

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE  
"AMEDEO AVOGADRO"



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

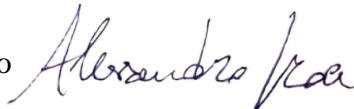
Dipartimento di scienze e innovazione tecnologica

*Corso di Laurea Magistrale in Biologia  
Curriculum Agro-Ambientale*

TESI DI LAUREA

*RICERCA DI INQUINANTI IN CAMPIONI PLACENTARI  
UMANI MEDIANTE TECNICHE DI MICROSCOPIA E  
SPETTROSCOPIA MICRO-RAMAN*

Relatore: Dott. CROCE Alessandro



Correlatore: Dott.ssa BERTOLOTTI Marinella

Tutor esterno: Dott.ssa BELLIS Donata

Candidata: CASARONE Giulia



Anno Accademico 2023/2024

*A Letizia e Lorenzo*

# INDICE

---

1 – SCOPO DEL LAVORO	4
2 – INTRODUZIONE	6
2.1 – LA PLACENTA	6
2.1.1 - STRUTTURA PLACENTARE	8
2.1.2 – ISTOLOGIA PLACENTARE	11
2.1.3 – CIRCOLAZIONE PLACENTARE	15
2.1.4 – FUNZIONI PLACENTARI	17
2.1.5 – POSSIBILI PATOLOGIE E COMPLICANZE IN GRAVIDANZA	19
2.1.5.1 - ABORTO SPONTANEO	19
2.1.5.2 - GRAVIDANZA ECTOPICA	20
2.1.5.3 - PLACENTA PREVIA	21
2.1.5.4 - PLACENTA ACCRETA	22
2.1.5.5 - DISTACCO DELLA PLACENTA	22
2.1.5.6 - INFEZIONI PLACENTARI	23
2.1.5.7 – PREECLAMPSIA	23
2.1.5.8 - INSUFFICIENZA UTERO-PLACENTARE	24
2.1.5.9 - MOLA IDATIFORME, CORIOCARCINOMA E TUMORE TROFOBLASTICO	24
2.2 – ASBESTO	26
2.2.1 – ESPOSIZIONE IN GRAVIDANZA ED EFFETTI NEGATIVI	26
2.3 - MICROPLASTICHE	29
2.3.1 – ESPOSIZIONE IN GRAVIDANZA ED EFFETTI NEGATIVI	29
2.4 – METALLI PESANTI	31
2.4.1 – ESPOSIZIONE IN GRAVIDANZA ED EFFETTI NEGATIVI	31
2.4.1.1 – ALLUMINIO	32
2.4.1.2 – ARSENICO	33
2.4.1.3 – CADMIO	33
2.4.1.4 – CROMO	34
2.4.1.5 – MERCURIO	35

2.4.1.6 – NICHEL	35
2.4.1.7 – PIOMBO	36
2.4.1.8 – ALTRI METALLI	37
3 – MATERIALI E METODI	39
3.1 – PREPARAZIONE DEI CAMPIONI DI PLACENTA	39
3.1.2–PREPARAZIONE SEZIONI ISTOLOGICHE E COLORAZIONE	39
3.1.3 – DIGESTIONE CHIMICA	43
3.2 – TECNICHE MICROSCOPICHE	44
3.2.1 – MICROSCOPIA OTTICA	44
3.2.1.1 – MICROSCOPIO OTTICO A LUCE TRASMESSA	45
3.2.1.2 – MICROSCOPIO OTTICO A LUCE POLARIZZATA	46
3.2.2 – MICROSCOPIO ELETTRONICO A SCANSIONE (SEM)	47
3.2.2.1 – INTERAZIONE FRA ELETTRONI E CAMPIONE	51
3.2.2.2 – RILEVATORI DI ELETTRONI	52
3.2.2.3 – MODALITA' OPERATIVE DEL SEM/EDS	55
3.2.3 – SPETTROSCOPIA MICRO-RAMAN	57
3.2.3.1 – STRUMENTAZIONE	60
3.2.3.2 – SPETTRO RAMAN: VIBRAZIONI RETICOLARI	61
4 – RISULTATI	65
4.1 – CASO 2	65
4.1.2 – ANALISI IN MICROSCOPIA OTTICA	65
4.1.3 – ANALISI IN MICROSCOPIA ELETTRONICA	68
4.1.4 – ANALISI IN SPETTROSCOPIA MICRO-RAMAN	80
5 – CONCLUSIONI	82
6 – BIBLIOGRAFIA	85
7 – SITOGRAFIA	90
8 – RINGRAZIAMENTI	91

# 1 – SCOPO DEL LAVORO

---

Con il presente studio, svolto presso il Dipartimento della Attività Integrate Ricerca e Innovazione (DAIRI) - Laboratorio integrato ricerca amianti, Ospedale “S. Spirito” Casale Monferrato, in collaborazione con il Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica (DiSIT) dell’UPO, si è voluta valutare una possibile correlazione fra gli inquinanti ambientali e le patologie e/o malformazioni sviluppatesi nel tessuto placentare umano durante la gestazione.

Si è scelto di studiare il tessuto placentare in quanto l’esposizione ad inquinanti ambientali in periodo gestazionale può causare esiti avversi alla gravidanza come ad esempio malformazioni, patologie fetali e aborti, ma anche patologie e malfunzionamenti placentari. L’esposizione a sostanze tossiche può essere nociva sia per la madre che per il feto in via di sviluppo.

Nel valutare tutti i possibili effetti negativi, il tessuto placentare è stato analizzato sia dal lato embrio-fetale (versante coriale) che dal lato materno (versante deciduale).

La collaborazione fra diverse figure del personale medico, anatomopatologi, mineralisti e biologi, ricoprenti ruoli diversi all’interno della ricerca, è stata di fondamentale importanza per la riuscita del lavoro. Infatti, le conoscenze dell’anatomopatologo sono necessarie per evidenziare eventuali patologie presenti nel tessuto in studio mentre i biologi e i mineralisti valutano la probabile correlazione fra lo stato patologico e possibili cause derivanti da contaminazione ambientale. Il lavoro è stato eseguito anche in collaborazione con il Centro Interdipartimentale per lo Studio degli Amianti e di altri Particolati Nocivi "Giovanni Scansetti" dell’Università di Torino, presso il Dipartimento di Scienze della Terra, diretto dalla Prof.ssa Elena Belluso.

Nel seguente studio è stato analizzato il tessuto placentare umano per la ricerca di diversi contaminanti, fra cui fibre minerali classificabili come amianto, microplastiche e in particolare sulla presenza di metalli pesanti come possibili cause di esiti avversi alla gravidanza ed i loro possibili effetti negativi sia sulla madre che sul feto in via di sviluppo.

Il lavoro ha anche lo scopo di dimostrare l’importanza di diverse tecniche di analisi, come la microscopia ottica, la microscopia elettronica a scansione con annessa microsonda in

dispersione di energia (SEM/EDS) e la spettroscopia micro-Raman, per la ricerca di particelle e componenti estranee al tessuto preso in considerazione. Queste tecniche hanno trovato ampio utilizzo, con risultati positivi, nella ricerca di fibre di amianto all'interno di tessuto respiratorio (Rinaudo et al., 2010). Per questo motivo si è scelto di analizzare il tessuto placentare con tali tecniche per verificarne le loro potenzialità anche in tessuti extrarespiratori.

Le tecniche usate hanno richiesto 1) che il campione, fissato in formalina, venisse incluso in paraffina, tagliato in sezioni sottili da 3-5 micron grazie all'utilizzo del microtomo e in seguito colorato in Ematossilina – Eosina (EE). Una volta ottenuto il vetrino, esso è stato analizzato prima in microscopia ottica, per una visione generale della sezione, dopodiché si è passati a tecniche quali la microscopia elettronica a scansione e la spettroscopia micro-Raman per ricercare ed identificare possibili inquinanti presenti nel campione; 2) che il campione venisse digerito con ipoclorito di sodio secondo la tecnica standardizzata (Belluso et al., 2006; Rinaudo et al., 2021) filtrato su membrane in policarbonato Millipore che poi sono state allestite su pin-stub per l'osservazione mediante SEM/EDS.

Queste due tecniche diverse permettono un loro confronto e risultati più completi.

## 2 – INTRODUZIONE

---

### **2.1 – LA PLACENTA**

La gravidanza umana ha una durata di circa nove mesi. Il periodo gestazionale viene diviso in trimestri: primo trimestre, dalla settimana zero alla dodicesima settimana, secondo trimestre, dalla tredicesima settimana alla ventiquattresima, e terzo trimestre, dalla venticinquesima settimana fino al momento del parto. Durante tutto il periodo della gravidanza, il corpo della donna si modifica per accogliere e far crescere il feto in via di sviluppo.

La placenta è un grande organo fetale temporaneo, il primo a svilupparsi durante la gravidanza; è un organo complesso che permette prima all'embrione e poi al feto di nutrirsi, respirare, eliminare le sostanze di rifiuto e difendersi da sostanze nocive e agenti patogeni (batteri e virus) cui può essere esposto durante la vita in utero (De Felici et al., 2020). La placenta si forma nell'utero e oltre che per il feto risulta importante anche per la madre, in quanto fornisce gli ormoni necessari per una corretta gravidanza.

Essa collega il feto in via di sviluppo all'utero e durante il parto viene espulsa (Staud et al., 2018). La placenta è definita come la fusione delle membrane fetali con la mucosa uterina ai fini dello scambio materno-fetale di nutrienti, gas e substrati di scarto. Lo sviluppo della placenta inizia al sesto o settimo giorno dopo il concepimento (Myren et al., 2007); essa si sviluppa dal trofotoderma, cioè lo strato esterno dell'embrione; in questa prima fase l'embrione preimpiantato, detto blastocisti, si trova fra la massa cellulare interna e il trofotoderma. La parte di trofotoderma situata sotto la massa cellulare interna, il trofotoderma polare, si unisce con l'endometrio, l'epitelio superficiale della mucosa uterina (Turco et al., 2019). L'endometrio uterino si trasforma e viene chiamato decidua, esso è costituito da cellule deciduali, queste cellule sono molto grosse rotonde e poligonali in cui il citoplasma è ripieno di glicogeno e lipidi. I cambiamenti cellulari e vascolari dell'endometrio durante questa fase gestazionale sono definiti "reazione deciduale" (Gude et al., 2004). Dal settimo giorno inizia l'annidamento. Durante questa fase il trofoblasto, strato cellulare periferico dell'ovulo da cui poi si originerà la placenta, si trasforma in corion. La comparsa dei vasi sanguigni nel corion è il primo passo nella formazione di una placenta funzionante, la vascolarizzazione dell'embrione e della placenta iniziano circa 21 giorni dopo il concepimento. Nella terza settimana di sviluppo, il mesoderma si estende

lungo l'asse di ciascuno dei villi trofoblastici, formando i villi coriali in contatto con i tessuti materni (Martini et al., 2019). Nei villi coriali si sviluppano le vene e le arterie che si incanalano poi nel cordone ombelicale; il cordone ombelicale è un tubo cilindrico che origina dalla superficie ventrale dell'embrione e lo collega alla faccia interna, quella fetale, della placenta dove i villi sono bagnati dal sangue materno. Il cordone ombelicale mantiene l'embrione attaccato alla placenta fino a fine gravidanza.

Il cordone ombelicale definitivo si forma a seguito di diverse trasformazioni. Alla fine della terza settimana di sviluppo, i vasi sanguigni trasformano il peduncolo di connessione in peduncolo ombelicale; alla fine del terzo mese l'amnios espandendosi in tutta la cavità corionica fa sì che il peduncolo ombelicale vada a contatto con il sacco vitellino formandovi attorno un rivestimento di membrana amniotica, si origina quindi il cordone ombelicale primitivo. Al suo interno troviamo l'allantoide, la vena e le arterie ombelicali, il dotto vitellino e i vasi vitellini. In seguito alla scomparsa del dotto e dei vasi vitellini si forma il cordone ombelicale definitivo. Il cordone ombelicale definitivo è rivestito esternamente dalla membrana amniotica e contiene una vena e due arterie ombelicali. Al termine della gravidanza il cordone ombelicale ha una lunghezza di circa 50 cm per uno spessore di 1-2 cm (Barbieri et al., 2015).

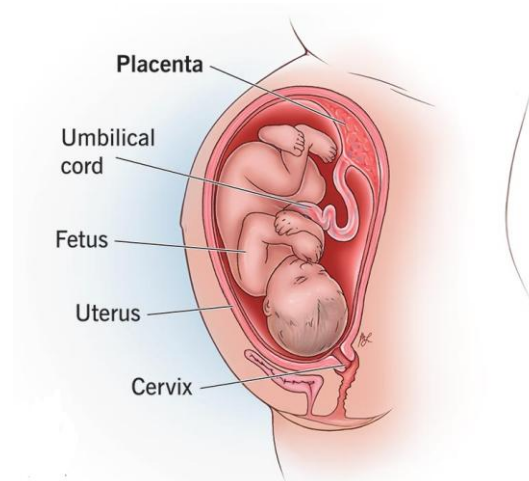


Fig. 1: Schema rappresentativo di utero, placenta e cordone ombelicale  
(<https://my.clevelandclinic.org/health/body/22337-placenta>)



## 2.1.1 - STRUTTURA PLACENTARE

La placenta è costituita da due porzioni: una embrio-fetale la quale deriva dal corion frondosum (porzione con villi più abbondanti), e una materna, che deriva dalla decidua basale. La porzione materna, è formata dalla decidua basale, presenta 10-30 rigonfiamenti, i cosiddetti cotiledoni materni, mentre la porzione embrio-fetale è definita da una lamina connettivale chiamata placca corionica, contenente il punto di attacco del cordone ombelicale da cui si distribuiscono all'intero disco placentare le arterie e le vene ombelicali (De Felici et al., 2020).

L'amnios, una membrana derivante dall'insieme di ectoderma e mesoderma, riveste la superficie embrio-fetale della placenta e il cordone ombelicale donandogli un aspetto liscio. Mentre l'embrione, e più tardi il feto, si ingrandisce, questa membrana continua ad espandersi, aumentando il volume della cavità amniotica (Martini et al., 2019). La cavità amniotica contiene il liquido amniotico, il quale ha il compito di circondare e proteggere da urti l'embrione e il feto.

Fra la decidua basale e la placca corionica troviamo gli spazi intervillosi contenuti il sangue materno. Lo spazio intervilloso è completamente rivestito da un sincizio multinucleato chiamato sinciziotrofoblasto. Il sangue materno entra in questo spazio attraverso le arterie endometriali a spirale, bagna i villi e torna indietro attraverso le vene endometriali (Gude et al., 2004; Fig. 2).

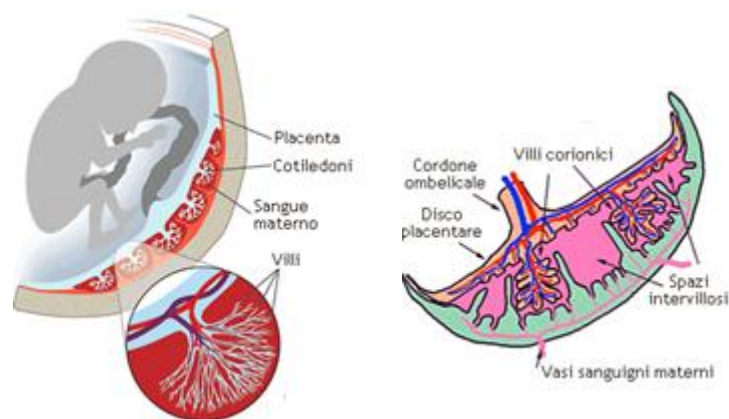


Fig. 2: Disegno schematico di placenta

(<https://www.my-personaltrainer.it/salute/placenta.html>)

Il sangue scorre dal feto alla placenta tramite due arterie ombelicali e torna al feto tramite un'unica vena ombelicale. I villi coriali forniscono la superficie per gli scambi attivi e passivi fra i torrenti ematici fetale e materno (Martini et al., 2019).

Il sangue materno è separato dal sangue embrio-fetale solo da un tessuto derivante dal corion, per questo motivo la placenta umana è considerata di tipo emocoriale (De Felici et al., 2020).

La placenta, nel suo periodo di sviluppo, è costituita da una placenta primitiva e una placenta definitiva. Nella placenta primitiva, struttura sferica che avvolge completamente il corion, i villi sono distribuiti su tutta la superficie esterna del corion. La placenta primitiva inizia a formarsi durante la seconda settimana di sviluppo, in questo periodo la decidua circonda la blastocisti e il sangue materno scorre nelle lacune del sinciziotrofoblasto fino alla superficie esterna del corion. In questo modo è garantita la nutrizione isotrofica della blastocisti, ma dopo pochi giorni crescendo l'embrione si allontana dal sincizio e la nutrizione diventa emotrofica grazie alla formazione dell'apparato circolatorio primitivo. I villi coriali si sviluppano, come semplici protuberanze, durante la seconda settimana di gravidanza e dal tredicesimo giorno si allungano diventando villi primari. Essi sono cordoni rivestiti di sinciziotrofoblasto con all'interno i citotrofoblasti (Barbieri et al., 2015). Dal quindicesimo giorno i villi primari continuano a crescere e si trasformano in villi secondari i quali presentano una superficie costituita dal sinciziotrofoblasto disposto su uno strato di cellule citotrofoblastiche che hanno il compito di rivestire un asse di mesoderma extraembrionale. Intorno alla terza settimana di gestazione nel mesoderma dei villi si sviluppano i vasi, i villi secondari diventano villi terziari e nella quarta settimana il sistema dei vasi dei villi si collega a quello dell'embrione (De Felici et al., 2020; Fig. 3).

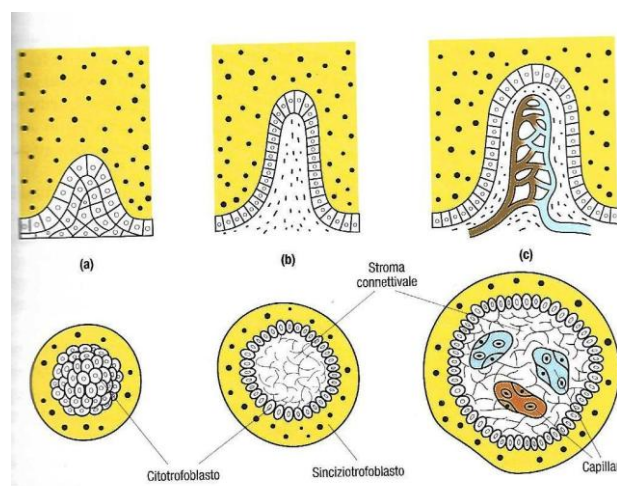


Fig. 3: Sezioni di villi nei tre stadi di sviluppo; (a) villo primario, (b) villo secondario, (c) villo terziario (Barbieri et al., 2015)

Tutte queste modifiche suddividono la decidua in tre regioni: la decidua basale, è la porzione adiacente ai villi che non sporge nella cavità dell'utero; la decidua capsulare, è la porzione che si trova fra i villi e la cavità uterina e la decidua parietale, la porzione che non risulta a contatto con i villi (De Felici et al., 2020; Fig. 4).

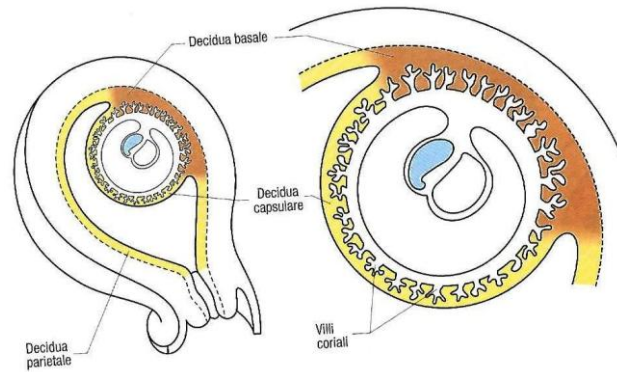


Fig.4: Disegno rappresentativo della divisione della decidua in decidua basale, capsulare e parietale (Barbieri et al., 2015)

Diversamente dalla placenta primitiva, in quella definitiva i villi si trovano solamente nella porzione embrionale del corion. L'espansione del corion e dell'amnios causano lo stiramento e infine la scomparsa dei villi presenti nella parte della decidua capsulare e il corion che li contiene viene chiamato corion liscio, mentre i villi presenti nella parte di decidua basale, per compensare la scomparsa di quelli dal lato opposto, diventano più folti, lunghi e ramificati. La porzione embrionale che presenta i villi viene chiamata corion frondosum e insieme alla decidua basale forma la placenta definitiva (De Felici et al., 2020; Fig.5).

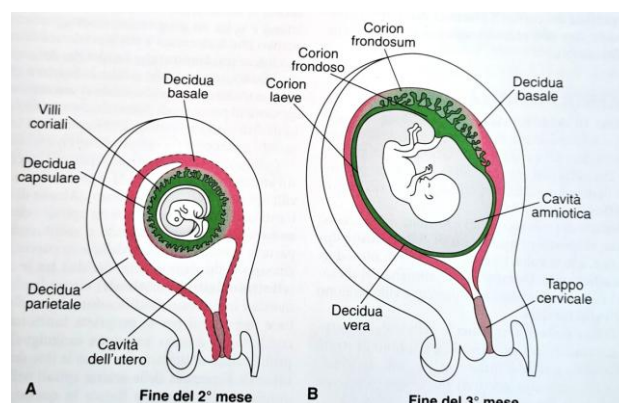


Fig. 5: Disegno schematico di placenta primitiva (A) e placenta definitiva (B) (De Felici et al., 2020)

La placenta definitiva diventa riconoscibile dal quarto mese di sviluppo, essa ha una forma discoidale. Durante il terzo mese di gravidanza, oltre all'espansione del corion, vi è anche l'espansione, molto più rapida, dell'amnios. Il sacco amniotico va quindi a riempire tutto lo spazio disponibile all'interno del corion ed entrando a contatto forma con la sua parete una membrana corioamniotica; in questa fase si sviluppa anche il cordone ombelicale primitivo (Barbieri et al., 2015).

Durante la gravidanza, a seguito della crescita del feto e dell'aumento di volume dell'utero, la placenta occupa il 25-30% della superficie interna dell'utero e a fine gravidanza essa ha un diametro di circa 15-20 cm, uno spessore di circa 3 cm e un peso di circa 500-600g (De Felici et al., 2020). La parte materna è convessa, ricoperta di decidua basale spongiosa con la presenza di cotiledoni materni (10-30 rigonfiamenti), la parte fetale è rivestita dalla membrana corioamniotica con aspetto liscio e il punto di attacco del cordone ombelicale (Barbieri et al., 2015; Fig. 6).



Fig. 6: Placenta a termine, a sinistra lato fetale; a destra lato materno  
(Resta et al., 2005)

### **2.1.2 – ISTOLOGIA PLACENTARE**

L'istologia placentare cambia durante il progresso della gravidanza, come già accennato al termine della gravidanza la placenta dal lato fetale risulta avere una superficie liscia, data dal rivestimento amniotico, ed è trasparente e sul corion si possono vedere le arterie e le vene allantocoriali le quali dal cordone ombelicale si ripartono su tutto il disco placentare. Il lato materno risulta essere una superficie opaca, non avendo alcun rivestimento

epiteliale, questa parte è la zona spongiosa della decidua che, al momento del parto, si è staccata dalla decidua compatta. Delle profonde incisive frazionano il parenchima in cotiledoni materni che comprendono i cotiledoni fetali. Tutta la placenta è piena di villi coriali i quali si trovano nel sangue materno e fra il corion fetale e materno (Resta et al., 2005). I villi placentari si distinguono in principali, intermedi immaturi, mesenchimali, intermedi maturi e terminali, in base alla struttura e all'organizzazione vascolare

Il villo principale è la struttura portante dell'albero villosa da cui si diramano i diversi villi; esso presenta al centro un'arteria e una vena con parete muscolare propria e ben strutturata con stroma denso e collagene (Resta et al., 2005; Fig.7).

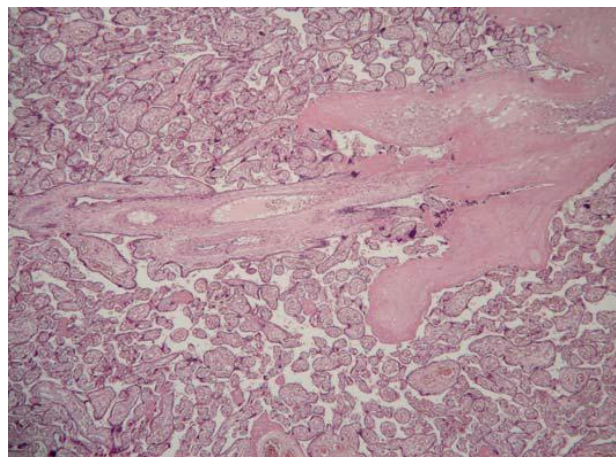


Fig. 7: Villo principale  
(Resta et al., 2005)

Le ramificazioni finali dei villi principali possono dar origine ai villi liberi, all'interno del sangue materno, o a villi di ancoraggio che si saldano alla decidua materna (Resta et al., 2005).

I villi di ancoraggio uniscono la placca corionica con l'albero villosa, costituiscono il 20-25% del volume di una placenta a termine. Sono formati da stroma fibroso condensato e presentano alcune arterie e vene centrali (Fig. 8).



