

Microscopia elettronica a scansione e analisi EDX al servizio della Medicina Forense Veterinaria

***REATI CONTRO GLI ANIMALI: IL RUOLO
DELLA MEDICINA FORENSE VETERINARIA***

Alessia Mariacher

ROMA, 21 NOVEMBRE 2017





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

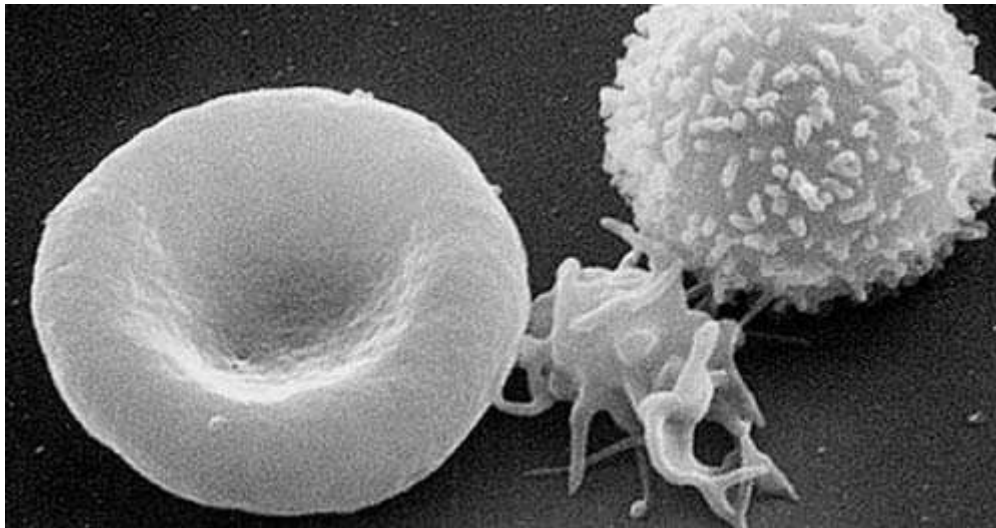
Scanning **E**lectron **M**icroscopy

- Un SEM è un microscopio che produce immagini scansionando la superficie del campione con un fascio concentrato di elettroni
- Gli elettroni del fascio interagiscono con gli atomi nel campione, producendo vari segnali che consentono di studiare topografia e composizione del campione

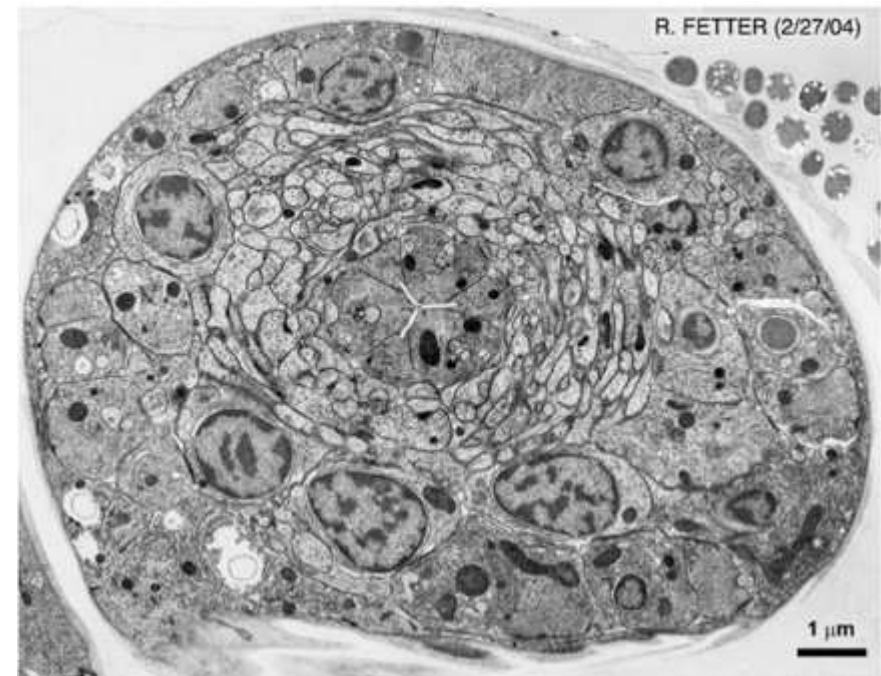


Alessia Mariacher

SEM \neq TEM



Ph. Lionden.com



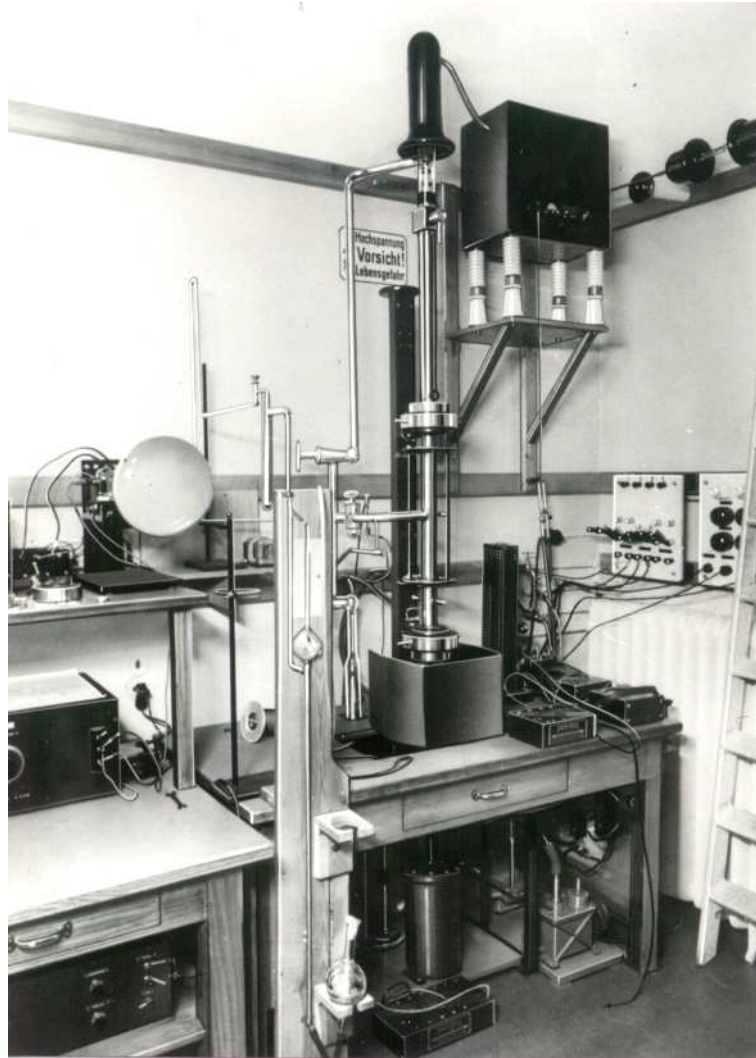
Ph. R. Fetter



Alessia Mariacher



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri



nanofabrication.unt.edu



Alessia Mariacher



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



azonano.com

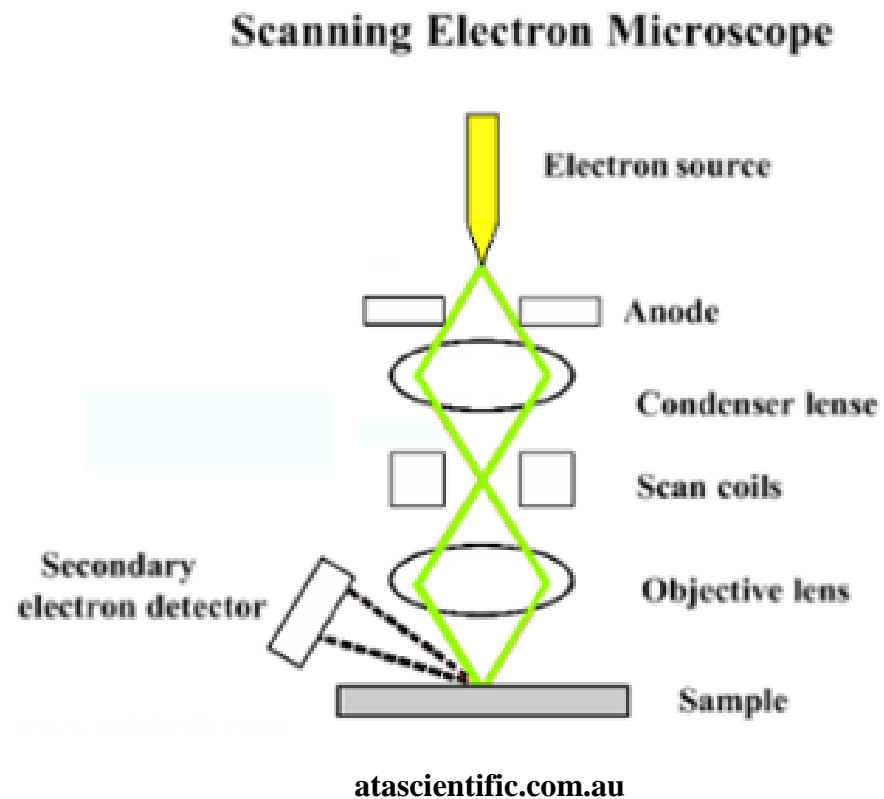
PhenomWorld



Alessia Mariacher

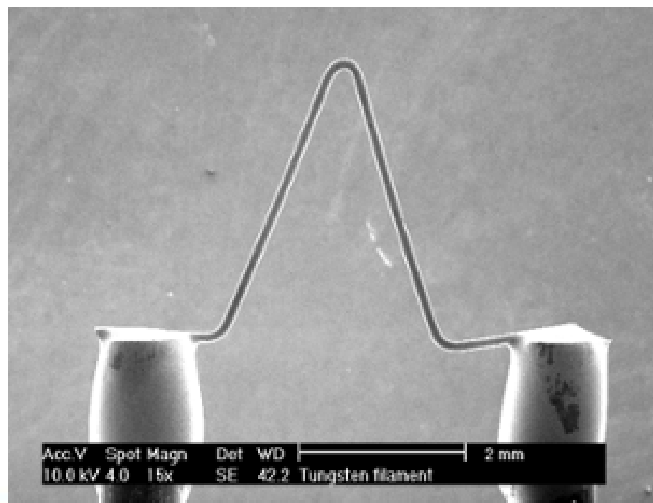
Principi di funzionamento

- Sorgente
- Colonna
- Campione
- Rivelatori
- Monitor
- EDX

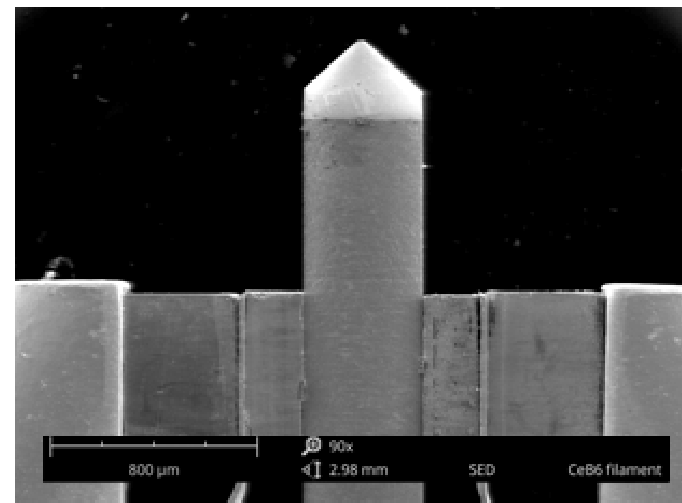


Sorgente di Elettroni

- Cannone termoionico
- Tungsteno (W) o Esaboruro di Cerio (CeB6) o Lantanio (LaB6)



