
capitolo 1

Definizioni dei nanomateriali

Danilo Cottica (coordinatore), *Fondazione Salvatore Maugeri di Pavia*

Stefano Bellucci, *Istituto Nazionale di Fisica Nucleare, Laboratori Nazionali di Frascati*

Fabio Bocconi, *INAIL, Dipartimento di Medicina del Lavoro - ex ISPESL*

Stefano Casciardi, *INAIL, Dipartimento di Igiene del Lavoro - ex ISPESL*

Paola Castellano, *INAIL, Dipartimento di Igiene del Lavoro - ex ISPESL*

Matteo Goldoni, *INAIL, Centro Studi e Ricerche di Parma - ex ISPESL*

Elena Grignani, *Fondazione Salvatore Maugeri di Pavia*

Achille Marconi, *Istituto Superiore di Sanità*

1.1 Definizione dimensionale e strutturale dei nanomateriali

Le nanotecnologie presto troveranno applicazione in molti ambiti della vita e del lavoro e renderanno possibili forti innovazioni in tutte le aree relative alla comunicazione, alla salute alle produzioni manifatturiere, ai materiali ed alle tecnologie basate sulla conoscenza, pertanto la maggior parte delle autorità del settore ritengono necessario fornire all'industria ed alla ricerca gli strumenti adatti per lo sviluppo e l'utilizzo di tali tecnologie. Inoltre, è essenziale che i legislatori e le agenzie che si occupano di protezione ambientale e della salute abbiano a disposizione sistemi di misura validi e protocolli di valutazione basati su standard di indubbia certezza (ISO, 2010).

In questo senso occorre definire alcuni concetti fondamentali, per inquadrare l'ambito della presente trattazione.

Innanzitutto, con il termine "Nanoscienze" si intende il risultato di una cooperazione interdisciplinare tra fisica, chimica, biologia, biotecnologia, scienze dei materiali ed ingegneria con il fine di studiare i fenomeni e la manipolazione di materiali alla scala atomica e molecolare, le cui proprietà differiscono significativamente da quelli di dimensioni maggiori (Royal Society, 2004; IRGC, 2006).

Per le finalità di questo documento si assume la definizione di nanotecnologia fornita dalla *National Nanotechnology Initiative* (NNI 2006a,b,c), il programma di Ricerca e Sviluppo fondato dal governo federale degli Stati Uniti per coordinare i molteplici sforzi in materia di scienza, ingegneria e tecnologia alla nanoscala. Questa definizione prevede che il termine "Nanotecnologia" possa essere affiancato ad un processo o ad un prodotto solo se sono rispettate le seguenti condizioni:

(1) sviluppo di ricerca e tecnologia a livello atomico, molecolare o macromolecolare,

in una scala dimensionale che vada approssimativamente da 1 a 100 nanometri;
(2) creazione ed utilizzo di strutture, dispositivi e sistemi che abbiano proprietà e funzioni innovative dovute alla loro grandezza;
(3) capacità di controllare o manipolare la materia alla scala atomica. Tale definizione è stata ripresa anche dall'*Environmental Protection Agency* (EPA), l'Agenzia per la protezione ambientale statunitense, e dal *National Institute of Occupational Safety and Prevention* (NIOSH) nei loro documenti principali di riferimento sul tema delle nanotecnologie (EPA, 2007; NIOSH, 2009).

Esistono, inoltre, definizioni che differiscono per le dimensioni in base alle quali si considerano i materiali alla nanoscala: alcune includono quelli superiori ai 100 nm¹, ed altre identificano i nanomateriali (NM) come "quei materiali che abbiano componenti strutturati con almeno una delle dimensioni inferiore ai 100 nm (Royal Society, 2004) e che includono nanoparticelle (NP), ovvero particelle caratterizzate da tutte e tre le dimensioni tra circa 1 nm e 100 nm (ISO, 2008).

La definizione di nanotecnologia scelta in questa sede si riferisce ai materiali alla nanoscala intenzionalmente prodotti in laboratorio o a livello industriale. Questi nanomateriali sono detti "ingegnerizzati" escludendo, quindi, tutto il particolato esistente in natura (il particolato proveniente dagli incendi delle foreste, o i particolati biologici, ecc.) e tutto quello che proviene in modo casuale da prodotti dell'uomo (dai motori diesel, dagli impianti energetici, ecc.), sebbene rientri comunque nella scala dimensionale compresa tra 1 e 100 nm.

I NM ingegnerizzati possono ulteriormente essere suddivisi in base alle modalità con cui vengono prodotti, ovvero con tecniche sia "top-down" (lett: dall'alto verso il basso) sia "bottom-up" (lett: dal basso verso l'alto) (Royal Society, 2004). Il procedimento "top-down" prevede il taglio o il passaggio in una fresatrice di un campione di materiale unico e molto largo per ottenerne il corrispettivo alla nanoscala e nella configurazione desiderata; al contrario, l'approccio "bottom-up" prevede l'assemblaggio di subunità più piccole per ottenerne il corrispettivo più largo alla nanoscala tramite procedimenti simili alla sintesi chimica. Molte applicazioni della tecnica "top-down" vengono utilizzate da anni, come i procedimenti litografici per la produzione manuale dei chip per computer, mentre gli approcci "bottom-up", come quelli per la produzione dei nanotubi, sono relativamente nuovi. La tecnica che viene utilizzata per produrre il nanomateriale può influenzare il tipo di rischio per la salute dell'uomo associato al nanomateriale stesso (Thomas K and Sayre P, 2005). Le basi concettuali delle nanotecnologie sono state esposte per la prima volta nel 1959 dal fisico Richard Feynman nel suo discorso dal titolo "In fondo c'è molto spazio" (Feynman R, 1959). Feynman ha studiato la possibilità di manipolare la materia

¹ www.lanl.gov/mst/nano/definition.html

a livello dei singoli atomi o molecole, immaginando come sarebbe stata l'intera Enciclopedia Britannica scritta sulla testa di uno spillo e prevedendo così una crescente possibilità di esaminare e controllare la materia alla nanoscala. Tuttavia, il termine "nanotecnologia" non compare fino al 1974, quando Norio Taniguchi, un ricercatore dell'Università di Tokyo (Giappone) lo ha utilizzato in riferimento alla possibilità di costruire materiali in modo molto preciso a livello nanometrico (Taniguchi M, 1974). All'epoca, la spinta iniziale verso la miniaturizzazione venne dall'industria elettronica, che aveva l'obiettivo di sviluppare la strumentazione utilizzata per creare dispositivi elettronici sui chip di silicene sempre più piccoli (e quindi più veloci e più complessi). Infatti, già agli inizi degli anni Settanta, negli Stati Uniti d'America veniva utilizzata dalla IBM una tecnica, chiamata litografia a fascio di elettroni, per creare nanostrutture e dispositivi piccoli 40 – 70 nm (Royal Society, 2004).