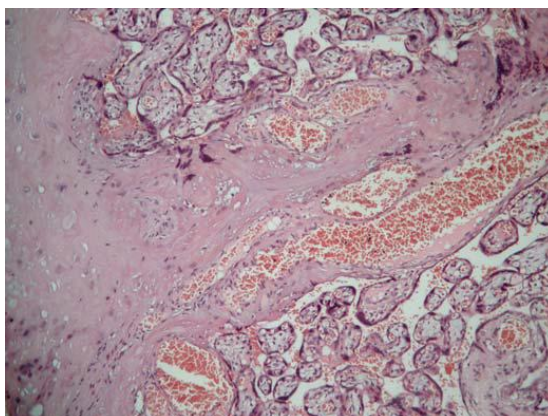


Fig. 8: Villi di ancoraggio  
(Resta et al., 2005)

Nella placenta del primo e del secondo trimestre troviamo numerosi villi intermedi immaturi, i quali risultano poi sparsi nella placenta del terzo trimestre diventando villi intermedi maturi. Possiamo trovare dei villi intermedi più piccoli la cui superficie villosa presenta un solo strato di citotrofoblasti e dei villi germogli che daranno origine ai villi mesenchimali. Nei villi intermedi immaturi lo stroma è edematoso e cellulato, all'interno dei capillari si possono ancora trovare alcuni eritrociti fetali nucleati. All'interno del reticolo dello stroma si trovano le cellule di Hoffbauer le quali svolgono l'attività dei macrofagi (Resta et al., 2005; Fig. 9).

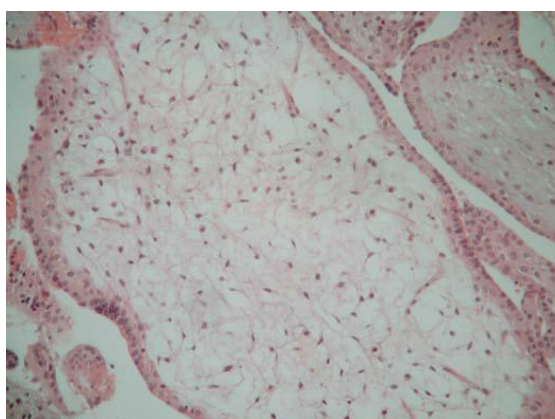


Fig. 9: Villi intermedi immaturi  
(Resta et al., 2005)

I villi coriali del primo trimestre, villi mesenchimali primitivi, presentano un doppio strato di trofoblasti, elevato stroma edematoso, cellule di Hoffbauer, pochi capillari e centralmente vi sono gli eritrociti nucleati. Lo stroma centrale è circondato da due strati

distinti di epitelio, il più esterno è il sinciziotrofoblasto mentre quello interno è il citotrofoblasto (Kumar et al., 2015; Fig. 10). I villi mesenchimali originano dalle gemme dei villi intermedi immaturi, che durante tutto il periodo della gravidanza, continuano a ramificarsi dando origine a nuovi villi mesenchimali che maturano poi in villi principali (Resta et al., 2005).

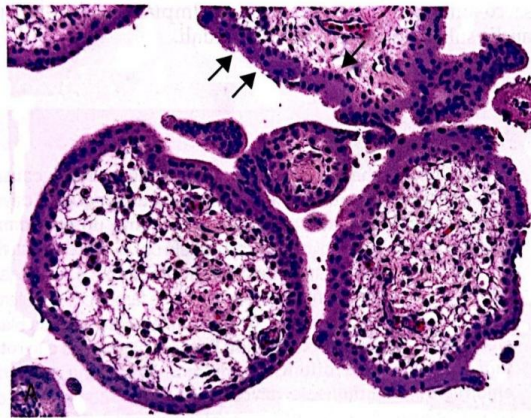


Fig. 10: Villi mesenchimali, la doppia freccia indica il sinciziotrofoblasto e la freccia il citotrofoblasto (Kumar et al., 2015)

I villi intermedi maturi si sviluppano nel terzo trimestre dai villi intermedi immaturi, questi villi non presentano più uno stroma reticolato, ma centrale e collagenizzato. I villi intermedi maturi hanno un profilo nodoso il quale presenta delle protuberanze che daranno origine al villo terminale (Resta et al., 2005; Fig. 11).

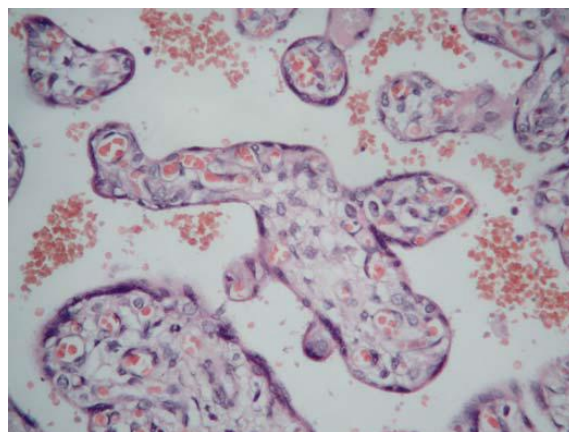


Fig. 11: Villo intermedio maturo (Resta et al., 2005)

Nel terzo periodo gestazionale troviamo i villi terminali, lo stroma è composto da una densa rete di capillari dilatati circondata da citotrofoblasti e sinciziotrofoblasti assottigliati (Kumar et al., 2015). L'ansa capillare è a contatto con la membrana basale del trofoblasto, l'unione delle loro membrane basali porta alla formazione della membrana vasculo-sinciziale fondamentale per gli scambi placentari. In questo periodo gestazionale inizia la formazione di vasi vasculosinciziali. A seguito della formazione della membrana vasculo-sinciziale il sangue materno e fetale è separato solamente da un sottile citoplasma dell'endotelio e del trofoblasto a loro volta separati da un'unica membrana basale (Resta et al., 2005; Fig. 12).

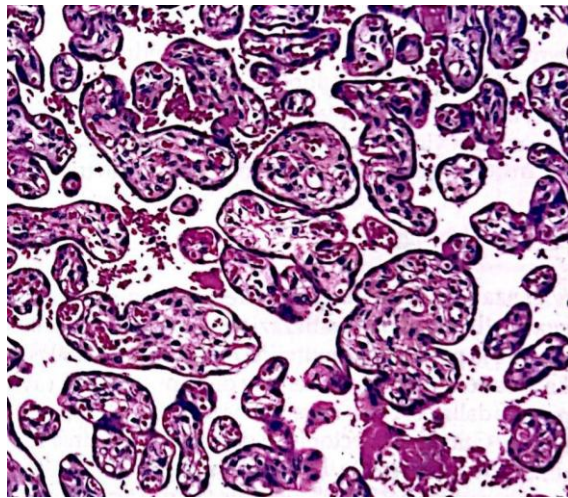


Fig. 12: Villi terminali  
(Kumar et al., 2015)

### **2.1.3 – CIRCOLAZIONE PLACENTARE**

Nell'ultimo periodo della gravidanza, il sangue materno all'interno della placenta viene ricambiato 3-4 volte al minuto ed ha un volume di circa 150 mL, il flusso della circolazione sanguigna attraverso la placenta è molto elevato, da 450 a 600 mL al minuto. 80-100 arterie spirali permettono al sangue materno di entrare nella placenta, la struttura che collega le arterie e la decidua basale produce automaticamente un aumento di pressione (Barbieri et al., 2015).

Le pareti delle arterie spirali, prima di entrare nella decidua, cambiano di spessore in quanto le cellule endoteliali, basse e squamose, che ora le rivestono vengono sostituite da cellule colonnari alte. Questa modifica restringe il lume delle arterie causando quindi un



aumento della pressione sanguigna. Il sangue ha ora una pressione di 70-80 mm-Hg e, visto che nello spazio intervilloso la pressione è di 10 mm-Hg, il sangue materno scorre all'interno. Il sangue materno incontra i villi coriali; avendo, però, una forte pressione, attraversa lo spazio intervilloso e arriva alla parete del disco corionico, qui ritorna indietro circolando più lentamente attorno ai villi coriali e permettendo così lo scambio di sostanze. I setti dei cotiledoni materni indirizzano il sangue verso la decidua; in questo modo, il sangue evita di disperdersi all'interno dello spazio intervilloso. Una volta che il sangue materno ha raggiunto la decidua basale esce dalla placenta attraverso le vene uterine (Barbieri et al., 2015; Fig. 13).

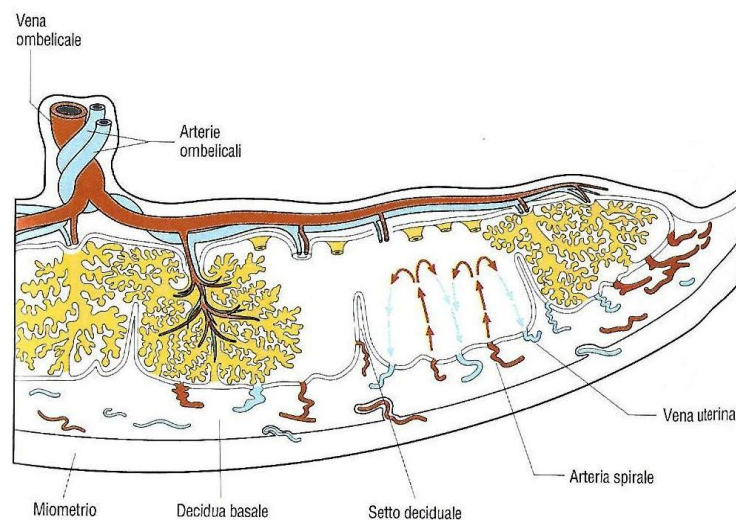


Fig. 13: Schema della circolazione placentare  
(Barbieri et al., 2015)

Le arterie ombelicali e la vena ombelicale vascolarizzano i villi della placenta, in genere le arterie che dal feto vanno alla placenta sono due mentre è solo una la vena che dalla placenta raggiunge il feto. Il sangue arterioso dalla placenta al feto scorre nella vena ombelicale, il sangue venoso refluo dal feto alla placenta scorre nelle vene ombelicali (De Felici et al., 2020).

La membrana placentare, formata da tessuti fetali, separa il sangue materno dal sangue fetale. Essa si forma alla fine della terza settimana di gravidanza, quando si sviluppa l'apparato circolatorio primitivo e al sesto mese acquista una struttura definitiva. La struttura primitiva della membrana placentare presenta quattro strati fra il sangue materno e fetale, tali strati sono il sinciziotrofoblasto, il citotrofoblasto, il tessuto connettivo e l'endotelio dei vasi sanguigni. Al sesto mese il citotrofoblasto scompare e i vasi sanguigni

vanno contro il sinciziotrofoblasto eliminando anche il tessuto connettivo. La struttura definitiva risulta quindi essere formata da due strati che separano il sangue materno da quello fetale. La membrana placentare essendo molto sottile, 1 o 2 micron, potrebbe subire delle piccole rotture e permettere quindi un passaggio di sangue fra madre e feto (Barbieri et al., 2015).

Una corretta irrogazione dei villi embrionali da parte del sangue materno permette all'embrione di svilupparsi correttamente, una riduzione della circolazione utero placentare causa ipossia dell'embrione con ritardo della crescita intrauterina e, in casi gravi, alla morte fetale (De Felici et al., 2020).

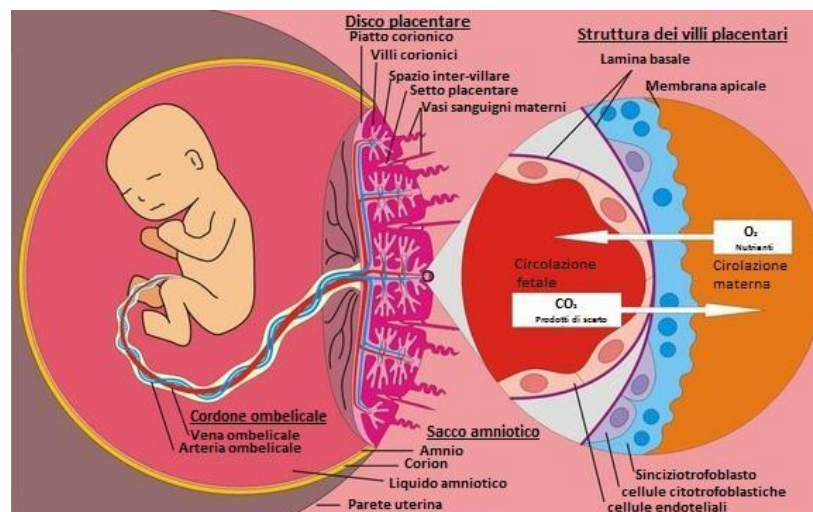


Fig.14: Circolazione materno-fetale  
(dannidaparto.legal)

## 2.1.4 – FUNZIONI PLACENTARI

Nel corso della gravidanza, le funzioni placentari sono principalmente:

- sintesi di metaboliti
- scambi metabolici e gassosi tra madre e feto
- passaggio di anticorpi materni al feto
- produzione di ormoni

Già dall'inizio della gravidanza, la placenta sintetizza glicogeno, colesterolo e acidi grassi come fonte di nutrimento per l'embrione e per la sintesi di membrane cellulari. Tutti i

nutrienti, gas, ormoni, elettroliti ed anticorpi che passano dalla madre al feto devono superare la membrana placentare e così anche i prodotti di rifiuto dal sangue fetale. Le sostanze possono attraversare la membrana placentare per diffusione passiva, come l'ossigeno e l'anidride carbonica; diffusione attiva, come sodio, potassio e cloro; osmosi, come l'acqua oppure per diffusione facilitata con conseguente accumulo nel feto, come ad esempio calcio e fosfati. Oltre ai nutrimenti, la madre trasmette al feto anche gli anticorpi della classe IgG, i quali vengono legati dai recettori Fc specifici presenti sul sinciziotrofoblasto e attraversano la membrana placentare per transitosi. Questi anticorpi restano in circolo nel bambino per i primi mesi dopo la nascita, in modo da proteggerlo da malattie infettive finché non avrà maturato un suo sistema immunitario.

La placenta è un potente filtro per i parassiti del sangue, ma risulta meno efficace contro virus, batteri e sostanze tossiche che la madre può trasmettere al feto. Molti medicinali e metaboliti degli stupefacenti attraversano la placenta senza difficoltà andando a danneggiare l'embrione causando malformazioni congenite (De Felici et al., 2020).

Le fasi iniziali della gravidanza dipendono dall'attività ormonale materna, fino alla settima settimana il corpo luteo è l'organo endocrino essenziale per la produzione di progesterone, in seguito la placenta assume un ruolo fondamentale nella produzione di ormoni. Pochi giorni dopo la fecondazione le cellule del citotrofoblasto cominciano a produrre l'ormone gonadotropina corionica umana, il quale stimola il corpo luteo a continuare a produrre progesterone per mantenere l'endometrio in fase secretiva (De Felici et al., 2020). Successivamente, la placenta in via di sviluppo comincia a produrre ormoni in grado di cambiare la fisiologia della madre nel periodo della gravidanza influenzando la crescita dei vasi sanguigni materni, l'ematopoiesi, la produzione di steroidi, il comportamento e lo sviluppo delle ghiandole mammarie, cosicché venga assicurato un corretto apporto di nutrienti ed ossigeno per l'accrescimento dell'embrione (De Felici et al., 2020). La placenta produce ormoni proteici come la gonadotropina corionica umana (hCG) per il mantenimento del corpo luteo; il lattogeno placentare umano (hPL) stimolante lo sviluppo della mammella e riducendo nella madre la sensibilità all'insulina; la tireotropina corionica umana (hCT) che aumenta la secrezione dell'ormone tiroideo importante per stimolare i processi anabolici di crescita, sviluppo e movimento dell'organismo e la corticotropina corionica umana (hCC) che sembra aumentare i livelli di colesterolo e di pregnenolone necessari per gli altri ormoni steroidei della placenta. Produce, inoltre, ormoni steroidei quali il progesterone, indispensabile per il mantenimento e la prosecuzione della gravidanza, e gli estrogeni, l'estradiolo, che aumentano il flusso di sangue utero-placentare

e stimolano la crescita uterina e lo sviluppo della ghiandola mammaria (De Felici et al., 2020).

## **2.1.5 – POSSIBILI PATOLOGIE E COMPLICANZE IN GRAVIDANZA**

Le malattie della gravidanza e le condizioni patologiche della placenta sono cause importanti di morte fetale intrauterina o perinatale, di malformazioni congenite, di ritardo di crescita intrauterina, di morte materna e di morbidità sia per la madre che per il bambino (Kumar et al., 2015).

### **2.1.5.1 - ABORTO SPONTANEO**

L'aborto spontaneo o "miscarriage" è definito come l'interruzione di una gravidanza prima della 20<sup>a</sup> settimana di gestazione (Kumar et al., 2015). L'aborto spontaneo solitamente si verifica entro la dodicesima settimana e interessa dal 10 al 15 % delle gravidanze. Può verificarsi un aborto spontaneo completo con l'espulsione spontanea totale dell'embrione o del feto senza vita, oppure un aborto incompleto o ritenuto, in questo caso la gravidanza è ancora parzialmente o completamente presente nella cavità uterina, ma l'embrione o il feto non presenta più attività cardiaca.

Si definiscono aborti silenti gli aborti privi di sintomi dove la diagnosi è fatta tramite ecografia ostetrica, altre volte invece si hanno perdite ematiche oppure contrazioni uterine. Esistono diverse cause che portano ad aborti spontanei, le più importanti sono le anomalie cromosomiche fetali come l'aneuploidia, la poliploidia e le traslocazioni, che risultano essere la causa più frequente di aborto spontaneo (circa nel 50% dei casi), più l'età della madre avanza più vi è la possibilità di anomalie cromosomiche. Fattori endocrini materni come difetto della fase luteale o diabete non controllato, malformazioni dell'utero come setti, polipi, fibromi o altri difetti dell'utero stesso, malattie autoimmuni o trombofiliche che aumentano la coagulazione del sangue, l'ipertensione e infezioni sia da protozoi (Toxoplasma), batteri (Mycoplasma, Listeria) e virus aumentano il rischio di aborto spontaneo.

### 2.1.5.2 - GRAVIDANZA ECTOPICA

La gravidanza ectopica è l'impianto del feto in qualsiasi sede al di fuori della normale localizzazione intrauterina: la sede più comune è la porzione extrauterina della tuba (circa il 90% dei casi); altre sedi possono essere le ovaie, la cavità addominale e la porzione intrauterina della tuba (gravidanza interstiziale; Kumar et al., 2015). La gravidanza ectopica si verifica nel 2% circa delle gravidanze, nel primo periodo della gravidanza (fra la quarta e la sesta settimana) non sono presenti sintomi e si pensa ad una gravidanza ectopica quando, a seguito di un test di gravidanza positivo, non si vede la camera gestazionale all'interno della cavità uterina. In quasi tutte le gravidanze ectopiche sono presenti perdite ematiche e nelle gravidanze più avanzate, dove avviene una graduale erosione della tuba con conseguente rottura, sono presenti dolori pelvici e addominali. Le cause di gravidanze ectopiche possono essere diverse, la più ricorrente è una progressiva malattia infiammatoria pelvica con conseguente cicatrizzazione intraluminare delle tube di Falloppio. Appendicite, endometriosi e interventi chirurgici possono causare cicatrizzazioni e aderenze peritubariche che aumentano il rischio di gravidanze ectopiche. Anche l'utilizzo di dispositivi di contraccezione intrauterini possono raddoppiarne il rischio. La gravidanza ovarica è il risultato dell'infezione e dell'intrappolamento dell'ovocita all'interno del follicolo proprio al momento della sua rottura. Gravidanze addominali si sviluppano quando l'ovocita fecondato non riesce ad entrare nella tuba o fuoriesce dalla porzione terminale costituita dalle fimbrie della tuba (Kumar et al., 2015; Fig.15).

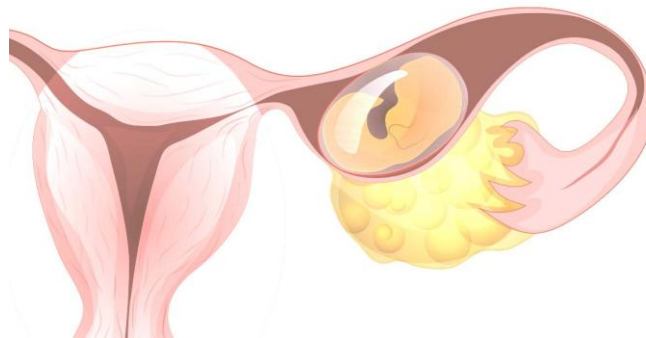


Fig. 15: Gravidanza ectopica, impianto dell'embrione fecondato all'infuori dell'utero  
(<https://www.ginecologomarcocomonti.it/gravidanza-extrauterina/>)

Nel terzo trimestre di gravidanza, le patologie sono correlate alla complessità anatomica della placenta matura.

### 2.1.5.3 - PLACENTA PREVIA

La placenta, che solitamente si trova inserita nella parte superiore dell'utero, in questo caso risulta essere nella parte più bassa dell'utero e blocca parzialmente (placenta previa parziale) o completamente (placenta previa totale) l'accesso al canale cervicale (De Felici et al., 2020; Fig. 16). La placenta previa può causare emorragie durante il parto nel momento in cui il collo dell'utero si dilata, solitamente si procede quindi con il taglio cesareo per evitare la rottura della placenta e la conseguente emorragia. I sintomi di una placenta previa sono un improvviso e indolore sanguinamento vaginale dopo la ventesima settimana di gravidanza. Episodi precedenti di placenta previa, precedenti aborti spontanei o indotti, età avanzata della madre, anomalie dell'utero ed interventi chirurgici all'utero sono tutti fattori che possono comportare alla formazione di una placenta previa. La placenta previa può portare rischi per la madre come sanguinamento sia in gravidanza che durante il parto, parto precoce, distacco della placenta e rischi per il bambino come nascita prematura, basso peso alla nascita e problemi respiratori.



Fig. 16: Confronto fra placenta normale e placenta previa  
(<https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/24211-placenta-previa>)

#### 2.1.5.4 - PLACENTA ACCRETA

La placenta accreta è causata dalla parziale o completa assenza della decidua, il tessuto villosa placentare, quindi, aderisce direttamente al miometrio, con conseguente mancato distacco della placenta al momento del parto (Kumar et al., 2015). In base alla profondità in cui la placenta si attacca all'utero, si definisce placenta accreta, se essa è attaccata saldamente all'utero non attraversandone la parete, placenta increta, quando la placenta è attaccata al muscolo dell'utero senza attraversarne la parete, e placenta percreta, il caso più grave, dove la placenta attraversa la parete dell'utero (Fig. 17). Precedenti parti cesarei, una placenta in posizione anomala in utero, interventi chirurgici sull'utero o la fecondazione in vitro sono fattori di rischio per una placenta accreta. Come per la placenta previa, la placenta accreta può portare ad un parto pretermine con conseguente basso peso alla nascita e problemi respiratori.

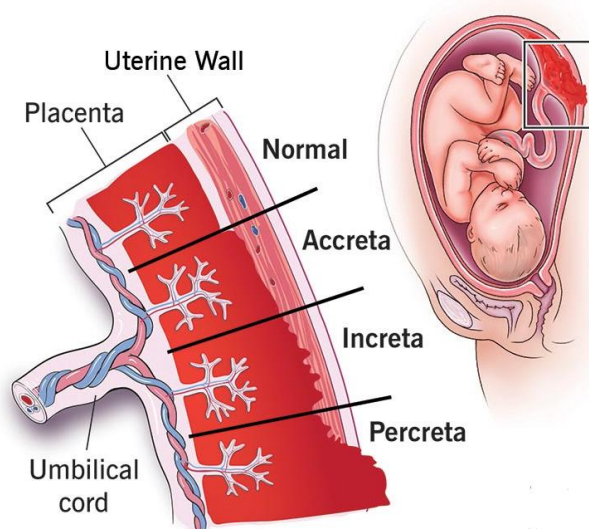


Fig. 17: Confronto fra placenta normale, accreta, increta e percreta  
(<https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/24211-placenta-previa>)

#### 2.1.5.5 - DISTACCO DELLA PLACENTA

Si parla di distacco della placenta quando la placenta si separa dall'utero prima del parto; essa può staccarsi parzialmente, rimanendo solo per una parte attaccata alla parete uterina, o completamente (Fig. 18). I sintomi più comuni del distacco della placenta sono perdite ematiche e crampi addominali. Questa complicanza riduce la quantità di ossigeno e sostanze nutritive che raggiungono il feto e può portare a forti emorragie per la madre. Il



distacco della placenta risulta pericoloso sia per la madre che per il feto, può causare nascita prematura, basso peso alla nascita, problemi di crescita e la mancanza di ossigeno può comportare lesioni cerebrali e morte.



Fig. 18: Confronto fra placenta normale e placenta distaccata

(<https://www.dannidaparto.legal/danni-prenatali-e-perinatali/danni-nel-parto-e-nel-travaglio/danni-al-neonato-causati-da-distacco-della-placenta/>)

### 2.1.5.6 - INFEZIONI PLACENTARI

Le infezioni a carico della placenta si sviluppano attraverso due vie: infezione ascendente attraverso il canale del parto e infezione ematogena (transplacentare). Le infezioni ascendenti sono le più comuni e generalmente sono di tipo batterico, se l'infezione è localizzata alle membrane determina la rottura prematura delle membrane e il parto prematuro. Le infezioni ematogene, generalmente quelle appartenenti al complesso TORCH (ad esempio toxoplasmosi, citomegalovirus, rosolia) possono interessare la placenta dando luogo, nei villi coriali, a infiltrati di cellule dell'inflammazione cronica (Kumar et al., 2015).

