

---

## capitolo 4

# Protocolli di acquisizione delle informazioni e metodi di caratterizzazione dell'esposizione a nanomateriali

Danilo Cottica (coordinatore), *Fondazione Salvatore Maugeri*

Stefano Bellucci, *INFN*

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

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

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

Elena Grignani, *Fondazione Salvatore Maugeri*

Ivo Iavicoli, *Università Cattolica del Sacro Cuore di Roma*

Achille Marconi, *ISS*

### 4.1 Identificazione delle fonti di aerodispersione

La produzione "volontaria" di nanomateriali (NM) destinati alle nanotecnologie viene realizzata attraverso due processi chimico-fisici diversi (INRS, 2007): il metodo "ascendente" (*bottom-up*) e quello "discendente" (*top-down*), già in precedenza definiti. Il primo è il frutto della ricerca nel campo delle nanotecnologie e consiste nel costruire i materiali desiderati assemblandoli dagli atomi secondo schemi predefiniti; il secondo è parte integrante dell'industria elettronica per la miniaturizzazione dei materiali e dei componenti. In termini dimensionali i due processi convergono nel campo delle nanoparticelle (NP). La "via ascendente" fa riferimento a processi di natura chimica e fisica mentre quella "discendente" comporta generalmente processi di tipo meccanico. Non sempre le NP sono il prodotto finale del ciclo tecnologico. Spesso la maggior parte delle NP presenti nell'ambiente di lavoro è associata alla formazione attraverso processi di nucleazione e condensazione partendo da aerosol precursori quali gas, liquidi e solidi. Questi processi possono individuarsi tra quelli che sviluppano e/o implicano elevata energia termica, quali: rifinitura e lavorazione dei metalli, applicazione mediante spray ad alta temperatura, varie applicazioni delle tecniche di saldatura, molatura e incisione dei metalli/leghe; i prodotti "indesiderati" che ne derivano sono particelle metalliche e/o di ossidi metallici di dimensioni nanoparticellari, ampia area superficiale specifica e spesso bassa solubilità.

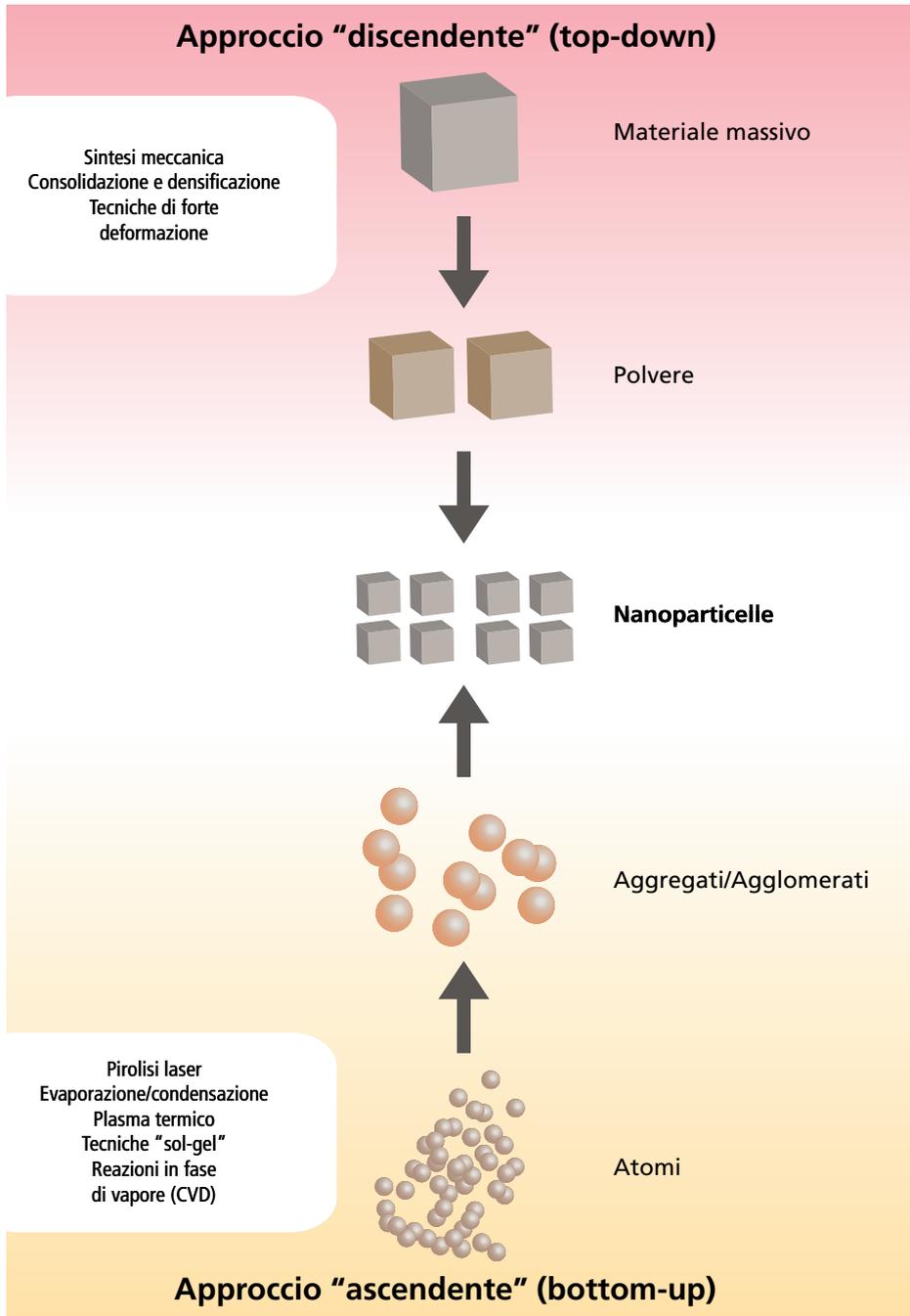


Figura 4.1 - Processi chimico fisici di formazione dei NM (INRS, 2007).

Anche i classici processi di combustione portano alla formazione di NP attraverso reazioni in fase vapore e di nucleazione/condensazione.

Le caratteristiche delle particelle che si generano da questi processi dipendono dalle condizioni chimico-fisiche in cui tali processi avvengono. Tuttavia, le particelle primarie hanno generalmente un diametro compreso fra 10 nm e 50 nm e coagulano rapidamente in funzione della maggior concentrazione nel punto d'origine fino a raggiungere dimensioni superiori a quelle definite per le NP.

Particelle generate da sorgenti puntuali, ad alta temperatura e concentrazione – quali ad esempio i fumi di saldatura – sono destinate ad una rapida condensazione già a breve distanza dalla sorgente per cui, al fine della valutazione della potenziale

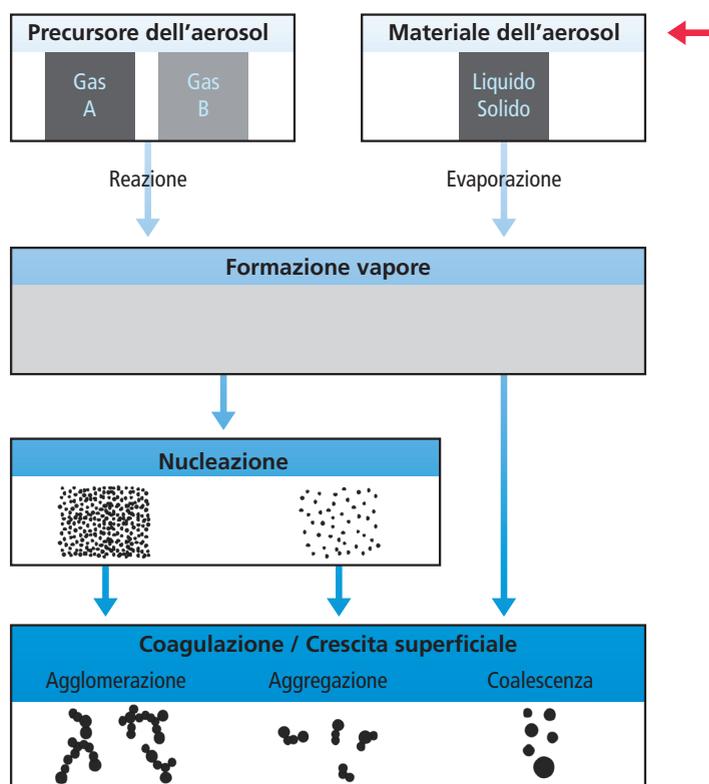


Figura 4.2 - Processi di formazione delle NP (BIA, 2003).

esposizione a NP, diventerà fondamentale definire ad esempio la posizione delle vie respiratorie dell'operatore rispetto alla sorgente e di conseguenza la posizione del substrato di campionamento. Al contrario, in sorgenti "diffuse", con temperature alla sorgente relativamente più basse quali la rifinitura dei metalli/leghe, si avrà una rapida diminuzione del processo di coagulazione, con la conseguenza che le particelle nanometriche generate saranno in grado di mantenere le loro caratteristiche dimensionali e di aerodispersarsi maggiormente, con più possibilità d'interessare le vie respiratorie dell'operatore e/o di altre persone nelle vicinanze.

Un altro gruppo di processi termici che portano alla generazione di aerosol aventi un'elevata area superficiale specifica riguarda la formazione del nero di carbone (carbon black), le NP di TiO<sub>2</sub>, i fumi da vaporizzazione di allumina e silice. Spesso questi processi generano particelle agglomerate di dimensioni superiori a quelle delle NP (maggiori di 100 nm), che tuttavia sono caratterizzate da un'area superficiale specifica superiore a 300 m<sup>2</sup>/g. Nello stesso gruppo vanno annoverati materiali, prodotti per via umida ma utilizzati come polveri secche, quali il nero di rutenio, il nero di palladio ed alcuni tipi di TiO<sub>2</sub>

#### 4.1.1 Processi di fabbricazione di nano-oggetti o NM

Attualmente i processi tecnologici che consentono la fabbricazione di oggetti/NM possono essere riassunti come in Tabella 4.1.

Tabella 4.1 - Processi di formazione delle NP	
Categoria	Tipo di Processo
Per via fisica	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Evaporazione/condensazione</li> <li>• Ablazione laser</li> <li>• Scarica elettrica</li> <li>• Fiamme di combustione</li> <li>• Pirolisi mediante laser</li> <li>• Microonde</li> <li>• Irraggiamento ionico o elettrochimico</li> <li>• Decomposizione catalitica</li> <li>• Deposizione in fase vapore (deposizione fisica in fase vapore)</li> </ul>
Per via chimica	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reazione in fase vapore (<i>deposizione chimica in fase vapore</i>)</li> <li>• Reazioni in fase liquida: co-precipitazione chimica, idrolisi, ecc.</li> <li>• Reazioni in fase solida</li> <li>• Fluidi supercritici con reazione chimica</li> <li>• Tecniche in soluzione/gel: a base di silice, ossidi di metalli</li> </ul>
Per via meccanica	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Frantumazione ad alta energia o sintesi meccanica</li> <li>• Saldatura</li> <li>• Tecniche di deformazione ad alta energia meccanica: torsione, frizione, laminazione, ecc.</li> </ul>

Tali processi comportano i rischi di potenziale esposizione riassunti in Tabella 4.2.