Dall'inizio del nuovo millennio, lo sviluppo delle nanotecnologie ha registrato un andamento esponenziale, testimoniato dal numero di prodotti commercializzati e dall'entità dei fondi dedicati alla ricerca e sviluppo nel settore.

Le prospettive indicate da Roco e altri (Roco MC, 2004; Roco MC, 2006; Renn O and Roco MC, 2006) identificavano quattro generazioni "sovrapponibili" (nel tempo) di nuovi prodotti nanotecnologici e di processi che avrebbero avuto potenziale sviluppo tra il 2000 e il 2020. Ogni generazione di prodotti è stata di seguito elencata inserendo tra parentesi l'anno di creazione dei primi prototipi:

1. Nanostrutture passive (2001): prodotto della ricerca primaria sui materiali nanostrutturati e sugli strumenti di misura e controllo di processi alla scala nanometrica, quali nanoparticelle, nanomateriali e nanotubi di carbonio.
2. Nanostrutture attive (2005): dispositivi e sistemi per l'immagazzinamento e la conversione di energia; strumenti per medicina molecolare e sistemi alimentari; nanoelettronica; strumentazioni e manifatture 3D alla nanoscala.
3. Sistemi di Nanosistemi (2010): nanostrutture eterogenee e sistemi supramolecolari ingegnerizzati, quali tessuti artificiali e sistemi sensoriali; interazioni quantiche all'interno di sistemi alla nanoscala; sistemi elettromeccanici alla nanoscala; terapia focalizzata sulla cellula con nanodispositivi.
4. Nanosistemi molecolari (2015): manipolazione al livello atomico per la progettazione di molecole e sistemi supramolecolari; dinamica di singola molecola; macchine molecolari; progettazione di grandi ed eterogenei sistemi molecolari; interazione controllata tra luce e materia con rilevanza per la conversione dell'energia.

Ad oggi sembrerebbe che tale andamento abbia subito addirittura un'accelerazione con un'anticipazione della data di inizio di ciascuna fase (Iavicoli S et al, 2009).

Per la nanotecnologia quindi – molto di più che per altri ambiti – è richiesta l'integrazione di molte scienze diverse con l'ingegneria e con competenze e discipline

tecniche; le sue applicazioni entreranno in ogni settore e sfera della vita (comunicazione, salute, lavoro, mobilità, casa, tempo libero, energia, alimentazione) e saranno accompagnate da cambiamenti sociali, economici ed ecologici (IRGC, 2006).

Tuttavia, le stesse proprietà che rendono i NM unici da un punto di vista chimico, fisico e biologico, rispetto a particelle di dimensioni maggiori dello stesso materiale, possono contribuire a causare un rischio per la salute umana e per l'ambiente. A tali dimensioni, infatti, i NM iniziano a mostrare proprietà particolari che influenzano il loro comportamento fisico, chimico e biologico con effetti che, al momento, sono lontani da un'interpretazione precisa del loro impatto sull'ambiente e sulla salute umana.

Oltre alle nanotecnologie, che producono ed utilizzano deliberatamente dette strutture chimiche, esiste un vasto campo di ambiti produttivi e di ambienti di vita e di lavoro in cui i NM possono rappresentare una fonte di rischio (durante la produzione dei NM stessi, fino alla formulazione ed utilizzo di prodotti contenenti NM, per arrivare alle fasi del loro smaltimento o riciclaggio) e che possono essere presi in considerazione per scopi preventivi.

1.1.1 Definizioni igienistico-industriali

Quando si parla di microparticelle e nanoparticelle è opportuno riprendere un concetto della chimica-fisica applicato all'igiene industriale che è di notevole rilevanza per gli strumenti di campionamento del particolato aerodisperso, quando si preveda il frazionamento delle diverse classi dimensionali. Le frazioni granulometriche delle polveri aerodisperse sono classificate in base al "diametro aerodinamico" delle particelle, definito come il "diametro di una sfera di densità pari a 1 g/cm^3 con la stessa velocità di sedimentazione nelle stesse condizioni di temperatura, pressione ed umidità".

La norma UNI-EN 481:1994 "Atmosfera nell'ambiente di lavoro – Definizione delle frazioni granulometriche per la misurazione delle particelle aerodisperse." definisce molto bene le tre frazioni, inalabile, toracica e respirabile, delle polveri aerodisperse e fornisce specifiche tecniche per gli strumenti di campionamento necessari (HSE, 2004). Quando viceversa si parla di "polveri fini", "particelle ultrafini" in bibliografia difficilmente si reperiscono definizioni del *range* dimensionale loro attribuito. Nel 1998 Preining definì le polveri ultrafini come quelle aventi un diametro inferiore a 100 nm (Preining O, 1998). Analogamente, la Royal Society ha proposto una definizione di nanotecnologia che porta a definire le nanoparticelle come quelle aventi diametro inferiore a 100 nm (Royal Society, 2004).

La ISO definisce una nanoparticella come "una particella con un diametro sufficientemente piccolo per proprietà chimiche e fisiche [...]. Un diametro superiore nominale,

ma non esclusivo, per le nanoparticelle è di 40 nm". La norma definisce poi altre due importanti classi di particolato aerodisperso (ISO, 2005):

- 1) *agglomerato*: un gruppo di particelle legate da forze relativamente deboli quali Van der Waals, elettrostatiche e di tensione superficiale;
- 2) *aggregato*: particella eterogenea in cui i diversi componenti non sono facilmente separabili, perché legati da forze molto stabili.

Facile intuire la rilevanza della definizione ai fini tossicologici e della relativa misura (campionamento ed analisi).

Per classificare le particelle con diametro aerodinamico inferiore a 0,5 μm , si dovrebbe utilizzare il "diametro di diffusione", definito come il "diametro di una sfera con lo stesso coefficiente di diffusione nelle stesse condizioni di temperatura, pressione ed umidità". Quando si parla di NP siamo nel secondo caso e quindi si evidenzia un potenziale contributo del processo di diffusione alla loro aerodispersione.

La Commissione Tedesca per i MAK (concentrazioni massime ammissibili per le sostanze chimiche nell'aria nei luoghi di lavoro che, nello stato delle conoscenze attuali, non alterano la salute dei lavoratori, né provocano un fastidio indebito – MAK Commission: Commissione per lo studio delle sostanze pericolose nei luoghi di lavoro), infine, prende in considerazione gli agglomerati per sviluppare una definizione di particella ultrafine di questo tipo: "Particelle Ultrafini (nanoparticelle) [...] comprendendo i loro aggregati ed agglomerati come componenti di polveri o fumi. Le loro particelle primarie sono caratterizzate da un diametro di diffusione equivalente di meno di 100 nm" (BIA, 2003; HSE, 2004).