### 2.1.5.7 – PREECLAMPSIA

La preeclampsia è una sindrome sistemica caratterizzata da diffusa disfunzione endoteliale materna, edema e proteinuria durante la gravidanza. Si manifesta in circa il 3-5% delle donne gravide, di solito verso l'ultimo trimestre e colpisce di più le donne alla prima gravidanza (Kumar et al., 2015). La placenta risulta avere un ruolo centrale nell'insorgenza



della preeclampsia; infatti al momento del parto con l'espulsione della placenta la patologia scompare. La preeclampsia generalmente inizia dopo la trentaquattresima settimana di gravidanza, se però vi è presenza di mola idatiforme, patologie renali, ipertensione o coagulopatia può insorgere prima. I principali problemi legati alla preeclampsia sono una vascolarizzazione placentare anomala, disfunzione endoteliale e squilibrio dei fattori angiogenici ed antiangiogenici ed anomalie della coagulazione.

#### **2.1.5.8 - INSUFFICIENZA UTERO-PLACENTARE**

L'insufficienza utero-placentare si verifica quando la placenta non si sviluppa correttamente o subisce dei danni, questa complicanza comporta uno scarso flusso sanguigno verso il feto, che può portare ad una ridotta crescita intrauterina e mancanza di nutrienti ed ossigeno essenziali per lo sviluppo.

#### **2.1.5.9 - MOLA IDATIFORME, CORIOCARCINOMA E TUMORE TROFOBLASTICO**

La malattia trofoblastica gestazionale comprende tumori e condizioni simil-tumorali caratterizzate dalla proliferazione di tessuto placentare, villosa o trofoblastica. Le principali sono: la mola idatiforme (completa e parziale), la mola invasiva, il coriocarcinoma e il tumore trofoblastico del sito placentare (PSTT; Kumar et al., 2015).

Le mole sono caratterizzate dal rigonfiamento cistico dei villi coriali accompagnato da proliferazione trofoblastica parziale. Vengono diagnosticate intorno alla nona settimana di gravidanza, le adolescenti e le donne over 40 sono più a rischio di una gravidanza molare. La maggior parte delle gravidanze molarie terminano con un aborto spontaneo, con conseguente rischio di sviluppare coriocarcinoma. La mola invasiva penetra nella parete uterina o la perfora e i villi coriali idropici invadono il miometrio. Il tumore è localmente distruttivo e può invadere il tessuto periuterino ed i vasi ematici. Il coriocarcinoma gestazionale è una neoplasia maligna delle cellule trofoblastiche derivate da precedenti gravidanze sia normali sia anormali, come la gravidanza ectopica extrauterina. Il coriocarcinoma è rapidamente invasivo e metastatizza diffusamente, ma una volta identificato risponde bene alla chemioterapia (Kumar et al., 2015). I tumori trofoblastici del sito placentare (PSTT) sono proliferazioni neoplastiche dei trofoblasti extravillosi. Il

PSTT risulta essere una massa uterina con sanguinamento uterino anomalo e aumento di HCG. È composto da cellule trofoblastiche maligne che infiltrano diffusamente l'endometrio. I PSTT possono seguire, nella metà dei casi, una normale gravidanza, un aborto spontaneo o una mola idatiforme (Kumar et al., 2015).

## **2.2 – ASBESTO**

Il termine asbesto, sinonimo di amianto, si riferisce ad un gruppo di minerali fibrosi naturalmente presenti che sono stati sfruttati in numerosi contesti commerciali e industriali ed in applicazioni già nell'antichità (Oury et al., 2014).

Grazie alla sua notevole resistenza alla degradazione termica e chimica, resistenza alla trazione e al suo abito fibroso, l'amianto è stato utilizzato nell'edilizia e non solo per molti anni. Il cemento-amianto è il prodotto più conosciuto ed utilizzato a partire dal 1901, per molti anni vennero prodotte lastre e tegole, sono stati poi prodotti tubi in cemento- amianto e infine le lastre a ondulina, utilizzate sia nelle industrie che nel privato (Rinaudo et al., 2020).

Sono riconosciuti come amianto sei fasi minerali, cinque appartenenti alla classe degli anfiboli, silicati a doppia catena, e uno al serpentino, fillosilicato.

Appartenenti alla classe degli anfiboli troviamo:

- actinolite  $\rightarrow \text{Ca}_2(\text{Mg}, \text{Fe}^{2+})_5\text{Si}_8\text{O}_{22}(\text{OH})_2$
- amosite  $\rightarrow (\text{Fe}^{2+}, \text{Mg})_7\text{Si}_8\text{O}_{22}(\text{OH})_2$
- antofillite  $\rightarrow (\text{Mg}, \text{Fe}^{2+})\text{Si}_8\text{O}_{22}(\text{OH})_2$
- crocidolite  $\rightarrow \text{Na}_2\text{Fe}_2^{3+}(\text{Fe}^{2+}, \text{Mg})_3[\text{Si}_8\text{O}_{22}(\text{OH})_2]$
- tremolite  $\rightarrow \text{Ca}_{2+}\text{Mg}_5\text{Si}_8\text{O}_{22}(\text{OH})_2$

Appartenente alla classe dei serpentini troviamo:

- crisotilo  $\rightarrow \text{Mg}_3(\text{Si}_2\text{O}_5)(\text{OH})_4$

### **2.2.1 – ESPOSIZIONE IN GRAVIDANZA ED EFFETTI NEGATIVI**

La capacità delle diverse forme di asbesto di causare malattia dipende dalla concentrazione, dimensione, forma e solubilità. Il crisotilo rappresenta il 90% dell'amianto utilizzato nell'industria. Gli anfiboli, benché meno frequenti, sono più patogeni del crisotilo nel causare il mesotelioma, un tumore maligno derivato dalle cellule di rivestimento delle superfici pleuriche (Kumar et al., 2015).

Gli anfiboli risultano essere più aerodinamici, questo fa sì che abbiano una più elevata patogenicità rispetto al crisotilo che, grazie alla sua struttura più flessibile e incurvata,

viene più facilmente intrappolato nelle vie respiratorie superiori e rimosso dall'apparato mucociliare. Le fibre degli anfiboli sono dritte e rigide e si possono disporre parallelamente alla direzione del flusso aereo ed essere trasportate in profondità nei polmoni, qui possono in seguito penetrare nelle cellule epiteliali e raggiungere l'interstizio. La principale fonte di esposizione alle fibre di amianto è la via aerea; si parla di fibre respirabili se possiedono le seguenti caratteristiche: lunghezza maggiore di 5 micron, diametro inferiore di 3 micron e rapporto lunghezza/diametro maggiore di 3 (Rinaudo e Croce, 2020; Fig.19). Quando le fibre entrano nell'organismo la prima forma di difesa è la degradazione da parte dei macrofagi, questo avviene solamente se le fibre hanno una lunghezza inferiore a 5 micron, se le fibre sono più lunghe i macrofagi non riescono a fagocitarle andando incontro a morte. Di conseguenza, al tentativo dei macrofagi di incorporare le fibre più lunghe, si ha la formazione dei corpuscoli dell'asbesto. In questo caso la fibra viene rivestita da un materiale proteico, in particolare ferritina, che forma delle strutture somiglianti a perle che, se molto sviluppate e attaccate fra loro, possono ricoprire l'intera fibra. La presenza dei corpuscoli dell'asbesto indica l'esposizione all'amianto (Rinaudo e Croce, 2020).

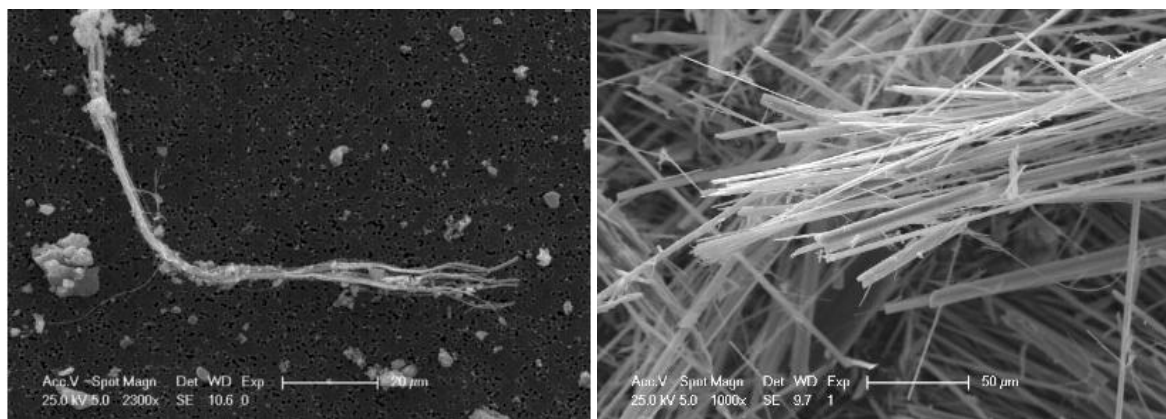


Fig. 19: A sinistra fibre di crisotilo e a destra fibre di tremolite al SEM

Malattie amianto correlate risultano essere il mesotelioma, cancro ai polmoni, cancro laringeo e cancro ovarico, ma respirare l'amianto può causare anche patologie non neoplastiche come asbestosi, versamento pleurico benigno, placche pleuriche, ispessimento pleurico e atelettasia.

L'esposizione alle fibre di amianto comporta quindi un grave pericolo per la salute umana, prevalentemente a livello delle vie aeree. In letteratura ci sono stati studi dove hanno cercato il nesso causale tra amianto (anche ingerito) e patologie neoplastiche

extrapolmonari (Sigismondi, a.a. 2023/2024). Sono stati condotti anche studi per verificare se le fibre di amianto fossero in grado di attraversare la membrana placentare e quindi entrare in contatto con il feto. Bassi livelli di fibre di amianto con lunghezza inferiore a 5 micron, sottili e non rivestite sono state trovate nelle placente e negli organi di neonati nati morti (Haque et al., 1996). Delle fibre di amianto presenti nei digeriti placentari l'88% era crisotilo, il 10% tremolite e il 2% actinolite e antofillite (Haque et al., 1998). Poiché la placenta è l'unica via di comunicazione tra il feto e l'ambiente esterno, i risultati suggeriscono un trasferimento transplacentare di fibre di amianto (Haque et al., 1992). A seguito di esposizione alla crocidolite sono stati identificati casi di coriocarcinoma e mola idatiforme (Reid et al., 2009). Gli effetti negativi derivanti dall'esposizione all'amianto nel periodo gestazionale possono quindi comprendere la rottura della membrana placentare, malattie trofoblastiche gestazionali (GTD), mola idatiforme, coriocarcinoma e possibile mortalità fetale.

## **2.3 - MICROPLASTICHE**

Nell'ultimo secolo la produzione globale di plastica ha raggiunto i 320 milioni di tonnellate all'anno, il 40% del totale viene utilizzato per la produzione di imballaggi monouso con conseguente produzione di rifiuti di plastica (Ragusa et al., 2020). L'utilizzo della plastica per la produzione di apparecchiature mediche usa e getta e contenitori alimentari è associato ad un miglioramento nella salute umana. La plastica però, se mal gestita, porta ad un suo accumulo nell'ambiente; qui subisce una lenta degradazione causata da processi foto- e termo-ossidativi e biodegradazione. La plastica, subendo questi processi degradativi, si indebolisce fino a frammentarsi in pezzi inferiori a 5 millimetri chiamati microplastiche (Prata et al., 2019).

Le microplastiche sono quindi particelle più piccole di 5 millimetri derivanti dalla degradazione degli oggetti di plastica presenti nell'ambiente. Le microplastiche non derivano solamente dalla frammentazione di pezzi più grandi, ma vengono anche prodotte per usi commerciali (Ragusa et al., 2020). Grazie alla sua natura flessibile e facilmente malleabile, la plastica viene anche utilizzata nella produzione di beni di base come vestiti e cosmetici (Hamid et al., 2018). Le microplastiche non sono visibili ad occhio nudo, ma la loro presenza nell'ambiente e nei prodotti di consumo porta all'inevitabile esposizione umana a queste particelle (Prata et al., 2019).

### **2.3.1 – ESPOSIZIONE IN GRAVIDANZA ED EFFETTI NEGATIVI**

I polimeri plastici sono in genere considerati inerti e poco preoccupanti per la salute umana, i rischi per la salute dati dal loro utilizzo derivano dalla presenza dei molteplici additivi plastici che possono contenere. Questi additivi non sono legati alla matrice polimerica e per questo motivo possono fuoriuscire dal polimero plastico disperdendosi nell'ambiente circostante come l'aria, l'acqua, il cibo o i tessuti (Galloway, 2015). L'esposizione alle microplastiche può avvenire attraverso diverse vie. L'ingestione di alimenti contenenti microplastiche è la principale via di esposizione umana, le particelle possono raggiungere il sistema gastrointestinale attraverso alimenti contaminati; le microplastiche possono entrare nel corpo umano anche attraverso l'inalazione, in quanto esse vengono rilasciate nell'aria da diverse fonti (tessuti sintetici, abrasione dei pneumatici ecc.) in maniera minore si può essere esposti alle microplastiche attraverso contatto cutaneo (Prata et al., 2019; Fig. 20).

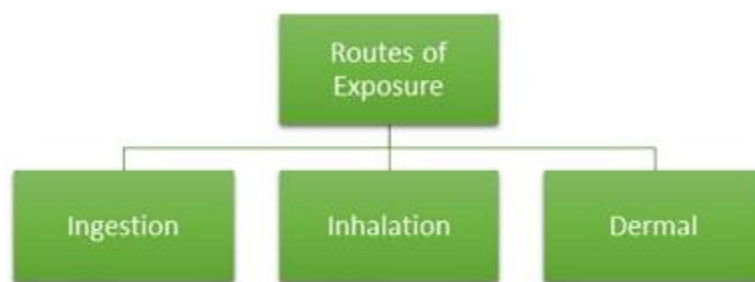


Fig. 20: Vie di esposizione alle microplastiche  
(Prata et al., 2019)

Studi su campioni placentari hanno evidenziato il possibile passaggio delle microplastiche attraverso la membrana placentare. Sono state ritrovate microplastiche sul versante fetale, su quello materno e nelle membrane corioamniotiche, questi risultati indicano che una volta che le microplastiche entrano all'interno del corpo umano possono raggiungere i tessuti della placenta (Ragusa et al., 2020). L'esposizione delle donne in gravidanza alle microplastiche può causare tossicità localizzata, esse possono indurre o potenziare le risposte immunitarie, causare preeclampsia e restrizione della crescita fetale. Le microplastiche possono mostrare effetti negativi direttamente al feto, come la riduzione del meccanismo di difesa contro patogeni, alterare l'utilizzo delle riserve energetiche ed effetti negativi a lungo termine sul metabolismo e sul sistema riproduttivo (Fig. 21).

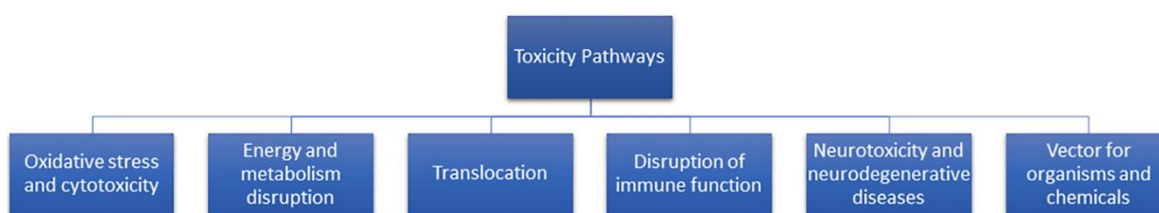


Fig. 21: Effetti tossici delle microplastiche  
(Prata et al., 2019)

## **2.4 – METALLI PESANTI**

I metalli pesanti risultano essere uno dei rischi ambientali più preoccupanti; essi vengono definiti in base alle loro proprietà, quali numero atomico, peso atomico, tossicità e densità (Suvarapu et al., 2016). In base a questo per metalli pesanti si intendono quei metalli con una densità maggiore di  $4.5 \text{ g/cm}^3$  (arpat.toscana.it). I metalli pesanti esistono naturalmente nella crosta terrestre, possiamo trovarli come ioni o composti, spesso vengono estratti, purificati e poi trattati per uso industriale e infine rilasciati nell'ambiente; di conseguenza quindi gli organismi viventi possono essere esposti a tali sostanze attraverso la respirazione, contatto o per consumazione (Merian, 1991). Alcuni metalli sono essenziali, ma essendo tossici ed inquinanti anche in basse concentrazioni causano effetti negativi sia sull'ambiente che sull'uomo (Fu et al., 2019). I metalli pesanti sono in grado di accumularsi negli animali e nelle piante e in seguito nell'uomo attraverso la catena alimentare (Suvarapu et al., 2016). I composti metallici si trovano in grande varietà in atmosfera, essi possono derivare sia da fonti naturali che da fonti antropiche, sotto forma di aerosol (Merian, 1991). Sono inoltre presenti nell'acqua e nel suolo rendendoli anch'essi fonti di esposizione. I metalli sono tossici per l'uomo e alcuni risultano essere cancerogeni, fra i più pericolosi troviamo l'alluminio, l'arsenico, il cadmio, il cromo, il mercurio, il nichel e il piombo.

### **2.4.1 – ESPOSIZIONE IN GRAVIDANZA ED EFFETTI NEGATIVI**

Acqua, cibo, aria e suolo rappresentano le principali vie attraverso cui l'uomo è esposto ai metalli pesanti, con potenziali effetti negativi sulla salute; è quindi importante controllare la qualità degli ambienti di vita (d'Angelo et al., 2020). L'esposizione ai metalli pesanti in gravidanza comporta rischi sia per la madre che per il feto, in quanto tali sostanze sono in grado di attraversare la membrana placentare entrando quindi nella circolazione sanguigna fetale (Fig. 22). Diversi studi hanno evidenziato che il principale meccanismo attraverso cui gli ioni e i composti metallici oltrepassano la membrana placentare è per diffusione passiva. Inoltre, è stato riscontrato che le sostanze liposolubili attraversano la membrana placentare e raggiungono un equilibrio materno-fetale più rapidamente rispetto alle sostanze polari (Merian, 1991).



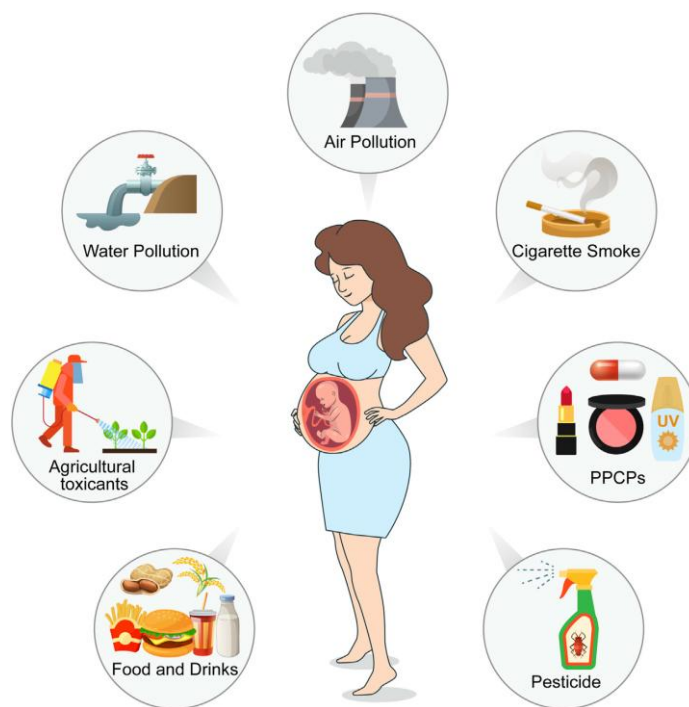


Fig. 22: Vie di esposizione alle sostanze tossiche ambientali  
(Yao et al., 2023)

### 2.4.1.1 – ALLUMINIO

L'alluminio (Al) è il terzo elemento più abbondante nella crosta terrestre, grazie alle sue proprietà chimiche e fisiche è spesso utilizzato con conseguente esposizione umana (Exley, 2013). Nel terreno l'alluminio è presente sotto forma di silicati, idrossidi e ossidi che possono essere in seguito trasformati in ioni (Merian, 1991). Le principali vie di esposizioni all'alluminio comprendono il tratto respiratorio, il tratto gastrointestinale e la pelle (Liu et al., 2021). Gli ioni di alluminio risultano tossici soprattutto per le persone con funzionalità renale compromessa, in questo caso vi è una ridotta eliminazione con conseguente accumulo di alluminio all'interno del siero e dei tessuti. Per questo motivo, risulta di grande interesse analizzare le soluzioni di dialisi per verificare le concentrazioni di alluminio al suo interno (Merian, 1991).

L'alluminio è in grado di attraversare la membrana placentare e raggiungere il feto, studi hanno dimostrato che l'esposizione all'alluminio può provocare un distacco della placenta (Ibrahimou et al., 2017). Concentrazioni di alluminio all'interno del tessuto placentare sono associate ad esiti negativi della gravidanza come basso peso alla nascita,

malformazioni e cardiopatie congenite e rischio di sviluppare difetti del tubo neurale (NTD; Liu et al., 2021).

#### **2.4.1.2 – ARSENICO**

L'arsenico (As) e i suoi composti sono ampiamente utilizzati nell'industria e nell'agricoltura (Yao et al., 2023). Fino agli anni '70 la maggior parte dell'arsenico proveniva dalla produzione di pesticidi, in seguito la percentuale si è ridotta dall' 80 al 50%. La combustione ad alte temperature di oli, la termodistruzione dei rifiuti, la lavorazione del cemento sono tutte fonti di arsenico, come anche l'allevamento intensivo, utilizzato per disinfettanti, compost e fertilizzanti e i mangimi per animali. L'utilizzo dell'arsenico da parte delle industrie di componenti elettronici per i semiconduttori, nella lavorazione di alcuni metalli, nell'industria chimica per la produzione di tinture, coloranti, prodotti per la conservazione del legno, pesticidi e nell'industria farmaceutica hanno prodotto grande quantità di arsenico ambientale (Adani et al., 2012).

L'arsenico attraversa facilmente la placenta e la sua esposizione durante la gravidanza induce stress ossidativo, aumenta il rischio di perdita del feto e di basso peso alla nascita.

Uno dei meccanismi della tossicità dell'arsenico è la generazione di specie reattive dell'ossigeno; lo stress ossidativo nella placenta può innescare la secrezione di fattori proinfiammatori ed è stato associato alla preeclampsia (Ahmed et al., 2011). È stato dimostrato che l'arsenico influenza la struttura e la funzione delle gonadi femminili, inibisce la meiosi degli ovociti con conseguente diminuzione di qualità e quantità degli stessi. A livello fetale viene inibito lo sviluppo embrionale e interrotto l'equilibrio immunitario. Risulta avere anche effetti negativi a lungo termine come suscettibilità alle malattie infettive, genotossicità e metilazione globale del DNA, cancro, disturbi cardiovascolari, respiratori e neurologici (Yao et al., 2023).

#### **2.4.1.3 – CADMIO**

Il cadmio (Cd) è un metallo pesante che può essere presente nel cibo, viene assorbito dall'organismo e trattenuto nei reni, nel fegato e nelle ossa. È un inquinante ambientale diffuso e altamente tossico, lo si può trovare nell'atmosfera, nell'acqua potabile e nel suolo. Nel corso degli anni il cadmio ha trovato grande utilizzo nelle batterie di

accumulatori al Ni-Cd, nei rivestimenti anticorrosivi di metalli, alcuni dei suoi composti sono stati utilizzati come stabilizzanti nelle plastiche (PVC), negli pneumatici, nei combustibili per motori a diesel, negli oli lubrificanti a base di zinco, nei concimi e antiparassitari, nel tabacco e nel fumo di sigaretta e dall'utilizzo di queste sostanze il cadmio si diffonde nell'ambiente (Adani et al., 2012).

Il cadmio risulta essere pericoloso per la salute e la fertilità femminile in quanto si accumula nelle ovaie e ne influenza la funzione ovarica. L'esposizione al cadmio riduce inoltre il numero di ovociti, ne inibisce la meiosi e la qualità (Yao et al., 2023). Il cadmio è noto anche per accumularsi nella placenta umana. Elevate concentrazioni di cadmio nella placenta sono associate a un ridotto trasferimento di zinco al feto, che potrebbe influenzare la crescita e lo sviluppo fetale (Kipper et al., 2009). Il cadmio può portare ad un parto pretermine, necrosi tissutale e aborto spontaneo, gli effetti negativi diretti sul feto sono un mancato sviluppo embrionale, ritardo nella crescita uterina con minor peso alla nascita e rischio di difetti del tubo neurale (NTD). Risulta avere anche effetti negativi a lungo termine sulla funzione immunitaria, riduzione della fertilità e suscettibilità al cancro.

#### **2.4.1.4 – CROMO**

Il cromo (Cr) è un metallo pesante presente in natura, il suo utilizzo nell'ambito della metallurgia, nelle industrie chimiche, nel settore tessile per la concia delle pelli e nelle cromature sono le principali fonti di inquinamento. La maggior parte del cromo presente nell'ambiente deriva quindi dagli scarichi di concerie, fabbriche di placcature, vernici, anticorrosivi, fungicidi, ma anche dalla combustione di carbone, legname e petrolio (Adani et al., 2012). Il cromo si trova anche nell'aria e nelle acque superficiali e a seguito della deposizione dei rifiuti esso penetra nel terreno (d'Angelo et al., 2020). Il cromo può trovarsi in forma trivalente o esavalente, quest'ultima risulta essere molto tossica in quanto attraversa con facilità le membrane biologiche e una volta all'interno dell'organismo si accumula nei reni e nel fegato. Il cromo esavalente ha la capacità, una volta all'interno delle cellule, di trasformarsi in cromo trivalente con forte potere legante (Adani et al., 2012).

