

LE NANOPARTICELLE

Maria Francesca Anzani, Angela Sancini, Laura Santoro, Katia Ripamonti, Elisa De Rose, Maria Fiaschetti, Paola Palermo, Monica Gaballo, Simona Renata Baldassarre, Benedetta Pimpinella, Francesco Tornei

Università degli studi di Roma La Sapienza, cattedra e scuola di specializzazione in Medicina del lavoro

-

L'inquinamento atmosferico rappresenta un rischio per la salute umana. Gli agenti inquinanti di natura chimica presenti nell'aria urbana sono diversi, tra questi possiamo annoverare il monossido di carbonio (CO₂), gli ossidi di azoto (NO e NO₂), gli ossidi di zolfo (SO₂ e SO₃), l'acido nitrico e nitroso (HNO₃, HNO₂), gli idrocarburi emessi dagli scarichi autoveicolari e le polveri sottili inalabili (Pm₁₀) cui possono essere adsorbiti numerosi metalli pesanti, quali il piombo, il cadmio e il mercurio.

La continua ricerca di certezze sempre più definitive sugli effetti biologici associati all'inalazione degli agenti inquinanti e la presenza in letteratura di una non trascurabile quantità di studi sull'inquinamento, giustifica il crescente interesse del mondo scientifico nei confronti dell'argomento.

Recenti studi epidemiologici mostrano una associazione tra l'aumento della tossicità conseguente l'esposizione ad agenti inquinanti e il diminuire delle dimensioni delle particelle aerodisperse inalate [1,2].

Le particelle aventi dimensioni comprese tra 0-100 nanometri (nm) vengono definite nanoparticelle; esse possono essere presenti in atmosfera come singole molecole o come aggregati [2, 3]. In relazione alla loro origine è possibile distinguere le nanoparticelle in naturali e antropiche [4]. Le prime sono una componente chiave del nostro ecosistema; sono prodotte da nanofossili [5], vulcani, processi chimici di combustione [6], agenti microbici [7-9] e da componenti di sedimenti acquatici [10, 11].

Le seconde possono essere ulteriormente distinte in nanoparticelle intenzionali e non intenzionali, dette anche incidentali o ultrafini [4, 9].

La principale differenza tra i due tipi di particelle è la natura polidispersa e chimicamente complessa (composizione elementare, solubilità e presenza di composti volatili di carbonio, composti inorganici solubili) delle prime, rispetto alle caratteristiche di monodispersione e precisa composizione chimica delle seconde [12, 13]. Le particelle antropiche intenzionali (metalli, semiconduttori, polimeri, ecc.) sono utilizzate nel settore delle nanotecnologie (agricoltura, elettronica, biomedicina, industrie manifatturiera, farmaceutica e cosmetica), [14-16]. Si definiscono con questo termine la ricerca e la tecnologia sviluppate sui piani atomico, molecolare o macromolecolare che impiegano come scala di misura il range 1-100 nanometri [17].

L'impiego dell'intervallo dimensionale nanometrico è dovuto al fatto che i nanomateriali, le strutture, i dispositivi e i sistemi utilizzati, presentano proprietà e funzioni, diverse rispetto a quelle possedute dagli stessi componenti aventi maggiori dimensioni [3]; tali proprietà sono attribuibili all'aumentato rapporto tra l'area di superficie e il numero per unità di massa delle nanoparticelle che implica una maggiore reattività chimica, una maggiore resistenza e conducibilità elettrica e, potenzialmente, una più accentuata attività biologica [9, 18-20]. Questo incremento potenziale dell'attività biologica può avere non solo valenza positiva (attività antiossidante, penetrazione delle barriere cellulari per il rilascio di farmaci), ma anche negativa (ad es. tossicità, induzione di stress ossidativo o di disfunzione cellulare). Dall'analisi delle caratteristiche fisicochimiche si evince un netto contrasto tra i potenziali benefici derivanti dalla nanotecnologia e gli effetti indesiderati che potrebbero sorgere in seguito a una non intenzionale esposizione nanoparticellare durante le varie applicazioni industriali.

Diverse sono le sorgenti antropiche delle nanoparticelle incidentali o ultrafini: processi di combustione, fumi di metalli e di polimeri e processi di fotossidazione atmosferica che avvengono in presenza di basse temperature e basse pressioni di saturazione di vapore. I gas naturali e antropogenici (SO₂, NO₃, NH₃) e i numerosi composti organici volatili (Voc) derivanti dagli scarichi autoveicolari, in seguito a reazioni fotochimiche, partecipano a processi di nucleazione o reagiscono con composti molecolari neutri, presenti in atmosfera, dando luogo alla formazione di nuovi composti (ad es. composti organici ossigenati) che possono esercitare effetti deleteri sulla salute umana [21].