Tungsten

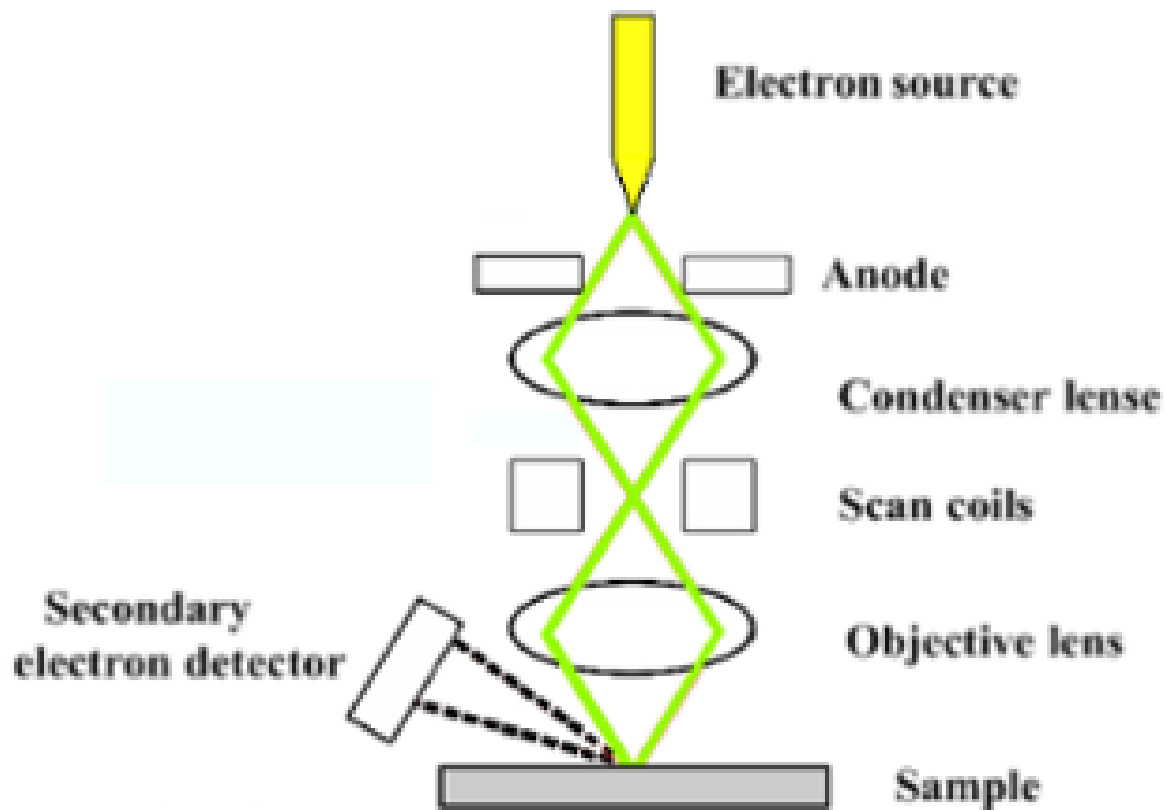


CeB6

PhenomWorld

Alessia Mariacher

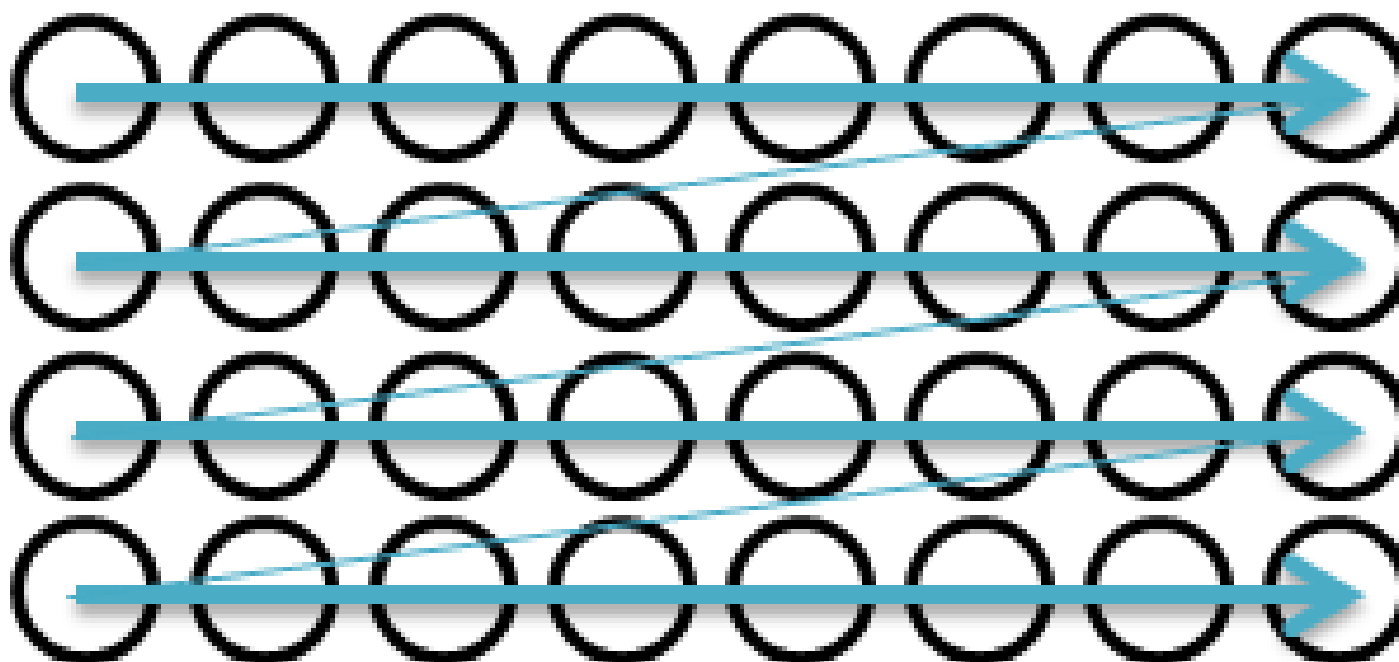
Colonna



atascientific.com.au

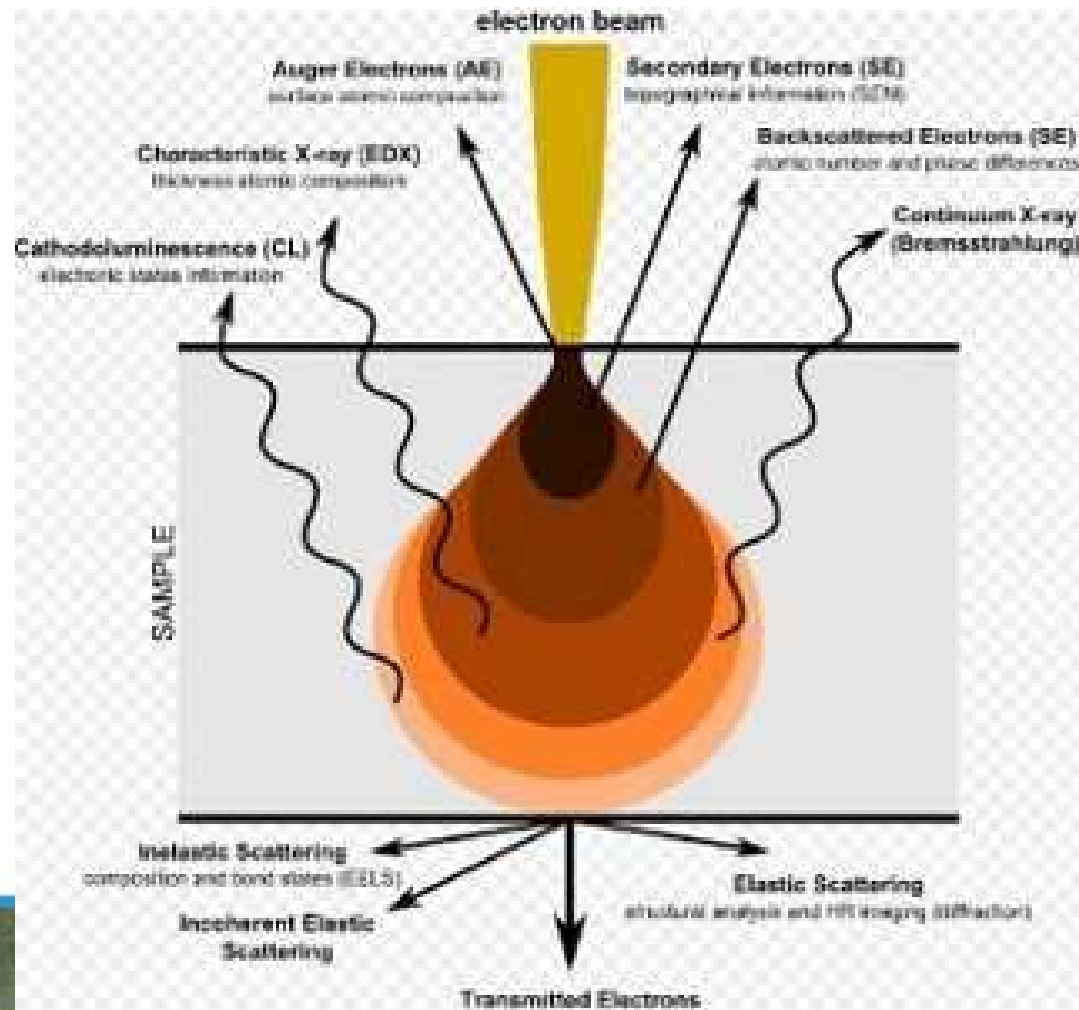


Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



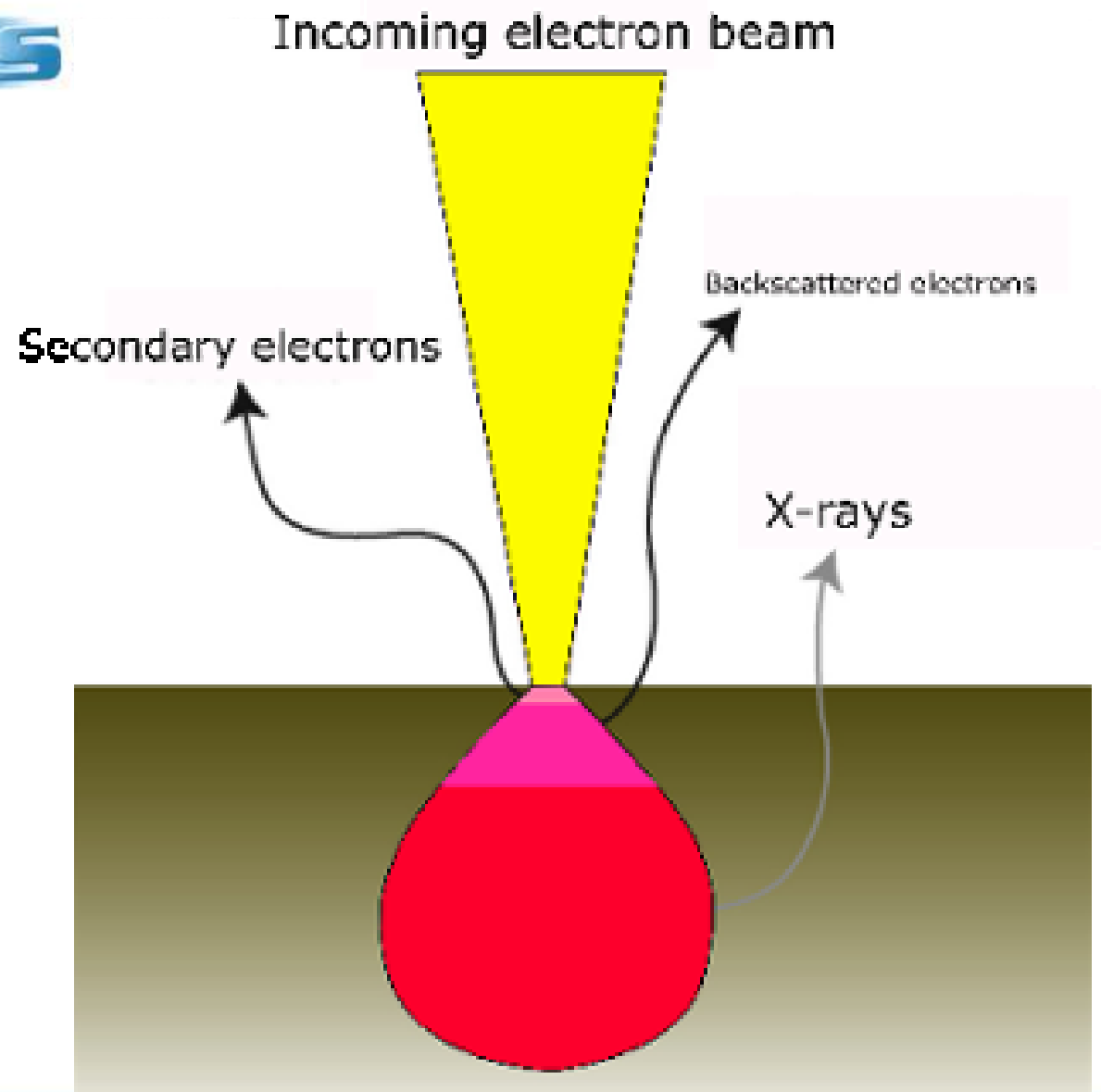
Alessia Mariacher

Interazione elettroni-campione



wikimedia.org

Alessia Mariacher



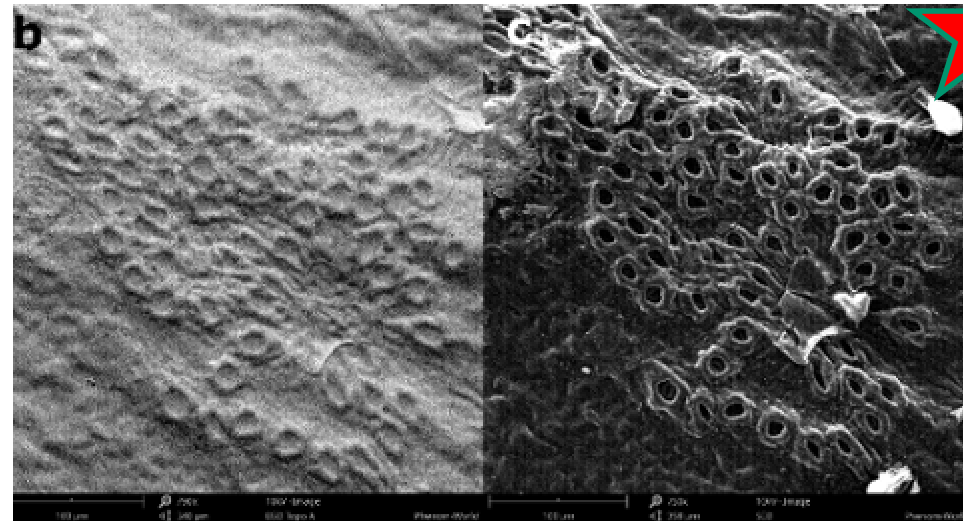
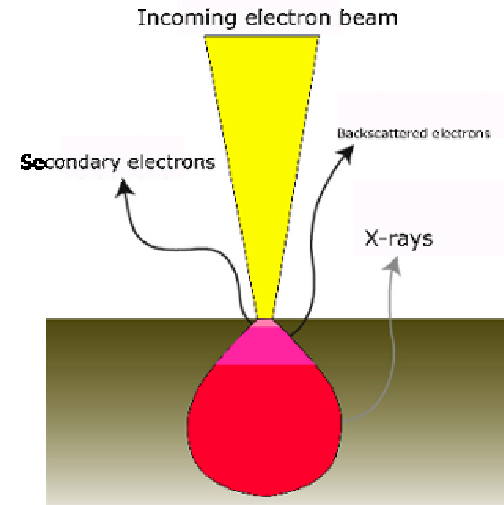
PhenomWorld

Alessia Mariacher

Elettroni Secondari (SE)

Vengono emessi in prossimità della superficie del campione, per effetto di diffusione anelastica.

Sono utilizzati per l'imaging, poiché consentono di ottenere immagini ad alta risoluzione della superficie del campione (topografia ed effetto tridimensionale).



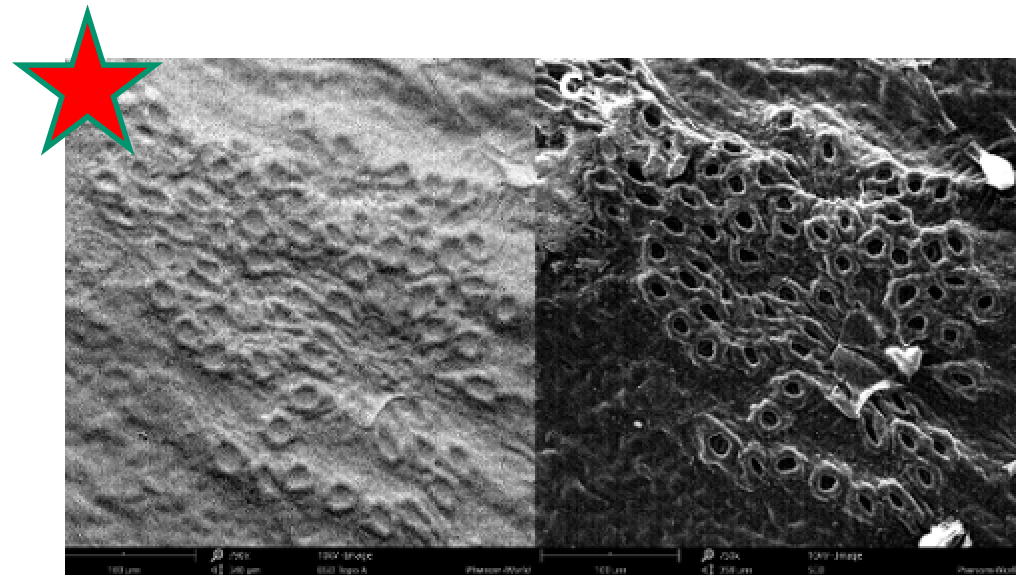
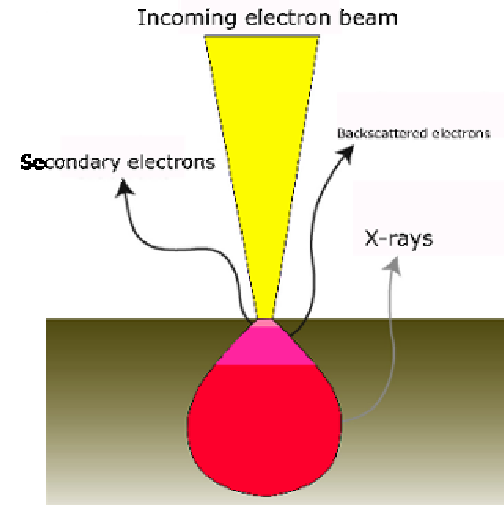
Azom.com

Alessia Mariacher

Elettroni Retrodiffusi (BSE)

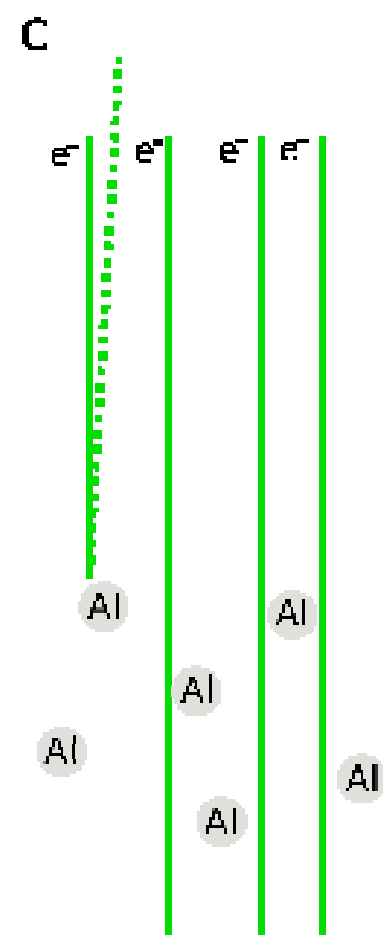
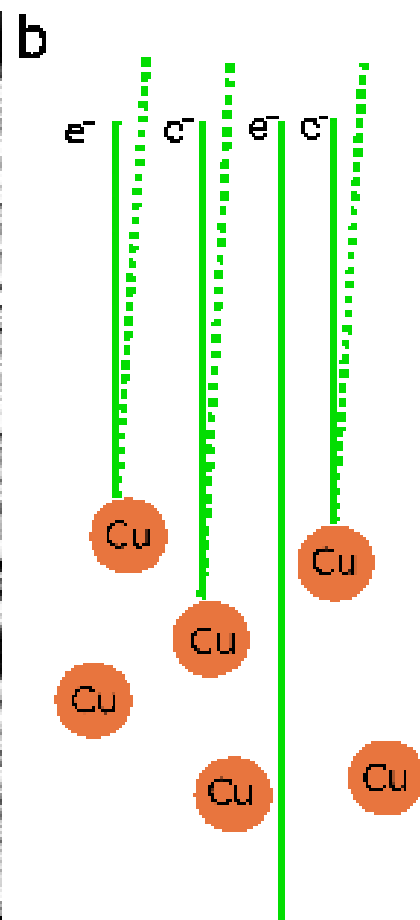
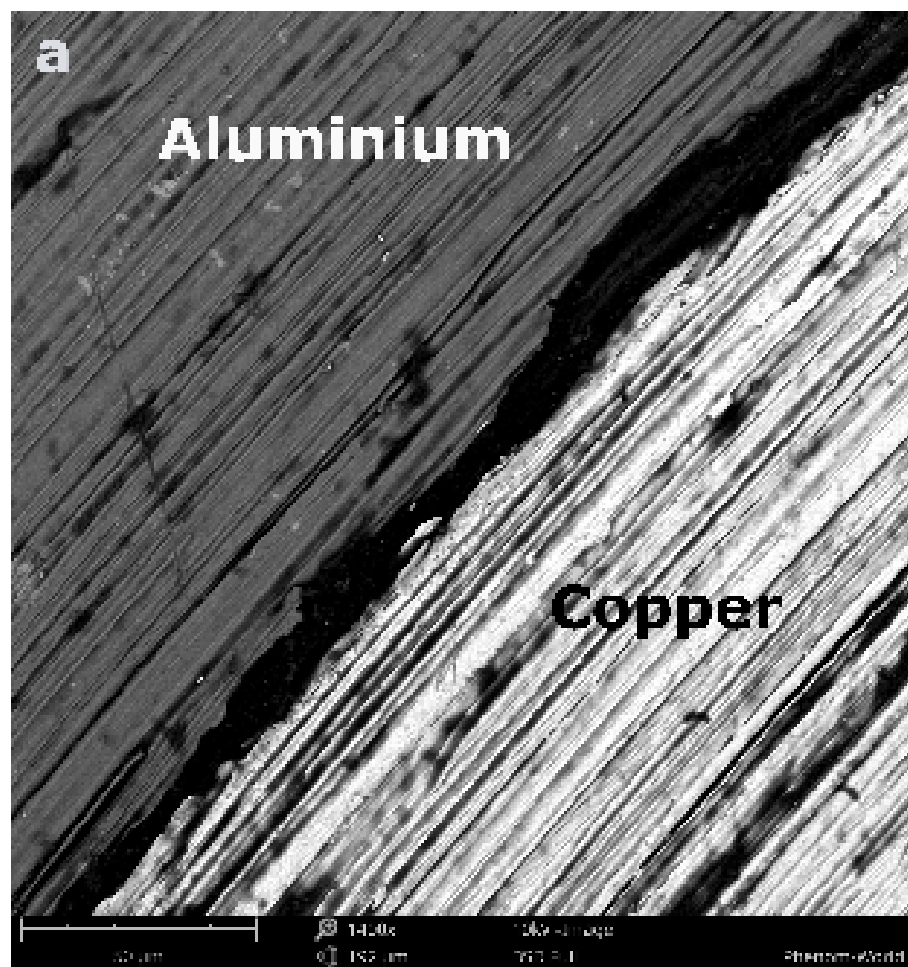
Vengono emessi da maggiore profondità nel campione, per effetto di diffusione elastica.

Sono meno efficaci per l'imaging (< risoluzione), ma la loro energia è correlata al numero atomico (Z) degli atomi presenti nel campione: ottimo contrasto e riconoscimento di elementi ad alto Z.