L'esposizione materna al cromo può portare all'apoptosi degli ovociti e causare diabete mellito gestazionale, in gravidanza esso si accumula nella placenta inducendo stress ossidativo, parto pretermine, aborto, dimorfismo sessuale (prevalentemente nei maschi) e in alcuni casi morte neonatale. Il cromo inoltre inibisce lo sviluppo e la crescita fetale,

provoca problemi respiratori, ittero prenatale ed un aumento dei difetti alla nascita (Banu et al., 2018).

#### **2.4.1.5 – MERCURIO**

Il mercurio (Hg) viene spesso utilizzato nell'ambito industriale, domestico e nei prodotti cosmetici. È un metallo molto tossico e può entrare all'interno del corpo per inalazione, ingestione o attraverso contatto con la pelle (Yao et al., 2023). La forma di mercurio più tossica per l'uomo, che può provocare anche alterazioni cromosomiche, è quella metilata  $[\text{CH}_3\text{Hg}]^+$ . Il mercurio da sempre ha trovato impiego nelle lavorazioni del materiale elettrico, delle materie plastiche, della cellulosa, nei processi di pitture e nei prodotti farmaceutici e a seguito degli scarichi nell'atmosfera e nelle acque da parte delle industrie si diffonde nell'ambiente (Adani et al., 2012).

L'esposizione al mercurio risulta essere molto pericolosa anche in periodo gestazionale, in quanto anche questo metallo è in grado di attraversare la membrana placentare e raggiungere il feto. Le donne esposte al mercurio possono subire un'inibizione dell'attività degli enzimi antiossidanti con aumento dello stress ossidativo, un'alterazione nell'assorbimento e trasporto degli amminoacidi e nel trasferimento dell'ossigeno; il mercurio causa, inoltre, una diminuzione della produzione degli ovociti e una possibile alterazione dell'istomorfologia dell'ovaio (Yao et al., 2023). Durante la gravidanza, può causare parto pretermine o aborto spontaneo, oltre che danni diretti sul feto come disturbi nello sviluppo neurologico, rischi di malattie del tubo neurale (NTD) ed un basso peso alla nascita (Kozikowska et al., 2013). Il mercurio risulta avere anche effetti a lungo termine sul bambino quali la difficoltà di apprendimento, autismo, disturbo da deficit di attenzione e iperattività (Tapia et al., 2023).

#### **2.4.1.6 – NICHEL**

Il nichel (Ni) è il ventiquattresimo elemento in ordine di abbondanza presente nella crosta terrestre, esso può trovarsi nell'acqua, nel suolo e nel cibo. L'esposizione umana avviene per inalazione, ingestione e per contatto diretto in quanto il nichel è utilizzato nella produzione di gioielli, monete, leghe, acciaio inossidabile e nelle industrie di trasformazione alimentare e dispositivi medici (Zhang et al., 2019). Il nichel viene quindi

rilasciato nell'ambiente in conseguenza alla lavorazione dei metalli e per combustione del carbone e dei derivati del petrolio (Adani et al., 2012). Data la sua liposolubilità e volatilità, il nichel carbonile  $[\text{Ni}(\text{CO})_4]$  è estremamente tossico, viene assorbito con l'inalazione e attraversa facilmente i polmoni, le membrane alveolari e la barriera ematoencefalica (Merian 1991). Il nichel è quindi in grado di accumularsi all'interno del corpo e presenta tossicità biologica e cancerogenicità, è stato dimostrato che questo metallo ha un impatto più ampio sulla salute delle donne incinte e nei feti durante il periodo gestazionale; infatti, l'effetto barriera della placenta risulta indebolito dal nichel influenzando quindi una corretta crescita intrauterina (Ding et al., 2021). Il nichel, attraversando la placenta, induce la perossidazione lipidica; inoltre, può indurre neurotossicità, nefrotossicità, tossicità riproduttiva e tossicità per lo sviluppo, riducendo la fertilità, e causare aborti. Il nichel sembra accumularsi di più nelle donne che presentano malattie gestazionali. L'accumulo di nichel comporta anche il rischio per il feto di sviluppare malattie coronariche e suscettibilità al cancro (Zhang et al., 2019).

#### **2.4.1.7 – PIOMBO**

Il piombo (Pb) è una sostanza tossica presente nella crosta terrestre e ampiamente distribuito nell'ambiente, visti anche i suoi innumerevoli utilizzi; infatti, la fonte principale di inquinamento risulta essere la combustione della benzina (Adani et al., 2012).

Il piombo risulta essere uno dei metalli pesanti più tossici per l'uomo, esso è in grado di accumularsi nell'organismo danneggiando il sistema nervoso centrale e il cervello. Il piombo è introdotto all'interno dell'organismo principalmente attraverso gli alimenti e l'acqua potabile, esso è inoltre accumulabile per inalazione di aria contaminata prodotta dalle industrie. L'esposizione cutanea per contatto risulta essere una via meno importante. Il piombo viene trasportato principalmente nel fegato provocandone epatotossicità e in seguito trasportano nei diversi organi attraverso la circolazione sanguigna. In conseguenza ad una lunga esposizione esso si accumula anche nelle ossa e nei denti (Tasin et al., 2022). L'esposizione materna comporta una riduzione nella vitalità, sviluppo e maturazione degli ovociti con conseguenti cambiamenti istopatologici e strutturali negli ovociti e nei tessuti ovarici (Yao et al., 2023).

L'esposizione in gravidanza al piombo risulta essere molto pericolosa in quanto la placenta costituisce una debole barriera difensiva contro questo metallo, poiché nessuna proteina placentare è in grado di formare un complesso con il piombo. Per questa ragione esso

attraversa la membrana ed arriva al feto. I livelli di piombo nel sangue cordonale sono considerati il principale bioindicatore dell'esposizione del feto nella fase prenatale. Il cervello fetale in via di sviluppo, non avendo una barriera ematoencefalica altamente protettiva, è considerato l'organo più suscettibile all'avvelenamento da piombo con conseguenti danni neurologici (Tasin et al., 2022). Sono associati all'esposizione da piombo il parto pretermine, una rottura prematura delle membrane, preeclampsia e rischi di aborto spontaneo. Inoltre, sembra essere in grado di causare stress ossidativo placentare con conseguente restrizione della crescita fetale (Ahamed et al., 2009).

Malformazioni congenite, malattie del tubo neurale (NTD), disturbi da deficit di attenzione, difficoltà di apprendimento e suscettibilità al cancro sono tutte conseguenze negative attribuibili ad una esposizione al piombo (Tasin et al., 2022).

#### **2.4.1.8 – ALTRI METALLI**

Oltre ai metalli pesanti analizzati in precedenza sono stati presi in considerazione anche altri metalli considerati inquinanti ambientali a cui la donna in gravidanza risulta essere esposta.

Ad esempio, è possibile trovare il **cobalto** nell'aria e nell'acqua di mare, può derivare dagli incendi boschivi o da eruzioni vulcaniche ed erosione. Viene prodotto anche dai processi di lavorazione degli alimenti e dagli imballaggi, dalle attività industriali ed attività antropiche. L'esposizione al cobalto comporta danni alla membrana cellulare, inoltre, provoca tossicità nel cuore, nel fegato, nei polmoni e nel sistema immunitario. Il cobalto attraversa la membrana placentare e il feto esposto ad alte concentrazioni di tali sostanze risulta essere a rischio di sviluppare malattie coronariche (Zhang et al., 2020).

Il fabbisogno del **ferro**, un metallo essenziale per diversi processi biologici come ad esempio il trasporto dell'ossigeno, durante la gravidanza, aumenta in conseguenza allo sviluppo del feto. Per questo motivo la carenza di ferro in gravidanza risulta essere uno dei deficit nutrizionali più comune che può causare il rischio di sviluppare malattie gestazionali, diabete mellito, parto pretermine e restrizione della crescita intrauterina. D'altra parte, un eccesso di tale metallo risulta essere in grado di generare specie reattive dell'ossigeno, stress ossidativo, ferroptosi e autofagia, preeclampsia e in alcuni casi aborto. La placenta svolge un ruolo essenziale nel trasporto del ferro al feto; infatti, una sua carenza può portare al deterioramento neurocognitivo con conseguenti futuri disturbi di

salute mentale, come la depressione, ansia, autismo, schizofrenia e problemi di memoria (Zhang et al., 2022).

Il **litio**, un metallo la cui possibile presenza è nell'acqua potabile, è stato classificato come teratogeno. Oltre ad aumentare il rischio di aborti spontanei e parto pretermine, esso passa attraverso la placenta e raggiunge il feto dove può provocare malformazioni cardiache, gozzo fetale, ipotiroidismo, resistenza all'insulina, minor lunghezza e ridotto peso alla nascita (Harari et al., 2015).

Il **titanio** risulta essere uno degli elementi metallici più comuni, soprattutto come biossido di titanio, utilizzato come rivestimento nelle materie plastiche, nei prodotti cosmetici e negli additivi. Il biossido di titanio, classificato dall'ECHA (Agenzia europea per le sostanze chimiche) come cancerogeno, può entrare nell'organismo attraverso l'ingestione, l'inalazione o per contatto cutaneo. L'esposizione al titanio in gravidanza causa una riduzione della formazione del sistema vascolare placentare e parto pretermine. Il titanio raggiunge il feto, al quale può causare alterazione dell'attività respiratoria, malattie cardiache, sofferenza fetale, basso peso alla nascita e rischio di sviluppare malattie del tubo neurale (NTD). Inoltre, vi è una possibile correlazione fra l'esposizione e deficit cognitivi associati a neurotossicità, malattie cardiovascolari e respiratorie anche a lungo termine (Sun et al., 2022).

## 3 – MATERIALI E METODI

---

Il lavoro si basa sull'analisi di tessuto placentare umano per la ricerca di diversi contaminanti quali amianti, microplastiche e metalli pesanti.

Il tessuto in studio è stato analizzato a seguito della preparazione e colorazione della sezione istologica e dopo digestione chimica della componente organica. I campioni ottenuti sono stati analizzati con il microscopio ottico per una prima osservazione generale e individuazione di componenti estranee al tessuto. L'osservazione con il microscopio elettronico a scansione è stata effettuata per caratterizzare morfologicamente e chimicamente le diverse fasi minerali eventualmente presenti. Infine la spettroscopia micro-Raman è stata utilizzata per determinare i moti vibrazionali dei composti chimici presenti nel tessuto in esame.

### **3.1 – PREPARAZIONE DEI CAMPIONI DI PLACENTA**

Per la preparazione dei campioni istologici è stato seguito un protocollo di laboratorio standardizzato presente nelle aziende ospedaliere. I tessuti placentari sono stati raccolti durante il parto dal ginecologo, partecipante alla ricerca. Le partorienti hanno dato il consenso all'utilizzo del materiale placentare a scopo di ricerca.

#### **3.1.2–PREPARAZIONE SEZIONI ISTOLOGICHE E COLORAZIONE**

La preparazione dei campioni placentari ha previsto l'utilizzo delle seguenti attrezzature:

- bisturi, lamette, forbici chirurgiche come attrezzature da taglio
- pinzette
- pennelli
- microtomo
- contenitori in plastica con tappo a vite
- acqua deionizzata
- biocassette da inclusione
- etanolo nelle seguenti concentrazioni 70%, 95% e 100%



- bioClear
- ematossilina di Mayer
- eosina

I tessuti placentari fissati in formalina sono stati analizzati secondo un protocollo definito all'interno della ricerca che prevede un campionamento delle membrane, del tessuto placentare versante fetale, porzione centrale e versante materno (o decidua). Ogni campione è stato poi incluso in blocchetti di paraffina e in seguito la paraffina in eccesso è stata eliminata con l'utilizzo di bisturi e lamette.

Grazie all'utilizzo del microtomo sono state tagliate sezioni di tessuto dello spessore di circa 3-5 micron (Fig. 23).



Fig. 23: Microtomo con campione incluso in paraffina

Successivamente, con l'aiuto di un pennellino, le sezioni ottenute con il microtomo vengono messe in acqua deionizzata, preriscaldata, per la distensione su un vetrino portaoggetti. A questo punto i vetrini vengono posizionati su una piastra riscaldante a circa 40-45°C per eliminare la paraffina e, con carta assorbente, l'eccesso di acqua (Fig. 24).



Fig.24: Piastra riscaldante

Asciugati i vetrini, si procede con la colorazione con Ematossilina-Eosina (EE). Questa colorazione, utilizzata nella microscopia ottica, è la più comune colorazione istologica con la quale è possibile identificare nei tessuti i diversi elementi cellulari che li costituiscono. È definita colorazione combinata o bicromica perché avviene grazie alla combinazione di due coloranti: ematossilina ed eosina.

Grazie a questa colorazione i nuclei appaiono di colore blu-viola ed il citoplasma rosa, in questo modo sono facilmente distinguibili (biodaily.it).

Per procedere con la colorazione viene seguito il protocollo standardizzato, che prevede i seguenti passaggi:

- eliminazione della paraffina dai campioni immergendoli per due volte per 30 secondi nel BioClear
- reidratazione in etanolo a concentrazioni decrescenti 100%, 95% e 70% per 5 minuti l'uno
- immersione in acqua corrente
- colorazione: ematossilina di Mayer filtrato per 20 minuti, lavaggio in acqua corrente, eosina per 4 minuti, disidratazione in etanolo a concentrazioni crescenti 70%, 95% e 100% per 5 minuti l'uno, chiarificazione in BioClear per tre volte per 30 secondi, montaggio con Eukitt e vetrino copri oggetto.

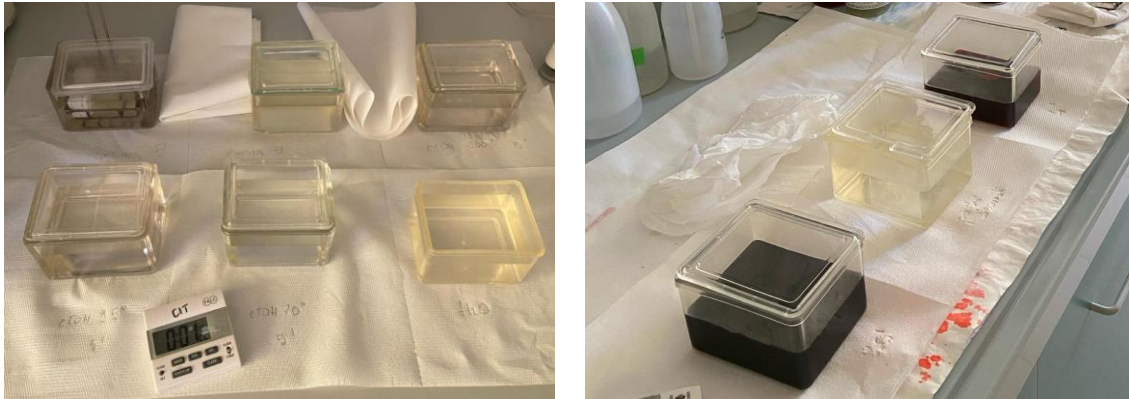


Fig. 25: A sinistra contenitori con bioClear, etanolo a diverse concentrazioni e acqua; a destra contenitori per colorazione in Ematossilina ed Eosina



Fig. 26: Campione di tessuto placentare colorato in EE

### 3.1.3 – DIGESTIONE CHIMICA

La digestione chimica del tessuto è indispensabile per poter caratterizzare e quantificare le sostanze inorganiche, in particolare amianto, presenti nel campione attraverso l'utilizzo del microscopio elettronico a scansione con annessa microsonda in dispersione di energia.

Per la digestione chimica del campione viene seguito il seguente protocollo standardizzato:

- estrazione di circa 0.5g di tessuto placentare, pesatura con bilancia tecnica e sminuzzatura con bisturi o lamette
- digestione della componente organica, inserire il campione all'interno di una falcon contenente 30 mL di NaClO
- riscaldare la falcon, all'interno di un becher contenente acqua, su piastra riscaldante a 60°C
- filtrare dopo 72 ore su membrana Millipore diluendo la soluzione con acqua deionizzata riscaldata a 60°C
- posizionare, con l'aiuto di pinzette, il filtro sugli appositi pin-stub e in seguito nel piattello porta campioni all'interno della camera del microscopio elettronico a scansione per procedere con l'osservazione in microscopia elettronica.

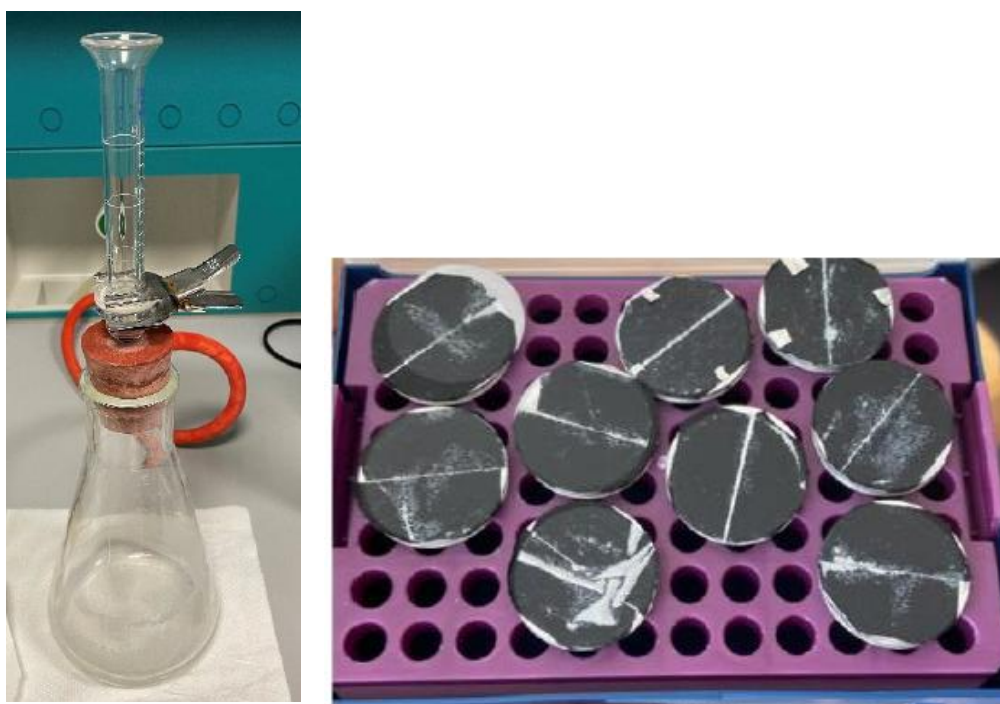


Fig. 27: A sinistra filtrazione del campione e a destra supporto porta campioni e pin-stub con filtri

## **3.2 – TECNICHE MICROSCOPICHE**

Le tecniche di microscopia hanno un ruolo centrale nella ricerca scientifica e nella diagnostica, la microscopia permette di osservare dettagli microscopici non visibili ad occhio nudo. Le tecniche utilizzate per lo studio del tessuto placentare sono la microscopia ottica, microscopia elettronica e spettroscopia micro-Raman.

### **3.2.1 – MICROSCOPIA OTTICA**

Il primo microscopio nasce nel 1595 in una bottega di fabbricanti di lenti olandesi; Zacharia Janssen e suo figlio scoprirono che più lenti montate su un singolo tubo ingrandivano oggetti vicini. In seguito, nel 1609 Galileo Galilei, dopo aver studiato i principi fisici del funzionamento delle lenti, costruì uno strumento di miglior qualità con la possibilità di mettere a fuoco. Diversi anni dopo, l'olandese Anton Van Leeuwenhoek, un mercante di stoffa, acquisendo una grande abilità nel taglio delle lenti, riuscì ad ottenere ingrandimenti superiori. Costruì verso la fine del 1600 un microscopio semplice formato da una lente, un porta campione, messa a fuoco e un traslatore del campione (Fig.28).



Fig. 28: Microscopio semplice di Leeuwenhoek

(<https://www.microbiologiaitalia.it/batteriologia/microscopio-ottico-la-storia-delle-origini/>)

Gli studi e le pubblicazioni di Leeuwenhoek, dove venivano descritti per la prima volta protozoi e batteri all'interno dell'acqua, forniscono gli strumenti iniziali per l'utilizzo del microscopio per l'osservazione di particelle non visibili ad occhio nudo. Il microscopio, quindi nel corso degli anni, diventa uno strumento sempre più importante e nel 1665 fu costruito il microscopio composto di Hooke. Esso era formato da oculare, messa a fuoco, obiettivo, porta campione, lente sferica ad acqua e lampada ad olio (Fig. 29). È proprio

grazie a questo strumento che Hooke per la prima volta riuscì ad osservare le cellule riconosciute poi, nella prima metà dell'Ottocento, come elementi fondamentali della materia vivente.



Fig. 29: Microscopio composto di Hooke

(<https://www.microbiologiaitalia.it/batteriologia/microscopio-ottico-la-storia-delle-origini/>)

L'utilizzo del microscopio è diventato di grande importanza anche in campo medico ed oggi è uno strumento indispensabile nella ricerca scientifica (<https://www.microbiologiaitalia.it>). Esistono microscopi ottici a luce trasmessa e microscopi ottici a luce polarizzata.

### 3.2.1.1 – MICROSCOPIO OTTICO A LUCE TRASMESSA

Gli attuali microscopi ottici a luce trasmessa sono costituiti da due strutture di lenti inserite in un tubo portalenti. L'oculare è la lente sulla quale viene appoggiato l'occhio, l'obiettivo è invece la lente posizionata all'altra estremità del tubo vicino all'oggetto da osservare.

I microscopi possiedono diversi obiettivi con differente potere di ingrandimento, i quali sono posizionati su una torretta girevole portaobiettivi, il potere di ingrandimento è indicato sulle lenti. L'insieme di oculare, tubo meccanico porta lenti e obiettivi forma il sistema ottico del microscopio. Il microscopio è fornito di un sistema di illuminazione, il quale può comprendere solo uno specchio, posto sotto l'oggetto che viene osservato, che riflette la luce solare o di una lampada sull'oggetto oppure un condensatore che concentra la luce sull'oggetto e un diaframma che regola la quantità che viene riflessa. Il campione in studio, dopo essere preparato in sezioni sottili ed eventualmente in seguito colorato, viene posto su un vetrino portaoggetti con relativo vetrino coprioggetto; esso è sistemato sul



tavolino portaoggetti con un foro per il passaggio della luce. Il campione viene attraversato dalla luce e la sua immagine ingrandita dal sistema ottico.

Il microscopio possiede anche una struttura di sostegno formata da una base di appoggio, il tavolino portaoggetti e il supporto dove è collegato il tubo portalenti. La vite macrometrica, posizionata sul supporto, permette di avvicinare o allontanare il tubo portalenti al vetrino per permettere la messa a fuoco e la vite micrometrica aiuta a migliorare la messa a fuoco grazie a piccoli movimenti (Barbone, 2010; Fig.30).

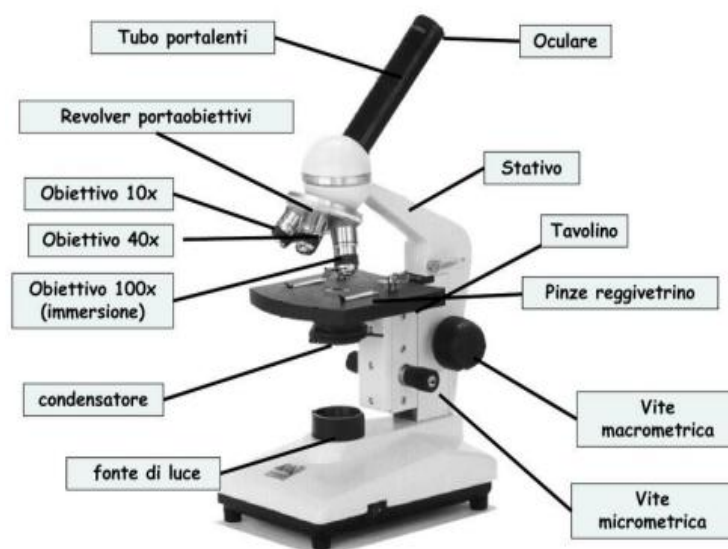


Fig. 30: Microscopio ottico

([https://chimicapratICA.altervista.org/images/File/Biologia/Microscopia/Microscopio\\_ottico](https://chimicapratICA.altervista.org/images/File/Biologia/Microscopia/Microscopio_ottico))

### 3.2.1.2 – MICROSCOPIO OTTICO A LUCE POLARIZZATA

Il microscopio ottico a luce polarizzata utilizza la luce polarizzata per l'osservazione dei campioni che ne intensifica il contrasto migliorando così la qualità dell'immagine. La luce è un'onda elettromagnetica con una variazione periodica di un campo elettrico e di un campo magnetico. La luce bianca è un fascio costituito da un numero infinito di vibrazioni che si propaga perpendicolarmente rispetto alla direzione di propagazione dello stesso fascio, la luce polarizzata invece è un fascio di luce con un unico e preciso piano di vibrazione del campo elettrico. Per poter ottenere la luce polarizzata, la luce bianca deve passare attraverso un polarizzatore.

Il polarizzatore è un filtro in grado di selezionare il raggio luminoso incidente sul campione, fornendo un fascio di luce con un solo piano vibrazionale. Per poter funzionare, il polarizzatore deve essere posto prima del campione, fra la luce e il tavolino portaoggetti, e posizionare un secondo polarizzatore, chiamato analizzatore, tra gli obiettivi e l'oculare. I due filtri sono ruotati di  $90^\circ$  l'uno rispetto all'altro; se l'analizzatore viene ruotato in modo da essere perpendicolare al polarizzatore il fascio luminoso viene interrotto e si osserverà buio, questa posizione è chiamata a "polarizzatori incrociati". Se il polarizzatore e l'analizzatore si trovano paralleli la luce passerà completamente e si otterrà la massima luce. Questa posizione è chiamata a "polarizzatori paralleli" (Rinaudo, 2020; Fig.31).