Tabella 4.2 - Rischi di potenziale esposizione nei processi produttivi intenzionali di NP			
Processi di sintesi	Formazione delle particelle	Rischi potenziali di inalazione	Rischio cutaneo potenziale rischio di ingestione
Da fase gassosa	In aria	Dispersione diretta dal reattore; Recupero del prodotto; Lavorazioni successive al recupero e imballaggio	Contaminazione da particelle aerodisperse nell'ambiente di lavoro; Manipolazione del prodotto Pulizia / manutenzione dell'impianto
Da fase vapore	Sul substrato	Recupero del prodotto Lavorazioni successive al recupero e imballaggio	Contaminazione da polveri asciutte nell'ambiente di lavoro; Manipolazione del prodotto Pulizia / manutenzione dell'impianto
Colloidale	Sospensione liquida	Essiccamento del prodotto Lavorazione e travaso	Travaso/ Contaminazione dell'ambiente di lavoro; Manipolazione del prodotto Pulizia / manutenzione dell'impianto
Attrito meccanico	Sospensione liquida	Essiccamento del prodotto Lavorazione e travaso	Travaso/ Contaminazione dell'ambiente di lavoro; Manipolazione del prodotto Pulizia / manutenzione dell'impianto

#### 4.1.2 Fonti di aerodispersione di NP

Nella Tabella 4.3 sono riportati esempi individuati dall'*International Standardization Organisation* (ISO) di potenziali fonti d'esposizione a NP in termini di cicli tecnologici/attività che ne comportano la formazione anche non intenzionale (ISO/TR, 2007):

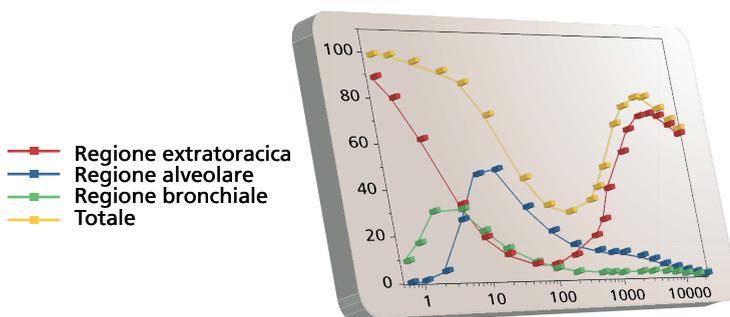
Tabella 4.3 - Fonti di aerodispersione di NP	
Processo	Fonte/attività specifica
Processi a caldo	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Raffinazione dei metalli</li> <li>• Fusione dell'acciaio</li> <li>• Galvanica</li> <li>• Taglio metalli mediante torcia termica</li> <li>• Rivestimento mediante spray termico</li> <li>• Applicazione di cere a caldo</li> <li>• Fusione dell'alluminio</li> <li>• Fusione del ferro</li> <li>• Saldatura</li> <li>• Taglio metalli mediante laser</li> <li>• Cottura</li> </ul>
Combustione	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Motori diesel</li> <li>• Motori con combustibili gassosi</li> <li>• Impianti di riscaldamento a gas</li> <li>• Motori a benzina</li> <li>• Inceneritori</li> </ul>
Aerosol negli ambienti indoor	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Formazione di aerosol per reazione fra emissioni in fase gas/vapore da macchine d'ufficio, materiali per la pulizia</li> </ul>
Processi meccanici	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Processi di rettifica, molatura, affilatura, levigatura e lavorazioni con utensili in genere</li> <li>• Trapanatura ad alta velocità</li> </ul>
Generazione di particolato da processi a fiamma	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Produzione di nero di carbone (<i>carbon black</i>)</li> <li>• Produzione di silice vaporizzata</li> <li>• Produzione di TiO<sub>2</sub> ultrafine</li> <li>• Produzione di allumina vaporizzata</li> </ul>
Manipolazione materiali	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Manipolazione di polveri di nanoparticelle</li> <li>• Manipolazione di depositi colloidali secchi</li> </ul>
Nanotecnologie	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Produzione di nanotubi</li> <li>• Manipolazione ed uso di nanoparticelle precostruite</li> <li>• Produzione in fase gassosa di nanoparticelle precostruite</li> <li>• Aerosol di sospensioni, soluzioni e miscele di nanoparticelle precostruite</li> </ul>

## 4.2 Potenziali vie di esposizione

Esistono quattro vie principali attraverso le quali i lavoratori possono essere esposti ai NM: inalatoria, cutanea, olfattiva e ingestiva.

### 4.2.1 Inalazione

La via di esposizione più comune alle particelle aerodisperse negli ambienti lavorativi è quella inalatoria. Come avviene per altri tipi di particelle, la deposizione di NP nel tratto respiratorio è determinata dal loro diametro. Gli agglomerati di NP si depositeranno in funzione del diametro dell'intero agglomerato e non di quello delle singole NP costituenti. Conformemente al modello di deposizione accreditato (ICRP, 1994) è prevista una sostanziale deposizione in tutte le diverse regioni polmonari, in modo predominante nella regione alveolare, ma anche nelle regioni tracheobronchiale ed extra-toracica (Figura 4.3) (ISO, 2008; Yeh HC et al. 1996).



**Figura 4.3** – Probabilità di deposizione totale e regionale delle particelle nel tratto respiratorio umano in funzione delle loro dimensioni sulla base del modello ICRP 66. La frazione depositata include la probabilità delle particelle inalabili (inalabilità). Viene considerato un soggetto che respira con il naso e svolge un lavoro standard.

Occorre, altresì, considerare che, a seguito della deposizione, il destino delle NP dipende dalla loro biopersistenza (durabilità), e dal loro potenziale di traslocazione ad altri organi e tessuti. Sono tuttora in corso ricerche per determinare i fattori che regolano tali fenomeni ed i meccanismi che contribuiscono all'agglomerazione e de-agglomerazione delle NP, nonché il loro ruolo nell'attività tossica dopo l'inalazione (Maynard AD and Kuempel ED, 2005).

L'*International Commission on Radiological Protection* (ICRP) ha di recente aggiornato e commentato i modelli di deposizione delle particelle nelle vie aeree in base al loro diametro aerodinamico, distinguendo 5 aree: 1) regione extratoracica 1 (RE1) che comprende il naso anteriore; 2) regione extratoracica 2 (RE2) che comprende il passaggio nasale posteriore, bocca, laringe e faringe; 3) regione bronchiale 1 (RB1) che comprende trachea e bronchi; 4) regione bronchiale 2 (RB2) che comprende bronchioli e bronchioli terminali; 5) regione alveolare-interstiziale (RA) (ICRP, 1994; ICRP, 2002; Bailey MR et al, 2003). Utilizzando il modello *Activity Median Thermodynamic Diameter* (AMTD), che basa le sue ipotesi partendo dall'assunto che la deposizione delle particelle con diametro aerodinamico minore di 100 nm avvenga prevalentemente per diffusione, l'ICRP ha calcolato la percentuale di deposizione delle NP fissando parametri sperimentali al contorno per applicare il modello, qui riassunti:

- Distribuzione log-normale del diametro delle particelle;
- Densità 3 g/cm<sup>3</sup>; la densità comunque influisce poco sulla deposizione delle NP.
- Fattore di forma 1.5, ossia particelle compatte, irregolari e non sferiche.

In Tabella 4.4 è riportata la deposizione in percentuale nei diversi comparti, considerando i lavoratori in due diverse condizioni: attività lavorativa normale (flusso=1.2 m<sup>3</sup>/h) ed intensa (flusso 1.7 m<sup>3</sup>/h) e con due diversi tipi di respirazione: nasale e buccale.

Tabella 4.4 - Percentuale di deposizione delle NP nei diversi compartimenti delle vie aeree secondo il modello ICRP						
Lavoratore flusso normale (1.2 m <sup>3</sup> /h) – Respirazione per naso - Respirazione per bocca						
D.A (nm)	RE1 (%)	RE2 (%)	RB1 (%)	RB2 (%)	RA (%)	Totale (%)
5	16.0 – 7.5	18.0 – 18.0	5.6 – 6.2	26.0 – 30.0	27.0 – 30.0	92.0 – 91.0
10	8.7 – 4.2	9.8 – 9.9	3.0 – 3.2	19.0 – 20.0	47.0 – 50.0	88.0 – 87.0
20	5.3 – 2.6	5.9 – 6.0	1.8 – 1.8	12.6 – 13.0	49.0 – 50.0	74.0 – 73.0
50	3.2 – 1.5	3.4 – 3.4	1.0 – 1.0	7.2 – 7.4	31.0 – 32.0	46.0 – 45.0
100	3.2 – 1.2	3.2 – 2.4	0.8 – 0.8	4.8 – 4.8	21.0 – 21.0	33.0 – 30.0
Lavoratore flusso forzato (1.7 m <sup>3</sup> /h) – Respirazione per naso -Respirazione per bocca						
D.A (nm)	RE1 (%)	RE2 (%)	RB1 (%)	RB2 (%)	RA (%)	Totale (%)
5	14.0 – 6.3	17.0 – 17.0	4.8 – 5.4	26.0 – 28.0	32.0 – 35.0	92.0 – 92.0
10	7.6 – 3.6	9.6 – 9.6	2.6 – 2.8	17.2 – 18.2	51.0 – 54.0	88.0 – 88.0
20	4.7 – 2.2	5.8 – 5.8	1.5 – 1.6	11.4 – 11.8	50.0 – 51.0	74.0 – 73.0
50	2.8 – 1.3	3.3 – 3.4	0.9 – 0.9	6.4 – 6.6	31.0 – 32.0	45.0 – 44.0
100	2.9 – 1.1	3.2 – 2.4	0.7 – 0.7	4.2 – 4.2	20.0 – 21.0	31.0 – 29.0

Partendo dal presupposto che tra le condizioni ci sono variazioni anche significative (nella respirazione buccale la deposizione in RE1 è chiaramente inferiore che nella respirazione nasale), prendiamo in considerazione la respirazione nasale ad attività lavorativa normale per spiegare in dettaglio i risultati.

Le particelle assai piccole (5 nm) si depositano ad alte percentuali (92%) più o meno lungo tutte le vie aeree: 34% nella regione extratoracica (RE1+RE2), 31.6% nella regione bronchiale (RB1+RB2) e 27% in RA. A 10 nm si ha un leggero calo della deposizione totale (88%), ma aumenta la deposizione alveolare rispetto alle altre due frazioni. Questo fenomeno diventa man mano più evidente quando aumenta il diametro aerodinamico fino a 100 nm, dove la deposizione totale scende al 33%, di cui il 21% alveolare. In sostanza, quindi, la componente alveolare diviene man mano preponderante all'aumentare delle dimensioni, pur diminuendo la deposizione totale. Sulla base di questi dati, quindi, l'interazione tra NP e basse vie aeree è forse la più rilevante dal punto di vista tossicologico. C'è infine da sottolineare che, poiché i modelli di deposizione dipendono dalle dimensioni, si presume che NP strutturate e particelle ultrafini non strutturate abbiano percentuali di deposizione comparabili. Può invece variare l'interazione tra le NP e i sistemi biologici in base alle specifiche caratteristiche chimico-fisiche delle NP (vedi Capitolo 1, paragrafo 1.2).