1.1.2 Le nanoparticelle in igiene industriale ed occupazionale

Molti materiali utilizzati nelle nanotecnologie sono costituiti da nanoparticelle o materiali fibrosi che inizialmente sono prodotti allo stato di aerosol o sospensioni colloidali. La maggior parte dei nanomateriali attualmente prodotti o prossimi ad essere immessi sul mercato viene catalogata dalla Organization for Economic Co-operation and Development (OECD, 2008) nelle seguenti tipologie:

- *Fullereni* (C_{60}): molecole di carbonio con strutture cave, a gabbia; la famiglia dei fullereni è vasta, ma il più conosciuto è il C_{60} , un composto con numero di atomi di carbonio pari a 60 a creare una struttura sferica, formata da pannelli pentagonali o esagonali.
- *Nanotubi di carbonio* (*Carbon Nanotubes – CNT*): cilindri di fogli di grafite arrotolati e chiusi ad un'estremità, possono essere a parete singola (*Single Wall – SWCNT*) o multipla (*Multi Wall – MWCNT*), a seconda che si compongano di un singolo foglio oppure di più fogli disposti in una struttura coassiale. Per le loro dimensioni (rapporto

lunghezza/diametro) cadono nella definizione convenzionale di fibre, sono altamente elettrostatici e si agglomerano in fasci o filamenti di circa 20 – 50 nm di diametro. Poiché il processo produttivo prevede l'uso di catalizzatori metallici, il materiale finale può contenere metalli quali ferro, nichel, cobalto.

- *Materiali a base di metalli e/o ossidi di metalli* quali:
 - nanoparticelle di argento e di ferro;
 - diossidi di titanio e di silicio;
 - ossidi di alluminio, cerio e zinco.
- *Nero di carbone (Carbon black)*.
- *Polistirene*.
- *Dendrimeri*: polimeri sintetici di struttura nanometrica costruiti da unità ramificate (dal greco *déndron* – albero). Le superfici dei dendrimeri sono caratterizzate da numerosi terminali di catena che possono essere adattati ai fini della realizzazione di specifiche funzioni chimiche (ad esempio per l'impiego come catalizzatori o come vettori di farmaci a causa della presenza di cavità interne alla struttura tridimensionale)
- *Nanoclays* (nanoargille): argille minerali con strutture caratterizzate da una morfologia a lamina.

In aggiunta alle tipologie riportate nella suddetta lista vanno anche menzionati i seguenti NM:

- *Nanodots* (nanocristalli): strutture cristalline di composti quali cadmio, selenio, tellurio e zolfo; il loro diametro nominale è dell'ordine di diversi nanometri; sono reperibili in sospensione in un veicolante o inglobati in un solido (polistirene, poliuretano, policarbonato, silice).
- *Carbon nanofoam* (nanoschiama di carbonio): è la quinta forma allotropica conosciuta del carbonio, costituita da mazzi di atomi di carbonio con diametro medio di 6 – 9 nm, interconnessi casualmente a formare una struttura simile al tessuto. È un solido poroso, estremamente leggero, che funziona da semiconduttore; ha proprietà magnetiche e contiene ferro e nichel come impurezze.
- *Quantum dots* (punti quantici): sono NP cristalline con proprietà legate alle dimensioni, dovute agli effetti del confinamento quantico sullo stato degli elettroni (ISO, 2009).

1.2 Caratteristiche chimico-fisiche e proprietà chimiche dei nanomateriali

La ricerca in questo campo si pone alcune questioni fondamentali, ossia se l'esposizione a NM e NP rappresenti un fattore di rischio per la salute dei lavoratori, e come le proprietà chimico-fisiche e chimiche influenzino tale rischio di esposizione.

Diversi studi hanno dimostrato che la presenza di NP e di nanoaerosol in vari ambiti lavorativi, di natura intenzionale (prodotte o manipolate) o sviluppate nell'ambito di emissioni involontarie durante particolari processi chimico-fisici, può comportare potenziali rischi per la salute e per la sicurezza dei lavoratori sulla base di evidenze sperimentali relative a correlazioni fra esposizioni e insorgenza di patologie che interessano, in particolare, il tratto respiratorio ed il sistema immunologico e nervoso (Marconi A, 2006; Ostiguy C et al, 2006).

Le ricerche, in particolare documentate attraverso studi su animali ed *in vitro*, hanno, infatti, posto in evidenza la possibilità di insorgenza di effetti nefrotossici, genotossici e sul sistema riproduttivo, nonché di granulomi e tumori al sistema polmonare (Oberdöster G et al, 1994; Borm P et al, 2004) e di traslocazione ad altri tessuti od organi (Oberdöster G et al, 2002; Oberdöster G et al, 2004) in relazione alle diverse caratteristiche chimico-fisiche delle NP. Tuttavia, allo stato attuale, a causa del numero limitato di studi, dei brevi periodi di esposizione, della differente composizione delle NP testate e, spesso, delle inusuali vie di esposizione negli ambienti di lavoro, molti aspetti di tale problematica richiedono ulteriori approfondimenti per un corretto approccio nella valutazione dell'esposizione professionale a NP.

Particolare attenzione deve essere, quindi, focalizzata sugli aspetti metrologici in quanto, sebbene diversi parametri (quali dimensioni, massa, composizione chimica, area superficiale, concentrazione, stato di aggregazione e di agglomerazione, solubilità in acqua e chimica superficiale, struttura morfologica) possano contribuire all'entità della pericolosità dell'interazione delle NP con l'organismo umano, ad oggi non risulta ancora opportunamente definita un'opinione univoca circa le specifiche relazioni con gli effetti tossici.

È quindi fondamentale, al fine di fissare opportuni limiti igienistici di riferimento per l'esposizione a NP per la messa a punto di adeguati sistemi di prevenzione e di protezione per i lavoratori e per l'ambiente, individuare in maniera univoca i parametri "corretti" da valutare in relazione agli aspetti della tossicità delle NP, ricorrendo, a supporto degli studi inerenti all'interazione biologica delle NP, ad un approccio metrologico multiparametrico, caratterizzato dall'utilizzo di opportune tecniche di campionamento e di analisi negli ambienti *indoor*.

La caratterizzazione chimico-fisica del particolato ultrafine è estremamente importante per distinguere tra NP naturalmente aerodisperse nell'ambiente o rilasciate occasionalmente quali sottoprodotti di reazioni termiche e chimiche, come, ad esempio, nei processi di stampa (He C et al, 2007; Kagi N et al 2007) o, più in generale, di combustione, e NP ingegnerizzate e nanoaerosol ingegnerizzati (*engineered nanoparticles* e *engineered nanoaerosol*) specificatamente prodotte/i e/o manipolate a livello industriale. Queste ultime, infatti, possiedono caratteristiche chimico-fisiche ben precise

che le distinguono dal resto del particolato ambientale (Oberdorster G et al 2005a). Sebbene molte delle proprietà chimico-fisiche delle nanoparticelle ingegnerizzate risiedano nel nucleo, di particolare interesse sono anche le proprietà della superficie o del guscio (*shell*), poiché rappresentano i punti con i quali gli organismi vengono immediatamente a contatto (Christian P et al, 2008).

