

*Nanoparticelle prodotte nei processi di combustione:  
caratterizzazione chimica e valutazione della genotossicità*

**Relazione Finale**

**Autori: Alessia D'Alessio\*, Rita Di Bonito°, Rosanna Gatti°,  
Giovanna Zappa°, Claudia Zoani°**

Affiliazioni \*ACPA – Associazione Cittadini per l'Ambiente - Roma  
e: °ENEA C.R.Casaccia-*Dipartimento BAS*

Ricerca finanziata da:



Dipartimento Igiene del Lavoro

## Progetto di Ricerca: 02/B/DIL/05

### ***Nanoparticelle prodotte nei processi di combustione: caratterizzazione chimica e valutazione della genotossicità***

Ente assegnatario: ACPA Associazione Cittadini per l'Ambiente Roma

#### **Relazione finale**

*Il presente progetto di ricerca di cui è ente assegnatario l'ACPA, Associazione Cittadini per l'Ambiente di Roma, è stato svolto in collaborazione con l'ENEA, Dipartimento Biotecnologie Agroindustria e protezione della Salute. Le attività descritte nella presente relazione sono state svolte in accordo a quanto previsto dal contratto di affidamento del 8/06/07 e sono state preliminarmente concordate nel dettaglio con la Prof.ssa Roberta Curini, responsabile per conto ISPESL.*

#### **OGGETTO DEL PROGETTO**

Il progetto si propone di fornire elementi utili alla valutazione dei rischi per i lavoratori professionalmente esposti a nanoparticelle. In particolare la ricerca ha riguardato la messa a punto di metodologie per la raccolta separata delle diverse frazioni del particolato emesso da motori diesel e per la loro successiva caratterizzazione chimica, chimico-fisica e tossicologica. In particolare in un ambiente di laboratorio è stata creata la possibilità di campionare il particolato presente negli esausti di un motore diesel per autotrazione e sono stati messi a punto sistemi di campionamento ad impattori inerziali, valutando l'influenza delle diverse variabili operative sulla riproducibilità e l'affidabilità delle misure. Le diverse frazioni granulometriche raccolte sono state poi utilizzate per mettere a punto le metodologie di caratterizzazione chimica, chimico-fisica e tossicologica, studiando, in particolare, la possibilità di effettuare determinazioni, in serie o in parallelo, sullo stesso campione individuale, al fine di rendere maggiormente efficaci le ipotesi di correlazione tra composizione chimica e genotossicità.

## QUADRO DI RIFERIMENTO

Le nanoparticelle sono correntemente definite<sup>1</sup> come particelle con una o più dimensioni dell'ordine di 100 nm o meno. Le nanoparticelle sono già da tempo utilizzate nella produzione di vernici, resine e cosmetici e da alcuni anni, grazie al progredire delle nanoscienze, si è assistito ad un rapido sviluppo nella realizzazione di nanomateriali (nanotubi, nanofibre, quantum dots, nanocristalli, etc.) e nell'applicazione di nanotecnologie in diversi settori (farmaceutico, alimentare, informatico, etc.). A questi scopi le nanoparticelle vengono intenzionalmente prodotte attraverso diversi processi, come ad esempio le reazioni in fase gassosa indotte da laser o di deposizione chimica in fase vapore attivata da catalizzatore. I lavoratori maggiormente soggetti all'esposizione a nanoparticelle sono, oltre a quelli coinvolti nei suddetti processi di produzione, quelli addetti alle manipolazioni (taglio, finitura ed altro) dei nanomateriali.

È necessario considerare inoltre che le nanoparticelle vengono "involontariamente" prodotte durante svariati altri processi (ad esempio: atomizzazione, ablazione e combustione), con un allargamento a numerose categorie lavorative del rischio di esposizione a questi agenti. In particolare i processi di combustione sono quelli di maggior rilevanza per la vastità di settori lavorativi coinvolti e per il fatto che si possono considerare la fonte principale delle nanoparticelle presenti nel particolato atmosferico, alle quali tutti gli esseri viventi sono indiscriminatamente esposti. Le indicazioni che emergono dagli studi di tossicità e dagli studi epidemiologici rendono sempre più consistente l'ipotesi che gli effetti tossici del particolato atmosferico con diametro < 10 µm (PM10) siano da attribuire in larga parte alla presenza di nanoparticelle. Queste infatti, nonostante rappresentino soltanto una piccola frazione in massa del PM10, sono la componente più numerosa e questo elevato numero - insieme al grande rapporto superficie/volume - comporta un'elevatissima area superficiale con un incremento della reattività chimica. Gli effetti avversi vengono inoltre amplificati dalle nanodimensioni, che permettono più facilmente il raggiungimento degli organi bersaglio.

Le nanoparticelle del PM10 derivano, oltre che da processi di combustione (es.: impianti per la produzione di energia elettrica, impianti di riscaldamento e traffico veicolare) e dal crescente impiego di nanotecnologie e nanomateriali in diversi settori (farmacologico, medico, informatico, dell'energia, della protezione ambientale, dell'industria alimentare), anche da fonti naturali, quali vulcani, spray marini, incendi ed erosione.

---

<sup>1</sup> *Vocabulary Nanoparticles PAS 71:2005* - British Standards Institution (BSI)

Le nanoparticelle possono essere sia primarie che secondarie, a seconda che siano emesse direttamente dalla fonte o derivino da processi di nucleazione, coagulazione e condensazione.

Una volta generate possono andare incontro a fenomeni di agglomerazione e di aggregazione dando luogo a prodotti che non presentano più le dimensioni caratteristiche delle nanoparticelle, ma ne conservano la potenziale tossicità.

Al fine di valutare la tossicità delle nanoparticelle, è necessario considerare oltre alle caratteristiche fisiche anche la loro composizione chimica. Da studi condotti sui motori diesel è emerso che la combustione di gasolio produce un'ampia varietà di particelle carboniose, che differiscono in natura e dimensioni: oltre alla fuliggine e a nanoparticelle di carbonio organico (NOC) primarie, si possono formare aggregati e/o agglomerati di nanoparticelle carboniose e metalliche e NOC secondarie. Recenti studi hanno permesso di identificare due picchi di nanoparticelle emesse da scarichi di motori diesel con diametro aerodinamico a 30 e 80 nm corrispondenti rispettivamente alle cosiddette nanogocce (specie volatili) e a particelle con un nucleo carbonioso solido. Queste particelle primarie possono rapidamente formare aggregati, oltre che le nanogocce possono volatilizzare con conseguente impossibilità di identificarle come nanoparticelle. Le nanogocce hanno una composizione chimica estremamente complessa. Esse possono essere costituite da idrocarburi C13–C35 (es: aldeidi, chetoni, alchilnitrati), Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA - es.: benzo[a]pirene), nitro-IPA (es.: nitropirene) e si formano a partire da alcani ramificati e cicloalcani alchil-sostituiti (derivanti da incombusti e oli lubrificanti) e una piccola percentuale di acido solforico. Le nanoparticelle con nucleo carbonioso mostrano una scarsa solubilità e contengono solfati ed una frazione organica costituita da incombusti, oli lubrificanti, IPA ed ulteriori composti organici che possono condensare sulle particelle.

Tra le varie sostanze presenti gli IPA, pur rappresentando meno dello 0,1% della massa totale del particolato atmosferico, sono ritenuti una delle classi di composti chimici maggiormente responsabili della tossicità. Ciò è dovuto al fatto che gli IPA sono associati alla frazione nanoparticellare, sia come molecole che aderiscono sulla superficie che come costituenti.

Alcuni IPA sono stati classificati dalla IARC2 come probabili o possibili cancerogeni per l'uomo fin dal 1987. Questa classificazione è stata recentemente rivista<sup>4</sup> “promuovendo” il benzo[a]pirene (BaP) nella classe 1 (cancerogeni per l'uomo) e portando il ciclopenta[c,d]pirene (CPcdP), il dibenzo[a,h]antracene (DBahA) e il dibenzo[a,l]pirene (DBalP) dalla classe classe 2B

---

<sup>2</sup> International Agency for Research on Cancer (WHO)

<sup>3</sup> IARC Monographs Volume 32 *Polynuclear Aromatic Compounds* Suppl. 7 (1987)

<sup>4</sup> IARC Monographs Volume 92 in pubblicazione

alla classe 2A (probabili cancerogeni per l'uomo); nella classe 2B (possibili cancerogeni per l'uomo), oltre ai già classificati benzo[a]antracene (BaA), benzo[b]fluorantene (BbFA), benzo[j]fluorantene (BjFA), benzo[k]fluorantene (BkFA), dibenzo[a,h]pirene (DBahP), dibenzo[a,i]pirene (DBaiP), indeno[1,2,3-cd]pirene (IP), è stato inserito il benzo[j]aceantrilene. Il benzo[a]pirene (BaP) è il composto più studiato e preso in considerazione dalla normativa ed è comunemente ritenuto rappresentativo degli IPA classificati IARC.

In realtà gli IPA non sono di per sé agenti cancerogeni, ma solo alcuni loro metaboliti prodotti dall'organismo nel tentativo di renderli idrosolubili.

I meccanismi d'azione di queste sostanze cancerogene non sono ancora ben definiti. Generalmente l'azione cancerogena è esplicita non direttamente dall'IPA ma da un suo metabolita. Per quanto riguarda il benzo[a]pirene, ad esempio, sembra che questo venga convertito prima ad epossido e poi in un diolo epossido ad opera degli enzimi ossidativi. Il diolo epossido del benzo[a]pirene è un mutagene e quindi il responsabile dell'attività cancerogena di questo IPA. Si ritiene che l'azione mutagena passi attraverso formazione di addotti per reazione di addizione tra i dioli epossidi (elettrofili) e gruppi nucleofili presenti sul DNA e/o sulle proteine.

