



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI BRESCIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CLINICHE E SPERIMENTALI

DOTTORATO DI RICERCA IN
INTELLIGENZA ARTIFICIALE IN MEDICINA E INNOVAZIONE NELLA RICERCA
CLINICA E METODOLOGICA

Settore scientifico disciplinare
Innovazione della Ricerca Clinica e Metodologica – 3BIS

XXXVIII (38) CICLO

**Nanotossicologia dei metalli:
uno studio sull'uomo per valutare le specie circolanti nei fluidi biologici
sotto forma di nanoparticelle o incluse in vescicole extracellulari**

*Nanotoxicology of metals:
a human study to assess the species circulating in biological fluids
as nanoparticles or included into extracellular vesicles*

DOTTORANDA
Tatiana Pedrazzi

SUPERVISORE
Professor Giuseppe De Palma

Abstract	1
1. Introduzione	2
1.1 Nanotecnologie e Nanoparticelle	2
1.2 Applicazioni delle nanotecnologie.....	4
1.3 Le problematiche in ambito occupazionale	5
1.4 Nanotossicologia	7
1.5 Regolamentazione dell'esposizione alle NP occupazionali	11
1.6 Vescicole extracellulari	13
1.7 Letteratura in ambito occupazionale e di nanoparticelle	14
1.8 Biomonitoraggio e monitoraggio degli inquinanti respirabili: un approccio integrato	22
1.9 Metodi analitici per la caratterizzazione delle nanoparticelle	24
1.10 Spettrometria di massa al plasma accoppiato induttivamente per particelle singole	25
1.11 NanoSight – Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)	29
1.12 Cryo-EM (Cryogenic Electron Microscopy)	32
1.13 Grimm 1371 Mini-WRAS	35
1.14 Percezione Pubblica delle Nanotecnologie: Stato dell'Arte e Fattori Psicologici, Sociali e Comunicativi	37
2. Obiettivi e disegno dello studio	40
3. Materiali e Metodi	42
3.1 Monitoraggio ambientale	42
3.2 Monitoraggio biologico	43
4. Risultati	48
4.1 Monitoraggio ambientale	48
4.2 Monitoraggio biologico	51
5. Discussione	72
5.1 Monitoraggio ambientale	72
5.2 Monitoraggio biologico	72
6. Conclusioni e prospettive future	75
7. Bibliografia	78

“Una strada è soltanto una strada, e [...] abbandonarla non è un affronto né verso sé stessi né verso gli altri, se ce lo chiede il nostro cuore [...] osserva la strada da vicino e senza fretta, provala tutte le volte che lo ritieni necessario e poi rivolgiti a te stesso, e a nessun altro, questa domanda [...] Questa strada ha un cuore? Se ce l’ha, è la strada giusta; se non ce l’ha, è inutile.

Carlos Castaneda, Gli insegnamenti di Don Juan, 1968

ABSTRACT

Le nanoparticelle metalliche (NP) rappresentano una sfida emergente nella tossicologia occupazionale, in particolare nei processi di saldatura, dove cromo (Cr) e nichel (Ni) costituiscono i principali componenti dei fumi generati. Questo progetto di dottorato ha valutato l'esposizione dei saldatori a NP di Cr e Ni tramite un approccio integrato di monitoraggio ambientale e biologico, combinando misurazioni in aria con l'analisi di matrici biologiche (urina, plasma e condensato dell'aria espirata) mediante spettrometria di massa al plasma accoppiato induttivamente per particelle singole (sp-ICP-MS). Inoltre, è stato approfondito il possibile ruolo delle vescicole extracellulari (EV) come vettori biologici delle NP attraverso ultracentrifugazione, analisi con NTA e Cryo-EM. Il monitoraggio ambientale, svolto con uno spettrometro portatile per aerosol ad ampio raggio (miniWRAS modello 1371), ha evidenziato un significativo incremento della concentrazione di particelle aerodisperse durante le attività di saldatura, con valori più elevati nella modalità MIG (Metal-arc Inert Gas). Il diametro medio delle particelle rilevate nell'aria è risultato confrontabile con quello delle NP riscontrate nelle urine. Inoltre, durante il singolo processo di saldatura è stata osservata una maggiore concentrazione di particelle in aria, con diametri inferiori, rispetto all'intero ciclo lavorativo. Dal punto di vista biologico, le concentrazioni urinarie delle NP di Cr e Ni sono state misurate tramite un metodo sviluppato e validato in sp-ICP-MS. I risultati hanno mostrato un aumento delle NP a fine turno rispetto all'inizio, confermando l'assorbimento delle particelle durante l'attività lavorativa. I soggetti non esposti presentano invece livelli nettamente inferiori. Le NP mostrano un diametro medio stabile (circa 50 nm per il Cr e 60 nm per il Ni), in linea con le caratteristiche delle particelle ambientali. Le analisi su plasma e condensato dell'aria espirata sempre tramite sp-ICP-MS hanno confermato la presenza di NP anche in questi compartimenti sistemici. L'analisi delle EV rappresenta uno degli aspetti più innovativi del lavoro. È stato sviluppato e validato un metodo di ultracentrifugazione per estrarre e concentrare i campioni urinari, sia per EV che per NP. Le frazioni isolate a $100.000 \times g$ mostrano la maggiore presenza di EV e NP, suggerendo che tali vescicole possano fungere da serbatoi e vettori nel trasporto intracorporeo delle particelle metalliche. Il metodo ha inoltre permesso di concentrare e analizzare campioni urinari contenenti quantità limitate di NP. Le analisi tramite Cryo-EM hanno identificato tre modalità di interazione nella matrice urinaria tra NP ed EV: NP libere nel mezzo extracellulare, NP di circa 5 nm all'interno delle EV, e NP associate alla membrana fosfolipidica delle vescicole. Questi risultati indicano un potenziale coinvolgimento delle EV nella biodistribuzione e nell'eliminazione delle NP urinarie, oltre a suggerire che le particelle possano presentarsi in forma aggregata anche durante le analisi in sp-ICP-MS. Nel complesso, questo studio fornisce una caratterizzazione approfondita dell'esposizione occupazionale a NP di Cr e Ni nei saldatori e propone nuovi elementi per comprendere la loro tossicocinetica. L'approccio integrato ambientale-biologico, combinato con lo studio delle EV, offre strumenti promettenti per il biomonitoraggio e per la valutazione del rischio associato alle nanoparticelle metalliche. I risultati, seppur preliminari, costituiscono un contributo originale nel campo della nanotossicologia e indicano la necessità di ulteriori ricerche per approfondire il mondo ancora poco conosciuto delle nanoparticelle.