Il modello non è ovviamente valido per le nanofibre, poiché la lunghezza può essere anche di diversi micron. In questi casi, la deposizione è altamente dipendente dal tipo di fibra ed esistono prevalentemente modelli animali di deposizione (Szoke R et al, 2007; Lentz TJ et al 2003; Warheit DB et al, 1994; Coin PG et al, 1992; Tanaka I et al, 1994; Yamato H et al 1994).

Nonostante l'accumulo cellulare, la tossicità e la tossicocinetica delle NP strutturate inalate dipendano altamente dalle specifiche caratteristiche chimico-fisiche delle particelle stesse, si possono individuare alcune caratteristiche comuni utili per definire l'interazione tra polmoni e NP (Yang W et al, 2008). Inizialmente, le particelle vengono incorporate nel fluido che ricopre la superficie epiteliale alveolare, *epithelial lining fluid* (ELF), con un'efficienza inversamente proporzionale alle dimensioni (Geiser M et al, 2003), senza che per questo il film formato dal surfactante venga destabilizzato (Stuart D et al, 2006). Le particelle più solubili si dissolvono *in situ*. Le molecole insolubili nel muco e nel *lining fluid*, d'altra parte, non sono assorbite rapidamente, ma possono subire una traslocazione fisica, in base alla regione dove sono depositate (Oberdorster G et al, 2005) e ai sistemi difensivi dell'organismo. Diversi meccanismi possono quindi attivarsi: trasporto mucociliare, fagocitosi da parte dei macrofagi ed endocitosi (Gumbleton M, 2001; Arredouani M et al 2004).

Il trasporto mucociliare è efficiente prevalentemente nelle alte vie aeree (Heyder J et al, 1986), mentre fagocitosi ed endocitosi sono i meccanismi prevalenti di trasporto

delle particelle depositate negli alveoli (Sibille Y and Reynolds HY, 1990). Se le microparticelle sono rimosse dai macrofagi con alta efficienza, le particelle di diametro aerodinamico  $<0.26 \mu\text{m}$  possono eludere il sistema macrofagico grazie alle loro piccole dimensioni (Chono S et al, 2006; Lauweryns JM and Baert JH, 1977). Per questa ragione, le NP arrivano ad interagire facilmente con le cellule dell'epitelio (Nel A et al, 2006). Si pensa che il fenomeno prevalente di endocitosi sia in tale sede il trasporto attraverso caveole, anche se questo fenomeno deve essere ancora dimostrato in vivo (Rejman J et al, 2004). Le caveole sono micro-domini delle membrane cellulari contenenti caveolina-1, ampiamente espressi dai capillari dei polmoni e dalle cellule alveolari di tipo I. Le caveole trasportano macroparticelle e particelle con diametro dell'ordine dei nanometri dai polmoni al sangue (Oberdorster G et al, 2005; Rejman J et al, 2004). L'espansione inspiratoria e la contrazione espiratoria degli alveoli polmonari può portare all'apertura e alla chiusura delle caveole (aperture di 40-100 nm), giustificando così il trasporto assistito di macromolecole/NP attraverso la membrana alveolare ed il passaggio delle NP attraverso la barriera alveolo-capillare (Patton JS, 1996) e l'accumulo di particelle nell'interstizio (Semmler-Behnke M et al 2007; Brown JS, et al, 2002). Tuttavia, non c'è accordo tra studi che si sono occupati della traslocazione extra-polmonare delle NP e non è ancora chiaro in che misura le NP inalate raggiungano la circolazione sistemica e di conseguenza altri organi (Card JW, et al, 2008). È infine possibile anche il trasporto attraverso i pori ed è stato dimostrato che l'accumulo di NP all'interno delle cellule non avviene necessariamente solo per endocitosi, ma anche per diffusione ed interazioni adesive (Geiser M et al, 2005).

#### 4.2.1.1 Definizione dei Valori Limite di Soglia

Un ulteriore punto della tematica sul quale focalizzare l'attenzione è legato alle incertezze nell'individuazione di eventuali differenze o analogie riscontrabili nell'impatto biologico di NP che si depositano nel sistema respiratorio rispetto a quello di agglomerati o aggregati contenenti lo stesso volume di materiale che subiscono processi di de-agglomerazione o disaggregazione dopo la deposizione. Così come viene evidenziato anche dalla Norma ISO/TR 27628 (ISO/TR, 2007), se la risposta biologica è associata con l'area superficiale dell'aerosol depositato, per un dato volume di materiale la risposta all'agglomerato/aggregato con una struttura aperta simil-frattale sarà presumibilmente simile a quella di una dose equivalente di particelle discrete. D'altra parte se le interazioni biologiche che seguono la deposizione sono governate dal diametro delle particelle, è verosimilmente ipotizzabile che la risposta a NP discrete che si depositano nel tratto respiratorio differirà da quella di una dose equivalente di particelle agglomerate/aggregate che non si separano nella fase di deposizione.

Sulla base di tali premesse è opportuno evidenziare che la definizione di standard normativi di riferimento dovrà considerare alcuni aspetti fondamentali: in particolare i Valori Limite di esposizione professionale dovranno tenere conto in maniera globale sia di NP discrete, sia di agglomerati/aggregati di NP nel caso in cui si riscontri una similitudine negli effetti sulla salute derivanti dall'esposizione (in relazione ad una possibile indipendenza dalle caratteristiche dimensionali delle particelle che si depositano); nel caso contrario dovranno invece necessariamente essere fissati limiti igienistici differenziati.

#### 4.2.2 Contatto cutaneo

Negli ambienti lavorativi si può verificare esposizione ai NM per contatto cutaneo durante la loro produzione o utilizzo o per contatto con superfici contaminate. È tuttora oggetto di discussione se e di quanto le NP siano in grado di penetrare nella cute intatta e di causare effetti dannosi. La maggior parte degli studi sperimentali è stata realizzata con singoli tipi di NM, come  $\text{TiO}_2$  e  $\text{ZnO}$  su cute intatta. È stato, inoltre, dimostrato l'assorbimento cutaneo di nanoAg su cute danneggiata (Larese, 2009) e di nanoAu su cute di ratto (Sanovane, 2009).

Gli eventuali effetti sotto lo sforzo di flessione della cute e la penetrazione attraverso la cute danneggiata necessitano ancora di accurata esplorazione (Tinkle SS et al, 2003; Nohynek GJ et al, 2007; Crosera M et al, 2009). La stessa situazione si riscontra nel caso del possibile ruolo dei solventi nel meccanismo di penetrazione cutanea da parte delle NP.

#### 4.2.3 Altre vie d'esposizione

In letteratura, sono riportate altre due possibili vie di esposizione: attraverso il sistema olfattivo e attraverso il tratto gastro-enterico.

Per via dei modelli di deposizione nelle vie aeree presentati nel paragrafo precedente, è evidente come una percentuale non trascurabile di NP, soprattutto se piccole (diametro aerodinamico minore di 50 nm), possa depositarsi nelle alte vie aeree ed in particolare nella mucosa olfattiva. Questa deposizione può giustificare l'assorbimento di NP nel sistema nervoso centrale per passaggio nei nervi olfattivi (Oberdorster G et al, 2004; Elder A et al, 2006). Tale passaggio, tuttavia, dipende enormemente dalle proprietà chimico-fisiche delle particelle e dalla variabilità inter-specie (Oberdorster G et al, 2005) e al momento non è ancora stata dimostrata in vivo sull'uomo.

NM in forma di particelle, d'altra parte, possono essere ingeriti deglutendo il muco che incorpora e ripulisce le NP depositate lungo il tratto respiratorio, nonchè per assunzione

di cibi ed acqua contaminati oppure per contatto orale con mani e superfici contaminate (Lomer MC et al, 2002; Tiede K et al, 2008). Diversi studi sui ratti hanno dimostrato che particelle tra 50 nm e 20  $\mu$ m possono essere assorbite attraverso le placche di Peyer del piccolo intestino, nonostante esse coprano solo una piccola porzione del piccolo intestino stesso (Jani P et al, 1990; O'Hagan DT, 1996; Gullberg E et al, 2006), ma si suppone anche le NP possano essere assorbite dagli enterociti intestinali (Carr KE et al, 1996; Hillyer JF and Albrecht RM, 2001; Des Rieux A et al, 2006). Fattori chimico-fisici che possono influire sul processo di assorbimento intestinale (*persorption*) sono la carica e ovviamente le dimensioni delle NP (Jani P et al, 1990; Florence AT, 1997; Hussain N et al, 2001; Gaumet M et al, 2009). Anche in questo caso, studi sull'uomo sono praticamente assenti (Des Rieux A et al, 2006).

### 4.3 Rassegna dei metodi per la caratterizzazione dell'esposizione inalatoria a nanomateriali.

La presenza dei NM ingegnerizzati nei luoghi di lavoro e nell'ambiente generale rappresenta un'immediata sfida su come gestire effettivamente la salute e la sicurezza negli ambienti di vita e di lavoro. Ancora poco è conosciuto su quali possano essere i rischi immediati o come gestirli e ancora meno su come sia possibile prevedere e gestire i rischi da queste nuove tecnologie nei prossimi anni (Maynard, 2007). Questo può essere attribuito al recente sviluppo del settore delle nanotecnologie, oltre che alla carenza di informazioni sull'esposizione umana e sulle condizioni lavorative. In particolare le nostre capacità di misurare l'esposizione a NM negli ambienti di lavoro sono limitate dalla tecnologia corrente. Al momento, infatti, si riscontrano molte lacune riguardo all'identificazione, alla caratterizzazione ed alla valutazione della potenziale esposizione lavorativa nel settore delle nanotecnologie a causa delle scarse informazioni inerenti agli aspetti metrologici (quali dimensioni, massa, composizione chimica, area superficiale, concentrazione, stato di aggregazione e di agglomerazione, solubilità in acqua e chimica superficiale) che possono concorrere a determinare il grado di tossicità e la pericolosità dell'interazione dei NM con l'organismo umano e che portano, di conseguenza, alla mancata individuazione di valori limite igienistici di riferimento.

La determinazione simultanea di più caratteristiche richiede pertanto l'impiego contemporaneo di apparecchiature multiple e, inoltre, sebbene i più recenti sviluppi della tecnologia offrano strumentazioni in grado di misurare gran parte dei parametri considerati maggiormente significativi, le caratteristiche di questi strumenti non ne consentono l'uso personale. In attesa dello sviluppo di strumentazione personale in grado di fornire la misura dei parametri appropriati, applicabile al monitoraggio sistematico dell'esposizione, è necessario operare disegnando un'idonea strategia di campiona-

mento che tenga conto delle limitazioni interpretative per una stima dell'esposizione basata su campionamenti di area (Marconi, 2007).

Una buona parte delle informazioni riportate è basata sulla documentazione in corso di preparazione da parte del *National Institute for Occupational Safety and Health* (NIOSH) (NIOSH, 2008) e del *Working Party on Nanomaterials* (WNPM) dell'*OECD, Steering Group 8 (SG8)*.

Poiché attualmente non esistono valori limite di esposizione occupazionali per i NM (con l'eccezione del nero di carbone in Giappone), per affrontare il problema della valutazione dell'esposizione occorre adottare un approccio basato su di una valutazione qualitativa (o semi-quantitativa) in grado di determinare l'esistenza di un rilascio di NM durante le fasi del processo produttivo.

