



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

Scuola di
Scienze Matematiche
Fisiche e Naturali

Corso di Laurea in Chimica
Curriculum Scienze Chimiche

Studio EPR di campioni di tessuto polmonare contenente SLC

EPR study of SLC in lung tissues

Relatore

Prof. Francesco Di Benedetto

Correlatore

Prof. Massimo Innocenti

Candidato

Benedetta Ciuffi

INDICE

Introduzione	3
Capitolo 1 <i>Silice: cause di tossicità e patologie correlate</i>	5
1.1 La Silice	5
1.2 Cause di tossicità delle polveri minerali	7
1.3 Malattie causate dall'inalazione di particelle di SLC	10
1.4 Normative previste	16
Capitolo 2 <i>Principi Spettroscopia Paramagnetica Elettronica</i>	17
2.1 Le proprietà magnetiche dell'elettrone	17
2.2 Effetto Zeeman	18
2.3 Interazione radiazione-materia	20
2.4 Interazione iperfine	20
2.5 Interazione spin-orbita	22
2.6 Struttura fine	24
2.7 Spettro EPR	26
2.8 Spettri EPR su polveri	27
Capitolo 3 <i>Principi di Spettroscopia EPR Impulsata.</i>	28
3.1 Il vettore magnetizzazione	28
3.2 Impulso Singolo	30
3.3 Sequenza a due impulsi	31
3.4 Sequenza a tre impulsi	33
3.5 Spettroscopie basate sull'impiego di sequenze di impulsi	34

Capitolo 4 <i>Metodi EPR e parte sperimentale</i>	36
4.1 Descrizione dei campioni	36
4.2 Spettrometro EPR	36
4.3 Registrazione di spettri EPR in onda continua a temperatura ambiente	38
4.4 Registrazione di spettri EPR in onda continua a 35 K	39
4.5 Registrazione di spettri EPR impulsati	39
Capitolo 5 <i>Risultati sperimentali</i>	40
5.1 Spettri EPR in onda continua	40
5.2 Spettri EPR impulsati	47
Capitolo 6 <i>Discussione</i>	53
6.1 Ioni di metalli di transizione	53
6.1.1 Fe(III) in intorno rombico	53
6.1.2 Fe(III) concentrato	54
6.1.3 Ione Cu(II)	59
6.2 Specie radicaliche	60
6.2.1 Attribuzione della specie B	61
6.2.2 Attribuzione della specie A	65
Capitolo 7 <i>Conclusioni</i>	71
Bibliografia	73

INTRODUZIONE

La silice, SiO_2 , è una delle sostanze chimiche più abbondanti in natura. La forma cristallina più comune è il quarzo, seguita dai polimorfi tridimite e cristobalite. La silice è inoltre componente di molte rocce di interesse industriale come graniti, marne, quarziti, sabbie (Coli e Tanini, 2010).

Già ai tempi dei Greci e dei Romani era noto che l'inalazione di polveri minerali fosse causa di gravi danni alla salute umana, in particolare Plinio fu il primo a suggerire l'utilizzo di dispositivi di protezione individuale per tutti i lavoratori soggetti all'inalazione di polveri (Fubini e Fenoglio, 2007).

Nel 1997 la IARC, International Agency for Research on Cancer (IARC, 1987) ha classificato la silice libera cristallina o SLC, nella forma quarzo e cristobalite, come cancerogeno certo per l'uomo, inserendola quindi nel gruppo 1. Questa data ha rappresentato un punto di rinnovato interesse scientifico e di riqualificazione delle responsabilità di prevenzione verso la SLC. Di seguito, si intenderà per SLC l'insieme di tutti i polimorfi della SiO_2 aventi struttura cristallina e presenti in natura.

Nel 2002 in Italia è stato fondato il NIS (Network Italiano Silice) i cui obiettivi sono: valutazione dell'esposizione professionale a silice libera cristallina, sorveglianza sanitaria e accertamenti diagnostici su lavoratori esposti (Giovanazzi, 2010).

Nonostante i numerosi studi sperimentali condotti sulla SLC, le caratteristiche di tossicità e i meccanismi di azione di quest'ultima non sono ancora stati completamente chiariti (Fubini e Fenoglio, 2007). La conoscenza dettagliata di questi aspetti non solo è importante per comprendere le cause di malattie ben note come silicosi e cancro al polmone, ma anche per sviluppare efficaci procedure di inattivazione di quest'ultima.

E' stato scientificamente acquisito (Fubini et al., 1990; Fubini e Fenoglio, 2007) che le caratteristiche chimico-fisiche delle particelle di polveri minerali, come forma, dimensioni, cristallinità, micromorfologia, solubilità in fluidi biologici e reattività superficiale, sono responsabili della loro tossicità.

Nello specifico, la reattività superficiale è legata sia a fattori intrinseci alla SLC (come la presenza di impurezze) sia a fattori ad essa estrinseci

(materiali ad essa associati, tipi di lavorazione, caratteristiche ambientali). Questi infatti possono causare alterazioni significative della superficie della stessa (Romanelli et al., 2010). Proprio per questo motivo nella valutazione finale sull'effetto cancerogeno della silice, il gruppo di lavoro della IARC sottolineò che non vi era la stessa evidenza di cancerogenicità in tutte le condizioni lavorative studiate.

E' stato supposto che la reattività dei radicali di superficie svolga un ruolo chiave nell'interazione con i macrofagi alveolari durante il processo di fagocitosi (Fubini et al., 1990).

L'obbiettivo di questa tesi è quello di comprendere la relazione che lega i principali fattori di reattività superficiale della SLC, come radicali inorganici della silice e ioni di metalli di transizione, con lo sviluppo di patologie ad essa associate. A tale scopo sono stati analizzati mediante spettroscopia di Risonanza Paramagnetica Elettronica (EPR), campioni di tessuto polmonare umano e polveri da esso estratte, prelevati da un paziente la cui ricostruzione dell'esposizione professionale ha individuato una importante esposizione occupazionale a SLC. Per i campioni si ringraziano la Prof. Elena Belluso e la Dr.ssa Silvana Capella, del Dipartimento di Scienze della Terra dell'Università di Torino.

La tecnica EPR attualmente è molto utilizzata in chimica delle radiazioni, biochimica, fisica dello stato solido, scienza dei materiali, medicina (Motoji, 1993) e vi si ricorre nello studio di radicali, di complessi dei metalli *d* e di radicali organici ed inorganici (Atkins, 1997). Grazie alla sua elevata selettività essa permette di caratterizzare le specie paramagnetiche presenti nei campioni analizzati.

CAPITOLO 1 SILICE: CAUSE DI TOSSICITA' E PATOLOGIE CORRELATE

1.1 LA SILICE

Il diossido di silicio, comunemente chiamato silice, è una delle sostanze minerali più comuni in natura, formata da silicio e ossigeno, i due elementi più abbondanti nella crosta terrestre (rispettivamente il 27% e il 46,6% in peso).

Il diossido di silicio si trova in natura in numerosi minerali cristallini (polimorfi) fra i quali il quarzo, la tridimite e la cristobalite; si trova inoltre in fasi amorphe, in fasi parzialmente idrate, in fasi semicristalline come l'agata e l'onice (Bertini et al., 2011).

In tutte le sue modificazioni cristalline, il diossido di silicio presenta una struttura costituita dalla ripetizione tridimensionale di una unità fondamentale: il tetraedro Si-O₄ (figura 1).

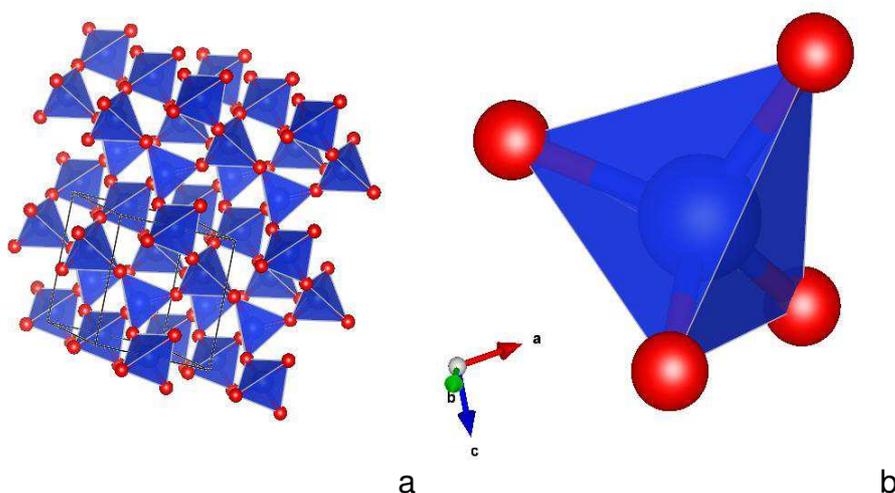


Figura 1 – a) L'unità strutturale fondamentale della silice, il tetraedro Si-O₄; gli atomi di Si sono illustrati in blu, quelli di O in rosso. b) Esempio di impalcatura tridimensionale dei tetraedri nella silice.

Ogni atomo di silicio coordina quattro atomi di ossigeno, i quali sono a loro volta legati a ponte tra due atomi di silicio in una struttura continua. I legami hanno un considerevole carattere ionico, dettato dalla differenza in

elettronegatività tra i due elementi. Le unità tetraedriche nel legarsi reciprocamente possono formare angoli Si-O-Si diversi e con diverse distanze di legame, dando luogo così a sostanze con strutture cristalline e proprietà fisiche differenti (Bertini et al., 2011). Le simmetrie delle forme cristallografiche e le temperature degli equilibri di interconversione per le varie forme polimorfe che sono stabili ad 1 atm (pressione ambiente), sono indicate in figura 2.

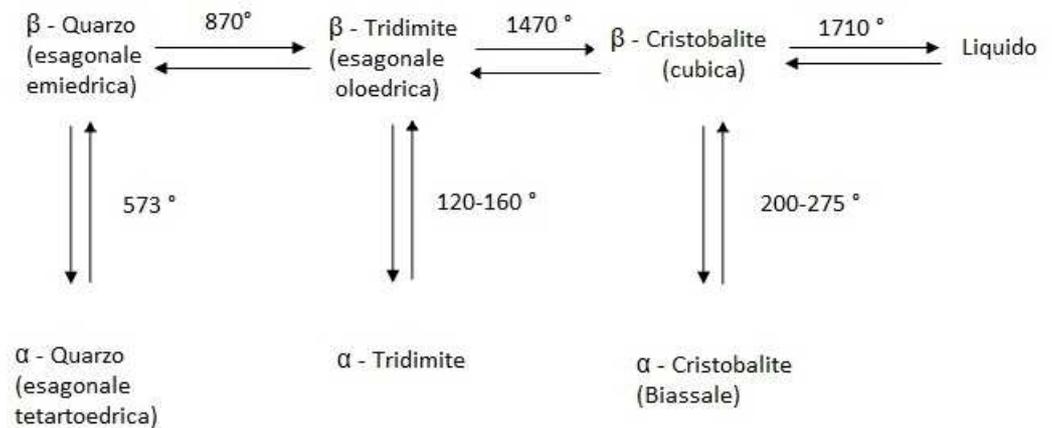


Figura 2 – Forme cristallografiche della silice stabili a 1 atm (Cotton e Wilkinson, 1968).

Il quarzo è la forma più comune di silice cristallina presente in natura, è stabile fino a 870°C, poi metastabile fino a fusione. Costituisce il componente primario di molte rocce vulcaniche (rioliti, porfido, andesiti ecc.), ignee (graniti, granodioriti ecc.), sedimentarie (arenarie, ciottolami, sabbie, silt, marne) e metamorfiche (anageniti, filladi, gneiss), (Coli e Tanini, 2010).

La tridimite e la cristobalite sono forme cristalline stabili a temperature più elevate (rispettivamente 870-1470°C, 1470-1710°C), sono più rare e compaiono nelle rocce di natura vulcanica, sedimentaria e metamorfica (Coli e Tanini, 2010).

In natura si trovano tutte e tre le forme polimorfe, anche se come forma il quarzo α è termodinamicamente stabile, mentre le altre sono metastabili. Ciò avviene perché l'interconversione tra tridimite, cristobalite e quarzo avviene mediante la rottura di legami, ed è pertanto cineticamente sfavorita (Carobbi,

1971). Al contrario, le interconversioni delle forme α e β per ogni tipo di struttura avvengono senza rottura di legame e di conseguenza sono rapide anche a temperature piuttosto basse (Cotton e Wilkinson, 1968).

1.2 CAUSE DI TOSSICITA' DELLE POLVERI MINERALI

La tossicità delle particelle di polvere minerale, come quelle di SLC, possono essere spiegate facendo riferimento a ben determinate proprietà fisiche o chimico-fisiche:

- *FORMA, CRISTALLINITA', MICROMORFOLOGIA*

La cristallinità costituisce un fattore determinante per la tossicità della silice, infatti la silice amorfa risulta causare pochi danni. Altri fattori come bordi taglienti, superfici fratturate, difetti di superficie e ioni con coordinazione incompleta sono inclusi nel termine “micromorfologia” e governano la reattività superficiale e quindi la tossicità di tutte le particelle minerali (Fubini e Fenoglio, 2007).

- *REATTIVITA' SUPERFICIALE*

Le superfici di solidi covalenti e ionici presentano siti, generati dall'interruzione della struttura bulk del minerale, che possono reagire con molecole biologiche.

Come evidenziato da Antonini e Hochstrasser nel 1972, un cristallo di quarzo appena rotto, deve “aggiustare” la sua superficie, in quanto cariche superficiali, legami “dangling” (cioè specie radicaliche) e ioni con sfera di coordinazione incompleta si sono generati dalla rottura dei legami silicio ossigeno in corrispondenza della superficie di frattura. Questa “ricostruzione” della superficie avviene in parte attraverso la formazione di ponti silossano distorti. Più in generale la ricostruzione della superficie del cristallo è assistita da reazioni chimiche con l'ambiente circostante, che quindi influenzerà la funzionalità della superficie finale.

Un ambiente ricco di ossigeno favorisce la formazione di ponti perossidici (Berestetskaya et al., 1980; Kolbanev et al., 1980) e di radicali ossigeno reattivi (Ratdzig e Bystrikov, 1978, Fubini et al., 1989a).

Quando la frantumazione del cristallo avviene in acqua pura è favorita l'idrossilazione mentre la formazione di radicali ossigeno è inibita. In una soluzione acquosa di perossido di idrogeno, la formazione di radicali ossigeno di vario tipo è maggiore rispetto a quanto avvenga in aria, (Fubini et al., 1989b,c; Giamello et al., 1990).

In un sistema biologico complesso, come nel fagolisosoma all'interno dei macrofagi, possono avvenire numerose reazioni redox che coinvolgono questi radicali, molte delle quali rilevanti per la patogenicità. Vari tipi di gruppi funzionali che possono essere presenti sulla superficie della silice, sono riportati in tabella 1.

• *SOLUBILITA' NEI FLUIDI BIOLOGICI*

Più a lungo le particelle rimangono inalterate in compartimenti biologici critici, causando stress alle cellule e ai tessuti, maggiore sarà l'estensione dei danni da esse causati. La solubilità nell'organismo è fortemente influenzata dalla complessa composizione dei fluidi incontrati dalle particelle: sono osservabili grandi differenze nei valori di pH, di forza ionica, di composizione e di contenuto di molecole organiche (per esempio proteine, amminoacidi, antiossidanti) fra il liquido intracellulare e quello extracellulare (Plumlee et al., 2006).

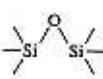
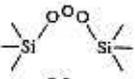
Functionalities at the Silica Surfaces			
Functionality		Origin	Reference
	silanols - isolated - geminal - H-bonded	surface hydration	Knözinger 1976
	dissociated silanols	silica aqueous suspensions	Nolan et al. 1976
	siloxane bridges	regular elimination of H ₂ O from two adjacent silanols by thermal treatment	Knözinger 1976
		distorted surface reconstruction after mechanical cleavage	Fubini et al. 1987
	peroxide bridges	mechanical grinding in presence of O ₂	Berestetskaya et al. 1980
	E' center	mechanical grinding homolytic cleavage	Antonini and Hochstrasser 1972
	radical	" "	" "
] surface charges	mechanical grinding heterolytic cleavage	Fubini et al. 1989
			
] surface charges	thermal treatment in vacuo above 873K	Morrow and Cody 1976
			
	peroxyradical	mechanical grinding in presence of O ₂	Ratdzig et al. 1978 Steinicke et al. 1982 Fubini et al. 1989
	superoxide radical	mechanical grinding in presence of O ₂ or H ₂ O ₂	Zav'yalov et al. 1984 Fubini et al. 1989 Giamello et al. 1990
	radical	mechanical grinding in presence of CO ₂	Ratdzig and Bystrikov (1978)

Tabella 1. Gruppi funzionali sulla superficie della silice (Fubini et al., 1990).

1.3 MALATTIE CAUSATE DALL'INALAZIONE DI PARTICELLE DI SLC

L'esposizione a Silice Libera Cristallina si verifica comunemente in alcuni settori lavorativi, quali: estrazione e lavorazione di materiali lapidei (Carneiro et al., 2017), estrazione in miniere di minerali metalliferi (Cairncross e Kisting, 2016), attività di sabbiatura (Akgün, 2016), industria metallurgica (Omidianidost et al., 2016), edilizia (Normohammadi et al., 2016), produzione di materiali da costruzione (Capacci et al., 2010), di vetro (Poli et al., 2010), ceramiche (Cioni e Cassinelli, 2010) e infine in agricoltura (Swanepoel et al., 2010).

Reports recenti indicano che oltre 33 milioni di lavoratori in Cina e in India, 3.3 milioni in Europa e 1.7 milioni negli Stati Uniti sono esposti a polveri di SLC. L'esposizione a SLC causa numerosi problemi di salute, come la silicosi, malattie cardiovascolari, tubercolosi, cancro al polmone, malattie autoimmuni, problemi renali e un incremento aspecifico della mortalità. Per questi motivi l'esposizione a SLC rappresenta una delle problematiche di maggiore priorità per la salute pubblica (Sataviani et al., 2016).

A seconda del loro diametro aerodinamico, le particelle di SLC inalate possono migrare dalle vie aeree superiori agli alveoli polmonari. Qui a seconda delle loro forma, dimensione, composizione chimica e caratteristiche superficiali, possono essere soggette a destini differenti. Le particelle possono danneggiare le cellule epiteliali di tipo 1, cioè quelle cellule di forma piatta che costituiscono la parete degli alveoli attraverso i quali avviene lo scambio gassoso. Le particelle possono anche innescare le difese immunitarie, dando luogo a segnali che vengono inviati ai macrofagi alveolari, cellule che si occupano di fagocitare e quindi di liberare l'organismo da eventuali sostanze estranee. Se il processo di fagocitosi non va a buon fine e i macrofagi attivati muoiono, questi rilasceranno nell'ambiente le particelle precedentemente incorporate e molte altre sostanze fra cui fattori coinvolti nel reclutamento di nuove cellule immuno-difesa (sia macrofagi alveolari sia leucociti polimorfo-nucleati). Si stabilisce così un ciclo continuo di reclutamento e morte cellulare, che da luogo a un processo infiammatorio che continua fino a quando la particella permane nel polmone. L'infiammazione è causata dalle sostanze rilasciate durante l'attivazione dei

macrofagi alveolari; tra di esse i ROS (Reactive Oxygen Species), citochine e fattori di crescita, che contribuiscono a danneggiare le cellule epiteliali circostanti e a stimolare la crescita anormale dei fibroblasti (Fubini e Fenoglio, 2007).

Silicosi

La silicosi, patologia irreversibile e incurabile, è una pneumoconiosi indotta da inalazione e deposizione di particelle di SLC con diametro inferiore ai 10 µm. È caratterizzata da una eccessiva proliferazione di fibroblasti e da una marcata deposizione di collagene a livello del tessuto polmonare fino a determinare una fibrosi. I macrofagi, che rappresentano la prima difesa dell'organismo contro la polvere silicea, giocano un ruolo cruciale per lo sviluppo della silicosi (Hamilton et al., 2008; Zhang et al., 2016).

I sintomi della silicosi compaiono soltanto dopo molti anni dall'esposizione (latenza) e consistono in senso di oppressione e dolore al torace, dispnea sia sotto sforzo sia a riposo, tosse secca, bronchite cronica, rumori bronchiali, enfisema polmonare, febbre, perdita di peso corporeo e problemi cardiaci. È stato osservato come il periodo di apparizione e la gravità della malattia varino in modo considerevole in funzione del livello di esposizione del soggetto a SLC, dell'attività biologica delle polveri, così come della presenza o meno di sostanze che ritardano la reazione tissutale. L'iter diagnostico per la silicosi inizia con una anamnesi lavorativa accurata, per ottenere informazioni relativamente al comparto industriale in cui il paziente ha prestato servizio, alle mansioni svolte e alla durata dell'attività lavorativa.

Tubercolosi

Esiste una stretta relazione tra Silicosi e Tubercolosi (Elkard et al., 2016; Barboza et al., 2008). L'accumulo di silice al livello del tessuto polmonare provoca una riduzione dell'efficienza delle difese cellulari polmonari; in tali condizioni i macrofagi non sono più una valida difesa contro i Micobatteri della TBC e di altre malattie micotiche quali Nocardia, Cryptococco. Anche nel caso della TBC, l'insorgenza della malattia può verificarsi a distanza di anni dalla fine dell'esposizione.

Malattie autoimmuni

L'attivazione del sistema immunitario dovuta all'esposizione a SLC costituisce la base del meccanismo patogenetico della silicosi e venne descritta da Vigliani già nel 1958 (Vigliani, 1958). Lo studio pubblicato da Lee S. et al. (2014), evidenzia come l'esposizione a SLC provochi lo sviluppo di diversi autoanticorpi specifici, alterazioni della CD95 / Fas e le sue molecole correlate, e determini una attivazione cronica delle cellule T responder e delle cellule T regolatorie. Numerose patologie autoimmuni quali la sclerodermia, il lupus eritematoso sistemico, l'artrite reumatoide, l'anemia emolitica autoimmune, le vasculiti e l'insufficienza renale cronica sono state messe in correlazione con l'esposizione a SLC.