Per quanto attiene ai principali composti presenti nelle emissioni di veicoli a benzina, l'IPA più abbondante è il ciclopenta(cd)pirene e la sua concentrazione risulta 10 volte maggiore rispetto a quella del benzo(a)pirene. Le emissioni dei veicoli diesel, invece, sono caratterizzate dalla presenza di benzo-Nafto-Tiofene, che si forma durante il processo di combustione a partire da molecole organiche e zolfo.

Negli esausti dei motori diesel sono presenti, oltre ai suddetti IPA, anche altre sostanze (possibili/probabili) cancerogene, quali formaldeide, acetaldeide, butadiene, acroleina e benzene. Il rischio cancerogeno maggiore è però sempre associato al particolato (Diesel Particulate Matter -DPM); l'EPA attribuisce alle sostanze volatili degli esausti diesel un rischio cancerogeno dell'ordine di 1/milione x  $\mu\text{g}$  x 70 anni (massimo rischio per il benzene da 2 a 8/milione x  $\mu\text{g}$  x 70 anni), mentre per il DPM è riportato un rischio da 12 a 1210/milione x  $\mu\text{g}$  x 70 anni.

La concentrazione ambientale di DPM è generalmente compresa tra 5 e 30  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  ma in alcuni ambienti di lavoro si possono raggiungere concentrazioni superiori a 1000  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ .

Studi epidemiologici hanno evidenziato una stretta correlazione tra il tumore al polmone e l'esposizione al soot emesso dal diesel.

## Parte A

### **Messa a punto della procedura di campionamento**

*A cura di: Giovanna Zappa e Claudia Zoani*

Come sorgente fissa di emissione di esausti di motore diesel è stato utilizzato un mezzo per autotrasporto (Fiat Ducato anno 2002 - 2800 cm<sup>3</sup>, 93.5 kW) mantenuto nella stessa posizione con il motore in funzione al minimo per tutta la durata del campionamento. Lo scarico laterale del mezzo era orientato verso un locale di circa 25 m<sup>3</sup>, chiuso su 3 lati e completamente aperto sul lato rivolto verso il mezzo. In questo locale sono stati collocati i seguenti due sistemi di campionamento che hanno operato in parallelo:

Sistema di campionamento 1: Impattore inerziale a bassa pressione DEKATI (DLPI) dotato di pre-filtro di ingresso, 13 stadi di raccolta (fig.1), misuratore di pressione e pompa da vuoto Leybold SV65B;

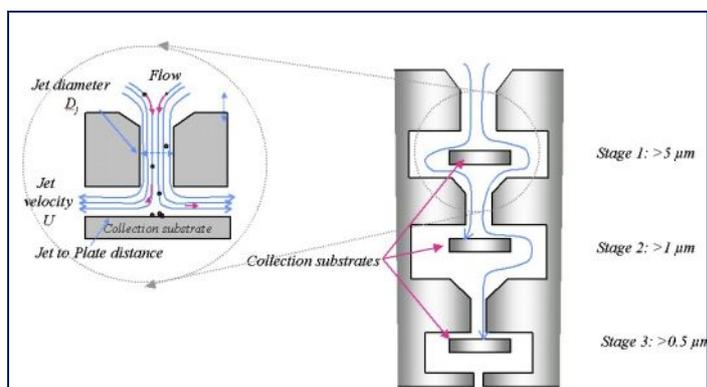
Sistema di campionamento 2: Sistema per il campionamento del PM10 operante con pompa volumetrica a membrana a flusso costante, dotata di modulo di controllo a microprocessore (TCR TECORA mod. BRAVO M2-Serie Air Guard) e testa di prelievo per funzionamento a basso flusso (17 l/min).

**Figura 1:** Impattore a 13 stadi DEKATI DLPI



L'impattore inerziale consente di separare le diverse frazioni del particolato in base alla loro massa. Infatti quando le linee di flusso di un fluido, tenuto in regime laminare, in uscita da una fenditura sottile si curvano per superare un ostacolo piano posto perpendicolarmente alla direzione del moto, le particelle di massa più elevata sospese nel fluido non riescono a seguire il cambiamento di direzione e impattano sulla superficie (fig.2). Per raccogliere le diverse frazioni vengono posizionati sulle superfici di impatto dei diversi stadi opportuni supporti rimovibili. Nel presente lavoro è stato valutato l'impiego di supporti di diverso materiale ed in particolare: policarbonato, alluminio e fibra di vetro. L'impattore DEKATI DLPI consente la raccolta frazionata del particolato di diametro aerodinamico compreso tra 0.03 e 10  $\mu\text{m}$  su 13 stadi (fig.1).

**Figura 2:** Principio di funzionamento dell'impattore inerziale



Per la taratura dell'impattore viene impiegato il foglio di calcolo fornito dalla DEKATI (fig.3). Il parametro più importante da mantenere sotto controllo è la differenza di pressione tra il primo e l'ultimo stadio di raccolta, che determina il flusso di aspirazione della pompa. In particolare per mantenere un flusso di 30 l/min a 20 °C, considerando che al di sopra dello stadio di testa (stadio 13) la pressione è quella atmosferica, il valore di pressione da mantenere al di sotto dello stadio di coda (stadio 1) è pari a 100 mbar.

Per controllare questo valore di pressione in coda l'apparato è dotato di un misuratore che funziona anche da *data-logger* con mantenimento in memoria dei valori massimi e minimi misurati durante l'intero periodo di campionamento. Dalle prove di messa a punto eseguite è emersa una notevole difficoltà a regolare "sul campo" questo valore di pressione e pertanto è stata introdotta una modifica strumentale consistente nell'aggiunta di due valvole dosatrici di precisione poste in linea rispetto alla valvola di interruzione in dotazione con l'apparato.

Figura 3: Foglio di calcolo per la taratura dell'impattore DEKATI DLPI

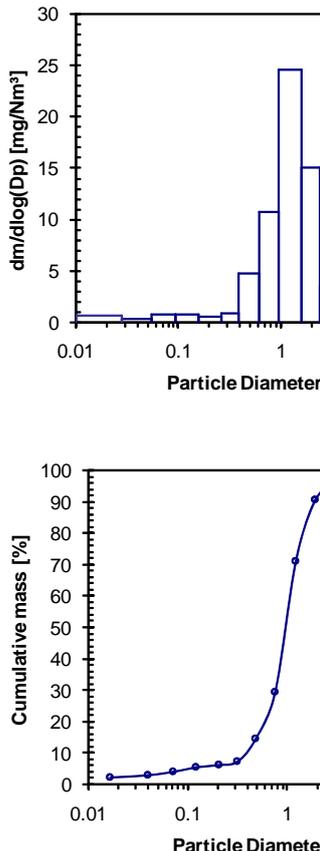


DLPI) Data processing

Description	
Project	Test
Name	sample
Date	01/01/2003
Sampling point	Before ESP
Start time	01/01/2003 16.30
Stop time	01/01/2003 17.00
Sampling time	30 min
Preseparator	None
Impactor serial number	230
Substrate numbers	1-3
Substrate type	Aluminum + APL
Filter number	1
Filter type	TX40
Notes	Sample data
Sampling point conditions	
Temperature	20 °C
Pressure	101.33 kPa
Humidity	0 vol %
Impactor inlet conditions	
Temperature	20 °C
Pressure	101.33 kPa
Impactor flow rate from the datasheet	
Flow rate	30.00 l/min
Temperature	20 °C
Pressure	101.33 kPa
Dilution ratio	
Dilution ratio	1
Flow rate at impactor inlet	
Flow rate	30.00 l/min
Normalisation Conditions	
Temperature	20 °C
Pressure	101.33 kPa
Humidity	0 vol %
Gas	
Molecular weight at standard conditions	28.96 kg/kmol
Viscosity at 296K	1.83E-05 Ns/m2
k, ratio of specific heats	1.4
R, universal gas constant	8.314 J/kmol
Viscosity at impactor inlet	1.82E-05 Ns/m2
Gas volume	
Collected volume with sampler	0.900 m3
Sample volume at sampling point	0.900 m3
Sample volume normalised	0.900 Nm3

Stage	D50 [µm]	Pressure [kPa]	D50 [µm]	Di [µm]	m1 [mg]	m2 [mg]	dm [mg]	dm/d log(Dp) [mg/Nm³]	cumulative [mg/Nm³]	cumulative [%]
Filter			0.010	0.017	16.930	17.200	0.270	0.668	0.300	2.25
1	0.029	10.00	0.028	0.039	15.920	16.000	0.080	0.303	0.389	2.91
2	0.057	22.14	0.055	0.072	16.090	16.230	0.140	0.674	0.544	4.08
3	0.097	38.24	0.094	0.122	16.360	16.500	0.140	0.690	0.700	5.25
4	0.163	68.48	0.158	0.205	16.710	16.820	0.110	0.542	0.822	6.16
5	0.274	89.28	0.265	0.320	16.660	16.790	0.130	0.889	0.967	7.24
6	0.397	97.37	0.386	0.488	16.720	17.580	0.860	4.700	1.922	14.40
7	0.633	99.69	0.616	0.765	16.210	18.020	1.810	10.707	3.933	29.48
8	0.98	100.55	0.950	1.231	16.500	21.480	4.980	24.530	9.467	70.94
9	1.64	101.02	1.597	1.951	16.850	19.200	2.350	14.997	12.078	90.51
10	2.45	101.19	2.384	3.080	16.390	17.100	0.710	3.547	12.867	96.42
11	4.08	101.25	3.979	5.107	16.730	17.000	0.270	1.383	13.167	98.67
12	6.82	101.30	6.556	8.056	16.600	16.650	0.050	0.310	13.222	99.08
13	10.11	101.32	9.899	22.247	16.750	16.860	0.110	0.174	13.344	100.00
Inlet		101.33								
Pre-separator	50.0				0.00	0.00	0.000			
Total collected mass					12.010	mg				
Mass concentration					13.344	mg/Nm³				



This sheet displays DLPI measurement results. All set correct results.