Le particelle nanometriche e i composti da esse generati possono, attraverso la via inalatoria, digestiva e cutanea, giungere nella circolazione sistemica e

migrare successivamente in diversi organi e tessuti, interagendo con i sistemi biologici ed esercitando la loro tossicità [22, 23]. Quando la via di penetrazione è quella inalatoria, l'apparato respiratorio rappresenta il primo organo bersaglio. Le nanoparticelle si depositano nelle vie respiratorie, attraverso un processo di diffusione che risulta essere facilitato dal fattore dimensionale delle stesse [124]; le particelle più voluminose si depositano prevalentemente nel tratto naso-faringeo e tracheobronchiale, quelle più piccole sedimentano nella regione alveolare [125].

Lo studio condotto da Ferin et al. [261] dimostra come le dimensioni nanometriche consentano alle particelle, una volta depositate, di attraversare le membrane biologiche e interstizializzare. L'incrementato accesso interstiziale delle particelle ultrafini induce un'intensa attivazione macrofagica, che si accompagna ad una severa risposta di flogosi polmonare.

Anche lo studio condotto da Peters e collaboratori [127, 28], su un campione di 27 soggetti asmatici non fumatori, dimostra come la prevalenza dei sintomi respiratori, corredata da una riduzione del picco di flusso espiratorio (Pef), era associata all'inalazione di particelle ultrafini.

Gli effetti delle particelle nanometriche sulla funzione polmonare sono stati indagati anche da Gardiner e collaboratori [29] su un campione di 490 lavoratori esposti a polveri di nero di carbone. Il nero di carbone è una polvere molto fine di carbone elementare, ottenuta in seguito a processi di pirolisi degli idrocarburi liquidi o gassosi; tale polvere ha dimensioni nanometriche comprese tra i 10-50 nm quando si presenta come particella elementare e tra gli 80-800 nm quando si presenta sottoforma di aggregati. I risultati emersi dalla ricerca, indicano che l'esposizione a polveri inalabili di nero di carbone si associa a un incremento della morbilità polmonare, caratterizzata da una prevalenza di sintomi relativi a stati bronchitici cronici, corredata da una riduzione dei seguenti indici di funzionalità respiratoria: volume espiratorio forzato in un secondo (Fev₁), flusso espiratorio forzato (Fef) al 25%-75% e il rapporto tra volume espiratorio forzato in un secondo e la capacità vitale forzata (Fev/Fvc). Nel 2002 Nemmar e collaboratori [30] studiando particelle di carbone marcate con tecnezio (^{99m}Tc) hanno dimostrato la capacità delle nanoparticelle di "traslocare" dall'interstizio polmonare alla circolazione sistemica.

I fibroblasti presenti nell'interstizio, attivati dalle particelle nanometriche, producono diverse citochine e diversi fattori di crescita, tra i quali si può annoverare quello di derivazione piastrinica. L'attivazione delle piastrine, la loro interazione con i globuli rossi, insieme alla produzione di citochine e chemochine può indurre disturbi della coagulazione [22, 23],

Gli effetti cardiovascolari, in aggiunta alla diretta traslocazione alveolare delle nanoparticelle, possono essere considerati come il corollario di una sequenza di eventi che origina da un'iniziale flogosi alveolare, procede con l'instaurarsi di una risposta sistemica acuta, alla quale si associano un'aumentata attività dei fattori della coagula-

zione, tra i quali il fibrinogeno [27, 28, 31] e termina con difetti di perfusione, episodi di ischemia e infarto del miocardio [32].

Dalla circolazione sistemica le particelle nanometriche possono raggiungere altri organi e apparati; il fegato rappresenta il maggior sito di distribuzione, seguito dalla milza e da altri organi del sistema reticoloendoteliale [33].

Il danno epatico, indotto dalle nanoparticelle si caratterizza per la presenza di processi flogistici, necrosi e lesioni istologiche.