Cancro al polmone

Già nel 1987 la IARC (International Agency for Research on Cancer) aveva classificato la silice come probabilmente cancerogena per l'uomo inserendola nel Gruppo 2A. Nel 1997, a seguito dell'analisi di ulteriore letteratura scientifica aggiuntasi nel frattempo, la IARC classificò la SLC, nella forma quarzo e cristobalite, come cancerogeno certo per l'uomo, inserendola quindi nel gruppo 1 (IARC, 1997). L'azione cancerogena della silice si esplica sul polmone. Il gruppo di lavoro della IARC sottolineò come l'evidenza di cancerogenicità non fosse stata rilevata in tutte le realtà industriali esaminate e fosse quindi da considerarsi prioritaria l'associazione meccanismo cancerogeno - attività industriale svolta. Quest'associazione poteva essere legata sia alle caratteristiche proprie della silice (caratteristiche chimico-fisiche o di superficie), sia a fattori esterni in grado di modificarne l'attività biologica o la distribuzione dei suoi polimorfi (IARC, 1997).

Nella review pubblicata da Donaldson e Borm (1998), gli autori hanno sottolineato come gli effetti biologici del quarzo possono essere spiegati in termini di reattività superficiale. Nello studio viene messa in evidenza la capacità del quarzo di generare radicali liberi e causare stress ossidativo e come questo fenomeno possa essere influenzato da una serie di altre sostanze che possono trovarsi sulla superficie del quarzo stesso, per esempio la presenza di altri minerali. La pericolosità legata all'esposizione al quarzo non ha un'entità costante, ma può variare notevolmente a seconda

della provenienza del campione di silice o in relazione al contatto di quest'ultimo con altri minerali o sostanze chimiche.

A seguito di questa seconda valutazione del 1997, sono emerse nella comunità scientifica ulteriori discussioni che hanno portato a nuovi studi, per definire le misure di prevenzione da applicare nei comparti lavorativi.

Gli aspetti considerati più controversi nella valutazione della cancerogenicità della SLC sono principalmente quattro:

- ✓ Possibile confondimento dei risultati ad opera del fumo;
- ✓ Possibile confondimento ad opera di altri cancerogeni occupazionali quali Radon e Arsenico nelle miniere, IPA nelle fonderie e nell'industria della ceramica;
- ✓ La relazione esposizione-risposta e la ricerca di una eventuale soglia di non cancerogenicità della silice;
- ✓ La valutazione del ruolo della silicosi nello sviluppo del tumore al polmone in seguito ad esposizione alla silice.

Il possibile confondimento da fumo è stato esaminato sia in studi caso-controllo che di coorte (Axelson, 1978; Simonato et al., 1988; Kriebel et al., 2004; Richiardi et al., 2005). Complessivamente questo effetto è risultato in genere modesto.

Studi pubblicati dopo il 1997 (Cassidy et al., 2007; McDonald et al., 2005; Pukkala et al., 2005; Chen et al., 2007; Preller et al., 2009), hanno messo in evidenza come il rischio di tumore al polmone legato all'esposizione a silice si evidenzi anche dopo aggiustamento per abitudine al fumo in fase di analisi.

Per quanto riguarda il possibile confondimento da altri cancerogeni occupazionali, è possibile che l'esposizione concomitante a SLC e altri cancerogeni impedisca di valutare gli effetti dei singoli agenti. Per risolvere questa problematica sono stati effettuati studi su lavoratori non esposti ad altri oncogeni occupazionali o per i quali le esposizioni erano improbabili. Inoltre sono state raccolte informazioni relativamente all'esposizione agli altri

cancerogeni occupazionali in modo da aggiustare le stime di rischio per silice in fase di analisi.

Per quanto riguarda la relazione dose-risposta rivestono particolare importanza tre studi condotti rispettivamente da Steenland et al. (2001), Cassidy et al. (2007) e di Lacasse et al. (2009). I tre studi pur basandosi in grandissima parte su dati indipendenti fra loro, riportano risultati estremamente coerenti e indicano un aumento del rischio di sviluppare un tumore polmonare all'aumentare dell'esposizione cumulativa a silice. Questa relazione diventa costante per livelli di esposizione cumulativa superiore ai 5 mg/m³ per anno. Questo tipo di relazione dose-risposta è stata descritta anche per altri cancerogeni noti (Stayner et al., 2003).

Gli studi hanno anche valutato se vi fossero elementi per stabilire l'esistenza di un effetto soglia sotto la quale l'esposizione a silice potesse essere considerata non cancerogena. Pur non essendo concordanti nei risultati tutti e tre gli studi affermano che una esposizione cumulativa di 4,5 mg/m³ per anno determina un aumento statisticamente significativo del rischio: dunque l'eventuale soglia di effetto si troverebbe a un livello molto più basso di quello a cui possono essere esposti i lavoratori, anche quando i limiti di esposizione vengono rispettati.

Infine riguardo il ruolo della silicosi nel determinare l'insorgenza del cancro del polmone è risultata una maggiore associazione tra i silicotici che tra i non silicotici (Kurihara e Wada, 2004; Smith et al., 1995; Steenland e Stayner, 1997).

Nel corso del dibattito si è cercato di comprendere se il tumore al polmone fosse causato dalla patologia silicotica in sé o se fosse dovuto al fatto che i livelli di esposizione a SLC dei silicotici sono in genere più alti di quelli dei lavoratori che non hanno sviluppato la malattia (Lacasse et al., 2009; Pelucchi et al., 2006; Brown e Rushton, 2005; Erren et al., 2009; Cole e Hernán, 2002). Nel 2012 la IARC, con una ulteriore valutazione (IARC, 2012) conferma la classificazione della SLC come cancerogeno certo per l'uomo. La principale differenza con la classificazione del 1997 è che non si fa più riferimento a specifici comparti professionali.

Oltre alla IARC diversi altri Enti si sono pronunciati sulla cancerogenicità della silice, fra i quali:

- ✓ il National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) statunitense, che nel Report dell'aprile 2002 concorda con le conclusioni della IARC e ricorda di aver raccomandato già nel 1989 (54 Fed. Reg. 2521) all' Occupational Safety and Health Administration (OSHA) di etichettare la silice cristallina come un potenziale cancerogeno.
- ✓ l'American Thorax Society, nel 1997, descrive, tra gli effetti avversi della silice cristallina, il tumore polmonare.
- ✓ la Commissione Tossicologica Nazionale, istituita presso il Centro Studi del Ministero della Sanità, nel verbale del 5 giugno 2001 alloca la silice al livello di cancerogenesi 1, sostenendo che l'esposizione a Silice Libera Cristallina è cancerogena per l'uomo.
- ✓ il Concise International Chemical Assessment Document (CICAD) N° 24 "Cristalline silica, quartz", sotto indicazione dell'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) e ILO (International Labour Organisation), mette in evidenza come gli effetti dell'esposizione a lungo termine o ripetuta alla silice, siano causa di silicosi e la sostanza viene definita come cancerogena per l'uomo.
- ✓ Il National Toxicology Program (NTP) nel nono rapporto del sottocomitato per i cancerogeni del 2000 definisce la silice come sostanza nota per essere cancerogena per l'uomo.

La silice cristallina non risulta classificata dall' Unione Europea (UE), come sostanza chimica pericolosa e può ricadere in regime di classificazione provvisoria all'atto della commercializzazione. Tuttavia la Comunità Europea ha sviluppato un' attività di controllo e di supporto tecnico e legale sulla questione sotto lo statuto giuridico dell'Accordo di Dialogo Sociale. Tale Accordo è il NEPSI (European Network for Silica), che vede coinvolte parti amministrative/politiche, parti sindacali, parti datoriali e copre alcuni milioni di lavoratori in tutto il continente (NEPSI, 2017).

1.4 NORMATIVE PREVISTE

Il NIOSH ha definito come Limite di Esposizione Permesso (PEL) per SLC 25 microgrammi su metro cubo, ma risulta molto difficile raggiungere una adeguata sensibilità analitica, qualora si effettui il campionamento con i tradizionali selettori in ambienti dove le concentrazioni sono dell'ordine del valore limite (Sciarra et al., 2010).

L'OSHA, fondata nel 1970 negli Stati Uniti, ha emesso una regola finale per limitare l'esposizione dei lavoratori a SLC respirabile. L'OSHA ha emesso due norme distinte: una per l'industria generale e marittima, l'altra per il settore delle costruzioni; queste si possono riassumere nei seguenti punti:

- Il PEL per SLC, viene ridotto a 50 microgrammi per metro cubo di aria (valore che risulta analiticamente misurabile) come media di un turno di otto ore.

- Ai datori di lavoro viene richiesto:
 - ✓ L'utilizzo di sistemi ingegneristici di controllo come acqua o ventilazione per limitare l'esposizione del lavoratore al PEL.
 - ✓ L'utilizzo di sistemi di protezione individuale quando i sistemi di controllo ingegneristici non sono sufficienti a limitare adeguatamente l'esposizione.
 - ✓ Limitare l'accesso dei lavoratori a zone ad alta esposizione.
 - ✓ Sviluppare un piano di controllo scritto dell'esposizione.
 - ✓ Offrire esami medici ai lavoratori altamente esposti, informarli relativamente ai rischi della silice e su come limitare l'esposizione.

CAPITOLO 2 PRINCIPI DI RISONANZA PARAMAGNETICA ELETTRONICA

La spettroscopia EPR (Electron Paramagnetic Resonance) o ESR (Electron Spin Resonance) è una tecnica basata su un effetto quantistico, previsto e verificato sperimentalmente da Zavoisky nel 1945 per ioni di metalli di transizione in sali.

Essa è utilizzata per individuare e analizzare centri paramagnetici, sistemi cioè che contengono uno o più elettroni spaiati, come radicali inorganici e organici, ioni di metalli di transizione e di terre rare.

La spettroscopia EPR si basa sull'effetto Zeeman elettronico, ovvero l'interazione che si viene a creare fra il momento magnetico di spin di un elettrone μ_e ed un campo magnetico omogeneo B applicato esternamente al campione.

2.1 LE PROPRIETA' MAGNETICHE DELL' ELETTRONE

Gli elettroni sono particelle dotate di massa e carica: in un atomo o in una molecola essi si muovono intorno al nucleo (o ai nuclei) in orbitali la cui energia e distribuzione spaziale può essere definita per mezzo della trattazione quantistica.

Il comportamento dell'elettrone su un orbitale può essere paragonato a quello di una carica puntiforme che ruota intorno ad un asse fisso: esso darà luogo a un momento magnetico lungo tale asse (Ayscough, 1967).

Secondo la trattazione classica il momento magnetico μ_L prodotto da una carica $-e$, con massa m , che si muove con velocità v lungo un percorso circolare di raggio r , è dato dall' equazione:

$$\mu_L = - \frac{e}{2mc} \cdot L \quad (1)$$

dove L è il momento angolare orbitale.

Il segno meno indica che il vettore momento magnetico è in verso opposto rispetto al vettore momento angolare.

L' elettrone possiede anche un momento angolare intrinseco, detto spin, assimilabile da un punto di vista figurativo al moto di rotazione intorno al proprio asse. Anche a questo moto di rotazione sarà associato un corrispondente momento magnetico:

$$\mu_e = - \frac{e}{mc} \cdot \mathbf{S} \quad (2)$$

dove \mathbf{S} è il vettore momento angolare di spin.

Da un punto di vista quantomeccanico, l'operatore momento magnetico di spin

μ_e viene definito come:

$$\hat{\mu}_e = -g_e \beta_e \hat{\mathbf{S}} \quad (3)$$

dove $\beta_e = \frac{eh}{4\pi mc} = 9,27 \cdot 10^{-24} \frac{\text{J}}{\text{T}}$ è una grandezza chiamata magnetone elettronico di Bohr;

$\hat{\mathbf{S}}$ è l'operatore momento angolare di spin dell'elettrone; g_e è un fattore di proporzionalità che trae origini da effetti relativistici e da interazioni fra l'elettrone e le fluttuazioni elettromagnetiche nel vuoto che circonda l'elettrone stesso (Atkins, 1997).

2.2 EFFETTO ZEEMAN

L'applicazione di un campo magnetico esterno B_0 ad un campione contenente sistemi con un elettrone spaiato induce la formazione di due popolazioni di elettroni spaiati: una con stato di spin α ad energia maggiore, e una con stato di spin β ad energia minore, come mostrato in figura 3.

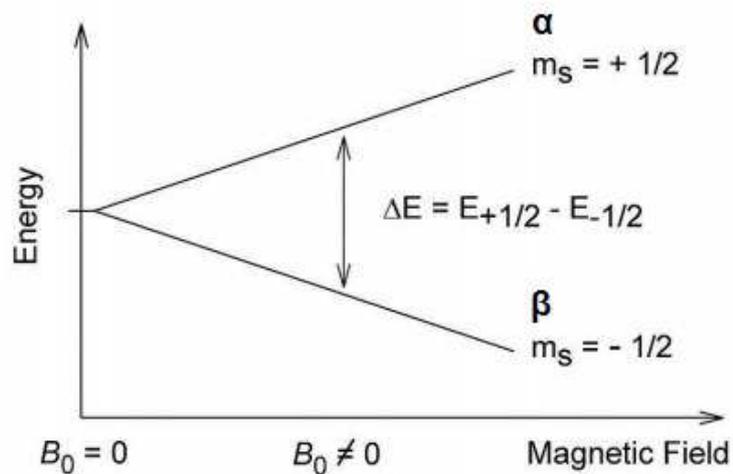


Figura 3 - Separazione dei livelli di spin elettronico, in seguito all'applicazione del campo magnetico B_0 .

Gli stati di spin α e β corrispondono rispettivamente ai due possibili valori assunti dalle componenti di \mathbf{S} lungo la direzione di B_z (stato α : $m_s = +1/2$; stato β : $m_s = -1/2$).

Lo stato β si presenta ad energia minore rispetto ad α perché il rapporto magnetogirico dell'elettrone è negativo (Atkins, 1997).

La differenza di energia fra questi due stati è proporzionale al campo magnetico applicato B_0 , in particolare, scegliendo la direzione z quale direzione del campo:

$$\Delta E = g_e \beta_e B_z \quad (4)$$

g_e è chiamata "fattore g " dell'elettrone o "fattore di separazione spettroscopica" ed è uguale a 2,0023 per l'elettrone libero, cioè in assenza di qualsiasi perturbazione esterna.

Nel caso in cui l'elettrone non sia "libero", g_e diventa una quantità tensoriale che dipende dall'orientamento del sistema di spin nel campo magnetico e dall'accoppiamento spin-orbita.

In un sistema a simmetria sferica o cubica l'interazione del momento magnetico di spin con un campo magnetico B_z è descritta dall'operatore hamiltoniano Zeeman:

$$\hat{H} = g_e \beta_e B_Z \hat{S}_Z \quad (5)$$

2.3 INTERAZIONE RADIAZIONE-MATERIA

La transizione fra i due stati di spin si ottiene applicando una radiazione di frequenza tale da soddisfare la condizione di risonanza:

$$\Delta E = h\nu = g_e \beta_e B_Z \quad (6)$$

dove ΔE è la differenza di energia fra i due stati di spin, h la costante di Planck e ν la

frequenza della radiazione che cade nel campo delle microonde. In regime di risonanza sussiste un forte accoppiamento tra gli spin elettronici e la radiazione e, mentre si verifica la transizione $\beta \rightarrow \alpha$, avviene un intenso assorbimento.

L'equazione (6) è valida per l'elettrone "libero", ma è scarsamente rappresentativa di sistemi reali contenenti elettroni spaiati.

Nei sistemi reali, infatti, il momento magnetico di spin dell'elettrone è soggetto anche ad altre interazioni quali: quella con il momento magnetico di spin del nucleo (interazione iperfine), o di nuclei vicini (interazione superiperfine), quella con il momento magnetico associato al suo moto orbitale (interazione spin-orbita), quella con i momenti magnetici di spin di altri elettroni appartenenti allo stesso atomo (interazione fine).

2.4 INTERAZIONE IPERFINE

Così come l'elettrone anche le particelle subnucleari hanno associate proprietà di spin.

E' quindi possibile definire un operatore hamiltoniano Zeeman nucleare:

$$\hat{H}_N = g_N \beta_N B_Z \hat{I}_Z \quad (7)$$

In cui \hat{I}_z è l'operatore di spin nucleare totale. Un nucleo con momento magnetico di spin diverso da zero, oltre ad interagire con il campo magnetico esterno, dà luogo a una interazione con il momento magnetico di spin dell'elettrone chiamata interazione iperfine. Alla base di questa interazione si hanno principalmente due meccanismi: l'interazione dipolo-dipolo e l'interazione di contatto.

L'interazione dipolo dipolo è la classica interazione fra due dipoli magnetici separati da una distanza r . I due dipoli sono associati rispettivamente al momento angolare di spin elettronico e a quello nucleare. Questa interazione ha carattere direzionale, poiché la sua intensità dipende dall'ampiezza dell'angolo compreso fra il raggio vettore (linea che unisce l'elettrone e il nucleo) e la direzione del campo magnetico esterno. Questa interazione è spesso chiamata interazione iperfine anisotropica.

La seconda forma di interazione è nota con il nome di interazione di contatto o di Fermi e non è di tipo classico. Essa dipende dalla presenza di densità elettronica sul nucleo e deve essere presa in considerazione soltanto per elettroni su orbitali s (o su orbitali che contengano, almeno parzialmente, il carattere s). Questo tipo di interazione è isotropica poiché non dipende dall'orientazione delle specie paramagnetiche rispetto al campo magnetico.

Il contributo isotropico all'interazione iperfine deve essere considerato sia se la specie paramagnetica si trova in un reticolo rigido o si muove rapidamente in un mezzo fluido, viceversa la componente anisotropica contribuisce solo in un sistema rigido ed è mediata a zero in soluzione.

L'interazione iperfine è descrivibile da un operatore Hamiltoniano di interazione elettrone-nucleo detto operatore di interazione iperfine. In prima approssimazione esso può esser scritto come:

$$\hat{H}_{SN} = A I_z S_z \quad (8)$$

Dove A è il tensore di accoppiamento iperfine dato dalla somma di due contributi:

$$A = aI + T \quad (9)$$

Nell'espressione 9, a è la costante di accoppiamento iperfine di contatto, che per rendere omogenea l'equazione dev'essere moltiplicata per la matrice identità I, e T è un tensore (rappresentabile attraverso una matrice 3x3), che tiene in considerazione l'interazione dipolare tra le componenti di \hat{I}_z e quelle di \hat{S}_z .

L'interazione iperfine si manifesta negli spettri EPR con la comparsa di più (2I+1) righe. La struttura iperfine dello spettro è altamente caratteristica, e in molti casi può essere messa in relazione alla distribuzione spaziale dell'elettrone spaiato nella specie paramagnetica.

2.5 INTERAZIONE SPIN-ORBITA

Quando l'elettrone si trova su un orbitale che non ha simmetria sferica, ha luogo l'interazione spin-orbita.

Il momento angolare di spin e il momento angolare orbitale dell'elettrone non sono più indipendenti; la loro interazione genera un'anisotropia nel momento magnetico risultante e quindi nei fattori g ed a.

L'Hamiltoniano di questa interazione ha la forma seguente:

$$\tilde{H}_{SO} = \lambda \tilde{L} \tilde{S} \quad (10)$$

dove λ è una costante che esprime la forza dell'accoppiamento ed \tilde{L} è l'operatore del momento angolare orbitale.

Un momento angolare orbitale non nullo porta ad un corrispondente momento magnetico μ_L . L'interazione Zeeman coinvolgerà quindi un momento magnetico totale, somma dei due momenti magnetici di spin e orbitale:

$$\tilde{H}_Z = B\beta_e (g\hat{S} + \hat{L}) \quad (11)$$

A causa della diversa proporzionalità esistente tra i due momenti angolari ed i corrispondenti momenti magnetici associati, il momento magnetico totale non risulta allineato né con il vettore momento magnetico di spin né, in modo antiparallelo, con il vettore momento angolare totale.

Possiamo esprimere l'Hamiltoniano relativo all'effetto Zeeman soltanto in funzione degli operatori del momento di spin, tenendo comunque in considerazione l'effetto che la presenza del momento magnetico orbitale comporta. Per fare questo introduciamo un tensore g , descritto da una matrice 3×3 , che esprime la proporzionalità tra ciascuna componente del momento angolare di spin e ciascuna componente del momento magnetico totale.

$$\begin{bmatrix} \tilde{\mu}_x \\ \tilde{\mu}_y \\ \tilde{\mu}_z \end{bmatrix} = \beta_e \begin{bmatrix} g_{xx} & g_{xy} & g_{xz} \\ g_{yx} & g_{yy} & g_{yz} \\ g_{zx} & g_{zy} & g_{zz} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \tilde{S}_x \\ \tilde{S}_y \\ \tilde{S}_z \end{bmatrix} \quad (12)$$

L'Hamiltoniano Zeeman assume quindi la forma:

$$\tilde{H}_Z = \beta_e B g \tilde{S} \quad (13)$$

L'accoppiamento spin-orbita non si osserva per tutte le specie paramagnetiche, ma, quando si verifica, fornisce utili informazioni che possono essere ricavate dai valori delle componenti di g . Le informazioni che possiamo ricavarne riguardano la simmetria dell'intorno, il carattere del legame tra il centro paramagnetico e gli ioni vicini e le energie degli orbitali coinvolti nell'accoppiamento. Esistono infatti delle relazioni fra i valori di g , la costante di accoppiamento spin-orbita λ e le energie che separano gli orbitali in campo cristallino: a partire dalla determinazione dei valori di g , in uno

spettro EPR è possibile valutare la simmetria del campo cristallino e la separazione energetica che esso induce fra gli orbitali d.