Per quanto riguarda gli aspetti dimensionali, si è rilevato come questi influenzino notevolmente la deposizione delle NP (in particolare nel tratto respiratorio, soprattutto a livello alveolare), che risulta particolarmente elevata per particelle con raggio aerodinamico <100 nm (Oberdorster G et al, 2005a; ICRP 1994; ICRP, 2002; Bailey M, 1994). Inoltre, le NP possono entrare direttamente nelle cellule attraverso le membrane e traslocare, prevalentemente per diffusione, in altre zone del corpo (Oberdorster G et al, 2005a; BeruBe K, 2007; Card JW et al, 2008) eludendo i macrofagi alveolari e trasmigrando nell'interstizio polmonare, sebbene questo non sia stato definitivamente dimostrato sull'uomo (Oberdorster G et al, 2005a; BeruBe K, 2007; Card JW et al 2008; Oberdorster G et al, 2005b).

Se le dimensioni sono piccole, infatti, si possono creare nella particella piani cristallini discontinui, che fanno aumentare il numero di difetti strutturali e modificano notevolmente la configurazione elettronica del materiale (Nel A et al, 2006).

Lo stato di aggregazione o agglomerazione può influire sulla deposizione, sulla tossicità locale e sulla tossicocinetica delle NP, a causa di variazioni significative del raggio aerodinamico (maggiore nell'aggregato) e dell'area di superficie complessiva occupata dalle NP, che si riduce (Tsuji et al, 2006; Borm PJ et al, 2006); in tal modo, il comportamento di grandi aggregati di NP diviene assimilabile a quello di particelle fini *in vivo* (Tsuji et al, 2006; Borm PJ et al, 2006).

L'aggregazione/agglomerazione dipende, oltre che dalle proprietà intrinseche delle NP e dal loro numero, anche dalle proprietà del mezzo in cui esse si trovano (pH, forza ionica, materiale organico disciolto nel mezzo stesso) (Christian P et al, 2008). Il volume occupato e la massa diminuiscono al diminuire delle dimensioni, ma con un conseguente aumento dell'area di superficie per unità di massa e, pertanto, del potenziale per avere interazioni biologiche (Oberdorster G et al, 2005a; Borm PJ et al, 2006; Warheit DB, 2008). Quando la particella si riduce nelle dimensioni, infatti, la percentuale di atomi che si trova a livello superficiale aumenta in relazione a quella che occupa il resto del volume (Oberdorster G et al, 2005b; Nel A et al, 2006; Yang W et al, 2008). Questo può influenzare tanto la carica quanto la composizione superficiale e l'attività catalitica della superficie stessa, oltre ad aumentare il numero di potenziali gruppi reattivi sulla superficie cellulare (Card JW et al, 2008; Nel A et al, 2006; Warheit DB, 2008; Warheit DB et al, 2008; Nel AE et al, 2009). Come conseguenza, è ipotizzabile che i gruppi reattivi sulla superficie modifichino l'attività biologica della NP e

siano perciò rilevanti nel definirne la tossicità. A parità di composizione chimica, quindi, l'area di superficie per unità di massa appare un parametro estremamente rilevante nel definire la tossicità di una NP (Oberdorster G et al, 2005b).

La reattività superficiale dipende, inoltre, dalla composizione chimica stessa (presenza di gruppi reattivi sulla superficie), dalla carica superficiale (che influenza molto anche la deposizione delle particelle soprattutto a livello polmonare), dall'attività catalitica, dalla capacità di assorbimento e desorbimento di molecole, dalle imperfezioni dei cristalli e dalle impurezze (Oberdorster G et al, 2005a; Yang W et al, 2008; Nel AE et al, 2009; Aillon KL et al, 2009).

Anche la porosità contribuisce al significativo aumento dell'area di superficie totale, che si va ad aggiungere all'area di superficie geometrica (Powers KW et al, 2006a). Se in alcuni casi un'aumentata reattività superficiale (con una conseguente aumentata attività biologica) produce effetti positivi (per esempio, attività antiossidante, veicolazione e rilascio intracellulare di sostanze terapeutiche, grazie ad un'alta capacità di penetrazione della NP), in altri possono manifestarsi effetti tossici (per esempio, induzione di stress ossidativo e citotossicità) (Oberdorster G et al, 2005b; Nel A et al, 2006; Yang W et al, 2008; Limbach et al, 2007), in altri ancora effetti positivi e tossici contemporaneamente (Oberdorster G et al, 2005b; Yang W et al, 2008). Infine, la reattività superficiale risulta fondamentale nel definire le interazioni tra NP e macromolecole biologiche (proteine, elementi del citoscheletro, collagene, strutture di membrana, recettori, DNA, ecc.). In molti casi, quindi, le NP mostrano lo stesso potenziale infiammatorio citotossico di particelle più grandi, anche a parità di composizione chimica.

Le dimensioni e la chimica/reattività superficiale influenzano anche la tossicocinetica delle particelle dopo la loro deposizione a livello alveolare (Oberdorster G et al, 2005b; Powers KW et al, 2006a; Balbus JM et al, 2007).

Per entrare più in dettaglio, alcuni autori si soffermano in particolare su composizione chimica, carica ed energia superficiale: sebbene non sia ancora del tutto chiaro quanto la chimica del nucleo influenzi la tossicità di una NP, la composizione chimica della superficie può avere un effetto sull'aggregazione/agglomerazione, sull'assorbimento di biomolecole e perciò sulla dissoluzione, distribuzione, e biopersistenza *in vivo*. Allo stesso modo, la carica netta superficiale è fondamentale nel definire non solo l'interazione tra NP e molecole biologiche, ma anche la loro capacità di penetrazione attraverso le membrane cellulari. Le membrane cellulari sono cariche negativamente a pH fisiologico, e questo favorisce la penetrazione di NP cariche positivamente per via di interazioni elettrostatiche (Nel AE et al, 2009; Elder A et al, 2009). È stato, inoltre, supposto che una superficie cationica possa portare ad un incontrollato trasporto cationico nel lisosoma, con conseguente citotossicità (Xia T et al, 2009). Infine, superfici

a bassa energia (idrofobiche) vengono assorbite in modo aspecifico e possono favorire lo "srotolamento delle proteine" (*protein unfolding*). Inoltre, avendo proprietà "analoghe al surfactante" (*surfactant-like*), possono disorganizzare i componenti lipidici delle membrane cellulari ed aumentare la penetrazione epiteliale. Di contro, superfici ad alta energia (idrofiliche), in particolare quelle con bassa carica negativa o neutra, hanno bassa affinità con le proteine e limitano l'accumulo cellulare (Nel AE et al, 2009; Elder A et al, 2009). Il legame tra NP e proteine può generare complessi più mobili che possono accedere a siti tissutali normalmente inaccessibili. Inoltre, la denaturazione o degradazione delle proteine sulla superficie di NP può portare a modificazioni funzionali e strutturali, con possibile inibizione totale o parziale dell'attività enzimatica. Il fatto che le superfici delle NP siano idrofobiche o idrofiliche, lipofiliche o lipofobiche, cataliticamente attive o passive può avere un effetto importante sulla loro tossicità (Nel A et al, 2006, Nel AE et al, 2009; Dutta D et al, 2007).