Il meccanismo attraverso il quale il danno epatocellulare origina, è l'attivazione del citocromo P450, che comporta la perossidazione delle membrane lipidiche, l'inibizione della sintesi proteica, la disregolazione dell'omeostasi del calcio e l'attivazione di enzimi coinvolti in processi apoptotici [22, 23]. Dall'analisi della letteratura si evince anche la capacità neurotossica delle particelle nanometriche. Sono presenti due ipotesi differenti circa la modalità con cui le particelle possono penetrare nel sistema nervoso centrale (Snc); la prima prevede una "traslocazione" delle nanoparticelle dalle vie aeree superiori agli assoni neurali, attraverso il nervo olfattorio [22, 23]. Questa teoria è stata descritta per la prima volta negli anni '40 da Bodian e Howe [34], i quali instillarono per via nasale, 30 nm di poliovirus nell'Snc di animali da laboratorio. La traslocazione attraverso il nervo olfattivo è giustificata dalla notevole vicinanza tra la mucosa nasale olfattiva e il bulbo olfattivo, condizione che favorisce un rapido trasporto neuronale [351],

La seconda ipotesi, presente in letteratura, descrive il passaggio delle particelle nanometriche dalla circolazione sistemica all'Snc mediante la barriera ematoencefalica, grazie a meccanismi di diffusione passiva o di trasporto endocitotico carriers mediato [36]. Lo studio condotto da Calderon-Garciduenas e collaboratori [37] su animali da esperimento, circa gli effetti neurotossici delle nanoparticelle, ha dimostrato l'instaurarsi di processi flogistici e alterazioni neurodegenerative della mucosa e del bulbo olfattivo, dei neuroni corticali e subcorticali, apoptosi delle cellule gliali della sostanza bianca, insorgenza di placche non neuritiche e di ammassi neurofibrillari; tali alterazioni sembrano essere dovute alla capacità delle nanoparticelle di generare stress ossidativo che si associa a una incrementata presenza di specie reattive dell'ossigeno, quali l'anione superossido (O₂⁻), il perossido di idrogeno (H₂O₂) e i radicali idrossidi (OH⁻), [38].

Dall'analisi della letteratura si evince la presenza di vie di traslocazione neuronali addizionali per le particelle nanometriche solide, attraverso il nervo trigemino e i nervi sensoriali tracheobronchiali; uno studio condotto da Hunter e Dey [39] su animali di laboratorio, ha dimostrato la traslocazione di microsfele di rodamina marcata (20-200 nm) instillate per via nasale, all'Snc, attraverso le branche oftalmica e mascellare del nervo trigemino; nel 1999 Hunter e Udem [40], attraverso un'instillazione intratracheale delle stesse microsfele di rodamina, dimostrarono la presenza di un'altra via accessoria di traslocazione neuronale, attraverso il ganglio nodoso del nervo vago. Questa ricerca ipotizza la possibile insorgenza di disturbi cardiovascolari dovuti alla diretta traslocazione delle particelle nanometriche dall'apparato respiratorio al sistema nervoso autonomo, attraverso la via nervosa sensoriale.

Il processo di traslocazione neuronale, qualunque sia la via attraverso cui avvenga, dipende dalle dimensioni delle particelle nanometriche e dalle caratteristiche chimiche di superficie delle stesse [22, 23]. Un'altra importante via di penetrazione attraverso cui le nanoparticelle possono penetrare nell'organismo umano è la pelle. Sebbene la presenza di abrasioni o lacerazioni cutanee rappresenti una via di ingresso per le particelle, Tinkle e collaboratori [41] hanno dimostrato che anche la pelle integra, se impegnata in movimenti di flessione, può rappresentare una via di penetrazione per le particelle di dimensioni micrometriche e nanometriche, le quali possono albergare nell'epidermide.

Lepidermide, costituita dallo strato corneo, lo strato spinoso e basale, rappresenta una barriera protettiva per il derma sottostante particolarmente ricco di sangue, vasi linfatici e cellule dendritiche. Lo strato epidermico a differenza del derma, non essendo vascolarizzato, rappresenta "l'ambiente" in cui le particelle nanometriche potrebbero potenzialmente alloggiarsi e non essere suscettibili di rimozione dai processi di fagocitosi.

La capacità delle particelle nanometriche di attraversare la pelle è determinata primariamente dal loro potenziale dermatotossico e dalla capacità di penetrare lo strato corneo, per poter esercitare la tossicità negli strati più profondi.

La penetrazione e l'assorbimento di nanoparticelle e nanomateriali dipende dalla struttura chimica degli stessi, solo le particelle liposolubili sono in grado di muoversi attraverso la componente lipidica intercellulare e raggiungere le cellule dello strato corneo, dei follicoli piliferi e dei dotti di escrezione sudorale [17]. Lo studio condotto da Eedy [42] dimostra la capacità dei nanotubi di carbonio di penetrare nell'organismo umano attraverso la pelle; l'autore descrive il caso di un lavoratore che, in seguito al contatto cutaneo giornaliero con tali sostanze, sviluppa un'infiammazione cutanea caratterizzata da rash a carico del dorso delle mani, degli spazi interdigitali e del volto, nonché fenomeni di ipercheratosi; secondo Chou [43] questi quadri clinici potrebbero essere attribuiti all'incrementato rilascio da parte delle cellule epidermiche danneggiate dall'azione dei nanotubi di interleuchina 8.