2.6 STRUTTURA FINE

Molti degli ioni dei metalli di transizione hanno più di un elettrone spaiato e nel loro stato fondamentale hanno numero quantico di Spin totale S maggiore di $1/2$.

In tal caso l'applicazione di un campo magnetico divide questi livelli energetici in $2S+1$ livelli magnetici. Possono essere indotte transizioni fra livelli energetici adiacenti, in accordo con la regola di selezione $\Delta M_S = \pm 1$, per mezzo di un campo oscillante perpendicolare al campo statico. In un sistema di questo tipo tutte le transizioni avvengono alla stessa frequenza e nello spettro comparirà una sola riga (figura 4a).

Ioni paramagnetici in cristalli sono soggetti a campi elettrostatici molto forti. Questi campi cristallini sono in grado di rimuovere la degenerazione fra i livelli di spin anche in assenza di un campo esterno, dando luogo a un fenomeno chiamato Zero - Field Splitting (ZFS). Questo fenomeno è illustrato in figura 4b per uno ione con spin totale $S=3/2$.

In questo caso transizioni tra livelli energetici adiacenti si verificano per diversi valori di campo magnetico a frequenza costante, o viceversa.

Tali transizioni multiple sono dette struttura fine. In generale queste non sono né equispaziate né di uguale intensità e la loro posizione relativa dipenderà dall'orientazione del cristallo nel campo magnetico. Questo perché i campi cristallini hanno essenzialmente natura anisotropa, essendo governati dalla simmetria del cristallo (Ayscough, 1967).

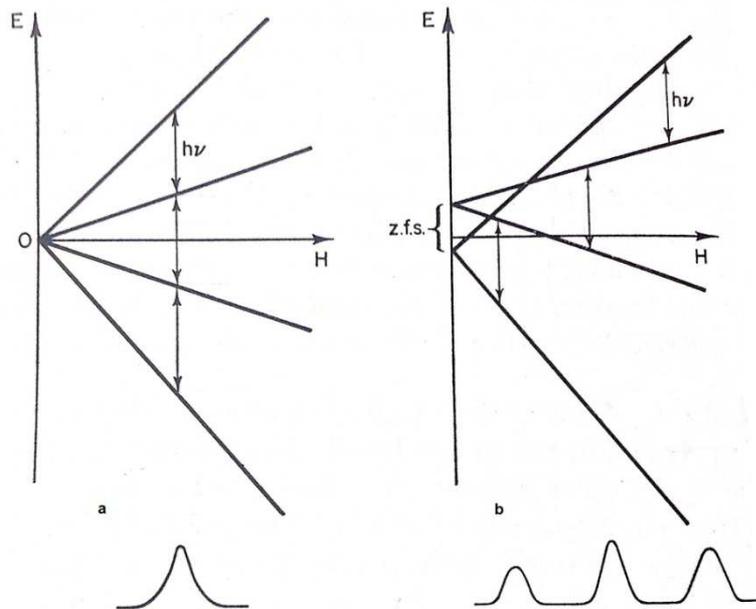


Figura 4 – Livelli energetici per un sistema con $S=3/2$. (a) Assenza di ZFS. Il sistema dà un solo picco di assorbimento. (b) Presenza di ZFS. Il sistema dà tre picchi che differiscono per spaziatura e intensità.

(Fonte: Ayscough, 1967).

Il corrispondente Hamiltoniano può essere espresso come:

$$H = D \left[S_z^2 - \frac{1}{3} S(S+1) \right] + E [S_x^2 - S_y^2] \quad (14)$$

dove S è il vettore di spin con componenti S_x, S_y, S_z . D ed E sono due parametri che rispettivamente descrivono la componente assiale (D) e quella trasversale (E) dell'interazione magnetica dipolo-dipolo. Le caratteristiche dello spettro dipendono fondamentalmente dal grado dello ZFS che riflette la deviazione del campo cristallino dello ione dall'ideale simmetria tetraedrica o ottaedrica per cui $D = E = 0$. Quando la simmetria è assiale $D \neq 0$ ed $E = 0$, mentre nel caso di simmetrie inferiori a quella assiale entrambi i valori differiscono da 0.

2.7 SPETTRO EPR

Lo spettro EPR si ottiene registrando l'assorbimento delle microonde al variare del campo magnetico Zeeman. Sia per motivi tecnologici che per migliorare l'identificabilità delle caratteristiche fini e iperfini, lo spettro viene registrato in derivata prima (figura 5).

Il picco di assorbimento corrisponde al punto in cui la derivata prima passa per lo zero. La larghezza di riga, espressa in termini di campo magnetico, viene misurata tra i punti di massimo e minimo della riga ed è dovuta a meccanismi di rilassamento termico che limitano il tempo di vita dell'elettrone in uno stato eccitato di spin. Questo allargamento, di tipo omogeneo, è descritto da una forma di riga Lorentziana.

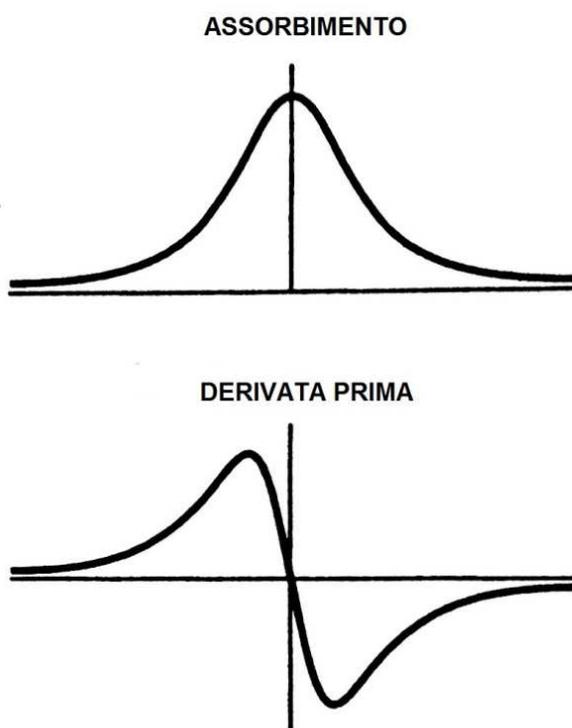


Figura 5 – Relazione fra una riga di assorbimento e la sua derivata prima.

2.8 SPETTRI EPR SU POLVERI

Molti materiali analizzati con spettroscopia EPR sono policristallini o polveri. Lo spettro EPR di un campione di polveri è analogo a quello di un vetro o di una soluzione congelata, a causa dell'orientazione casuale dei granuli di materiale e della mosaicità dei granuli stessi.

Lo spettro EPR di polveri è dato dall'involuppo di tutte le righe corrispondenti a tutte le possibili orientazioni del centro paramagnetico rispetto alla direzione del campo magnetico esterno B_z . Da tale involuppo è possibile determinare le componenti principali del tensore g . Spesso spettri EPR su polveri sono caratterizzati da minore risoluzione e dall'assenza di struttura iperfine, e la loro interpretazione può essere soggetta ad alcune ambiguità. Il metodo su polveri presenta però come grosso vantaggio quello relativo alla preparazione del campione, che risulta molto semplice, in quanto non richiede la preparazione di un monocristallo di dimensioni macroscopiche (2-3 mm³).

CAPITOLO 3 PRINCIPALI DI SPETTROSCOPIA EPR IMPULSATA

Le prime misure di spettroscopia EPR impulsata vennero condotte negli anni '50. Questa tecnica differisce da quella in onda continua (cw-EPR) essenzialmente per due aspetti (Romanelli et al., 2010):

- L'eccitazione del sistema di spin è stimolata da impulsi di microonde della durata di qualche nanosecondo e avviene ad un solo valore B_0 del campo magnetico Zeeman (considerando una singola sequenza strumentale).
- Il segnale di risposta del sistema viene registrato in assenza della radiazione eccitatrice.

3.1 IL VETTORE MAGNETIZZAZIONE

In un esperimento EPR normalmente vengono analizzati campioni contenenti un numero molto elevato di spin elettronici. E' possibile definire il vettore magnetizzazione macroscopica \mathbf{M} come somma vettoriale di tutti i momenti magnetici μ_e associati al moto di spin di ciascun elettrone per unità di volume:

$$\mathbf{M} = \frac{1}{V} \sum \mu_e \quad (15)$$

All'equilibrio, in assenza di un campo magnetico esterno, gli spin sono per metà nello stato α e per metà nello stato β , dal momento che i due stati sono degeneri. Gli spin possono essere rappresentati come vettori giacenti sulla superficie di un cono con asse parallelo a z e altezza m_s (figura 6a).

In queste condizioni, la magnetizzazione \mathbf{M} è nulla perché gli spin hanno orientazioni casuali nel piano xy e sono equidistribuiti nei due stati. Se viene applicato un campo magnetico \mathbf{B}_0 parallelo a z, la degenerazione dei livelli viene rimossa e il loro popolamento avviene secondo la legge di distribuzione di Boltzmann (figura 6b).

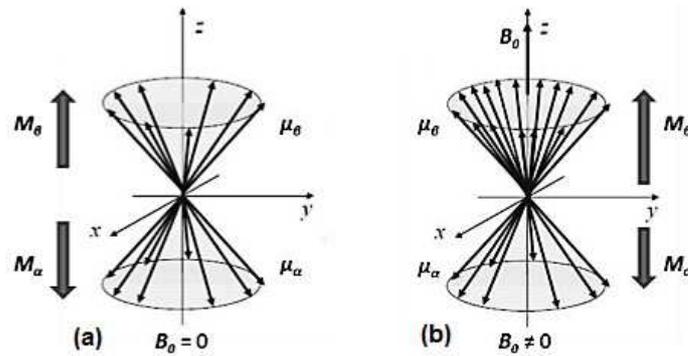


Figura 6 – Magnetizzazione di un campione di elettroni (a) in assenza di un campo esterno la magnetizzazione è zero, (b) in presenza di un campo esterno, si osserva una magnetizzazione netta lungo l’asse z (Tempieri, 2012).

I singoli vettori precessono intorno alla direzione del campo magnetico esterno, cioè risultano in movimento sulla superficie conica, con frequenza di Larmor:

$$\omega = \left(\frac{g\beta}{h}\right)H = \gamma H \quad (16)$$

dove γ è il rapporto giromagnetico (Ikeya, 1993).

In questo caso la magnetizzazione di equilibrio (M_0) è proporzionale alla differenza di popolazione tra i livelli e ha stessa direzione e verso del vettore campo magnetico.

$$M_x = M_y = 0 \quad M_z = M_0 \quad (17)$$

Questa è la condizione di equilibrio.

L’applicazione degli impulsi distrugge questa condizione perché induce transizioni fra i due stati di spin. Ciò dà luogo a rotazioni della magnetizzazione, che alla fine di un impulso sarà orientata diversamente rispetto al campo magnetico. Il nuovo orientamento della magnetizzazione dipende da tre fattori strumentali: la forza degli impulsi B_1 , la loro durata τ_p e

la loro direzione (Romanelli et al., 2010). Negli esperimenti EPR possono essere applicati o un singolo impulso oppure sequenze di impulsi.

3.2 IMPULSO SINGOLO

Negli esperimenti EPR impulsati più semplici viene applicato al sistema di spin un singolo impulso lungo l'asse x, con durata tale da portare il vettore di magnetizzazione dall'asse z esattamente sull'asse delle y del sistema rotante (figura 7).

Questo impulso è detto impulso di 90° o $\pi/2$ e ha un'ampiezza pari a:

$$t = \frac{\pi}{4\omega_1} = \frac{\pi}{4\gamma H_1} \quad (18)$$

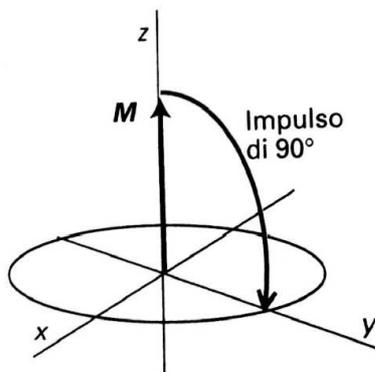


Figura 7 – Effetto di un impulso $\pi/2$, sul vettore di magnetizzazione (Atkins, 1997).

Un impulso di ampiezza doppia porterà alla rotazione della magnetizzazione di un angolo doppio. Tale impulso viene detto impulso 180° o π .

Dopo l'impulso, il sistema tende a riportarsi all'iniziale situazione di equilibrio, e quindi a riallineare la magnetizzazione lungo il campo Zeeman. Il ripristino dell'equilibrio costituisce il processo che prende il nome di rilassamento dello spin e il tempo impiegato dal sistema per tornare all'equilibrio è detto tempo

di rilassamento. Questo è legato a meccanismi di dissipazione dell'energia all'interno del sistema di spin o fra esso e l'intorno.

Dopo un impulso di 90° , la componente z del vettore di magnetizzazione riacquista il valore di equilibrio M_0 secondo una costante temporale detta tempo di rilassamento longitudinale T_1 . Poiché tale processo di rilassamento comporta la cessione di energia all'ambiente, la costante temporale T_1 viene detta *tempo di rilassamento spin - reticolo*.

Un secondo meccanismo di rilassamento è quello caratterizzato da costante temporale T_2 , detta tempo di rilassamento trasversale o *tempo di rilassamento spin - spin*.

Questo tempo è quello necessario affinché ritornino completamente casuali le fasi degli spin sul piano xy, passando da un assetto ordinato, acquisito dopo l'impulso, ad uno disordinato (Atkins, 1997). Il tempo di rilassamento spin-spin è connesso all'ampiezza della riga di assorbimento. La larghezza di riga a metà altezza è inversamente proporzionale al parametro T_2 : quanto maggiore è il tempo di rilassamento trasversale tanto più è stretta la riga (Atkins, 1997).

3.3 SEQUENZA A DUE IMPULSI (2P)

Gli impulsi $\pi/2$ e π possono essere combinati in opportune sequenze per dar luogo ai cosiddetti echi di spin. Le sequenze di impulsi riorientano i dipoli magnetici; il loro rifasamento per formare nuovamente il momento macroscopico costituisce l'eco. L'eco misura quindi la magnetizzazione netta del sistema ad un dato tempo dalla fine dell'impulso (Kevan e Bowman, 1990).

Il tipo più semplice di sequenza pulsata (figura 8a,b) consiste di un impulso $\pi/2$ seguito da un impulso π (sequenza di impulsi Hahn).

L'impulso $\pi/2$ orienta i vari spin elettronici lungo un asse nel piano xy perpendicolare alla direzione del campo magnetico applicato. Gli spin danno luogo a moti di precessione sul piano xy con frequenze di Larmor differenti che dipendono dai vari intorni nucleari o da altre interazioni magnetiche.

Si suppone che la magnetizzazione complessiva sia costituita da una serie di magnetizzazioni differenti, ognuna delle quali deriva da un pacchetto di spin di elettroni a frequenza di precessione molto simile (Atkins, 1997).

Dopo un tempo τ , in cui sono attivi i meccanismi di rilassamento, viene applicato un impulso π , che provoca la rotazione di ciascun pacchetto di spin di 180° attorno alla direzione dell'impulso. A seguito di quest'ultimo, i pacchetti di spin danno luogo a un moto di precessione muovendosi gli uni verso gli altri e, al termine di un intervallo di tempo τ , si ritroveranno nuovamente in fase. Questo processo si dice rifocalizzazione e porta alla generazione di un eco di spin.

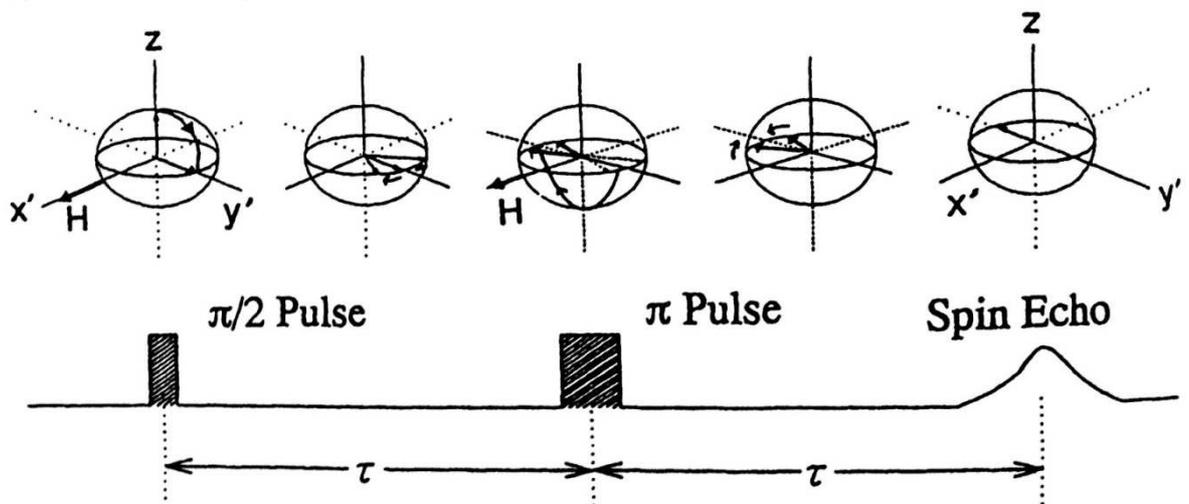


Figura 8a – Schema temporale di una sequenza a due impulsi (Ikeya, 1993).

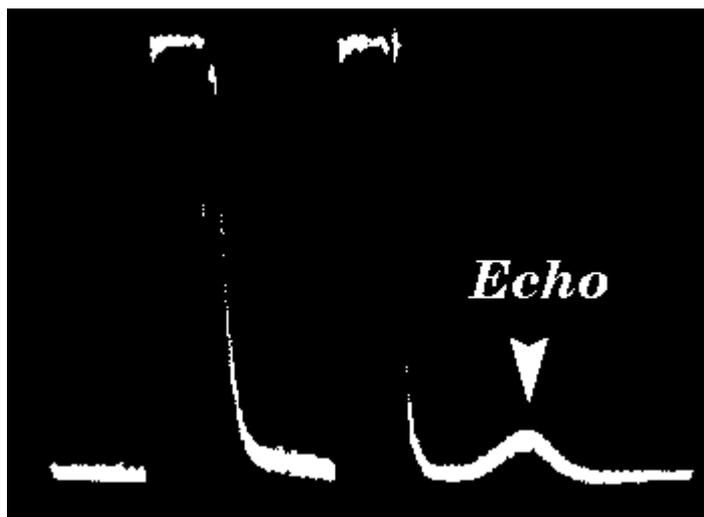


Figura 8b – Sequenza di Hahn sperimentale del primo eco di spin nucleare osservato da E. Hahn nel 1950.

3.4 SEQUENZA A TRE IMPULSI (3P)

Un altro tipo di sequenza molto comune è quella a tre impulsi. Questa è del tipo $\pi/2 - \tau - \pi/2 - T - \pi/2 - \tau - eco$ e consiste di impulsi tutti uguali ($\pi/2$) che fanno compiere alla magnetizzazione rotazioni di 90° . L'intervallo di tempo τ è uguale fra il primo e il secondo impulso e fra il terzo e il momento di rivelazione del segnale di eco, mentre è diverso fra il primo e il secondo impulso (T). L'intervallo di tempo T può essere progressivamente allungato. In questo caso, così come nel metodo a due impulsi, un segnale di eco primario, compare a seguito dell'applicazione dei primi due impulsi (figura 9). Molti altri segnali di eco compaiono dopo l'applicazione del terzo impulso. Tre di questi sono i cosiddetti echi primari indesiderati e appaiono come risultato della combinazione del terzo impulso con il primo e il secondo impulso di microonde e con l'eco primario. Tutti e tre gli impulsi partecipano alla formazione del segnale di eco al tempo $2\tau + T$. Questo particolare segnale viene detto a tre impulsi o segnale di eco stimolato (Dikanov e Tsvetkov, 1992). La magnetizzazione viene registrata in funzione di T .

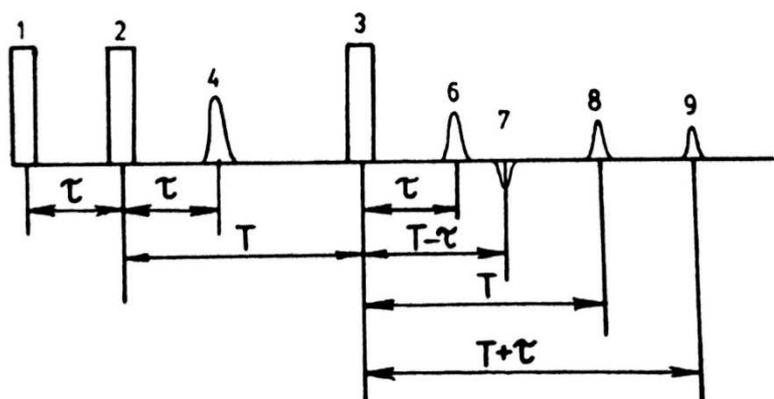


Figura 9 – Schema temporale di una sequenza 3P. 1,2,3 – impulsi di microonde; 4 – segnale di eco primario; 6 – segnale di eco stimolato; 7,8,9 segnali di eco primari indesiderati che appaiono come risultato della combinazione del terzo impulso con l'eco primario e gli impulsi 1 e 2 (Dikanov e Tsvetkov, 1992).

Dal decadimento del segnale di eco si possono ottenere informazioni sia sui moti reticolari che sulle concentrazioni degli spin.

3.5 SPETTROSCOPIE BASATE SULL'IMPIEGO DI SEQUENZE DI IMPULSI

Negli esperimenti impulsati, una delle sequenze sopra descritte può essere ripetuta più volte variando altri parametri sperimentali, dando così luogo a indagini nel dominio del campo magnetico (spettroscopia EchoEPR) oppure nel dominio del tempo (spettroscopia di Eco di Spin Elettronico, ESE).