In diversi casi, è possibile utilizzare dei rivestimenti per modificare le proprietà della superficie delle NP, sia per ridurne la reattività, sia per prevenire aggregazione ed agglomerazione, favorendone, quindi, la dispersione e mantenendone inalterate le proprietà di interesse. Tuttavia, la traslocazione delle particelle dal tratto respiratorio alla circolazione sistemica può essere accelerata, alterando la distribuzione delle NP nel corpo (Warheit DB, 2008; Carlotti ME et al, 2009; Clift MJ et al, 2008; Gupta AK et al, 2007, Leonov AP et al, 2008; Mancini MC et al, 2008; Nakano K et al, 2009; Okassa LN et al, 2007; Ryman-Rasmussen JP et al, 2007).

Per quanto riguarda gli aspetti inerenti alla solubilità o la biopersistenza (durabilità), si è rilevato che tali proprietà influiscono sia sulla definizione dell'organo bersaglio delle NP, sia sui meccanismi di *clearance* delle particelle, sia sulla tossicocinetica. Inoltre, la presenza di sostanze tossiche in NP altamente solubili, come alcuni metalli, può provocare un'esposizione diretta a ioni metallici con i conseguenti effetti tossici (Card JW et al, 2008; Borm PJ et al, 2006; Balbus JM et al, 2007; Borm P et al, 2006). Si parla anche di degradabilità: NM non degradabili possono accumularsi negli organi e nelle cellule, causando alterazioni biologiche a lungo termine. D'altra parte, i NM biodegradabili possono portare ad un'inattesa tossicità a causa di prodotti di degradazione tossici (Aillon KL et al, 2009).

Un altro parametro considerato fondamentale per definire la tossicità delle NP è la loro forma. Sebbene in generale l'effetto della forma sulla tossicità sia ancora largamente sconosciuto, così come quello della porosità, è noto, tuttavia, che quest'ultima può influire sulla deposizione e sull'assorbimento delle NP nel corpo.

Un discorso a parte meritano invece i materiali fibrosi (Oberdorster G et al, 2005a; Oberdorster G et al, 2005b). In particolare, l'esposizione a fibre è associata ad un aumentato rischio di fibrosi e cancro polmonare dopo esposizione prolungata, ed i parametri importanti per definire la tossicità di una fibra sono dose, dimensioni e biopersistenza. La

penetrazione a livello polmonare delle fibre è inversamente proporzionale al loro diametro. Questo è particolarmente rilevante per alcune NP di grande interesse industriale, quali i nanotubi. In diversi studi sugli animali, infatti, è stato osservato come l'esposizione a nanotubi provochi gli stessi effetti polmonari osservati per altre fibre notoriamente tossiche (quali l'asbesto), anche se si suppone che parte degli effetti sia provocata dalle impurezze metalliche (Al_2O_3 , Fe_2O_3 , TiO_2), presenti nei nanotubi come conseguenza della lavorazione necessaria per generarli (Oberdorster G et al, 2005a; Oberdorster G et al, 2005b).

In conclusione, alcuni autori riportano le principali caratteristiche chimico-fisiche che influenzano la tossicità delle NP (Tabella 1.1) indicando, in alcuni casi, la caratterizzazione minima necessaria affinché uno studio di tossicità *in vivo/in vitro* abbia un significato. Molti altri autori concordano sostanzialmente con i parametri riportati in tabella, distinguendo, in alcuni casi, anche le caratteristiche chimico-fisiche importanti sulla base della loro classificazione (Aillon KL et al, 2009; Ju-Nam Y and Lead JR, 2008; Lewinski N et al, 2008, Shulte PA et al, 2009). Altri autori presentano schemi in cui le proprietà chimico-fisiche sono immediatamente connesse alla tossicità (Nel A et al, 2006; Nel AE et al, 2009; Xia T et al, 2009; Fischer HC and Chan WCW, 2007). Sulla base di alcuni studi (Aillon KL et al, 2009; Murdock RC et al, 2008), l'European Agency for Safety and Health at Work (EU-OSHA), nella sua revisione della letteratura, indica i seguenti attributi che caratterizzano le NP: forma, area di superficie, chimica di superficie, composizione, omogeneità di composizione tra nucleo e superficie, eterogeneità della distribuzione della composizione, solubilità, carica (nei fluidi biologici), struttura cristallina, porosità, cambio nelle dimensioni e/o struttura dopo deposizione, rilascio di componenti costitutivi dopo deposizione, stimolo associato al comportamento, risposta funzionale all'ambiente.

Sulla base di questi attributi, pur ammettendo che non esiste un parametro fisico-chimico universale per caratterizzare la tossicità delle particelle nanostrutturate, l'Agenzia suggerisce, come test minimi da effettuare prima di uno studio di tossicologia, i seguenti parametri: dimensioni, distribuzione, area di superficie specifica, struttura cristallina, reattività superficiale, composizione superficiale, purezza (EU-OSHA, 2009).

Riportando anche i test suggeriti da Murdock et al., 2008 (Murdock RC et al, 2008), l'EU-OSHA propone altri possibili parametri interessanti nella caratterizzazione delle NP: forma, potenziale zeta, solubilità, potenziale idrofobico (EU-OSHA, 2009). È, pertanto, evidente che la completa caratterizzazione delle NP richiede l'utilizzo di tecniche talvolta sofisticate e non ancora completamente ottimizzate (Murdock RC et al, 2008; Ju-Nam Y and Lead JR, 2008; Hasselov M et al, 2008).