Shvedova e collaboratori [44] hanno studiato in vitro su colture di cheratinociti, il potere dermatotossico dei nanotubi di carbonio; dopo un'esposizione di 18 ore, le cellule esaminate mostravano alterazioni strutturali e morfologiche, imputabili alla capacità delle nanoparticelle di indurre stress ossidativo, attraverso il rilascio di radicali liberi dell'ossigeno e prodotti di perossidazione.

Le particelle nanometriche possono entrare nell'organismo anche per via digestiva, in seguito all'ingestione di cibi o acque contaminati o all'uso di cosmetici e prodotti farmaceutici che li contengano; diversi studi mostrano che particelle di latex, polistirene e copolimeri di acido poliacetico e poliglicolico, una volta ingerite per via orale, possono essere assorbite attraverso le placche linfatiche di Peyer e da qui possano traslocare nei tessuti non linfatici dell'intestino [45-47]. Questi studi hanno mostrato che il processo di traslocazione è strettamente correlato a due fattori intrinseci alle nanoparticelle: la dimensione fisica e la composizione fisico-chimica; ciò vuol dire che le particelle di piccole dimensioni e quelle aventi caratteristiche di idrofobicità vengono assorbite più facilmente [48, 49].

Una volta assorbite le particelle dalle placche linfatiche di Peyer e dai linfonodi mesenterici possono migrare in altri organi e tessuti, quali fegato, milza, sangue, rene e midollo osseo [48]. Alcuni studi presenti in letteratura indicano che le particelle nanometriche possano indurre effetti tossici a carico del corredo genetico. Lu e collaboratori [50] dimostrarono la capacità delle nanoparticelle di biossido di titanio di indurre apoptosi e alterazioni cromosomiche, quali scambio di cromatidi fratelli e formazione di micronuclei; anche Rahman e collaboratori [51], confermarono le proprietà genotossiche delle nanoparticelle di biossido di titanio, TiO_2 (< 20 nm), riscontrando la presenza di alterazioni mitotiche, mutazioni cromosomiche e danni a carico del Dna; dai risultati di questi studi si evince che il meccanismo responsabile della formazione di micronuclei, è dipendente dalla capacità delle particelle nanometriche di produrre specie reattive dell'ossigeno, quali O_2 , H_2O_2 , OH e ROS; pertanto è possibile affermare che l'apoptosi, ovvero morte programmata della cellula, insieme ai danni Dna ossido-mediati possano rappresentare importanti fattori che inducono o promuovono la cancerogenesi e i disturbi proliferativi.

a particelle nanometriche, emerge la complessità dell'argomento e la necessità di maggiori informazioni circa le proprietà chimico-fisiche delle nano-particelle (dimensione, area superficiale, forma, solubilità), i meccanismi d'azione biologica e la possibile relazione dose-risposta, nonché le condizioni responsabili dell'entità dei processi patologici; solo attraverso un'approfondita attività di valutazione e un'attenta misurazione di questi parametri, è possibile caratterizzare l'esposizione alle nanoparticelle.

Le emissioni nanoparticellari possono essere misurate attraverso l'analisi di diversi parametri; oltre alle informazioni circa la massa, occorre conoscere la concentrazione numerica, l'area di superficie e il chimismo superficiale [9].

La concentrazione numerica delle nanoparticelle presenti in atmosfera può essere misurata attraverso diversi strumenti, di seguito riportati.

Contatori a condensazione di particelle (Cpc): consentono l'analisi in tempo reale di particelle di dimensioni comprese tra 7 e 100 nm. Il flusso contenente l'aerosol nanoparticellare da analizzare, viene fatto passare attraverso una camera sovrasatura di vapore, contenente come saturatore una sostanza (alcol butilico, isopropilico) a tensione di vapore nota; successivamente il flusso viene sottoposto a raffreddamento, in seguito al quale si verifica la condensazione del vapore sulle particelle. Tale fenomeno si accompagna alla formazione di goccioline di vapore sulla superficie delle particelle, condizione che comporta un aumento dimensionale delle stesse [9, 52]. Le nanoparticelle, aumentate di dimensioni, vengono analizzate attraverso un sensore ottico che misura il coefficiente di diffusione della luce (*tight scattering*); i risultati ottenuti mediante l'impiego di tale strumento esprimono la concentrazione nanoparticellare in particelle/cm³. Un limite di questa metodica è che, se la sovrasaturazione del vapore è molto elevata, la risposta dei Cpc non è sensibile alla composizione delle particelle misurate.