Nel primo caso, si ripetono sequenze di impulsi a differenti valori di campo magnetico fino a formare uno spettro analogo a quello ottenuto mediante condizioni standard in onda continua, ma relazionata alla magnetizzazione rifocalizzata a differenti valori di campo magnetico.

Nel secondo caso, si esplora l'andamento della intensità di eco in funzione del cosiddetto *interpulse time*, cioè ripetendo più volte la sequenze ed allungando ogni volta il tempo τ (nel caso di sequenza a due impulsi) o T (nel caso di sequenza a tre impulsi), generalmente da 0 a 5 μ s. Di conseguenza, la magnetizzazione osservata (eco) decresce all'aumentare

del tempo tra gli impulsi, e porta con sé informazioni sulle proprietà dinamiche (rilassamento), ma anche strutturali (tramite la cosiddetta Envelope Nuclear Modulation) (Romanelli et al., 2010).

Molto spesso in spettri EPR in onda continua, sono sovrapposti spettri appartenenti a più specie. Per separare i segnali dovuti a ciascuna di esse una strategia può essere quella di impiegare l'esperimento di eco-EPR, in cui si sfrutta il fatto che specie diverse hanno tempi di rilassamento differenti e quindi i loro segnali decadono con cinetiche diverse. Se i segnali ottenuti non modificano la loro forma, vuol dire che sono originati da una sola specie; in caso contrario, si ottengono segnali di forma diversa ai diversi valori di τ o T (Romanelli et al., 2010).

CAPITOLO 4 METODI EPR E PARTE SPERIMENTALE

4.1 DESCRIZIONE DEI CAMPIONI

L'indagine spettroscopica è stata condotta su due tipologie di substrati: un campione di tessuto polmonare umano e una aliquota di polveri inorganiche da esso estratte. Entrambi i campioni esaminati sono stati forniti dal Dipartimento di Scienze della Terra dell'Università di Torino (grazie alla collaborazione della prof.ssa E. Belluso).

Il tessuto è parte di un referto autoptico prelevato da un paziente con diagnosi di silicosi, pertanto con pregressa esposizione ad alte dosi di SLC, a causa della sua occupazione nel comparto di lavorazione di materiali lapidei. Il tessuto polmonare, una volta prelevato, viene fissato in formalina. Successivamente viene ridotto in piccoli pezzi e alla fine sottoposto ad una serie di trattamenti che si concludono con l'immersione in paraffina liquida da cui, una volta raffreddata e solidificata, è possibile ricavare dei blocchetti contenenti il campione di tessuto da analizzare. Dal blocchetto vengono ottenute tramite microtomo una serie di sezioni che saranno sottoposte ad analisi, mentre la restante parte viene conservata in un archivio a fini medico-legali per un certo numero di anni. Le sezioni, al momento dell'indagine, vengono trattate con Xilolo al fine di rimuovere la paraffina. Per mantenere intatta la parte organica, il campione viene disidratato con etanolo.

Le polveri inorganiche sono ottenute da un'aliquota del campione di tessuto, mediante digestione chimica con ipoclorito dello stesso, seguita da filtrazione su membrana. Per le specificità della spettroscopia EPR, il filtro è quindi ripiegato più volte su se' stesso e avvolto con teflon senza ulteriori manipolazioni fisiche o chimiche.

4.2 SPETTROMETRO EPR

Gli spettrometri EPR sono strumenti che, combinando l'effetto di un campo magnetico con una radiazione nelle microonde, consentono di realizzare le condizioni di risonanza di spin per sistemi con elettroni spaiati.

Uno schema dello strumento utilizzato negli esperimenti EPR è mostrato in figura 10:

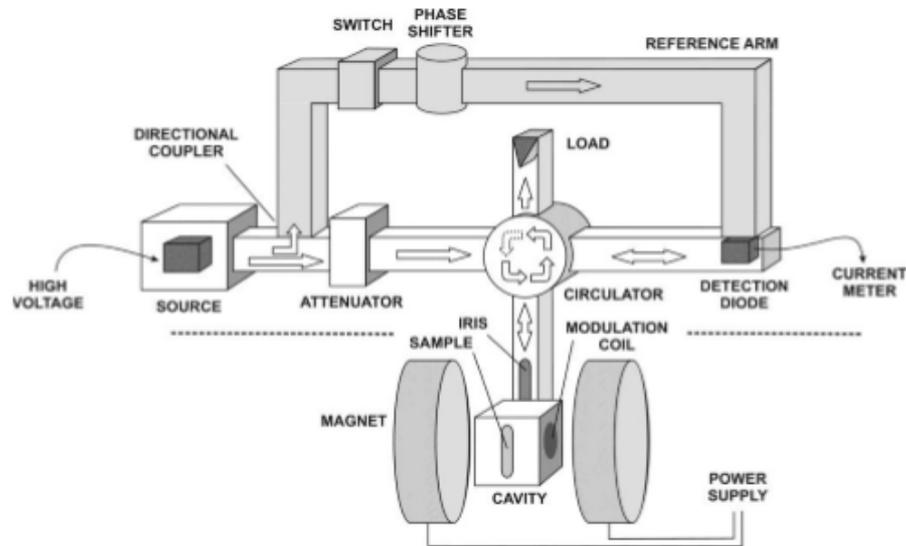


Figura 10 – Schema di uno spettrometro EPR (Adapted from Hagen, W.R. (2009) Biomolecular EPR Spectroscopy).

Sia per ragioni pratiche che economiche, le misure vengono normalmente condotte a frequenza fissa nel campo delle microonde, ottenuta per mezzo di un Klystron o di un diodo semiconduttore. La separazione in energia tra le popolazioni di spin per effetto Zeeman viene ottenuta variando il campo magnetico applicato. La radiazione viene condotta per mezzo di una guida d'onda nella cavità risonante, dove arriva in condizioni di risonanza e con la massima intensità.

Il campione viene inserito in cavità attaccato a un goniometro nel caso di analisi su cristallo singolo oppure all'interno di un capillare, nel caso di campioni in soluzione o in polvere. All'esterno della cavità sono posti un elettromagnete ed il rivelatore dell'assorbimento dell'energia radiante nella cavità. Il segnale, amplificato e filtrato, viene inviato direttamente ad un calcolatore per l'elaborazione dei dati. Il campo magnetico effettivo agente sulla cavità viene controllato per mezzo di una sonda di Hall.

La temperatura viene misurata per mezzo di una termocoppia posta nella cavità risonante e controllata da una resistenza, in grado di riscaldare il flusso d'aria entrante nella cavità stessa. La registrazione degli spettri EPR può essere condotta anche a temperature inferiori a quella ambiente

semplicemente sostituendo il flusso d'aria che attraversa la cavità con un flusso di azoto, ottenuto scaldando con una resistenza l'azoto liquido contenuto in un dewar. Si realizza così un impianto criogenico, utilizzabile fino a temperature di 100K. Temperature ancora inferiori, fino circa a 2 K, possono essere raggiunte con strumenti che utilizzano come liquido tecnico refrigerante elio liquido al posto dell'azoto liquido.

Le basse temperature permettono di migliorare la qualità degli spettri, sfruttando il restringimento della riga, incrementano la popolazione dello

stato più basso in energia secondo il fattore di Boltzmann $e^{\frac{-g\beta H}{T k_B}}$, e danno luogo ad un aumento del rapporto segnale rumore (S/N) (Motoji, 1993). Inoltre permettono di esplorare le proprietà del campione in esame al diminuire della temperatura stessa.

Nel corso del presente studio di tesi sono stati registrati spettri EPR a temperatura ambiente ed in condizioni criogeniche.

4.3 REGISTRAZIONE DI SPETTRI EPR IN ONDA CONTINUA A TEMPERATURA AMBIENTE

La registrazione di spettri EPR a temperatura ambiente è stata condotta utilizzando uno spettrometro Bruker ER 200DSRC operante in banda X. Lo strumento è dotato di un apparecchio Bruker ST 100/700 per il controllo della temperatura ed è interfacciato con un calcolatore PC-IBM per mezzo di un software Stelar, per l'acquisizione e il trattamento dei dati.

Per l'inserimento del campione nella cavità risonante, sono stati utilizzati capillari di silice vetrosa. In tal modo, si evita che in cavità potessero essere presenti tracce di ferro eventualmente contenute nei capillari di vetro comune. Tutti gli spettri sono stati registrati con le seguenti impostazioni strumentali:

- frequenza delle microonde: 9,78 GHz
- frequenza di modulazione: 100 KHz
- ampiezza della modulazione: 4 G
- costante di tempo: 50 ms
- tempo di acquisizione 200 s

Inizialmente sono stati acquisiti spettri panoramici lavorando su un ampio range di campo magnetico, successivamente sono stati acquisiti spettri di dettaglio.

4.4 REGISTRAZIONE DI SPETTRI EPR IN ONDA CONTINUA A 35 K

La registrazione di spettri EPR a 35K è stata effettuata utilizzando uno spettrometro Bruker Elexys E500, operante in banda X, equipaggiato con criostato funzionante sia con azoto che con elio liquido, cella portacampione ad alta sensibilità per soluzioni, cavità standard e cavità ad alta sensibilità. Sono stati utilizzati tubi portacampione di silice vetrosa anche in questo caso. Per la registrazione degli spettri si ringrazia il Prof. Lorenzo Sorace del Dipartimento di Chimica 'Ugo Schiff', Università degli Studi di Firenze. Le impostazioni strumentali utilizzate nel corso della registrazione degli spettri, poiché variano per ciascuno di essi, sono riportate nel capitolo 5 come didascalie alle figure.

4.5 REGISTRAZIONE DI SPETTRI EPR IMPULSATO

Gli spettri di Eco-EPR sono stati registrati presso il laboratorio di EPR impulsato del Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università di Padova, utilizzando uno spettrometro Bruker Elexsys E580, operante in banda X e munito di criostato funzionante con azoto o elio liquido. I campioni sono stati analizzati tal quali, inserendoli in un tubo di silice vetrosa. Gli spettri sono stati registrati a differenti temperature (35-60-80K) ed è stata utilizzata una sequenza di impulsi Hahn ($\pi/2 - \pi$). Si ringrazia il Dr. Alfonso Zoleo del Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università di Padova.

CAPITOLO 5 RISULTATI SPERIMENTALI

5.1 SPETTRI EPR IN ONDA CONTINUA

Lo spettro EPR (mostrato in figura 11) registrato a temperatura ambiente (298 K) sul campione di polveri, consiste di quattro segnali in un range di campo magnetico compreso fra 0 e 6000 G. Si osserva una prima riga centrata a circa 1580 G, caratterizzata da ridotta intensità, modesta larghezza di riga (~87 G) e assenza di struttura iperfine o fine. E' possibile effettuare una stima del valore di g , che risulta essere pari a 4,43. Molto ben evidenti sono invece due segnali molto larghi (~300 G) centrati rispettivamente a circa 2500 G e 3200 G e privi di ogni tipo di struttura. Infine, una quarta riga molto stretta (~4.2 G) è centrata a 3400 G.

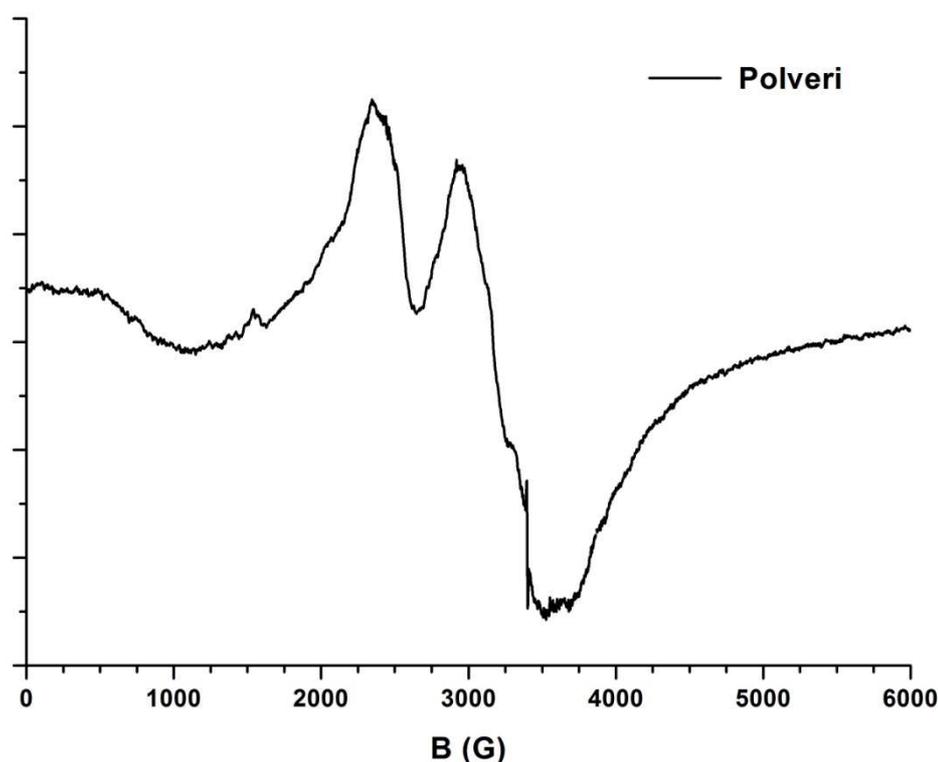


Figura 11 – Spettro panoramico del campione di polveri a 298 K.

Per ottenere maggiori informazioni su quest'ultima, attribuibile per posizione e larghezza di riga ad una specie radicalica, è stato registrato uno spettro di

dettaglio (figura 12), ottenuto restringendo il campo di indagine in un range di valori di campo magnetico fra i 3250 e i 3550 G.

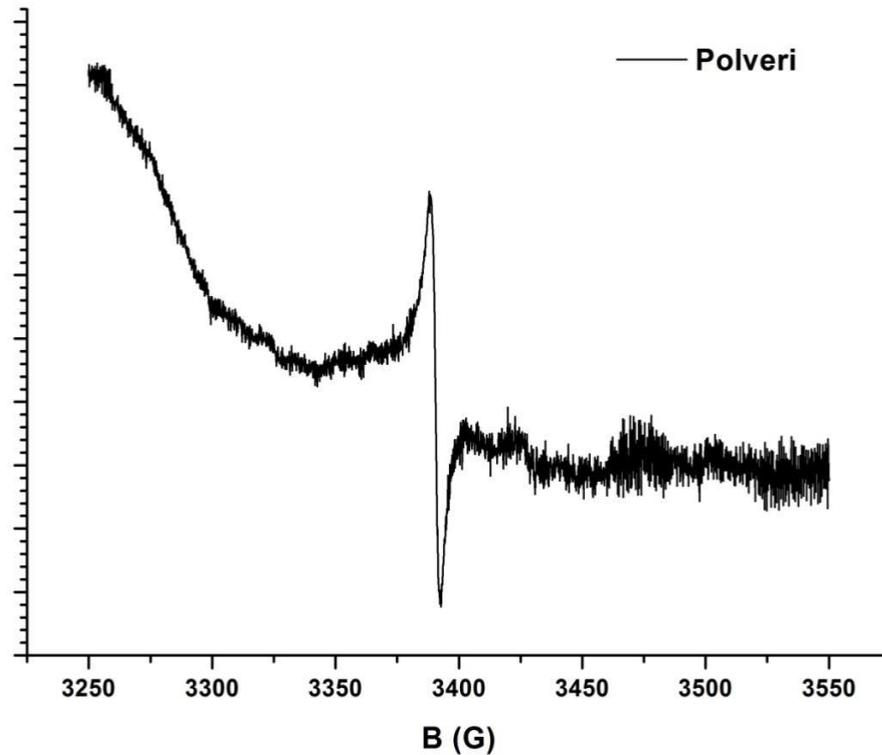


Figura 12 – Spettro di dettaglio campione di polveri a 298 K.

Lo spettro di dettaglio consente di ottenere parametri spettrali più precisi del quarto segnale, che risulta essere centrato a 3390,5 G. Il segnale risulta inoltre privo di struttura iperfine. Una volta determinati i valori di campo magnetico ai quali cadono i punti di massimo e di minimo dell'assorbimento, è possibile calcolare per differenza l'ampiezza di riga, che risulta essere di circa 4 G. E' infine possibile calcolare il valore di g , pari a 2,062.

Anche lo spettro EPR del campione di tessuto polmonare (figura 13), registrato a 298 K e in un range di campo magnetico compreso fra 0 e 10000 G, mostra una struttura complessa perché caratterizzata dalla presenza di più segnali sovrapposti. Un primo segnale largo (la larghezza di riga è di ~3000 G) è centrato a circa 1500 G. Un secondo segnale è centrato a circa 3300 G e possiede una larghezza di riga di 500 G. A quest'ultimo

assorbimento sono sovrapposti due segnali relativamente stretti, centrati approssimativamente a 3400 G.

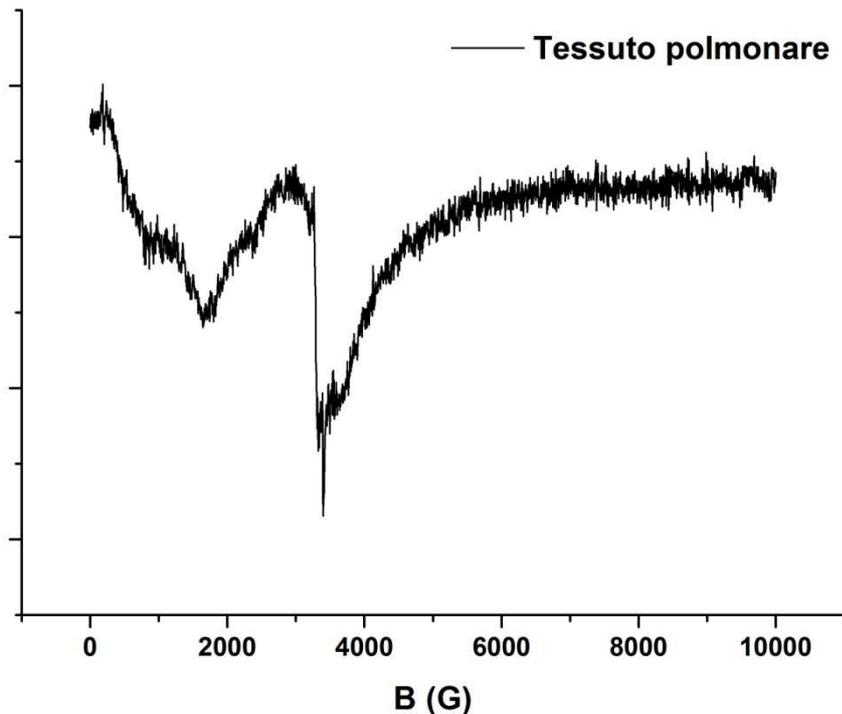


Figura 13 - Spettro panoramico del campione di tessuto polmonare a 298 K.

Per ottenere maggiori informazioni relativamente a questi ultimi, è stato registrato uno spettro di dettaglio (figura 14), in un range di campo magnetico ridotto compreso fra 2500 e 4500 G. I due segnali stretti sono centrati rispettivamente a circa 3388 G e 3494 G. Quest'ultimo segnale è da attribuirsi a effetti di sottrazione della cavità, il cui spettro è stato registrato come bianco da sottrarre agli spettri dei campioni. Il segnale a 3388 G ha un'ampiezza di riga di circa 8 G e un valore di g pari a 2.064.

Lo spettro di dettaglio mostra inoltre la presenza di un nuovo segnale, non visibile nello spettro panoramico, centrato a circa 3380 G e con ampiezza di riga pari a circa 100 G.

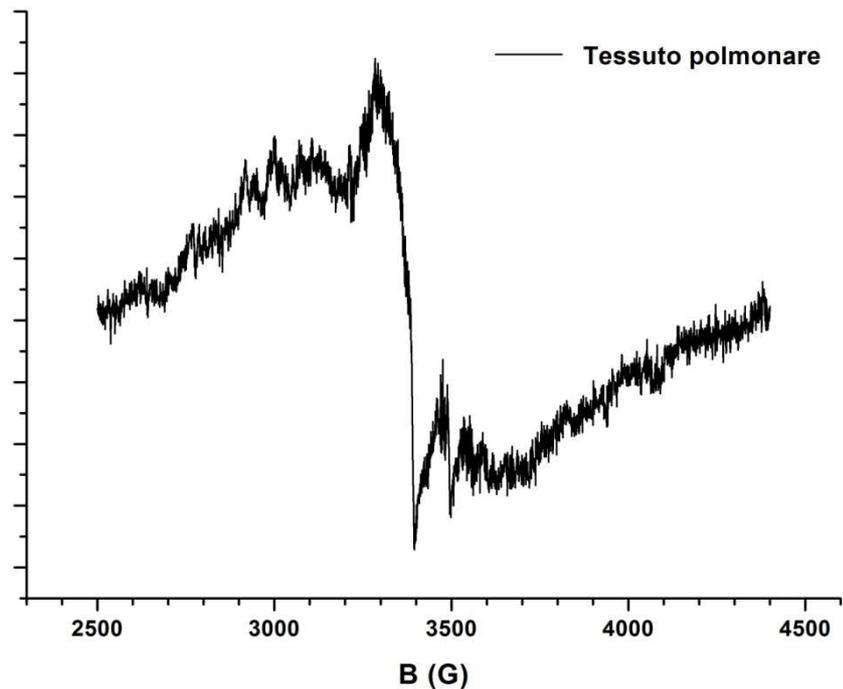


Figura 14 – Spettro di dettaglio del campione di tessuto polmonare alla temperatura di 298 K.

Gli spettri EPR registrati a 35 K appaiono sostanzialmente diversi da quelli registrati a temperatura ambiente. Si osservano infatti variazioni nel numero, nell'intensità e nella struttura dei segnali stessi.