Per quanto riguarda l'identificazione e la caratterizzazione della specifica composizione chimica dei NM, risulta importante sottolineare alcuni aspetti di particolare ri-

Tabella 1.1 – Caratteristiche chimico-fisiche essenziali delle NP correlabili alla tossicità.	
<ul style="list-style-type: none"> • dimensioni delle particelle e loro distribuzione in stato umido e area di superficie (stato secco) nei mezzi utilizzati per l'esposizione • struttura cristallina/cristallinità • stato di aggregazione • composizione e rivestimento superficiale • reattività superficiale • metodo di sintesi e/o loro preparazione, incluse le modificazioni post-sintesi • purezza del campione 	Warheit, 2008, Murdock et al., 2008 Card JW et al, 2008
<ul style="list-style-type: none"> • dimensioni • forma • composizione chimica • cristallinità • proprietà superficiali (area, porosità, carica, modificazioni superficiali, presenza di rivestimenti) • stato di agglomerazione/aggregazione • biopersistenza • dose assorbita 	Oberdorster et al., 2005a,b
<ul style="list-style-type: none"> • numero di particelle e distribuzione delle dimensioni • dose a livello dell'organo bersaglio • trattamenti superficiali • livello di aggregazione/agglomerazione • carica superficiale • forma e/o potenziale elettrostatico di attrazione • metodo di sintesi (liquida o gassosa, modificazioni post-sintesi) 	Tsuji et al., 2006
<ul style="list-style-type: none"> • dimensioni e distribuzione delle dimensioni • forma • area di superficie • potenziale e proprietà redox • purezza/presenza di contaminanti • attività catalitica diversa dalla generazione di ROS 	Balbus et al., 2007
<ul style="list-style-type: none"> • numero di particelle e dimensioni • dose di superficie • rivestimenti superficiali • capacità di agglomerare/aggregare • carica superficiale • metodi di sintesi 	Borm et al., 2006
<ul style="list-style-type: none"> • stato di aggregazione • composizione elementare e concentrazione di massa • numero di particelle • forma • dimensioni e distribuzione delle dimensioni • solubilità • speciazione (metalli) • area di superficie e porosità • carica di superficie • chimica di superficie 	Tiede et al., 2008

Tabella 1.1 – Caratteristiche chimico-fisiche essenziali delle NP correlabili alla tossicità.

<ul style="list-style-type: none"> • dimensioni • forma • carica • stato di aggregazione • irregolarità superficiali • idrofobicità • presenza di rivestimenti o gruppi funzionali superficiali 	Xia et al. 2009
--	-----------------

levanza nella valutazione del rischio tossicologico ed ecologico.

Una completa caratterizzazione richiede, infatti, che, oltre alla struttura e alla composizione dei NM, vengano prese in considerazione ulteriori proprietà (peso molecolare, punto di ebollizione e di congelamento, pressione di vapore, coefficiente di partizione ottanolo-acqua, solubilità in acqua, reattività, stabilità); le informazioni inerenti alla formulazione e al metodo di preparazione del NM risultano importanti nel determinare il grado di purezza e la variabilità del prodotto, nonché, ovviamente, la performance e le prospettive di utilizzo.

La diversità e la complessità dei NM presenti in commercio contribuiscono a rendere l'identificazione e la caratterizzazione chimica aspetti di particolare rilievo. Una specifica tipologia di NM, infatti, può essere prodotta mediante processi differenti, ciascuno dei quali può generare derivati dello stesso materiale, con proprietà chimiche e chimico-fisiche diverse e, di conseguenza, proprietà tossicologiche ed ecologiche potenzialmente differenti (Oberdorster G et al 2005).

Le proprietà chimiche sopra menzionate potrebbero rivelarsi fondamentali nell'identificazione di una potenziale pericolosità associata ad un dato NM, sebbene, come già evidenziato, contribuiscano in maniera altrettanto rilevante la dimensione e la distribuzione dimensionale delle particelle, il rapporto superficie/volume, la forma, le caratteristiche elettroniche e superficiali, lo stato di dispersione/agglomerazione (Powers KW et al, 2006b) e la conduttività.

Sarà, pertanto, necessario disporre di un ampio spettro di informazioni circa le proprietà del NM in oggetto, la cui completa caratterizzazione permetterà di valutare in modo appropriato il rischio di esposizione e conseguentemente di predisporre misure di prevenzione e di protezione per la salute umana e per l'ambiente.

Si riportano in Tabella 1.2 alcuni esempi relativi alle principali proprietà chimiche, nonché ai settori di impiego di alcune tipologie di NM attualmente presenti in commercio ed evidenziati nell'ambito della problematica dei NM quali contaminanti emergenti dalla *U.S. Environmental Protection Agency (EPA) Federal Facilities Restoration and Reuse Office (FFRRO)* (EPA, 2009).

Tabella 1.2 – Proprietà chimiche ed utilizzo di NM ² .			
Tipologie di nanomateriali (NM)	Esempi	Proprietà chimiche	Impiego
A base di carbonio (naturali o ingegnerizzati)	<i>Fullereni/Buckyballs</i> (Carbonio 60, Carbonio 20, Carbonio 70); nanotubi di carbonio; <i>nanodiamonds</i> ; <i>nanowires</i> .	Stabili, limitata reattività, composti interamente da carbonio, forti antiossidanti.	Applicazioni biomediche, supercondensatori, sensori, fotovoltaici.
Ossidi metallici (naturali o ingegnerizzati)	TiO ₂ , ZnO, CeO ₂	Alta reattività, proprietà fotolitiche	Fotocatalizzatori, pigmenti, veicolazione di farmaci, diagnostica medica, profetori dai raggi UV nelle creme solari, additivi nei diesel
Metalli zero-valenti (ingegnerizzati)	<i>Nanoscale Zero-Valent Iron</i> (nZVI), <i>Emulsified Zero-Valent Iron</i> (EZVI), <i>Bimetallic Nanoscale Particles</i> (BNPs). I BNP includono ferro elementare ed un catalizzatore metallico (quale Au, Ni, Pa o Pt)	Alta reattività superficiale. Comuni materiali di partenza utilizzati nella produzione includono: sali ferrici (Fe [III]) o ferrosi (Fe [II]) con sodio boroidruro	Impieghi nelle acque, nei sedimenti e nei suoli per la riduzione di contaminanti quali nitrati, tricloroetilene e tetracloroetilene
Quantum dots (ingegnerizzati)	Quantum dots a base di CdSe, CdTe e ZnSe	Semiconduttori impaccati i cui eccitoni sono confinati in tutte e tre le dimensioni spaziali. Possibili strutture metalliche includono: CdSe, CdTe, CdSeTe, ZnSe, InAs, o PbSe, per il nucleo e CdS o ZnS per il guscio.	Diagnostica medica, fotovoltaici, telecomunicazioni e sensori
Dendrimeri (ingegnerizzati)	Polimeri iper ramificati; <i>dendrigrft polymers</i> e dendroni.	Altamente ramificati; polimeri multifunzionali	Rilascio di farmaci, sensori chimici, elettrodi modificati e agenti di trasferimento di DNA
NM composti (ingegnerizzati)	Caratterizzati da due differenti NM o NM combinati con <i>nanoclays</i> . Possono anche includere NM combinati con polimeri sintetici e resine.	Componenti multifunzionali; caratteristiche catalitiche	Potenziati applicazioni nel rilascio di farmaci. Utilizzati anche per ottimizzare proprietà meccaniche e dei ritardanti di fiamma.
NM di argento (ingegnerizzati)	Argento colloidale, fili di argento, polvere di nanoargento ed argento polimerico	Alta reattività superficiale, forti proprietà antimicrobiche	Applicazioni mediche, purificazione dell'acqua, impieghi come antimicrobici. Utilizzati in diversi prodotti commerciali.