I Cpc possono essere classificati come strumenti a detenzione diretta o indiretta [53]. I Cpc a detenzione diretta consentono di determinare le concentrazioni delle particelle dal conteggio individuale dei droplet formati in seguito alla condensazione. Gli strumenti del tipo Aitken implicano l'uso di un microscopio che conta manualmente i droplet ottenuti, a partire da un volume noto di aria su una griglia. I Cpc a detenzione indiretta consentono di determinare la concentrazione delle nanoparticelle, attraverso la misura della luce attenuata o della luce diffusa che attraversa la nube costituita dalla condensazione del vapore.

Analizzatori a mobilità differenziale (*differential mobility analyser*, Dma): tali strumenti consentono di selezionare le particelle caricate elettricamente, in classi dimensionali uniformi, in relazione alla loro mobilità elettrica. Successivamente mediante l'impiego di un Cpc si procede alla misura della loro concentrazione numerica [52, 54]. Questi strumenti riescono ad analizzare la mobilità delle particelle di dimensioni comprese tra 5-800 nm.

Misuratore di particelle a scansione di mobilità (*scanning mobility particle sizers*, Smps): la famiglia di spettrometri Smps è in grado di misurare la distribuzione dimensionale e la concentrazione numerica delle particelle aventi dimensioni comprese tra 3-800 nm. Uno spettrometro Smps è costituito da un Dma e un Cpc. Le particelle vengono caricate mediante un campo elettrico, facendole passare attraverso due elettrodi o una nube di ioni generati da una sorgente radioattiva; questo passaggio causa la migrazione delle particelle in funzione della loro carica e del loro diametro. Le particelle così separate vengono conteggiate mediante un Cpc. Si discrimina in tal modo il numero di particelle in funzione della dimensione [55].

Contatore ottico di particelle: tale strumento consente di misurare la concentrazione numerica delle nanoparticelle. Nei contatori ottici l'aerosol particellare in esame, scorre attraverso una camera trasparente di minimo spessore; un fascio di luce laser attraversa la cella e, in funzione del tempo e della velocità di flusso del campione, eccita il sensore tante più volte, quanto più pulito risulterà il campione stesso. La quantità di luce intercettata sarà direttamente proporzionale al numero di particelle opache che si sono interposte con la sorgente di luce. Impattatori a bassa pressione del tipo Elpi: questi strumenti campionano le particelle dopo averle caricate elettricamente. La loro carica in ogni stadio di impatto viene misurata da un elettrometro multi-canale. Elpi può classificare le particelle di diametro compreso tra 6,8 nm e 10 µm. L'analisi si basa pertanto sulla separazione inerziale e sulla carica delle particelle. Gli impattatori a bassa pressione del tipo Elpi possono essere utilizzati come prelevatori statici e non come campionatori personali a causa delle loro dimensioni [9, 54].

Oltre alla concentrazione numerica è possibile misurare l'area di superficie delle nanoparticelle, attraverso l'impiego dell'epifaniometro e degli elettrometri a carica diffusa [9].

Nell'epifaniometro viene aggiunto all'aerosol nanoparticellare il radioisotopo ²¹¹Pb in fase gassosa; lo strumento misura la radioattività generata da ioni aderenti alla superficie delle particelle, la quale risulta essere proporzionale all'area superficiale attiva delle stesse [53].

Anche gli elettrometri a carica diffusa o caricatori a diffusione consentono di misurare la superficie delle particelle. Questi strumenti misurano la radioattività

generata da ioni positivi unipolari aderenti alla superficie delle particelle, la quale risultata proporzionale all'area superficiale delle stesse [9]. L'impiego della microscopia elettronica può fornire informazioni circa la morfologia delle nanoparticelle e la composizione elementare delle stesse; con questo approccio le particelle sono raccolte su un filtro e sono irradiate con elettroni in condizione di sottovuoto. Le informazioni sulla composizione elementare sono realizzate misurando lo spettro di energia dei raggi X, prodotto dalle interazioni degli elettroni con le particelle. La microscopia elettronica è una tecnica relativamente economica e di semplice impiego che fornisce sia le informazioni morfologiche che composizionali delle particelle ultrafini. Con queste metodiche è possibile monitorare i costituenti delle nanoparticelle: prodotti nucleazione di vapori sovrasaturi (SO₂ e SO₃, NO e NO₂, NH₃ e prodotti della combustione) [56], carbonio elementare [57] e numerosi metalli, quali piombo, cadmio, ferro, manganese, mercurio e zinco [58]. Poiché le particelle ultrafini rientrano nella classificazione di Pm_{2.5} [52], è possibile far riferimento ai Tlv già esistenti per ciascun di questi inquinanti.