1. INTRODUZIONE

1.1 Nanotecnologie e Nanoparticelle

La nanotecnologia è considerata da molti un'area di ricerca e sviluppo rivoluzionaria in grado di risolvere problemi chiave della società. I nanomateriali ingegnerizzati possiedono un grande potenziale in numerosi settori, in particolare in medicina. Si prevede un'ampia applicazione anche nella produzione e nello stoccaggio di energia, così come nei settori ottico, elettronico, meccanico e ceramico. La nanotecnologia è ampiamente utilizzata anche per migliorare le caratteristiche dei prodotti di consumo. Inoltre, il campo della nanomedicina mostra grandi promesse, come l'uso delle nanoparticelle per il targeting specifico delle cellule tumorali e per l'imaging medico [1].

Nel database "Nanodatabase" (<https://www.nanodb.dk>) è possibile osservare che, al 15 dicembre 2025, sono presenti sul mercato europeo circa 5368 prodotti contenenti nanomateriali.

Secondo la Commissione Europea, il termine "nanoparticella" identifica particelle formate da aggregati atomici o molecolari con diametro compreso tra 1 e 100 nm. In generale, le NP si dividono in naturali e ingegnerizzate: le prime derivano da processi geologici e biologici, mentre le seconde possono essere rilasciate involontariamente nell'ambiente a causa di attività industriali, processi di combustione ad alte temperature, lavorazioni meccaniche ad alta velocità, traffico veicolare o impianti di riscaldamento e incenerimento [2].

Le nanoparticelle inoltre possono essere:

- Metalliche (oro, argento, ferro, rame, nichel, ecc.),
- Ossidi metallici (ossido di titanio, di zinco, ecc.),
- Polimeriche o carboniose, con funzioni e applicazioni differenti.

Le nanoparticelle rappresentano una classe di materiali caratterizzati da dimensioni nanometriche e proprietà chimico-fisiche peculiari che ne consentono un ampio impiego in ambito biomedico, tecnologico e ambientale. Tuttavia, le stesse caratteristiche che ne determinano l'efficacia funzionale possono comportare potenziali rischi di natura tossicologica, legati alla loro elevata reattività e capacità di interagire con i sistemi biologici. Gli studi recenti evidenziano la necessità di approcci multidisciplinari per comprendere i meccanismi di azione delle nanoparticelle e valutarne la sicurezza. In tale contesto, la ricerca sulle nanoparticelle metalliche, in particolare di cromo e nichel, assume un ruolo centrale per la valutazione dell'esposizione occupazionale e degli effetti sulla salute umana.

Concludendo l'ambito occupazionale offre scenari di studio semi-sperimentali per la caratterizzazione degli effetti sull'uomo delle nanoparticelle.

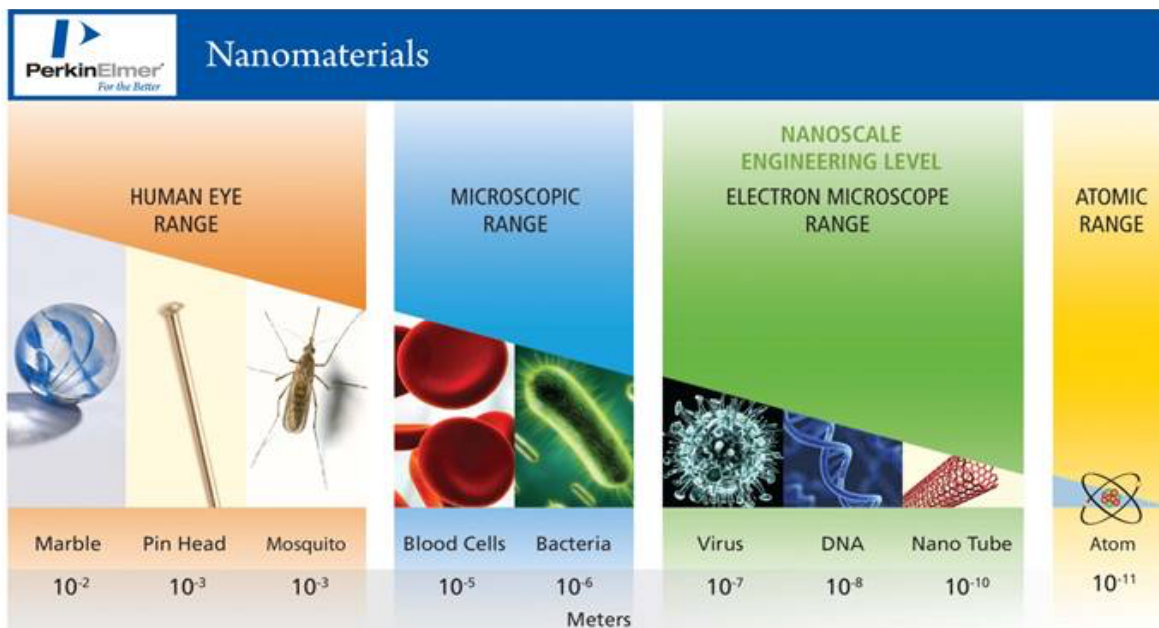


Figura 1 = Differenti diametri a confronto, Courtesy of PerkinElmer

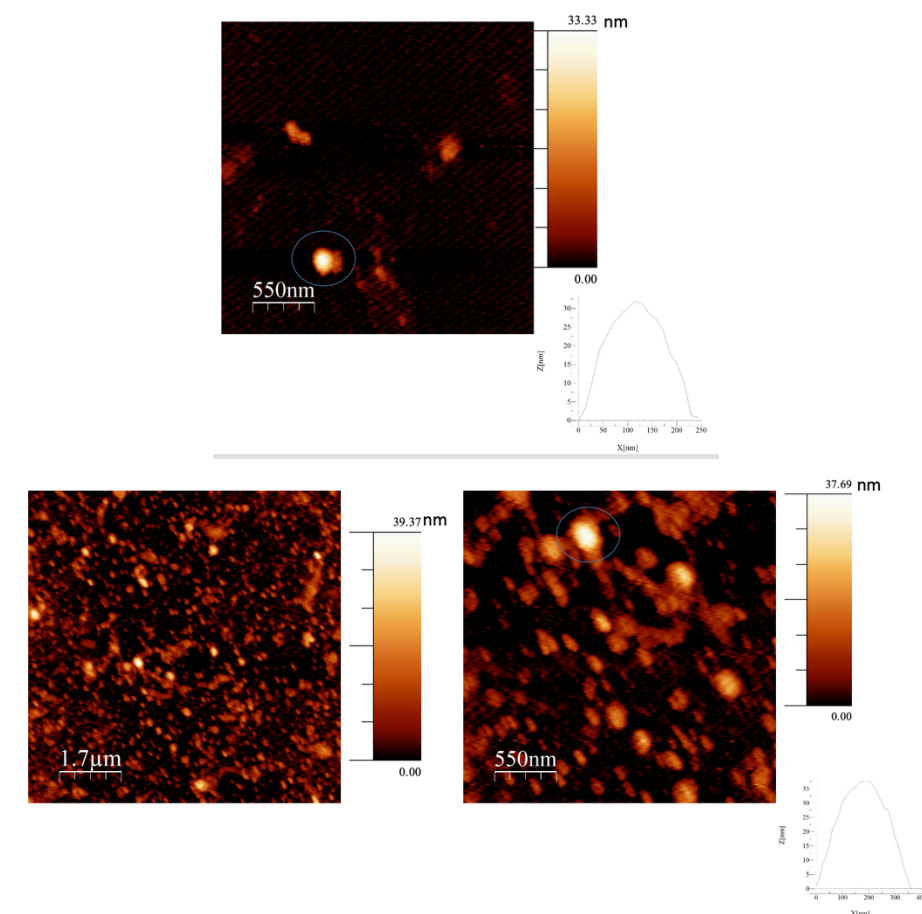


Figura 2 = Morfologia NP di oro con Microscopio a Forza Atomica (AFM)