Tale sistema di valutazione è imperniato sul confronto tra le concentrazioni di particelle vicino al punto di emissione e le concentrazioni di fondo. Benché i risultati di questa valutazione non possano essere interpretati come rappresentativi dell'esposizione personale, essi forniscono una determinazione semi-quantitativa del rilascio di NM nell'ambiente di lavoro e possono essere utilizzati vantaggiosamente dagli esperti sanitari e della sicurezza, e dagli igienisti industriali. L'ottenimento di questi risultati, infatti, consente di effettuare una stima semi-quantitativa dell'esposizione personale (Koshi, 1980) che può orientare la scelta nella selezione di appropriate tecniche di mitigazione dell'esposizione (ad esempio per la protezione cutanea) (Wendel-de-Joode, 2003). La loro acquisizione, inoltre, permette di determinare se le misure di prevenzione esistenti siano adeguate al controllo delle emissioni o se siano necessari ulteriori controlli.

Diversi paesi in questi ultimi anni hanno dato inizio ad indagini per la determinazione dell'esposizione negli insediamenti produttivi in cui sono utilizzate le nanotecnologie, sviluppando specifici protocolli di valutazione. Negli Stati Uniti, il NIOSH ha organizzato gruppi operativi per la valutazione dei processi lavorativi, dei materiali e delle tecnologie di controllo associati alle nanotecnologie fin dal 2006<sup>1</sup> (Methner, 2007; Methner, 2008). Queste iniziative hanno consentito una generale valutazione della strumentazione in grado di fornire la caratterizzazione dei NM negli ambienti di lavoro e la preparazione di indicazioni per la valutazione delle emissioni che permettono di caratterizzare semi-quantitativamente i luoghi di lavoro dove può verificarsi il rilascio di NM (NIOSH, 2007; NIOSH, 2008).

A livello europeo sono state attivate numerose iniziative di studio che spaziano dall'identificazione delle sorgenti di NM, alla caratterizzazione delle NP, al campionamento ed alla misura in tempo reale, alla determinazione dell'esposizione inalatoria e cutanea, allo studio del comportamento aerodinamico dei NM (adesione, coagula-

<sup>1</sup> [www.cdc.gov/niosh/docs/2008-121/](http://www.cdc.gov/niosh/docs/2008-121/) ; [www.cdc.gov/niosh/docs/2008-120/](http://www.cdc.gov/niosh/docs/2008-120/)

zione, aggregazione e/o agglomerazione), fino alle strategie e tecniche per la valutazione della distinzione tra contributo del fondo rispetto alle specifiche emissioni di NM. Maggiori e più aggiornate informazioni su queste attività sono reperibili nelle presentazioni dei vari progetti di ricerca europei (NANOSAFE2, NANOSH, NANOTRANSPORT, NANODEVICE, IMPART, etc.) descritti nel Capitolo 3 della presente trattazione.

L'ISO ha predisposto importanti documenti informativi ed orientativi per la valutazione e la gestione dei rischi potenzialmente associati all'uso dei NM negli ambienti lavorativi, nei quali viene affrontato il tema della valutazione e della misura dell'esposizione occupazionale a NP, aerosol nanostrutturati e a NP ingegnerizzate (ISO/TR, 2007; ISO/TR, 2008; ISO/NP TS, 2008), nonché esaminati gli aspetti inerenti alla terminologia (UNI CEN ISO/TS, 2010; ISO/DTS, 2010). Negli USA, già nel 2007 l'*American Society of Testing Materials* (ASTM) ha pubblicato una guida per la manipolazione dei NM negli ambienti lavorativi (ASTM, 2007).

Finché non saranno disponibili informazioni sui meccanismi di azione biologica associati ai NM, non vi sarà certezza sulla più appropriata tecnica di misura per determinare l'esposizione lavorativa. Sulla base delle conoscenze disponibili, numerosi sono i parametri con potenziale rilievo sanitario che occorrerebbe conoscere per caratterizzare l'esposizione ai NM.

Per la valutazione dell'esposizione e della dose, oltre alle informazioni tradizionali sulla massa e la sua caratterizzazione, sarebbero necessari dati sulla distribuzione dimensionale, sul numero e/o sull'area superficiale e, possibilmente, sul chimismo superficiale delle particelle.

Benché esistano tecniche appropriate alla misura di questi parametri, solo alcune di queste sono applicabili per la determinazione di routine dell'esposizione. Nel caso dei NM, appare, al momento, di difficile realizzazione la completa caratterizzazione dell'esposizione mediante la determinazione di tutti i parametri che possono avere rilevanza tossicologica.

Nelle sezioni a seguire verranno esaminati gli aspetti inerenti alle principali tecniche di campionamento e di analisi nell'ambito della strategia di approccio alla valutazione dell'esposizione professionale.

### 4.3.1 I sistemi di campionamento e di misura

Allo stato attuale non esiste un metodo di campionamento che permetta di valutare l'esposizione al particolato aerodisperso nanometrico. Ogni tentativo di valutare l'esposizione alle NP che caratterizzano i NM deve essere basato sull'impiego di più tecniche di campionamento e di misura (Tabella 4.5).

Tabella 4.5: Metodi per il campionamento e la misura di NP		
Misura	Metodo	Commento
Massa	Campionatore personale con separazione in classi dimensionali	Attualmente non esiste un dispositivo che campioni la frazione con un taglio nell'intervallo dimensionale inferiore ai 100 nm. È pertanto necessaria la rilevazione gravimetrica o chimica off-line. La massa potrebbe essere anche derivata da misure della distribuzione dimensionale
	Campionatori statici con separazioni in classi dimensionali	Gli unici dispositivi che offrono un taglio dimensionale inferiore ai 100 nm (fino all'ordine dei 10 nm) sono gli impattori a cascata
	Tapered Element Oscillating Microbalance (TEOM®)	Per la misura on-line della concentrazione di massa dei nanoaerosol con un idoneo ingresso selettivo alle dimensioni
	Scanning Mobility Particle Sizer (SMPS)	Analisi in tempo reale e suddivisione delle particelle in classi dimensionali, si basa sulla mobilità elettrica delle particelle; intervallo da 3 nm a 800 nm
	Electrical Low Pressure Impactor (ELPI)	Analisi in tempo reale, si basa sulla separazione inerziale e la carica delle particelle. Misura della concentrazione numerica. Raccolta dei campioni
Numero	Optical Particle Counter (OPC)	Non rilevabili particelle inferiori a 300 nm
	Condensation Particle Counters (CPC)	Analisi in tempo reale di particelle fino a 100 nm
	Scanning Mobility Particle Sizer (SMPS)	Analisi in tempo reale e suddivisione delle particelle in classi dimensionali, si basa sulla mobilità elettrica delle particelle; intervallo da 3 nm a 800 nm
	Electrical Low Pressure Impactor (ELPI)	Analisi in tempo reale, si basa sulla separazione inerziale e la carica delle particelle. Misura della concentrazione numerica. Raccolta dei campioni
Area di superficie	Epifaniometro	Misura la radioattività indotta delle particelle che è proporzionale all'area superficiale attiva
	Caricatori a diffusione	Misura dell'area superficiale attiva sotto 100 nm in funzione dell'aderenza alla superficie di ioni positivi. Necessitano di preseparatori
	SMPS	Analisi in tempo reale e suddivisione delle particelle in classi dimensionali, si basa sulla mobilità elettrica delle particelle; intervallo da 3 a 800 nm
	ELPI	Analisi in tempo reale, si basa sulla separazione inerziale e la carica delle particelle. Misura della concentrazione numerica. Raccolta dei campioni
	BET (Brunauer, Emmett and Teller method)	Si basa sulla misura dell'assorbimento di un gas (N <sub>2</sub> ) sulla superficie delle particelle
Analisi d'immagine	Scanning Electron-Microscopy (SEM); Transmission Electron-Microscopy (TEM)	Analisi indiretta dell'area proiettata delle NP. I campioni possono essere raccolti da campionatori personali o campionatori statici a selezione dimensionale

Le tecniche di monitoraggio e di caratterizzazione ad oggi disponibili nel settore, discusse nelle norme ISO/TR 27628 (ISO/TR, 2007) e ISO/TR 12885 (ISO/TR, 2008), rendono fattibile una valutazione dell'esposizione a NP e nanoaerosol in termini di massa, numero e area superficiale e rappresentano una base per lo sviluppo di ulteriori standard per la caratterizzazione dell'esposizione, per quanto la maggior parte delle strumentazioni in tale settore sia comunque destinata ad un adattamento in termini di compattezza, portabilità e costi ai fini di applicazioni di routine negli ambienti di lavoro.

La valutazione e la caratterizzazione dell'esposizione professionale a NM (così come a NP e a nanoaerosol) è fortemente limitata dalla mancanza di strumentazioni idonee per il campionamento di tipo personale e, pertanto, l'impiego combinato di dispositivi per le misure *in-situ* e per l'analisi *off-line* di campioni rappresenta al momento lo strumento di elezione nell'ambito della valutazione dell'esposizione personale negli ambienti di lavoro.

I campioni di aerosol possono essere prelevati con sistemi che selezionano la frazione inalabile, toracica e respirabile. Poiché le attuali conoscenze suggeriscono che le regioni di scambio gassoso sono potenzialmente più suscettibili alle NP (ICRP, 1994; Yeh, 1996), la frazione da prelevare dovrebbe essere quella respirabile. Tale determinazione di massa (associata eventualmente alla sua caratterizzazione chimica), tuttavia, non fornisce informazioni sul numero, le dimensioni, e la superficie, ma può essere utilizzata come una misura surrogata se si possiedono informazioni sulla distribuzione dimensionale o sull'area superficiale specifica (Möhlmann, 2004).

L'uso dei sistemi ad impatto convenzionali per la determinazione dell'esposizione ai NM risulta limitato, in quanto la dimensione limite di impatto è situata in pratica tra 200 e 300 nm. Esistono impattori a bassa pressione, del tipo Electrical Low Pressure Impactor (ELPI)<sup>2</sup>, i quali campionano le particelle dopo averle caricate elettricamente. La loro carica in ogni stadio di impatto viene misurata da un elettrometro multicanale. Un sistema simile (nano-MOUDI) è stato introdotto recentemente sul mercato<sup>3</sup>. Questi strumenti possono misurare particelle fino a circa 10 nm come prelevatori statici, ma le loro dimensioni e complessità ne precludono l'utilizzo come campionatori personali. Attualmente, tuttavia, è disponibile sul mercato un tipo di impattore personale che fornisce una dimensione di taglio a 250 nm (Misra, 2002) e potrebbe essere usato per approssimare la misura della concentrazione di massa di NP nella zona respiratoria del lavoratore. Questi strumenti offrono il vantaggio di consentire la caratterizzazione chimico-fisica delle particelle raccolte sui singoli substrati, ma hanno la limitazione di non discriminare gli agglomerati di NP da singole particelle con le stesse dimensioni.