**Dekati Ltd.** tel. +358-3-3578 100  
 Osuusmyllynkatu 13 fax. +358-3-3578 140  
 FIN-33700 Tampere email support@dekati.fi  
 Finland http://www.dekati.fi

**Filling Instructions:**  
 Description: Description part is mainly ment for notes. The only necessary stopping times, but can also be used separately. (Note that prefer not filling the starting and stopping times).

Sampling point conditions: Temperature, pressure and humidity at the sampling point.  
 Measurement conditions: Temperature and pressure at the impactor inlet.  
 Impactor flow rate from the datasheet: Impactor flow rate and calibration conditions from the impactor datasheet.  
 Dilution ratio: If dilution is used, add dilution ratio here. If not, dilution ratio is 1.  
 Flow rate at impactor inlet: Flow rate at the impactor inlet in impactor inlet conditions.  
 Normalisation conditions: Temperature, pressure and humidity where sample volume was collected.  
 Gas: Sample gas molecular weight and viscosity. Default values are from the datasheet.  
 Gas volume: Collected volume with sampler is in impactor inlet conditions. If possible dilution has been taken into an account. After that, Results are calculated with normalised sample volume.  
 Impactor information from calibration data sheet: Stage pressure values and impactor D50 values can be found from the datasheet.  
 Pre-separator: If you are using pre-separator add the cut point here. The cut point must be within the limitations.  
 Collected mass: Change values of m1 and m2. Values of m1 are impactor substrates after the measurement.

**Calculations:**  
 The formulas to the calculation sheet originate mainly from Marjamaäki, M., Keskinen, J., Chen, D.-R. and Pui, D. Y. H. (ELPI), Journal of Aerosol Science 31:2, pp. 249-261  
 Hillamo, R.E. & Kauppinen, E.I. 1991. On The Performance of the Dekati DLPI. Aerosol Science and Technology 14, p. 33-47.  
 Hinds, W.C. 1999. Aerosol Technology –Properties, behavior and measurement. John Wiley & Sons, Inc. USA.

**Note:**  
 All D50% values are expressed as aerodynamic diameter of the particles.  
 The lowest limit for the filter stage is set because of drawing.

Questa modifica ha consentito di realizzare un sistema di regolazione estremamente efficace e rapido e di raggiungere una grande stabilità nei valori di pressione durante tutta la durata dei campionamenti, infatti durante i numerosi campionamenti eseguiti il valore di pressione misurato si è mantenuto sempre entro l'intervallo 99 – 101 mbar, ampiamente inferiore alle specifiche di lavoro indicate ( $100 \pm 5$  mbar). Il sistema di campionamento del PM10 consente la raccolta di questa frazione di particolato su filtri di Teflon di 47 mm di diametro e porosità 1  $\mu\text{m}$ .



I due sistemi di campionamento sono stati collocati in posizioni adiacenti (circa 30 cm di distanza tra le teste), alla stessa altezza da terra (circa 1.50 m) ed hanno operato rigorosamente in simultaneo (fig. 4).

**Figura 4:** Campionamento in parallelo del particolato emesso da motore diesel



I campioni raccolti con entrambi i sistemi di campionamento sono stati utilizzati per la messa a punto delle metodologie di caratterizzazione chimica, chimico-fisica e genotossicologica.

In primo luogo sono state effettuate determinazioni gravimetriche, misurando l'aumento ponderale dei filtri. A tal fine i filtri sono stati pesati con bilancia analitica (incertezza di misura 0.02 mg) prima e dopo il campionamento, provvedendo a condizionarli, prima di ciascuna pesata, per almeno 24 h in un locale a temperatura e umidità controllata ( $T = 22^{\circ} \text{C}$  e U.R. 50%). I risultati relativi al particolato sono stati poi espressi come quantità in  $\mu\text{g}$  ( $Q$ ) per unità di volume di aria ( $V_{\text{aria}}$  in  $\text{m}^3$ ), utilizzando la seguente relazione:

$$C_{\text{aria}} = \frac{Q}{V_{\text{aria}}}$$

Per il sistema DEKATI, visto il valore costante di pressione ottenuto, si è considerato un flusso costante di 30 l/min e pertanto il volume totale di aria per 3 ore di campionamento è risultato pari a  $5.4 \text{ m}^3$ . Il sistema TECORA, invece, è fornito di un contatore volumetrico; il valore registrato è stato in ogni caso confrontato con il valore calcolato a partire dal flusso di aspirazione impostato e dal tempo di campionamento.

Una volta definite le condizioni operative, si è proceduto alla raccolta dei campioni. Sono stati eseguiti 12 campionamenti successivi, utilizzando, come supporti di raccolta per l'impattore i seguenti differenti filtri:

- Filtri in alluminio (diametro 25 mm) – 4 campionamenti
- Filtri in policarbonato (diametro 25 mm) – 4 campionamenti
- Filtri in fibra di vetro (diametro 25 mm, porosità  $1 \mu\text{m}$ ) – 4 campionamenti

Per ogni campionamento si sono quindi ottenuti 13 filtri corrispondenti ai 13 differenti stadi di raccolta e 1 filtro in teflon (diametro 47 mm) corrispondente alla raccolta del PM10 con la testa TECORA (fig. 5). Il totale dei campioni raccolti è quindi di  $14 \times 12 = 168$ .

I filtri in fibra di vetro sono stati mantenuti al buio e a  $+4^{\circ} \text{C}$  sino all'analisi, al fine di evitare processi di degradazione fotochimica a carico degli IPA.

**Figura 5** - Il filtro in teflon (PM10) e i 13 filtri in polycarbonato (frazioni da 0.03 a 10 µm) dopo il campionamento



**Figura 6** - I 13 stadi di raccolta dell'impattore con i 13 filtri in alluminio (frazioni da 0.03 a 10 µm) dopo il campionamento



## Risultati

In tabella 1 si riportano i risultati relativi al campionamento del particolato con testa PM10.

I differenti valori di concentrazione di PM10 misurati possono essere attribuiti alle diverse condizioni climatiche: in particolare in condizioni di presenza di forte vento (N\_D5 e N\_D7) si sono misurate le minori quantità di particolato su filtro e ciò è in accordo con una maggiore ventilazione del locale adibito al campionamento. I casi in cui si sono misurate le più alte concentrazioni di PM10 (N\_D2 e N\_D8) corrispondono ai casi in cui il volume misurato di aria aspirato è risultato notevolmente inferiore, nonostante il flusso di aspirazione della pompa fosse stato impostato sempre a 17 l/min. Ciò potrebbe essere la conseguenza di una perdita di carico dovuta alle grandi quantità di particolato raccolte su filtro.

**Tabella 1:** Risultati del campionamento del PM10 (filtri in Teflon, Ø 47 mm, porosità 1 µm)

	Sigla filtro	Tara (g)	Peso lordo (g)	Peso netto (g)	ora inizio	m <sup>3</sup> iniziali	ora fine	m <sup>3</sup> finali	m <sup>3</sup> aspirati	µg/m <sup>3</sup>
N_D1	N_T1	0.08099	0.08215	0.00116	12.45	3092.388	15.50	3095.528	3.14	369
N_D2	N_T2	0.07988	0.08140	0.00152	9.30	3095.528	12.40	3097.006	1.48	1028
N_D3	N_T3	0.08098	0.08213	0.00115	13.30	3097.006	16.30	3099.503	2.50	461
N_D4	N_T4	0.08310	0.08462	0.00152	10.40	3099.503	13.40	3102.235	2.73	556
N_D5	N_T5	0.08229	0.08333	0.00104	14.10	3102.235	17.15	3105.357	3.12	333
N_D6	N_T6	0.08063	0.08218	0.00155	10.00	3105.357	13.00	3108.383	3.03	512
N_D7	N_T7	0.08032	0.08102	0.00070	14.05	3108.383	17.05	3111.451	3.07	228
N_D8	N_T8	0.08112	0.08261	0.00149	9.45	3111.451	12.50	3113.368	1.92	777

Nelle tabelle 2 e 3 e nelle figure 7 e 8 si riportano, rispettivamente per i filtri in policarbonato e in alluminio, i risultati dei campionamenti effettuati con l'impattore a 13 stadi, evidenziando i casi in cui si sono misurate concentrazioni inferiori al limite di quantificazione gravimetrica.

Nonostante i campionamenti siano stati eseguiti in condizioni ambientali differenti (soprattutto presenza o meno di condizioni ventose) si registra una discreta riproducibilità. In particolare i profili granulometrici risultano abbastanza riproducibili, sia utilizzando i filtri di policarbonato che quelli di alluminio. I profili ottenuti (fig. 9 e 10) mostrano, in particolare, un picco compreso tra le frazioni 0.06 e 1 µm, con massimo intorno alla frazione corrispondente allo stadio n.4 (D50% 0.17 µm).