² Materiale tratto da EPA, 2009. Emerging Contaminants-Nanomaterials Fact Sheet. EPA 505-F-09-011.

Bibliografia

- Aillon KL, Xie Y, El-Gendy N, Berklund CJ, Forrest ML. Effects of nanomaterial physicochemical properties on in vivo toxicity. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009;61:457-66.
- Bailey M. The New ICRP Model for the Respiratory Tract. *Radiat Prot Dosimetry* 1994;53:107-14.
- Balbus JM, Maynard AD, Colvin VL, Castranova V, Daston GP, Denison RA, et al. Meeting report: hazard assessment for nanoparticles-report from an interdisciplinary workshop. *Environ Health Perspect.* 2007;115:1654-9.
- Report 7/2003e; BIA-Workshop "Ultrafine aerosols at workplaces". Berufsgenossenschaftliches Institute für Arbeitsschutz - BIA- Germany.
- Borm P., Schins R., Albrecht C. Inhaled particles and lung cancer. Part B: Paradigm and risk assessment. *Int J Cancer* 2004; 110(1): 3-14
- Borm PJ, Robbins D, Haubold S, Kuhlbusch T, Fissan H, Donaldson K, et al. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECE-TOC. Part Fibre Toxicol. 2006;3:11.
- Borm P, Klaessig FC, Landry TD, Moudgil B, Pauluhn J, Thomas K, et al. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part V: role of dissolution in biological fate and effects of nanoscale particles. *Toxicol Sci.* 2006;90:23-32.
- Card JW, Zeldin DC, Bonner JC, Nestmann ER. Pulmonary applications and toxicity of engineered nanoparticles. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008;295:L400-11.
- Carlotti ME, Ugazio E, Sapino S, Fenoglio I, Greco G, Fubini B. Role of particle coating in controlling skin damage photoinduced by titanium nanoparticles. *Free Radic Res.* 2009;43:312-22.
- Christian P, Von der Kammer F, Baalousha M, Hofmann T. Nanoparticles: structure, properties, preparation and behaviour in environmental media. *Ecotoxicology.* 2008;17:326-43.
- Clift MJ, Rothen-Rutishauser B, Brown DM, Duffin R, Donaldson K, Proudfoot L, et al. The impact of different nanoparticle surface chemistry and size on uptake and toxicity in a murine macrophage cell line. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008;232:418-27.
- Dutta D, Sundaram SK, Teeguarden JG, Riley BJ, Fifield LS, Jacobs JM, et al. Adsorbed proteins influence the biological activity and molecular targeting of nanomaterials. *Toxicol Sci.* 2007; 100:303-15.
- Elder A, Vidyasagar S, DeLouise L. Physicochemical factors that affect metal and metal oxide nanoparticle passage across epithelial barriers. *Nanomed Nanobiotech.* 2009; 1:434-50.
- EPA. Nanotechnology White Paper. Environmental Protection Agency (EPA), USA; 2007.
- EPA. Emerging Contaminants-Nanomaterials Fact Sheet. EPA 505-F-09-011. September 2009:1 - 7
- EU-OSHA. Workplace exposure to nanoparticles. Madrid, Spain: European Agency for Safety and Health at Work (EU-OSHA); 2009.
- Feynman R. There's plenty of room at the bottom. 1959 Available from: www.its.caltech.edu/~feynman/plenty.html.
- Fischer HC and Chan WCW. Nanotoxicity: the growing need for in vivo study. *Curr Opin Biotech.* 2007;18:565-71.
- Gupta AK, Naregalkar RR, Vaidya VD, Gupta M. Recent advances on surface engineering of magnetic iron oxide nanoparticles and their biomedical applications. *Nanomed.* 2007;2:23-39.
- Hasselov M, Readman JW, Ranville JF, Tiede K. Nanoparticle analysis and characterization methodologies in environmental risk assessment of engineered nanoparticles *Ecotoxicology.* 2008;17:344-61.
- He C., Morawska L., Taplin L. Particle Emission Characteristics of Office Printers. *Environmental Sci. Technol.* 2007; 41: 6039– 45
- HSE. Nanoparticles: An occupational Hygiene review; Research Report 274: HSE Books. 2004;10. Health and Safety Executive (HSE), UK.
- Iavicoli S, Rondinone BM, Bocconi F. Occupational safety and health's role in sustainable, responsible nanotechnology: gaps and needs. *Hum Exp Toxicol.* 2009;28:433–43.
- ICRP. International Commission on Radiological Protection: human respiratory tract model for radiological protection, Publication 66 Ann ICRP. 1994;24 (Issues 1-3).
- ICRP. International Commission on Radiological Protection: guide for practical application of the ICRP human respiratory tract model: ICRP supporting guidance 3. Approved by ICRP committee 2 in October 2000. *Ann ICRP.* 2002;32 (issues 1-2).
- ISO. Workplace Atmospheres – Ultrafine, nanoparticle and nano-structured aerosol – Inhalation exposure characterization and assessment.