Lo spettro panoramico del campione di polveri (figura 15), registrato nel range di campo magnetico compreso fra 0 e 6000G, mostra una riga centrata a ~1500 G con ampiezza di ~47 G e di ridotta intensità. È stato possibile per tale riga calcolare un valore di g pari a 4,267.

La caratteristica preminente di questo spettro è la presenza di un segnale molto stretto e di elevata intensità, centrato a 3356 G, di larghezza di circa 11,5 G e con valore di g pari a 2,008.

I due segnali larghi centrati a 2500 G e 3200 G, che erano stati osservati nello spettro di polveri registrato a temperatura ambiente, non sono più visibili a questa temperatura.

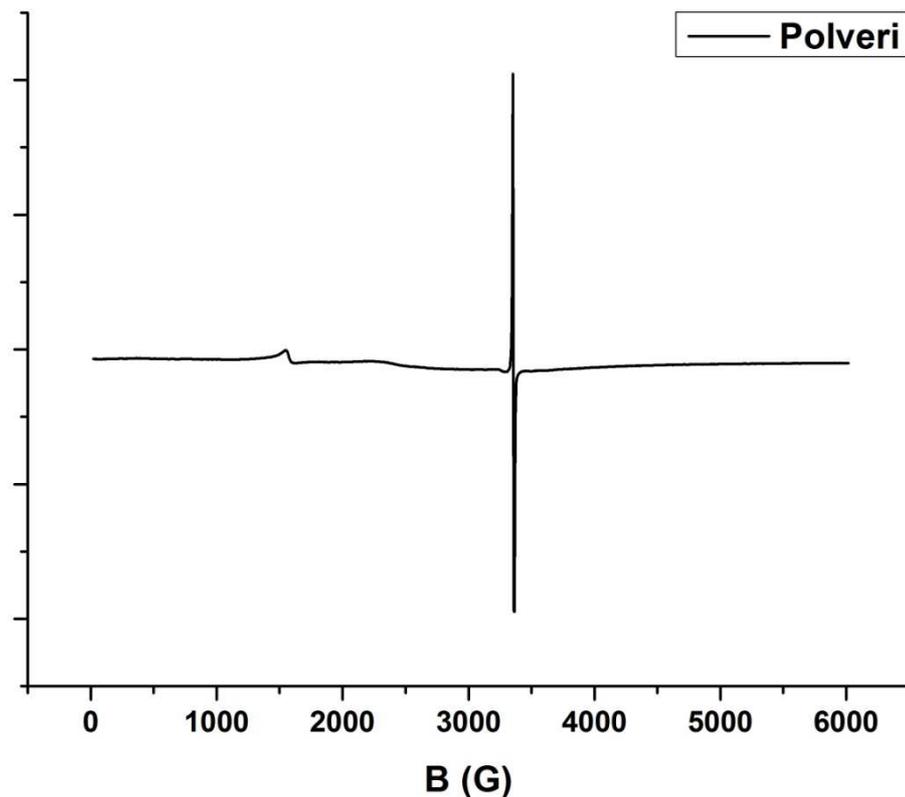


Figura 15 - Spettro panoramico del campione di polveri a 35K. Lo spettro è stato ottenuto lavorando con le seguenti condizioni operative: frequenza nelle microonde: 9.402126 GHz; frequenza di modulazione: 100KHz; ampiezza di modulazione: 2,00 G; costante di tempo: 40,96 ms; tempo di acquisizione: 83,89s; gain: 60 dB; modulazione gain: 60 dB.

Anche in questo caso è stato registrato uno spettro di dettaglio, nel range di campo magnetico compreso fra 2800 e 3800 G (figura 16). Mediante lo spettro di dettaglio è possibile stimare con maggiore precisione il valore di campo magnetico cui è centrato il segnale stretto, che risulta essere pari a 3349,5 G, ed il corrispondente valore di g pari a 2,0055. E' possibile inoltre calcolare la larghezza di riga a partire dai punti di massimo e minimo dell'assorbimento, che risulta essere pari a 3,9 G, valore molto simile a quello trovato per il segnale stretto nello spettro di polveri registrato a temperatura ambiente (figura 12).

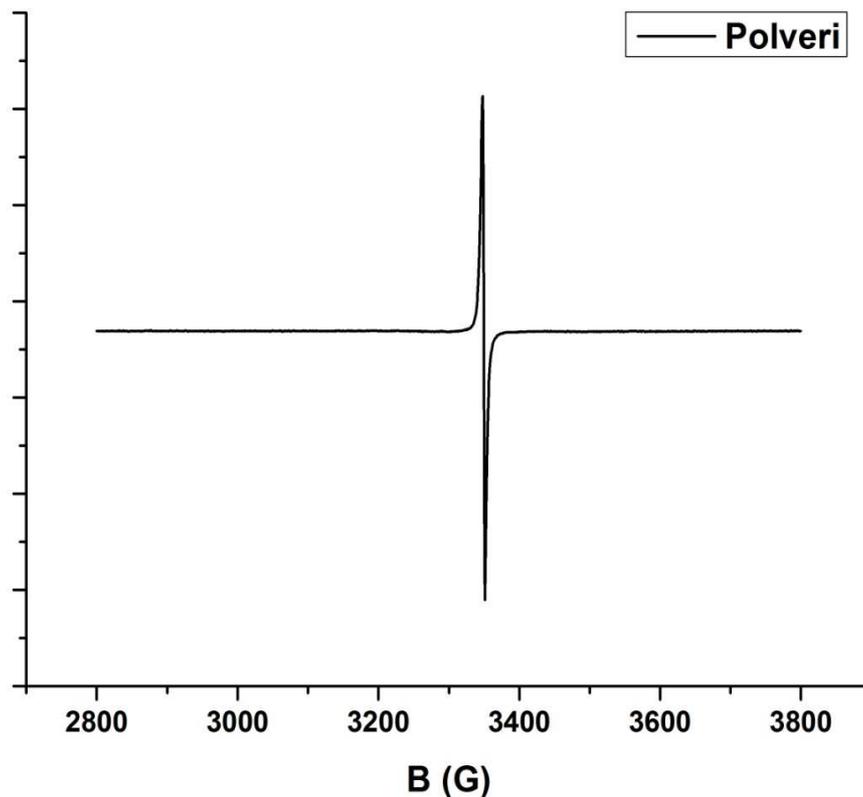


Figura 16 – Spettro di dettaglio per il campione di polveri a 35K. Lo spettro è stato ottenuto lavorando con le seguenti condizioni operative: frequenza nelle microonde: 9.402132 GHz; frequenza di modulazione: 100KHz; ampiezza di modulazione: 2,00 G; costante di tempo: 40,96 ms; tempo di acquisizione: 83,89s; gain: 60dB; modulazione gain: 60 dB.

Per quanto riguarda il campione di tessuto polmonare si è inizialmente registrato uno spettro panoramico operando in un range di valori di campo magnetico compreso fra 0 e 6000G (figura 17). Lo spettro consiste di tre segnali: il primo centrato a circa 1570 G, con ampiezza di riga di ~67 G e con g pari a 4,28, il secondo molto largo (ampiezza di riga di ~900 G) centrato a circa 3254 G e infine un segnale stretto centrato a circa 3355 G e con ampiezza di riga di ~8.3 G.

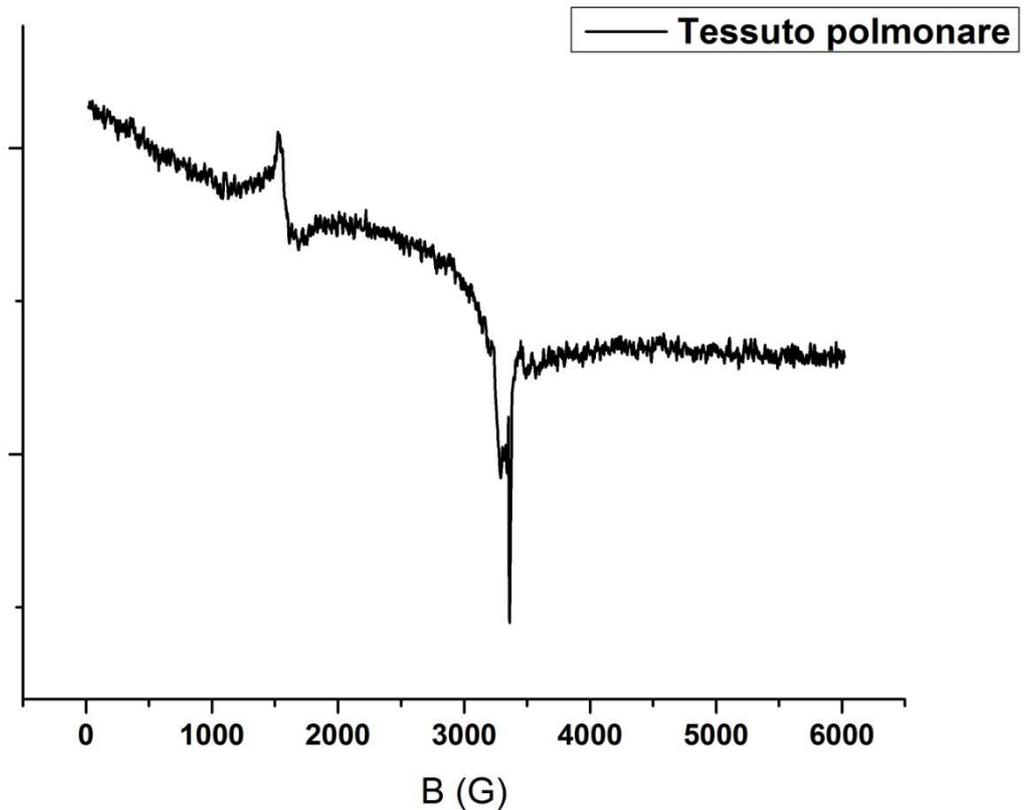


Figura 17 - Spettro panoramico del campione di tessuto polmonare a 35K. Lo spettro è stato ottenuto lavorando con le seguenti condizioni operative: frequenza nelle microonde: 9.400603 GHz; frequenza di modulazione: 100KHz; ampiezza di modulazione: 2,00 G; costante di tempo: 40,96 ms; tempo di acquisizione: 83,89s. Gain: 60 dB, Modulazione gain: 60 dB.

Per ottenere maggiori informazioni relativamente a quest'ultimo segnale, è stato registrato uno spettro di dettaglio (figura 18) in un range di campo magnetico compreso fra 3250 e 3450 G. Il segnale risulta centrato a 3347,8 G, ha un'ampiezza di riga calcolata come differenza fra il punto di massimo e minimo della derivata dell'assorbimento di 2,6 G e ha valore di $g = 2.0074$.

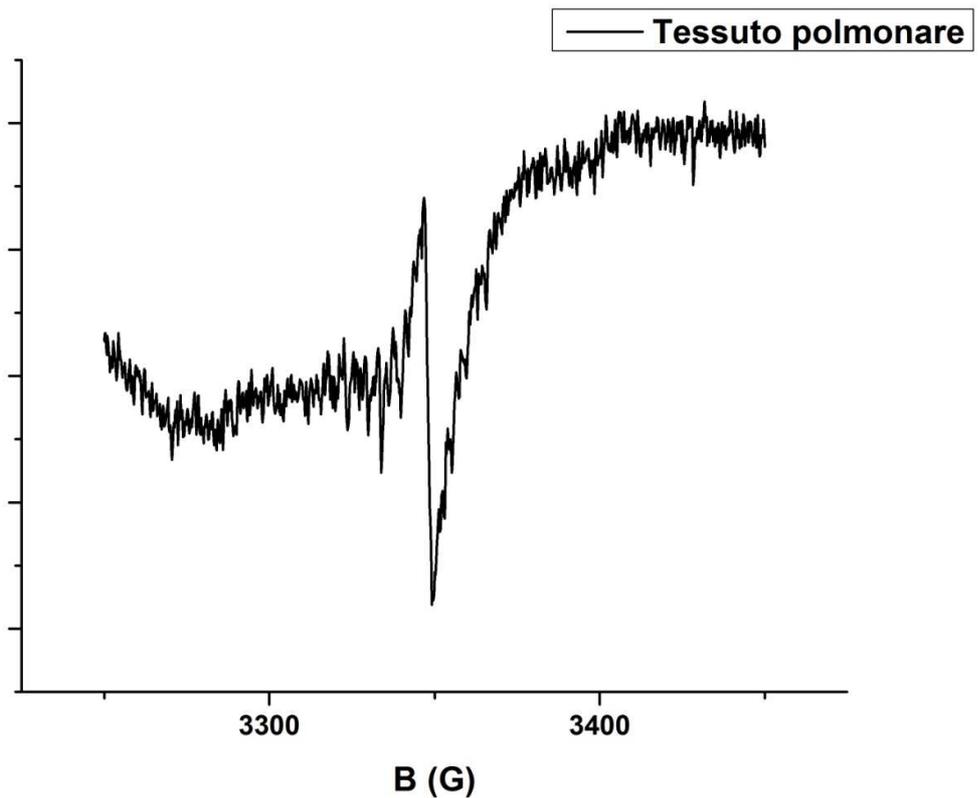


Figura 18 - Spettro di dettaglio del campione di tessuto polmonare a 35K. Lo spettro è stato ottenuto lavorando con le seguenti condizioni operative: frequenza nelle microonde: 9.400606 GHz; frequenza di modulazione: 100KHz; ampiezza di modulazione: 0,50 G; costante di tempo: 163,84 ms; tempo di acquisizione: 167,77s; gain: 60 dB; modulazione gain: 60 dB.

5.2 SPETTRI EPR IMPULSATI

Di seguito sono riportati gli spettri EcoEPR registrati per il campione di tessuto polmonare alle temperature di 35K e 60 K e per il campione di polveri alla temperatura di 80 K.

CAMPIONE DI TESSUTO POLMONARE, 60 K

Lo spettro EcoEPR del tessuto polmonare è costituito, nel range 2600-3600 G, da un singolo assorbimento fortemente asimmetrico, con un massimo relativo a circa 3350 G ed un massimo assoluto a 3450 G. Per effettuare una quantificazione più precisa dei parametri spettrali si è scelto di operare con

una procedura semplificata rispetto alla simulazione con software appositamente concepiti, nell'approssimazione dell'hamiltoniano di spin.

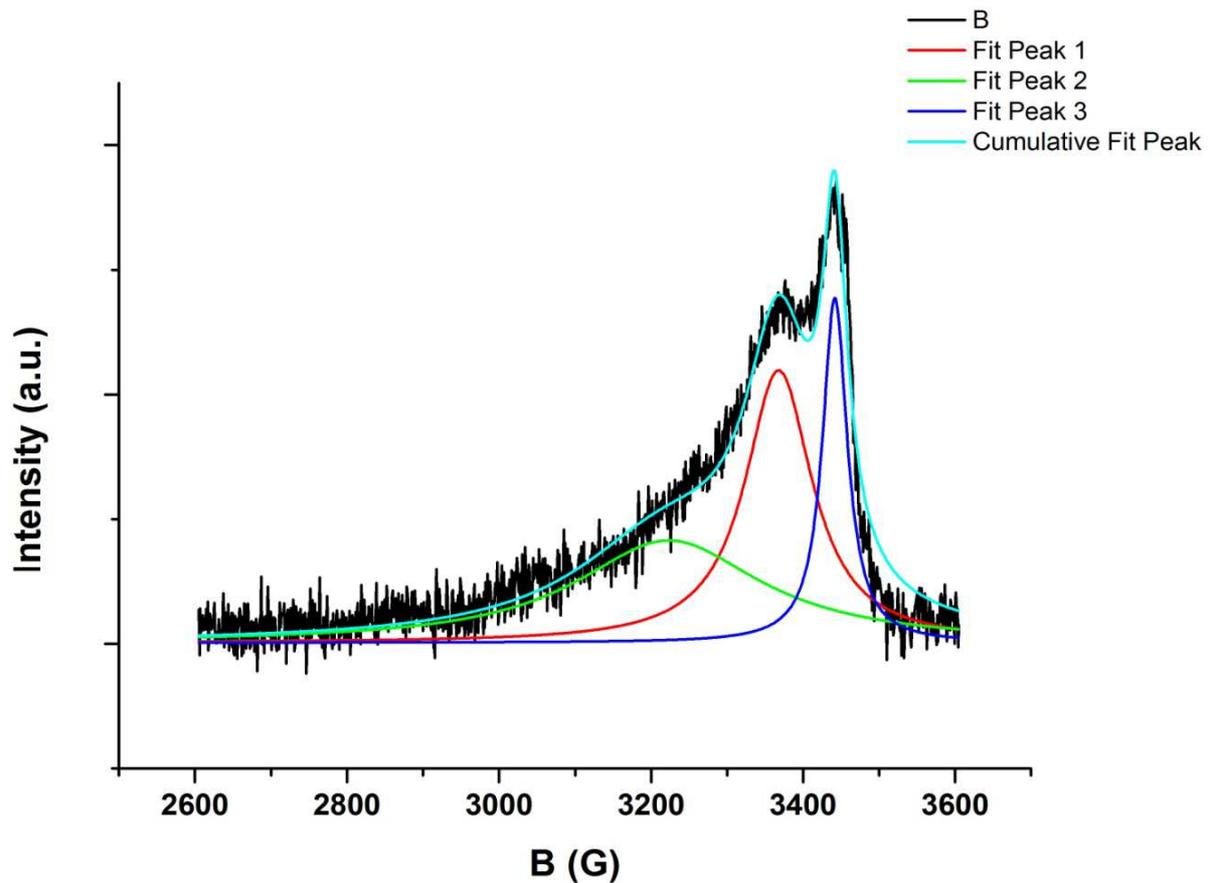


Figura 19 – Spettro di EcoEPR registrato a 60K sul campione di tessuto polmonare.

E' stato pertanto eseguito un fit dello spettro con tre componenti (figura 19), per ognuna delle quali sono riportati in tabella 2 i corrispondenti valori di campo magnetico e ampiezza di riga. La scelta del numero dei contributi è stata dettata dalla volontà di considerare il numero minimo di picchi lorentziani deducibili dalla semplice osservazione dello spettro.

Picco	x_c (G)	Standard Error x_c (G)	W (G)	Standard Error w (G)
1	3368	1	107	7
2	3223	11	298	27
3	3441,8	0,4	39	2

Tabella 2

Confrontando gli spettri di EcoEPR registrati sul campione di tessuto polmonare rispettivamente alle temperature di 35K (in nero) e di 60 K (in rosso), mostrate in figura 20, è stato possibile formulare un'attribuzione dei tre contributi a differenti specie paramagnetiche. Possiamo infatti osservare come a 35 K l'involuppo con il massimo a 3350 G, corrispondente al picco n° 1 in Tabella 2, abbia un'intensità equivalente a quella dell'involuppo con massimo a 3450 G (corrispondente al segnale n°3 in Tabella 2).

A 60 K si osserva una situazione differente: innanzitutto l'intensità complessiva dei due involuppi è diminuita, in buon accordo con il fatto che le basse temperature rendono i tempi di rilassamento meno efficienti. Inoltre, a questa temperatura, come già sottolineato, le intensità dei due involuppi differiscono. L'unica ragione di un simile comportamento può essere identificata nella presenza di due specie diverse, con differenti tempi di rilassamento e ognuna presumibilmente con due valori di g distinti (un $g_{//}$ e un g_{\perp}). In totale quindi sarebbero state necessarie per il fit quattro

componenti, due per ogni specie. La scelta di lavorare con tre componenti invece che con quattro deriva dal fatto che una di queste viene nascosta dalle altre e non risulta sperimentalmente accessibile.

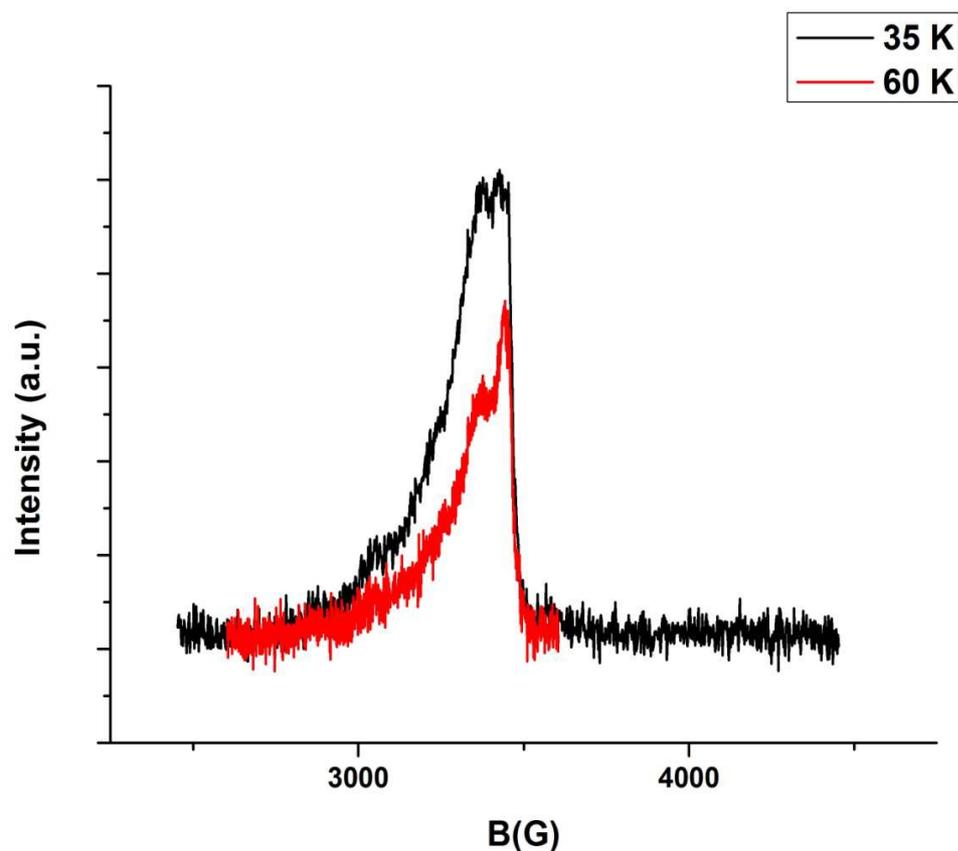


Figura 20 – Confronto fra gli spettri di EcoEPR registrati per il campione di tessuto polmonare rispettivamente a 35 K (nero) e 60 K (rosso).