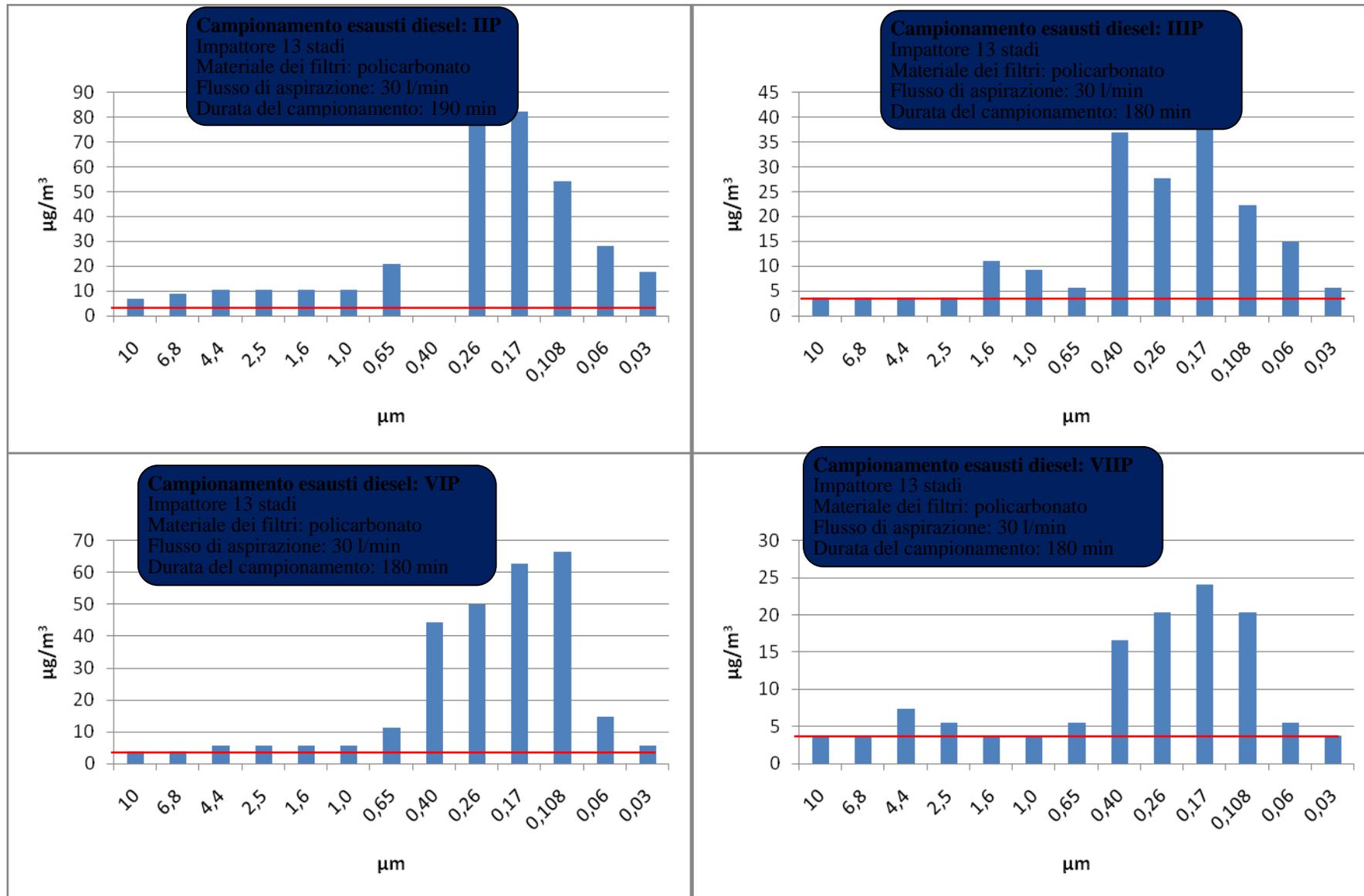
**Tabella 1:** Risultati del campionamento con impattore (filtri in Policarbonato Ø 25mm)

Campionamento	Sigla filtro	Tara (g)	Lordo (g)	Netto (g)	g	µg	m <sup>3</sup>	µg/m <sup>3</sup>
ND_02	N_P1	0.00698	0.00708	0.00010	0.00010	100	5.7	17.5
	N_P2	0.00710	0.00726	0.00016	0.00016	160	5.7	28.1
	N_P3	0.00705	0.00736	0.00031	0.00031	310	5.7	54.4
	N_P4	0.00718	0.00765	0.00047	0.00047	470	5.7	82.5
	N_P5	0.00726	0.00770	0.00044	0.00044	440	5.7	77.2
	N_P6	0.00717	0.00786	0.00069	0.00069	690	5.7	121
	N_P7	0.00713	0.00725	0.00012	0.00012	120	5.7	21.1
	N_P8	0.00685	0.00691	0.00006	0.00006	60	5.7	10.5
	N_P9	0.00706	0.00712	0.00006	0.00006	60	5.7	10.5
	N_P10	0.00690	0.00696	0.00006	0.00006	60	5.7	10.5
	N_P11	0.00705	0.00711	0.00006	0.00006	60	5.7	10.5
	N_P12	0.00693	0.00698	0.00005	0.00005	50	5.7	8.8
	N_P13	0.00690	0.00694	0.00004	0.00004	40	5.7	7.0
ND_03	N_P14	0.00708	0.00711	0.00003	0.00003	30	5.4	5.6
	N_P15	0.00711	0.00719	0.00008	0.00008	80	5.4	14.8
	N_P16	0.00723	0.00735	0.00012	0.00012	120	5.4	22.2
	N_P17	0.00720	0.00741	0.00021	0.00021	210	5.4	38.9
	N_P18	0.00715	0.00730	0.00015	0.00015	150	5.4	27.8
	N_P19	0.00711	0.00731	0.00020	0.00020	200	5.4	37.0
	N_P20	0.00690	0.00693	0.00003	0.00003	30	5.4	5.6
	N_P21	0.00700	0.00705	0.00005	0.00005	50	5.4	9.3
	N_P22	0.00716	0.00722	0.00006	0.00006	60	5.4	11.1
	N_P23	0.00709	0.00710	0.00001	< 0.00002	< 20	5.4	< 3.7
	N_P24	0.00723	0.00723	0.00000	< 0.00002	< 20	5.4	< 3.7
	N_P25	0.00699	0.00700	0.00001	< 0.00002	< 20	5.4	< 3.7
N_P26	0.00721	0.00722	0.00001	< 0.00002	< 20	5.4	< 3.7	
ND_06	N_P27	0.00710	0.00713	0.00003	0.00003	30	5.4	5.6
	N_P28	0.00713	0.00721	0.00008	0.00008	80	5.4	14.8
	N_P29	0.00688	0.00724	0.00036	0.00036	360	5.4	66.7
	N_P30	0.00709	0.00743	0.00034	0.00034	340	5.4	63.0
	N_P31	0.00706	0.00733	0.00027	0.00027	270	5.4	50.0
	N_P32	0.00712	0.00736	0.00024	0.00024	240	5.4	44.4
	N_P33	0.00711	0.00717	0.00006	0.00006	60	5.4	11.1
	N_P34	0.00691	0.00694	0.00003	0.00003	30	5.4	5.6
	N_P35	0.00692	0.00695	0.00003	0.00003	30	5.4	5.6
	N_P36	0.00697	0.00700	0.00003	0.00003	30	5.4	5.6
	N_P37	0.00706	0.00709	0.00003	0.00003	30	5.4	5.6
	N_P38	0.00712	0.00712	0.00000	< 0.00002	< 20	5.4	< 3.7
	N_P39	0.00703	0.00702	-0.00001	< 0.00002	< 20	5.4	< 3.7
ND_07	N_P40	0.00730	0.00732	0.00002	< 0.00002	< 20	5.4	< 3.7
	N_P41	0.00714	0.00717	0.00003	0.00003	30	5.4	5.6
	N_P42	0.00690	0.00701	0.00011	0.00011	110	5.4	20.4
	N_P43	0.00691	0.00704	0.00013	0.00013	130	5.4	24.1
	N_P44	0.00694	0.00705	0.00011	0.00011	110	5.4	20.4
	N_P45	0.00703	0.00712	0.00009	0.00009	90	5.4	16.7
	N_P46	0.00717	0.00720	0.00003	0.00003	30	5.4	5.6
	N_P47	0.00716	0.00717	0.00001	< 0.00002	< 20	5.4	< 3.7
	N_P48	0.00721	0.00723	0.00002	< 0.00002	< 20	5.4	< 3.7
	N_P49	0.00704	0.00707	0.00003	0.00003	30	5.4	5.6
	N_P50	0.00702	0.00706	0.00004	0.00004	40	5.4	7.4
	N_P51	0.00710	0.00710	0.00000	< 0.00002	< 20	5.4	< 3.7
	N_P52	0.00710	0.00712	0.00002	< 0.00002	< 20	5.4	< 3.7

