeger W. *Investigation of the proinflammatory potential of biodegradable nanoparticle drug delivery systems in the lung*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2006 215: 100-108.
- Dini L, Panzarini E, Mariano S, Passeri D, Reggente M, Rossi M, e Vergallo C. *Microscopies at the Nanoscale for Nano-Scale Drug Delivery Systems*. *Current drug targets* 2015 16: 1512-1530.
- Decreto Ministeriale 6/9/94: 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. (094A5917) (GU Serie Generale n.220 del 20-09-1994 - Suppl. Ordinario n. 129)
- Dogan and Dogan (2008) Re-evaluation and re-classification of erionite series minerals *Environ Geochem Health* 30:355–366
- Dodson et al. (2003) Asbestos Fiber Length as Related to Potential Pathogenicity. *Am. J. Ind. Medicine* 44:291-297
- Phd Tesi Fiorentino: Dott.ssa Ilaria Fiorentino “Effetti delle Nanoparticelle su differenti sistemi biologici”, XXV Ciclo – Università degli studi di Napoli Federico II

- Phd Tesi Giordani: Dr Matteo Giordani “Mineralogical study of the fibrous zeolites erionite and offretite and hazard assessment”, XXIX Ciclo – Università degli studi di Urbino Carlo Bo
- Foged C, Brodin B, Frokjaer S., Sundblad A. *Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in a vitro model*. Int J Pharm 2005 298:315-22.
- Geiser M, Rothen-Rutishauser B, Kapp N, Schürch S, Kreyling W, Schulz H, Semmler M, Im Hof V, Heyder J, Gehr P. *Ultrafine Particles Cross Cellular Membranes by Nonphagocytic Mechanisms in Lungs and in Cultured Cells*. Environ Health Perspect 2005 113: 1555-60.
- Geiser M, Kreyling WG. *Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles*. Part Fibre Toxicol 2007 7:2.
- M. Giordani et al. (2016) Potential carcinogenic erionite from Lessini Mounts, NE Italy: Morphological, mineralogical and chemical characterization, J Toxicol Environ Health, Part A, 79:18, 808-824, DOI: 10.1080/15287394.2016.1182453.
- Godbey WT, Wu KK, Mikos AG. *Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery*. Proc Natl Acad Sci 1999 96:5177-81.
- Gupta AK, Gupta M. *Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications*. Biomaterials 2005 26: 3995–4021.
- Hoet PHM, Bruske-Hohlfeld I, Salata OV. *Nanoparticles – known and unknown health risks*. Journal of Nanobiotechnology 2004 2: 12.
- IARC Monographs (2012) Vol. 100C Erionite.
- ISO 14966:2002(E) Ambiente air – Determination of numerical concentration of inorganic fibrous particles – SEM.
- ISO 16700: 2016 “Microbeam analysis — Scanning electron microscopy — Guidelines for calibrating image magnification”
- Jin H, Heller DA, Sharma R, Strano MS. *Size-dependent cellular uptake and expulsion of single-walled carbon nanotubes: single particle tracking and a generic uptake model for nanoparticles*. ACS Nano 2009 27: 149-58.
- Katsumata, Y., Inoue, K., & Shimamura, K. Y. (1998). A study for effects on pre- and postnatal development, including maternal function in rats treated subcutaneously with magnesium sulfate J. Toxicology Science, 23, 67–79.
- Kim J S, Yoon TJ, Yu KN, Noh MS, Woo M, Kim BG, Lee KH, Sohn BH, Park SB, Lee JK. *Cellular uptake of magnetic nanoparticles is mediated through energydependent endocytosis in A549 cells*. J Vet Sci 2006 7: 321–326.
- Millakua et al. (2013) Use of scanning electron microscopy to monitor nanofibre/cell interaction in digestive epithelial cells. J of Hazardous Mat. 260 (2013) 47-52
- Roser M, Fischer D, Kissel T. *Surface-modified-biodegradable albumin nano- and microspheres II: effects of surface charges on in vitro phagocytosis and biodistribution in rats*. Eur J Pharm Biopharm 1998 46: 255-63.
- A. Molina et al (2012) Effect of Calcium and Magnesium on Phosphatidylserine Membranes: Experiments and All-Atomic Simulations (Biophysical Journal Volume 102 May 2012 2095–210);

- Nel A, Xia T, Madler L, Li N. *Toxic potential of materials at the nanolevel*. Science 2006, 311:622.
- Oberdörster G, Ferin J, Lehnert BE. *Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury*. Environ Health Perspect 1994 102 5:173-9.
- Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. *Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles*. Environ Health Perspect 2005 113: 823-839.
- Oura K, Lifshits VG, Saranin AA, Zotov AV, Katayama M. *Surface Science – An Introduction*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2003.
- Pres. Cons. Ministri, Rep. Atti n. 211/CSR del 10/11/2016, Le Fibre Artificiali Vetrose (FAV) - Linee guida per l'applicazione della normativa inerente ai rischi di esposizioni e le misure di prevenzione per la tutela della salute.
- Regolamento CE n. 1272/2008 (CLP) relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele.
- Shin JS e Abraham SN. *Caveolae-not just craters in the cellular landscape*. Science 2007 293:1447-8.
- Singh S, Nalwa HS. *Nanotechnology and health safety: toxicity and risk assessments of nanostructured materials on human health*. J Nanosci Nanotechnol 2007 7: 3048-70.
- Swanson JA e Watts C. *Macropinocytosis*. Trends Cell Biol 1995 5: 424-8.
- Takei K e Haucke V. *Clathrin-mediated endocytosis: membrane factors pull the trigger*. Trends Cell Biol 2001 11: 385-91.
- Yuan Xia, Agula Bo, Zhiyue Liu, Baofeng Chi, Zhuang Su, Yueling Hu, Ru Luo, Xiong Su & Juan Sun (2016) Effects of magnesium sulfate on apoptosis in cultured human gastric epithelial cells, Food and Agricultural Immunology, 27:2, 171-181, DOI: 10.1080/09540105.2015.1079596
- Zhang et al. (2012) Macrophages in Tumor Microenvironments and the Progression of Tumors. Clinical and Developmental Immunology Col. 2012, Article ID 948098.