<sup>2</sup> [www.dekati.com](http://www.dekati.com)

<sup>3</sup> <http://appliedphysicsusa.com/moudi.asp>

La misura della concentrazione numerica di particelle aerodisperse a partire da 10 nm risulta relativamente semplice mediante i *Condensation Particle Counter* (CPC) e può essere estesa senza difficoltà fino a 3 nm. Questi sistemi convogliano le particelle entranti in una camera soprassatura di vapore (alcol butilico, isopropilico), in tal modo sulle particelle più piccole si ha la formazione di goccioline da 100 a 1000 volte maggiori delle dimensioni iniziali delle particelle (McMurry, 2000). Le goccioline, quindi, attraversano un sensore ottico che misura l'attenuazione della luce ed i risultati vengono convertiti in concentrazione.

Questi strumenti vengono largamente utilizzati per la misura delle particelle ultrafini nell'atmosfera urbana (Kim, 2002; Zhu, 2002; Aalto, 2005; Marconi, 2007a). Poiché questi sistemi non forniscono la separazione in classi dimensionali (salvo l'eventuale selezione all'ingresso), risulta difficile distinguere tra le diverse sorgenti di NM generati dai singoli processi, oppure tra queste e quelle presenti nel fondo dell'ambiente. Queste limitazioni sono state evidenziate nel recente studio in un impianto per la produzione di nero di carbone (Kuhlbusch, 2004). Malgrado ciò, l'utilizzo di queste misure, eseguite vicino alle potenziali sorgenti, è stato proposto per l'identificazione grezza delle NP emesse dalle sorgenti lavorative (Brouwer, 2004).

I dispositivi di questo tipo sono utilizzabili solo in modo statico, ma di recente è disponibile un tipo portatile che opera in un intervallo da 10 nm a 1.000 nm ed a concentrazioni fino a 105 p/cm<sup>3</sup>. Strumenti che forniscono informazioni sia sul numero che sulle dimensioni delle NP sono oggi disponibili commercialmente. Benché siano più complessi e costosi, gli *Scanning Mobility Particle Sizers* (SMPS)<sup>4</sup> consentono la misura della distribuzione dimensionale approssimativamente da 3 nm a 800 nm (Flagan, 2001). Questi dispositivi operano fornendo una carica elettrostatica alle particelle e separandole in funzione della loro mobilità elettrica tramite il passaggio tra due elettrodi o tra una nube di ioni generati da una sorgente radioattiva. Le particelle così separate vengono conteggiate mediante un CPC. La più recente versione di questo tipo di strumentazione, il *Fast Mobility Particle Sizer* (FMPS)<sup>4</sup>, consente di ottenere la distribuzione dimensionale ancora più rapidamente (pochi secondi, rispetto a qualche minuto dello SMPS) e, grazie ad una serie di elettrometri come sensori della carica delle particelle, evita l'uso della sorgente radioattiva.

Le tecniche finora descritte, benché sensibili nella determinazione di particelle con dimensioni di qualche nanometro, sono limitate nella loro capacità di distinguere le singole NP da quelle formate da agglomerati di particelle più piccole.

Diversi studi tossicologici supportano la necessità di misurare l'area superficiale delle NP, in quanto maggiormente correlata con i potenziali effetti biologici (HSE, 2004; EPA, 2005; NIOSH, 2008). Tradizionalmente questo parametro è misurato con la tecnica

<sup>4</sup> www.tsi.com

analitica *Brunauer-Emmet-Teller* (BET), che viene applicata ai materiali pulverulenti in massa, sfruttando le caratteristiche di assorbimento di gas quali azoto, kripton, argon. I campioni forniti dal monitoraggio (su filtri o substrati) negli ambienti lavorativi non consentono di ottenere una massa sufficiente per questo tipo di analisi, che potrebbe, invece, avere un ruolo in una complessiva strategia di monitoraggio se applicata al materiale in massa entrante nel processo lavorativo in esame.

Lo strumento che attualmente consente la misura diretta dell'area superficiale delle particelle aerodisperse è l'epifaniometro (Baltensperger, 1988). Tale dispositivo misura la quantità di radioattività generata da ioni aderenti alla superficie delle particelle, la quale risulta proporzionale all'area superficiale attiva, almeno per dimensioni inferiori a 100 nm. L'epifaniometro non risulta adatto ad un largo utilizzo negli ambienti lavorativi a causa della sua dipendenza da una sorgente radioattiva.

Strumenti di più recente generazione (elettrometri a carica diffusa) potrebbero trovare un uso più largo in ambienti lavorativi, in quanto basati sullo stesso principio del precedente dispositivo, ma operanti con la generazione e l'adesione di ioni positivi unipolari alla superficie delle particelle di aerosol (Keller, 2001).

Tali strumenti sono soggetti a possibili errori se le particelle aerodisperse sono dotate di cariche preesistenti o multiple, tuttavia studi di laboratorio hanno mostrato una buona correlazione con le misure di area superficiale derivate dall'esame in *Transmission Electron-Microscopy* (TEM) per particelle minori di 100 nm (Ku, 2005), mentre una recentissima versione di questo tipo di strumento ha fornito dati che si correlano bene con l'area superficiale delle particelle depositate nel tratto respiratorio umano (Wilson, 2004). Per la misura dell'area superficiale è possibile partire dalle informazioni sulla distribuzione dimensionale, in quanto è stata dimostrata l'associazione tra il diametro di mobilità delle particelle e l'area superficiale nel campo del cammino libero molecolare (Rogak, 1993; Wilson, 2004; Ku, 2005). In tal modo può essere effettuata una stima ragionevole dell'area superficiale, partendo da una distribuzione dimensionale che abbia un diametro modale fino a 100 nm (Maynard, 2002). Questo approccio, tuttavia, richiede strumentazione e sistemi di calcolo difficilmente applicabili al monitoraggio sistematico dell'esposizione.

Come è stato esaminato, diversi campionatori consentono il prelievo del materiale, generalmente su membrane, già suddiviso in intervalli granulometrici.

Questo permette di effettuare ulteriori indagini off-line dei NM tramite analisi chimiche e le microscopie elettroniche ed a scansione di sonda. La misura gravimetrica, sebbene rappresenti la continuità con l'approccio del monitoraggio tradizionale, risulta molto poco sensibile ai NM costituiti da NP.

Per quanto riguarda le metodologie analitiche impiegate nell'ambito della caratterizzazione chimica qualitativa e quantitativa delle sostanze presenti in campioni raccolti

su filtro (attraverso l'impiego di strumentazioni quali gli impattori statici a cascata) sempre più frequente è il ricorso a tecniche impiegate off-line scelte in base alla composizione chimica dei NM in esame.

In particolare l'applicazione di tecniche di *Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry* (ICP-MS) (Montaser, 1998), caratterizzate dalla combinazione di una strumentazione per la spettroscopia in emissione a plasma con un sistema di rivelazione a spettrometria di massa, consente di effettuare determinazioni qualitative e quantitative delle componenti inorganiche di NM a base di metalli o ossidi di metalli naturali o ingegnerizzati. Inoltre, attraverso l'accoppiamento di tecniche di cromatografia liquida (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) a sistemi di rivelazione di spettrometria di massa (HPLC-MS, HPLC-MS-MS) o a fotodiodi (*Diode Array Detector*, DAD) e di gascromatografia a sistemi di rivelazione di spettrometria di massa (GC-MS) è possibile effettuare una caratterizzazione delle impurezze dovute a composti organici a diverso grado di volatilità, eventualmente presenti nei NM ingegnerizzati a causa delle procedure di produzione, che rappresentano un importante contributo al rischio espositivo professionale a nanoaerosol. L'analisi morfologica dei NM si può effettuare tramite tecniche di microscopia elettronica a scansione (SEM) ed a scansione di sonda. La microscopia elettronica a scansione (*Scanning Electron Microscopy*, SEM) (Goldstein, 1981) permette di ottenere informazioni sulla morfologia del NM (forme e dimensioni) con risoluzioni inferiori ai 50 nm.

La microscopia elettronica a trasmissione (*Transmission Electron Microscopy*, TEM) (Williams, 1996) permette di ottenere informazioni strutturali con risoluzioni inferiori al nanometro. Inoltre, la TEM tramite la diffrazione degli elettroni, nelle sue diverse modalità (*Selected Area Electron Diffraction*, SAED; *Convergent Beam Electron Diffraction*, CBED; nanodiffrazione), e l'alta risoluzione (*High Resolution TEM*, HRTEM) consente di studiare la struttura cristallina dei NM, mettendo in evidenza anche la presenza di materiale amorfo e di difetti nel reticolo.

Informazioni sulla composizione in elementi dei NM si possono ottenere attraverso l'abbinamento della spettroscopia a dispersione di energia dei raggi X (*Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*, EDXS) ai microscopi elettronici a trasmissione ed a scansione e della spettroscopia a perdita di energia degli elettroni (*Electron Energy Loss Spectroscopy*, EELS) ai microscopi elettronici a trasmissione. Inoltre, analizzando la forma fine dello spettro EELS in prossimità della soglia di un elemento (*Energy-Loss Near Edge Structure*, ELNES), si possono ricavare informazioni sulla natura dei legami chimici di quel determinato elemento, mentre lo studio delle oscillazioni nello spettro successive al picco (*Extended Energy-Loss Fine Structure*, EXELFS) consente di ottenere informazioni strutturali sul NM.

Anche le microscopie a scansione di sonda possono essere utilizzate per la caratterizzazione dei NM (Albonetti, 2006). Tali microscopi forniscono informazioni morfologiche e mappe di determinate proprietà fisiche della superficie dei NM, con risoluzioni inferiori al nanometro.

Infine, studi inerenti alla composizione chimica superficiale dei NM ed alla struttura elettronica vengono condotti mediante il ricorso di metodologie convenzionali ed avanzate spettro-nanoscopiche quali la microscopia di emissione a fotoelettroni (*PhotoElectron Emission Microscopy*, PEEM), la spettroscopia di fotoemissione a raggi X (*X-ray-photoemission-spectroscopy*, XPS) e la Spettroscopia Ultravioletta a fotoelettroni (*Ultraviolet Photoelectron Spectroscopy*, UPS).

Per assicurare l'ottenimento di misure affidabili, è importante attivare un programma di controllo e garanzia di qualità basato sui seguenti elementi:

- impiego di analizzatori di particelle a lettura diretta calibrati dal costruttore;
- esecuzione giornaliera del controllo del punto di zero su tutti i contatori prima del loro uso;
- calibrazione delle pompe prima e dopo ogni seduta di campionamento (o almeno dopo ogni giornata di prelievi);
- ricorso a laboratori accreditati per le analisi di ogni campione di processo, di fondo, o in massa, assieme ad un appropriato numero di bianchi di campo e di laboratorio.

Per quanto riguarda l'uso di NM di riferimento da includere nelle attività di controllo di qualità, attualmente ne sono disponibili solo alcuni tipi, come ad esempio NP di oro (RM 8011, RM 8012, RM 8013) prodotte dall'*U.S. National Institute of Standards and Technology* (NIST) e quelle di silice (CRM-N° IRMM-204) fornite dalla Commissione European *Joint Research Centre – Institute for Reference Materials and Measurements* (IRMM), Geel, Belgium<sup>5</sup>

Questi tipi di particelle nanometriche hanno morfologia sferica e sono certificati principalmente per le loro dimensioni e, quindi, possono essere utilizzati per la calibrazione ed il controllo di qualità degli strumenti che misurano le dimensioni delle particelle.

Il maggior ostacolo alla produzione di NM di riferimento è l'assenza di consenso sui parametri metrologici e sui metodi.