BIBLIOGRAFIA

- [1] G. Oberdörster, R.M. Gelein, J. Ferin, B. Weiss. *Association of particulate air pollution and acute mortality: involvement of ultrafine particles?* *Inhal Toxicol.* 7: 111-24. 1995.
- [2] World health organization (Who). *Health aspects of air pollution results from the Who project: systematic review of health aspects of air pollution in Europe.* Who regional office for Europe. Copenhagen, Danimarca, 2004.
- [3] R. Flagan. *Terminology.* In Nsf workshop report on Emerging issues in nanoparticle aerosol science and technology (Nast). S.K. Friedlander, D.H.R. Pui. National science foundation. Arlington, VA, 2003.
- [4] K.A.D. Guzman, M.R. Taylor, J. Banfield. *Environmental risk of nanotechnology: national nanotechnology initiative funding, 2000-2004.* *Environ Sci Technol.* 40: 1401-7. 2006.
- [5] G. Southam, R. Donald. *A structural comparison of bacterial microfossils vs. 'nanobacteria' and nanofossils.* *Earth Science Reviews.* 48: 251-64. 1999.
- [6] J.F. Banfield, D.R. Veblen, B.F. Jones. *Transmission electron microscopy of subsolidus oxidation and weathering olivine.* *Contrib Mineral Petrol.* 106: 110-23. 1990.
- [7] D.C. Nelson, W.H. Casey, J.D. Sison, E.E. Mack, A. Ahmad, J.S. Pollack. *Selenium uptake by sulphur-accumulating bacteria.* *Geochim Cosmochim Acta.* 60: 3531-9. 1996.
- [8] M. Labrenz, G.K. Druschel, T. Thomsen-Ebert, B. Gilbert, S.A. Welch, K.M. Kemner, G.A. Logan, R.E. Summons, G. De Stasio, R.L. Bond, B. Lai, S.D. Kelly, J.F. Banfield. *Formation of sphalerite (ZnS) deposits in natural biofilms of sulfatereducing bacteria.* *Science.* 290: 1744-7. 2000.
- [9] A. Marconi. *Particelle fini, ultrafini e nanoparticelle in ambiente di vita e di lavoro: possibili effetti sanitari e misura dell'esposizione inalatoria.* *G Ital Med Lav Erg.* 28: 258-65. 2006.
- [10] C. Van der Zee, D.R. Roberts, D.G. Racourt, C.R. Slomp. *Nahogoethite is the dominant reactive oxyhydroxide phase in lake and marine sediments.* *Geology.* 31: 993-6. 2003.
- [11] L.A.J. Garvie, R.R. Buseck. *Nanosized carbon-rich grains in carbonaceous chondrite meteorites.* *Earth Planet Sci Lett.* 224: 431-9. 2004.
- [12] L.S. Hughes, G.R. Cass, J. Gone, M. Ames, I. Olmez. *Physical and chemical characterization of atmospheric ultrafine particles in the Los Angeles area.* *Environ Sci Technol.* 32: 1153-61. 1998.
- [13] J. Cyrus, M. Stolzel, J. Heinrich, W.G. Kreyling, N. Menzel, K. Wittmaack, et al. *Elemental composition and sources of fine and ultrafine ambient particles in Erfur, Germany.* *Sci Tot Environ.* 305: 143-56. 2003.
- [14] V.S.W. Chan. *Nanomedicine: a unresolved regulatory issue.* *Regulatory Toxicology and Pharmacology.* 46: 218-24. 2006.
- [15] W.T. Liu. *Nanoparticles and their biological and environmental applications.* *J Biosci Bioeng.* 102: 1-7. 2006.
- [16] T.C. Long, N. Saleh, R.D. Tilton, G.V. Lowry, B. Veronesi. *Titanium dioxide (P25) produces reactive oxygen species in immortalized brain microglia (BV2): implications for nanoparticle neurotoxicity.* *Environmental Science and Technology.* 40: 4346-52. 2006.
- [17] M.R. Holsapple, W.H. Farland, T.D. Landry, N.A. Monteiro-Riviere, J.M. Carter, N.J. Walker, K.V. Thomas. *Research strategies for safety evaluation on nanomaterials, part II: toxicological and safety evaluation on nanomaterials, current challenges and data needs.* *Toxicological Sciences.* 88: 12-7. 2005.
- [18] A. Magrini, A. Bergamaschi, E. Bergamaschi. *Nanotubi di carbonio (Ntc) e nanoparticelle (Np): interazione con i sistemi biologici con particolare riferimento all'apparato respiratorio.* *G Ital Med Lav Eng.* 28: 266-9. 2006.