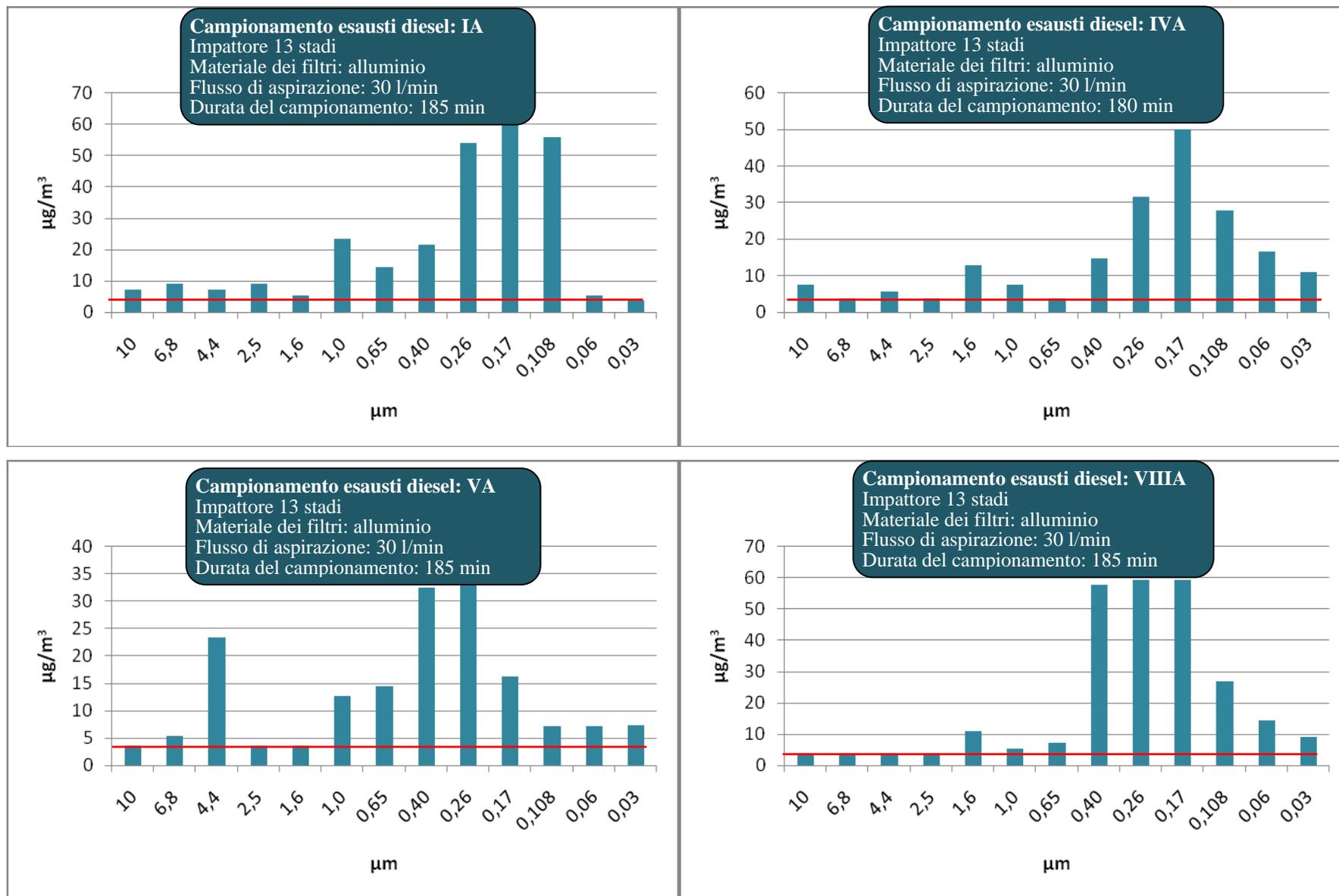
**Tabella 2:** Risultati del campionamento con impattore (filtri in Alluminio Ø 25mm)

Campionamento	Sigla filtro	Tara (g)	Lordo (g)	Netto (g)	g	µg	m <sup>3</sup>	µg/m <sup>3</sup>
ND_01	N_AI1	0.01377	0.01379	0.00002	< 0.00002	< 20	5.55	< 3.6
	N_AI2	0.01382	0.01385	0.00003	0.00003	30	5.55	5.4
	N_AI3	0.01387	0.01418	0.00031	0.00031	310	5.55	55.9
	N_AI4	0.01373	0.01408	0.00035	0.00035	350	5.55	63.1
	N_AI5	0.01381	0.01411	0.00030	0.00030	300	5.55	54.1
	N_AI6	0.01368	0.01380	0.00012	0.00012	120	5.55	21.6
	N_AI7	0.01391	0.01399	0.00008	0.00008	80	5.55	14.4
	N_AI8	0.01388	0.01401	0.00013	0.00013	130	5.55	23.4
	N_AI9	0.01374	0.01377	0.00003	0.00003	30	5.55	5.4
	N_AI10	0.01361	0.01366	0.00005	0.00005	50	5.55	9.0
	N_AI11	0.01366	0.01370	0.00004	0.00004	40	5.55	7.2
	N_AI12	0.01373	0.01378	0.00005	0.00005	50	5.55	9.0
	N_AI13	0.01377	0.01381	0.00004	0.00004	40	5.55	7.2
ND_04	N_AI14	0.01378	0.01384	0.00006	0.00006	60	5.4	11.1
	N_AI15	0.01374	0.01383	0.00009	0.00009	90	5.4	16.7
	N_AI16	0.01384	0.01399	0.00015	0.00015	150	5.4	27.8
	N_AI17	0.01382	0.01409	0.00027	0.00027	270	5.4	50.0
	N_AI18	0.01384	0.01401	0.00017	0.00017	170	5.4	31.5
	N_AI19	0.01401	0.01409	0.00008	0.00008	80	5.4	14.8
	N_AI20	0.01389	0.01390	0.00001	< 0.00002	< 20	5.4	< 3.7
	N_AI21	0.01382	0.01386	0.00004	0.00004	40	5.4	7.4
	N_AI22	0.01375	0.01382	0.00007	0.00007	70	5.4	13.0
	N_AI23	0.01371	0.01371	0.00000	< 0.00002	< 20	5.4	< 3.7
	N_AI24	0.01383	0.01386	0.00003	0.00003	30	5.4	5.6
	N_AI25	0.01388	0.01388	0.00000	< 0.00002	< 20	5.4	< 3.7
ND_05	N_AI26	0.01380	0.01384	0.00004	0.00004	40	5.4	7.4
	N_AI27	0.01372	0.01376	0.00004	0.00004	40	5.55	7.2
	N_AI28	0.01384	0.01388	0.00004	0.00004	40	5.55	7.2
	N_AI29	0.01375	0.01384	0.00009	0.00009	90	5.55	16.2
	N_AI30	0.01378	0.01397	0.00019	0.00019	190	5.55	34.2
	N_AI31	0.01385	0.01403	0.00018	0.00018	180	5.55	32.4
	N_AI32	0.01382	0.01390	0.00008	0.00008	80	5.55	14.4
	N_AI33	0.01377	0.01384	0.00007	0.00007	70	5.55	12.6
	N_AI34	0.01385	0.01387	0.00002	< 0.00002	< 20	5.55	3.6
	N_AI35	0.01381	0.01375	-0.00006	< 0.00002	< 20	5.55	3.6
	N_AI36	0.01370	0.01383	0.00013	0.00013	130	5.55	23.4
N_AI37	0.01388	0.01391	0.00003	0.00003	30	5.55	5.4	
N_AI38	0.01370	0.01371	0.00001	< 0.00002	< 20	5.55	< 3.6	
N_AI39	0.01385	0.01385	0.00000	< 0.00002	< 20	5.55	< 3.6	
ND_08	N_AI40	0.01368	0.01373	0.00005	0.00005	50	5.55	9.0
	N_AI41	0.01383	0.01391	0.00008	0.00008	80	5.55	14.4
	N_AI42	0.01379	0.01394	0.00015	0.00015	150	5.55	27.0
	N_AI43	0.01386	0.01419	0.00033	0.00033	330	5.55	59.5
	N_AI44	0.01389	0.01422	0.00033	0.00033	330	5.55	59.5
	N_AI45	0.01374	0.01406	0.00032	0.00032	320	5.55	57.7
	N_AI46	0.01371	0.01375	0.00004	0.00004	40	5.55	7.2
	N_AI47	0.01383	0.01386	0.00003	0.00003	30	5.55	5.4
	N_AI48	0.01373	0.01379	0.00006	0.00006	60	5.55	10.8
	N_AI49	0.01373	0.01375	0.00002	< 0.00002	< 20	5.55	< 3.6
	N_AI50	0.01384	0.01382	-0.00002	< 0.00002	< 20	5.55	< 3.6
	N_AI51	0.01379	0.01378	-0.00001	< 0.00002	< 20	5.55	< 3.6
N_AI52	0.01386	0.01387	0.00001	< 0.00002	< 20	5.55	< 3.6	

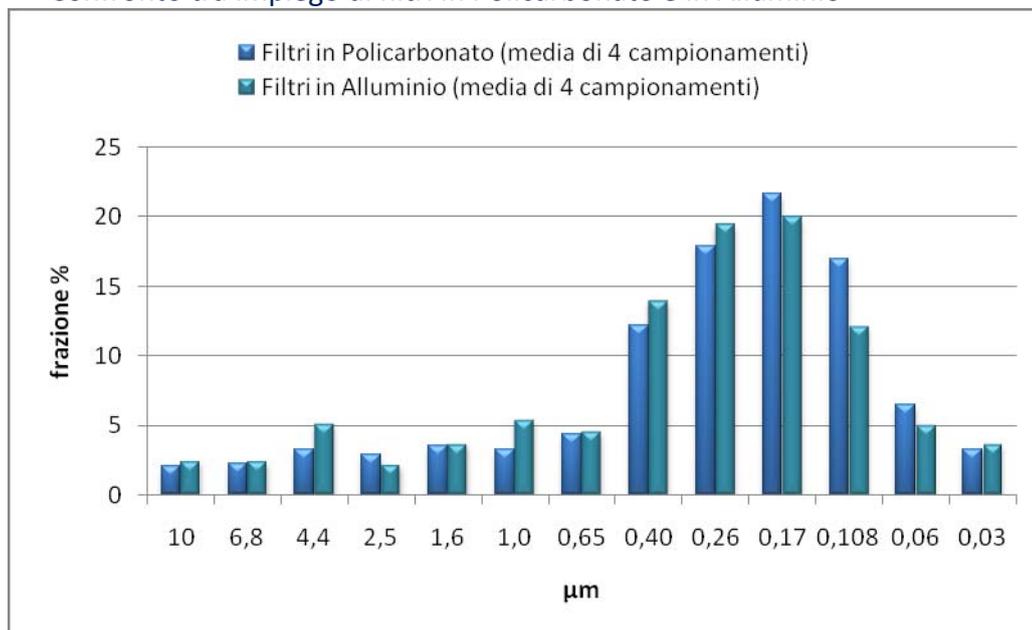
**Figura 7** - Particolato emesso da motore diesel raccolto con impattore multistadio su filtri in policarbonato