Azom.com

Alessia Mariacher



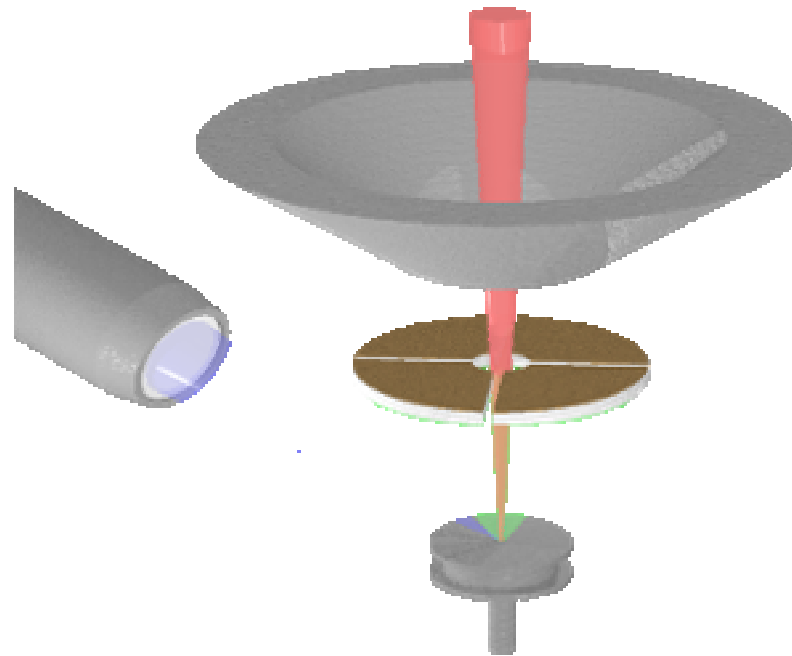
PhenomWorld

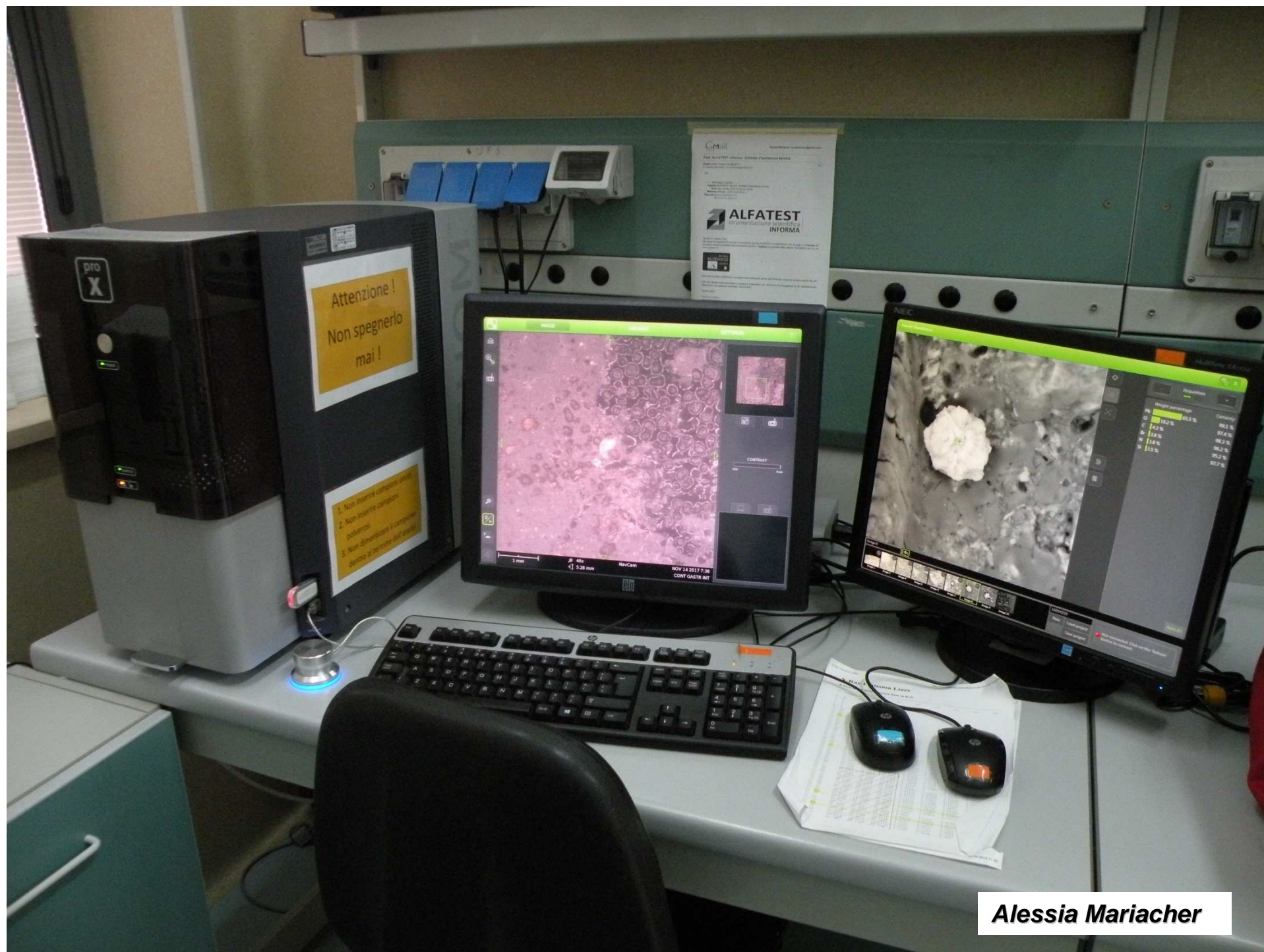


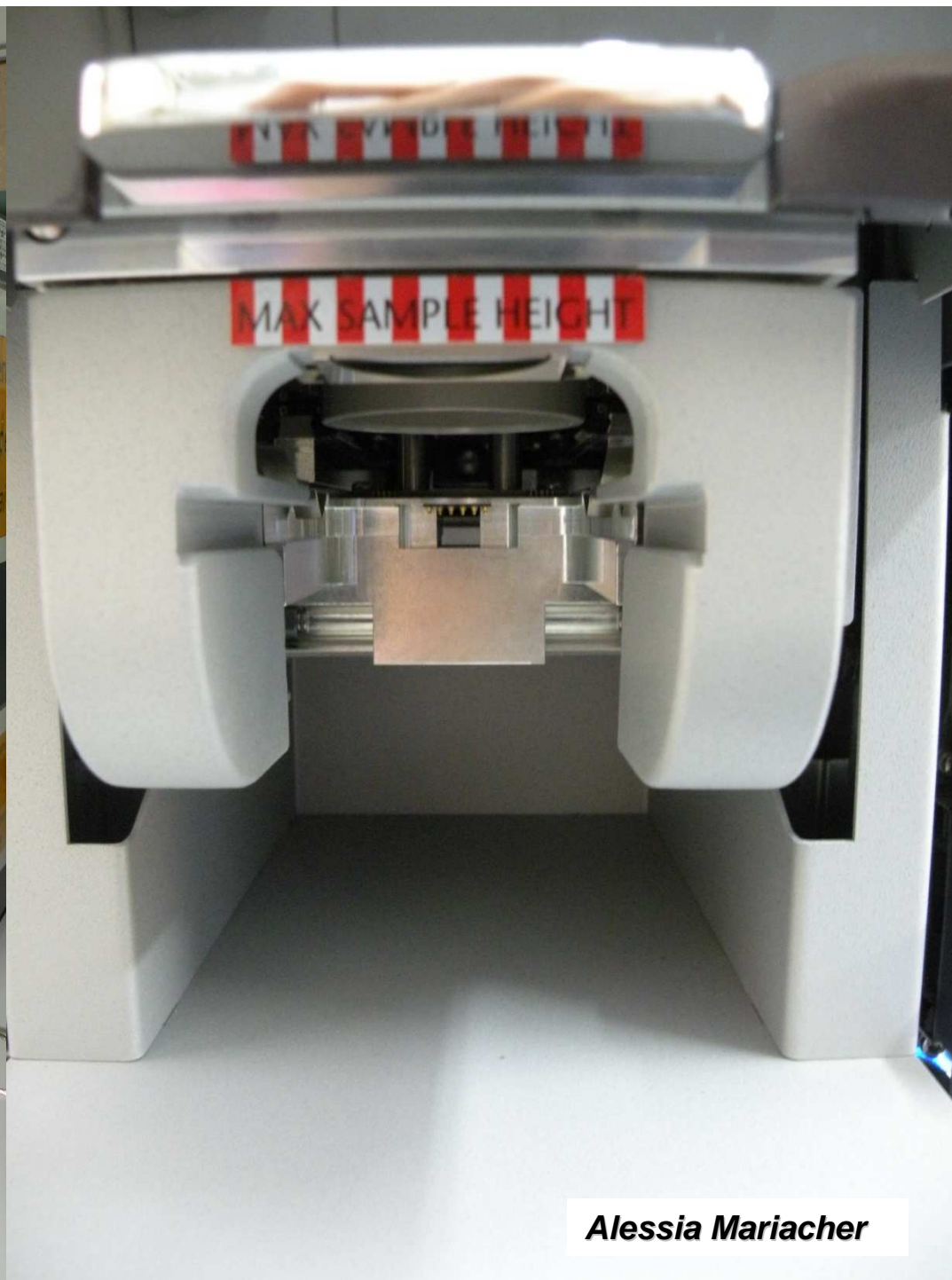
Alessia Mariacher

Rivelatori

- SE
- BSE
- (Fotoni X)







Alessia Mariacher



Alessia Mariacher



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



TedPella



Alessia Mariacher



PhenomWorld



Alessia Mariacher



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Caratteristiche del SEM Phenom PRO X

- Sorgente di elettroni: CeB6 (lifetime: 1500 h)
- Rivelatori BSE + EDX
- Ingrandimento: MIN 140x, MAX 105.000x
- Potere di risoluzione: 8-10 nanometri



Alessia Mariacher

VANTAGGI

- Minimo allestimento del campione, anche nei campioni non conduttivi (no metallizzazione)
- Tempo di analisi minimo
- Sorgente di elettroni con elevata durata e brillantezza
- EDX

LIMITI

- Campioni umidi
- Campioni polverosi o detriti
- Campioni organici





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

- **CAMPIONI POLVEROSI** o **DETRITI**: possono farsi strada nella colonna SEM e distorcere il fascio di elettroni
- **CAMPIONI UMIDI**: liberano gas nelle condizioni di sotto vuoto (outgassing), riducendo la funzionalità di imaging e causando danni permanenti al SEM
- **CAMPIONI ORGANICI**: outgassing + bassa conduttività

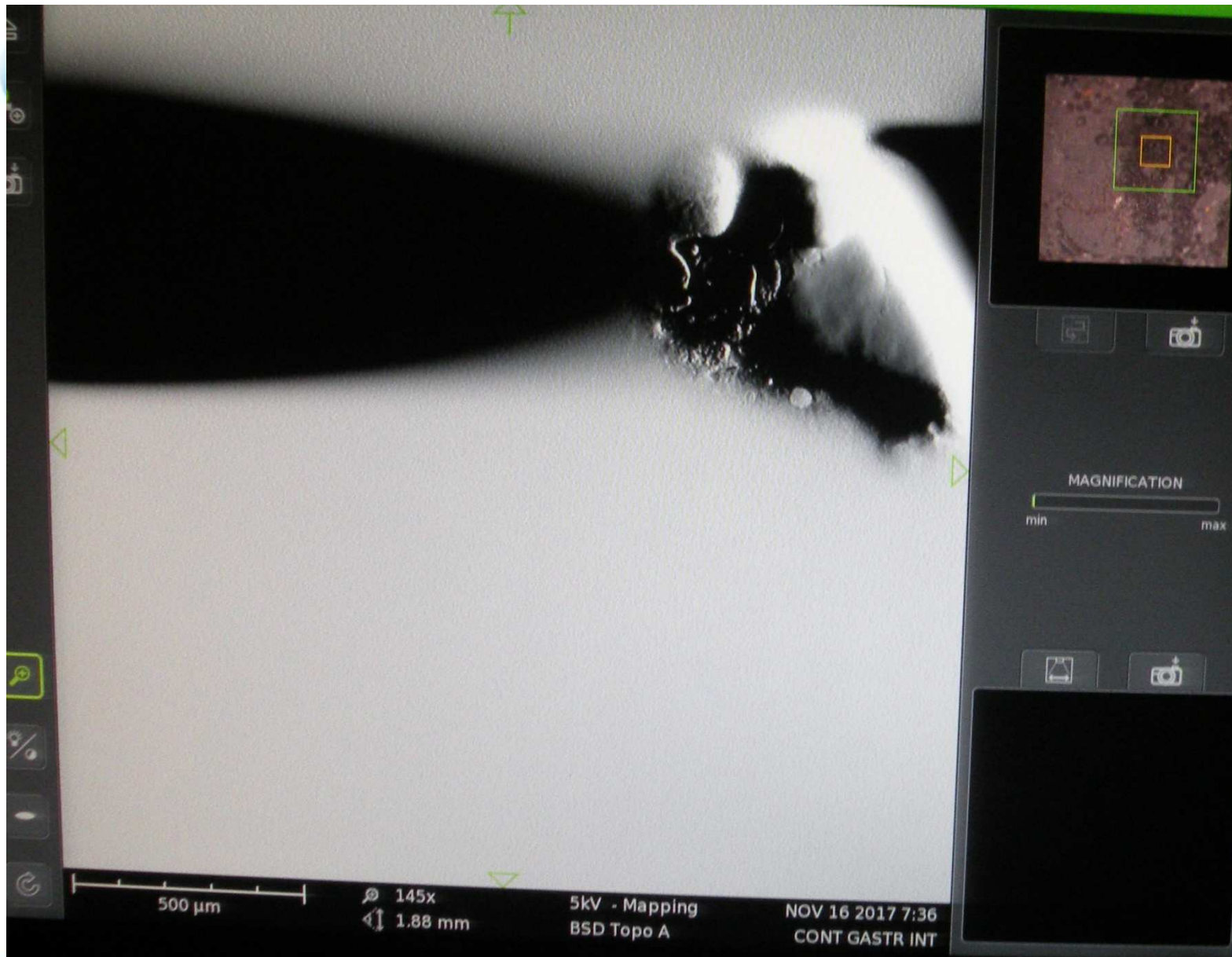


Alessia Mariacher

Analisi di campioni **NON** **CONDUTTIVI**

Il materiale organico (alto contenuto in C e altri elementi a basso numero atomico) non si presta all'imaging perché scarsamente conduttivo (> accumulo di carica elettrostatica = CHARGING), umido (OUTGASSING) e danneggiabile dal fascio di elettroni





Alessia Mariacher

Possibili soluzioni:

- Dimensione minima del fascio di elettroni
- Perfetto essiccamento
- Charge reduction holder
- Rivelatori BSE invece di SE

Altrimenti:

Metallizzazione, impregnazione con osmio,
congelamento





IMAGE

ARCHIVE

SETTINGS

?

live viewing

rate: 4.8 Hz

acquired image

exposure time: 3 sec

all materials (5kV)	high res. (10kV)	analysis (15kV)	
456	684	912	1024
live	med	high	best
low	image	point	map

mode | presets

resolution

quality

intensity | detector

med res	high res	user 1	user 2
456	684	1024	2048
basic	med	high	best
topographic A	full	topographic B	

07:51

time

11-08-17

date

16094350 F

label

advanced

exit advanced

USB

network

marker	magnify	FOV	datetime	label
include databar	TIFF	JPEG	BMP	
lefthand	righthand			

databar

image type

UI mode

sample holder

USB stick

mode

no sample holder inserted

delete all

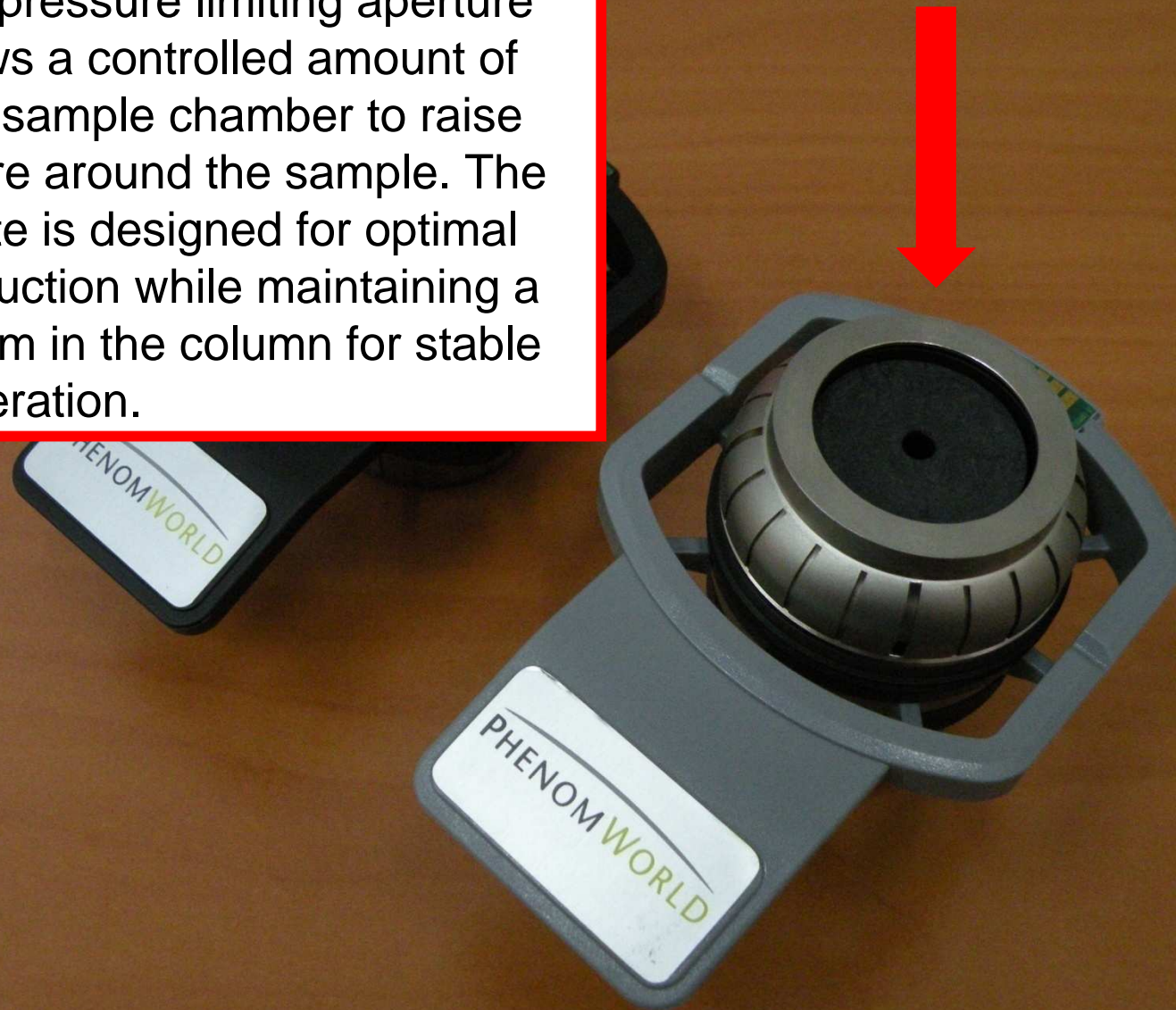
format

standby

hibernate

Alessia Mariacher

The charge reduction sample holder contains a pressure limiting aperture which allows a controlled amount of air into the sample chamber to raise the pressure around the sample. The leakage rate is designed for optimal charge reduction while maintaining a high vacuum in the column for stable system operation.