1.2 Applicazioni delle nanotecnologie

Le nanoparticelle sono impiegate in:

- Ambito biomedico, per drug delivery e diagnostica;
- Industria e tecnologia, come catalizzatori, sensori o materiali funzionali;
- Ambiente e salute, sia come strumenti di bonifica sia come possibili contaminanti [3].

Le nanoparticelle metalliche e metalliche ossidate trovano impiego in numerosi settori: dalla catalisi industriale alla sensoristica, dall'ingegneria dei materiali alle applicazioni biomediche, come la diagnostica, la somministrazione mirata di farmaci e le tecniche di imaging. La crescente produzione e diffusione di materiali nanostrutturati ha determinato un notevole interesse per la valutazione dei potenziali effetti sulla salute umana e sull'ambiente. Le nanoparticelle, per la loro ridotta dimensione e l'elevato rapporto superficie/volume, presentano proprietà chimico-fisiche profondamente diverse dai materiali massivi, rendendole al tempo stesso estremamente utili in applicazioni industriali e potenzialmente pericolose per gli organismi viventi.

La loro versatilità deriva da proprietà ottiche, elettriche e catalitiche uniche, che tuttavia rendono complesso prevedere le interazioni biologiche. L'aumento della produzione di nanomateriali ha comportato una crescita dell'esposizione professionale e ambientale, soprattutto nei contesti industriali come saldatura, metallurgia, e produzione di pigmenti o rivestimenti.

Tuttavia, al momento, la quantità di NP derivante da produzione industriale dedicata è marginale rispetto a quella generata e rilasciata involontariamente, ad esempio tramite combustione [2].

1.3 Le problematiche in ambito occupazionale

I lavoratori sono generalmente i primi nella società a essere esposti ai rischi derivanti dalle tecnologie emergenti, e le nanotecnologie non fanno eccezione. I luoghi di lavoro in cui i nanomateriali vengono sviluppati, studiati, prodotti, utilizzati e smaltiti sono estremamente vari e comprendono tutti i settori economici [4].

Lo sviluppo e la diffusione rapida delle nanotecnologie nelle attività industriali a livello mondiale richiedono particolare attenzione ai potenziali rischi per la salute dei lavoratori esposti a materiali nanometrici.

Il Censimento italiano delle nanotecnologie ha individuato 93 istituti pubblici attivi nella ricerca su scala nanometrica, per un totale di 1.122 addetti; inoltre, delle 23 imprese private censite, 14 risultavano di piccole dimensioni. Il documento in questione analizza principalmente le “manufactured nanoparticles”, ovvero le nanoparticelle prodotte intenzionalmente nell’ambito delle nanotecnologie, ponendo particolare attenzione alla valutazione del rischio occupazionale per i lavoratori coinvolti nella loro produzione e manipolazione. Gli autori riconoscono tuttavia l’esistenza di nanoparticelle non intenzionali (incidental nanoparticles), generate come sottoprodotti di cicli tecnologici o di processi industriali convenzionali. Al momento della pubblicazione, le quantità di nanoparticelle prodotte involontariamente risultavano nettamente superiori rispetto a quelle derivanti da una produzione intenzionale. Sebbene queste ultime non rappresentino il focus principale dello studio, il modello di stima dell’esposizione proposto potrebbe essere esteso anche a scenari caratterizzati dalla presenza di nanoparticelle non intenzionali, includendo quindi popolazioni lavorative esposte a rischi non direttamente legati al settore delle nanotecnologie.

Alla luce di queste considerazioni, emerge come un numero significativo di lavoratori in Italia sia potenzialmente esposto a nanoparticelle, sia intenzionali sia involontarie, rendendo necessario un approccio integrato alla valutazione del rischio occupazionale [5].

Ciò è dovuto, in parte, al fatto che la nanotecnologia non rappresenta un’industria a sé, bensì una tecnologia abilitante, che contribuisce alla catena del valore di numerosi prodotti [4].

Nello specifico la saldatura è un processo industriale diffuso che produce fumi metallici contenenti nanoparticelle di ossidi metallici.

Fino al 63% delle particelle emesse durante le operazioni di saldatura rientra nel range nanometrico, con prevalenza di Ferro (Fe), Cr e Ni [6].

L’Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) ha classificato i fumi di saldatura come cancerogeni per l’uomo (Gruppo 1).

Si stima che circa 11 milioni di lavoratori in tutto il mondo abbiano la saldatura come principale attività lavorativa, e che un totale di 110 milioni di persone siano in qualche modo esposte ai fumi di saldatura nei loro ambienti di lavoro [IARC 2017].

La tecnica di saldatura, le condizioni operative e il materiale degli elettrodi possono influenzare la composizione, la reattività e la dimensione delle miscele di fumi di saldatura, con un impatto conseguente anche sulla loro tossicità [7].

È inoltre necessario considerare le ossidazioni, dissociazioni e altre reazioni chimiche che possono verificarsi in prossimità dell'arco elettrico, l'esperienza dei lavoratori, la posizione di saldatura, e l'ambiente di lavoro (spazio aperto o confinato). La persistenza del particolato nell'ambiente dipende dalla presenza o dall'efficienza della ventilazione generale e locale. Anche il tempo trascorso dall'ultima saldatura sembra influire, contribuendo a un fenomeno di accumulo delle particelle e a una stratificazione dei livelli di esposizione [8].

Tra i diversi inquinanti contenuti nei fumi di saldatura, i saldatori sono esposti a elevate concentrazioni di nanoparticelle. Manganese (Mn), Ni, Cr e cromo esavalente Cr (VI) si trovano comunemente negli aerosol dei fumi di saldatura e sono stati associati a gravi effetti avversi sulla salute, incluso il cancro ai polmoni [9].

In alcuni studi è stato rilevato che gli apprendisti saldatori sono esposti a concentrazioni elevate (fino a 300.000 particelle/cm³) di particelle con diametro aerodinamico inferiore a 100 nm, mostrando oltretutto che fino al 60% delle particelle emesse durante i processi di saldatura ha un diametro inferiore a 100 nm [9].