#### 4.3.1.1 Analisi critica dei mezzi disponibili per la stima/misura dell'esposizione

La strategia di misura basata sulla determinazione delle emissioni per derivare una stima dell'esposizione è suscettibile di vari tipi di limitazioni riguardanti: 1) la variabilità della

<sup>5</sup> per maggiori informazioni consultare il sito: [http://ec.europa.eu/dgs/jrc/index.cfm?id=2820&obj\\_id=220&dt\\_code=HLN&lang=en](http://ec.europa.eu/dgs/jrc/index.cfm?id=2820&obj_id=220&dt_code=HLN&lang=en).

concentrazione numerica di NP negli ambienti lavorativi, 2) il limite superiore dell'intervallo di misura entro cui operano i CPC, 3) lo stato di aggregazione delle NP presenti nell'aerosol, 4) il difetto di selettività da parte degli strumenti contatori di particelle.

Sul punto 1), occorre tenere conto che possono esistere differenze di ordini di grandezza nelle concentrazioni numeriche di aerosol, in funzione della numerosità e del tipo di sorgenti in grado di emettere particelle. Campagne di monitoraggio su diversi giorni e stagioni possono fornire le informazioni necessarie a capire la variabilità nella concentrazione numerica esistente per le misurazioni di fondo ed in quelle vicine alle sorgenti dove avviene la manipolazione di NM.

Nel caso 2), poiché gli strumenti CPC presentano generalmente un limite di concentrazione massima misurabile non superiore a 100.000 p/cm<sup>3</sup>, è possibile estendere l'intervallo di misura ricorrendo ad un sistema di diluizione tramite il posizionamento a monte dell'ingresso di una apposita cartuccia con filtro *HEPA* (High Efficiency Particulate Air) (Peters, 2006).

Il problema indicato al punto 3) si verifica in quanto al momento del campionamento la distribuzione dimensionale del NM ed il suo stato di aggregazione (o agglomerazione) possono essere ignoti e, di conseguenza, l'uso di strumenti a lettura diretta per dimensionare/conteggiare le particelle possono fornire solo un'indicazione semi-quantitativa dell'entità delle potenziali emissioni. Ciò vale se le misure di fondo effettuate con CPC e OPC sono in grado di fornire dati sulle concentrazioni di particelle con dimensioni superiori a quelle definite dall'ISO per le NP (approssimativamente comprese tra 1 nm e 100 nm) (UNI CEN ISO/TS, 2010). In ogni caso, i due tipi di strumenti possono essere utilizzati simultaneamente per ottenere una valutazione semi-quantitativa, dimensionalmente differenziata dell'aerosol da campionare.

I CPC forniscono la misura numerica delle particelle totali per unità di volume di aria nell'intervallo dimensionale 10-1.000 nm. Gli OPC sono in grado di misurare il numero totale di particelle per unità di volume di aria nell'ambito di un minimo di quattro intervalli dimensionali: 300 - 500 nm; 500 - 1.000 nm; 1.000 - 10.000 nm, e maggiore di 10.000 nm. Per la determinazione della concentrazione numerica delle particelle nanometriche i risultati generati dai due tipi di strumenti devono essere combinati assieme.

Ad esempio, un dato di concentrazione numerica elevata ottenuta con il CPC simultaneamente con un'alta concentrazione nell'intervallo dimensionale (300-500 nm) fornita dall'OPC può indicare la possibile presenza di particelle nanometriche.

All'inverso, una bassa concentrazione con il CPC, assieme ad una elevata concentrazione, nell'intervallo, maggiore di 1.000 nm riscontrata con l'OPC, può indicare la presenza di particelle di grandi dimensioni o agglomerati di NP.

La verifica di questa assunzione può essere effettuata per mezzo dell'analisi con le tecniche di microscopia elettronica a trasmissione (TEM) ed a scansione (SEM).

Le limitazioni indicate al punto 4) possono essere trattate nel modo che segue. La selettività costituisce un parametro critico nella caratterizzazione dell'esposizione in termini di concentrazione numerica delle particelle.

Particelle aerodisperse con dimensioni nanometriche sono presenti in molti luoghi di lavoro e spesso hanno origine da molteplici sorgenti, quali combustioni, emissioni auto veicolari, ed infiltrazioni di aria esterna. I contatori di particelle generalmente non sono in grado di selezionare in funzione di una specifica sorgente o tipo di composizione rendendo molto difficoltosa la differenziazione tra particelle incidentali e quelle associate allo specifico processo in base alla sola concentrazione numerica. Strumenti quali i CPC e gli OPC, quindi, devono essere usati per identificare le sorgenti di NP ed i campioni basati sui filtri per la verifica delle dimensioni, forma, e composizione chimica al fine di differenziare i due diversi tipi di NP.

#### **4.4 Approccio alla valutazione dell'esposizione professionale a nanomateriali: la strategia**

Una considerazione particolare merita la strategia per la valutazione dell'esposizione negli ambienti lavorativi. Attualmente le stime dell'esposizione personale vengono derivate da misure ottenute con strumenti statici pertanto, per un'affidabile interpretazione dei risultati, è essenziale identificare tutte le potenziali sorgenti di emissione di NM, interne ed esterne all'ambiente lavorativo, registrare il regime di correnti d'aria, nonché e gli spostamenti dell'addetto rispetto alle sorgenti ed alla posizione dello strumento.

Sulla base degli aspetti di igiene occupazionale descritti in questa rassegna si può concludere che, attualmente, non esiste un metodo di campionamento per caratterizzare l'esposizione a NP. Risulta, quindi, necessario adottare un approccio basato sull'uso di diversi strumenti e su di una appropriata strategia di campionamento.

In tale contesto, nell'ambito della Commissione Europea, lo *Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks* (SCENIHR, 2006) parte dalle seguenti considerazioni per la messa a punto di una corretta strategia di valutazione dell'esposizione professionale a NM:

1. non esiste ad oggi un'opinione condivisa sulla scelta dei parametri che devono rappresentare la misura più appropriata nell'ambito della valutazione dell'esposizione (massa, numero, area superficiale, chimica superficiale, ecc.);
2. non sono al momento disponibili campionatori personali per effettuare misure di NP;

3. devono essere necessariamente elaborate tecniche innovative per il campionamento e la messa a punto di strategie per la valutazione dell'esposizione sia in ambito professionale sia nel settore ambientale;
4. risulta indispensabile individuare valori limite di esposizione professionale per le sostanze chimiche aerodisperse in forma nanoparticellare tenendo presenti le eventuali possibili differenze che si possono riscontrare negli effetti biologici a seconda che si tratti di NP discrete o di agglomerati/aggregati di NP.

Finché non verrà stabilito quale sia il sistema metrologico più appropriato per la valutazione dell'esposizione alle NP biologicamente attive, la comunità scientifica condivide l'orientamento di raccomandare l'utilizzo di diversi tipi di strumenti per fornire la caratterizzazione più completa possibile dell'aerosol nel luogo di lavoro ove vengono prodotte, manipolate o impiegate NP.

Questo approccio, richiedendo l'utilizzo di campionatori statici, rende difficoltosa l'applicazione delle normali procedure di campionamento personale previste per la valutazione dell'esposizione individuale ai fini della conformità con i valori limite di esposizione (premessa comunque la mancanza, allo stato attuale, di standard normativi di riferimento per sostanze chimiche aerodisperse in forma nanoparticellare) oppure per le elaborazioni epidemiologiche. Sulla base di tali premesse è, pertanto, opportuno sviluppare un'appropriata strategia per il campionamento (e/o le misurazioni), prima e durante il monitoraggio (Tabella 4.6).

Tabella 4.6 - Considerazioni da prendere prima e durante il campionamento (da <i>Technical Report ISO/TR 27628/2007</i> )		
Considerazioni	Obiettivo	Strumento
Sorgente	Identificare e localizzare sorgenti singole/ multiple di nanoaerosol nell'ambiente di lavoro; identificare la penetrazione di aerosol ambientali nel luogo di lavoro	Contatore di particelle a condensazione (CPC); registrare osservazioni sulle attività generatrici di emissioni
Ventilazione	Monitorare il flusso d'aria e la trasmissione di aerosol attraverso l'ambiente di lavoro	Anemometri; <i>Smoke tube</i> ; gas traccianti; osservazioni e registrazione di aperture porte, ecc.
Attività nel luogo di lavoro	Interpretazione dei dati registrati direttamente dalla strumentazione in vista delle variazioni dei parametri di esposizione	Sistema di osservazione: monitorare le attività che generano le emissioni; CPC
Comportamento del lavoratore	Interpretare le differenze spaziali alla luce del tempo di residenza nei diversi luoghi	Sistema di osservazione: monitorare le posizioni dei lavoratori rispetto alla sorgente/lettura dei campioni

L'individuazione di un appropriato luogo di campionamento è la chiave per una interpretazione affidabile dei dati ai fini di stimare l'esposizione personale.

La prima azione da intraprendere dovrebbe essere l'individuazione nel luogo di lavoro di sorgenti di NP, verificando, nel contempo, la presenza di eventuali sorgenti esterne, quali ulteriori attività industriali, traffico veicolare, ecc., che possono influire sulla concentrazione interna della quota nanometrica dell'aerosol.

Il ricorso a campionatori statici per NP implica che i campioni vengano raccolti in punti più prossimi possibili alle potenziali sorgenti di emissione, per consentire la massima accuratezza nella determinazione del rilascio di NM e per identificare i luoghi in cui risulta più probabile l'esposizione dei lavoratori. Di conseguenza, i risultati di questo tipo di campionamenti dovrebbero essere interpretati come un indicatore del rilascio di NM e della necessità di controlli più efficaci.

È importante che le misure di esposizione vengano condotte anche prima della produzione o lavorazione dei NM per ottenere dati sulle concentrazioni di fondo. I dati di concentrazione raccolti durante la produzione o lavorazione potranno essere così confrontati con i valori di fondo per valutare un eventuale aumento del parametro scelto. Un altro metodo consiste nell'effettuare misurazioni simultanee delle concentrazioni all'interno e all'esterno del luogo di lavoro, utilizzando due identiche strumentazioni, così da sottrarre il contributo dovuto all'esterno alle concentrazioni di NP rilevate all'interno. Questo metodo, tuttavia, comporta costi rilevanti ed è basato sull'assunzione che le particelle esterne non subiscano cambiamenti durante il loro trasporto all'interno dei luoghi di lavoro.

Inoltre, come precedentemente sottolineato, poiché gli aerosol di NP possono essere costituiti da miscele complesse di diversa origine, i metodi di campionamento e di analisi potranno essere ottimizzati ai fini di una corretta attribuzione delle varie possibili sorgenti emmissive involontarie (ad esempio ricorrendo all'utilizzo dei profili di sorgente della *Principal Component Analysis*) anche in considerazione di eventuali contributi provenienti dall'ambiente esterno.

In tale contesto risulta, quindi, opportuno mettere a punto protocolli di misura, ottimizzati in tutte le fasi succitate, nell'ambito della procedura di valutazione dell'esposizione professionale a NP, finalizzati alla determinazione della *composizione chimica* e della *distribuzione dimensionale* di NP e microparticelle presenti nell'ambiente di lavoro ricorrendo all'approccio multiparametrico caratterizzato da diverse tecniche di campionamento e di analisi.