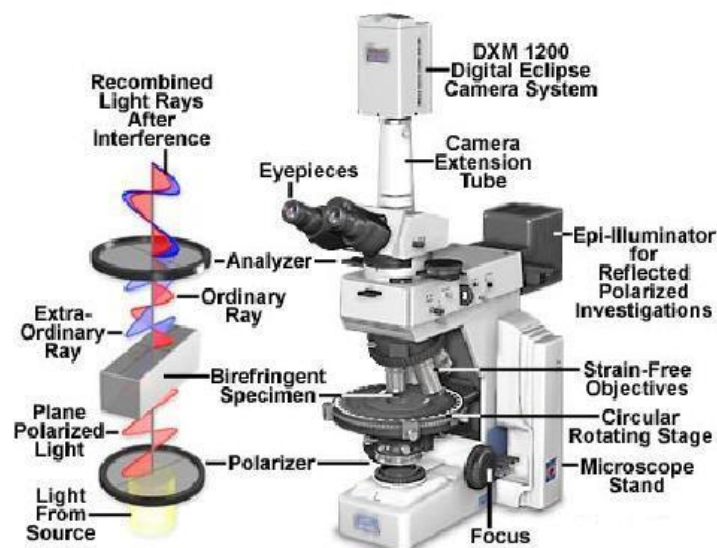


Fig. 31: Microscopio ottico a luce polarizzata  
(Rinaudo, 2020)

### 3.2.2 – MICROSCOPIO ELETTRONICO A SCANSIONE (SEM)

Il microscopio elettronico a scansione con annessa microsonda in dispersione di energia (SEM/EDS) permette di osservare campioni con ingrandimenti e risoluzione migliaia di volte superiore alla microscopia ottica. È una tecnica estremamente versatile, che viene applicata in tutti i campi per caratterizzare campioni naturali o artificiali, inorganici o organici. Genera immagini in formato digitale, risultato della scansione della superficie del campione eseguita con un fascio di elettroni. È una tecnica non distruttiva che però presenta alcuni limiti come l'impossibilità di effettuare analisi *in situ*, non consente



l'identificazione di fasi minerali che possiedono la stessa composizione chimica e per poter confrontare gli spettri ottenuti è necessario un database di riferimento.

Il SEM è una strumentazione elettro-ottica costituita da una sorgente di elettroni, un anodo verso cui sono accelerati gli elettroni, due lenti elettromagnetiche per la focalizzazione degli elettroni, una lente di scansione e di messa a fuoco del preparato, una camera con tavolino porta campioni e rilevatori di vario tipo, rilevatori per l'acquisizione e la trasmissione ai dispositivi di elaborazione dei segnali generati dall'interazione fra il fascio elettronico e il campione ed uno schermo dove viene visualizzata l'immagine (Fig. 32).



Fig. 32: Microscopio elettronico a scansione  
(Rinaudo, 2020)

La sorgente di elettroni, posizionata nella parte superiore della colonna, in genere, è costituita da un filamento di tungsteno o esaboruro di lantanio, funziona da catodo ed una volta riscaldato a temperature di  $\sim 2700$  K emette elettroni grazie all'effetto termoionico. La sorgente in alcuni casi è composta da una sorgente ad emissione di campo chiamata FEG (Field Emission Gun), in questo caso si ottengono migliori prestazioni strumentali. Il filamento è situato all'interno di un cilindro forato e polarizzato, il Wehnelt, che seleziona un fascio di elettroni. La polarizzazione può essere più o meno negativa rispetto al fascio di elettroni. Al di sotto del cilindro troviamo un anodo che è in grado di accelerare a energie variabili gli elettroni emessi dal filamento. Il filamento emette gli elettroni in tutte le direzioni che vengono convogliati in un'unica direzione grazie al campo elettrico di

polarizzazione del Wehnelt e la differenza di potenziale che si trova fra lui e l'anodo. La regione dove gli elettroni sono convogliati è definita *cross over* dove si forma l'immagine della sorgente (Fig. 33). La quantità di corrente che attraversa il filamento determina la quantità di elettroni estratti, in due condizioni però il numero di elettroni estratti può considerarsi costante. Tali condizioni sono il primo e il secondo punto di saturazione del filamento dove il fascio elettronico risulta stabile. Maggiore quantità di elettroni estratti e maggiore stabilità nel tempo risultano nel secondo punto di saturazione, per questi motivi le analisi vengono effettuate in questa condizione (Rinaudo e Croce, 2020).

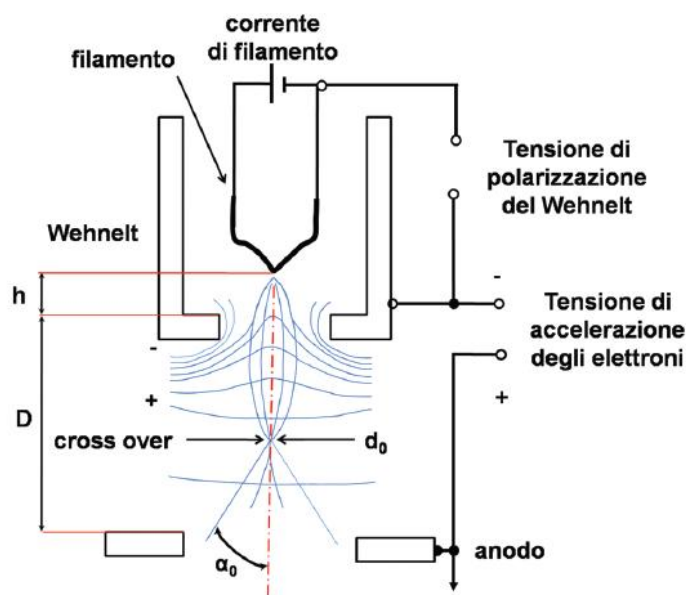


Fig. 33: Schema rappresentativo della funzione del Wehnelt e dell'anodo  
(Rinaudo e Croce, 2020)

Nella colonna del microscopio, sotto l'anodo, troviamo tre lenti elettromagnetiche. Le prime due lenti collimano e regolarizzano la larghezza del fascio, mentre la terza, l'ultima in basso, permette la messa a fuoco del campione in base alla distanza di lavoro desiderata (Fig. 34). Dal passaggio del fascio sulle lenti vengono generate quattro tipi di aberrazioni che l'operatore può modificare durante l'analisi.

La prima aberrazione è definita sferica dove gli elettroni che corrono a distanza diverse rispetto all'asse sono focalizzati su diversi punti; la seconda è quella cromatica in questo caso gli elettroni che possiedono diversa energia sono focalizzati in piani diversi per la diversa velocità del fascio; la terza aberrazione è di diffrazione dove per effetto dell'ondulazione dell'elettrone e della dimensione della lente non tutte le onde raggiungono la lente; l'ultima aberrazione, che può essere generata da diversi fattori, è

l'astigmatismo cioè un'asimmetria nei campi delle lenti. Le aberrazioni sferiche e cromatiche possono essere corrette diminuendo la lunghezza focale, cioè l'angolo di divergenza tra il fascio elettronico e il campione, questa modifica però può peggiorare la diffrazione. In questo caso quindi si diminuisce la lunghezza focale delle lenti, ma il campione non deve entrare nel campo magnetico delle lenti stesse. Per correggere l'astigmatismo, è possibile usare gli stigmatori composti da bobine di compensazione. Due coppie di bobine vicine all'asse ottico effettuano la scansione (Rinaudo e Croce, 2020).

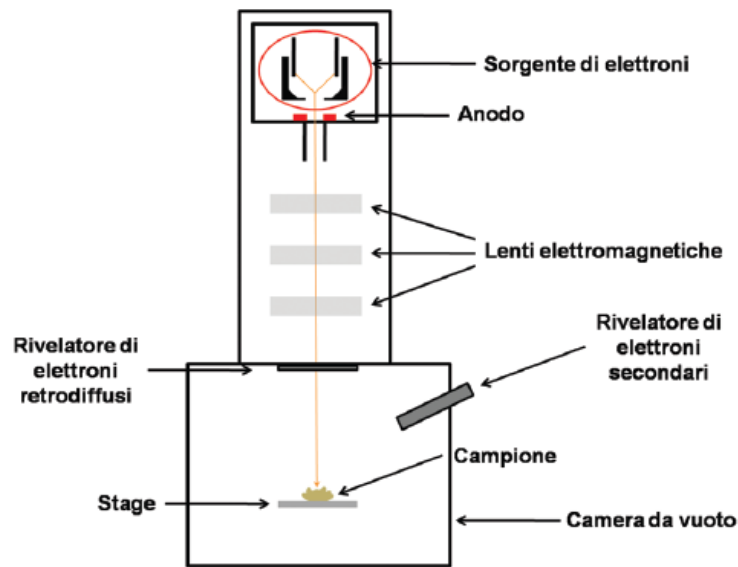


Fig. 34: Schema interno del SEM  
(Rinaudo e Croce, 2020)

Nella camera porta campione (Fig. 35) sono posizionati i campioni da analizzare; all'interno di tale camera troviamo dei tavolini, chiamati *stage*, i quali consentono di ruotare, inclinare e muovere il campione nelle tre dimensioni dello spazio. Una pompa rotativa e una a diffusione mantengono la colonna sottovuoto ( $10^{-4} - 10^{-6}$  torr), in modo da raggiungere la pressione necessaria per poter svolgere il lavoro.

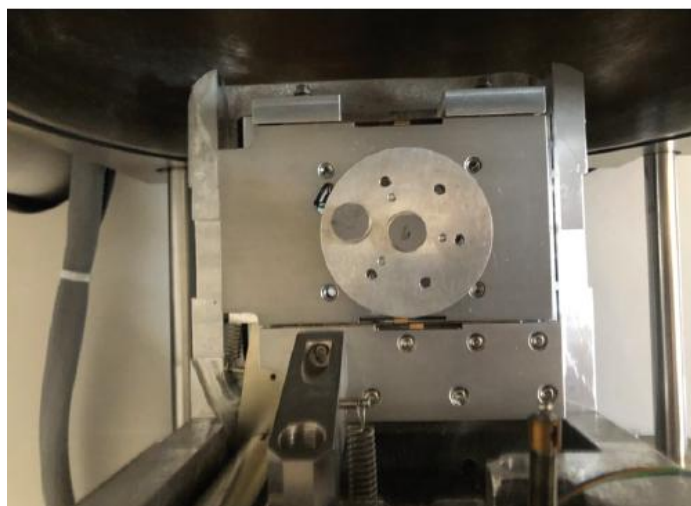


Fig. 35: Camera porta campioni del SEM vista dall'alto  
(Rinaudo e Croce, 2020)

I campioni da analizzare sono posizionati su *pin-stub*, dei supporti che, grazie ad una piccola staffa alla base, vengono inseriti nei fori del piattello della camera porta campioni (Rinaudo e Croce, 2020).

### 3.2.2.1 – INTERAZIONE FRA ELETTRONI E CAMPIONE

Posto il campione nell'apposita camera e avviato il microscopio, il fascio elettronico generato dal filamento colpisce il materiale da analizzare e come un pennello elettronico scansiona il campione oggetto di studio linea per linea. Dall'interazione degli elettroni con il campione si ha la produzione di diversi segnali, i quali forniscono le informazioni morfologiche e composizionali dell'oggetto in esame. Le immagini fornite dal SEM sono immagini virtuali frutto dell'analisi dei segnali diffusi dopo l'interazione del campione con il fascio elettrico primario. Diversi fenomeni fisici vengono generati dall'interazione fra il pennello elettronico e le nuvole elettroniche del materiale studiato, si chiamano elettroni retrodiffusi se gli elettroni del fascio rimbalzano elasticamente rispetto ai nuclei degli elementi da cui è formato il campione, essi originano dalla porzione di fascio riflessa, hanno un'energia fra i 50eV e l'energia di incidenza del fascio, sono prodotti in profondità e danno informazioni morfologico-composizionale; si generano elettroni secondari quando gli elettroni scalzano elettroni su orbitali più esterni degli atomi del campione, hanno un'energia inferiore a 50eV e sono generati dagli strati più superficiali. Essendo elettroni dei livelli atomici più esterni danno informazioni morfologiche della superficie

dell'oggetto in studio; si originano i raggi X quando un elettrone del fascio riesce ad allontanare un elettrone dei livelli più interni dell'atomo, resta così un posto libero che può essere occupato da un elettrone del livello superiore originando fotoni X, i raggi X sono acquisiti dai rilevato EDS o da rilevatori WDS dando informazioni chimiche (Rinaudo e Croce, 2020) (Fig. 36).

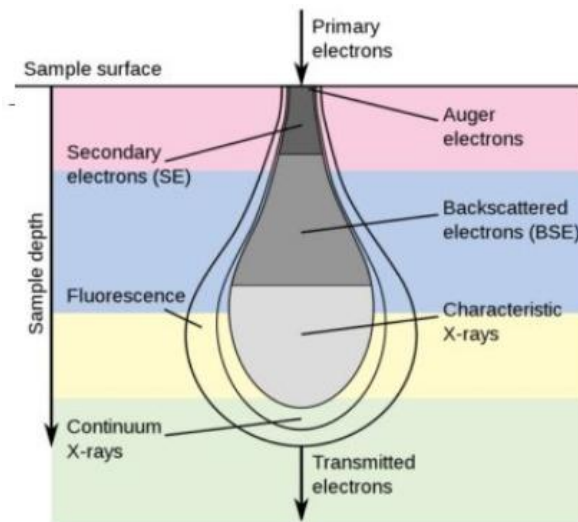


Fig. 36: Pera di eccitazione

### 3.2.2.2 – RILEVATORI DI ELETTRONI

A differenza del segnale emesso esiste un detector specifico, posto all'interno della camera porta campioni, con il compito di raccogliere o gli elettroni secondari o retrodiffusi o i raggi X.

Il rilevatore degli elettroni secondari è a elevata tensione, 10kV, ed è posto a basso angolo così che possa attirare gli elettroni secondari con bassa energia. Si ottiene un'immagine in scala di grigi che fornisce informazioni sulla tridimensionalità morfologica della zona del campione analizzata (Fig.37).



Fig. 37: Rilevatore di elettroni secondari  
(Rinaudo e Croce, 2020)

Il rivelatore di elettroni retrodiffusi è situato sopra al campione in modo da raccogliere gli elettroni retrodiffusi, sono elettroni ad energia più alta e si generano anche a pochi micron di profondità nel campione. L'immagine che si ottiene della porzione di campione analizzata dal fascio è in scala di grigi. Grazie al contrasto di tonalità vengono evidenziate le differenti composizioni chimiche che costituiscono il campione in studio. Le parti formate da peso atomico maggiore saranno più chiare, mentre in scuro risulteranno le parti formate da elementi chimici con peso atomico minore (Fig. 38).



Fig. 38: Rilevatore di elettroni retro diffusi  
(Rinaudo e Croce, 2020)

L'EDS, rivelatore in dispersione di energia, originando spettri a raggi X dà informazioni chimiche del campione. Ogni picco dello spettro corrisponde ad una specie atomica

differente. Grazie alla possibilità di poter fermare la scansione del fascio è possibile effettuare analisi puntuali su una specifica sezione di campione. È possibile effettuare anche analisi lineari, areali e ricostruire mappe a falsi colori evidenziando i diversi elementi nell'area studiata (Fig.39).



Fig. 39: Rivelatore in dispersione di energia  
(Rinaudo e Croce, 2020)

Ogni atomo ha un suo spettro caratteristico, in modo da poterlo riconoscere, oltre allo spettro caratteristico del campione troviamo uno spettro continuo, la radiazione di fondo, che deriva dall'interazione dei nuclei degli atomi con il fascio elettronico primario. Sistemi di rilevazione in grado di separare le diverse energie delle radiazioni servono per diminuire la radiazione di fondo e permettere quindi di ottenere la composizione chimica del campione in studio (Fig. 40).

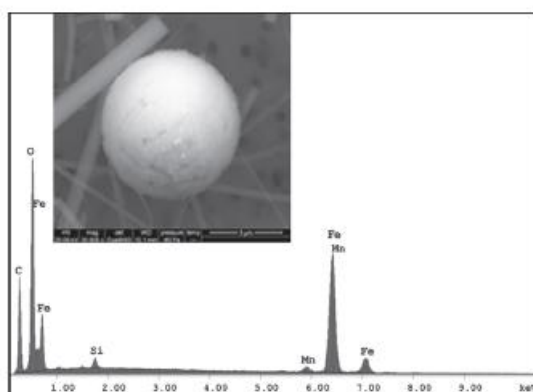


Fig.40: Spettro EDS di una particella di metallo in un filtro di particolato atmosferico  
(Rinaudo e Croce, 2020)



Il rivelatore EDS è formato da un monocristallo di silicio drogato in superficie con litio, contatore Si(Li), o da un monocristallo di germanio con specifici difetti reticolari. In tempo reale è possibile analizzare tutto lo spettro di raggi X che viene emesso dal campione, perché ciò avvenga è importante che venga mantenuta costante la distanza tra sorgente, campione, contatore e angolo di raccolta dei raggi X, il *take off*.

Per uno corretto funzionamento, il rivelatore EDS è conservato, grazie all'azoto liquido, a  $-190^{\circ}\text{C}$ , in questo modo il litio non diffonde nel silicio e le posizioni dei difetti reticolari del germanio non si alterano (Rinaudo e Croce, 2020).

### 3.2.2.3 – MODALITA' OPERATIVE DEL SEM/EDS

Il SEM/EDS può operare in tre modalità di vuoto differenti: alto vuoto, basso vuoto e Environmental-SEM.

La modalità ad alto vuoto, HV *High Vacuum*, lavora a pressione di  $10^{-6}$  Pa; possono essere analizzati solo campioni conduttivi e/o metallizzati e secchi. Si ottengono immagini ad altissima risoluzione, fino a 200000x, inoltre è possibile ottenere analisi chimiche quantitative. Nella modalità a basso vuoto, LV *Low Vacuum*, la pressione varia fra 10 e 130 Pa. Viene utilizzata su campioni che subirebbero deterioramento se analizzati nella modalità ad alto vuoto, può essere effettuata su campioni non conduttivi, ma devono essere secchi. L'ingrandimento è minore rispetto alla modalità HV e le analisi sono solo di tipo qualitativo. Nella modalità *Environmental-SEM*, E-SEM, si applica una pressione di tipo ambientale dai 10 ai 2600 Pa. Si possono analizzare campioni che contengono acqua e lavorare in atmosfera controllata, è possibile quindi lavorare con materiali umidi, campioni biologici, sali idrati ed altri campioni che contengono liquidi senza dover eseguire particolari preparazioni, in questo modo vengono mantenute le caratteristiche strutturali del campione in studio (Rinaudo e Croce, 2020).

Le analisi effettuate con il SEM/EDS permettono di combinare informazioni morfologiche derivanti dal microscopio elettronico a scansione ed informazioni semi-quantitative ottenute dai raggi X direttamente sul campione. Da ogni analisi puntuale eseguita si ottiene uno spettro EDS costituito da picchi caratteristici per i diversi elementi presenti nel campione. Lo spettro EDS è caratteristico della composizione chimica del campione in quanto la diversa altezza dei picchi è in base all'intensità di rilevazione di una determinata specie atomica (Rinaudo e Croce, 2020).



L'utilizzo della microscopia elettronica a scansione ha trovato grande successo nella ricerca di fibre di amianto in tessuti respiratori e una loro correlazione con lo sviluppo di patologie gravi alle vie respiratorie quali mesotelioma, asbestosi e carcinoma polmonare. Inoltre, è stata riconosciuta anche una correlazione fra l'esposizione alle fibre di amianto e lo sviluppo di neoplasie ovariche e alla laringe. Per questo motivo la microscopia elettronica può essere un valido strumento per la rivelazione di fibre di amianto e altre particelle estranee, quali metalli, in tessuti anche extrarespiratori.

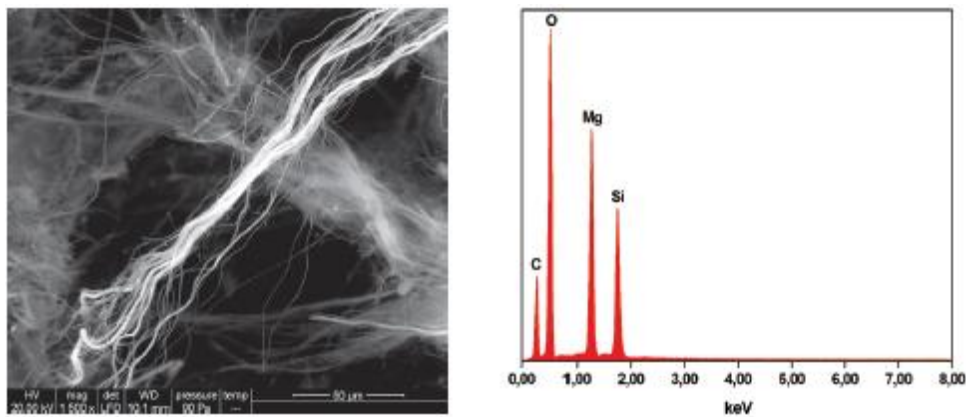


Fig. 41: A destra immagine SE di fibra di Crisotilo; a sinistra il relativo spettro EDS  
(Rinaudo e Croce, 2020)

Come tutte le tecniche anche la microscopia elettronica a scansione presenta dei vantaggi e degli svantaggi. Il vantaggio più grande è la possibilità di ottenere immagini ad ingrandimenti nettamente maggiori della microscopia ottica, si può osservare inoltre sia la morfologia superficiale, tramite gli elettroni secondari, sia la morfologia e le posizioni di aree formate da elementi con peso atomico differente, grazie agli elettroni retrodiffusi, in alta risoluzione. Grazie alla possibilità di abbinare uno spettroscopio EDS si possono ottenere spettri di composizione chimica, puntuali o areali, e mappe composizionali a falsi colori. La composizione chimica non consente però di distinguere fasi con composizione chimica uguale o poco differente, ad esempio i polimorfi e gli pseudo-polimorfi, in questo caso è consigliabile utilizzare tecniche quali la spettroscopia micro-Raman (Rinaudo e Croce, 2020).

### 3.2.3 – SPETTROSCOPIA MICRO-RAMAN

La spettroscopia Raman è una tecnica spettroscopica non distruttiva, essa si è sviluppata grazie ad osservazioni sperimentali sulla diffusione della luce da parte del fisico indiano Chandrasekhara Venkata Raman che, nel 1928, analizzando la radiazione diffusa, scoprì che una parte della radiazione aveva frequenza diversa da quella della radiazione incidente. Raman constatò che la frequenza di tale parte di radiazione diffusa, definita radiazione Raman, dipende dalla struttura del materiale analizzato e che cambiando la lunghezza d'onda della radiazione incidente lo spostamento della radiazione Raman rispetto a quella incidente non cambia. Grazie a questi studi e agli approfondimenti Raman, nel 1931, vinse il premio Nobel, ma l'applicazione della tecnica si diffuse solo a partire dagli anni Sessanta quando furono disponibili sorgenti laser abbastanza potenti. La spettroscopia Raman può essere utilizzata su campioni allo stato solido, liquido e gassoso con la capacità di identificare sostanze all'interno del campione anche in percentuali inferiori all'1%. Accoppiando allo spettroscopio un microscopio ottico, spettroscopia micro-Raman, si può selezionare un'area su cui indirizzare il fascio laser e in questo modo ottenere lo spettro di materiali presenti nell'area prescelta. In questo modo, è possibile riconoscere eterogeneità sia composizionali che strutturali presenti nel campione. La spettroscopia micro-Raman non richiede una specifica preparazione del campione da analizzare ed essendo una tecnica non distruttiva il campione può essere utilizzato per altri studi. Durante l'analisi, però, il campione può subire l'interferenza della fluorescenza, emissione molto intensa di fotoni, la quale coprendo parte dello spettro rende difficile rilevare le bande Raman (Rinaudo e Croce, 2020).

Di conseguenza all'irradiazione di un campione con un intenso fascio di radiazioni monocromatiche viene prodotta una radiazione diffusa formata da una diffusione Rayleigh molto intensa alla stessa frequenza della radiazione incidente, una diffusione a frequenze inferiori rispetto alla frequenza della radiazione incidente (righe Stokes) e una diffusione, o righe anti-Stokes, a frequenza superiori rispetto alla frequenza della radiazione incidente. Le righe Stokes e le righe anti-Stokes hanno un'intensità minore rispetto alla diffusione Rayleigh.

La spettroscopia Raman fornisce spettri dove in ascissa è riportato lo spostamento, shift, in  $\text{cm}^{-1}$  tra la frequenza della radiazione osservata e quella della sorgente eccitatrice ed in ordinata sono riportate le intensità relative delle bande (Fig. 42). Le righe Stokes e anti-

Stokes hanno lo stesso shift della riga Rayleigh, la sorgente eccitatrice, con valori positivi e negativi, e grazie alla loro posizione simmetrica rispetto alla Rayleigh vengono utilizzate prima di ogni misura per effettuare la calibrazione dello strumento (Rinaudo e Croce, 2020).