Nello specifico, per la saldatura di acciaio dolce, la percentuale stimata della nano-frazione di Mn depositata nel sistema respiratorio varia tra 10% e 56%; mentre per la saldatura di acciaio inox è il 59% del Mn totale, il 90% del Cr totale e il 64% del Ni totale [9].

Le nanoparticelle entrano quindi in contatto con il lavoratore durante le varie fasi del ciclo lavorativo.

Le principali vie di esposizione includono:

- inalazione, particolarmente rilevante nei lavoratori esposti ai fumi metallici;
- contatto cutaneo e ingestione accidentale;
- iniezione o impianto diretto, nei casi di applicazioni mediche e diagnostiche [10].

Nonostante gli sforzi normativi, mancano ancora valori limite di esposizione specifici per le nanoparticelle, e la regolamentazione si basa su dati derivati da materiali in forma massiva, non sempre rappresentativi del “nanoforme” [1].

1.4 Nanotossicologia

La letteratura indica un'elevata variabilità nella tossicità delle diverse NP, rendendo difficile valutarle come un unico gruppo di sostanze. Le conoscenze sugli effetti sulla salute delle NP metalliche e degli ossidi metallici sono in costante evoluzione e i dati disponibili non permettono ancora una valutazione del rischio affidabile per tutti questi nuovi materiali.

Le preoccupazioni derivano dal fatto che la piccola dimensione delle particelle implica una superficie specifica molto maggiore e, di conseguenza, un numero più alto di atomi di superficie rispetto allo stesso materiale in forma macroscopica. Ciò può alterare le proprietà elettroniche, ottiche, catalitiche e reattive del materiale, come la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) [1-5].

Da queste osservazioni nasce la nanotossicologia, che studia le interazioni tra nanomateriali e sistemi biologici [1].

Le NP possono raggiungere siti dell'organismo non accessibili alle particelle più grandi. La dimensione è cruciale per l'assorbimento cellulare, ma anche la forma e la carica superficiale influenzano fortemente il grado di uptake: le NP caricate positivamente vengono generalmente assorbite più rapidamente rispetto a quelle con carica negativa, a causa della carica netta negativa delle membrane cellulari [1].

È quindi essenziale distinguere una NP isolata da una NP che interagisce con un sistema biologico, modificandosi. Le proprietà chimico-fisiche delle NP dipendono dal contesto: si distingue quindi tra identità sintetica (composizione, struttura, rivestimenti superficiali, leganti) e identità biologica, che descrive le interazioni con le biomolecole e i loro effetti sulla dispersione [11].

Inoltre, studi recenti suggeriscono che, maggiore è la dose intracellulare di nanoparticelle, maggiori sono gli effetti tossici generati. Non solo la dimensione, ma anche la forma delle particelle può essere rilevante.

Il rilascio di ioni metallici può agire come “effetto cavallo di Troia”, con penetrazione intracellulare delle nanoparticelle e rilascio di ioni tossici all'interno delle cellule [12].

Le stesse caratteristiche che rendono le nanoparticelle utili — elevata superficie specifica, reattività, capacità di attraversare barriere biologiche — ne rendono anche complessa la valutazione tossicologica [2].

L'inalazione rappresenta la principale via di esposizione. Una parte dei nanossidi metallici (MONP) inalati può depositarsi nei polmoni e successivamente traslocare nel sangue e nel sistema linfatico, raggiungendo organi bersaglio come midollo osseo, linfonodi, milza, cuore e sistema nervoso centrale.

I MONP a bassa solubilità mostrano un lento processo di eliminazione e possono accumularsi nel tempo. Alcune rilasciano ioni metallici tossici all'interno delle cellule, con effetti sinergici se combinate.

Gli effetti sulla salute includono infiammazione, stress ossidativo, danni al DNA e genotossicità. L'esposizione a concentrazioni elevate di NP metalliche (Mn, Cr, Ni) può provocare disturbi respiratori, neurologici (come il Parkinsonismo da manganese), asma e cancro polmonare.

La letteratura indica che esiste un elevato grado di variabilità nella tossicità delle diverse nanoparticelle, rendendo difficile valutare i "nanomateriali" come un unico gruppo di sostanze [2].

I principali approcci tossicologici per studiare la tossicità delle NP possono quindi essere differenti:

- Studi in vitro (cellulari) e in vivo (animali o umani);
- Analisi di biodistribuzione, genotossicità, stress ossidativo e infiammazione;
- Approccio multidisciplinare per comprendere i meccanismi di interazione con i sistemi biologici [3].

Il capitolo 4 del *Handbook on the Toxicology of Metals* (Karlsson, Toprak e Fadeel, 2022) fornisce un'analisi completa sui principi, i meccanismi e le evidenze sperimentali riguardanti la tossicità delle nanoparticelle metalliche (MNP) e dei nanossidi metallici (MONP), sintetizzandoli nel seguente elenco:

- Dimensione: nanoparticelle più piccole hanno maggiore capacità di penetrare nei tessuti e interagire con strutture subcellulari;
- Forma e carica superficiale: influenzano il riconoscimento cellulare, la fagocitosi e la distribuzione nei compartimenti biologici;
- Solubilità e rilascio ionico: le particelle che rilasciano ioni metallici tossici (ad esempio Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}) mostrano effetti più marcati;
- Composizione e stato di ossidazione: determinano la stabilità chimica e la capacità di generare specie reattive dell'ossigeno;
- Corona proteica o “biocorona”: uno strato di proteine e biomolecole che si forma spontaneamente attorno alle nanoparticelle a contatto con fluidi biologici, modificandone la biodistribuzione e l'interazione con le cellule.

Uno dei meccanismi principali è l'induzione di stress ossidativo, dovuto alla produzione di ROS, che può portare a danni al DNA, perossidazione lipidica, disfunzioni mitocondriali e morte cellulare.

Il cosiddetto “effetto cavallo di Troia” descrive la capacità delle nanoparticelle di entrare nelle cellule e rilasciare ioni metallici tossici direttamente nel citoplasma, amplificando gli effetti tossici.

Fattore	Descrizione	Effetti sulla tossicità
Dimensione, forma e carica superficiale	Proprietà fisiche che determinano come le NP interagiscono con cellule e tessuti.	Influenzano la penetrazione cellulare, la distribuzione nei tessuti, l'assorbimento e la probabilità di reazioni biologiche avverse.
Solubilità e rilascio ionico	Capacità delle particelle di dissolversi e rilasciare ioni nel microambiente biologico.	Aumenta la tossicità soprattutto per NP contenenti metalli tossici (es. Ni, Cr), che possono generare stress ossidativo o danneggiare organelli cellulari.
Corona proteica (“biocorona”)	Strato di proteine e biomolecole che si adsorbe sulla superficie delle NP una volta entrate in un sistema biologico.	Modifica il riconoscimento da parte delle cellule, l'assorbimento, la biodistribuzione e può aumentare o ridurre la tossicità a seconda della composizione della corona.