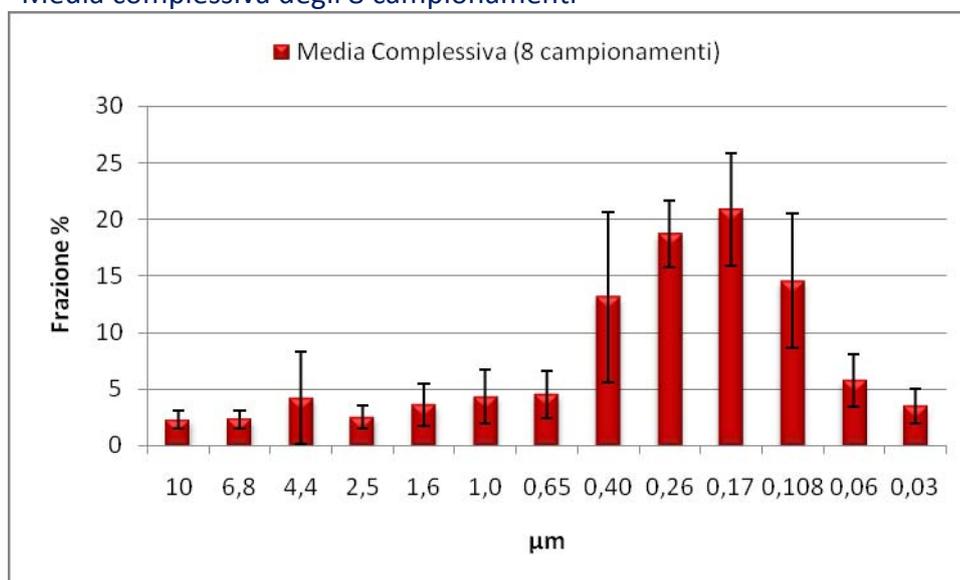
**Figura 8 - Particolato emesso da motore diesel raccolto con impattore multistadio su filtri in alluminio**



**Figura 9** - Distribuzione granulometrica del Particolato emesso da motore diesel. Confronto tra impiego di filtri in Policarbonato e in Alluminio



**Figura 10** - Distribuzione granulometrica del Particolato emesso da motore diesel. Media complessiva degli 8 campionamenti



## **Parte B**

### **Messa a punto delle metodologie chimico-analitiche per la caratterizzazione del particolato**

*A cura di: Rosanna Gatti, Giovanna Zappa e Claudia Zoani*

#### ***Metodologie analitiche per l'estrazione e la determinazione dei composti organici***

Per l'estrazione delle sostanze organiche possono essere impiegate diverse procedure. La più utilizzata è l'estrazione Soxhlet che consente buoni recuperi ma presenta alcuni svantaggi, quali i tempi lunghi di esecuzione e la necessità di impiegare grandi quantità di solvente. In alternativa possono essere utilizzate l'estrazione a microonde, l'estrazione in fase supercritica (SCF), la microestrazione in fase solida (SPME) e l'estrazione in bagno a ultrasuoni. Sono state dapprima eseguite prove di estrazione dei filtri in bagno a ultrasuoni con acetonitrile (CH<sub>3</sub>CN). La scelta di questo solvente consente la diretta iniezione in HPLC con rivelazione UV e a fluorescenza, a meno che la complessità della matrice reale non richieda una fase intermedia della procedura analitica consistente in una purificazione dell'estratto con scambio di solvente. Sono state effettuate prove di fortificazione aggiungendo i filtri con quantità note di standard mix di IPA (fortificazione a due livelli di concentrazione, *high* e *low*) procedendo all'estrazione in bagno a ultrasuoni per 30' con CH<sub>3</sub>CN impiegando vial di vetro ambrato.

Per la determinazione degli IPA è stata messa a punto una metodologia analitica mediante HPLC che prevede l'utilizzo, come fase stazionaria, di una colonna C18 a fase inversa (0.46 cm i.d. x 15 cm, diametro delle particelle 5 µm) e, come fase mobile, acqua ed acetonitrile in gradiente. Le migliori prestazioni analitiche sono state ottenute impiegando il rivelatore fluorimetrico. In tabella 4 si riportano le lunghezze d'onda di eccitazione ed emissione impiegate.

Quali soluzione di taratura è stata impiegata una miscela certificata contenente 16 diversi IPA (10 µg/ml ciascuno) fornite dalla Supelco.

I risultati dei recuperi dei diversi analiti con i filtri fortificati (e analizzati in HPLC in fase inversa) si sono rivelati insoddisfacenti e pertanto si è studiato un metodo alternativo di estrazione. Inoltre, l'analisi di alcune matrici reali ha evidenziato una complessità del campione tale da suggerire non solo la necessità di un procedimento di purificazione, ma anche di un metodo alternativo di separazione strumentale per la scarsa capacità di risoluzione del sistema HPLC.

**Tabella 4:** Lunghezze d'onda impiegate con il rivelatore spettrofluorimetrico dell'HPLC

Composto	$\lambda_{ecc}$	$\lambda_{em}$
Naftalene	280	340
Acenaftene	280	340
Fluorene	280	340
Fenantrene	265	389
Antracene	265	389
Fluorantene	280	435
Pirene	265	389
Benzo[a]antracene	265	389
Crisene	265	389
Benzo[e]pirene	265	389
Benzo[b]fluorantene	280	410
Benzo[k]fluorantene	280	410
Benzo[a]pirene	280	410
Dibenzo[a,h]antracene	280	410
Benzo[g,h,i]perilene	280	410
Indeno[1,2,3,cd]pirene	305	500

La difficoltà dell'estrazione è dovuta alla particolare e complessa combinazione analiti-matrice ed in particolare alla forza di adsorbimento degli IPA (con le loro strutture aromatiche planari) sulla superficie carboniosa delle particelle.

Considerando queste difficoltà si è ricorso all'estrazione con fluido pressurizzato (PLE) che, grazie all'impiego di temperatura e pressione più elevate, consente una maggiore efficacia di estrazione rispetto alle tecniche di estrazione tradizionali. Le condizioni sperimentali sono state le seguenti:

i filtri, inseriti in una cella di estrazione da 11 ml preventivamente lavata e posta in un estrattore ASE 100 (Dionex corp.), vengono sottoposti a due cicli di estrazione con toluene (195 °C, 15.2 MPa, tempo di estrazione statica: 20 min). I due estratti ottenuti (ca. 25 ml ciascuno) vengono raccolti in un unico vial ed il volume viene concentrato fino a ca. 300  $\mu$ l sotto corrente di azoto in un bagno termostatico alla temperatura di 50 °C. Gli estratti vengono poi ripresi con 1 ml di diclorometano ( $CH_2Cl_2$ ) e divisi in due aliquote: una (10%) per l'analisi chimica e l'altra (90%) per le prove di mutagenicità ( $M_{tot}$ ).

Come fase successiva si è poi messa a punto una procedura di purificazione e frazionamento degli estratti. Al fine di separare e raccogliere frazioni per classi di composti a diversa polarità, si esegue una separazione per cromatografia gravimetrica su colonna. Conseguentemente, gli estratti destinati all'analisi chimica sono purificati e frazionati mediante colonna cromatografica in vetro (18 x 1 cm) impaccata con gel di silice (Sigma Aldrich 60 Å, 70-230 mesh) precedentemente disattivata con il 10% di acqua distillata e sospesa in n-esano. Gli estratti sono lasciati adsorbire su ca. 0.5 ml di gel di silice. Il solvente viene fatto evaporare sotto corrente di azoto e la silice, contenente l'estratto, viene posta in testa alla colonna.

Vengono raccolte due frazioni di polarità crescente:

- ❖ frazione 1 (F1, 14 ml di n-esano), idrocarburi alifatici "leggeri";
- ❖ frazione 2 (F2, 72 ml di n-esano), idrocarburi alifatici "pesanti" e IPA;

[è possibile altresì ottenere le seguenti ulteriori frazioni contenenti molecole non oggetto di indagine della presente ricerca: frazione 3 (F3, 72 ml di una miscela 25%CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> in n-esano), Nitro-IPA; frazione 4 (F4, 72 ml di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); frazione 5 (F5, 72 ml di metanolo)].

La frazione 2, contenente gli IPA, viene a sua volta suddivisa in due aliquote: una (5%) per l'analisi chimica e l'altra (95%) per le prove di mutagenicità (M<sub>fraz2</sub>).

Le 2 aliquote per le prove di mutagenicità (M<sub>tot</sub> e M<sub>fraz2</sub>) vengono poi portate a secco e riprese con dimetilsolfossido (DMSO), mentre le aliquote per l'analisi chimica vengono concentrate sotto corrente di azoto. I campioni così ottenuti sono portati al volume di 1 ml con una soluzione di isotano ed analizzati mediante Gas Cromatografia con rivelazione a ionizzazione di fiamma (GC-FID) nelle condizioni riportate in tabella 5.

<b>Tabella 5 - Condizioni operative Gas Cromatografia (GC)</b>	
Apparecchiatura	Varian 3800
Colonna	Supelco SPB-5 (30m, 0.53mm ID, 1.5 µm)
Carrier	Elio (1 ml/min)
Forno	100 °C (1 min) a 300 °C (8 °C/min), tenuto a 300 °C per 10 min
Rivelatore	FID (300 °C)
Volume iniettato	1 µl

**Metodologie analitiche per l'estrazione e la determinazione dei composti inorganici**

Per analizzare la componente inorganica del particolato i filtri in teflon del PM10 e le diverse frazioni raccolte su filtri di policarbonato o fibra di vetro, dopo la misura gravimetrica, vengono sottoposte ad una procedura di lisciviazione e le soluzioni vengono analizzate mediante le tecniche di Cromatografia Ionica (IC), Spettrometria di Emissione Atomica a Plasma Accoppiato Induttivamente (ICP-AES) e Spettrometria di Assorbimento Atomico con Atomizzazione Elettrotermica (ET-AAS).