Alessia Mariacher



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Utilizzi del SEM in medicina forense veterinaria

- **ANALISI
MORFOLOGICHE**

Pelo animale

Fibre

Particelle

Tool marks

- **ANALISI DEGLI
ELEMENTI (EDX)**

Composizione del campione

Tracce lasciate da arma

bianca o arma da fuoco

GSR



Alessia Mariacher

CASO 1

- Campione di pelliccia, sospettata di contravvenire al Reg. 1523/07 CE
- Particolare lavorazione della pelle in strato sottilissimo ($< 1\text{mm}$)





Alessia Mariacher



Alessia Mariacher



Alessia Mariacher



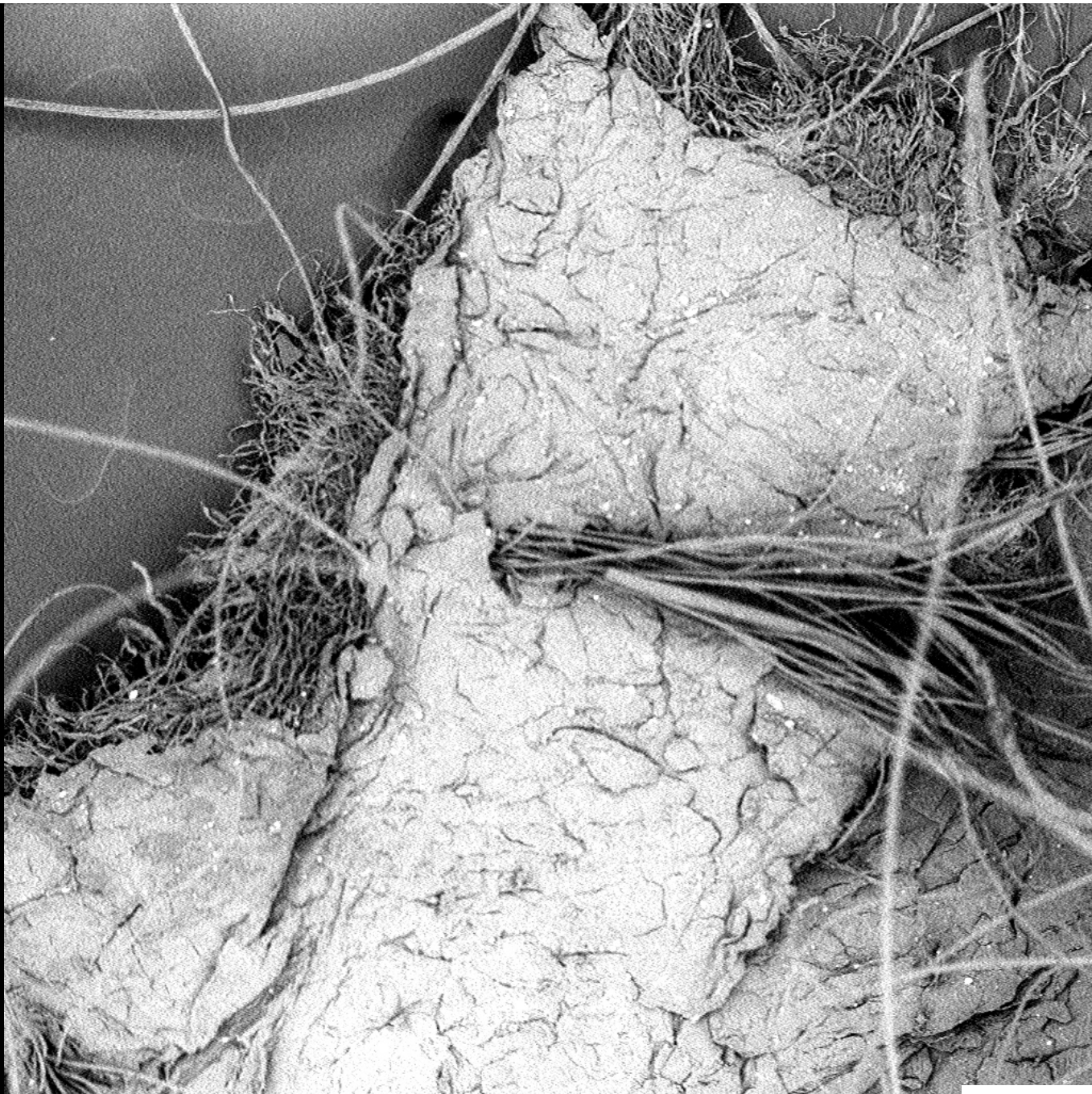
Alessia Mariacher

18/11/2014, 10:12



14086466_0007.jpg

Alessia Mariacher



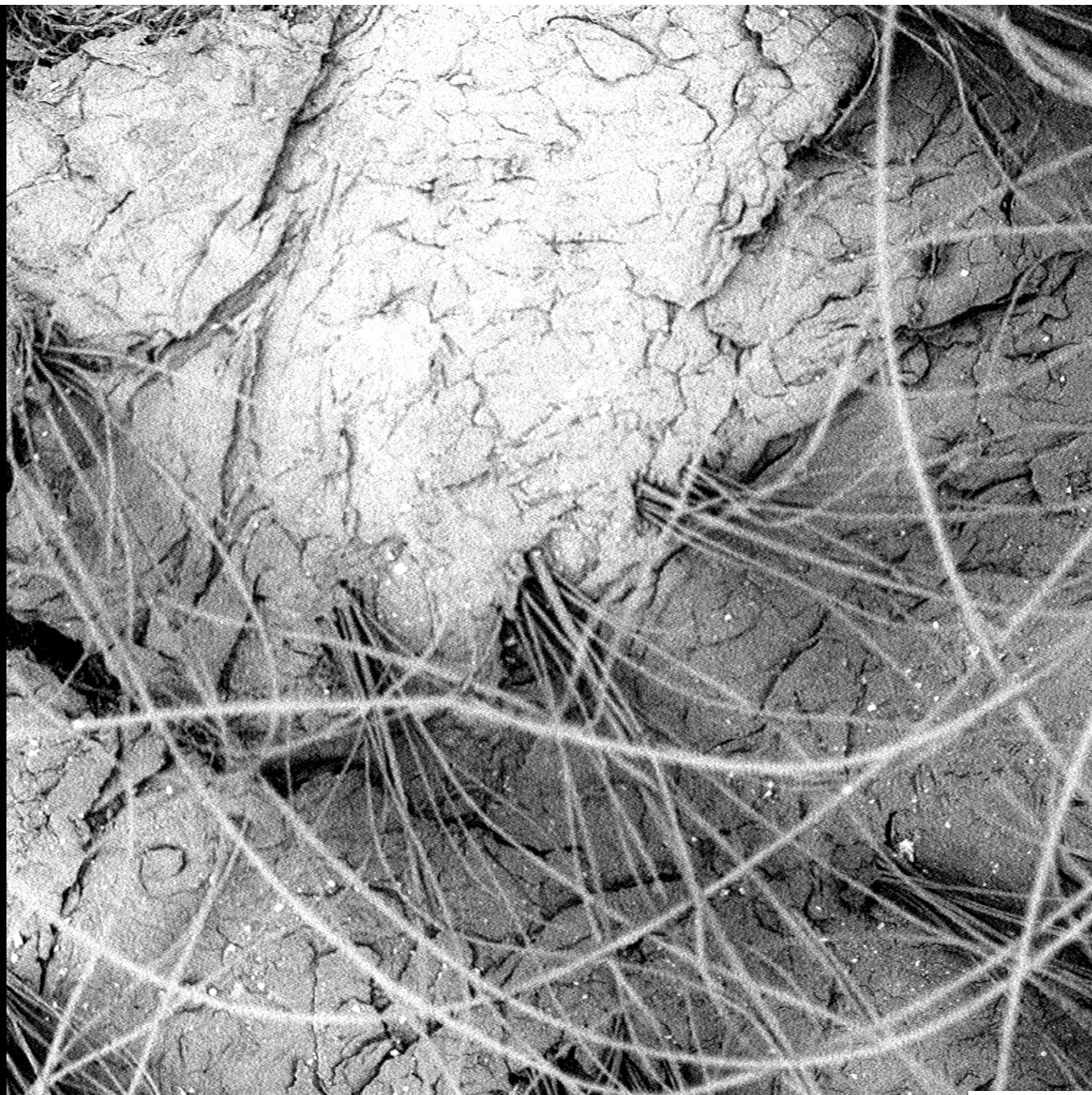
300 μ m

230x
1.17 mm

5kV - Image
BSD Full

NOV 18

Alessia Mariacher
14086466



300 μ m

230x
1.17 mm

5kV - Image
BSD Full

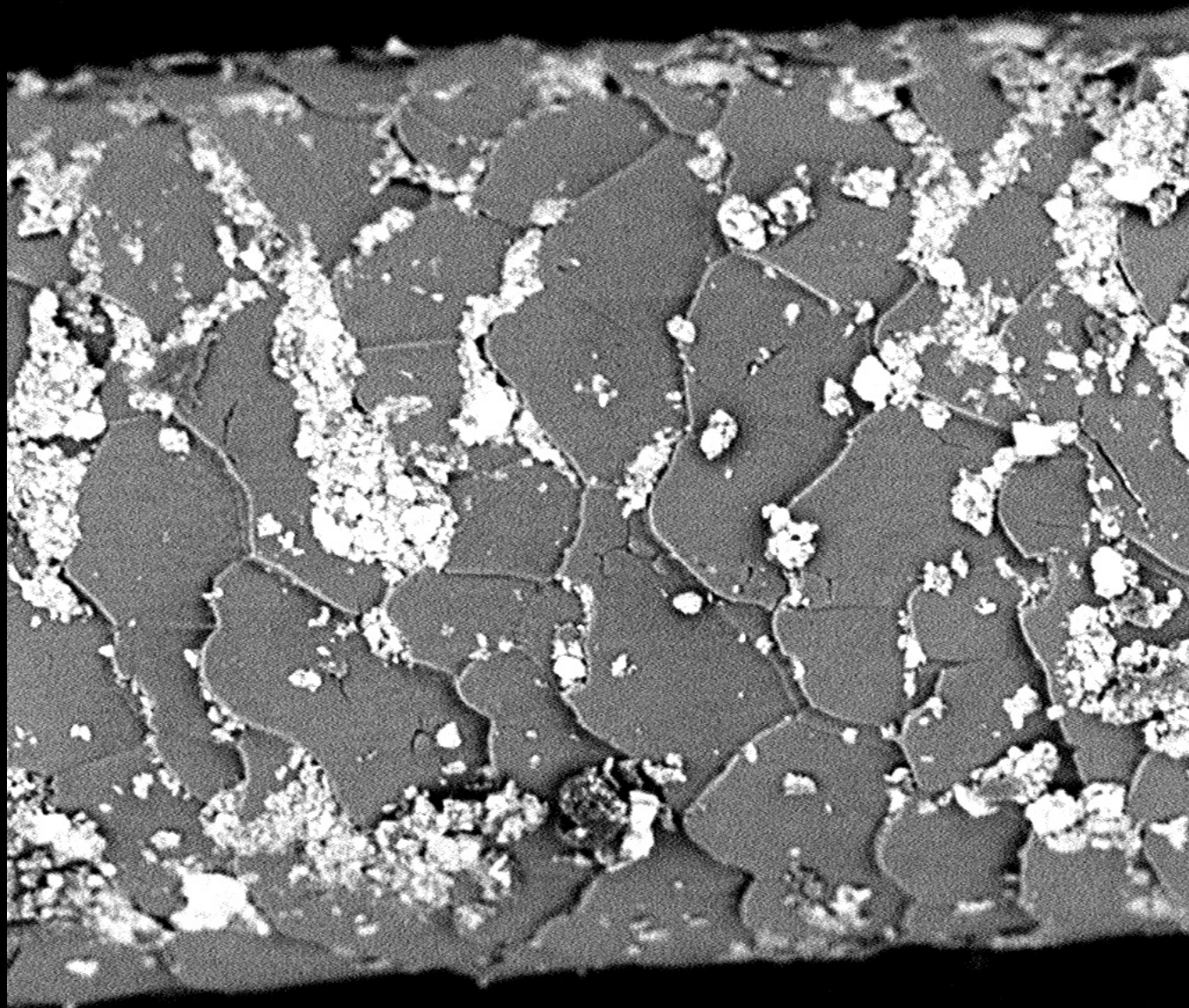
NOV 18

Alessia Mariacher
14086466

CASO 2

- Contributo all'analisi morfologica del pelo animale
- Esame della topografia superficiale del pelo, quindi studio dello strato esterno (scaglie cuticolari)
- Morfologia del bulbo pilifero