Tabella 1 = Fattori che influenzano la tossicità delle nanoparticelle

Il capitolo presenta anche un'ampia panoramica delle evidenze tossicologiche per diversi tipi di nanoparticelle:

- Oro (AuNP) – generalmente biocompatibili e stabili, ma la tossicità aumenta con la riduzione delle dimensioni e con superfici cationiche.
- Argento (AgNP) – elevata efficacia antimicrobica, ma marcata citotossicità e genotossicità dovuta al rilascio di ioni Ag^+ e alla formazione di ROS.
- Rame e ossido di rame (Cu, CuO) – tra i materiali più tossici, capaci di provocare danni ossidativi al DNA e necrosi cellulare.
- Nichel e ossido di nichel (Ni, NiO) – inducono infiammazione, stress ossidativo e potenziali effetti cancerogeni, in particolare nelle vie respiratorie.
- Titanio Ossido (TiO_2) – ampiamente utilizzato e ritenuto biocompatibile, ma in forma nanometrica può indurre infiammazione polmonare e accumulo a lungo termine.
- Zinco Ossido (ZnO) – altamente solubile, con tossicità dovuta al rilascio di Zn^{2+} ; può provocare apoptosi e danni mitocondriali.
- Ferro e ossidi di ferro (Fe_2O_3 , Fe_3O_4) – effetti variabili, da ossidativi a protettivi, a seconda della forma cristallina e del rivestimento.
- Cerio Ossido (CeO_2) – interessante per le proprietà antiossidanti, ma la tossicità aumenta in condizioni di elevata concentrazione o dopo ossidazione superficiale.

1.5 Regolamentazione dell'esposizione alle NP occupazionale

Oggigiorno non esistono valori limite di esposizione unificati per le nanoparticelle: ad esempio, per TiO_2 i limiti proposti variano da 0.3 a 2.4 mg/m^3 , e per Ag da 0.098 a 50 mg/m^3 , evidenziando l'assenza di consenso metodologico [1].

L'istituzione di valori limite di esposizione (OELs) è fondamentale per proteggere i lavoratori e la popolazione dagli effetti avversi delle NP.

In elenco vengono riportati alcuni dei principali riferimenti normativi e delle raccomandazioni attualmente disponibili a livello internazionale per la gestione dell'esposizione ai nanomateriali.

Tali indicazioni, tuttavia, risultano ancora eterogenee e spesso limitate a specifiche categorie di NP o a contesti applicativi circoscritti, rendendo difficile un confronto diretto tra i diversi approcci di valutazione del rischio.

- OMS

Una revisione sistematica ha identificato 20 studi che proponevano 56 valori OEL per i nanomateriali. Tuttavia, il gruppo di sviluppo delle linee guida dell'OMS ha concluso che non esiste ancora un consenso su come derivare tali valori. In generale, gli OELs per i nanomateriali dovrebbero essere almeno tanto protettivi quanto quelli per il materiale in forma macroscopica [1].

- EPA

Nel 2017, l'EPA ha introdotto una normativa che impone alle aziende produttrici, importatrici o utilizzatrici di materiali su scala nanometrica di notificare informazioni dettagliate su volume di produzione, metodi di fabbricazione, usi e dati di sicurezza [1].

- OSHA / NIOSH

Per nanotubi e nanofibre di carbonio, l'esposizione non deve superare 1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ come media ponderata su 8 ore. Per le nanoparticelle di TiO_2 , il limite raccomandato è 0,3 mg/m^3 , molto inferiore a quello per il TiO_2 in forma macroscopica (2,4 mg/m^3) [OSHA].

- UE ed EFSA

La problematica delle NP riguarda anche i consumatori. In Europa, diverse direttive regolano la presenza di NP in cosmetici (Regolamento CE n. 1223/2009) e in materiali a contatto con alimenti (Regolamenti CE n. 450/2009 e 10/2011). L'EFSA ha inoltre pubblicato linee guida per la valutazione del rischio dei nanomateriali negli alimenti e nei mangimi [11].

- REACH

I nanomateriali ingegnerizzati (NM) rientrano nel campo di applicazione del Regolamento REACH. In particolare, il REACH richiede che le sostanze chimiche in forma nanometrica siano registrate con informazioni specifiche sulle loro proprietà chimico-fisiche, tossicologiche ed ecotossicologiche. Anche quando un NM è chimicamente identico a una sostanza già registrata in forma convenzionale,

può essere necessario un processo di registrazione separato, poiché le proprietà a livello nano possono comportare rischi differenti. Il Regolamento impone inoltre una valutazione dei rischi ambientali e per la salute umana, includendo la tossicità, la persistenza e il potenziale di bioaccumulo dei NM [REACH].

Nonostante i progressi normativi e le iniziative delle principali agenzie internazionali, emerge chiaramente come il quadro regolatorio relativo alle nanoparticelle sia ancora frammentato. L'assenza di valori limite di esposizione unificati – evidenziata, ad esempio, dall'ampia variabilità delle soglie proposte per TiO_2 e Ag – riflette la mancanza di un consenso metodologico condiviso sia sulla caratterizzazione delle NP sia sulle modalità più adeguate per stimarne la concentrazione reale nei differenti ambienti di esposizione. Questa incertezza è legata a numerosi fattori: la diversità morfologica e chimica dei nanomateriali, l'influenza delle loro proprietà dinamiche (agglomerazione, solubilità, interazioni con le matrici ambientali), oltre alla scarsità di tecniche analitiche standardizzate e riproducibili su larga scala. Per questi motivi, la semplice trasposizione dei limiti relativi al materiale macroscopico non è sufficiente, e si rischia di sottovalutare potenziali rischi emergenti. Alla luce di ciò, diventa essenziale definire valori limite specifici, concepiti sulla base delle caratteristiche proprie delle nanoparticelle, e sviluppare protocolli armonizzati per la loro misurazione. Solo attraverso metodologie condivise e validate sarà possibile ottenere dati comparabili, valutare correttamente l'esposizione reale e implementare strategie di gestione del rischio realmente efficaci. La costruzione di un quadro normativo robusto e uniforme non può prescindere dallo sviluppo di strumenti standardizzati per l'identificazione, la quantificazione e il monitoraggio delle nanoparticelle. Tale integrazione tra limiti espositivi chiari e protocolli analitici affidabili rappresenta un passaggio imprescindibile per garantire una tutela adeguata della salute dei lavoratori, dei consumatori e dell'ambiente [13-14].