A tal fine, per la determinazione di anioni, quali solfati e nitrati, è stata messa a punto la seguente procedura analitica: trattare il filtro con 5 ml di una soluzione di tampone acetico ( $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COOK}$ ) 0.02 M (pH 4.5) ed agitare in bagno ultrasuoni per 15', prelevare il surnatante ed analizzare mediante IC, impiegando le condizioni sotto riportate; per la determinazione di metalli ed altri elementi tossici la procedura prevede la dissoluzione del particolato raccolto su filtro con 3 ml di  $\text{HNO}_3$  e 2 ml di HCl e, dopo aver portato al volume di 25 ml, l'analisi mediante ICP-AES e ET-AAS, nelle condizioni riportate nelle tabelle 6, 7 e 8:

<b>Tabella 6 - Condizioni operative Cromatografia Ionica (IC)</b>	
Apparecchiatura	DIONEX DX 120
Colonna	Ion Pac AS9-HC (4x250 mm)
Eluente	9.0 mM $\text{Na}_2\text{CO}_3$
Flusso	1 ml/min
Rivelatore	A conducibilità
Soppressore	ASRS-ULTRA
Loop	50 $\mu\text{l}$
Pressione	2250 psi

<b>Tabella 7 - Condizioni analitiche ET-AAS</b>				
	<b>Cd</b>	<b>Cr</b>	<b>Ni</b>	<b>Pb</b>
Alimentazione lampada catodo cavo (mA)	3,0	7,0	7,0	5,0
Lunghezza d'onda (nm)	228,8	357,9	232,0	283,3
Banda passante (nm)	0,5	0,2	0,2	0,5
Volume introdotto ( $\mu$ l)	10	10	10	10
Temperatura di essiccamento ( $^{\circ}$ C)	120	120	120	120
Temperatura di incenerimento ( $^{\circ}$ C)	250	1000	800	600
Temperatura di atomizzazione ( $^{\circ}$ C)	1800	2600	2400	2300
Correzione del fondo	Zeeman (MSR=82%)	Zeeman (MSR=94%)	Zeeman (MSR=83%)	Zeeman (MSR=81%)
Intervallo di lavoro ( $\mu$ g/l)	1-5	4-20	10-50	10-50
Modificatore di matrice	H3PO4 1000 $\mu$ g/ml	no	no	no
Segnale misurato	Altezza picco (unità di Assorbanza)			
Numero di repliche	3			

<b>Tabella 8 - Condizioni operative ICP-AES Varian Vista MPX</b>	
Configurazione	Torcia assiale
Generatore RF	40 MHz free running raffreddato ad aria
Potenza RF (KWatt)	1,2
Torcia	a tre camere concentriche in quarzo
Gas (plasmageno, ausiliario e nebulizzatore)	Argon
Flusso gas plasmageno (l min-1)	15
Flusso gas ausiliario (l min-1)	1,5
Flusso gas al nebulizzatore (l min-1)	0,9
Spray chamber	ciclonica in vetro
Nebulizzatore	a flussi concentrici in vetro (tipo Meinhard)
Portata pompa peristaltica a 3 vie	15 l min-1
Sistema di dispersione	Policromatore Echelle termostato a 35°C e purgato con gas inerte; lunghezza focale 400 mm; prisma CaF <sub>2</sub> ; reticolo 9474 righe/mm.
Rivelatore	CCD 1,12 milioni di pixel 15x15 µm con raffreddamento peltier a doppio stadio (-30°C) e protezione anti blooming
Software per controllo strumentazione e acquisizione/trattamento dati	ICP Expert versione 4
Lunghezze d'onda analitiche Al – 308.215 nm; As – 228.812 nm; B – 249.772; Ba – 455.403; Ca – 396.847 nm; Cd–228.802 nm; Co – 238.892 nm; Cr-284.325 nm; Cu – 222.778 nm; Fe - 238.204 nm; Li – 670.783; Mg – 279.553 nm; Mn–257.610 nm; Mo – 202.032; Na–589.592 nm; Ni - 231.604 nm; P – 213.618; Pb - 220.353 nm; S – 181.972; Sb – 206.834 nm; Si – 251.611; Sn – 189.927; Sr – 407.771; Ti – 336.122; V – 311.837 nm; Zn – 213.857 nm; Zr – 343.823	

## **Parte C**

### **Messa a punto ed esecuzione di saggi su colture cellulari per la valutazione dell'effetto genotossico del particolato atmosferico.**

*A cura di: Alessia d'Alessio e Rita di Bonito*

#### **Introduzione**

Il particolato atmosferico raccolto con i sistemi di campionamento precedentemente descritti risulta essere un miscuglio composto da sostanze di natura fisico-chimica diversa di cui va attentamente valutato l'effetto della concentrazione e l'influenza dei solventi utilizzati per l'estrazione. Nella valutazione dell'effetto genotossico vengono utilizzati metodi basati su colture cellulari e la scelta del sistema da utilizzare è dipendente dalle caratteristiche delle sostanze. L'effetto genotossico si differenzia dall'effetto tossico in quanto non produce effetti citotossici immediati ma mutazioni in bassa percentuale. Si rende dunque necessario eseguire esperimenti preliminari per stabilire la concentrazione da utilizzare tale che non produca un effetto citotossico immediato che inibendo la crescita cellulare potrebbe dare origine a falsi negativi. Inoltre, la natura chimica del particolato rende necessario per l'estrazione dai filtri di raccolta l'uso di solventi organici. Vanno quindi effettuati esperimenti preliminari per la valutazione dell'effetto del diluente sulle colture, in modo da scegliere la concentrazione soglia da utilizzare nel test.

Essendo il particolato oggetto di studio composto da frazioni di diversa natura chimico-fisica, si è ritenuto necessario effettuare indagini sia per valutare l'effetto di concentrazioni diverse di singoli componenti che per valutare l'effetto sinergico complessivo dell'insieme di componenti anche nel caso non siano rilevabili effetti genotossici delle singole frazioni. La valutazione dei sistemi disponibili ha condotto alla scelta del test di Ames, per la valutazione di genotossicità di sostanze presenti nel particolato atmosferico. Il principio del test si basa sulla capacità di retromutazione in seguito all'esposizione con sostanze mutagene ed utilizza ceppi *Salmonella typhimurium* recanti diversi tipi di mutazioni nel gene deputato alla sintesi dell'Istidina, che conferiscono incapacità di crescere in assenza di questo amminoacido. La positività, intesa come mutagenicità, viene valutata sul numero dei batteri che riacquistano la capacità di crescere in assenza di istidina in seguito ad una seconda mutazione (retromutazioni), dovuta

all'esposizione a sostanze mutagene. Ne nostro test sono stati utilizzati due ceppi di *Salmonella typhimurium* che permettono di evidenziare due diversi tipi di danni a livello di una o poche coppie di basi nel DNA (mutazioni puntiformi). In particolare il ceppo TA98 rileva mutazioni per inserzione o delezione di basi mentre il ceppo TA100 rileva mutazioni per sostituzione di basi. Si rende inoltre utile distinguere le sostanze mutagene dirette, che possono agire direttamente sul DNA (es: nitroderivati degli IPA) dai promutageni, che per esercitare la loro azione mutagena devono essere metabolizzate dal fegato (es: gli IPA). A tale scopo tutti i test sono stati condotti con e senza attivazione metabolica esogena aggiungendo al terreno di coltura estratti della frazione microsomiale epatica (S9) dei ratti nei quali è stata stimolata l'attività degli enzimi epatici.

La natura chimico-fisica ed il metodo di raccolta del particolato atmosferico oggetto del nostro studio hanno richiesto una indagine preliminare per valutare la corretta conduzione del test ed eliminare alcuni fattori che ne possano falsare i risultati.

## **Materiali e Metodi**

Sono state eseguite sperimentazioni preliminari per valutare l'effetto citotossico dei solventi di possibile uso per l'estrazione del particolato allo scopo di individuare sostanze compatibili con la natura fisico-chimica delle sostanze da estrarre e prive di inibizione sulla crescita delle colture cellulari. Il DMSO non ha mostrato inibizione della crescita cellulare alla concentrazione 25X ed è quindi stato utilizzato come solvente e controllo negativo per tutte le prove. Sono state eseguite sperimentazioni per la valutazione dell'effetto del potenziale mutagenico di soluzioni di sostanze di riferimento caratterizzate da attività genotossica su colture dei ceppi TA98 e TA100 di *Salmonella typhimurium*. Sono stati valutati diversi protocolli descritti in letteratura per scegliere il più adatto alle problematiche poste dall'analisi di un miscuglio complesso di particolato non solubile in soluzione acquosa ed è stato scelto per l'esecuzione del lavoro il metodo proposto dal kit Ames MPFTM 98/100 prodotto della ditta Xenometrix (Allschwill, Svizzera). Tale kit utilizza due ceppi di *Salmonella* TA98 e TA100 caratterizzati sia da mutazioni che li rendono incapaci di crescere in assenza di Istidina che da una mutazione che rende la parete lipopolisaccaridica maggiormente permeabile a sostanze chimiche complesse. L'aspetto innovativo del kit sta nell'utilizzo di un indicatore nel terreno di incubazione che produce un

cambiamento visibile di colore e rende evidente il risultato positivo. Inoltre il metodo è basato su un elevato numero di replicazioni e l'utilizzo di un software per la raccolta ed elaborazione statistica dei dati fornito appositamente dalla ditta. Gli esperimenti sono stati eseguiti utilizzando come sostanza mutagena una soluzione contenente 2.0 µg/ml di 2-nitrofluorene e 0.1 µg/ml 4-nitroquinoline N-oxide in DMSO. Sono state testate sei diverse diluizioni delle soluzioni iniziale per ogni ceppo e le capacità di retromutazione evidenziate in 48 colture ognuna, con 3 replicazioni. La presenza di colonie revertanti è stata individuata dal viraggio di colore del mezzo di coltura ed un aumento statisticamente significativo della loro frequenza considerata come prova di mutagenicità. Parallelamente è stato eseguito lo stesso test sui ceppi TA98 e TA100 in presenza di attivatore S9 estratto da frazione lisosomale del fegato di ratto attivato, utilizzando come sostanza da testare 0.1 µg/ml 2-Aminoantracene a sei concentrazioni scalari. Per ogni test è stato eseguito un controllo negativo con il solvente DMSO ed uno positivo con la soluzione non diluita.