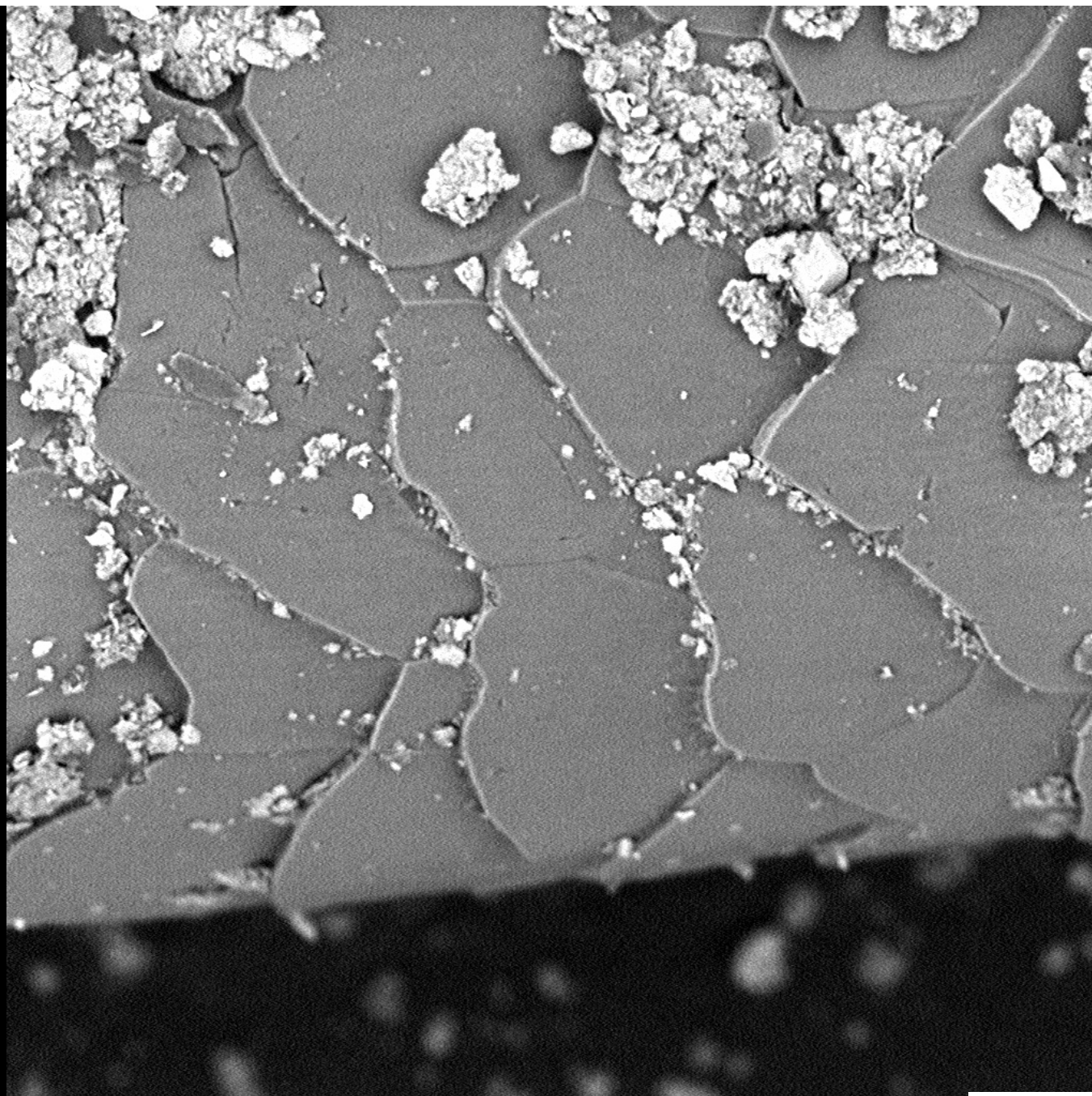


30 μm

2600x
103 μm

5kV - Image
BSD Full

AUG 18 **Alessia Mariacher**
C.LUPUS STELO



10 μm

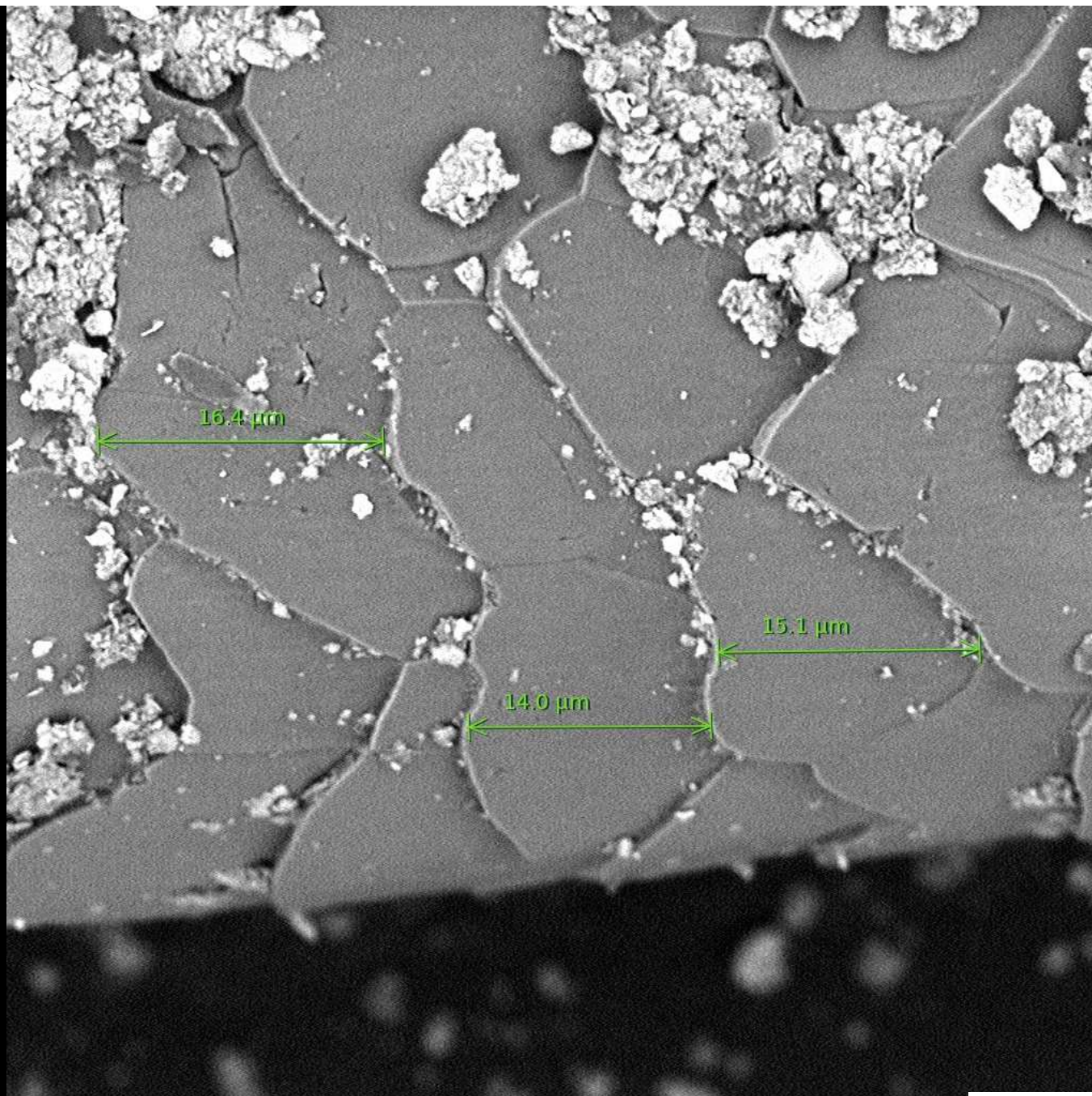
4200x
63.5 μm

5kV - Image
BSD Full

AUG 18

Alessia Mariacher

C.LUPUS STELO



10 μm

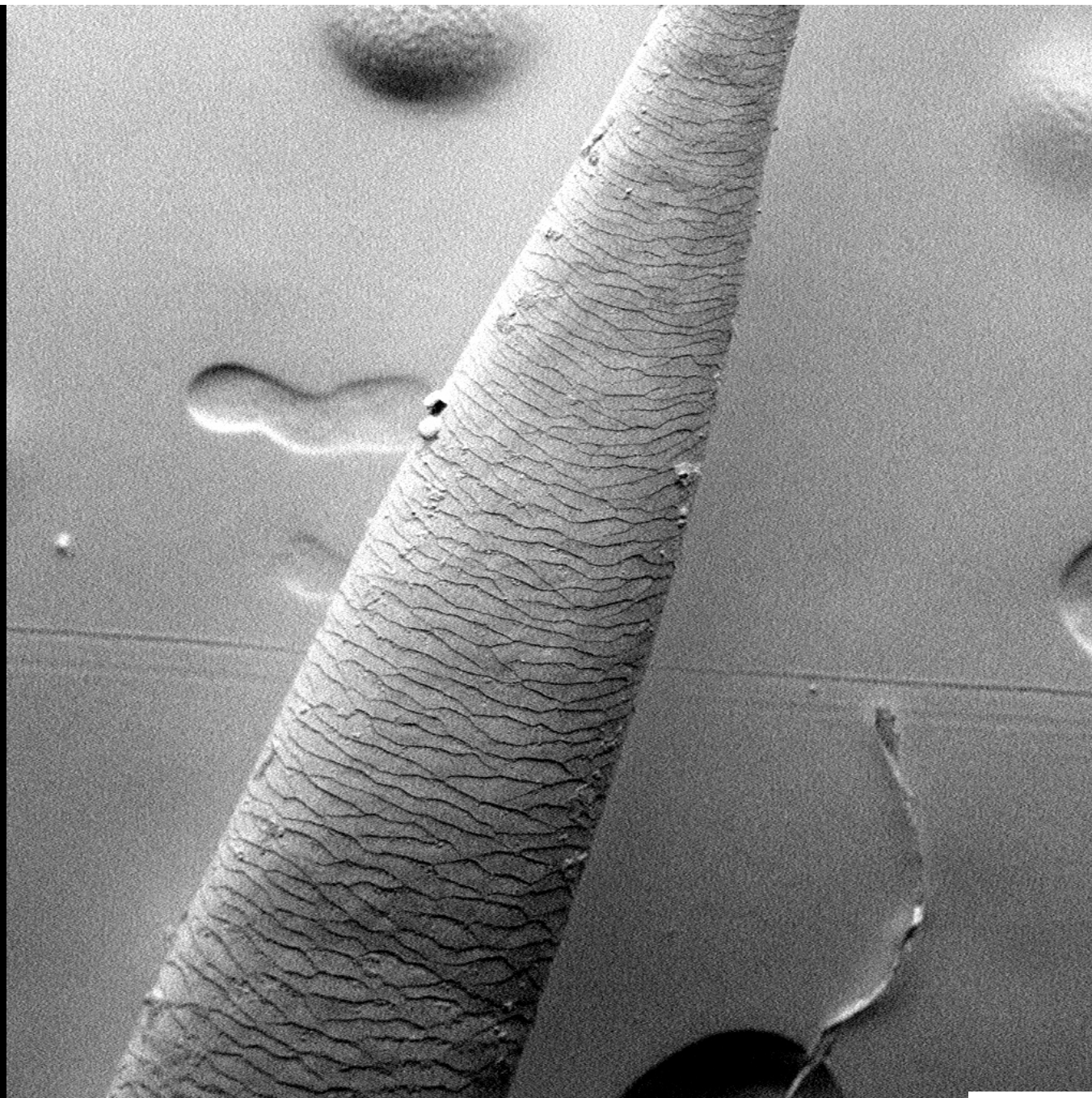
4200x
63.5 μm

5kV - Image
BSD Full

AUG 18

Alessia Mariacher

C.LUPUS STELO



200 μm

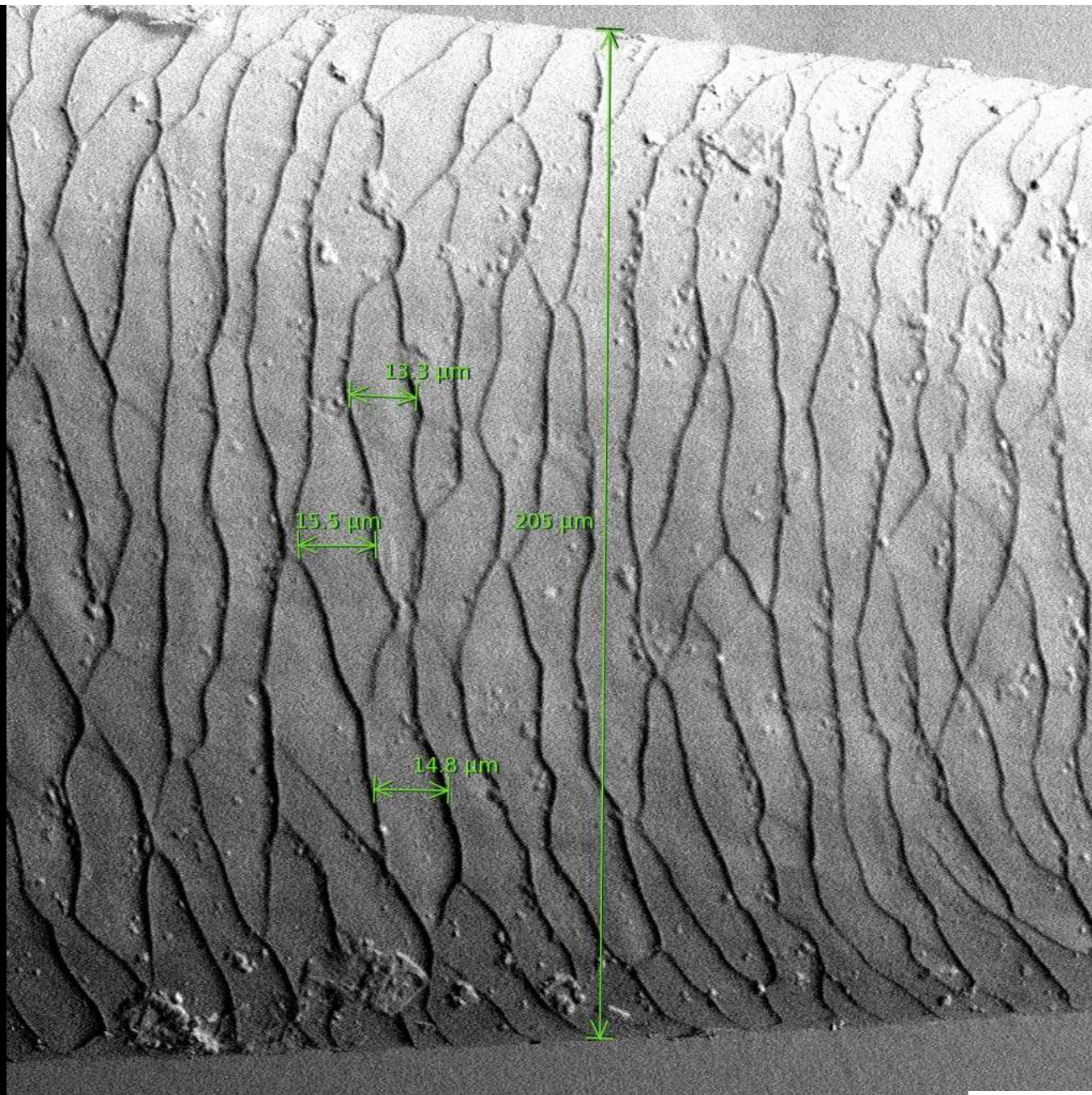
390x
688 μm

5kV - Image
BSD Topo B

AUG 18

Alessia Mariacher

CERVO BASE



50 μm

1200x
224 μm

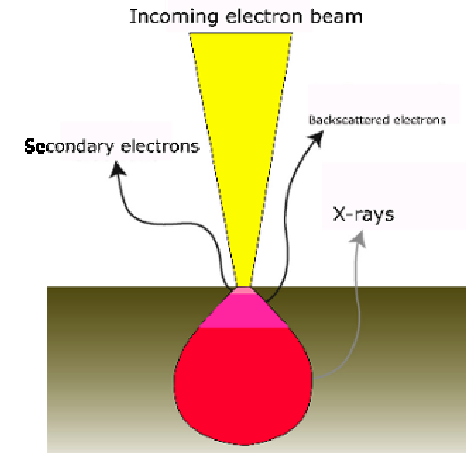
5kV - Image
BSD Topo B

AUG 18

Alessia Mariacher

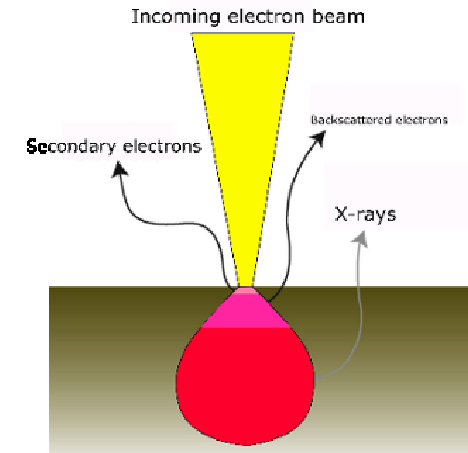
CERVO BASE

EDX



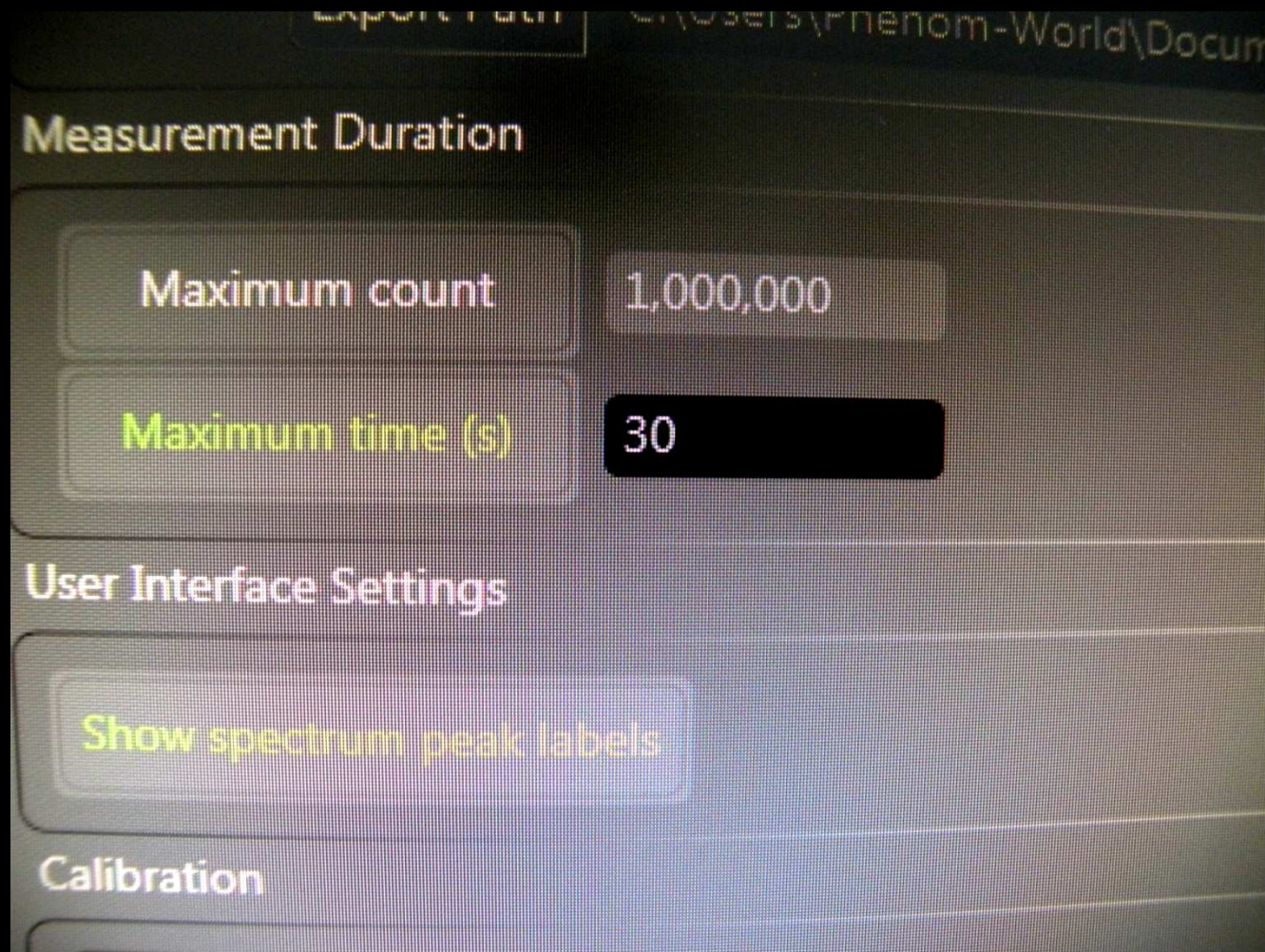
- Il campione viene bombardato con elettroni ad alta energia (accelerazione dalla sorgente: 15 kV)
- Gli atomi del campione si eccitano, promuovendo i loro elettroni a stati energetici più elevati
- Gli atomi ritornano allo stato di riposo, ovvero gli elettroni tornano al loro livello di energia minimo e nel fare questo si liberano dell'energia in eccesso sotto forma di radiazioni nella banda X (fotoni X)

EDX



- I fotoni X emessi avranno un'energia che corrisponde al salto che ha compiuto l'elettrone all'interno dell'atomo, e questa è *diversa e caratteristica* per ciascun atomo.
- Assorbimento da parte di un rivelatore e produzione di uno spettro in cui sono riportate le energie dei fotoni e la quantità di volte che il rivelatore ha ricevuto il segnale corrispondente







IMAGE

ARCHIVE

SETTINGS



live viewing

rate: 4.8 Hz

acquired image

exposure time: 3 sec

all materials (5kV)

high res. (10kV)

analysis (15kV)