- [19] M.C. Powell, M.S. Kanarek. *Nanomaterial health effects-part V. background and current knowledge*. *WW*. 105: 16-20. 2006.
- [20] M.C. Powell, M.S. Kanarek. *Nanomaterial health effects-part 2: uncertainties and recommendations for the future*. *WMJ*. 105: 18-23. 2006.
- [21] C. Sioutas, R Me Murry, R Biswas, H.W.Wilson. *Atmospheric nanoparticles (ultrafine particles)*. In NSF Workshop Report on Emerging issues in nanoparticle aerosol science and technology (Nast). S.K. Friedlander, D.H.R Pui. National science foundation. Arlington, VA, 2003.
- [22] G. Oberdörster, E. Oberdörster, J. Oberdörster. *Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles*. *Environ Health Perspect*. 113: 823-39. 2005.
- [23] G. Oberdörster, A. Maynard, K. Donaldson, V. Castranova, J. Fitzpathck, K. Ausman, J. Carter, B. Karn, W. Kreyling, D. Lai, S. Olin, N. Monteiro-Riviere, D. Warheit, H. Yang, Iisi research foundation/Risk science institute nanomaterial toxicity screening working group. *Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy*. Part *Fibre Toxicol*. 2: 8. 2005.
- [24] Z. Zhang, C. Kleinstreuer, J.F. Donohue, C.S. Kim. *Comparison of micro and nano-size particle depositions in a human upper airway model*. *Journal of Aerosol Science*. 36: 211-33. 2005.
- [25] A.C. James, W. Stahlhofen, G. Rudolf, M.J. Egan, W. Nixon, R Gehr, J.K. Briant. *The respiratory tract deposition model proposed by Ircp task group*. *Radiation Protection Dosimetry*. 38: 159-65. 1991.
- [26] J. Ferin, G. Oberdörster, D.R Penney. *Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats*. *Am J Respir Celi Mol Biol*. 6: 535-42. 1992.
- [27] A. Peters, H.E. Wichmann, T. Tuch, J. Heinrich, J. Heyder. *Respiratory effects are associated with the number of ultrafine particles*. *Am J Respir Crit Care Med*. 155: 1376-83. 1997
- [28] A. Peters, A. Doring, H.E. Wichmann, W. Koenig. *Increased plasma viscosity during an air pollution episode: a link to mortality?* *Lancet*. 349: 1582-7. 1997.
- [29] K. Gardiner, M. vanTongeren, M. Harrington. *Respiratory health effects from exposure to carbon black: results of the phase 2nd and 3rd cross sectional studies in the European carbon black manufacturing industry*. *Occup Environ Med*. 58: 496-503. 2001.
- [30] A. Nemmar, R.H. Hoet, B. Vanquickenbome, D. Dinsdale, M. Thomeer, M.F. Hoylaerts, H. Vanbilloen, L. Mortelmans, B. Nemery. *Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans*. *Circulation*. 105: 411-4. 2002.
- [31] J. Pekkanen, E.J. Brunner, H.R. Anderson, R Tiittanen, R.W. Atkinson. *Daily concentrations of air pollution and plasma fibrinogen in London*. *Occup Environ Med*. 57: 818-22. 2000.
- [32] A. Seaton, W. Mac Nee, K. Donaldson, D. Godden. *Particulate air pollution and acute health effects*. *Lancet*. 345: 176-8. 1995.
- [33] M.E. Akerman, W.C. Chan, R Laakkonen, S.N. Bhatia, E. Ruoslahti. *Nanocrystal targeting in vivo*. *Proc Nati Acad Sci Usa*. 99: 12617-21. 2002.
- [34] D. Bodian, H.A. Howe. *Experimental studies on intraneural spread of poliomyelitis virus*. *Bull Johns Hopkins Hosp*. 69: 248-67 1941.
- [35] G. Oberdörster, Z. Sharp, V. Atudorei, A. Elder, R. Gelein, W. Kreyling, et al. *Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain*. *Inhal Toxicol*. 16: 437-45. 2004.
- [36] R.R. Lockman, R.J. Mumper, M.A. Khan, D.D. Alien. *Nanoparticle technology for drug delivery across the blood-brain barrier*. *Drug Dev Ind Pharm*. 28: 1-12. 2002.
- [37] L. Calderon-Garciduehas, B. Azzarelli, H. Acuna, R. Garda, T.M. Gambling, N. Osnaya, et al. *Air pollution and brain damage*. *Toxicol Pathol*. 30: 373-89. 2002.
- [38] A.W. Segai, A. Abo. *The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes*. *Trends Biochem Sci*. 18: 43-7 1993.
- [39] D.D. Hunter, R.D. Dey. *Identification and neuropeptide content of trigeminal neurons innervating the rat nasal epithelium*. *Neuroscience*. 83: 591-9. 1998.
- [40] D.D. Hunter, B.J. Udem. *Identification and substance P content of vagal afferent neurons innervating the epithelium of the guinea pig trachea*. *Am J Respir Crit Care Med*. 159: 1943-8. 1999.
- [41] S.S. Tinkle, J.M. Antonini, B.A. Rich, J.R. Roberts, R. Salmen, K. De Pree, E.J. Adkins. *Skin as a route of exposure and sensitization in chronic beryllium disease*. *Environ Health Perspect*. 111: 1202-8. 2003.
- [42] D.J. Eedy. *Carbon-fibre-induced airborne irritant contact dermatitis*. *Contact Dermatitis*. 35: 362-3. 1996.