## Risultati

Le prove eseguite hanno confermato la validità della metodologia per l'individuazione dell'effetto genotossico di soluzioni di particolato risospeso nel solvente DMSO. I risultati sono illustrati nelle figure 1 e 2 e riportano rispettivamente le immagini di piastre utilizzate per i tests di mutagenicità su colture TA 98 e TA 100 in assenza ed in presenza di attivatore S9. In entrambi le colture è evidente un aumento della frequenza di retromutazioni (colore giallo) all'aumentare della concentrazione della sostanza testata. Per entrambi le colture è evidente un effetto dell'attivatore S9 che provoca un aumento significativodi retromutazioni. I grafici 1 e 2 mostrano l'elaborazione statistica dei dati ottenuti che ha previsto il calcolo delle medie, deviazione standard e significatività (t-Student, P=0.05). Per entrambi le colture le sostanze testate hanno prodotto un aumento significativo di mutagenicità per le concentrazioni più elevate. Anche la presenza di attivatore S9 ha prodotto un aumento significativo di retromutazioni per alcune concentrazioni delle sostanze testate.

Fig 1

a: Valutazione delle capacità mutagene sul ceppo TA 98 di *S.typhimurium*, (48 replicazioni)

Sostanze testate senza attivazione:

0 – Controllo (DMSO 1:25)

1 – 0,05 µg/ml 4-NQN e 1 µg/ml 2-NF

2 – 0,0031 µg/ml 4-NQN e 0,00625 µg/ml 2-NF

3 – 0,00625 µg/ml 4-NQN e 0,125 µg/ml 2-NF

4 – 0,0125 µg/ml 4-NQN e 0,25 µg/ml 2-NF

5 – 0,025 µg/ml 4-NQN e 0,5 µg/ml 2-NF

6 – 0,05 µg/ml 4-NQN e 1 µg/ml 2-NF

+ - 0,1 µg/ml 4-NQN e 2 µg/ml 2-NF

b: Sostanze testate: 0,05 µg/ml 2-AA con attivazione da parte della frazione microsomale S9.

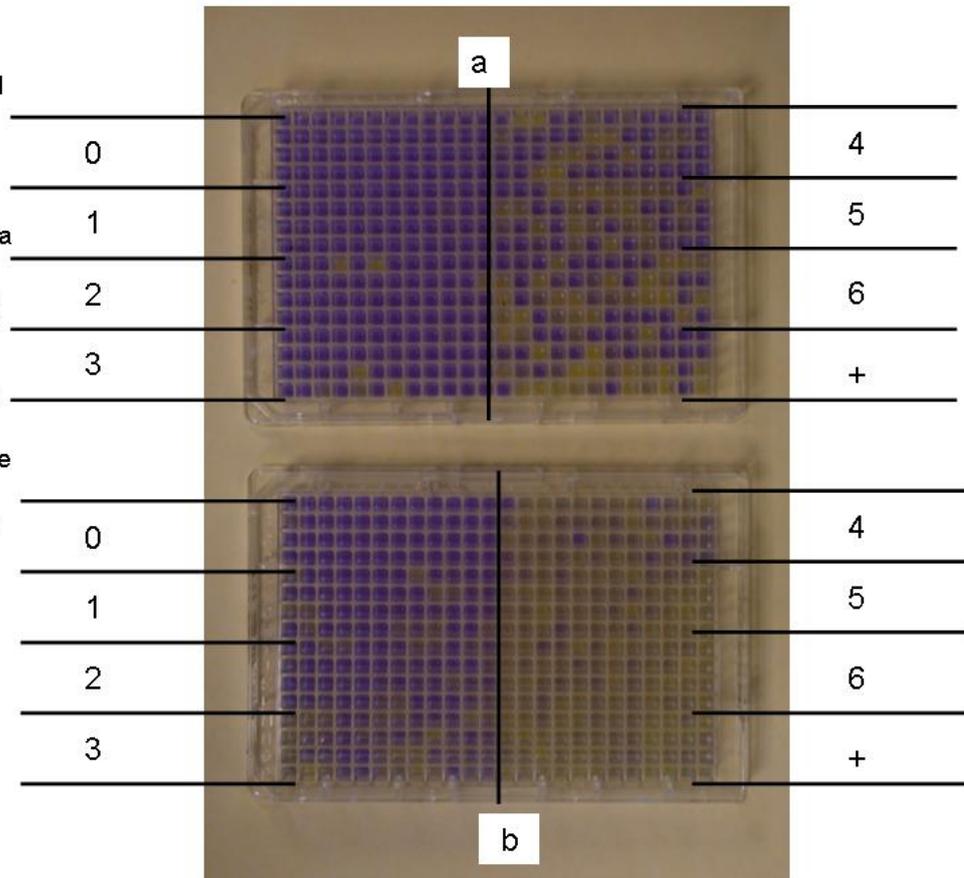


Grafico 1:  
Effetto mutageno sul ceppo TA98 di concentrazioni crescenti di 2-NF + 4-NQO (assenza di attivatore) e concentrazioni di 2-AA (presenza di attivatore S9).

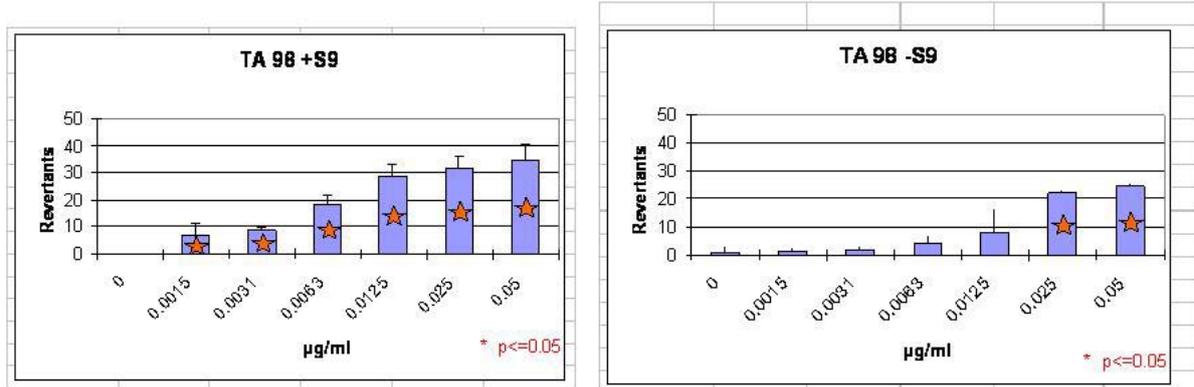
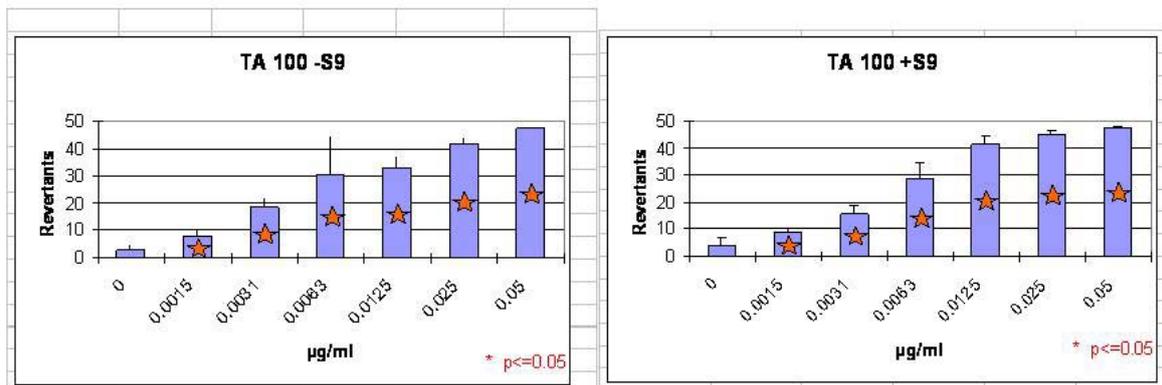


Grafico 2:  
Effetto mutageno sul ceppo TA100 di concentrazioni crescenti di 2-NF + 4-NQO (assenza di attivatore) e concentrazioni di 2-AA (presenza di attivatore S9).



## Conclusioni

La metodologia utilizzata è basata su un elevato numero di replicazioni e diluizioni ed è stata sottoposta ad elaborazione statistica che ha confermato la significatività dei risultati ottenuti. I protocolli sperimentali elaborati e validati si sono rivelati estremamente sensibili per l'individuazione di mutazioni in bassa frequenza e per l'individuazione di attività mutagena dipendente dalla concentrazione. Risultano dunque particolarmente idonei per l'analisi del particolato oggetto di studio. Tale particolato, infatti, comprende frazioni a diverso peso molecolare e proporzioni e risulta necessario avere informazioni non solo sull'effetto sinergico complessivo ma anche sugli effetti delle singole componenti e sulle componenti presenti a basse concentrazioni. Il metodo è risultato particolarmente utile per individuare frazioni che non presentano attività mutagena di per sé ma che possono diventare mutageni un seguito ad attivazione da parte del fegato. L'aggiunta di attivatore S9 estratto da lisosomi epatici di ratto ha infatti dimostrato l'insorgere di tale tipo di mutagenicità in relazione alle sostanze utilizzate.