Un ulteriore parametro da tenere sotto controllo è il flusso d'aria, per determinare la trasmissione di aerosol nell'ambiente di lavoro. Lo strumento più appropriato in questo caso è un generatore di fumo che, comunque, non può essere utilizzato contemporaneamente alle misurazioni, essendo esso stesso un generatore di aerosol.

Durante l'accertamento dell'esposizione tutte le attività svolte nell'ambiente di lavoro dovrebbero essere osservate in modo da fornire ulteriori informazioni utili all'interpretazione dei risultati dei campionamenti statici. L'attenzione deve essere rivolta alla presenza di attività supplementari in grado di generare aerosol, come l'uso di specifiche apparecchiature, la presenza di fumatori o di sorgenti secondarie come la risospensione di depositi di aerosol a causa di spostamenti di aria indotti dal movimento di persone o l'attività di veicoli. Sebbene la risospensione di polvere sia probabilmente caratterizzata da particelle grandi, il processo può giocare un ruolo nel rilascio di NP nell'aria. Infine, dovrebbero essere monitorate le variazioni della posizione del lavoratore rispetto alla sorgente nell'intervallo di tempo programmato per il campionamento. I risultati pesati di postazioni multiple campionate possono essere usati per stimare le esposizioni personali.

Nella valutazione iniziale può essere utile l'aggiunta di campioni dalle superfici qualora esista la possibilità di contaminazione da NM delle superfici per sedimentazione dall'aria, per il rilascio causato da perdite, oppure per migrazione di materiale da un luogo all'altro dell'impianto produttivo.

Per migliorare la confrontabilità dei dati di esposizione, la pratica consueta di esprimere l'esposizione personale come valore riferito al turno di otto ore dovrebbe essere seguita anche nel caso dei nanoaerosol. Di conseguenza, per quanto possibile i risultati delle misure di esposizione di breve periodo dovrebbero essere convertiti in dati basati sul turno di otto ore, ricalcolandone i valori ponderati sul tempo. In tutti i casi in cui l'esposizione a breve termine è l'obiettivo dell'indagine, l'intervallo temporale delle misurazioni deve essere documentato, rammentando che il periodo di tempo di riferimento generalmente raccomandato in igiene del lavoro per questo tipo di valutazioni è pari a 15 minuti.

Nella Figura 4.4 viene rappresentata in modo schematico la strategia finora delineata, basata principalmente sulle indicazioni elaborate dal NIOSH e dall'OECD.

L'approccio strategico incentrato sull'acquisizione di diversi parametri per la determinazione della presenza e identificazione di NP consente di effettuare una stima semi-quantitativa dell'esposizione personale.

Tuttavia, poiché questo tipo di indagine si basa su campionamenti statici o di area, la stima dell'esposizione lavorativa dovrà essere trattata con particolare attenzione (ISO/TR, 2008).

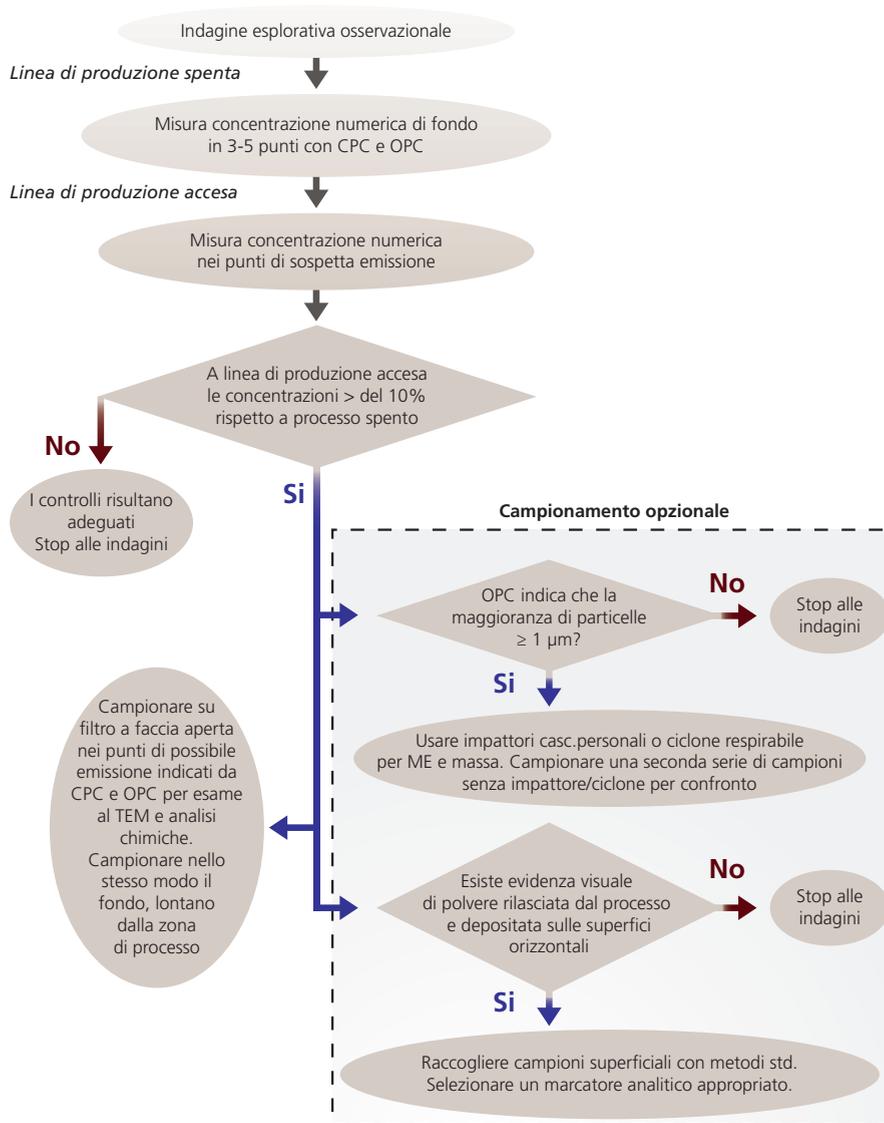


Figura 4.4 - Schema della strategia di campionamento secondo le indicazioni di NIOSH e OECD.

## Bibliografia

- Aalto P, Paatero P, Kulmala M, Hameri K, Forsstiere F, Cattani G, Marconi A, Cyrus J, Von Lot, S, Zetzsche K, Peters A, Bouso L, Castano-Vinyals G, Sunyer J, Lanki T, Pekkanen J, Sjovall B, Berglund N, Bellander T, Nyberg F. Aerosol number concentration measurements in five European cities using TSI-3022 condensation particle counter over three year period during HEAPSS (Health Effects of Air Pollution on Susceptible Subpopulations). *J Air Waste Manag Assoc.* 2005;55:1064-76.
- Albonetti C, Cavallini M, Kshirsagar R, Biscarini F. Microscopia a scansione di forza di nanostrutture molecolari: morfologia, proprietà e nanofabbricazione. In: Quaglino D, Falcieri E, Catalano M, Diaspro A, Montone A, Mengucci P, Pellicciari C editors. 1956-2006 Cinquanta anni di microscopia in Italia tra storia, progresso ed innovazione. Società Italiana di Scienze Microscopiche. 2006;181- 206.
- Arredouani M, Yang Z, Ning Y, Qin G, Soininen R, Tryggvason K, et al. The scavenger receptor MARCO is required for lung defense against pneumococcal pneumonia and inhaled particles. *J Exp Med.* 2004;200:267-72.
- ASTM. American Society of Testing Materials. ASTM E2535 – 2007. Standard guide for handling unbound engineered nanoscale particles in occupational settings.
- Bailey MR, Ansoberlo E, Guilmette RA, Paquet F. Practical application of the ICRP Human Respiratory Tract Model. *Radiat Prot Dosimetry.* 2003;105:71-6.
- Baltensperger U, HW Gaggeler, DT Jost. The Epi-phanometer, a new device for continuous aerosol monitoring. *J Aerosol Sci.* 1988;19 (7): 931-4.
- Berufsgenossenschaftliches Institute für Arbeitsschutz - BIA-Report 7/2003e; BIA-Workshop "Ultrafine aerosols at workplaces".
- Brouwer DH, Gijsbers JH, Lurvink MW. Personal exposure to ultrafine particles in the workplace: exploring sampling techniques and strategies. *Ann Occup Hyg.* 2004; 48 (5): 439-53.
- Brown JS, Zeman KL, Bennett WD (2002). Ultrafine particle deposition and clearance in the healthy and obstructed lung. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166:1240-7.
- 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.
- Carr KE, Hazzard RA, Reid S, Hodges GM. The effect of size on uptake of orally administered latex microparticles in the small intestine and transport to mesenteric lymph nodes. *Pharm Res.* 1996;13:1205-9.
- Chono S, Tanino T, Seki T, Morimoto K. Influence of particle size on drug delivery to rat alveolar macrophages following pulmonary administration of ciprofloxacin incorporated into liposomes. *J Drug Target.* 2006;14:557-66.
- Coin PG, Roggli VL, Brody AR. Deposition, clearance, and translocation of chrysotile asbestos from peripheral and central regions of the rat lung. *Environ Res.* 1992;58:97-116.
- Crosera M, Bovenzi M, Maina G, Adami G, Zanette C, Florio C, Filon Larese F. Nanoparticle dermal absorption and toxicity: a review of the literature. *Int Arch Occup Environ Health.* 2009. In press.
- Des Rieux A, Fievez V, Garinot M, Schneider YJ, Preat V. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach. *J Control Release.* 2006;116:1-27.
- Elder A, Gelein R, Silva V, Feikert T, Opanashuk L, Carter J, et al. Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system. *Environ Health Perspect.* 2006;114:1172-8.
- Environmental Protection Agency. External Review Draft Nanotechnology White Paper. EPA, 2005. Available from: <http://www.epa.org>.
- Flagan RC. Electrical techniques. In: Aerosol measurement: principles, techniques and applications, Baron PA and Willeke K. John Wiley & Sons, New York, 537-68, 2001.
- Florence AT. The oral absorption of micro- and nanoparticulates: neither exceptional nor unusual. *Pharm Res.* 1997;14:259-66.
- Gaumet M, Gurny R, Delie F. Localization and quantification of biodegradable particles in an intestinal cell model: the influence of particle size. *Eur J Pharm Sci.* 2009;36:465-73.
- Geiser M, Schrch S, Gehr P. Influence of surface chemistry and topography of particles on their immersion in the lung's surface-lining layer. *J Appl Physiol.* 2003;94:1793-801.
- Geiser M, Rothen-Rutishauser B, Kapp N, Schurch S, Kreyling W, Schulz H, et al. Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ Health Perspect.* 2005;113:1555-60.