mode | presets

med res

high res

user 1

user 2

456

684

912

1024

resolution

456

684

1024

2048

live

med

high

best

quality

basic

med

high

best

low

image

point

map

intensity | detector

topographic A

full

topographic B

07:51

time

11-08-17

date

16094350 F

label

advanced

exit advanced

USB

network

marker

magnify

FOV

datetime

label

databar

sample holder

no sample holder inserted

include databar

TIFF

JPEG

BMP

image type

USB stick

delete all

format

lefthand

righthand

UI mode

mode

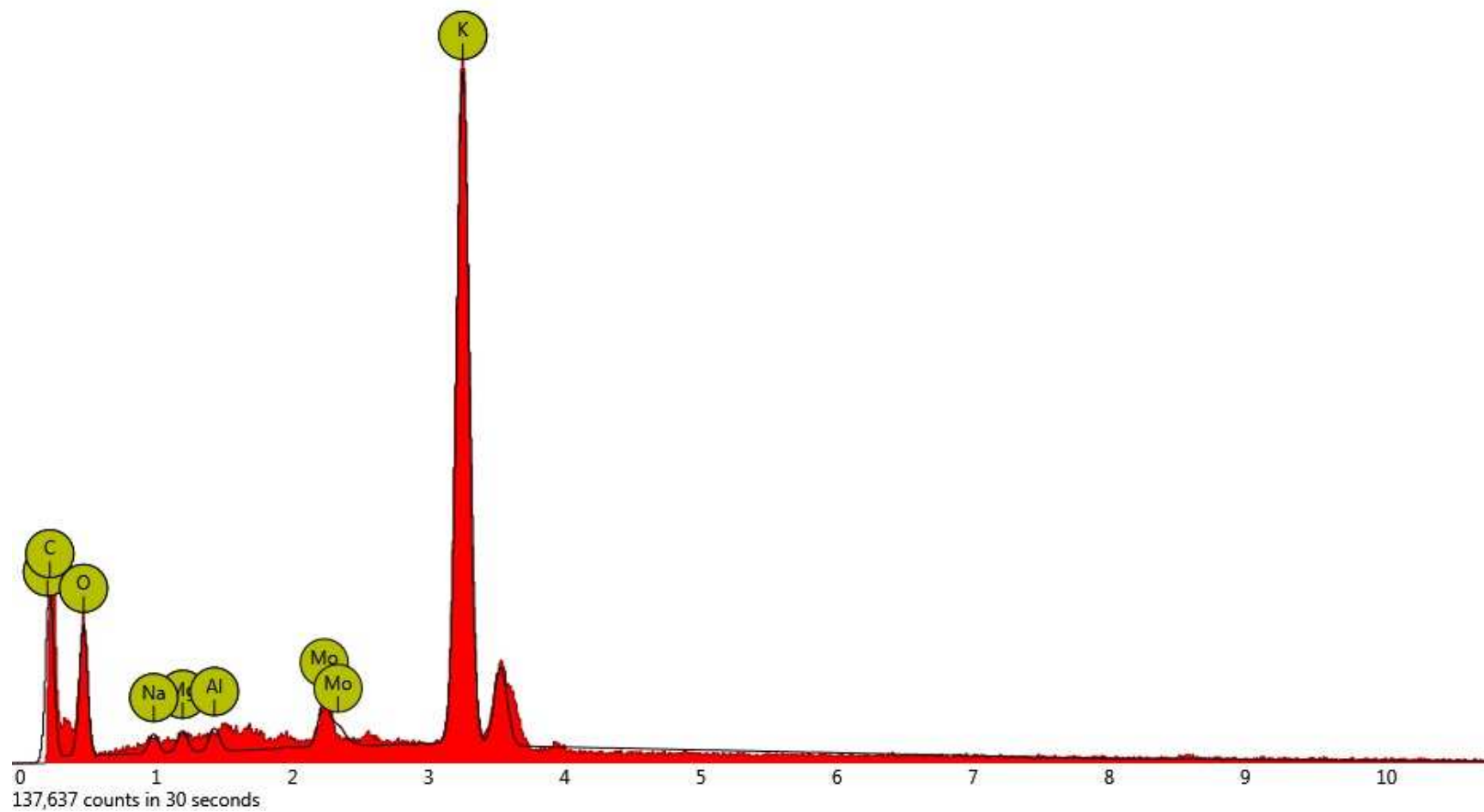
standby

hibernate

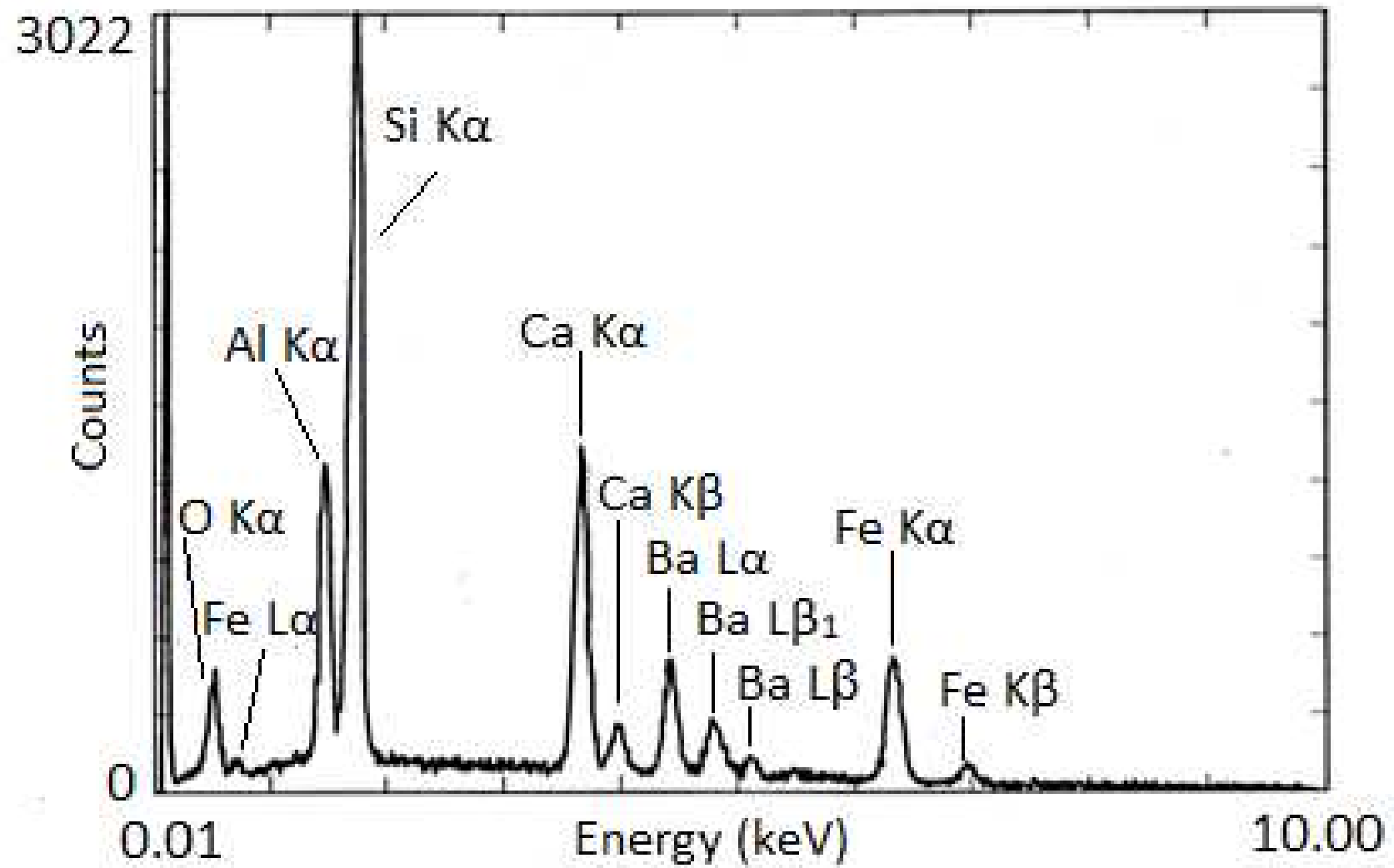
Alessia Mariacher



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri



Alessia Mariacher





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Group IA	Key to Energy Values in keV																VIIA							
H 1	IIA												IIIA	IVA	VA	VIA	VIIA	He 2						
0.052 Li 3	0.110 Be 4		<div><div>K_{α1} K_{β1}</div><div>Au 79</div><div>L_{α1} L_{β1}</div></div>										0.185 B 5	0.282 C 6	0.392 N 7	0.526 O 8	0.677 F 9	0.851 Ne 10						
1.04 1.07 Na 11	1.25 1.30 Mg 12																		1.49 1.55 Al 13	1.74 1.83 Si 14	2.02 2.14 P 15	2.31 2.46 S 16	2.62 2.82 Cl 17	2.96 3.19 Ar 18
3.31 3.59 K 19	3.69 4.01 Ca 20	4.09 4.46 Sc 21	4.51 4.93 Ti 22	4.95 5.43 V 23	5.41 5.95 Cr 24	5.90 6.49 Mn 25	6.40 7.06 Fe 26	6.93 7.65 Co 27	7.48 8.26 Ni 28	8.05 8.90 Cu 29	8.64 9.57 Zn 30	9.25 10.26 Ga 31	9.89 10.98 Ge 32	10.54 11.73 As 33	11.22 12.50 Se 34	11.92 13.29 Br 35	12.65 14.11 Kr 36							
13.39 14.96 Rb 37	14.16 15.83 Sr 38	14.96 16.74 Y 39	15.77 17.67 Zr 40	16.61 18.62 Nb 41	17.48 19.61 Mo 42	18.41 19.61 Tc 43	19.28 21.66 Ru 44	20.21 22.72 Rh 45	21.18 23.82 Pd 46	22.16 24.94 Ag 47	23.17 26.09 Cd 48	24.21 27.27 In 49	25.27 28.48 Sn 50	26.36 29.72 Sb 51	27.47 30.99 Te 52	28.61 32.29 I 53	29.80 33.64 Xe 54							
1.69 1.75 Cs 55	1.81 1.87 Ba 56	1.92 2.00 57 - 71	2.04 2.12 Hf 72	2.17 2.26 Ta 73	2.29 2.40 W 74	2.42 2.54 Re 75	2.56 2.68 Os 76	2.70 2.83 Ir 77	2.84 2.99 Pt 78	2.98 3.15 Au 79	3.13 3.32 Hg 80	3.29 3.49 Tl 81	3.44 3.66 Pb 82	3.61 3.84 Bi 83	3.77 4.03 Po 84	3.94 4.22 At 85	4.11 4.42 Rn 86							
30.97 34.98 Fr 87	32.19 36.38 Ra 88	55.76 63.21 Ac 89	57.52 65.21 Th 90	59.31 67.23 Pa 91	61.13 69.30 U 92	62.99 71.40 Np 93	64.89 73.55 Pu 94	66.82 75.74 Am 95	68.79 77.97 Cm 96	70.82 80.26 Bk 97	72.86 82.56 Cf 98	74.96 84.92 Es 99	77.10 87.34 Fm 100	79.30 89.81 Md 101	81.53 92.32 No 102	83.80 94.88 Lr 103	Actinides 90-103							
12.03 14.77 Lanthanides 57-71	12.34 15.23 La 57	12.65 15.71 Ce 58	12.97 16.20 Pr 59	13.29 19.70 Nd 60	13.61 17.22 Pm 61	13.95 17.74 Sm 62	14.28 18.28 Eu 63	14.62 18.83 Gd 64	14.96 19.39 Tb 65	15.31 19.97 Dy 66	15.66 20.56 Ho 67	16.02 21.17 Er 68	16.38 21.79 Tm 69	16.73 22.58 Yb 70	17.08 23.44 Lu 71									
Actinium - Ac 89		Bromine - Br 35		Dysprosium - Dy 66		Helium - He 2		Lutetium - Lu 71		Nobelium - No 102		Radium - Ra 88		Strontium - Sr 38		Uranium - U 92								
Aluminum - Al 13		Cadmium - Cd 48		Einsteinium - Es 99		Holmium - Ho 67		Magnesium - Mg 12		Osmium - Os 76		Radon - Rn 86		Sulphur - S 16		Vanadium - V 23								
Americium - Am 95		Calcium - Ca 20		Erbium - Er 68		Hydrogen - H 1		Manganese - Mn 25		Oxygen - O 8		Rhenium - Re 75		Tantalum - Ta 73		Xenon - Xe 54								
Antimony - Sb 51		Californium - Cf 98		Europium - Eu 63		Indium - In 49		Mendelevium - Md 101		Palladium - Pd 46		Rhodium - Rh 45		Technetium - Tc 43		Ytterbium - Yb 70								
Argon - Ar 18		Carbon - C 6		Fermium - Fm 100		Iodine - I 53		Mercury - Hg 80		Phosphorus - P 15		Rubidium - Rb 37		Tellurium - Te 52		Yttrium - Y 39								
Arsenic - As 33		Cerium - Ce 58		Fluorine - F 9		Iridium - Ir 77		Molybdenum - Mo 42		Platinum - Pt 78		Ruthenium - Ru 44		Terbium - Tb 65		Zinc - Zn 30								
Astatine - At 85		Cesium - Cs 55		Francium - Fr 87		Iron - Fe 26		Neodymium - Nd 60		Plutonium - Pu 94		Samarium - Sm 62		Thallium - Tl 81		Zirconium - Zr 40								
Barium - Ba 56		Chlorine - Cl 17		Gadolinium - Gd 64		Krypton - Kr 36		Neon - Ne 10		Polonium - Po 84		Scandium - Sc 21		Thorium - Th 90										
Berkelium - Bk 97		Chromium - Cr 24		Gallium - Ga 31		Lanthanum - La 57		Neptunium - Np 93		Potassium - K 19		Selenium - Se 34		Thulium - Tm 69										
Beryllium - Be 4		Cobalt - Co 27		Germanium - Ge 32		Lawrencium - Lr 103		Nickel - Ni 28		Praseodymium - Pr 59		Silicon - Si 14		Tin - Sn 50										
Bismuth - Bi 83		Copper - Cu 29		Gold - Au 79		Lead - Pb 82		Niobium - Nb 41		Promethium - Pm 61		Silver - Ag 47		Titanium - Ti 22										
Boron - B 5		Curium - Cm 96		Hafnium - Hf 72		Lithium - Li 3		Nitrogen - N 7		Protactinium - Pa 91		Sodium - Na 11		Tungsten - W 74										

Alessia Mariacher

K-level and L-level emission lines in KeV



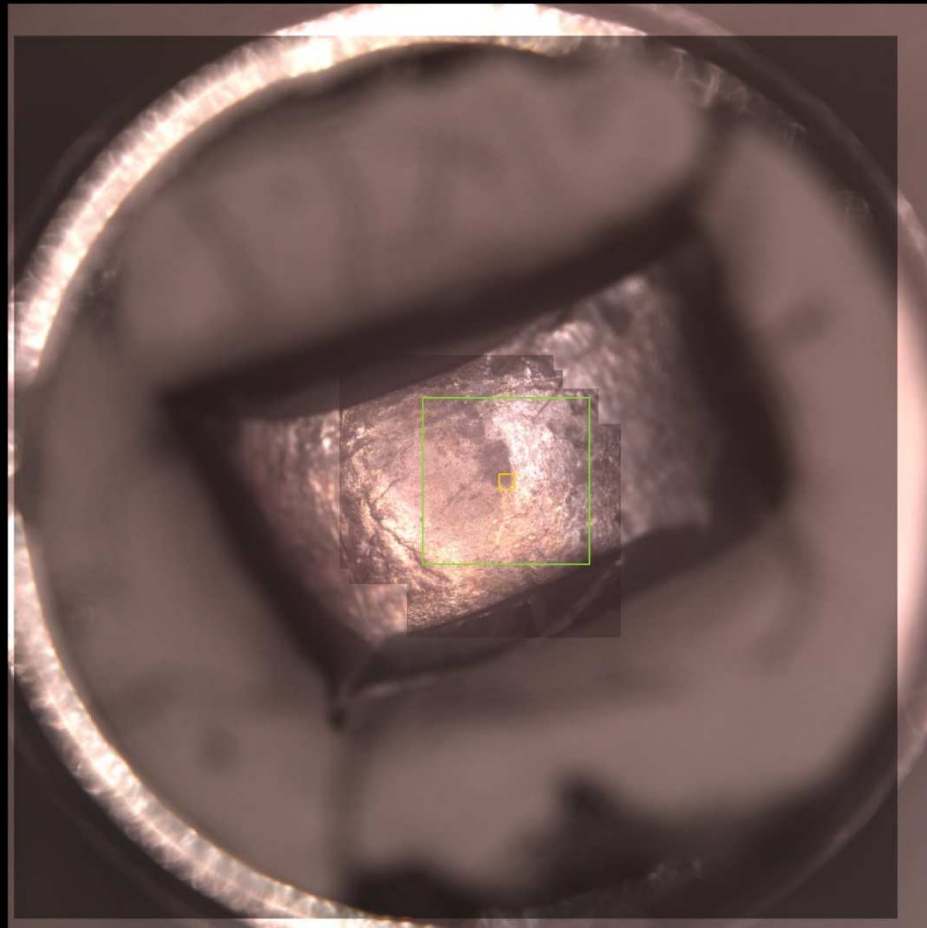
No.	Element	Ka1	Ka2	Kb1	La1	La2	Lb1	Lb2	Lg1
3	Li	0.0543							
4	Be	0.1085							
5	B	0.1833							
6	C	0.277							
7	N	0.3924							
8	O	0.5249							
9	F	0.6768							
10	Ne	0.8486	0.8486						
11	Na	1.04098	1.04098	1.0711					
12	Mg	1.25360	1.25360	1.3022					
13	Al	1.48670	1.48627	1.55745					
14	Si	1.73998	1.73938	1.83594					
15	P	2.0137	2.0127	2.1391					
16	S	2.30784	2.30664	2.46404					
17	Cl	2.62239	2.62078	2.8156					
18	Ar	2.95770	2.95563	3.1905					
19	K	3.3138	3.3111	3.5896					
20	Ca	3.69168	3.68809	4.0127	0.3413	0.3413	0.3449		
21	Sc	4.0906	4.0861	4.4605	0.3954	0.3954	0.3996		
22	Ti	4.51084	4.50486	4.93181	0.4522	0.4522	0.4584		
23	V	4.95220	4.94464	5.42729	0.5113	0.5113	0.5192		
24	Cr	5.41472	5.405509	5.94671	0.5728	0.5728	0.5828		
25	Mn	5.89875	5.88765	6.49045	0.6374	0.6374	0.6488		
26	Fe	6.40384	6.39084	7.05798	0.7050	0.7050	0.7185		
27	Co	6.93032	6.91530	7.64943	0.7762	0.7762	0.7914		
28	Ni	7.47815	7.46089	8.26466	0.8515	0.8515	0.8688		
29	Cu	8.04778	8.02783	8.90529	0.9297	0.9297	0.9498		
30	Zn	8.63886	8.61578	9.5720	1.0117	1.0117	1.0347		
31	Ga	9.25174	9.22482	10.2642	1.09792	1.09792	1.1248		
32	Ge	9.88642	9.85532	10.9821	1.18800	1.18800	1.2185		
33	As	10.54372	10.50799	11.7262	1.2820	1.2820	1.3170		
34	Se	11.2224	11.1814	12.4959	1.37910	1.37910	1.41923		
35	Br	11.9242	11.8776	13.2914	1.48043	1.48043	1.52590		
36	Kr	12.649	12.598	14.112	1.5860	1.5860	1.6366		
37	Rb	13.3953	13.3358	14.9613	1.69413	1.69256	1.75217		
38	Sr	14.1650	14.0979	15.8357	1.80656	1.80474	1.87172		
39	Y	14.9584	14.8829	16.7378	1.92256	1.92047	1.99584		
40	Zr	15.7751	15.6909	17.6678	2.04236	2.0399	2.1244	2.2194	2.3027
41	Nb	16.6151	16.5210	18.6225	2.16589	2.1630	2.2574	2.3670	2.4618
42	Mo	17.47934	17.3743	19.6083	2.29316	2.28985	2.39481	2.5183	2.6235
43	Tc	18.3671	18.2508	20.619	2.4240	-	2.5368	-	-
44	Ru	19.2792	19.1504	21.6568	2.55855	2.55431	2.68323	2.8360	2.9645
45	Rh	20.2161	20.0737	22.7236	2.69674	2.69205	2.83441	3.0013	3.1438
46	Pd	21.1771	21.0201	23.8187	2.83861	2.83325	2.99022	3.17179	3.3287
47	Ag	22.16292	21.9903	24.9424	2.98431	2.97821	3.15094	3.34781	3.51959
48	Cd	23.1736	22.9841	26.0955	3.13373	3.12691	3.31657	3.52812	3.71686
49	In	24.2097	24.0020	27.2759	3.28694	3.27929	3.48721	3.71381	3.92081
50	Sn	25.2713	25.0440	28.4860	3.44398	3.43542	3.66280	3.90486	4.13112
51	Sb	26.3591	26.1108	29.7256	3.60472	3.59532	3.84357	4.10078	4.34779
52	Te	27.4723	27.2017	30.9957	3.76933	3.7588	4.02958	4.3017	4.5709
53	I	28.6120	28.3172	32.2947	3.93765	3.92604	4.22072	4.5075	4.8009