Concludendo, come mostrato in figura 19, il picco verde e quello rosso sono attribuibili a una prima specie, viceversa quello blu appartiene ad una seconda specie.

Di seguito sono riportati per ognuna delle due specie i corrispondenti valori g , a partire dal valore di campo magnetico (x_c) a cui ogni componente è centrata tenuto conto dal valore di frequenza a cui lo spettro è stato registrato (9.698729 GHz).

SPECIE 1:

PICCO 1 (rosso): $x_c = 3368$, $g_{\perp} = 2.0588$

PICCO 2 (verde): $x_c = 3223$, $g_{\parallel} = 2.1512$

SPECIE 2:

PICCO 3 (blu): $x_c=3441.8$, $g = 2.0145$

CAMPIONE DI POLVERI, 80 K

Anche nel caso del campione di polveri, nel range considerato (2950-3950 G), lo spettro è costituito da un unico involuppo, chiaramente asimmetrico (figura 21). E' altresì apparente che le caratteristiche di larghezza di tale involuppo sono molto differenti da quelle osservate per lo spettro EcoEPR del campione di tessuto.

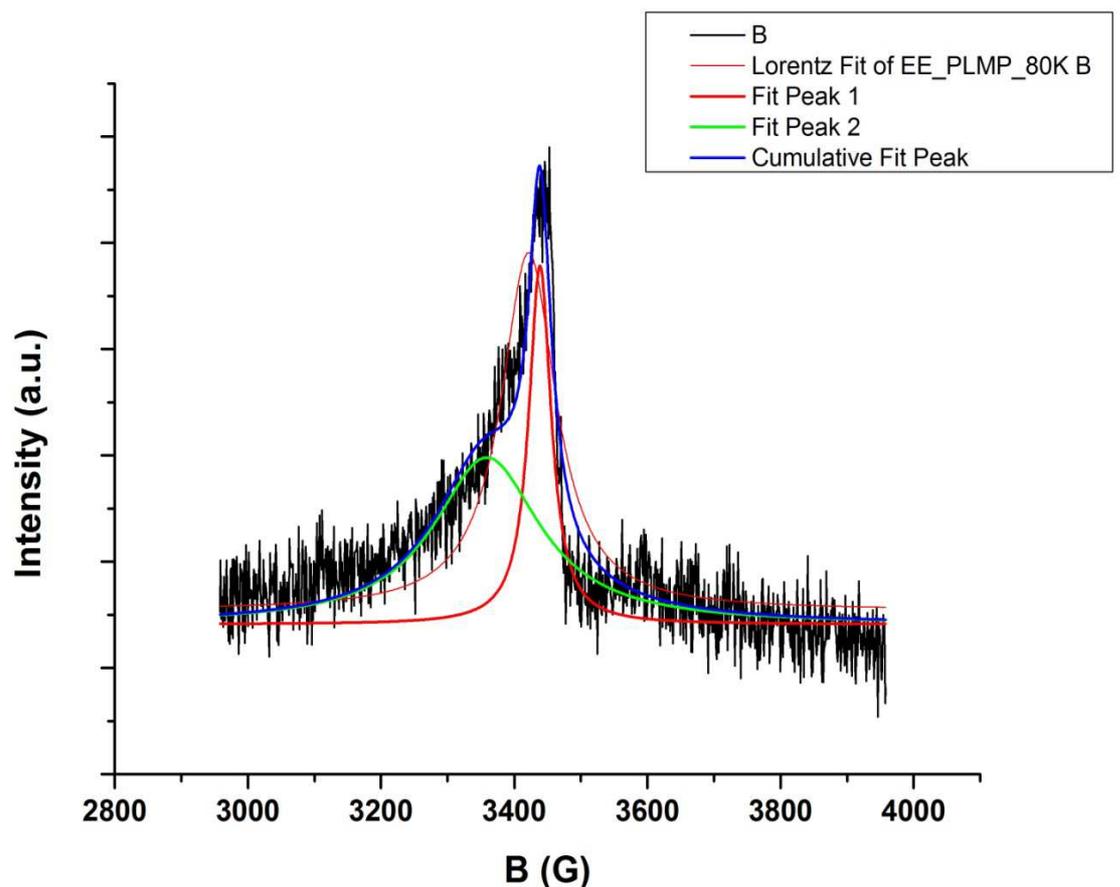


Figura 21 – Spettro di Eco- EPR registrato a 80K sul campione di polveri.

Picco	x_c (G)	Standard Error x_c (G)	W (G)	Standard Error w (G)
1	3438,5	0,5	40	2
2	3359	5	194	12

Tabella 3

In questo caso è stato eseguito un fit dello spettro di polveri con due componenti (figura 21), per ognuna delle quali sono stati riportati in tabella 3 i corrispondenti valori di campo magnetico e ampiezza di riga. E' importante sottolineare che in questo caso, data la presenza di due soli contributi all'involuppo, e data la loro differente intensità relativa, non è difficile formulare l'attribuzione alle componenti parallela (picco 2 in Tab. 3) e perpendicolare (picco 1 in Tab. 3) di una singola specie.

Ancora una volta a partire dai valori di campo magnetico x_c a cui ogni picco è centrato e dal valore di frequenza a cui lo spettro è stato registrato (9.6958 GHz), sono stati calcolati i valori di $g_{//}$ e il g_{\perp} per la specie osservata:

PICCO 1 (rosso): $x_c = 3438.5$, $g_{\perp} = 2.0158$

PICCO 2 (verde): $x_c = 3359$, $g_{//} = 2.0636$

CAPITOLO 6 *DISCUSSIONE*

6.1 Ioni di metalli di transizione

6.1.1 Fe(III) in intorno rombico

Sia gli spettri panoramici registrati a temperatura ambiente che quelli registrati a 35 K sui due campioni analizzati mostrano la presenza di una riga di risonanza che compare per valori di g prossimi a 4,3. Questo segnale è tipico dello ione Fe(III) in una configurazione ad alto spin in siti dotati di simmetria rombica ed è tipicamente osservabile in sistemi biologici come batteri, funghi e cellule animali (Baader et al., 1996).

Alcuni studi come quelli condotti da Aime et al.(1997) e da Baader et al.(1996) mostrano come l'intensità di questo segnale aumenti al diminuire della temperatura, seguendo il tipico comportamento descritto dalle legge di Curie (figura 22).

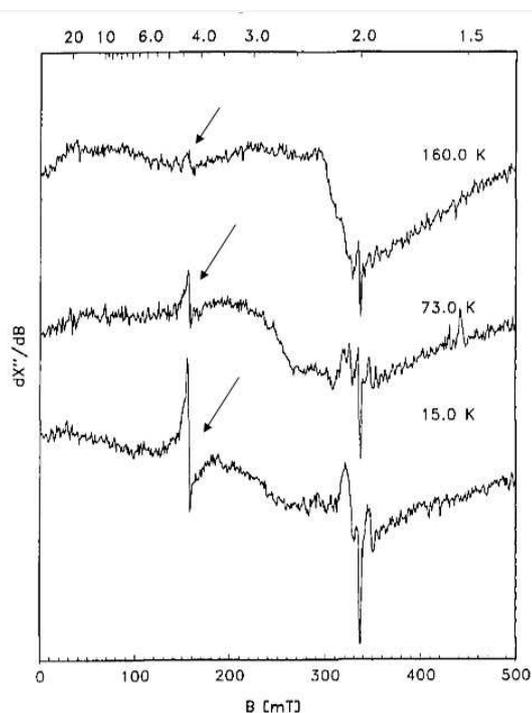


Figura 22 – Spettro EPR di cellule neuroblastoma SK-N-SH registrato a 15.0, 73.0, 160.0 K (Baader et al., 1996). Le frecce indicano il segnale relativo a Fe(III) in intorno rombico. L'intensità del segnale aumenta al diminuire della temperatura.

La legge di Curie quantifica l'effetto della temperatura sulla risposta magnetica di un materiale. Secondo questa legge, le suscettività paramagnetiche dipendono in modo inverso dalla temperatura, seguendo il comportamento descritto dall'equazione:

$$\chi_M = C/T$$

dove χ_M è la suscettività molare, T rappresenta la temperatura assoluta e C una costante caratteristica della sostanza e nota come costante di Curie. Una diminuzione della temperatura porta quindi ad un aumento della suscettività magnetica. Ciò si riflette nello spettro EPR con un aumento dell'intensità dei segnali.

Nel nostro studio la correlazione fra diminuzione della temperatura e aumento di intensità del segnale, descritta per i campioni biologici (tessuto polmonare), non è facilmente verificabile in quanto gli spettri a temperatura ambiente e quelli a 35K sono stati registrati con differente strumentazione. Tuttavia il confronto degli spettri riportati nelle Figure 23 e 24 suggerisce che tale comportamento si sia verificato nel campione di polveri e sia quindi presente anche per il campione di tessuto (figure 13 e 17).

6.1.2 Fe(III) concentrato

Lo spettro EPR registrato a temperatura ambiente sul campione di polveri, mostra due segnali molto larghi (~300 G), centrati rispettivamente a 2500 G e 3200 G (figura 23). Sia per posizione che per ampiezza di riga, questi segnali possono essere associati a ioni di metalli di transizione in stati paramagnetici.

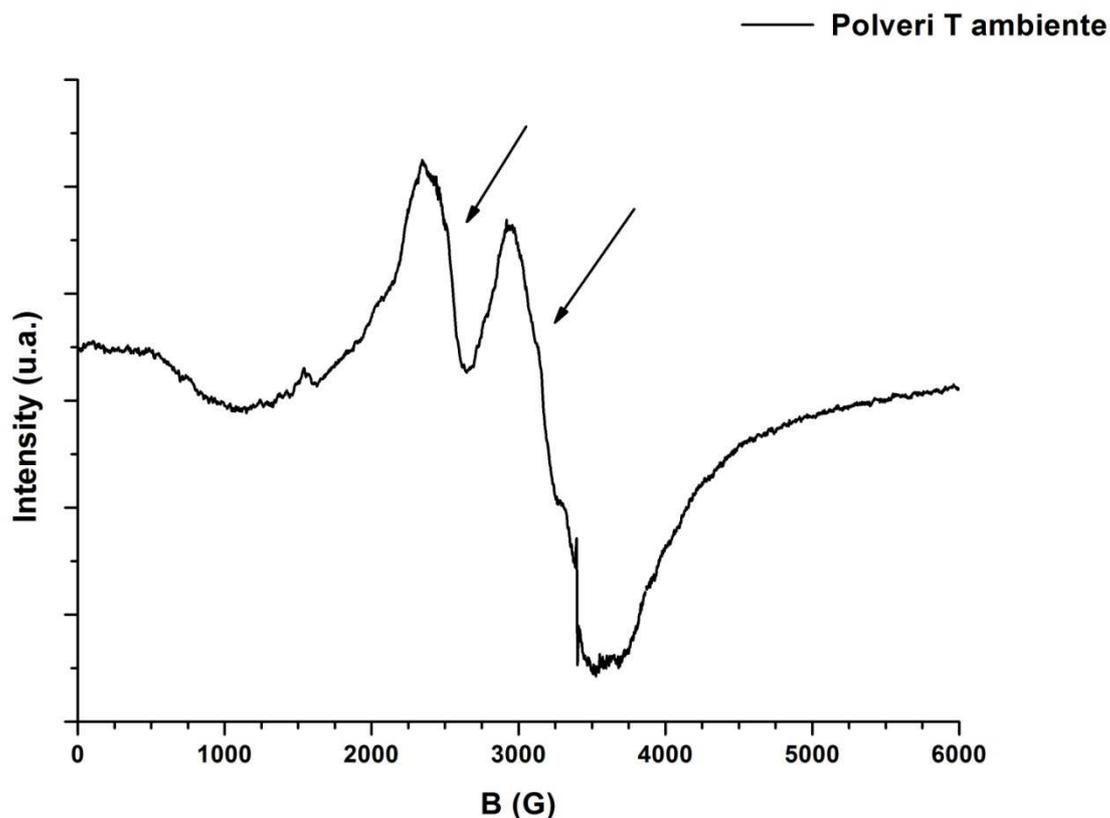


Figura 23 – Spettro panoramico del campione di polveri registrato a temperatura ambiente. Le frecce indicano i segnali larghi centrati a circa 2500 G e 3200 G.

Entrambi i segnali sembrano scomparire completamente nello spettro di polveri registrato alla temperatura di 35K (figura 15).

Modificando la scala dell'intensità di quest'ultimo spettro in modo da enfatizzare la risposta di eventuali segnali di debole intensità, possiamo osservare come in realtà, il segnale centrato a 3200 G nello spettro registrato a temperatura ambiente, sia ancora visibile nello spettro a 35 K, anche se con alcune importanti differenze.

Il segnale infatti si è spostato a valori di campo magnetico inferiori (è centrato adesso a ~ 2450 G), la sua ampiezza di riga è aumentata e la sua intensità si è notevolmente ridotta (figura 24).

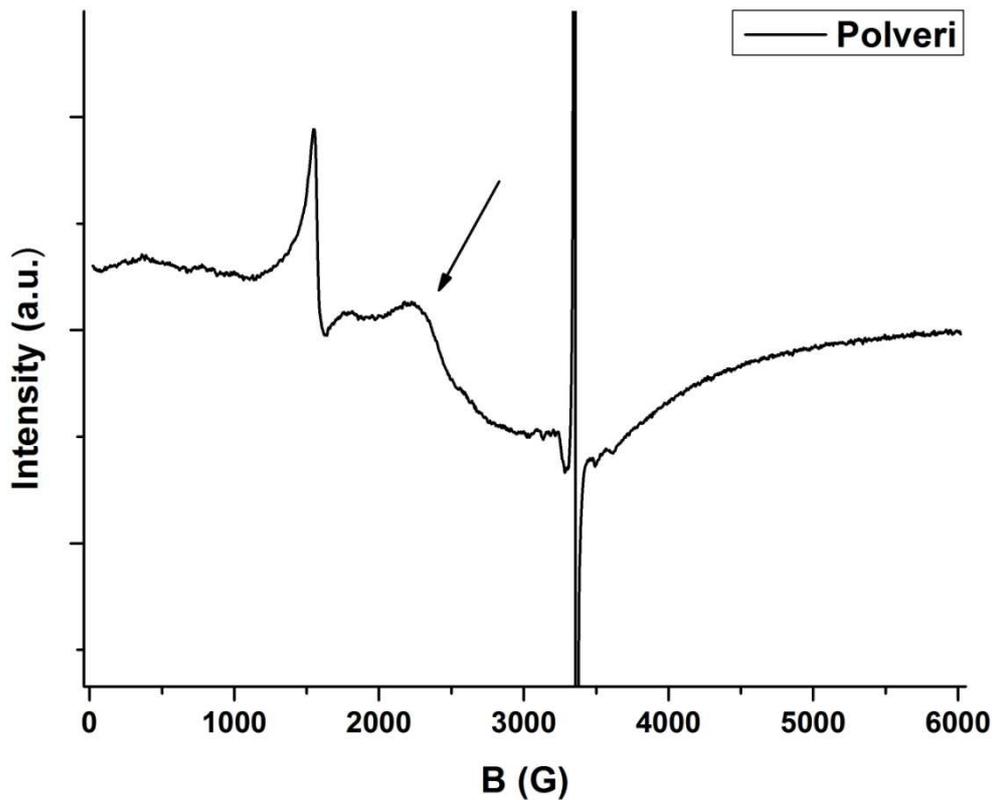


Figura 24 – Spettro panoramico del campione di polveri registrato alla temperatura di 35K. La figura è ottenuta da quella illustrata in figura 15 modificando l'asse delle intensità. La freccia indica la nuova posizione del segnale centrato a 3200 G nello spettro registrato a 298K.

Possiamo quindi supporre che per entrambi i segnali sussista una stretta relazione che lega posizione e ampiezza della riga di risonanza con la temperatura, in particolare al diminuire di quest'ultima l'intensità dei segnali diminuisce e aumenta la loro larghezza, con la conseguenza che il segnale centrato a 2500 G nello spettro registrato a temperatura ambiente, scompare totalmente in quello registrato a 35 K.

Un comportamento simile può essere riscontrato anche nel campione di tessuto polmonare, se si confrontano gli spettri registrati a temperatura ambiente e a 35 K (figure 13 e 17). Anche in questo caso, infatti, si osserva la modifica per posizione e/o larghezza di riga del contributo spettrale principale osservato a temperatura ambiente.

In letteratura, spettri simili a quelli da noi descritti sono stati osservati in uno studio condotto da Aime et al. (1997). Secondo gli autori, segnali la cui intensità diminuisce al diminuire della temperatura sono abbastanza comuni in sistemi inorganici contenenti ferro e sono stati descritti nel dettaglio per sistemi Fe - Zeoliti e Fe - Silicati.

Gli autori affermano inoltre come questi tipi di assorbimento siano generalmente assegnabili ad aggregati di ossido di ferro di piccole dimensioni (nel campo delle decine di nm) e con diverso grado di idratazione e come il loro comportamento al variare della temperatura suggerisca che gli ioni metallici siano organizzati in domini antiferromagnetici o superparamagnetici.

Basandoci quindi sulle considerazioni effettuate da Aime et al. e tenendo conto del fatto che il ferro è il metallo più abbondante nei sistemi biologici (Taiwo, 2003), possiamo ipotizzare che anche nel caso da noi analizzato, i segnali larghi registrati a temperatura ambiente siano dovuti ad aggregati contenenti ioni Fe(III).

Questa nostra ipotesi è avvalorata dal fatto che, come descritto da Taiwo (2003), spettri EPR relativi a Fe(III) non mostrano struttura iperfine a causa della bassa abbondanza isotopica di ^{57}Fe (2.15%) rispetto altri metalli di transizione come Cu, che danno nello spettro EPR una ben definita struttura iperfine. Il Rame infatti ha due isotopi stabili, ^{63}Cu e ^{65}Cu , entrambi con numero quantico di spin nucleare $I=3/2$, la cui abbondanza isotopica complessiva assomma al 99,99%. L'assenza di struttura iperfine in entrambi i segnali da noi precedentemente descritti, conferma pertanto l'attribuzione dei segnali larghi a Fe(III).

In particolare, trattandosi di campioni di tessuto polmonare o di polveri da esso derivate, possiamo supporre che questi aggregati contenenti ferro appartengano al core inorganico della proteina ferritina. La ferritina è una proteina globulare, la cui funzione fisiologica è quella di immagazzinare ferro (figura 25). E' costituita da 24 subunità identiche di peso molecolare di circa 20000 Da. Queste si strutturano in modo da dar luogo ad una cavità con diametro interno di 75 Å, in grado di contenere fino a 4500 ioni Fe^{3+} , anche se generalmente all'interno delle cellule il numero medio di ioni ferro non supera i 3000 (Harrison, 1986).

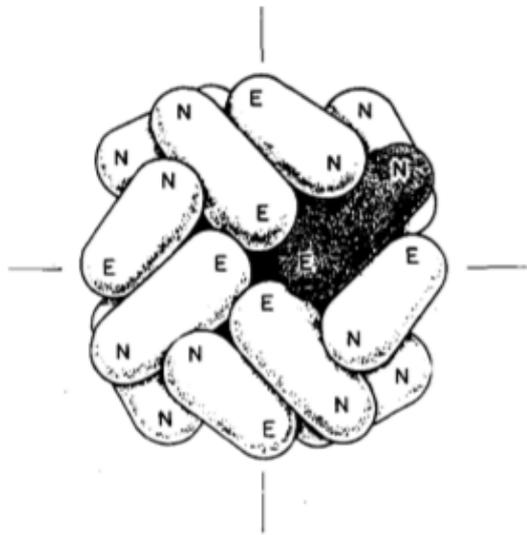


Figura 25 - Struttura schematica della Ferritina. 24 subunità circondano il nucleo di ferro della proteina (colorato in nero), il quale può contenere fino a 4500 ioni Fe (III) come ferridrite. (Harrison, 1968)

Chimicamente il ferro è depositato all'interno della ferritina come ossidossido-fosfato di Fe(III). Il Fe(III) è ottenuto attraverso l'ossidazione di Fe(II) condotta per mezzo di O_2 o H_2O_2 e viene immagazzinato all'interno della proteina sotto forma di nanominerali con struttura analoga a quella del minerale ferridrite (Dehner et al., 2013).

Quando il contenuto di ferro all'interno della proteina è basso, il minerale in essa immagazzinato assomiglia per struttura alla ferridrite a due linee (2L); viceversa quando il contenuto di ferro aumenta, il minerale assomiglia per struttura alla ferridrite a sei linee (6L) (Dehner et al., 2013). I termini "due/sei linee" fanno riferimento al numero di righe che compaiono nel pattern di diffrazione di raggi X del minerale. Entrambe le due forme di ferridrite sono criptocristalline: la struttura della ferridrite a sei linee presenta un ordine parziale maggiore rispetto a quella della ferridrite a due linee.