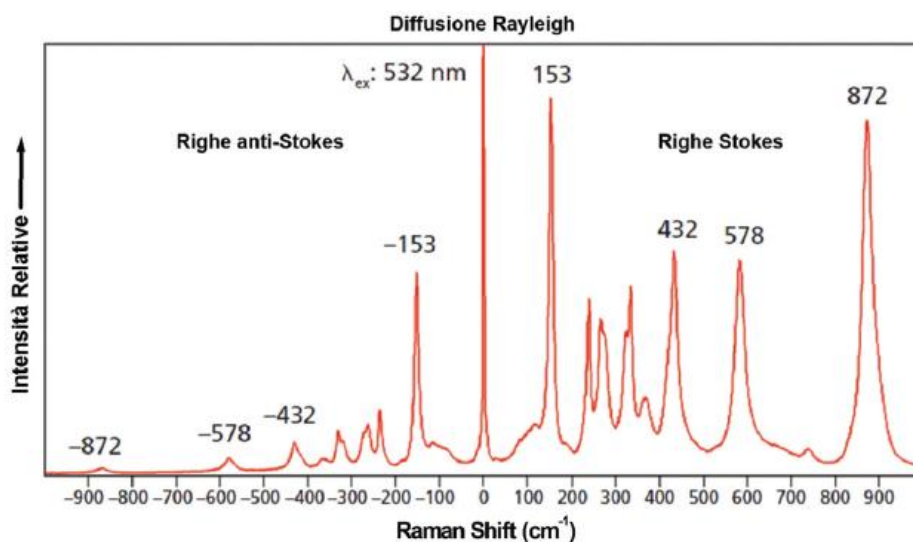


Fig. 42: Spettro Raman di cristallo singolo di LiNbO<sub>3</sub>  
(Rinaudo e Croce, 2020)

Le righe Stokes, essendo più intense, vengono usate nello studio degli spettri Raman, mentre le righe anti-Stokes sono usate per campioni fluorescenti dove la fluorescenza interferisce nell'esame delle righe Stokes e non in quelle anti-Stokes.

Il diagramma dei livelli energetici (Fig.43) ci aiuta a capire l'effetto Raman e l'origine del fenomeno fisico collegato. Come già visto nella distribuzione di Boltzmann, una molecola a temperatura ambiente occupa uno dei livelli energetici dello stato elettronico fondamentale. Se il fotone proveniente dalla sorgente eccitatrice colpisce la molecola, la sua energia causa un salto energetico e la molecola colpita raggiunge uno degli infiniti stati virtuali che si trovano tra lo stato fondamentale e il primo stato elettronico eccitato.

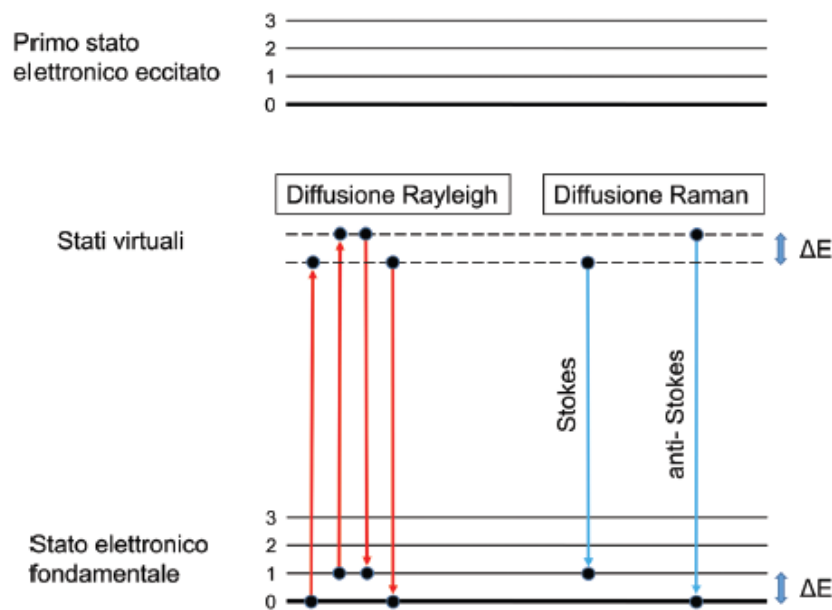


Fig. 43: Diagramma dei livelli energetici  
(Rinaudo e Croce, 2020)

Sono possibili diverse situazioni: una molecola che si trova nello stato elettronico fondamentale viene irradiata dal fascio incidente e passa ad uno stato eccitato ritornando poi allo stato iniziale, essa emette un fotone di energia uguale a quella del fotone incidente  $\Delta E = 0$  (freccie rosse nel diagramma dei livelli energetici Fig. 43).

Essendo la situazione più probabile, è la componente più importante della luce diffusa. Nello spettro Raman genera la banda più intensa e si trova in corrispondenza dell'origine degli assi, definito effetto Rayleigh.

Una seconda possibilità è che l'energia della molecola venga modificata di una quantità  $\Delta E$  negativa o positiva. La molecola che viene irradiata dal fascio incidente passa ad un livello eccitato e decadendo si ferma poco prima dello stato fondamentale, la molecola aumenta così la sua energia e si generano le righe Stokes; se invece la molecola è già ad un livello superiore a quello fondamentale e dopo essere irradiata passa dallo stato eccitato allo stato fondamentale diminuisce la sua energia e si generano le righe anti-Stokes.

Nella diffusione Rayleigh non avviene un'emissione di energia, si ha una collisione elastica fra il fotone e la molecola, le diffusioni Stokes e anti-Stokes invece sono anelastiche e differiscono dalla Rayleigh della quantità  $\pm \Delta E$ . Quando una radiazione incide su un campione, la radiazione che viene diffusa dà origine ad uno spettro Raman.

Esso è formato da una banda principale di massima intensità, la diffusione Rayleigh, e due serie di righe secondarie simmetriche alla riga principale, le righe Stokes e anti-Stokes (Rinaudo e Croce, 2020).

### **3.2.3.1 – STRUMENTAZIONE**

Gli spettroscopi Raman sono formati da una sorgente laser, lenti per la focalizzazione della luce diffusa, un *detector* il quale trasforma la radiazione in segnale elettrico ed un elaboratore con il compito di convertire il segnale in uno spettro. Gli spettroscopi micro-Raman sono dotati anche di un microscopio ottico, attraverso il quale viene inviato il fascio laser sul campione e in seguito raccoglie la radiazione diffusa. Una telecamera collegata al microscopio permette di registrare le immagini e, grazie al sistema confocale, è possibile modulare il piano del fuoco analizzando così zone interne dell'oggetto in studio. La presenza del microscopio ottico consente di acquisire informazioni morfologiche ed eseguire analisi puntuali in diverse zone del campione. Nello spettroscopio Raman è possibile cambiare il tipo di laser in modo da poter scegliere la sorgente eccitatrice migliore per materiale da analizzare. È anche possibile filtrare il segnale in arrivo sul campione per evitarne l'eccessivo eccitamento e diminuire la possibilità di modifica di ciò che viene esaminato, per questa ragione all'interno dello spettroscopio sono inseriti diversi filtri in grado di assorbire sempre più il segnale. I filtri vengono applicati con i comandi presenti nel software del computer.

Il materiale in esame è posto su un piattello e il fascio laser viene fatto incidere sopra, durante l'analisi non deve arrivare luce dall'esterno. I piattelli possono essere movimentati manualmente o attraverso un joystick, esistono anche piattelli rotanti con la possibilità di orientare il campione e analizzarlo a diversi angoli rispetto al fascio incidente. Degli appositi filtri eliminano la componente elastica della radiazione diffusa dal campione la quale non è rilevante nell'analisi, ma può saturare il detector. Invece la componente anelastica che genera le bande Raman è inviata su un reticolo di diffrazione che, dopo aver separato le diverse lunghezze d'onda, le invia al rivelatore. I reticoli di diffrazione possono essere cambiati, una maggiore densità di righe aumenta la risoluzione delle bande Raman, ma diminuisce la dimensione della regione spettrale acquisibile (Rinaudo e Croce, 2020).

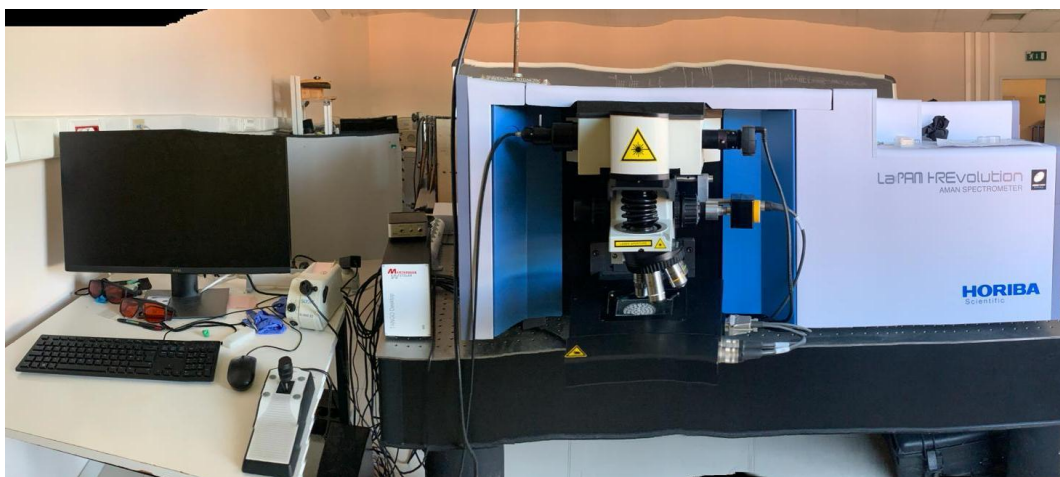


Fig. 44: Spettroscopio micro-Raman del polo DISIT

### 3.2.3.2 – SPETTRO RAMAN: VIBRAZIONI RETICOLARI

L'effetto Raman è collegato alla polarizzabilità dei legami chimici che costituiscono il campione e ne evidenzia le vibrazioni che possono essere divise in due gruppi: i modi vibrazionali di *stretching*, stiramento, e i modi di *bending*, deformazione.

Nella vibrazione di *stretching* cambia continuamente la distanza interatomica lungo l'asse di legame tra due atomi. Lo *stretching* può essere simmetrico, dove tutti e due i legami si allungano o si accorciano quindi entrambi gli atomi o si allontanano o si avvicinano, oppure asimmetrico, in questo caso un legame si allunga e l'altro si accorcia.

Nelle vibrazioni di *bending* invece varia l'angolo tra due legami. Le vibrazioni di bending si distinguono in vibrazioni di *scissoring*, a forbice nel piano, *rocking*, oscillazione nel piano, *wagging*, ondeggiare fuori dal piano e *twisting*, torsione fuori dal piano (Rinaudo e Croce, 2020; Fig. 45).

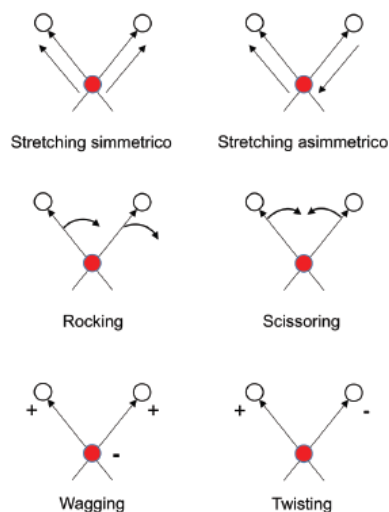


Fig. 45: Schema rappresentativo dei due tipi di *stretching* e dei modi vibrazionali di *bending*, il segno + indica il movimento sopra il foglio della pagina e il segno – il movimento sotto il foglio della pagina (Rinaudo e Croce, 2020)

Nella spettroscopia Raman i modi simmetrici producono bande molto intense, lo spettro Raman è quindi un insieme di bande che vengono prodotte dai modi vibrazionali dei legami sostituenti la struttura cristallina. Quando si interpretano gli spettri Raman, per poter assegnare le bande osservate sperimentalmente ai modi vibrazionali, bisogna tenere in considerazione i diversi legami chimici e i diversi poliedri di coordinazione presenti nel campione cristallino. Quindi maggiore è il numero delle bande sullo spettro Raman più numerosi saranno i tipi di legami o i poliedri di coordinazione presenti nel cristallo in esame, questo è possibile notarlo ad esempio nello spettro Raman del minerale crocidolite,  $\text{Na}_2\text{Fe}^{2+}_3\text{Fe}^{3+}_2[\text{Si}_8\text{O}_{22}(\text{OH})_2]$ , costituito da un numero elevato di bande (Rinaudo e Croce, 2020; Fig.46).

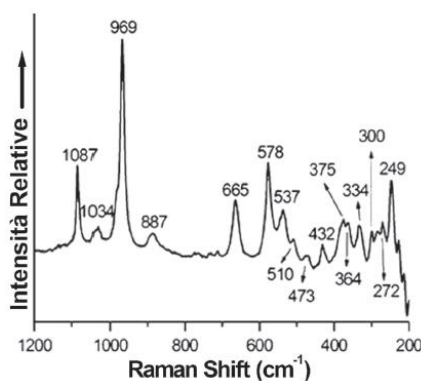


Fig. 46: Spettro Raman della crocidolite (Rinaudo e Croce, 2020)

La spettroscopia Raman permette una sicura identificazione del cristallo e/o minerale in esame, in quanto la struttura tridimensionale di ogni sostanza cristallina è una sua caratteristica particolare. Grazie alla possibilità di utilizzare anche un microscopio ottico si possono ottenere sia informazioni morfologiche sia informazioni sulla presenza di diverse fasi presenti nel campione, individuate nello spettro attraverso bande a frequenze Raman diverse (Rinaudo e Croce, 2020).

Il microscopio ottico accoppiato allo spettroscopio Raman permette di applicare questa tecnica anche per analizzare sezioni istologiche utilizzate per le analisi anatomopatologiche, il campione non necessita di particolari manipolazioni e non deve rispettare determinate dimensioni; l'unico limite è il suo spessore in quanto, deve permettere la messa a fuoco tramite il microscopio ottico. L'utilizzo del microscopio ottico permette di selezionare aree, particelle e fibre su cui inviare il fascio monocromatico. La spettroscopia Raman permette, però, di fare analisi solo qualitative e non quantitative e il segnale del campione deve essere in grado di superare l'intensità dei segnali di fondo. È possibile ottenere sia analisi puntuali che mappe composizionali grazie all'utilizzo di piattelli motorizzati che permettono di muovere il campione nelle tre dimensioni. Anche per la spettroscopia Raman è importante archiviare gli spettri ottenuti dalle fasi standard certificate per poterle confrontare con i dati ottenuti e riconoscere le fasi ignote (Rinaudo e Croce, 2020).

La spettroscopia micro-Raman è utilizzata, con successo, nella ricerca di fibre di amianto e altre particelle all'interno di tessuto respiratorio; è possibile inoltre analizzare anche piccole particelle presenti sulle fibre, come ad esempio la presenza di materiale carbonioso il quale risulta otticamente più scuro. Indirizzando quindi il fascio laser sulle particelle viene registrato sia lo spettro Raman della fibra che quello del materiale presente sulla fibra, questo grazie al fatto che il fascio è in grado di attraversare sia le particelle che il cristallo sulle quali sono presenti (Fig. 47).



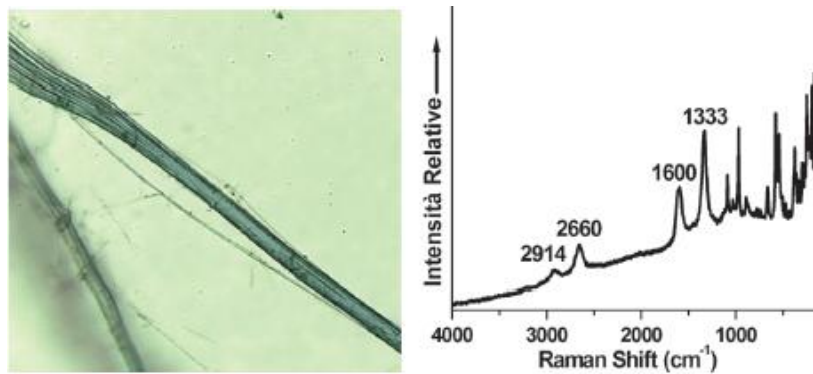


Fig. 47: A sinistra fascio di fibre di crocidolite con presenza di particelle scure (microscopia ottica); a destra spettro Raman delle particelle presenti sulle fibre riconducibili a particelle carboniose

(Rinaudo e Croce, 2020)

Si può quindi affermare che la spettroscopia Raman permette di riconoscere con sicurezza la fase minerale associata a fibre di amianto o a materiale asbestiforme come ad esempio l'erionite, grazie all'unione microscopio ottico – spettroscopio Raman è possibile identificare la presenza di più fasi in un campione con la possibilità di scegliere otticamente l'area da analizzare ed infine permette di caratterizzare anche particelle submicroscopiche presenti sulla superficie del campione in analisi (Croce e Rinaudo, 2020). Negli ultimi anni la spettroscopia micro-Raman è stata applicata anche per la ricerca di fibre di amianto, metalli pesanti e microplastiche su campioni di tessuti extrarespiratori.

## 4 – RISULTATI

---

Nell'ambito della ricerca sono stati analizzati, per l'identificazione di componenti e particelle estranee quali fibre di amianto, microplastiche e metalli pesanti, tre diversi casi studio: CASO 1, CASO 2 e CASO 3. Verrà qui di seguito preso in considerazione il CASO 2 in quanto è quello che ha dato risultati più interessanti e più spunti di riflessione.

L'utilizzo delle diverse tecniche di analisi, microscopia ottica, microscopia elettronica a scansione e spettroscopia micro-Raman ha permesso un'attenta e completa analisi del campione fornendo informazioni sia istologiche che composizionali raggiungendo pertanto il primo obiettivo che era quello di verificare se la stessa strumentazione e le stesse tecniche usate per l'analisi mineralogica di campioni polmonari umani poteva essere adattata al tessuto placentare. Inoltre, con queste tecniche è stato possibile osservare le zone di maggiore concentrazione di suddette particelle all'interno del tessuto placentare.

In prima analisi è stata dunque effettuata l'analisi in microscopia ottica per ottenere le informazioni di base quali l'istologia, eventuali patologie e la possibile presenza di particelle estranee presenti nel tessuto placentare; si è quindi ottenuto un quadro generale del campione. Il campione è stato poi analizzato in microscopia elettronica. Con questa tecnica, grazie anche alla possibilità di osservare il campione con ingrandimenti e risoluzioni maggiori, è stato possibile ottenere informazioni morfologiche, composizionali e chimiche dei componenti presenti nel tessuto in esame. In ultimo, è stata effettuata l'analisi tramite spettroscopia micro-Raman per identificare con sicurezza i componenti e le particelle presenti nel campione.

### **4.1 – CASO 2**

#### **4.1.2 – ANALISI IN MICROSCOPIA OTTICA**

Sono stati analizzate in microscopia ottica sezioni di tessuto ottenute da campioni di placenta inclusi in blocchetti di paraffina, i quali sono stati tagliati in sezioni sottili da circa 5 micron, grazie all'utilizzo del microtomo, ed in seguito colorati in Ematossilina ed Eosina. I vetrini ottenuti sono stati analizzati al microscopio ottico a luce polarizzata,

tenendo in considerazione le sezioni nelle quali sono stati riscontrati elementi importanti per lo studio in oggetto.

Per il caso in esame, si presentano i dati ottenuti osservando il vetrino più rappresentativo, denominato “placenta novembre 1 – 3” dove, in seguito, viene riportato ciò che è stato osservato microscopicamente.

**NOME VETRINO: PLACENTA NOVEMBRE 1 – 3 (Fig. 48)**



Fig. 48: Vetrino placenta novembre 1 – 3

Attraverso l’analisi in microscopia ottica è possibile notare una diffusa fibroialinosi sia a livello deciduale che submembranosa e peri- e inter-villositaria (Fig. 49).



Fig. 49: Diffusa fibroialinosi in porzione di tessuto placentare

Proseguendo con l’analisi è possibile identificare iperplasia delle gemme sinciziali con formazione di nodi (Fig. 50 e Fig. 51).

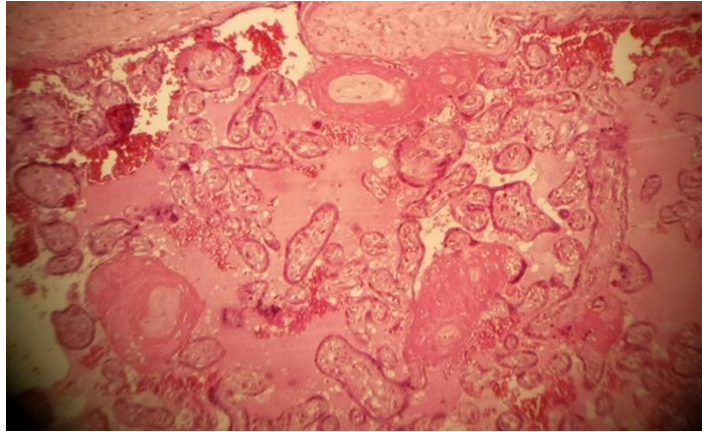


Fig. 50: Iperplasia delle gemme sinciziali e nodi in porzione di tessuto placentare

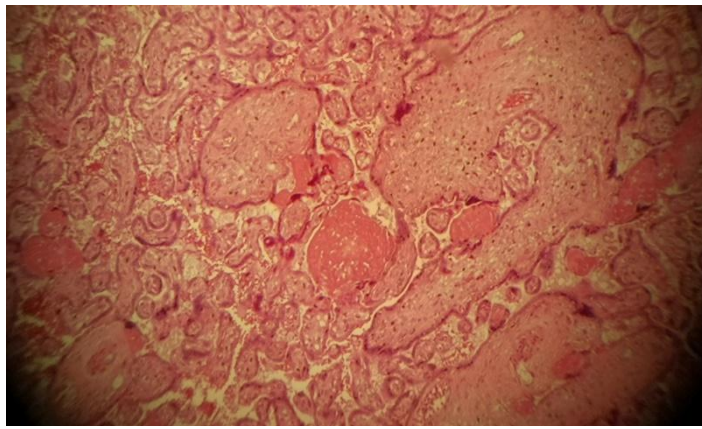


Fig. 51: Iperplasia delle gemme sinciziali e nodi in porzione di tessuto placentare

In questa porzione di tessuto placentare si osservano abbondanti nodi sinciziali (Fig. 52).

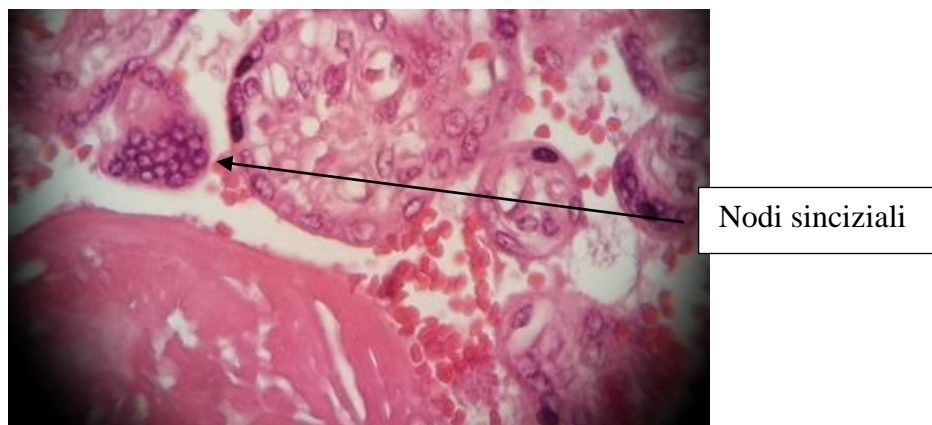
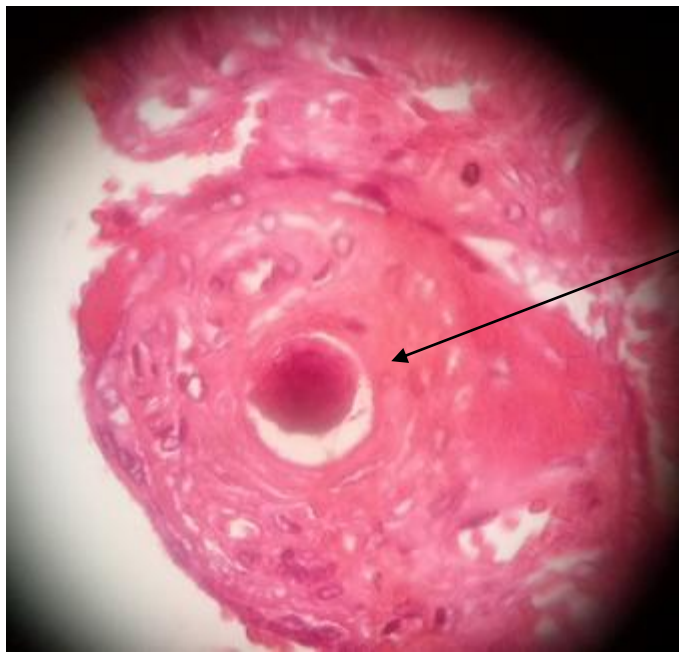


Fig. 52: Nodi sinciziali in porzione di tessuto placentare

Inoltre, sono state riscontrate calcificazioni nello stroma dei villi con morfologia di corpi psammomatosi (Fig. 53).



Calcificazioni nello stroma dei villi con morfologia di corpi psammomatosi

Fig. 53: Calcificazioni nello stroma dei villi con morfologia di corpi psammomatosi in porzione di tessuto placentare

In seguito ad analisi in microscopia ottica, le lesioni osservate rientrano ancora in un *range* fisiologico. Non si sono osservati depositi di minerali e di flogosi. Le calcificazioni sono verosimilmente da attribuire a fenomeni endogeni.

#### **4.1.3 – ANALISI IN MICROSCOPIA ELETTRONICA**

Le analisi con microscopio elettronico (SEM/EDS) sono state effettuate dal Centro Interdipartimentale per lo Studio degli Amianti e di altri Particolati Nocivi "Giovanni Scansetti" dell'Università di Torino, presso il Dipartimento di Scienze della Terra, diretto dalla Prof.ssa Elena Belluso.

Sono stati analizzati i campioni PL2A\_C, PL2A\_D e PL2A\_M, rispettivamente lato coriale, lato deciduale e materno, relativi alla "placenta caso 2", seguendo il protocollo interno del laboratorio (Belluso et al., 2006).