Alessia Mariacher

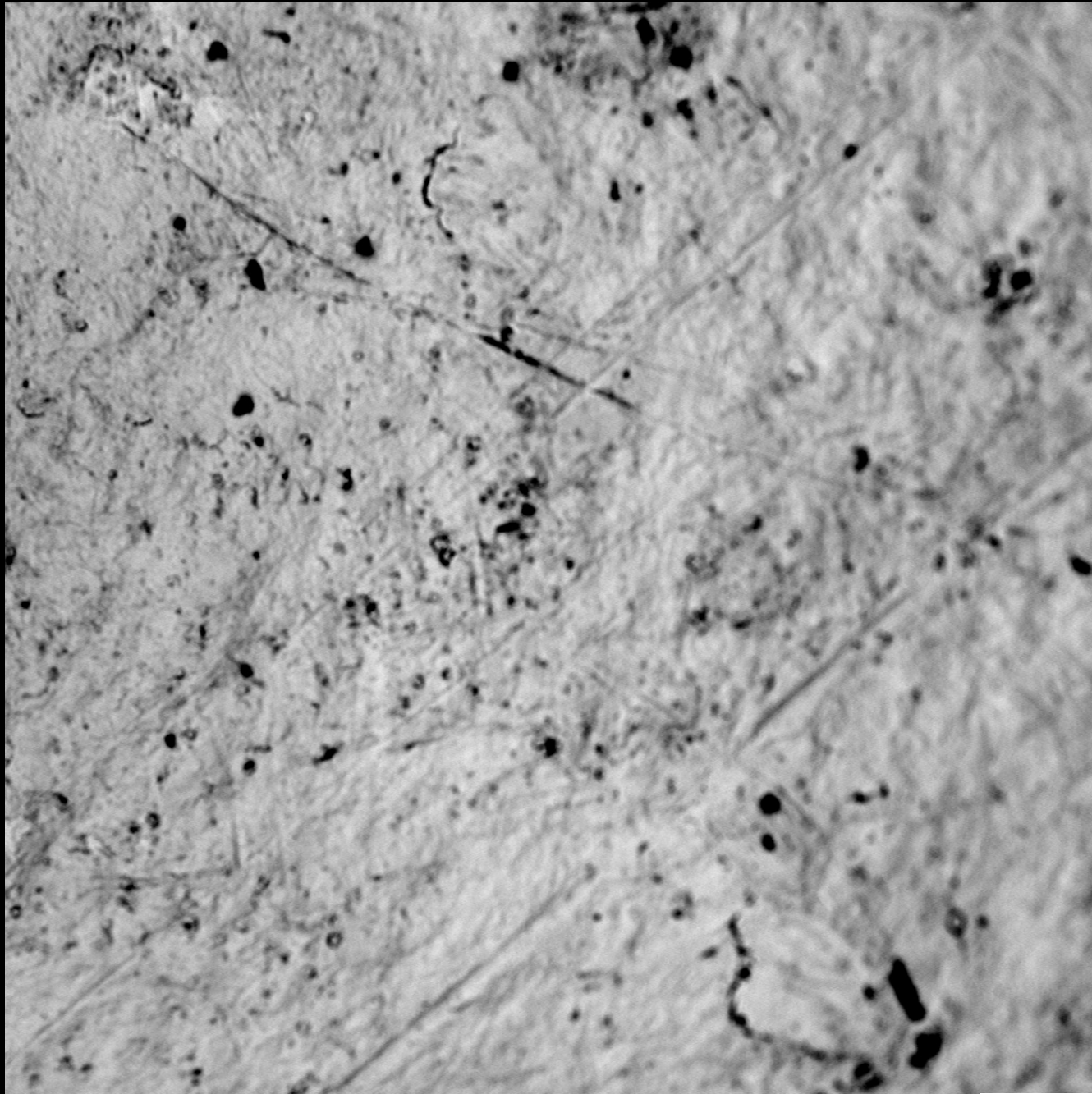
CASO 3

- Analisi della composizione di un frammento di proiettile recuperato da una carcassa di un cervo
- Procedimento penale





Alessia Mariacher



200 μm

410x
648 μm

15kV - Point
BSD Full

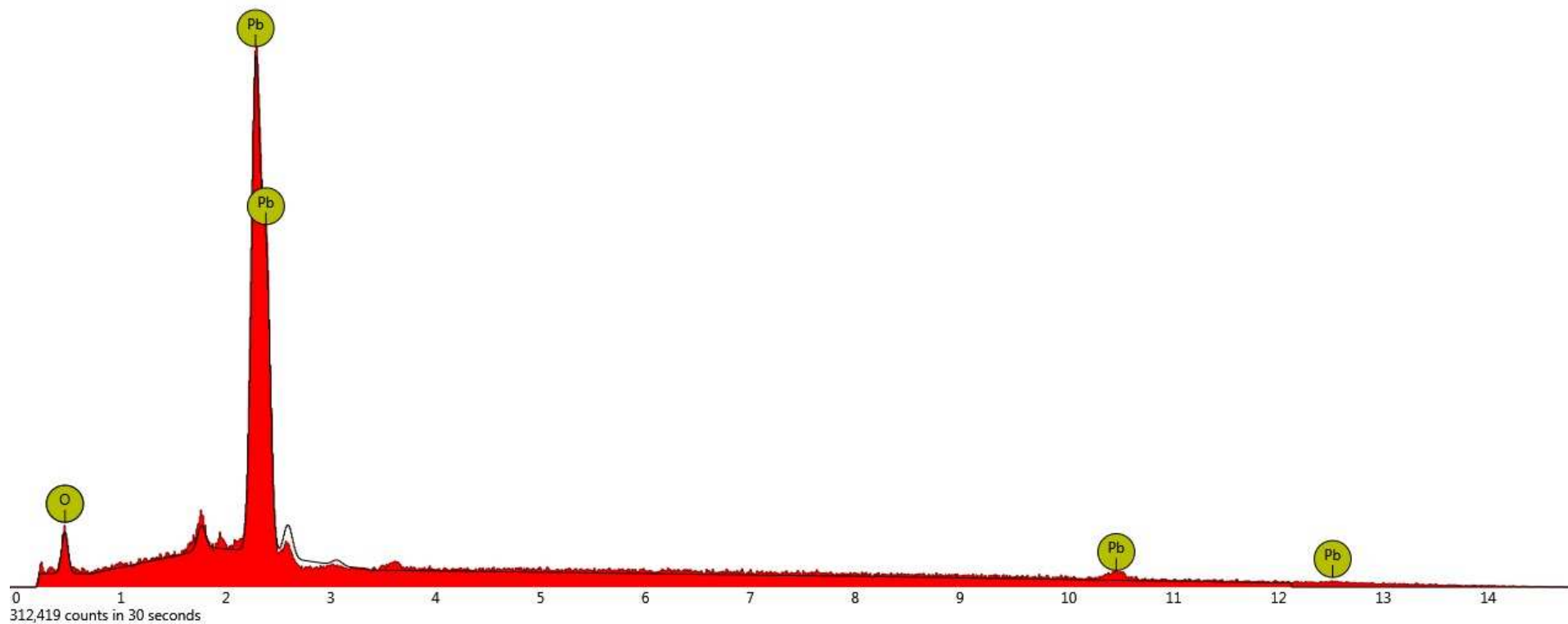
APR 28 2

FRAMMENTO J

Alessia Mariacher



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

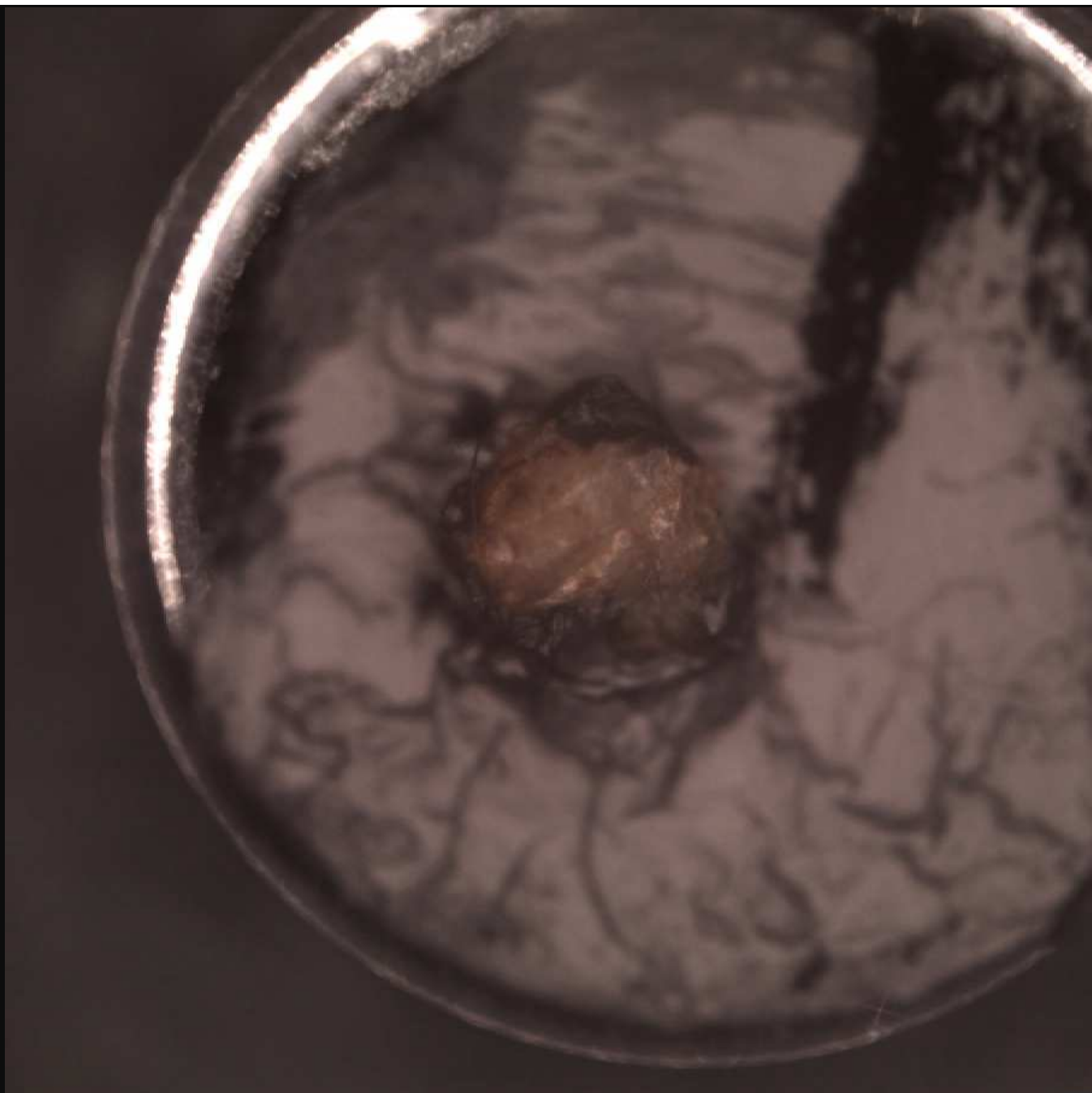


Alessia Mariacher

CASO 4

- Analisi di tracce su un frammento osseo di una frattura verosimilmente causata da colpo ad arma da fuoco
- Procedimento penale



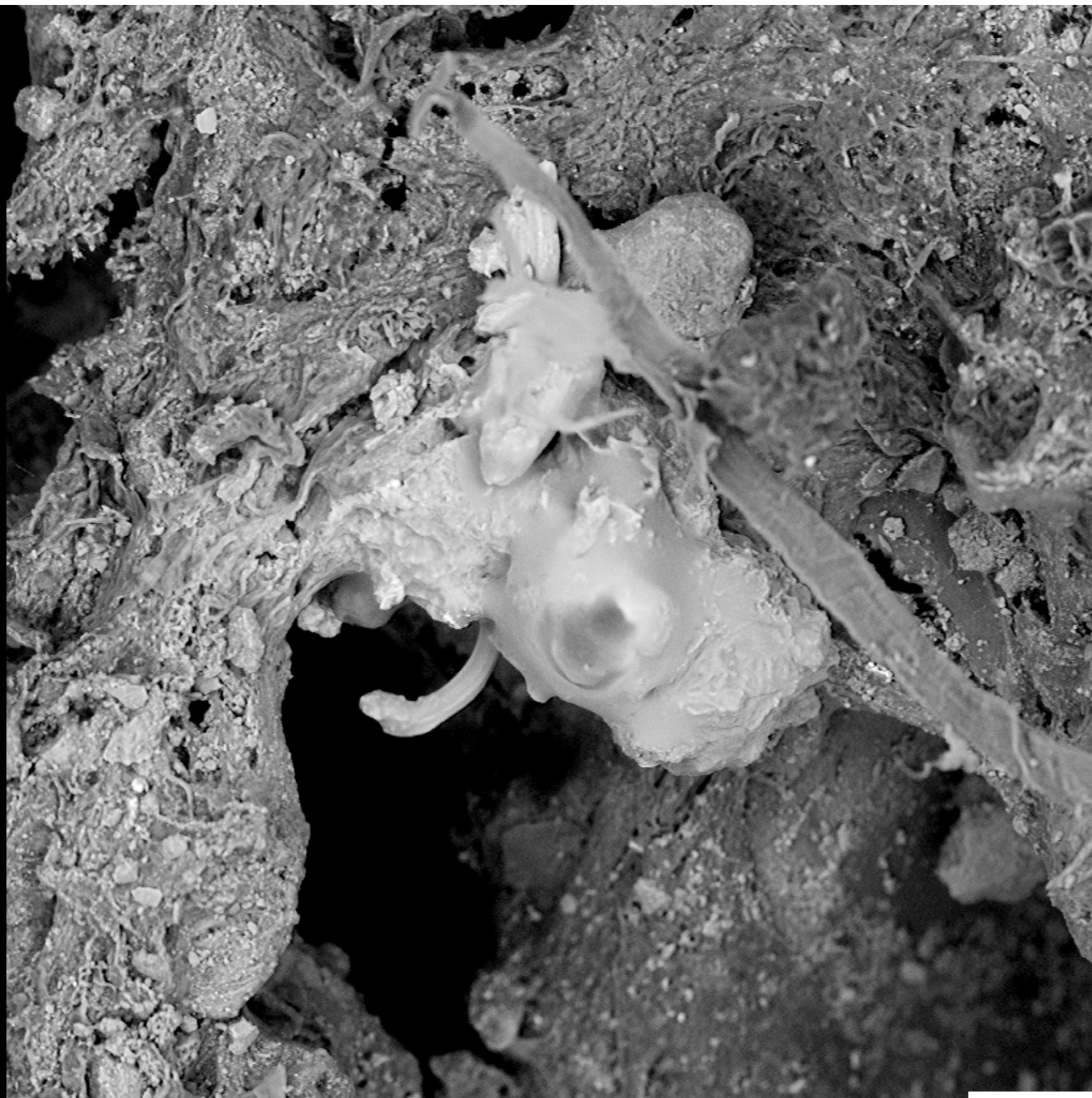


3 mm

20x
12.1 mm

NavCam

AUG **Alessia Mariacher**
39365 CINGHIALE



100 μm

510x
526 μm

15kV - Point
BSD Full

AUG 1
39365 CINGHIALE

Alessia Mariacher

GSR – Gun Shot Residue

- Dopo lo sparo di un'arma da fuoco si producono residui micro e nanometrici composti da particelle combuste o non combuste derivanti dalla carica di innesco, dalla carica di lancio, dal proiettile, dal bossolo e dalla canna stessa dell'arma



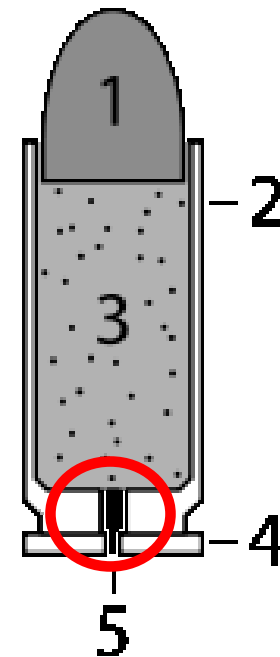
GSR – due principali applicazioni

- GSR propriamente detti: sono quelli ricercati sulle mani di una persona sospettata di aver recentemente esploso un colpo di arma da fuoco
- Residui di polvere da sparo e tracce lasciate dal passaggio del proiettile: vengono ricercate nei tessuti della vittima e in alcuni casi possono contribuire a determinare la distanza di tiro



Formazione dei GSR

- percussione sulla cartuccia
- detonazione della carica di innesco (5)
con $T = 1500-2000^{\circ}\text{C}$ e $P = 95 \text{ atm}$
- deflagrazione della carica di lancio (3)
con $T > 3500^{\circ}\text{C}$ e $P > 2700 \text{ atm}$
- **SUBLIMAZIONE della carica di innesco** e successiva solidificazione della miscela gassosa dopo lo sparo



GSR

- Polveri inorganiche prodotte per sublimazione
- Dimensioni: 0,5 – 30 micron (1-10)
- Forma sferica regolare
- Identificabili da **composizione + morfologia + dimensioni**
- Interpretazione vincolata alle condizioni del repertamento