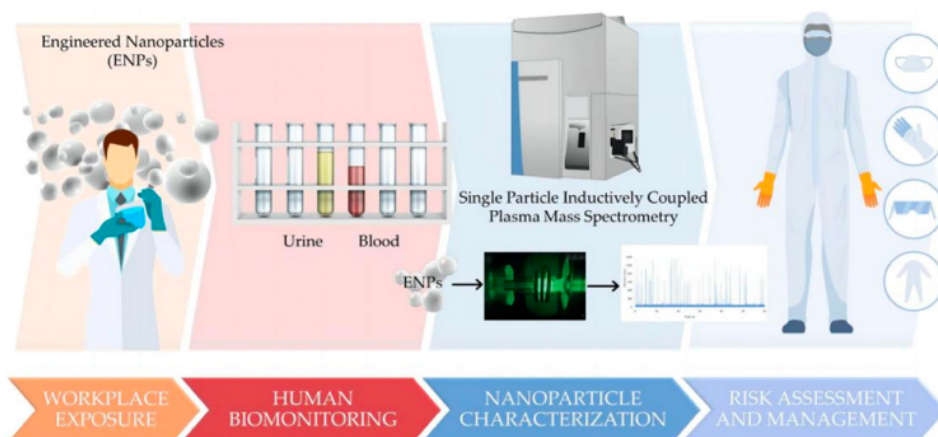


Figura 3 = Diagramma di gestione del rischio

1.6 Vescicole extracellulari

Le vescicole extracellulari (EV) sono particelle biogeniche secrete praticamente da tutti i tipi cellulari. Sono strutture delimitate da un doppio strato lipidico, con un diametro compreso tra 20 e 1000 nm, e vengono suddivise in diversi sottotipi in base ai meccanismi di biogenesi. Le EV sono presenti in numerosi fluidi corporei, tra cui plasma e urina, e svolgono un ruolo chiave nella comunicazione intercellulare. Modulano processi biologici fisiologici e patologici trasportando proteine, lipidi, metaboliti e acidi nucleici — tra cui mRNA e DNA — rispecchiando così il contenuto della cellula di origine [15-16].

Le proteine identificate nelle vescicole extracellulari urinarie (uEV) includono componenti del traffico di membrana, proteine citoscheletriche, motori molecolari, trasportatori e proteine ancorate a GPI. Negli ultimi anni, è stato dimostrato che le uEV sono straordinari indicatori dei processi molecolari e delle condizioni fisiopatologiche che interessano rene, urotelio e prostata, configurandosi come potenziali biomarcatori per diverse patologie renali e urogenitali.

Sono stati inoltre identificati nelle uEV anche componenti proteici provenienti da distretti anatomici distanti [9–10], un aspetto che amplia ulteriormente il loro potenziale diagnostico.

Grazie alle loro peculiari caratteristiche strutturali e compositive, le EV sono oggi considerate una delle piattaforme diagnostiche più promettenti per la medicina di precisione.

In questo contesto si inserisce anche l'attività del laboratorio con cui abbiamo collaborato per il progetto di dottorato: un gruppo che ha iniziato a studiare EV derivate da diverse matrici biologiche (urina, siero, plasma, tessuto muscolare scheletrico) attraverso un approccio multidisciplinare innovativo. Tale approccio integra metodologie biologiche e biochimiche con strumenti nanotecnologici, normalmente impiegati per indagare proprietà tipiche delle soluzioni colloidali — come concentrazione, dimensione, rigidità e stabilità — tradizionalmente applicate alle nanoparticelle sintetiche. Questo ha permesso di evidenziare caratteristiche distintive associate a varie condizioni patologiche, tra cui disturbi della coagulazione, malattie neurodegenerative e tumori del sangue.

Le applicazioni delle EV nell'ambito della medicina del lavoro sono numerose e ancora in gran parte inesplorate. La possibilità di caratterizzare in modo fine la risposta biologica alle nanoparticelle offre infatti prospettive concrete per migliorare la comprensione della loro tossicocinetica e tossicodinamica, con l'obiettivo di individuare nuovi biomarcatori di esposizione ed effetto, utili sia nella sorveglianza sanitaria sia nella prevenzione dei rischi professionali [15-16].

1.7 Letteratura in ambito occupazionale e di nanoparticelle

a) Nello studio di Beatrice Bocca et al., intitolato “*Human biomonitoring and personal air monitoring. An integrated approach to assess exposure of stainless-steel welders to metal-oxide nanoparticles*”, sono stati valutati il diametro e la concentrazione numerica delle nanoparticelle di ossidi metallici (MONP) in diverse matrici biologiche e in campioni d’aria personale raccolti da 18 saldatori di acciaio inox e 15 impiegati amministrativi non esposti, appartenenti a due aziende italiane del settore della meccanica.

Il condensato dell’aria espirata (EBC) e le urine sono stati prelevati prima del turno del primo giorno e dopo il turno del quinto giorno della settimana lavorativa, mentre plasma e particolato inalabile (IPM) sono stati raccolti dopo il turno del quinto giorno e analizzati mediante spettrometria di massa a particella singola (sp-ICP-MS), per valutare una possibile esposizione alle nanoparticelle di Cr_2O_3 , Mn_3O_4 e NiO nei saldatori.

Le nanoparticelle presenti nell’IPM di entrambe le aziende hanno mostrato una composizione multi-ossido, costituita da:

- Cr_2O_3 (mediana: 871.574 particelle/ m^3 ; 70 nm),
- Mn_3O_4 (mediana: 713.481 particelle/ m^3 ; 92 nm),
- NiO (mediana: 369.324 particelle/ m^3 ; 55 nm).

L’EBC dei saldatori di entrambe le aziende ha mostrato concentrazioni mediane di nanoparticelle di Cr_2O_3 significativamente più elevate nel post-turno (64.645 particelle/mL; 55 nm) rispetto al pre-turno (15.836 particelle/mL; 58 nm). Nel plasma dei saldatori sono state osservate concentrazioni e dimensioni mediane significativamente inferiori delle nanoparticelle di Cr_2O_3 (7.762 particelle/mL; 44 nm) rispetto all’EBC.

In una delle due aziende, le nanoparticelle di NiO sono state rilevate solo nel post-turno, con valori mediani di:

- EBC: 22.000 particelle/mL; 65 nm
- Plasma: 8.248 particelle/mL; 37 nm

Nelle urine dei saldatori di entrambe le aziende non sono state rilevate nanoparticelle di Cr_2O_3 , Mn_3O_4 o NiO .

Le analisi combinate delle matrici biologiche e dei campioni d’aria si sono rivelate un approccio valido per indagare sia le esposizioni interne che quelle esterne dei lavoratori della saldatura alle nanoparticelle di ossidi metallici [17].

b) Nello studio di Beatrice Bocca et al., intitolato “*Occupational Exposure to Metal Engineered Nanoparticles: A Human Biomonitoring Pilot Study Involving Italian Nanomaterial Workers*”, è stata valutata l'esposizione professionale a nanoparticelle metalliche ingegnerizzate (ENP) in due aziende italiane tramite human biomonitoring (HBM), utilizzando una tecnica avanzata: Single Particle ICP-MS (sp-ICP-MS), capace di misurare dimensioni e concentrazione delle nanoparticelle in campioni di sangue e urina.