- [43] C.C. Chou, J.E. Riviere, N.A. Monteiro-Riviere. *Differential relationship between the carbon chain length of jet fuel aliphatic hydrocarbons and their ability to induce cytotoxicity vs. inteleukin-8 release in human epidermal keratinocytes*. Toxicol Sci. 69: 226-33. 2002.
- [44] A.A. Shvedova, V. Castranova, E.R. Kisin, D. Schwegler-Berry, A.R. Murray, V.Z. Gandelsman, A. Maynard, R Baron. *Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells*. J Toxicol Environ Health A. 66: 1909-26. 2003.
- [45] A.M. Hillery, R.U. Jani, A.T. Florence. *Comparative, quantitative study of lymphoid and nonlymphoid uptake of 60 nm polystyrene particles*. J Drug Target. 2: 151-6. 1994.
- [46] K.E. Carr, R.A. Hazzard, S. Reid, G.M. Hodges. *The effect of size on uptake of orally administered latex microparticles in the small intestine and transport to mesenteric lymph nodes*. Pharm Res. 13: 1205-9. 1996.
- [47] M.R. Desai, V. Labhsetwar, G.L. Amidon, R.J. Levy. *Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size*. Pharm Res. 13: 1838-45. 1996.
- [48] R. Jani, G.W. Halbert, J. Langridge, A.T. Florence. *Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa: quantitation and particle size dependency*. J Pharm Pharmacol. 42: 821-6. 1990.
- [49] J.H. Eldridge, C.J. Hammond, J.A. Meulbroek, J.K. Staas, R.M. Gilley, T.R. Tice. *Controlled vaccine release in the gut-associated lymphoid tissues. I. Orally administered biodegradable microspheres target the Peyer's patches*. J Control Rel. 11: 205-14. 1990.
- [50] R.J. Lu, I.C. Ho, T.C. Lee. *Induction of sister chromatid exchanges and micronuclei by titanium dioxide in Chinese hamster ovary-K1 cells*. Mutat Res. 414: 15-20. 1998.
- [51] Q. Rahman, M. Lohani, E. Dopp, H. Pempel, L. Jonas, D.G. Weiss, D. Schiffmann. *Evidence that ultrafine titanium dioxide induces micronuclei and apoptosis in Syrian hamster embryo fibroblasts*. Environ Health Perspect. 110: 797-800. 2002.
- [52] V. Poluzzi, I. Ricciardelle, C. Maccone. *Il monitoraggio ambientale di polveri ultrafini e nanoparticelle*. Arpa Emilia Romagna, Eccellenza ecosistemi urbani e industriali. Ferrara, 2006.
- [53] R.H. Me Murry. *A review of atmospheric aerosol measurements*. Atmos environ. 3: 1959-99. 2000.
- [54] D.H. Bouwer, J.H.J. Gijssbers, M.W.M. Lurvink. *Personal exposure to ultrafine particles in the workplace: exploring sampling techniques and strategies*. Ann Occup Hyg. 5: 439-53. 2004.
- [55] G.B. Bartolucci, D. Cottica. *Caratterizzazione degli inquinanti aerodispersi e valutazione dell'esposizione*. G Ital Med Erg. 3: 252-7 2006.
- [56] A. Marconi. *Materiale particolato aerodisperso: definizioni, effetti sanitari, misura e sintesi delle indagini ambientali effettuate a Roma*. Ann Ist Super Sanità. 39: 329-42. 2003.
- [57] L. Lepore, D. Brocco, R. Avino. *Carbonio organico e carbonio elementare nelle particelle atmosferiche*. Ann Ist Super Sanità. 39: 365-9. 2003.
- [58] G.T. Ziemacki, G. Cattarli, M.C. Cusano, G. Stacchini, A. Marconi. *Contenuto di metalli nelle varie frazioni dimensionali di materiale particolato*. Ann Ist Super Sanità. 39: 371-9. 2003.