La nostra ipotesi relativa alla presenza di questo minerale nei campioni in analisi, è stata recentemente confermata da uno studio di spettroscopia microXAS condotto sul nostro stesso campione di tessuto polmonare (La Bella, 2016). Il trattamento del tessuto polmonare con ipoclorito porta all'eliminazione del guscio proteico chiamato apoferritina e consente di

ottenere, sottoforma di precipitato, il contenuto inorganico della stessa e quindi il minerale ferridrite. La marcata ampiezza del segnale osservato nello spettro è legata all'elevata concentrazione di Fe(III) immagazzinato all'interno della proteina (Taiwo, 2003). Per quanto riguarda il particolare andamento del segnale con la temperatura descritto in precedenza, questo può essere spiegato proprio tenendo conto del carattere antiferromagnetico delle nanoparticelle di ferridrite, a causa del quale il segnale decresce di intensità al di sotto della temperatura di Néel con il diminuire della temperatura (Baader et al., 1996). Inoltre, le differenze spettrali di tutti i segnali attribuiti a Fe(III) fin qui considerati possono essere compatibili con differenze nella dimensione delle particelle di ferridrite, che possono essere indotte dal trattamento con ipoclorito. Non si esclude tuttavia, che ulteriori specie contenenti Fe(III) concentrato possano essere presenti nel campione (La Bella, 2016).

6.1.3 Ione Cu(II)

Nello spettro panoramico registrato alla temperatura di 35 K sul campione di tessuto polmonare (figura 26), appare un ulteriore segnale largo (~900 G), che risulta essere centrato a circa 3254 G. Sia per la posizione che per l'elevata ampiezza di riga, questo segnale può essere attribuito alla presenza di uno ione di metallo di transizione, in particolare possiamo ipotizzare si tratti di Cu(II). La tipica struttura iperfine del rame non è però visibile a causa dell'elevata larghezza di riga del segnale stesso.

La conferma della nostra attribuzione proviene dall'analisi dello spettro EcoEPR registrato per il campione di tessuto polmonare alla temperatura di 60 K. In tale campione, infatti l'esperimento impulsato indica la presenza di una specie con anisotropia Zeeman, con $g_{//}$ e g_{\perp} pari a 2.1512 e a 2.0588, rispettivamente. I valori di g così ottenuti sono quelli tipici dello ione Cu(II). In particolare si può osservare che la sequenza $g_{//} > g > 2$, suggerisce per il nostro composto una geometria tetracoordinata oppure a base quadrata planare (Goodman and Raynor, 1970).

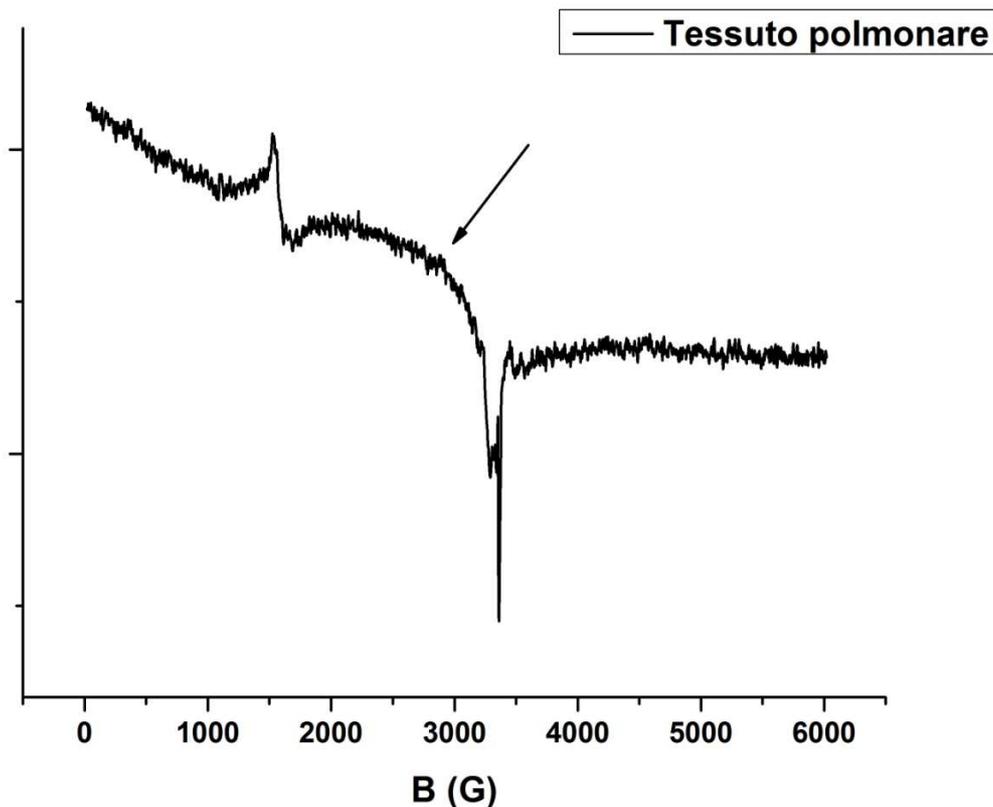


Figura 26 – Spettro EPR registrato alla temperatura di 35 K sul campione di tessuto polmonare. La freccia indica il segnale attribuibile allo ione Cu(II).

6.2. Specie radicaliche

Sia gli spettri EPR in onda continua che quelli impulsati registrati per entrambi i campioni, mostrano segnali compatibili con la presenza di specie radicaliche. Poiché l'osservazione e l'attribuzione di questi segnali risulta estremamente complessa ci avvaliamo dell'utilizzo di una tabella introduttiva (tabella 4), il cui scopo è quello di riassumere in forma più chiara il numero e la tipologia delle specie osservate.

Il punto principale da sottolineare è che i parametri sperimentali ottenuti per le specie radicaliche identificate in onda continua e quelle identificate mediante EcoEPR non sono coincidenti, suffragando l'ipotesi che la speciazione radicalica nei due campioni considerati sia molto complessa.

Pertanto, sia il campione di polveri che quello di tessuto contengono due specie radicaliche, che indicheremo genericamente come A e B. La specie A compare per entrambi i campioni esclusivamente negli spettri registrati in onda continua, mentre la specie B compare solo negli spettri impulsati.

Campione di polveri		Campione di tessuto	
<p>cw – EPR (298 K, 35 K)</p>	<p>Eco - EPR (80 K)</p>	<p>cw – EPR (298 K, 35 K)</p>	<p>Eco -EPR (60 K)</p>
Specie A	Specie B	Specie A	Specie B (+ ione Cu(II))

Tabella 4 – Numero e tipo di specie radicaliche osservate negli spettri registrati nel corso dello studio.

6.2.1 Attribuzione della specie B

La presenza della specie radicalica, indicata con B in Tabella 4, si evince dall'analisi degli spettri EcoEPR registrati per entrambi i campioni in analisi. Per quanto riguarda lo spettro EcoEPR, registrato sul campione di polveri alla temperatura di 80 K, le due componenti del fit, permettono di calcolare i corrispondenti valori di g per la specie anisotropica in esame che risultano essere uguali a: $g_{\perp} = 2.0158$, $g_{\parallel} = 2.0636$. Il

fit dello spettro EcoEPR, registrato sul campione di tessuto polmonare alla temperatura di 60 K, mostra 3 componenti, due dei quali (picco 1 e picco 2) permettono una sicura attribuzione allo ione Cu(II), come descritto nel paragrafo 6.1.3. La terza componente, che nella Figura 19 appare come un picco di colore blu, è relativa alla presenza di una specie radicalica. Ancora

una volta, noto il valore di campo magnetico x_c a cui è centrato il picco, possiamo ricavare g che risulta essere uguale a 2.0145, valore molto simile a

quello ottenuto per il g_{\perp} dello spettro EcoEPR su polveri. Possiamo quindi

ipotizzare che per entrambi gli spettri di Eco-EPR descritti, la specie radicalica osservata sia la stessa, con la differenza che nel caso del campione di tessuto polmonare non è possibile calcolare per la specie esaminata il valore di $g_{//}$, in quanto viene interferito dalla componente perpendicolare dell'involuppo attribuito allo ione Cu(II). Per quanto riguarda l'attribuzione di questa specie, l'ipotesi che noi avanziamo riguarda la presenza di un radicale inorganico associato a un difetto puntuale nel reticolo cristallino della silice. Questa ipotesi si basa sulla possibilità (non verificata sperimentalmente) di una possibile anisotropia Zeeman, e dall'assenza di interazione iperfine.

I difetti puntuali possono essere dovuti a:

- Assenza di un atomo o ione nel reticolo cristallino (vacanza).
- Un atomo del cristallo che si trova in un piccolo spazio vuoto, che normalmente non è occupato (difetto autointerstiziale).
- Presenza di impurezze che possono essere di tipo sostituzionale (le impurezze sostituiscono gli atomi ospitanti) o interstiziali (le impurezze riempiono i vuoti o gli interstizi presenti fra gli atomi ospitanti).

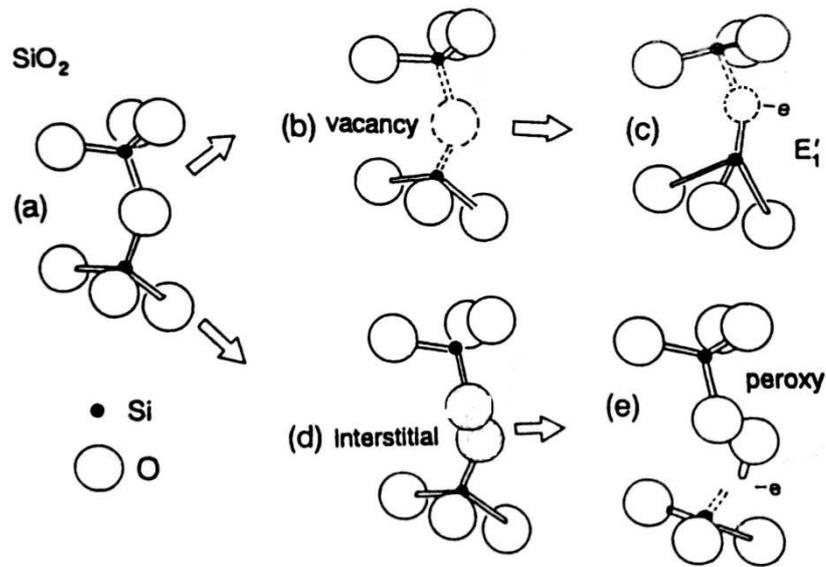


Figura 27 - Schema relativo alla formazione di un centro E'₁ e di un radicale perossidico: (a) un normale costituente SiO₂ del reticolo, (b) vacanza di ossigeno, (c) centro E'₁, (d) O²⁻ interstiziale, (e) centro perossidico (Ikeya, 1993).

In figura 27, è riportato il meccanismo di formazione di due difetti puntuali stabili a temperatura ambiente e comunemente osservati nel quarzo naturale e in SiO₂ amorfa irraggiata (Ikeya, 1993). Questi sono indicati rispettivamente come:

- Centro E'₁ : $[\text{SiO}_3]^+$, SiO_3^{3-} o $\equiv\text{Si}-\text{O}-\text{Si}\equiv$
dovuto alla presenza di un elettrone in una vacanza di ossigeno.
- Centro perossidico : $[\text{SiO}_5]^-$, SiO_5^{5-} o $\equiv\text{Si} \cdot \text{Si}\equiv$
dovuto alla presenza di uno ione O⁻ in posizione interstiziale.

Difetto	Fattore g			Tensore A		
	g ₁	g ₂	g ₃	A ₁	A ₂	A ₃
E'₁ (=Si•)	2.00179	2.00053	2.00030	45.3	39.1	39.1 (²⁹ Si)
Difetti E' di superficie	g _{//} =2.0017 g _⊥ =2.0003			(centro g=2.0007)		
Centro perossidico (=Si-O-O•)	2.0014	2.0074	2.067	A₁ = 0.36 A₂ = 0.42 (²⁹Si)		
[GeO ₄ /M ⁺] _A ⁰						
Li ⁺	1.9913	1.99965	2.0014	27.9	29.6	28.2 (⁷³ Ge)
Li ⁺	1.9907	2.0003	2.0019	0.04	0.10	0.05 (⁷ Li)
Na ⁺	1.9918	2.0002	2.0015	0.06	0.10	0.06 (²³ Na)
[GeO ₄ /M ⁺] _C ⁰						
Li ⁺	2.0000	1.9973	1.9962	30.9	29.4	29.5 (⁷³ Ge)
Li ⁺	1.9947	1.9983	2.0014	0.08	0.01	0.002 (⁷ Li)
Na ⁺	1.9959	1.9970	2.0005	0.07	0.09	0.11 (²³ Na)
[TiO ₄ /M ⁺] _A ⁰						
H ⁺	1.9856	1.9310	1.9151	0.46 0.19	0.94 0.48	0.43 (¹ H) 2.18 (⁴⁷ Ti)
H ⁺	1.985	1.9310	1.9151	A _{av} =1.08(⁴⁷ Ti), 0.50 (¹ H)		
Li ⁺	1.9789	1.9309	1.9119	A _{av} =1.17(⁴⁷ Ti), 0.13 (⁷ Li)		
Na ⁺	1.9675	1.9536	1.8994	A _{av} =1.49(⁴⁷ Ti), 0.09 (²³ Na)		

Tabella 5 – Parametri EPR di difetti comunemente osservati in quarzo. (Fonte: Ikeya, 1993).

In tabella 5 sono riportati i parametri EPR relativi ad alcuni radicali inorganici comuni nel quarzo. Le componenti del tensore A sono espresse in mT.

Confrontando il valori di g da noi ottenuti sperimentalmente con quelli riportati in tabella 5 possiamo supporre che la specie radicalica da noi osservata negli spettri EcoEPR sia compatibile con la presenza di un centro perossidico della silice.

6.2.2 Attribuzione della specie A

Gli spettri EPR in onda continua registrati sul campione di polveri rispettivamente a 298 K e a 35 K, mostrano un segnale molto stretto (~ 4 G) che sia per posizione che ampiezza di riga può essere attribuito alla presenza di un radicale. Analizzando lo spettro di dettaglio ottenuto sul campione alla temperatura di 35 K (Figura 16), possiamo osservare come la curva in derivata prima dell'assorbimento non sia perfettamente simmetrica. I picchi relativi al massimo e al minimo dell'assorbimento infatti non hanno stessa ampiezza e intensità. La mancanza di simmetria è stata verificata effettuando anche un'integrazione numerica del segnale stesso, per ottenere la corrispondente curva di assorbimento non derivata. Possiamo quindi ipotizzare un fattore g anisotropico per la specie in analisi. Per verificare questa ipotesi è stata effettuata una simulazione con il software SIM di Weihe.

SIM è un software di simulazione, creato da Glerup e Weihe nel 1991, che si basa sulla costruzione e successiva diagonalizzazione di una matrice numerica. Il software genera, a partire da un set di parametri, la matrice dell'Hamiltoniano di spin per ciascuna orientazione della specie rispetto al campo magnetico esterno. La condizione di risonanza per ciascuna transizione viene individuata attraverso successive diagonalizzazioni e iterazioni della matrice dell'energia e le intensità relative sono calcolate a partire dagli autovettori moltiplicati per l'appropriato fattore di Boltzmann alla temperatura considerata. La somma di tutte le transizioni su tutto lo spazio, dove ciascuna transizione è rappresentata da una differente curva Lorentziana, rende lo spettro simulato (Glerup e Weihe, 1997). Il software permette di introdurre separatamente tutte le interazioni fondamentali, lasciando la massima libertà nella scelta delle stesse e nell'orientazione dei relativi sistemi di riferimento.

I parametri utilizzati nella simulazione dello spettro EPR del campione di polveri sono riportati in tabella 6.

B e γ indicano rispettivamente gli angoli θ e φ necessari per l'integrazione su tutto lo spazio.

PARAMETRI	VALORI
Beta (B)	0 90 5
Gamma (γ)	0 180 11
Campo magnetico (G)	2800 - 3800
Frequenza (Hz)	$9.4021 \cdot 10^9$
g_{xx}	2.0050
g_{yy}	2.0050
g_{zz}	2.0060
Bandwidth (G)	3/4/4
Temperatura (K)	35 K

Tabella 6 - Parametri usati nella simulazione con software SIM di Weihe.

In figura 28, sono riportati a confronto i due spettri di polveri da noi ottenuti: in nero quello sperimentale e in rosso quello simulato. Con la simulazione sono stati individuati quindi i seguenti valori di g per la specie in esame:

$$g_{xx} = g_{yy} = 2,0050$$

$$g_{zz} = 2,0060$$

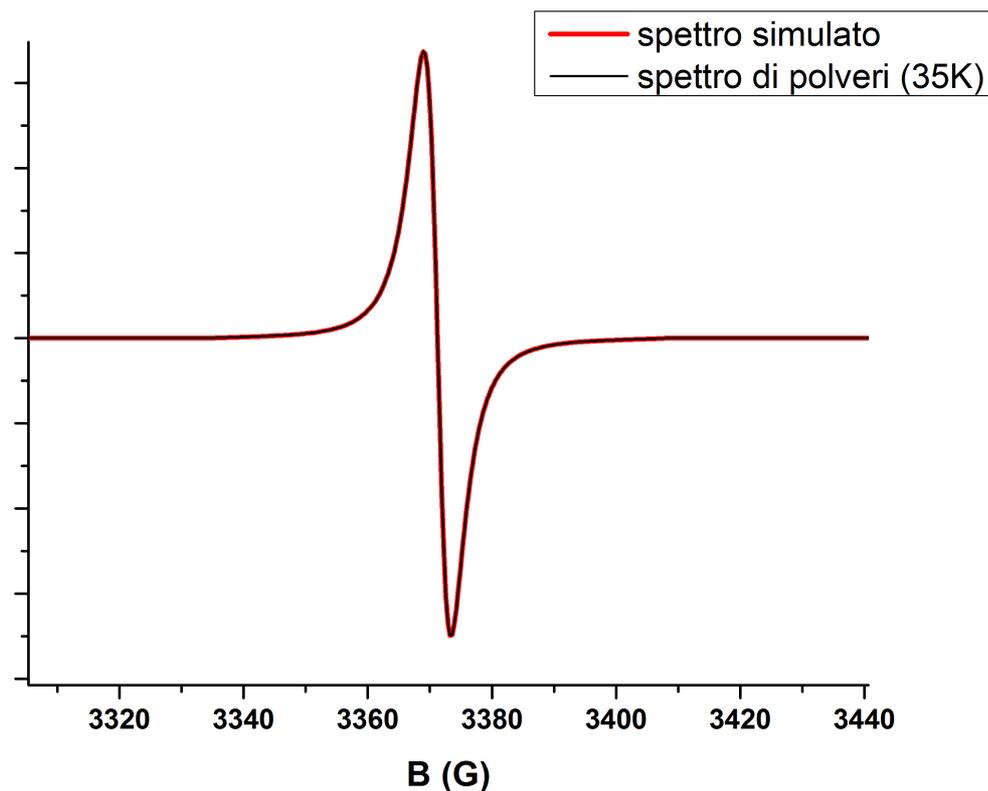


Figura 28 - Confronto fra lo spettro di polveri ottenuto sperimentalmente a 35 K (nero) e quello ottenuto dalla simulazione con software SIM di Weihe (rosso).

Anche gli spettri in onda continua registrati sul campione di tessuto polmonare evidenziano la presenza di una specie radicalica. Nello spettro di dettaglio registrato a temperatura ambiente compare infatti un segnale centrato a circa 3388 G e con ampiezza di riga molto ridotta. Questo segnale compare anche nello spettro di dettaglio registrato alla temperatura di 35 K, dove risulta centrato a circa 3348 G. Dall'analisi di quest'ultimo spettro possiamo supporre che sia per posizione, che per ampiezza di riga (2.6 G), che per valore di g (2,0074), il segnale osservato sia attribuibile ad un radicale e in particolare possiamo supporre che si tratti della stessa specie descritta in precedenza per il campione di polveri. Infatti il valore di g trovato per il radicale nel campione di tessuto polmonare (2,0074) e quello osservato per il campione di polveri (g medio = 2,0055), differiscono per la terza cifra decimale, differenza che può essere giustificata tenendo conto

della differente qualità degli spettri. Questa specie radicalica può essere indicata per semplicità con la lettera A.

Per quanto riguarda la sua attribuzione le informazioni a disposizione nel nostro studio sono essenzialmente tre:

- La specie A è presente sia nel campione di tessuto polmonare che nel campione di polveri. Questa informazione è particolarmente importante perché suggerisce che A sia una specie inorganica. Il trattamento del tessuto polmonare con ipoclorito per ottenere il campione di polveri, è infatti molto drastico, in quanto porta all'eliminazione di tutta la frazione organica. Se A è presente sia nel campione di tessuto che in quello di polveri, allora deve trattarsi di una specie che non viene attaccata dall'ipoclorito. Per lo stesso motivo possiamo supporre che non sia un radicale di superficie, ma interno.
- La specie A appare negli spettri in onda continua come un segnale privo di struttura iperfine. Si può quindi ipotizzare che la specie in analisi sia localizzata su un nucleo non magnetico.
- La specie A, non essendo visibile negli spettri EcoEPR, non è rifocalizzata in una sequenza a due impulsi. Quest'ultima informazione è particolarmente interessante. L'ampiezza di riga infatti, è inversamente proporzionale ai tempi di rilassamento, perciò righe strette come quelle da noi osservate per la specie A negli spettri in onda continua suggerirebbero tempi di rilassamento molto lunghi, che dovrebbero rendere la specie in esame facilmente visibile negli spettri EcoEPR. Il fatto che ciò non avvenga ci fa supporre che la specie in esame sia caratterizzata da una differenza nei tempi di rilassamento longitudinale e trasversale.

Le tre informazioni sopra elencate suggeriscono quindi che la specie A sia diversa dalle altre specie descritte nel corso dello studio ma di non semplice attribuzione. Le sue proprietà chimiche, tali da resistere all'attacco con ipoclorito, così come il fatto che sia localizzata su un nucleo non magnetico, ci inducono a pensare che si tratti di un difetto reticolare interno.

A scopo riassuntivo sono stati riportati in tabella 7, i valori di campo magnetico, di g e di ampiezza di riga per ciascuno dei segnali relativi alle specie radicaliche osservate negli spettri in analisi. Nel caso dello spettro EcoEPR registrato alla temperatura di 60 K per il campione di tessuto polmonare, sono riportati anche i valori $g_{//}$ e g_{\perp} relativi allo ione Cu (II).