Sono stati analizzati.

- 6 lavoratori esposti
 - *Company A*: produzione di nanostrutture InAs, con possibile uso di Au NPs
 - *Company B*: sintesi di nanoparticelle Pt-PVP e uso di Ir, Pd, Pt
- 2 controlli (impiegati amministrativi)

I campioni di urina sono stati raccolti pre e post turno per 4 giorni, i campioni di sangue sono stati raccolti a fine settimana lavorativa. Il metodo sp-ICP-MS è risultato altamente lineare ($R^2 > 0.99$), con limiti di rilevazione molto bassi (ng/mL), accurato e ripetibile.

Risultati campioni Urina

- NPs di Ag rilevate in 1 lavoratore di Company A e anche nei controlli, con dimensione ~29 nm. Non si osservano differenze chiare tra esposti e controlli. Probabile esposizione extra-professionale (cosmetici, prodotti sanitari, tessili, ecc.).
- Nessuna traccia in urina di: Au, In₂O₃, Ir, Pd, Pt, TiO₂.

Risultati campioni Sangue

- Au NPs (~15 nm) trovate in tutti i lavoratori di Company A e tutti i controlli. Anche in questo caso esposizione probabilmente ambientale/non lavorativa.
- TiO₂ NPs (~82–90 nm) presenti sia negli esposti sia nei controlli. Coerente con esposizioni comuni (cosmetici, alimenti contenenti additivi a base di TiO₂).
- In₂O₃ NPs (~38 nm) rilevate solo in due lavoratori di Company A, non nei controlli. Indica una vera esposizione professionale.
- Nessuna nanoparticella rilevata nei lavoratori di Company B (Ir, Pd, Pt). Le misure di contenimento adottate sembrano efficaci.

Lo studio dimostra che sp-ICP-MS è una tecnica promettente per biomonitoraggi reali dei lavoratori, grazie ad alta sensibilità e capacità di distinguere la forma nano dalla forma ionica.

Il metodo sp-ICP-MS permette di identificare e quantificare specifiche nanoparticelle in matrici biologiche e può diventare un valido strumento per la valutazione del rischio nei luoghi di lavoro.

È necessario, tuttavia, ampliare gli studi su campioni più numerosi per definire valori di riferimento, in quanto attualmente non esistono limiti biologici per nanoparticelle metalliche.

I risultati evidenziano l'importanza di considerare anche le esposizioni non professionali per interpretare correttamente i biomonitoraggi [18].

c) Nello studio di Elizabeth Adjoa Kuman et al., intitolato “*Human and environmental impacts of nanoparticles: a scoping review of the current literature*”, è stata svolta una revisione sistematica di tipo *scoping* la quale rappresenta uno dei contributi più completi e recenti nella mappatura della letteratura disponibile sugli impatti delle nanoparticelle. Il lavoro analizza 117 studi pubblicati dal 2000 al 2021, evidenziando tanto i progressi scientifici quanto le significative lacune conoscitive riguardo all'esposizione e alla tossicità di questa classe di materiali.

Negli ultimi due decenni l'interesse scientifico verso i nanomateriali è cresciuto in modo esponenziale, parallelamente all'aumento della loro applicazione in settori come biomedicina, industria cosmetica, elettronica, trattamento delle acque e ingegneria dei materiali. Le nanoparticelle, definite come entità con dimensioni comprese tra 1 e 100 nm, presentano proprietà fisico-chimiche peculiari che conferiscono vantaggi tecnologici, ma al contempo sollevano preoccupazioni rispetto ai loro potenziali effetti avversi sulla salute umana e sugli ecosistemi.

La letteratura esaminata dallo studio in questione distingue quattro categorie principali di nanoparticelle:

1. Inorganiche (metalli e ossidi metallici: ZnO, TiO₂, SiO₂, Fe₃O₄, Ag, ecc.)
2. Carboniose (nanotubi di carbonio mono e multi-parete, grafene, fullerene)
3. Organiche o polimeriche (liposomi, dendrimeri, micelle, PLGA)
4. Composite (combinazioni di materiali organici, metallici e carboniosi)

Le applicazioni sono estremamente diversificate: dal drug delivery alle terapie oncologiche, dai sistemi di rilevazione diagnostica al tessile, fino a processi di remediation ambientale. Le proprietà che rendono tali materiali particolarmente utili – elevata reattività superficiale, capacità di penetrare barriere biologiche, comportamento quantistico – rappresentano anche elementi critici in termini di rischio tossicologico.

Gli studi inclusi identificano tre principali vie di esposizione umana:

- inalatoria, considerata la più rilevante in ambienti occupazionali e urbani;
- orale/ingestiva, tipicamente associata all'ingestione involontaria di NP liberati da packaging, acqua o prodotti alimentari;
- cutanea, con particolare rilievo nell'esposizione tramite cosmetici o materiali topici.

Una volta penetrati nell'organismo, le nanoparticelle possono attraversare barriere fisiologiche (epiteliale, alveolare, emato-encefalica) e interagire con strutture subcellulari come mitocondri, lisosomi e reticolo endoplasmatico. Tali interazioni attivano una cascata di eventi molecolari riconducibili ai principali meccanismi di tossicità.

La quasi totalità degli studi analizzati (93%) riguarda l'impatto delle nanoparticelle sulla salute umana, in prevalenza attraverso modelli *in vitro* basati su linee cellulari immortalizzate (utilizzate nel 76,9% dei casi).

Le cellule maggiormente impiegate includono:

- A549 (epitelio alveolare umano),
- BEAS-2B (epitelio bronchiale),
- HepG2 (epatocarcinoma umano),
- SH-SY5Y (neuroblastoma).

Solo 22 studi impiegano cellule primarie umane, sottolineando un importante limite metodologico nel campo.

Dalla sintesi dei risultati emerge una serie di effetti ricorrenti, osservati in modo consistente attraverso vari tipi di nanoparticelle:

a) Stress ossidativo e produzione di ROS

È il meccanismo maggiormente documentato. Lo stress ossidativo è spesso dose-dipendente e associato a NP come SiO₂, ZnO, Fe₃O₄, CeO₂ e CuO. L'accumulo di specie reattive dell'ossigeno può determinare danni alle membrane, ai mitocondri e al DNA.

b) Danno al DNA e genotossicità

Sedici studi riportano evidenze di genotossicità, soprattutto per ZnO e nanotubi di carbonio multi-parete. I danni includono rotture dei filamenti, alterazioni della metilazione e instabilità cromosomica.

c) Apoptosi e morte cellulare

La diminuzione della vitalità cellulare e l'attivazione di programmi apoptotici costituiscono gli esiti più frequentemente osservati. Gli effetti dipendono da dimensioni, carica superficiale e cristallinità della nanoparticella.

d) Infiammazione

Molte NP inducono produzione di citochine pro-infiammatorie (IL-6, IL-8, TNF- α) e attivazione di vie di stress cellulare, specialmente nelle cellule epiteliali delle vie aeree.

e) Altri effetti biologici

Sono riportati:

- disfunzioni mitocondriali,
- alterazioni dell'autofagia,

- modifiche del ciclo cellulare,
- effetti neurotossici dovuti a TiO₂, SiO₂ e Ag.