- Goldstein JI, Newbury DE, Echlin P, Joy DC, Fiori C, Lifshin E. Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis. New York (NY): Plenum Press; 1981.
- Gullberg E, Keita AV, Salim SY, Andersson M, Caldwell KD, Soderholm JD, et al. Identification of cell adhesion molecules in the human follicle-associated epithelium that improve nanoparticle uptake into the Peyer's patches. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;319:632-9.
- Gumbleton M. Caveolae as potential macromolecule trafficking compartments within alveolar epithelium. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;49:281-300.
- Heyder J, Gebhart J, Rudolf G, Schiller CF, Stahlhofen W. Deposition of particles in the human respiratory-tract in the size range in the range 0.005-15  $\mu\text{m}$ . *J Aerosol Sci.* 1986;17: 811-25.
- Hillier JF, Albrecht RM. Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles. *J Pharm Sci.* 2001;90:1927-36.
- HSE. Health and Safety Executive. Nanoparticles: An occupational hygiene review. Research report 274, 2004. Available from: <http://www.hse.uk>.
- Hussain N, Jaitley V, Florence AT. Recent advances in the understanding of uptake of microparticulates across the gastrointestinal lymphatics. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;50:07-42.
- ICRP. International Commission on Radiological Protection. Human respiratory tract model for radiological protection. Oxford, England: Pergamon, Elsevier Science Ltd., ICRP Publication No. 66, 1994.
- 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).
- INRS. Les nanomatériaux, 15/03/2007. Available from : <http://www.inrs.fr>
- ISO/DTS. International Standardization Organisation. Nanotechnologies – Vocabulary – Part. 1: Core terms. ISO/DTS 80004-1/2010.
- ISO/NP TS. International Standardization Organisation. Guidelines for occupational risk management applied to engineered nanomaterials based on a “ control banding approach”. ISO/NP TS 12901-2/2008.
- ISO/TR. International Standardization Organisation. Workplace atmospheres – Ultrafine, nanoparticle and nano-structured aerosols – Inhalation exposure characterization and assessment. Technical Report ISO/TR 27628/2007.
- ISO/TR. International Standardization Organisation. Health and Safety Practices in Occupational. Settings Relevant to Nanotechnologies. Technical Report ISO/TR 12885/2008.
- Jani P, Halbert GW, Langridge J, Florence AT . Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa: quantitation and particle size dependency. *J Pharm Pharmacol.* 1990;42:821-6.
- Keller A, Fierz M, Siegmann K, Siegmann HC, Fillippov A. Surface science with nanosized particles in a carrier gas. *J Vacuum Sci Technol a Vacuum Surface Films.* 2001;19 (1):1-8.
- Kim S, Shen S, Sioutas C, Zhu Y, Hinds W. Size distribution and diurnal and seasonal trends of ultrafine particles in source and receptor sites of the Los Angeles Basin. *J Air Waste Manag Assoc.* 2002; 52:297-307.
- Koshi, S. Proposition for a method of evaluating the work environment with regard to airborne toxic substances, *Ind Health.* 1980;18:179-86.
- Ku BK and Maynard AD. Comparing aerosol surface-area measurement of monodisperse ultrafine silver agglomerates using mobility analysis, transmission electron microscopy and diffusion charging. *J Aerosol Sci.* 2005. Available from: [www.elsevier.com](http://www.elsevier.com).
- Kuhlbusch T.A.J., Neumann S. and Fissan H..Number Size Distribution, Mass Concentration, and Particle Composition of PM1, PM 2,5 and PM10 in Bag Filling Areas of Carbon Black Production. *J Occup Environ Hyg.* 2004;1:660-71.
- Larese Filon, F., D'Agostin, F., Crosera, M., Adami, G., Renzi, N., Bovenzi, M., Maina, G. Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin, *Toxicol.* 2009; 255: 33-37.
- Lauweryns JM, Baert JH. Alveolar clearance and the role of the pulmonary lymphatics. *Am Rev Resp Dis.* 1977;115:625-83.
- Lentz TJ, Rice CH, Succop PA, Lockey JE, Dement JM, LeMasters GK. Pulmonary deposition modeling with airborne fiber exposure data: a study of workers manufacturing refractory ceramic fibers. *Appl Occup Environ Hyg.* 2003;18:278-88.

- Lomer MC, Thompson RP, Powell JJ. Fine and ultrafine particles of the diet: influence on the mucosal immune response and association with Crohn's disease. *Proc Nutr Soc.* 2002;61:123-30.
- Marconi A, Cattani G, Cusano M, Ferdinandi M, Inglessis M, Viviano G, Settimo G. Two years of fine and ultrafine particles measurements in Rome, Italy. *J Toxicol Environ Health, Part A.* 2007;70:213-21.
- Marconi A, Fanizza C., Castellet y Ballarà G.. Particelle ultrafini e nanoparticelle: tecniche di misura convenzionali ed avanzate per la determinazione dell'esposizione inalatoria; *Riv Inf Mal Prof, INAIL.*2007;2:261-78.
- Maynard AD, Zimmer AT. Evaluation of grinding aerosols in terms of alveolar dose: The significance of using mass, surface-area and number metrics. *Ann Occup Hyg.* 2002;46 (Suppl. 1): 320-2.
- Maynard A.D. Nanotechnology: The next big thing, or much ado about nothing? *Ann Occup Hyg.* 2007;5(1):1-12.
- Maynard AD and Kuempel ED. Airborne nanostructured particles and occupational health. *J Nanop Res.* 2005;7:587-614.
- McMurry PH. A review of atmospheric aerosol measurements. *Atmos Environ.* 200: 34: 1959-99.
- Methner, M.M., Birch, M.E, Evans, D.E., Ku, B.K., Crouch, K.G., Hoover, M.D. Mazzukelli LF. Case study: Identification and characterization of potential sources of worker exposure to carbon nanofibers during polymer composite laboratory operations. *J Occup Environ Hyg.* 2007;4(12), D125-30.
- Methner, M. Engineering case reports (Old L. Editor). Effectiveness of local exhaust ventilation in controlling engineered nanomaterial emissions during reactor cleanout operations. *J Occup Environ Hyg.* 2008;5(6): D63-9.
- Misra C, Singh M, Shen S, Sioutas C, Hall PM. Development and evaluation of a personal cascade impactor sampler (PCIS). *J Aerosol Sci.* 2002;33(7):1027-48.
- Möhlmann C. German activity on the ultra-fine particles in the workplaces. *Proceedings of the First International Symposium on Occupational Health Implications of Nanomaterials-Nanomaterials: a risk to health at work?*, 12-14 Oct 2004, Buxton, UK. P. 128-30.
- Montaser A. *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry.* Wiley-VCH. New York (NY); 1998.
- Nel A, Xia T, Madler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science.* 2006;311: 622-7.
- NIOSH. National Institute for Occupational Safety and Health. Strategic Plan for NIOSH Nanotechnology Research: Filling the Knowledge Gaps, 2007. Available from: [http://www.cdc.gov/niosh/topics/nanotech/strat\\_plan.html](http://www.cdc.gov/niosh/topics/nanotech/strat_plan.html).
- NIOSH. National Institute for Occupational Safety and Health. Approaches to Safe Nanotechnology: An Information Exchange with NIOSH, 2008. Available from: <http://www.cdc.gov/niosh/topics/nanotech/safenano/>.
- Nohynek GJ, Lademann J, Ribaud C, Roberts MS. Grey goo on the skin? Nanotechnology, cosmetic and sunscreen safety. *Crit Rev Toxicol.* 2007;37: 251-77.
- Oberdorster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W, et al. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol.* 2004;16:437-45.
- Oberdorster G, Oberdorster E, Oberdorster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect.* 2005;113:823-39.
- O'Hagan DT. The intestinal uptake of particles and implications for drug and antigen delivery. *J Anat.* 1996;189 (Pt 3):477-82.
- Patton JS. Mechanisms of macromolecule absorption by the lungs. *Adv Drug Deliv Rev.* 1996;19:3-36.
- Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS, Hoekstra D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J.* 2004;377:159-69.
- Rogak SN, Flagan RC, Nguyen HV. The mobility and structure of aerosol agglomerates. *Aerosol Sci Technol.* 1993;18 (1): 25-47.
- Sonavane, G., Tomoda, K., Sano, A., Ohshima, H, Terada, H., Makino, K. In vitro permeation of gold nanoparticles through rat skin and rat intestine: Effect of particle size. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2008; 65: 1-10.
- SCENIHR. European Commission Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks. Opinion on the appropriateness of existing methodologies to assess the potential risks associated with engineered and adventitious products of nanotechnologies. 2006.
- Semmler-Behnke M, Takenaka S, Fertsch S, Wenk A, Seitz J, Mayer P, et al. Efficient elimination of inhaled nanoparticles from the alveolar

- region: evidence for interstitial uptake and subsequent reentrainment onto airways epithelium. *Environ Health Perspect.* 2007;115:728-33.
- Sibille Y, Reynolds HY. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am Rev Resp Dis.* 1990;141:471-501.
  - Stuart D, Lobenberg R, Ku T, Azarmi S, Ely L, Roa W, et al. Biophysical investigation of nanoparticle interactions with lung surfactant model systems. *J Biomed Nanotechnol.* 2006;2:245-52.
  - Szoke R, Alföldy B, Balashazy I, Hofmann W, Sziklai-Laszlo I. Size distribution, pulmonary deposition and chemical composition of Hungarian biosoluble glass fibers. *Inhal Toxicol.* 2007;19:325-32.
  - Tanaka I, Oyabu T, Ishimatsu S, Hori H, Higashi T, Yamato H. Pulmonary deposition and clearance of glass fiber in rat lungs after long-term inhalation. *Environ Health Perspect.* 1994;102 Suppl 5:215-6.
  - 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.
  - Tinkle SS, Antonini JM, Rich BA, Robert JR, Salmen R, De Pree K, Adkins. EJ Skin as a route of exposure and sensitization in chronic beryllium disease. *Environ Health Perspect.* 2003;111:1202-8.
  - UNI CEN ISO/TS. International Standardization Organisation. Terminologia e definizioni relative a nano-oggetti - Nanoparticelle, nanofibre e nanolastre. UNI CEN ISO/TS 27687/2010.
  - Warheit DB, Hartsky MA, McHugh TA, Kellar KA. Biopersistence of inhaled organic and inorganic fibers in the lungs of rats. *Environ Health Perspect.* 1994;102 Suppl 5:151-7.
  - Wendel-de-Joode, B. van, Brouwer, D.H., Vermeulen, R., van Hemmen, J.J., Heederik, D., Kromhout, H. DREAM: A method for semi-quantitative dermal exposure assessment. *Ann Occ Hyg.* 2003;47, 71-87.
  - Williams DB, Carter CB. *Transmission electron microscopy: a textbook for materials science.* 2nd ed. New York (NY): Plenum Press; 1996.
  - Wilson WE. Use of the electrical aerosol detector as an indicator for the total particle surface area deposited in the lung. *Proceedings of the 2004 Air and Waste Management Association Conference.*
  - Yamato H, Hori H, Tanaka I, Higashi T, Morimoto Y, Kido M. Retention and clearance of inhaled ceramic fibres in rat lungs and development of a dissolution model. *Occup Environ Med.* 1994;51:275-80.
  - Yang W, Peters JI, Williams III RO. Inhaled nanoparticles - A current review. *Int J Pharm.* 2008;356:239-47.
  - Yeh HC, Cuddihy RG, Phalen RF, Chang IY. Comparison of calculated respiratory-tract deposition of particles based on the proposed NCRP model and the new ICRP 66 model. *Aerosol Scie Technol.* 1996;25:134-40.
  - Zhu, Y., Hinds, W.C., Kim, S., Sioutas, C. Concentration and size distribution of ultrafine particles near a major highway. *J Air Waste Manag Assoc.* 2002;52(9):1032-42.