I campioni conservati in formalina sono stati consegnati presso il laboratorio DST UNITO, in seguito una porzione di ciascun campione, circa 0,3 g, è stata digerita chimicamente per eliminare la frazione organica.

Successivamente ogni sospensione è stata filtrata, mediante pompa ad acqua, su membrana in esteri misti di cellulosa (Millipore) con un diametro di 25 mm con pori di 0.45 µm.

Terminata la filtrazione, la membrana è stata sciacquata con acqua microfiltrata calda per la dissoluzione dei microcristalli di NaCl che si sono formati durante la digestione chimica. Una volta asciugato il filtro è stato fatto aderire su un apposito supporto con nastro biadesivo e successivamente metallizzato con grafite.

I campioni sono stati analizzati al SEM-EDS ad un ingrandimento di 4000x. Durante l'analisi sono stati utilizzati sia il rilevatore per gli elettroni secondari; per identificare la morfologia, che il rilevatore per gli elettroni retrodiffusi, per evidenziare le particelle inorganiche e differenziarle da quelle organiche.

Per ciascun campione sono stati analizzati diversi campi microscopici (da 4 a 8 in base alla quantità di particelle presenti nella determinata area in esame) per valutare la distribuzione e l'identificazione del materiale inorganico presente.

I dati sono stati ottenuti grazie all'utilizzo del software INCA.

In seguito, sono riportati, per ciascun campione del caso n. 2, un'immagine della distribuzione generale delle fibre e di alcune delle particelle analizzate presenti sulla membrana ed i relativi spettri energetici.

#### **NOME CAMPIONE: PL2A\_C**

Del campione PL2A\_C sono state analizzate 55 particelle presenti sulla membrana. Di tali particelle si presentano i dati relativi a tre particelle, part. 23, part. 26 e part. 43, risultate significative per lo studio sulla presenza dei metalli pesanti.

## PARTICELLA 23 (Fig. 54)

La particella 23, cerchiata in figura, riscontrata nel versante coriale, risulta essere isodiametrica con diametro di circa 1 micron.

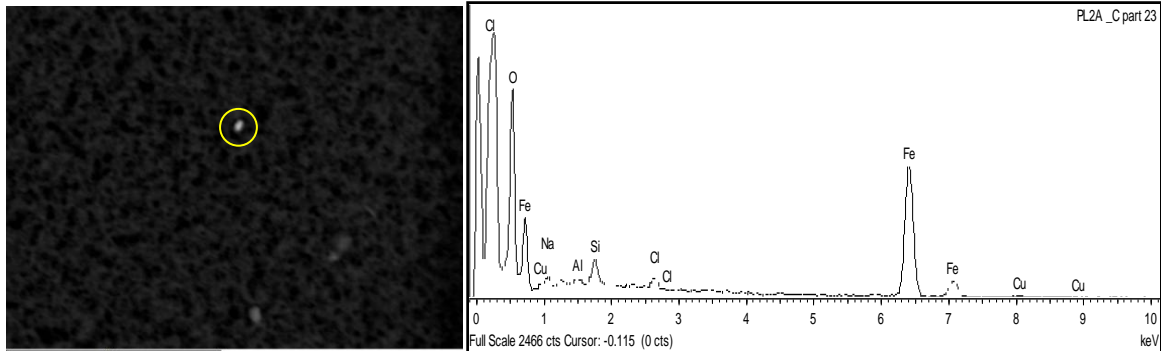


Fig. 54: A sinistra particella 23 rilevata al microscopio elettronico con elettroni retrodiffusi; a destra spettro EDS particella 23

Element	Weight%	Atomic%
O	3.16	53.74
Na	0.18	2.13
Al	0.06	0.64
Si	0.25	2.41
Cl	0.15	1.14
Fe	8.05	39.23
Cu	0.17	0.71
Totals	12.01	

Tabella 1: Elementi presenti nella particella 23

La particella analizzata contiene una grande quantità di ferro. Si osserva inoltre presenza di silicio e alluminio. In piccola quantità è presente anche il rame. Per questo motivo la particella in esame può essere considerata metallica.



## PARTICELLA 26 (Fig. 55)

La particella 26, cerchiata in figura, riscontrata nel versante coriale, non presenta aspetto allungato ed ha un diametro di circa 2 micron.

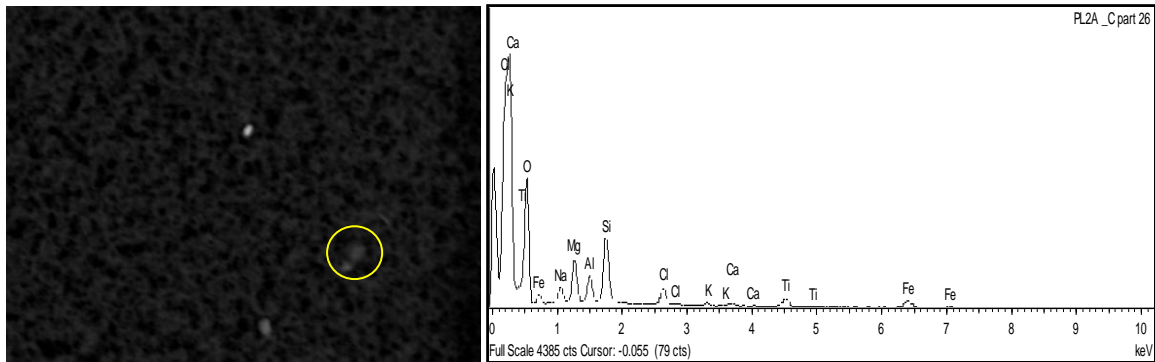


Fig. 55: A sinistra particella 26 rilevata al microscopio elettronico con elettroni retrodiffusi; a destra spettro EDS particella 26

Element	Weight%	Atomic%
O	5.16	70.55
Na	0.30	2.88
Mg	0.69	6.18
Al	0.39	3.19
Si	1.12	8.73
Cl	0.39	2.38
K	0.07	0.40
Ca	0.10	0.54
Ti	0.43	1.98
Fe	0.81	3.17
Totals	9.46	

Tabella 2: Elementi presenti nella particella 26

La particella analizzata contiene per lo più silicio e magnesio, c'è presenza di alluminio, potassio, calcio, titanio e ferro. La particella 26 può essere definita di tipo silicatica con composizione riconducibile a un fillosilicato.



## PARTICELLA 43 (Fig. 56)

La particella 43, cerchiata in figura, riscontrata nel versante coriale, presenta un aspetto allungato con diametro di circa 4 micron.

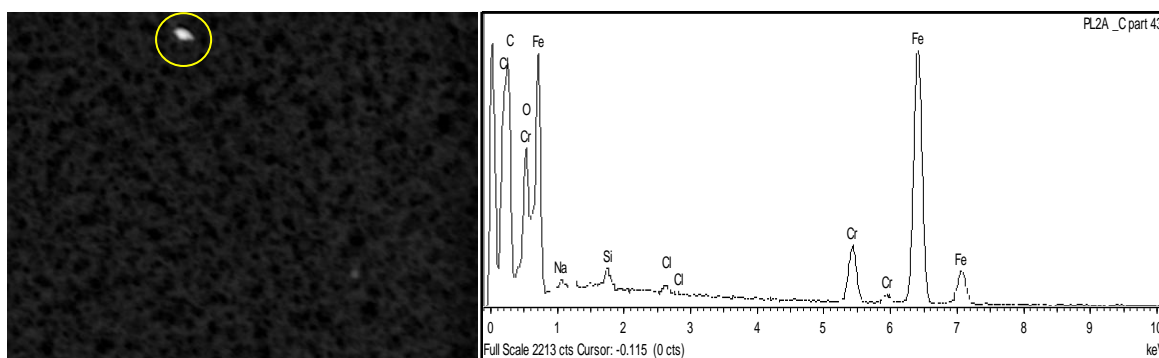


Fig. 56: A sinistra particella 43 rilevata al microscopio elettronico con elettroni retrodiffusi; a destra spettro EDS particella 43

Element	Weight%	Atomic%
O	1.72	27.15
Na	0.14	1.57
Si	0.15	1.38
Cl	0.08	0.59
Cr	1.61	7.83
Fe	13.62	61.49
Totals	17.34	

Tabella 3: Elementi presenti nella particella 43

La particella analizzata contiene in elevata quantità ferro e cromo. Data la minor quantità di silicio essa è considerata di tipo metallico, con composizione Fe-Cr.

## NOME CAMPIONE: PL2A\_D

Del campione PL2A\_D sono state analizzate 3 fibre e 127 particelle presenti sulla membrana. Di tali particelle vengono presentate in questo lavoro le 3 fibre e 1 particella, part. 83, risultate significative per lo studio sulla presenza dei metalli pesanti.

### FIBRA 01 (Fig. 57)

La fibra 01, cerchiata in figura, riscontrata nel versante deciduale, ha una lunghezza di circa 3,6 micron.

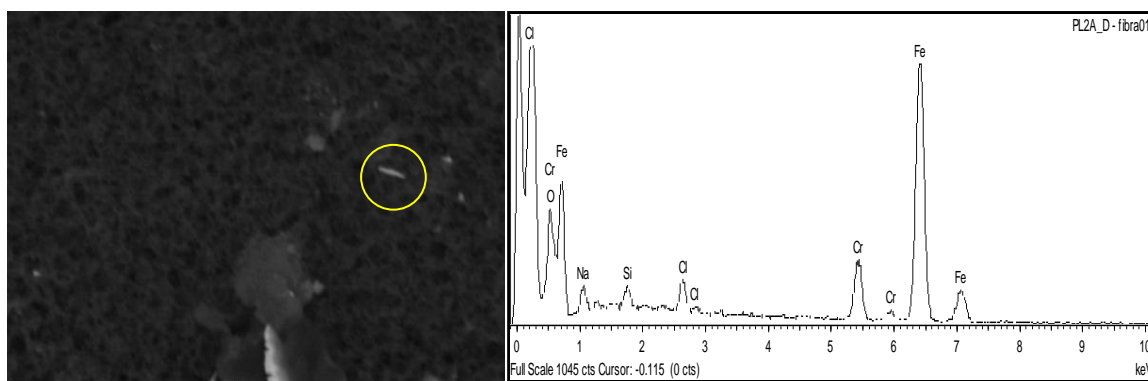


Fig. 57: A sinistra fibra 01 rilevata al microscopio elettronico con elettroni retrodiffusi; a destra spettro EDS  
fibra 01

Element	Weight%	Atomic%
O	0.71	20.88
Na	0.25	5.09
Si	0.10	1.68
Cl	0.21	2.78
Cr	0.93	8.41
Fe	7.29	61.17
Totals	9.49	

Tabella 4: Elementi presenti nella fibra 01

La fibra analizzata contiene maggior quantità di ferro e cromo rispetto al silicio. Per questo motivo la fibra 01 è stata caratterizzata come particella metallica di Fe-Cr.

## FIBRA 02 (Fig. 58)

La fibra 02, cerchiata in figura, riscontrata nel versante deciduale, ha una lunghezza di circa 4,5 micron.

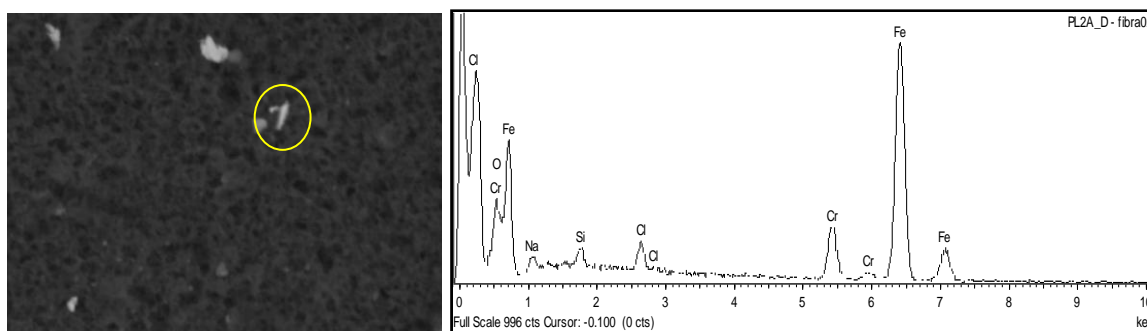


Fig. 58: A sinistra fibra 02 rilevata al microscopio elettronico con elettroni retrodiffusi; a destra spettro EDS  
fibra 02

Element	Weight%	Atomic%
O	0.50	16.07
Na	0.16	3.48
Si	0.11	1.94
Cl	0.19	2.76
Cr	0.89	8.84
Fe	7.26	66.92
Totals	9.10	

Tabella 5: Elementi presenti nella fibra 02

La fibra analizzata, anche in questo caso, contiene ferro e cromo in quantità maggiore rispetto al silicio. È dunque classificata come fibra con composizione metallica di Fe-Cr.

### FIBRA 03 (Fig. 59)

La fibra 03, cerchiata in figura, riscontrata nel versante deciduale, ha una lunghezza di circa 28,5 micron.

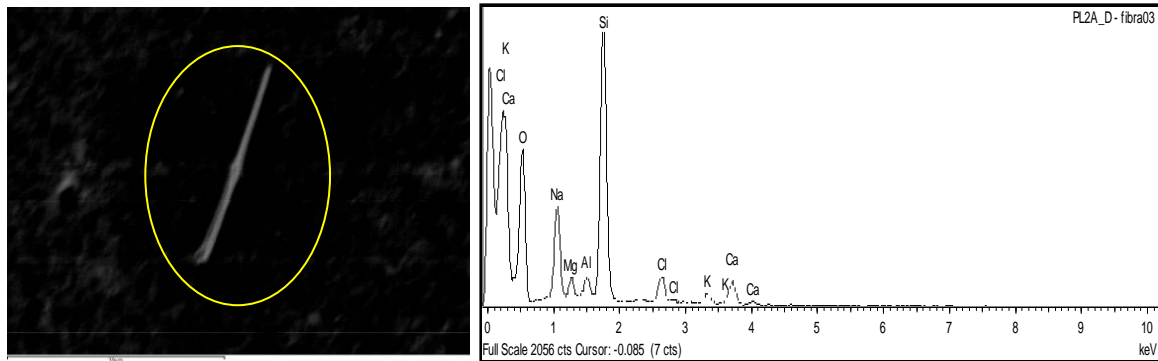


Fig. 59: A sinistra fibra 03 rilevata al microscopio elettronico con elettroni retrodiffusi; a destra spettro EDS  
fibra 03

Element	Weight%	Atomic%
O	3.01	61.99
Na	0.66	9.52
Mg	0.13	1.71
Al	0.10	1.22
Si	1.69	19.88
Cl	0.26	2.44
K	0.12	0.99
Ca	0.27	2.25
Totals	6.25	

Tabella 6: Elementi presenti nella fibra 03

La fibra analizzata contiene in maggior quantità silicio, vi è presenza di magnesio, alluminio, potassio e calcio. Tale fibra è considerata silicatica, probabilmente si tratta di una fibra artificiale vetrosa.

## PARTICELLA 83 (Fig. 60)

La particella 83, cerchiata in figura, riscontrata nel versante deciduale, presenta un aspetto allungato con una lunghezza di circa 4 micron.

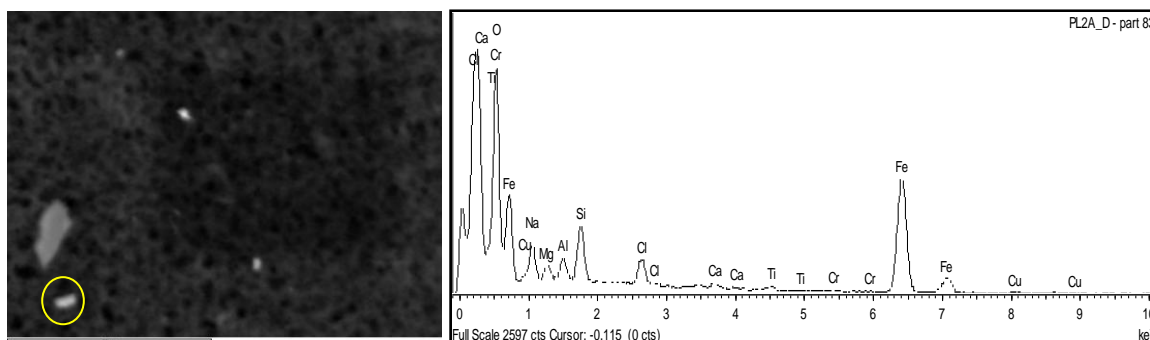


Fig. 60: A sinistra particella 83 rilevata al microscopio elettronico con elettroni retrodiffusi; a destra spettro EDS particella 83

Element	Weight%	Atomic%
O	7.46	55.00
Na	1.19	6.12
Mg	0.35	1.69
Al	0.40	1.77
Si	1.05	4.41
Cl	0.66	2.20
Ca	0.17	0.49
Ti	0.18	0.44
Cr	0.11	0.26
Fe	12.55	26.51
Cu	0.60	1.12
Totals	24.73	

Tabella 7: Elementi presenti nella particella 83

La particella analizzata contiene in maggior quantità ferro e cromo. Può essere considerata come una particella metallica a composizione Fe-Cr, nonostante la presenza di diversi inquinanti in quantità abbastanza rilevanti quali silicio, alluminio, rame e titanio. Inoltre, è stata riscontrata anche presenza di magnesio e calcio.

## NOME CAMPIONE: PL2A\_M

Del campione PL2A\_M sono state analizzate 82 particelle presenti sulla membrana. Di tali particelle ne vengono presentate tre, part. 46, part. 59 e part. 64, significative per lo studio sulla presenza dei metalli pesanti.

### PARTICELLA 46 (Fig. 61)

La particella 46, cerchiata in figura, riscontrata nel versante materno, non presenta un aspetto allungato e la sua lunghezza è di circa 2 micron.

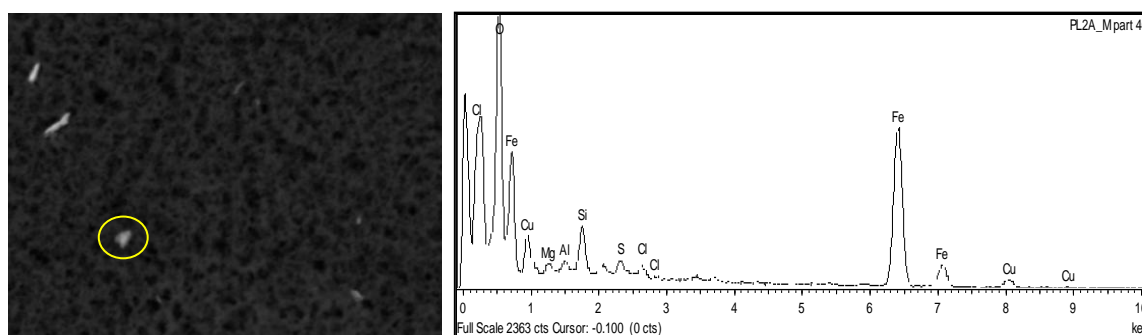


Fig. 61: A sinistra particella 46 rilevata al microscopio elettronico con elettroni retrodiffusi; a destra spettro EDS particella 46

Element	Weight%	Atomic%
O	4.69	56.84
Mg	0.12	0.94
Al	0.09	0.68
Si	0.43	2.97
S	0.15	0.89
Cl	0.13	0.74
Ca	0.07	0.34
Fe	9.09	31.56
Cu	1.65	5.04
Totals	16.43	

Tabella 8: Elementi presenti nella particella 46

La particella analizzata contiene, in maggior quantità, ferro e rame. Può essere considerata di tipo Fe-Cu, nonostante la presenza di diversi inquinanti in quantità abbastanza rilevanti quali silicio, alluminio e zolfo. Inoltre, è stata riscontrata anche presenza di magnesio e calcio.

## PARTICELLA 59 (Fig. 62)

La particella 59, cerchiata in figura, riscontrata nel versante materno, risulta isodiametrica con una lunghezza di circa 1,3 micron.

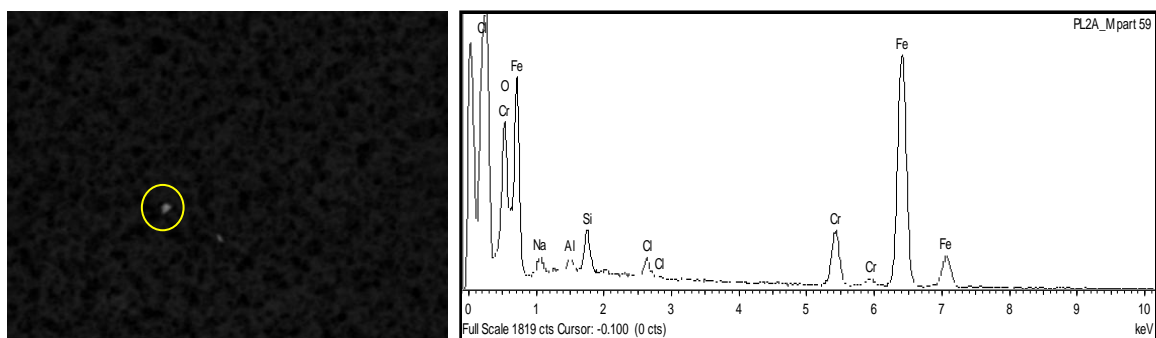


Fig. 62: A sinistra particella 59 rilevata al microscopio elettronico con elettroni retrodiffusi; a destra spettro EDS particella 59

Element	Weight%	Atomic%
O	1.56	30.09
Na	0.22	2.93
Al	0.09	1.05
Si	0.29	3.23
Cl	0.16	1.36
Cr	1.23	7.31
Fe	9.76	54.03
Totals	13.30	

Tabella 9: Elementi presenti nella particella 59

La particella analizzata è di tipo Fe-Cr. Il ferro ed il cromo risultano essere in quantità maggiore rispetto al silicio e all'alluminio presenti nella particella 59, quindi anche in questo caso si tratta di una particella metallica.

## PARTICELLA 64 (Fig. 63)

La particella 64, cerchiata in figura, riscontrata nel versante materno, risulta avere un aspetto non lineare con una lunghezza di circa 6,9 micron.

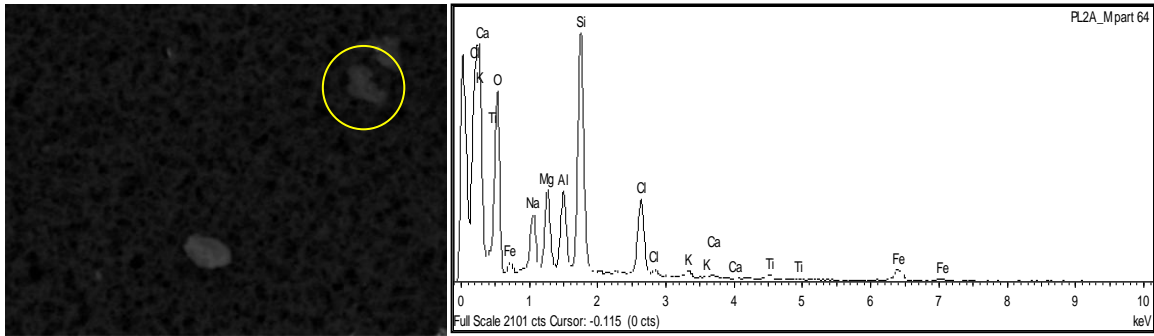


Fig. 63: A sinistra part. 64 rilevata al microscopio elettronico con elettroni retrodiffusi; a destra spettro EDS  
particella 64

Element	Weight%	Atomic%
O	4.01	59.39
Na	0.51	5.29
Mg	0.58	5.64
Al	0.51	4.50
Si	1.83	15.42
Cl	0.88	5.87
K	0.09	0.53
Ca	0.04	0.25
Ti	0.09	0.45
Fe	0.63	2.66
Totals	9.17	

Tabella 10: Elementi presenti nella particella 64

La particella analizzata contiene in maggior quantità silicio, per questo motivo è considerata silicatica, probabilmente di tipo fillosilicato. Sono presenti anche magnesio, alluminio, potassio, calcio, titanio e ferro.



#### 4.1.4 – ANALISI IN SPETTROSCOPIA MICRO-RAMAN

Le analisi in spettroscopia micro-Raman sono state eseguite presso il DiSIT dell'Università degli Studi del Piemonte Orientale di Alessandria.

Per questo tipo di analisi, il campione non necessita di particolari preparazioni, per questo motivo sono stati analizzati sia campioni di placenta tagliati a mano ed in seguito lasciati essiccare che campioni placentari su filtro. Grazie alla presenza del microscopio ottico è stato possibile effettuare analisi puntuali in diverse zone del campione.

Di seguito viene riportata l'immagine ed il relativo spettro Raman di due particelle rappresentative tra quelle analizzate presenti nel campione in studio.

Gli spettri Raman sono stati ottenuti grazie all'utilizzo del software LabSpec 6 ed elaborati mediante Origin 6.0.