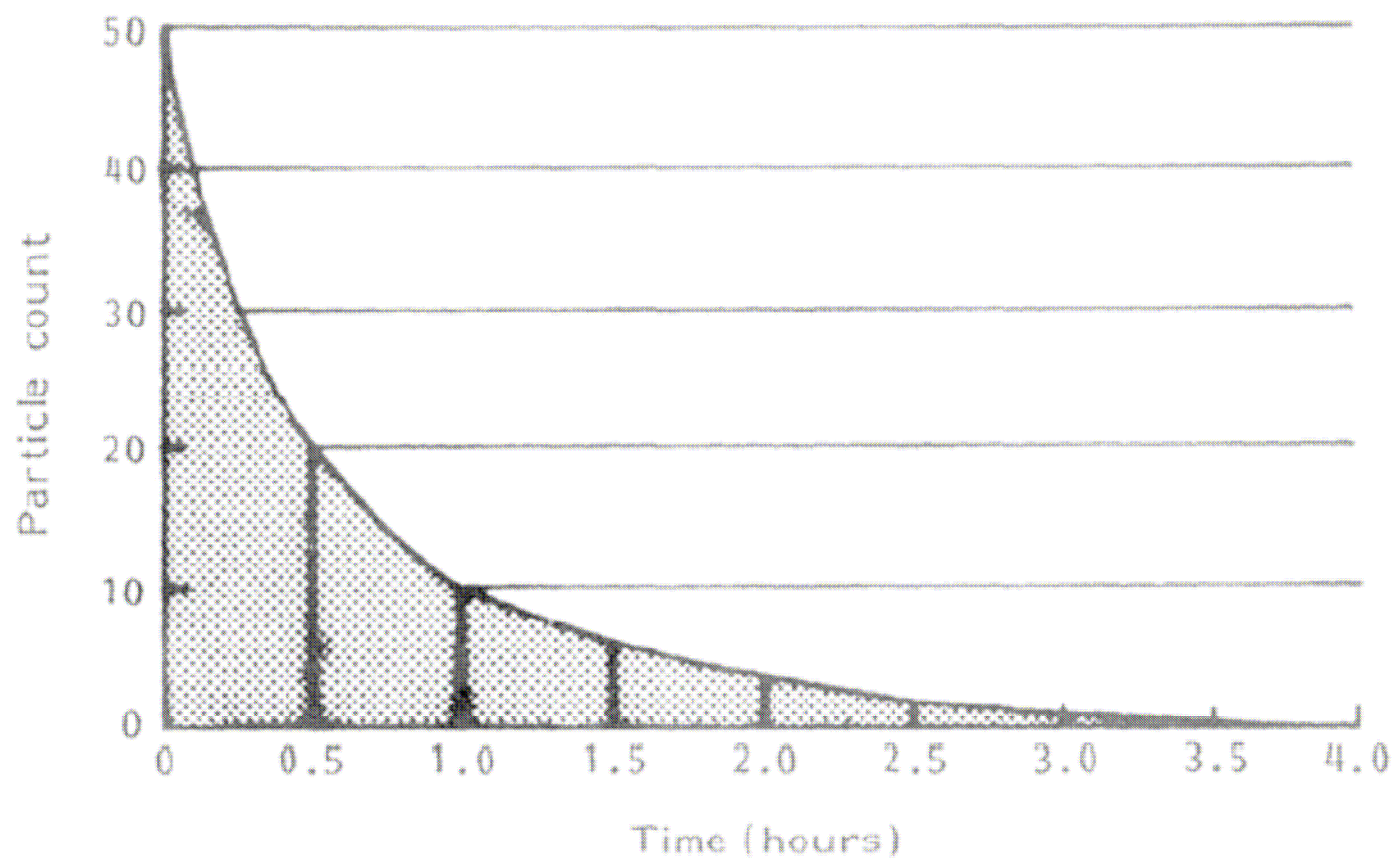
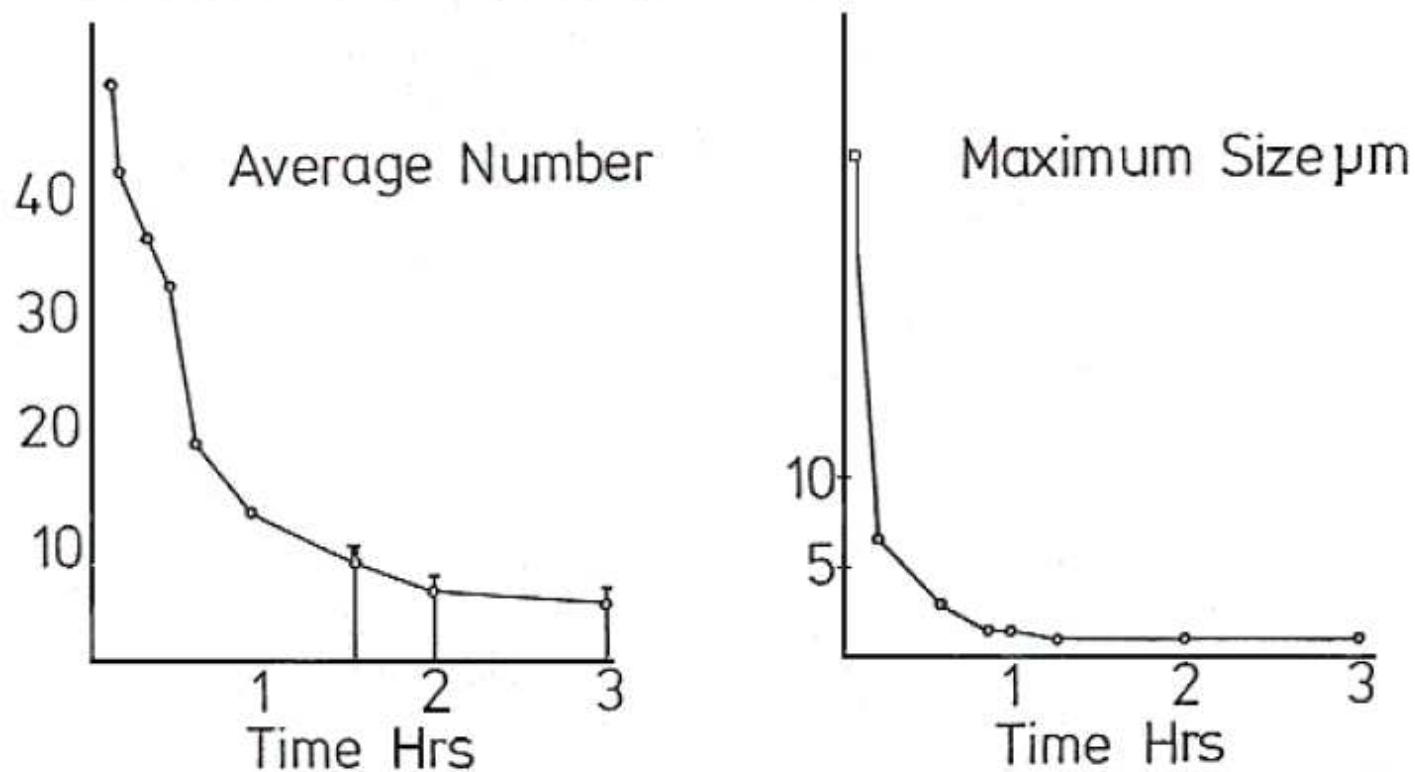


Figure 6.4 *GSR retention on the hands*

Figure 5
Particles Found During Two Hour Search

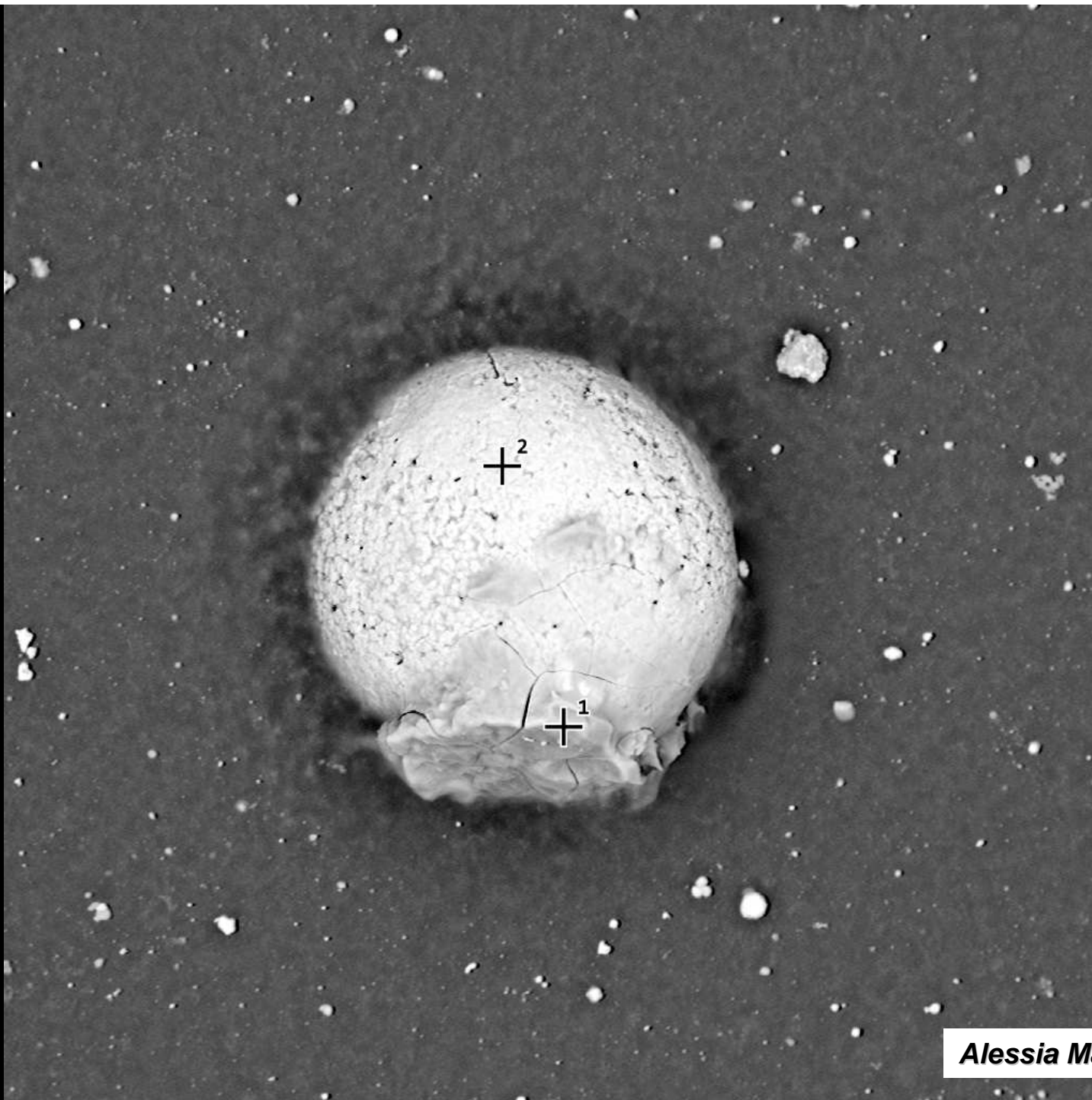


CASO 5

- Ricerca di GSR



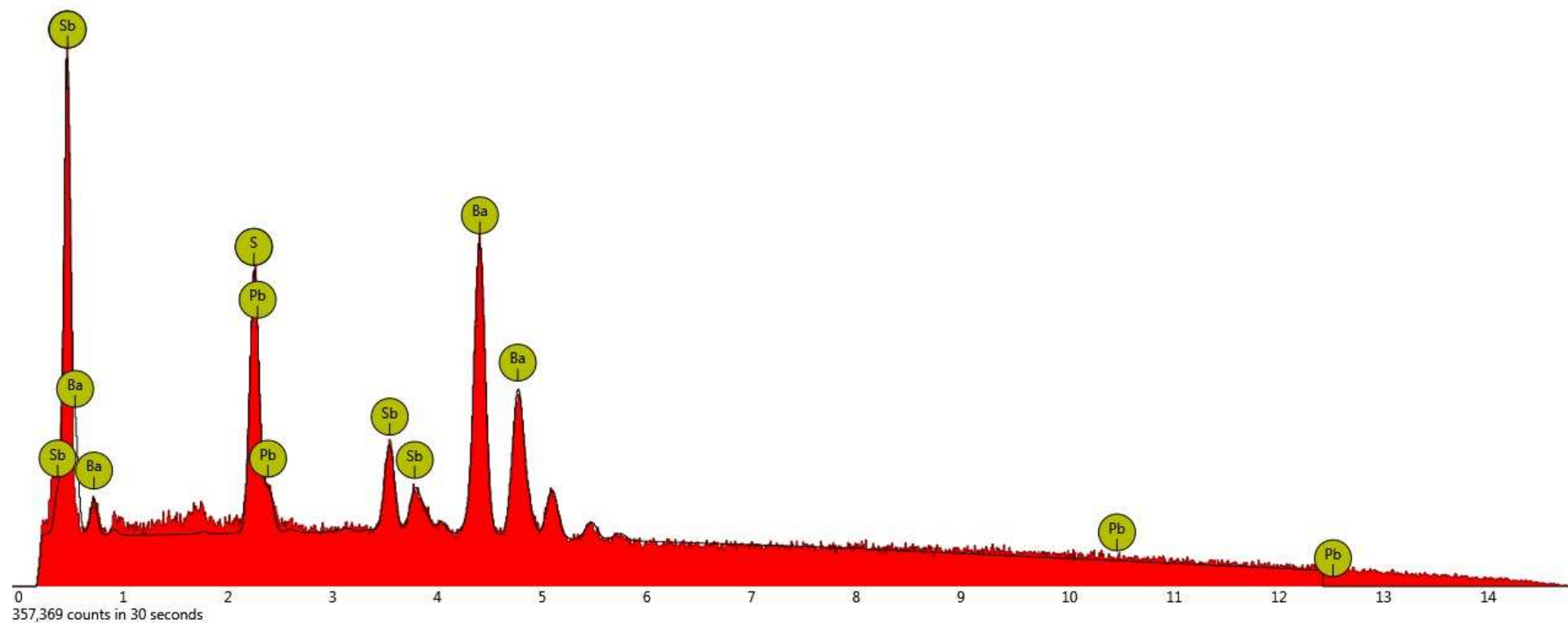
Alessia Mariacher



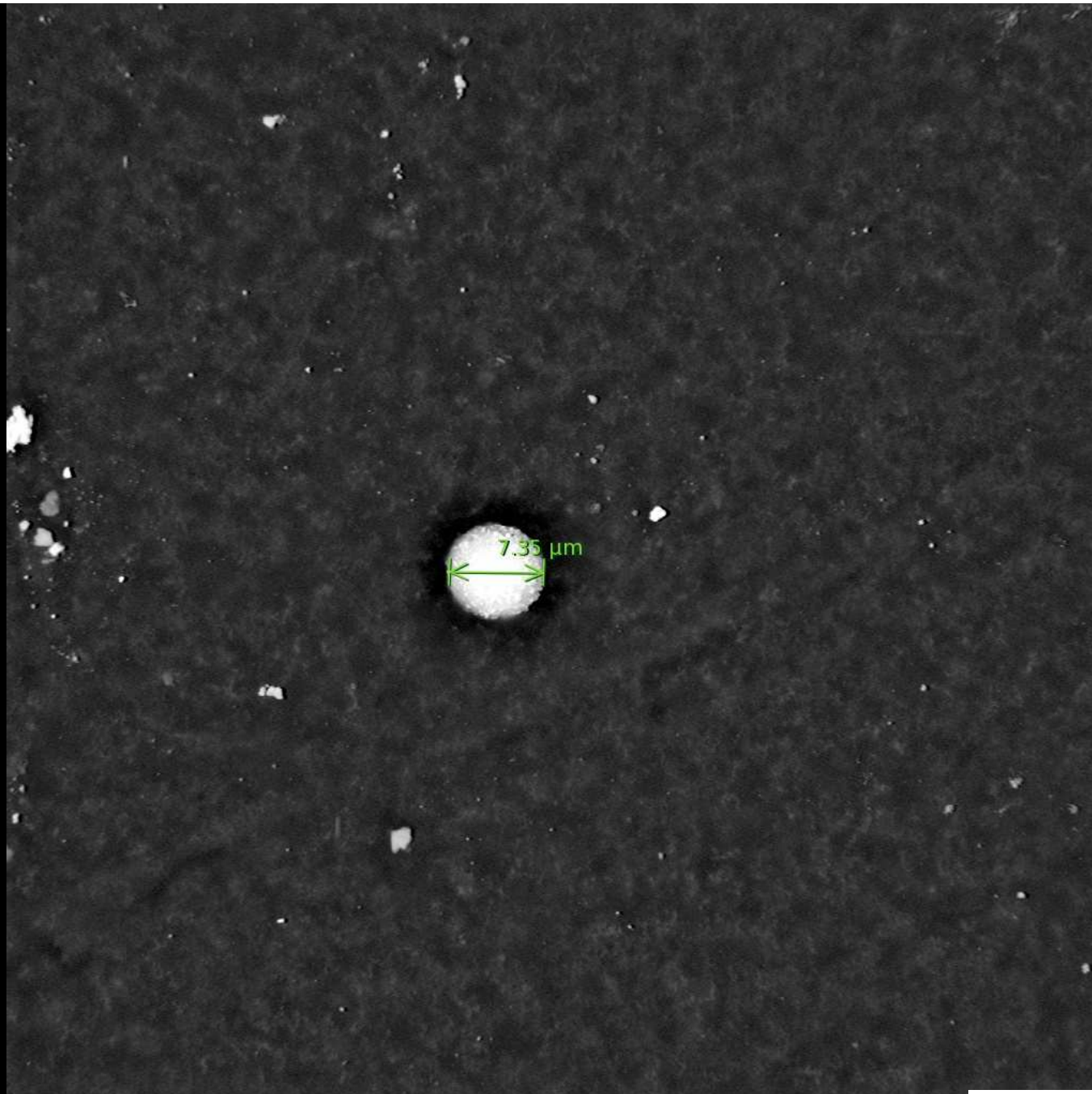
Alessia Mariacher



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



Alessia Mariacher



20 μm

3100x
86.5 μm

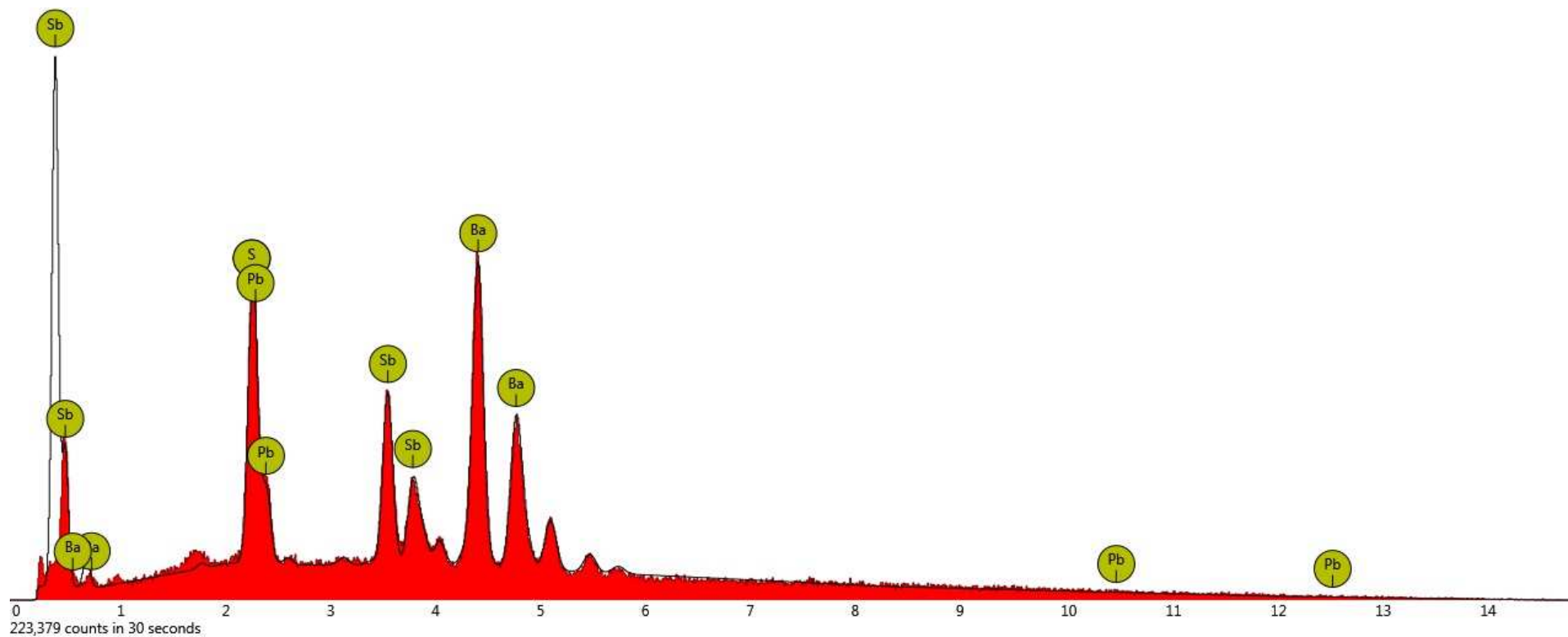
15kV - Point
BSD Full

APR 23

Alessia Mariacher
PARIDE_A1



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



Alessia Mariacher