SPETTRO	CAMPO MAGNETICO (G)	g	AMPIEZZA DI RIGA (G)	SPECIE
Spettro di polveri 298K	3390.5	2.062	4	A
Spettro di polveri simulato 35K	3349.5	$g_{xx} = 2.0050$ $g_{yy} = 2.0050$ $g_{zz} = 2.0060$	3 4 4	A
Spettro tessuto polmonare 298K	3388	2.0639	8 G	A
Spettro tessuto polmonare 35 K	3347. 8	2.0074	2.6	A
EcoEPR polveri 80 K	Picco 1 3438	$g_{\perp} = 2.0158$	40	B
	Picco 2 3359	$g_{//} = 2.0636$	194	
EcoEPR tessuto polmonare 60 K	Picco 1 3368	$g_{\perp} =$ 2.0588	107	Cu(II)
	Picco 2 3223	$g_{//} =$ 2.1512	297	
	Picco 3 3441.8	$g =$ 2.0145	39	B

Tabella 7

CAPITOLO 7 CONCLUSIONI

In questo lavoro, al fine di comprendere la possibile relazione che intercorre tra i principali soggetti di reattività superficiale della SLC e le patologie ad essa associate, sono stati analizzati con tecniche EPR in onda continua ed impulsate campioni di tessuto polmonare umano e di polveri inorganiche da esso estratte, prelevati da un paziente con una ricostruzione dell'esposizione professionale che ha evidenziato un'importante esposizione occupazionale a SLC. La spettroscopia EPR, grazie alla sua elevata selettività, ha permesso di individuare e caratterizzare le specie paramagnetiche presenti nei campioni in esame includendo radicali inorganici (della silice e non) e ioni di metalli di transizione. Alcune di queste specie si ritengono essere coinvolte nello sviluppo di patologie a carico del polmone.

Dall'analisi degli spettri registrati per entrambi i campioni, e avvalendoci dell'utilizzo di software di simulazione come SIM, sono state messe in evidenza le seguenti tipologie di specie paramagnetiche:

- ioni metallici: Fe(III) in intorno rombico, Fe(III) di ferridrite e Cu(II) . Presumibilmente il primo è legato ad una frazione inorganica, essendo osservato sia nel campione di polveri che in quello di tessuto. Si tratta di uno ione isolato, soggetto ad un forte campo dei leganti. Il Fe(III) concentrato, attribuito alla presenza di nanoparticelle di ferridrite, è anch'esso presente in entrambi i campioni, ma con differenze riconducibili ad esempio a cambiamenti di dimensione delle particelle o delle loro proprietà superficiali. E' già noto infatti, che l'azione dell'ipoclorito sulla ferritina, la proteina che accumula ferridrite nei tessuti biologici, provoca la liberazione delle nanoparticelle in essa contenute. Infine, per quanto riguarda il Cu(II), si presuppone coinvolto in strutture di tipo proteico, dove è frequentemente riscontrata una tetracoordinazione planare.
- la presenza di due sole specie radicaliche a carico della frazione mineralogica, di cui una (specie B) è probabilmente un centro perossidico della silice, come evidenziato da altri studi (Ikeya, 1991),

mentre la seconda (specie A) risulta di difficile attribuzione anche se alcune caratteristiche per essa osservate, come la capacità di sopravvivere all'attacco di ipoclorito, l'assenza d'interazione iperfine e la mancanza di rifocalizzazione, suggeriscono che si tratti di un difetto reticolare interno al minerale.

Le caratteristiche principali di questo studio sono state quelle di aver analizzato per la prima volta campioni di tessuto polmonare tal quale senza alcun tipo di artefatto derivante da possibili manipolazioni e di aver messo in evidenza la presenza di due specie radicaliche, una delle quali (specie A) non è mai stata osservata in studi precedenti. La presenza di questa specie sia nel campione di polveri che nel tessuto polmonare, esclude che essa derivi dall'azione dell'ipoclorito sul tessuto, e suggerisce che possa trattarsi di radicali non noti che si generano nel momento in cui la SLC interagisce con il tessuto biologico. Per fornire una sicura attribuzione della specie radicalica A da noi osservata, saranno necessari ulteriori studi, come indagini di EPR impulsato con sequenze a tre o più impulsi, che potranno permettere di ottenere importanti informazioni sui tempi di rilassamento, e in ultima analisi, sulla natura della specie in esame.

BIBLIOGRAFIA

- ✓ Aime S., Bergamasco B., Biglino D., Digilio G., Fasano M., Giamello E. and Lopiano L. (1997): EPR investigations of the iron domain in neuromelanin. *Biochim Biophys Acta*. **1361(1)**, 49-58.
- ✓ Akgün M. (2016): Denim production and silicosis. *Curr Opin Pulm Med*. **22(2)**, 165-169.
- ✓ Antonini F. and Hochstrasser G. (1972): Surface states of pristine silica surfaces. *Surface Sci*. **32**, 644-664.
- ✓ Atkins P.W. (1997): *Chimica Fisica*. Zanichelli, Bologna.
- ✓ Axelson O. (1978): Aspects of confounding in occupational health epidemiology. *Scand J Work Environ Health*. **4**, 85-89. 41.
- ✓ Ayscough P.B. (1967): *Electron Spin Resonance in Chemistry*. Methuen & co LTD, London.
- ✓ Baader S.L., Bill E., Trautwein A.X., Bruchelt G. and Matzanke B.F. (1996): Mobilization of iron from cellular ferritin by ascorbic acid in neuroblastoma SK-N-SH cells: an EPR study. *FEBS Lett*. **381(1-2)**, 131-134.
- ✓ Barboza C.E., Winter DH., Seiscento M., Santos Ude P. and Terra Filho M. (2008): Tuberculosis and silicosis: epidemiology, diagnosis and chemoprophylaxis. *J Bras Pneumol*. **34(11)**, 959-966.

- ✓ Berestetskaya V., Bystrikov A.V., Streletskij A.N. and Butyagin P. YU. (1980): Mechanochemistry of quartz surfaces. IV Interaction with oxygen. *Kinetika i Kataliz.* **21**, 1019-1022.

- ✓ Bertini I., Luchinat C. & Mani F. (2011): *Chimica Inorganica*. Milano, Casa Editrice Ambrosiana.

- ✓ Brown TP. & Rushton L. (2005): Mortality in the UK industrial silica sand industry. 2: A retrospective cohort study. *Occup Environ Med.* **62(7)**, 446-452.

- ✓ Cairncross E. & Kisting S. (2016): Platinum and Gold Mining in South Africa: The Context of the Marikana Massacre. *New Solut.* **25(4)**, 513-534.

- ✓ Capacci F., Annunziata M., Catoni F. & Nesi T. (2010): Il rischio SLC in edilizia. In: Capacci F., Carnevale F. & Di Benedetto F. "Silice Libera Cristallina nei Luoghi di Lavoro". Giunti O.S. Organizzazioni Speciali Firenze, Firenze: 67-77.

- ✓ Carneiro A.P., Braz N.F., Algranti E., Bezerra O.M., Araujo N.P., Amaral Eng Hyg L.S., Edmé J.L., Sobaszek A. and Chérot-Kornobis N. (2017): Silica exposure and disease in semi-precious stone craftsmen, Minas Gerais, Brazil. *Am J Ind Med.* **60(3)**, 239-247.

- ✓ Carobbi G. (1971): *Trattato di mineralogia*. Firenze, Edizioni Scientifiche S. p. A.

- ✓ Cassidy A., 't Mannetje A., van Tongeren M., Field JK., Zaridze D., Szeszenia-Dabrowska N., et al. (2007): Occupational exposure to

crystalline silica and risk of lung cancer: a multicenter case-control study in Europe. *Epidemiology*. **18(1)**, 36-43.

- ✓ Chen W., Bochmann F. and Sun Y. (2007): Effects of work related confounders on the association between silica exposure and lung cancer: a nested case-control study among Chinese miners and pottery workers. *Int Arch Occup Environ Health*. **80(4)**: 320-326.
- ✓ Cioni A.M. & Cassinelli C. (2010): Il rischio SLC nella ceramica artistica. In: Capacci F., Carnevale F. & Di Benedetto F. "Silice Libera Cristallina nei Luoghi di Lavoro". Giunti O.S. Organizzazioni Speciali Firenze, Firenze: 50-59.
- ✓ Cole SR. & Hernán MA. (2002): Fallibility in estimating direct effects. *Int J Epidemiol*. **31(1)**:163-165.
- ✓ Coli M. & Tanini C. (2010): Considerazioni sul rapporto tra natura delle rocce e possibilità di alterazioni termiche e/o fisiche a seguito di lavorazione. In: Capacci F., Carnevale F. & Di Benedetto F. "Silice Libera Cristallina nei Luoghi di Lavoro". Giunti O.S. Organizzazioni Speciali Firenze, Firenze: 151-154.
- ✓ Cotton F.A. & Wilkinson G. (1968): *Chimica Inorganica*. Milano, Casa Editrice Ambrosiana.
- ✓ Dehner C., Morales-Soto N., Behera R.K., ShROUT J., Theil E.C., Maurice P.A. and Dubois J.L. (2013): Ferritin and ferrihydrite nanoparticles as iron sources for *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Inorg Chem*. **18(3)**, 371–381.
- ✓ Dikanov S. A. & Tsvetkov Y. D. (1992): *Electron spin echo envelope modulation (Eseem) spectroscopy*. CRC Press, United State of America.

- ✓ Donaldson K. & Borm PJ. (1998): The quartz hazard: a variable entity.;
Ann Occup Hyg. **42(5)**, 287-294.

- ✓ Elkard I., Zaghba N., Benjelloun H., Bakhatar A. and Yassine
N. (2016): Silicotuberculosis. Rev Pneumol Clin,
72(3),179-183.

- ✓ Erren TC., Glende CB., Morfeld P. and Piekarski C. (2009): Is
exposure to silica associated with lung cancer in the absence of
silicosis? A meta-analytical approach to an important public health
question. Int Arch Occup Environ Health. **82**, 997-1004.

- ✓ Fubini B., Giamello E., Pugliese L. and Volante M. (1989 a):
Mechanically induced defects in quartz and their impact on
pathogenicity. Sol. State Ion. **32-33**, 334-343.

- ✓ Fubini B., Bolis V., Giamello E., Pugliese L. and Volante M. (1989 b):
The formation of oxygen reactive radicals at the surface of the crushed
quartz dusts as possible cause of silica pathogenicity. In: Mossman
B.T. and Begin R.O. "Effect on mineral dusts on cells". NATO ASI
Series Springer-Verlag, Berlin. **H 30**, 205-214.

- ✓ Fubini B., Giamello E. and Volante M. (1989 c): The possible role of
surface oxygen species in quartz pathogenicity. Inorg. Chim. Acta.
163, 187-189.

- ✓ Fubini B., Giamello E., Volante M., Bolis V., (1990): chemical
functionalities at the silica surface determining its reactivity when
inhaled. formation and reactivity of surface radicals. Toxicology and
Industrial Health. **6(6)**, 571-598.

- ✓ Fubini B. & Fenoglio I. (2007): Toxic Potential of Mineral Dusts, fluid-
fluid interactions reviews in mineralogy & geochemistry. **65**, 407-414.

- ✓ Giamello E., Fubini B., Volante M. and Costa D. (1990): Surface oxygen radicals originating via redox reactions during the mechanical activation of crystalline SiO₂ in hydrogen peroxide. *Colloids and surfaces*. **45**, 155-165.

- ✓ Giovanazzi A. (2010): L'originale percorso del Network Italiano Silice. In: Capacci F., Carnevale F. & Di Benedetto F. "Silice Libera Cristallina nei Luoghi di Lavoro". Giunti O.S. Organizzazioni Speciali Firenze, Firenze: 19-25.

- ✓ Glerup J., Weihe H. (1997): Magnetic Susceptibility and EPR Spectra of (μ - Hydroxo)bis[pentaamminechromium(III)] Chloride Monohydrate. *Inorg.Chem.***36**, 2816-2819.

- ✓ Goodman B.A. and Raynor J.B. (1970): *Advances in inorganic chemistry and radiochemistry*. Academic Press, New York and London, **13**.

- ✓ Hamilton R.F. Jr, Thakur S.A. and Holian A. (2008): Silica binding and toxicity in alveolar macrophages. *Free Radic Biol Med*. **44**, 1246–1258.

- ✓ Harrison P.M. (1986): The structure and function of ferritin: *Biochemical Education*. **14(4)**, 154-162.

- ✓ IARC (1987): Silica and some silicates. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. **42**, IARC, Lione.

- ✓ IARC (1997): Silica, some silicates, coal dust and para-aramid-fibrils. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. **68**, IARC, Lione.

- ✓ IARC (2012): Arsenic, metals, fibres and dusts. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. **100**, IARC, Lione.

- ✓ Ikeya M. (1993): New Applications of Electron Spin Resonance. Dating, Dosimetry and Microscopy. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore.

- ✓ Kevan L. & Bowman M.K. (1990): Modern pulsed and continuous-wave electron spin resonance. John Wiley & Sons, United States of America.

- ✓ Kolbanev V., Berestetskaya V. and Butyagin P. YU. (1980): Mechanochemistry of quartz surfaces. VI Properties of peroxide SiOOOSi. Kinetika i Kataliz. **21**, 1154-1158.

- ✓ Kriebel D., Zeka A., Eisen EA., and Wegman DH.(2004): Quantitative evaluation of the effects of uncontrolled confounding by alcohol and tobacco in occupational cancer studies. Int J Epidemiol. **33**,1040-1045. 43.

- ✓ Kurihara N. & Wada O. (2004): Silicosis and smoking strongly increase lung cancer risk in silica-exposed workers. Ind Health, **42(3)**, 303-314.

- ✓ La Bella M. (2015) : Indagini in microfluorescenza X e microXANES di silice libera cristallina in tessuto polmonare. Tesi di laurea non pubblicata presso l'Università degli Studi di Firenze. A.A. 2015/2016.

- ✓ Lacasse Y., Martin S., Gagné D. and Lakhal L. (2009): Dose-response meta-analysis of silica and lung cancer. Cancer Causes Control; **20(6)**, 925-33.

- ✓ Lee S., Matsuzaki H., Kumagai-Takei N., Yoshitome K., Maeda M., Chen Y., Kusaka M., Urakami K., Hayashi H., Fujimoto W., Nishimura Y. and Otsuki T. (2014): Silica exposure and altered regulation of autoimmunity. *Environ Health Prev Med.* **19(5)**, 322-329.

- ✓ McDonald JC., McDonald AD., Hughes JM., Rando RJ. and Weill H. (2005): Mortality from lung and kidney disease in a cohort of North American industrial sand workers: an update. *Ann Occup Hyg.* **49(5)**, 367-373.

- ✓ NEPSI (2017), <http://www.nepsi.eu>

- ✓ Normohammadi M., Kakooei H., Omidi L., Yari S. and Alimi R. (2016): Risk Assessment of Exposure to Silica Dust in Building Demolition Sites. *Saf Health Work.* **7(3)**, 251-255.

- ✓ Omidianidost A., Ghasemkhani M., Kakooei H., Shahtaheri S.J. and Ghanbari M. (2016): Risk Assessment of Occupational Exposure to Crystalline Silica in Small Foundries in Pakdasht, Iran. *J Public Health.* **45(1)**, 70-75.

- ✓ Pelucchi C., Pira E., Piolatto G., Coggiola M., Carta P. and La Vecchia C. (2006): Occupational silica exposure and lung cancer risk: a review of epidemiological studies 1996-2005. *Ann Oncol.* **17(7)**, 1039-1050.

- ✓ Plumlee GS., Morman SA., Ziegler TL. (2006): The toxicological geochemistry of Earth materials: An overview of processes and the interdisciplinary methods used to understand them. In: Sahai N. and Schoonen MAA. *Medical Mineralogy and Geochemistry, Reviews in Mineralogy & Geochemistry.* **64**, 5-57

- ✓ Poinen-Rughooputh S., Rughooputh M. S., Guo Y., Rong Y. and Chen W. (2016): Occupational exposure to silica dust and risk of lung cancer: an updated meta-analysis of epidemiological studies. *BMC Public Health*. **16(1)**, 1137.

- ✓ Poli C., Bartoli D. & Farina G.A. (2010): Il rischio SLC nella produzione del vetro. In: Capacci F., Carnevale F. & Di Benedetto F. "Silice Libera Cristallina nei Luoghi di Lavoro". Giunti O.S. Organizzazioni Speciali Firenze, Firenze: 46-49.

- ✓ Preller L., Van den Bosch L., Van den Brandt P., Kauppinen T. and Goldbohm A. (2009): Occupational exposure to silica and lung cancer risk in the Netherlands. *Occup Environ Med*. **67(10)**, 657-663.

- ✓ Pukkala E., Guo J., Kyyronen P., Lindbohm ML., Sallmen M. and Kauppinen T. (2005): National job-exposure matrix in analyses of census-based estimates of occupational cancer risk. *Scand J Work Environ Health*. **31**, 97-107.

- ✓ Ratzig V.A. and Bystrikov A.V. (1978): ESR study of chemically active centers on the surface of quartz. *Kinetika i Kataliz*. **L9**, 713-779.

- ✓ Richiardi L., Forastiere F., Boffetta P., Simonato L. and Merletti F. (2005): Effect of different approaches to treatment of smoking as a potential confounder in a case-control study on occupational exposures. *Occup Environ Med*. **62**,101-104.

- ✓ Romanelli M., Bartali L., Di Benedetto F., Innocenti M., Tesi S., Bafaro E., Fornaciai G., D'Acapito F., Montegrossi G. and Pardi L.A. (2010): Caratterizzazione della SLC: proprietà e alterazioni chimico-fisiche. In: Capacci F., Carnevale F. & Di Benedetto F. "Silice Libera Cristallina

nei Luoghi di Lavoro”. Giunti O.S. Organizzazioni Speciali Firenze, Firenze: 192-267.

- ✓ Sciarra G., Scancarello G., Banchi B., Vicentini M., Giomarelli A., Capacci F. and Carnevale F. (2010): SLC: problematiche relative al campionamento e alla scelta del selettore. In: Capacci F., Carnevale F. & Di Benedetto F. “Silice Libera Cristallina nei Luoghi di Lavoro”. Giunti O.S. Organizzazioni Speciali Firenze, Firenze: 122-135.
- ✓ Simonato L., Vineis P. and Fletcher AC. (1988): Estimates of the proportion of lung cancer attributable to occupational exposure. *Carcinogenesis*. **9**, 1159-1165. 42.
- ✓ Smith AH. & Lopipero PA. & Barroga VR. (1995): Meta-analysis of studies of lung cancer among silicotics. *Epidemiology*. **6**, 617-624.
- ✓ Stayner L., Steenland K., Dosemeci M. and Hertz-Picciotto I. (2003): Attenuation of exposure response curves in occupational cohort studies at high exposure levels. *Scand J Work Environ Health*. **29(4)**, 317-324.
- ✓ Steenland K. & Stayner L. (1997): Silica, asbestos, man-made mineral fibers, and cancer. *Cancer Causes Control*. **8**: 491-503.
- ✓ Steenland K., Mannetje A., Boffetta P., Stayner L., Attfield M., Chen J., et al. (2001): International Agency for Research on Cancer. Pooled exposure-response analyses and risk assessment for lung cancer in 10 cohorts of silica-exposed workers: an IARC multicentre study. *Cancer Causes Control*. **12(9)**, 773-784.
- ✓ Swanepoel A.J., Rees D., Renton K., Swanepoel C., Kromhout H. and Gardiner K. (2010): Quartz exposure in agriculture: literature review and South African survey. *Ann Occup Hyg*. **54(3)**, 281-292.

- ✓ Taiwo F.A. (2003): Electron paramagnetic resonance spectroscopic studies of iron and copper proteins. *Spectroscopy*, IOS Press. **17**, 53–63.

- ✓ Tempieri F. (2012): Studio tramite risonanza di spin elettronico di materiali grafenici di nuova produzione. Tesi di laurea magistrale, discussa alla facoltà di Scienze Chimiche, Università degli studi di Padova. A.A. 2011/2012.

- ✓ Vigliani EC. (1958): Sull'origine immunitaria della silicosi. Parte I: considerazioni generali. *Mad Lav* 2001; **92(6)**, 456-460.

- ✓ Zhang W., Zhang M., Wang Z., Cheng Y., Liu H., Zhou Z., Han B., Chen B., Yao H. and Chao J. (2016): Neogambogic acid prevents silica-induced fibrosis via inhibition of high-mobility group box 1 and MCP-1-induced protein 1. *Toxicol Appl Pharmacol.* **309**, 129–140.

Innanzitutto vorrei ringraziare il prof. Francesco di Benedetto e il prof. Maurizio Romanelli, per la grande disponibilità e appoggio con cui mi hanno accompagnato in questo percorso di tesi e per aver avuto, con la loro competenza, la capacità di farmi appassionare ancora di più alla spettroscopia.

Vorrei ringraziare anche il prof. Massimo Innocenti per avermi dato la possibilità di svolgere questo lavoro di tesi.

Un ringraziamento speciale va ai miei genitori e a mia sorella, per avermi sempre supportato in questo percorso e avermi insegnato a credere nei miei obiettivi, senza di loro oggi non potrei festeggiare questo risultato.

Ringrazio le mie compagne di Università Elisabetta, Eleonora e Costanza perché senza la loro complicità e amicizia questo percorso sarebbe stato molto più difficile. E' stato davvero bello aver raggiunto questo traguardo insieme! Un grazie anche a Giada per le risate e per le nostre insuperabili conversazioni di Chimica Fisica.

Un ringraziamento particolare va a Beatrice, non solo per le grandi quantità di appunti ma soprattutto per esserci sempre quando ho bisogno e avermi insegnato a non mollare mai.

Infine un grazie di cuore va a Cristina per la vera amicizia che mi ha regalato in questi anni e per essermi sempre stata accanto.