#### NOME CAMPIONE: NOV\_2\_FILTRO

#### PARTICELLA 003 (Fig. 69)

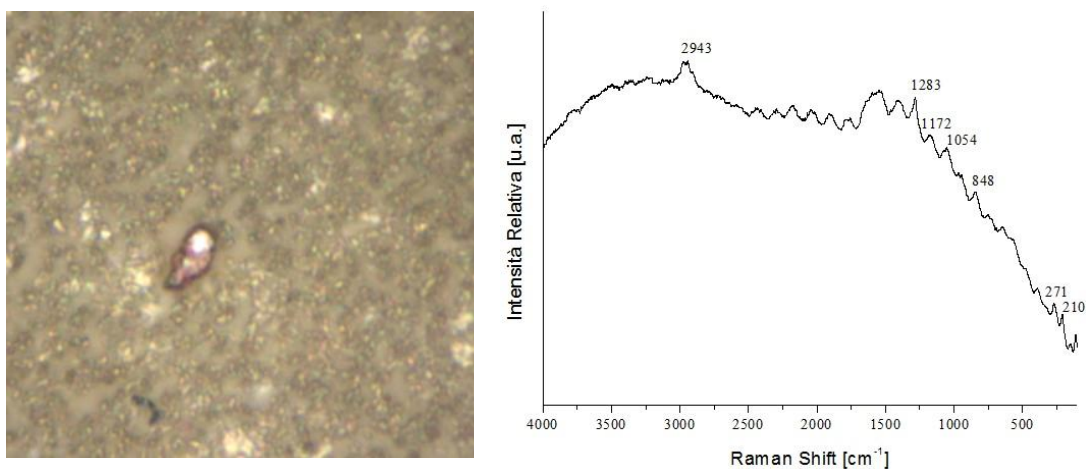


Fig. 69: A sinistra fotografia della part. 003 al microscopio associato al micro-Raman; a destra spettro Raman part. 003

Lo spettro evidenzia bande di maggiore intensità a 2943 cm<sup>-1</sup> e 1283 cm<sup>-1</sup> e nel range spettrali tra 1200-840 cm<sup>-1</sup>, relative alla componente organica quali proteine (dos Santos et al., 2016). Sono stati riscontrati inoltre bande intorno ai 271 e 210 cm<sup>-1</sup> associabili a materiale metallico di tipo ossidi di Fe-Cr; confermando la presenza di particelle metalliche all'interno del tessuto in studio (Das et al., 2011).

## PARTICELLA 006 (Fig. 70)

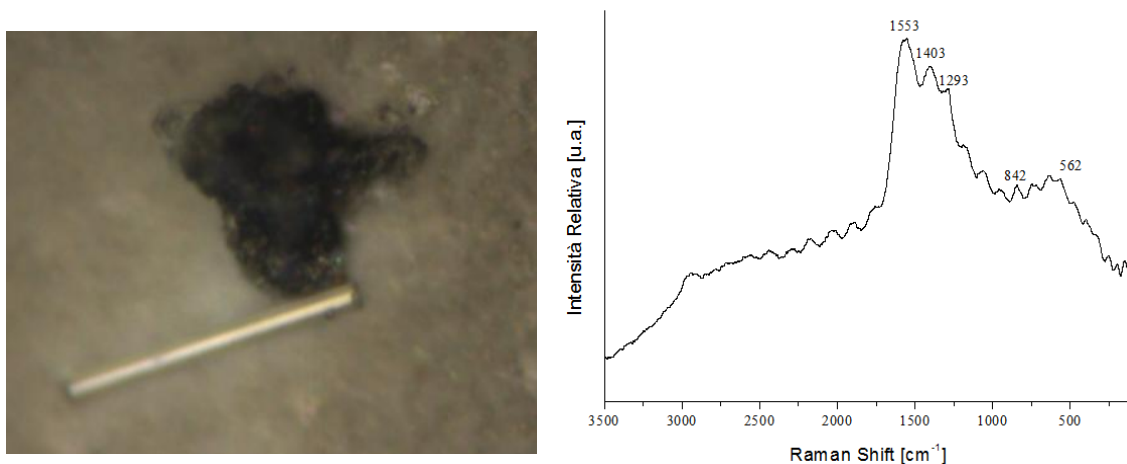


Fig. 70: A sinistra fotografia della part. 006 al microscopio associato al micro-Raman; a destra spettro Raman part. 006

Lo spettro evidenzia bande di maggiore intensità a  $1553\text{ cm}^{-1}$  e  $1403\text{ cm}^{-1}$ , derivanti dal coating grafítico applicato per l'analisi in microscopia elettronica a scansione. Lo spettro, per questa ragione, appare dominato da fenomeni di fluorescenza, evidenti dal segnale quasi armonico che si può osservare in figura 70. Tuttavia alcune bande risultano spiccare dal rumore di fondo con maggiore intensità, tra cui una banda molto larga, centrata a circa  $570\text{ cm}^{-1}$ , corrispondente al vetro, si può quindi trattare di una fibra di vetro. Questo dato, ottenuto mediante la spettroscopia, si sposa con il dato ottenuto in SEM/EDS, in quanto anche mediante questa tecnica è stata osservata una fibra di natura artificiale vetrosa (vedasi Figura 59). Di seguito si riporta uno spettro Raman del vetro presente in bibliografia (Baert et al., 2011).

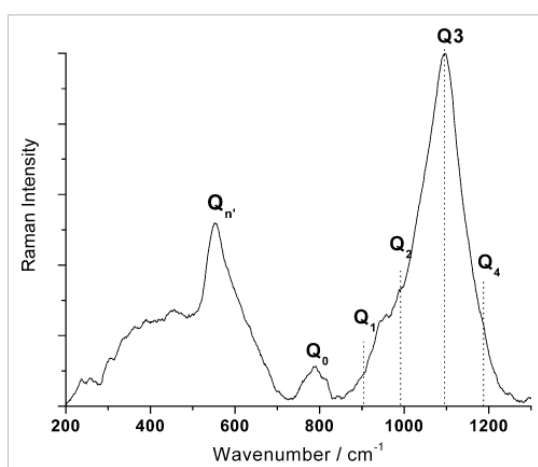


Fig. 71: Spettro Raman del vetro  
(Baert et al., 2011)

## 5 – CONCLUSIONI

---

Lo scopo del seguente lavoro è stato quello di ricercare, attraverso l'utilizzo della microscopia ottica, della microscopia elettronica a scansione (SEM/EDS) e della spettroscopia micro-Raman, in tessuto placentare umano, fibre, microplastiche e metalli pesanti confermando anche il possibile utilizzo di tali tecniche in tessuto extrarespiratorio.

L'analisi in microscopia ottica ha permesso di avere una visione generale dello stato fisiomorfologico della placenta presa in considerazione.

Le sezioni di tessuto placentare, dopo colorazione in Ematossilina ed Eosina, sono state analizzate attraverso l'utilizzo del microscopio ottico a luce diretta e a luce polarizzata.

Dall'analisi microscopica, è risultata una placenta che, nel complesso a livello fisiologico, può essere considerata normale in quanto non vi è presenza di depositi di minerali o di flogosi e/o lesioni elementari considerate patologiche. Si tratta di alterazioni morfologiche presenti in placente a termine che indicano un invecchiamento della placenta stessa con uno stato di ipossia cronica.

Il quadro morfologico presenta una diffusa fibroialinosi sia a livello deciduale che submenbranosa e peri- e inter-villositaria, iperplasia delle gemme sinciziali che può essere ricondotta ad una crescita reattiva del trofoblasto e formazione di nodi sinciziali, aggregati di nuclei trofoblastici, riconducibili ad ipossia cronica di lunga durata. Il tessuto placentare presenta anche calcificazioni nello stroma dei villi con morfologia di corpi psammomatosi. Non sono state identificate, dato anche i limiti di ingrandimento del microscopio ottico, fibre o particelle inorganiche all'interno del tessuto in esame.

Successivamente all'analisi in microscopia ottica, i campioni, sono stati analizzati dopo digestione chimica in microscopia elettronica a scansione, dove grazie a maggiori ingrandimenti e migliore risoluzione sono state individuate ed analizzate all'interno del tessuto placentare particelle e fibre di natura inorganica.

L'analisi ha riscontrato la presenza di fibre e particelle sia nel lato embrio-fetale, versante coriale, che nel lato materno, versante deciduale. Le particelle analizzate sono quasi tutte riconducibili a particelle metalliche; la maggior parte risultano contenere ferro e cromo in maggior quantità, per questo motivo sono state caratterizzate come particelle metalliche con composizione Fe-Cr. È stata, inoltre, riscontrata la presenza di alluminio, titanio, rame,

zolfo. Alcune presentano grande quantità di silicio, sono quindi riconducibili a particelle silicatiche.

Sono state trovate tre fibre nel versante deciduale, due delle quali sono formate da ferro e cromo, mentre una è costituita principalmente dal silicio. È stata caratterizzata come fibra silicatica, con probabile origine artificiale, considerando anche la sua morfologia con assenza di tendenza a sfibrare in fibre a minor diametro. In minor quantità contiene anche magnesio, alluminio, potassio e calcio.

Non è stata riscontrata presenza di fasi minerali riconducibili ad “amianto”. Non è stato possibile individuare l’eventuale presenza di microplastiche.

A completamento dell’analisi, i campioni di placenta sono stati esaminati anche in spettroscopia micro-Raman. Grazie alla presenza del microscopio ottico è stato possibile selezionare la zona di interesse ed effettuare analisi puntuali in diverse zone del campione.

Confrontando gli spettri Raman delle particelle analizzate con spettri di composizione nota è stato possibile associare le bande trovate sia a materiale organico che inorganico. Sono state identificate all’interno del tessuto placentare in esame proteine.

Tracce di ossidi di ferro e cromo nella particella presa in considerazione riconducono alla presenza di particelle metalliche all’interno del tessuto placentare in studio. È stata inoltre riscontrata una fibra, la quale è riconducibile ad una fibra di vetro. In questo modo, sono stati quindi confermati i dati acquisiti mediante SEM/EDS.

I risultati ottenuti confermano che gli inquinanti ambientali, soprattutto i metalli pesanti, sono in grado di accumularsi all’interno del tessuto placentare ed in seguito attraversare la membrana placentare fino ad arrivare al feto. Come già affermato in precedenza, i metalli pesanti sono inquinanti molto diffusi nell’ambiente e l’esposizione da parte di una donna in gravidanza a tali sostanze può portare seri rischi sia per la madre che per il feto in via di sviluppo.

L’esposizione al cromo è molto frequente, in quanto risulta essere un metallo presente in natura ed utilizzato nelle industrie, per questo motivo potrebbero essere state riscontrate particelle contenenti cromo all’interno del tessuto placentare oggetto dello studio.

Il campione di placenta in esame è risultato contenere anche particelle metalliche contenenti titanio, tale metallo è molto comune nei rivestimenti, nelle materie plastiche, nei prodotti cosmetici e negli additivi favorendo così l’esposizione umana a tale sostanza.

Le particelle inorganiche sono state riscontrate sia nel lato embrio-fetale, versante coriale, che nel lato materno, versante deciduale. Questo dimostra che le sostanze tossiche sono in grado di migrare dal versante materno a quello fetale.

Lo studio conferma, inoltre, l'utilità dell'applicazione combinata delle diverse tecniche di analisi - microscopia ottica, microscopia elettronica a scansione e spettroscopia micro-Raman - per la ricerca di particelle estranee anche in tessuti extrarespiratori.

## 6 – BIBLIOGRAFIA

---

- Adani F., Negri M., Tambone F., Molaschi G., Genevini P., Scaglia B. – *I metalli nell'ambiente*, settima edizione, 2012, FrancoAngeli Editore
- Ahmed S., Khoda S. M., Rekha R. S., Gardner R. M., Ameer S. S., Moore S., Ekström E. C., Vahter M., Raqib R. - *Arsenic-Associated Oxidative Stress, Inflammation, and Immune Disruption in Human Placenta and Cord Blood*, *Children's Health Environmental Health Perspectives*, 2011, vol. 119, pag. 258-264
- Ahamed M., Mehrotra P. K., Kumar P., Kaleem M., Siddiqui J. - *Placental lead-induced oxidative stress and preterm delivery*, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2009, vol. 27, pag. 70–74
- Baert K., Meulebroeck W., Wouters H., Cosyns P., Nys K., Thienpont H., Terry H., - *Using Raman spectroscopy as a tool for the detection of iron in glass*, *Journal of Raman Spectroscopy*, 2011, vol. 42, pag. 1789-1795
- Banu S. K., Stanley J. A., Taylor R. J., Sivakumar K. K., Arosh J. A., Zeng L., Pennathur S., Padmanabhan V. - *Sexually Dimorphic Impact of Chromium Accumulation on Human Placental Oxidative Stress and Apoptosis* *Toxicological Sciences*, 2018, vol. 161, pag. 375–387
- Barbieri M., Carinci P. – *Embriologia*, terza edizione, 2015, Casa Editrice Ambrosiana
- Barbone S. – *Scienze integrate*, seconda edizione, 2010, Editore Franco Lucisano
- Belluso E., Bellis D., Fornero E., Capella S., Ferraris G., Coverlizza S. – *Assessment of Inorganic Fibre Burden in Biological Samples by Scanning Electron Microscopy – Energy Dispersive Spectroscopy*, *Microchimica Acta*, 2006, vol. 155 pag. 95-100
- d'Angelo R., Genovese G., Guadagni R., Novi C., Sannolo N., Miraglia N. - *ESPOSIZIONE A METALLI Definizione dei valori di riferimento di cromo e nichel urinari e piombo ematico nella popolazione campana*, Inail, 2020, Collana Salute e Sicurezza
- Das S., Hendry M. J. – *Application of Raman spectroscopy to identify iron minerals commonly found in mine wastes*, *Chemical Geology*, 2011, vol. 290, pag. 101-108

- De Fenici M., Boitani C., Bouchè M., Canipari R., Dolfi A., Filippini A., Musarò A., Papaccio G., Salustri A. - *Embriologia umana morfogenesi processi molecolari aspetti clinici*, terza edizione, 2020, Piccin Editore
- Ding A., Hu H., Xu F., Liu L., Peng J., Dong X. - *Pregnancy complications effect on the nickel content in maternal blood, placenta blood and umbilical cord blood during pregnancy*, World Journal Clinical Cases, 2021, vol. 9, pag. 8340-8348
- dos Santos E. C., da Silvia Martinho H. S., Annes K., da Silva T., Soares C. A., Leite R. F., Milazzotto M. P. - *Raman-based non invasive metabolic profile evaluation of in vitro bovine embryos*, Journal of Biomedical Optics, 2016, vol. 21, pag. 1-8
- Exley C. - *Human exposure to aluminium*, Environmental Science: Processes & Impacts, 2013, vol. 10, pag. 1807-1816
- Fu Z., Xi S. - *The Effects of Heavy Metals on Human Metabolism*, Toxicology Mechanisms and Methods, 2019, vol. 30, pag. 167-176
- Galloway T. S. - *Micro- and Nano-plastics and Human Health*, Marine Anthropogenic Litter, 2015, pag. 343-366
- Gude N. M., Roberts C. T., Kalionis B., King R. G. - *Growth and function of the normal human placenta*, Thrombosis Research, 2004, vol. 114, pag. 397—407
- Hamid F. S., Bhatti M. S., Anuar N., Mohan P., Periathamby A. - *Worldwide distribution and abundance of microplastic: How dire is the situation?*, Sage journals, 2018, vol. 36, pag. 873-897
- Haque A. K., Vrazel D. M., Burau K. D., Cooper S. P., Downs T. - *Is There Transplacental Transfer of Asbestos? A Study of 40 Stillborn Infants*, Pediatric Pathology & Laboratory Medicine, 1996, vol. 16, pag. 877 - 892
- Haque A. K., Vrazel D. M., Uchida T.- *Assessment of asbestos burden in the placenta and tissue digests of stillborn infants in South Texas*, Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 1998, vol. 35, pag. 532-538
- Haque A. K., Mancuso M. G., Williams M. G., Dodson R. F. - *Asbestos in organs and placenta of five stillborn infants suggests transplacental transfer*, Environmental Research, 1992, vol. 58, pag. 163-175

- Harari F., Langeén M., Casimiro E., Bottai M., Palm B., Nordqvist H., Vahter M. - *Environmental exposure to lithium during pregnancy and fetal size: A longitudinal study in the Argentinean Andes*, Environment International, 2015, vol. 77, pag. 48–54
- Ibrahimou B., Albatineh A. N., Hamisu S. M., Janvier G. - *Ambient PM2.5 Aluminum and Elemental Carbon and Placental Abrupton Morbidity*, Journal of Occupational and Environmental Medicine, 2017, vol. 59, pag 148-153
- Kippler M., Hoque A. M. W., Raqib R., Öhrvik H., Ekström E. C., Vahter M. - *Accumulation of cadmium in human placenta interacts with the transport of micronutrients to the fetus*, Toxicology Letters, 2010, vol. 192, pag 162–168
- Kozikowska I, Binkowski L. J., Szczepanska K., Slawska H., Mischczuk K., Sliwinska M., Laciak T., Stawarz R. - *Mercury concentrations in human placenta, umbilical cord, cord blood and amniotic fluid and their relations with body parameters of newborns*, Environmental Pollution 2013, vol. 182, pag. 256-262
- Kumar V., Abbas A. K., Aster J. C. - *Le basi patologiche della malattie – malattie degli organi e degli apparati*, nona edizione, 2015, Elsevier Editore
- Liu M., Wang D., Wang C., Yin S., Pi X., Li Z., Wang L., Liu J., Yin C., Jin L., Ren A. - *High concentrations of aluminum in maternal serum and placental tissue are associated with increased risk for fetal neural tube defects*, Chemosphere, 2021, vol. 284, pag. 1-7
- Martini F. H., Tallitsch R. B., Nath J. L. - *Anatomia umana*, settima edizione, 2019, Edises Editori
- Merian E. – *Metals and Their Compounds in the Environment Occurrence, Analysis and Biological Relevance*, 1991, VCH Editore
- Myren M., Mose T., Mathiesen L., Knudsen L. E. - *The human placenta – An alternative for studying foetal exposure*, Toxicology in Vitro, 2007, vol. 21, pag. 1332 - 1340
- Oury T. O., Sporn T. A., Roggli V. L. - *Pathology of Asbestos-Associated Diseases*, terza edizione, 2014, Springer Editori
- Prata J. C. , da Costa J. P., Lopes I., Duarte A. C., Rocha-Santos T. - *Environmental exposure to microplastics: An overview on possible human health effects*, Science of The Total Environment, 2020, vol. 702, pag. 134455-134464



- Ragusa A., Svelato A., Santacroce C., Catalano P., Notarstefano V., Carnevali O., Papa F., Rongioletti M. C. A., Baiocco F., Draghi S., D'Amore E., Rinaldo D., Matta M., Giorgini E. - *Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta*, Environment International, 2021, vol. 146, pag. 1-8
- Reid A., Heyworth J., de Klerk N., Musk A.W. - *Asbestos Exposure and Gestational Trophoblastic Disease: A Hypothesis*, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2009, vol. 18, pag. 2895-2898
- Resta L., Sblano S. - *Dal trofoblasto alla placenta matura: aspetti morfo-funzionali*, Riv. It. Ost. Gin., 2005 vol. 7, pag. 407-414
- Rinaudo C. - *Microscopia ottica*, Corso di Laurea Magistrale in Biologia Università del Piemonte Orientale, A.A. 2020/2021
- Rinaudo C., Croce A., Musa M., Fornero E., Allegrina M., Trivero P., Bellis D., Sferch D., Toffalorio F., Veronesi G., Pelosi G. - *Study of Inorganic Particles, Fibers, and Asbestos Bodies by Variable Pressure Scanning Electron Microscopy with Annexed Energy Dispersive Spectroscopy and Micro-Raman Spectroscopy in Thin Sections of Lung and Pleural Plaque*, Applied spectroscopy: Sage Journals, 2010, vol. 64, pag. 571-577
- Rinaudo C., Croce A. - *Appunti per biologi su cristalli e minerali. Metodi non distruttivi per la loro identificazione*, prima edizione, 2020, TAB Edizioni
- Rinaudo C., Croce A., Erra S., Nada E., Bertolotti M., Grosso F., Maconi A., Amisano M. - *Asbestos Fibers and Ferruginous Bodies Detected by VP-SEM/EDS in Colon Tissues of a Patient Affected by Colon-Rectum Cancer: A Case Study*, Minerals, 2021, vol. 11, pag. 1-11
- Sigismondi V. - *PATOLOGIE ASBESTO INDOTTE IN TESSUTI EXTRAPOLMONARI: Studio della presenza di fibre di amianto e di eventuali altri inquinanti ambientali nell'apparato gastrointestinale, attraverso l'utilizzo del microscopio ottico e del microscopio elettronico a scansione (SEM)*, Tesi di Laurea Magistrale anno accademico 2022/2023
- Staud F., Karahoda R. - *Trophoblast: The central unit of fetal growth, protection and programming*, International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2018, vol. 105, pag. 35-40

- Suvarapu L. N., Baek S. O. - *Determination of heavy metals in the ambient atmosphere: A review*, Toxicology and Industrial Health, 2016, vol.33, pag. 76-96
- Sun J., Mao B., Wu Z., Jiao X., Wang Y., Lu Y., Ma X., Liu X., Xu X., Cui H., Lin X., Yi B., Qiu J., Liu Q. - *Relationship between maternal exposure to heavy metal titanium and offspring congenital heart defects in Lanzhou, China: A nested case-control study*, Frontiers in PublicHealth, 2022, pag. 1-10
- Tapia D. E., Abad J. T., Madera M., Lázaro J. M. - *Mercury and neurodevelopmental disorders in children: A systematic review*, Arch Argent Pediatr, 2023, vol.121, pag. 1-13
- Tasin F. R., Ahmed A., Halder D., Mandal C. - *On-going consequences of in utero exposure of Pb: An epigenetic perspective*, Journal of Applied Toxicology, 2022, vol. 4, pag. 1553-1569
- Turco M. Y., Moffett A. - *Development of the human placenta*, The Company of Biologists Ltd, 2019, vol. 146, pag. 1-14
- Yao X., Liu W., Xie Y., Xi M., Xiao L. - *Fertility loss: negative effects of environmental toxicants on oogenesis*, Frontiers in Physiology, 2023, vol. 14, pag. 1-16
- Zhang H., Silva A. C., Zhang W., Rutigliano H., Zhou A. - *Raman Spectroscopy characterization extracellular vesicles from bovine placenta and peripheral blood mononuclear cells*, Plos One, 2020, vol. 15, pag. 1-16
- Zhang N., Chen M., Li J., Deng Y., Li S., Guo Y., Li N., Lin Y., Yu P., Liu Z., Zhu J. - *Metal nickel exposure increase the risk of congenital heart defects occurrence in offspring A case-control study in China*, Medicine, 2019, pag. 1-8
- Zhang N., Yang S., Yang J., Deng Y., Li S., Li N., Chen X., Yu P., Liu Z., Zhu J. - *Association between metal cobalt exposure and the risk of congenital heart defect occurrence in offspring: a multi-hospital case-control study*, Environmental Health and Preventive Medicine, 2020, pag. 25-38
- Zhang Y., Lu Y., Jin L. - *Iron Metabolism and Ferroptosis in Physiological and Pathological Pregnancy*, Review, International Journal of Molecular Science, 2022, vol 23, pag. 1-17

## 7 – SITOGRAFIA

---

- <https://www.arpat.toscana.it/temi-ambientali/aria/monitoraggio/inquinanti-monitorati/metalli-pesanti>
- <https://www.biodaily.it/colorazione-ematossilina-eosina-ee-caratteristiche-e-procedimento/>
- [https://www.chimicapratica.altervista.org/images/File/Biologia/Microscopia/Microscopio\\_ottico.pdf](https://www.chimicapratica.altervista.org/images/File/Biologia/Microscopia/Microscopio_ottico.pdf)
- <https://www.dannidaparto.legal/danni-prenatali-e-perinatali/danni-nel-parto-e-nel-travaglio/danni-al-neonato-causati-da-distacco-della-placenta>
- <https://www.dannidaparto.legal/esami-diagnostici/emogasanalisi-del-cordone-ombelicale-ed-encefalopatia-ipossico-ischemica>
- <https://www.ginecologomarcomonti.it/gravidanza-extrauterina>
- <https://www.humanitas.it/malattie>
- <https://www.microbiologiaitalia.it/batteriologia/microscopio-ottico-la-storia-delle-origini/>
- <https://www.msmanuals.com/it-it/casa/problemi-di-salute-delle-donne/complicanze-della-gravidanza>
- <https://www.msmanuals.com/it-it/professionale/ginecologia-e-ostetricia/anomalie-della-gravidanza/placenta-previa>
- <https://www.my.clevelandclinic.org/health/body/22337-placenta>
- <https://www.my.clevelandclinic.org/health/diseases/24211-placenta-previa>
- <https://www.my-personaltrainer.it/salute/placenta.html>
- [https://www.treccani.it/enciclopedia/placenta\\_\(Universo-del-Corpo\)](https://www.treccani.it/enciclopedia/placenta_(Universo-del-Corpo))

## 8 – RINGRAZIAMENTI

---

Ringrazio mio marito per l'aiuto ed il supporto che mi ha dato, permettendomi di concludere il mio percorso di studi, trascorrendo il suo tempo libero con i nostri figli, senza di lui non ce l'avrei fatta.

Ringrazio i miei figli Letizia e Lorenzo per la pazienza che hanno avuto, a loro dedico la mia seconda laurea.

Ringrazio il mio relatore Alessandro Croce per avermi dato l'opportunità di svolgere il tirocinio ed avermi seguita ed aiutata in questa bella esperienza. Ringrazio inoltre la correlatrice Marinella Bertolotti e la tutor esterna Donata Bellis per l'aiuto che mi hanno dato, il personale dell'ospedale "S. Spirito" di Casale Monferrato, Elena Belluso e Silvana Capella del Centro Interdipartimentale per lo Studio degli Amianti e di altri Particolati Nocivi "Giovanni Scansetti" dell'Università degli Studi di Torino.

Ringrazio la mia collega Alice per l'aiuto ed il sostegno datoci durante questi mesi di tirocinio.

Ringrazio i miei genitori, i miei suoceri, in particolare mia suocera che finché ha potuto non si è mai tirata indietro nel guardare la nipote, parenti, amici e tutti coloro che durante questo mio percorso hanno creduto in me.