- International Standardization Organisation. ISO/TR 27628, 2007.
- ISO. Nanotechnologies. Terminology and definitions for nano-objects. Nanoparticle, nanofibre and nanoplat. UNI CEN ISO/TS 27687, 2010.
 - IRGC. White paper on nanotechnology governance. International Risk Governance Council (IRGC), Geneva, Jun 2006.
 - Ju-Nam Y and Lead JR. Manufactured nanoparticles: an overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. *Sci Total Environ.* 2008;400:396-414.
 - Kagi N Fujii S, Horiba Y, Namiki N, Ohtani Y, Emi H, Tamura H, kim YS. Indoor air quality for chemical and ultrafine particle contaminants from printers. *Build Environ.* 2007; 42(5): 1949 -54
 - Leonov AP, Zheng J, Clogston JD, Stern ST, Patri AK, Wei A. Detoxification of gold nanorods by treatment with polystyrenesulfonate. *ACS Nano.* 2008;2:2481-8.
 - Lewinski N, Colvin V, Drezek R. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small.* 2008;4:26-49.
 - Limbach LK, Wick P, Manser P, Grass RN, Bruinink A, Stark WJ. Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress. *Environ Sci Technol.* 2007;41:4158-63.
 - Mancini MC, Kairdolf BA, Smith AM, Nie S. Oxidative quenching and degradation of polymer-encapsulated quantum dots: new insights into the long-term fate and toxicity of nanocrystals in vivo. *J Am Chem Soc.* 2008;130:10836-7.
 - Marconi A. Particelle fini, ultrafini e nanoparticelle in ambiente di vita e di lavoro: possibili effetti sanitari e misura dell'esposizione inalatoria. *G Ital Med Lav Erg* 2006; 28(3): 258-65
 - Murdock RC, Braydich-Stolle L, Schrand AM, Schlager JJ, Hussain SM. Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique. *Toxicol Sci.* 2008;101:239-53.
 - Nakano K, Egashira K, Masuda S, Funakoshi K, Zhao G, Kimura S, et al. Formulation of nanoparticle-eluting stents by a cationic electrodeposition coating technology: efficient nano-drug delivery via bioabsorbable polymeric nanoparticle-eluting stents in porcine coronary arteries. *JACC Cardiovasc Interv.* 2009;2:277-83.
 - Nel A, Xia T, Madler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science.* 2006;311: 622-7.
 - Nel AE, Madler L, Velegol D, Xia T, Hoek EM, Somasundaran P, et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat Mater.* 2009;8:543-57.
 - NIOSH. Approaches to Safe Nanotechnology. Managing the Health and Safety Concerns Associated with Engineered Nanomaterials. National Institute of Occupational Safety and Prevention (NIOSH), USA. 2009.
 - NNI. What is Nanotechnology? National Nanotechnology Initiative (NNI), USA. 2006. Available from: http://www.nano.gov/html/facts/home_facts.html.
 - NNI. About the NNI. National Nanotechnology Initiative (NNI), USA. 2006. Available from: http://www.nano.gov/html/about/home_about.html.
 - NNI. Environmental, Health and Safety Research Needs for Engineered Nanoscale Materials. National Nanotechnology Initiative (NNI), USA. 2006. Available from: <http://www.nano.gov>.
 - Oberdöster G., Ferin J. Lehnert Be. Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury, *Environ Health Perspect* 1994;102 (Suppl 5):173-9.
 - Oberdöster G., Sharp Z., Atudorei V., Elder A., Gelein R., Lunts A., Kreyling W., Cox C. Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J. Toxicol Environ. Health A* 2002; 65(20): 1531-43.
 - Oberdöster G., Sharp Z., Atudorei V., Elder A., Gelein R., Lunts A., Kreyling W., Cox C. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal.Toxicol Environ. Health* 2004; 16(6-7): 437- 45.
 - Oberdorster G, Maynard A, Donaldson K, Castranova V, Fitzpatrick J, Ausman K, et al. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Part Fibre Toxicol.* 2005,2:8.
 - Oberdorster G, Oberdorster E, Oberdorster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect.* 2005;113:823-39.
 - OECD. List of manufactured nanomaterials and list of endpoints for phase one of the OECD testing programme ENV/JM/MONO. 2008;13. 2
 - Jun 2008. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Environment Directorate Joint Meeting of the Chemicals

- Committee and the Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology. Series on the safety of manufactured nanomaterials Number 6.
- Okassa LN, Marchais H, Douziech-Eyrolles L, Herve K, Cohen-Jonathan S, Munnier E, et al. Optimization of iron oxide nanoparticles encapsulation within poly(D,L-lactide-co-glycolide) sub-micron particles. *Eur J Pharm Biopharm.* 2007;67:31-8.
 - Ostiguy C., Lapointe G., Menard L., Cloutier Y., Trottier M., Boutin M., Antoun M., Normand C. Les nanoparticules: Etat des connaissances sur les risques en santé et sécurité du travail, rapport IRSST soumis, IRSTT. Montreal, Canada. 2006.
 - Powers KW, Brown SC, Krishna VB, Wasdo SC, Moudgil BM, Roberts SM.. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part VI. Characterization of nanoscale particles for toxicological evaluation. *Toxicol Sci.* 2006;90:296-303.
- Powers KW, Brown SC, Krishna VB, Wasdo SC, Moudgil BM, Robert SM. Research Strategies for safety Evaluation of nanomaterials, Part IV: characterization of Nanoscale Particles for toxicological Evaluation. *Toxicol Sci.* 2006; 90(29): 296-303.
- Preining O. The physical nature of very, very small particles and its impact on their behaviour. *Journal of Aerosol Science* 1998; 29: 481-95.
 - Roco MC. Nanoscale Science and Engineering: Unifying and Transforming Tools. *American Institute of Chemical Engineers Journal* 2004; 50(5): 890-7.
 - Roco MC. Societal implications of nanoscience and nanotechnology: Maximizing human benefit. *Journal of Nanoparticle Research* 2005; 7: 1-13.
 - Royal Society. Nanoscience and nanotechnologies. The Royal Society and Royal Academy of Engineering Nanotechnology, UK. July 2004.
 - Ryman-Rasmussen JP, Riviere JE, Monteiro-Riviere NA. Surface coatings determine cytotoxicity and irritation potential of quantum dot nanoparticles in epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2007;127:143-53.
 - Schulte PA, Schubauer-Berigan MK, Mayweather C, Geraci CL, Zumwalde R, McKernan JL. Issues in the development of epidemiologic studies of workers exposed to engineered nanoparticles. *J Occup Environ Med.* 2009;51: 323-35.
 - Taniguchi M. On the basic concept of nanotechnology. In Proceedings of the International Congress on Prod Eng. Tokyo, Japan: JSPE. 1974.
 - Thomas K and Sayre P. Research Strategies for Safety Evaluation of Nanomaterials, Part I: Evaluating the Human Health Implications of Exposure to Nanoscale Materials. *Toxicol Sci.* 2005;87(2):316-21.
 - Tiede K, Boxall ABA, Tear SP, Lewis J, David H, Hasselov M. Detection and characterization of engineered nanoparticles in food and the environment. *Food Add Contam.* 2008;25:795-821.
 - Tsuji JS, Maynard AD, Howard PC, James JT, Lam CW, Warheit DB, et al. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part IV: risk assessment of nanoparticles. *Toxicol Sci.* 2006;89:42-50.
 - Warheit DB. How meaningful are the results of nanotoxicity studies in the absence of adequate material characterization? *Toxicol Sci.* 2008;101:183-5.
 - Warheit DB, Sayes CM, Reed KL, Swain KA. Health effects related to nanoparticle exposures: environmental, health and safety considerations for assessing hazards and risks. *Pharmacol Ther.* 2008;120:35-42.
 - Xia T, Li N, Nel AE. Potential health impact of nanoparticles. *Annu Rev Public Health.* 2009;30:137-50.
 - Yang W, Peters JI, Williams III RO. Inhaled nanoparticles - A current review. *Int J Pharm.* 2008;356:239-47.