Nel complesso, la revisione sottolinea che la tossicità delle NP dipende non solo dalle proprietà fisico-chimiche delle particelle, ma anche dalla suscettibilità individuale, includendo fattori genetici e capacità di risposta allo stress.

Solo 5 studi su 117 trattano esplicitamente l'impatto delle nanoparticelle sugli ecosistemi. Questo dato rivela una significativa lacuna conoscitiva, nonostante l'elevato potenziale di rilascio dei nanomateriali nell'ambiente durante:

- la produzione,
- l'utilizzo,
- lo smaltimento dei prodotti contenenti NP.

Si stima che solo il 2% del volume totale delle NP venga rilasciato in fase di produzione, mentre la maggior parte dell'emissione avviene durante l'uso e alla fine del ciclo di vita dei prodotti.

Gli studi analizzati utilizzano organismi e matrici ambientali quali:

- suoli e semi di soia,
- *Allium cepa*,
- batteri nitrificanti (*Nitrosomonas*, *Nitrospira*),
- *Daphnia magna*,
- larve di zebrafish,
- pesci d'acqua dolce.

Gli impatti riportati includono:

- riduzione della vitalità cellulare nei vegetali,
- stress ossidativo in organismi acquatici,
- ritardi nella crescita di germogli,
- bioaccumulo,
- alterazioni nei processi nitrificanti dei suoli.

Complessivamente, gli autori evidenziano che l'ecotossicità delle nanoparticelle rappresenta un'area estremamente sottostudiata e critica per una valutazione realistica del rischio.

Il corpus di studi esaminato presenta vari limiti strutturali, tra cui:

- prevalenza di studi in vitro, spesso difficilmente generalizzabili;
- scarsa standardizzazione dei protocolli, con differenze significative nelle condizioni sperimentali;
- uso eccessivo di linee cellulari immortalizzate, che non rappresentano accuratamente i tessuti umani;

- debolezza delle analisi ambientali, quasi assenti rispetto alle indagini sulla salute umana;
- assenza di ricerche su alcune tipologie di nanoparticelle (es. oro, platino, MoO₃, WO₃).

La revisione analizzata mostra in modo chiaro che, nonostante i numerosi benefici applicativi delle nanoparticelle, esistono rischi documentati per la salute umana, mentre l'impatto ambientale rimane largamente non definito.

Le principali indicazioni per la ricerca futura includono:

- sviluppo di modelli realistici di esposizione umana e ambientale;
- maggiore utilizzo di cellule primarie rispetto alle linee immortalizzate;
- studi più approfonditi su NP poco investigate;
- ampliamento delle analisi ecotossicologiche in ecosistemi reali;
- definizione di standard metodologici comuni per la valutazione della nanotossicità [19].

c) Nello studio di Fang Wang et al., intitolato “*Current research on ecotoxicity of metal-based nanoparticles: from exposure pathways, ecotoxicological effects to toxicity mechanism*” ci si focalizza sulla crescente diffusione dei nanomateriali che comporta potenziali rischi per l'ambiente e la salute umana. Le nanoparticelle possono essere rilasciate nell'ambiente durante produzione, utilizzo e smaltimento, contribuendo a effetti tossici su microrganismi, piante, animali e organismi umani. L'articolo fornisce un'ampia revisione delle conoscenze attuali includendo:

- vie di esposizione;
- effetti ecotossicologici;
- meccanismi molecolari e cellulari di tossicità;
- sfide e prospettive future nella valutazione ecotossicologica.

Secondo la revisione, le NP possono raggiungere gli organismi attraverso modalità specifiche legate alla loro piccola dimensione, che permette di attraversare membrane cellulari e compartimenti intracellulari, rendendo la dinamica dell'esposizione diversa rispetto a particelle più grandi.

Le NP inoltre entrano negli ecosistemi acquatici tramite scarichi industriali, acque di scolo e runoff agricolo.

Una volta nell'acqua, possono:

- aderire e penetrare nei tessuti degli organismi acquatici (es. rame e oro);
- subire bioaccumulo e biomagnificazione lungo la catena trofica, come osservato per AgNPs trasferite fino a *Tetrahymena thermophila*;
- modificare la propria tossicità in presenza di materia organica, che può ridurre la tossicità di AgNPs verso batteri e protozoi.

La capacità di accumulo dipende dalle proprietà chimico-fisiche, dalle caratteristiche fisiologiche degli organismi e dalle condizioni ambientali.

Le piante possono assorbire NP attraverso:

- superficie fogliare, dove particelle più piccole (es. AuNPs da 3–10 nm) possono penetrare più facilmente attraverso l'epidermide rispetto a particelle con coating PVP;
- radici, che rappresentano una via di ingresso rilevante: sono implicati trasportatori specifici come IRT1 in *Arabidopsis thaliana*, che facilitano l'assorbimento di ioni metallici derivanti dalla dissoluzione delle NP.

Numerosi studi mostrano che le NP esercitano tossicità variabile verso pesci, invertebrati e altri organismi acquatici. Gli effetti includono alterazioni della crescita, della sopravvivenza e della riproduzione, con una forte dipendenza dalle caratteristiche specifiche del metallo e dalle condizioni ambientali

Sulle piante possono invece provocare:

- inibizione della crescita,
- alterazioni dei processi metabolici,
- stress ossidativo,
- danni correlati alla dimensione e alla concentrazione, come evidenziato per ZnO NPs in semi di soia e campioni di suolo.

Gli studi sugli animali mostrano tossicità dose- e dimensione-dipendente, con:

- citotossicità,
- danni ossidativi,
- alterazioni dei livelli enzimatici,
- accumulo organo-specifico.

Gli effetti documentati sull'uomo includono:

- riduzione di vitalità cellulare,
- incremento dei livelli di LDH,
- generazione di ROS,
- induzione di infiammazione (es. IL-8),
- neurotossicità e alterazioni metaboliche a seconda del tipo di nanoparticella.

La revisione evidenzia numerose sfide nella valutazione dell'ecotossicità dei nanomateriali metallici:

- difficoltà nel misurare l'effettiva esposizione alle NP in ambienti reali, data la tendenza all'aggregazione e alla trasformazione chimica,
- scarsa standardizzazione dei metodi tossicologici,
- variabilità degli effetti in base alla specie e alle condizioni ambientali,
- necessità di integrare approcci come “integrated biomarker response”, QSAR e read-across per colmare lacune di dati.

Per una gestione adeguata dei rischi, sarà indispensabile sviluppare metodologie più integrate, regolamentazioni adeguate e un forte approccio multidisciplinare [20].

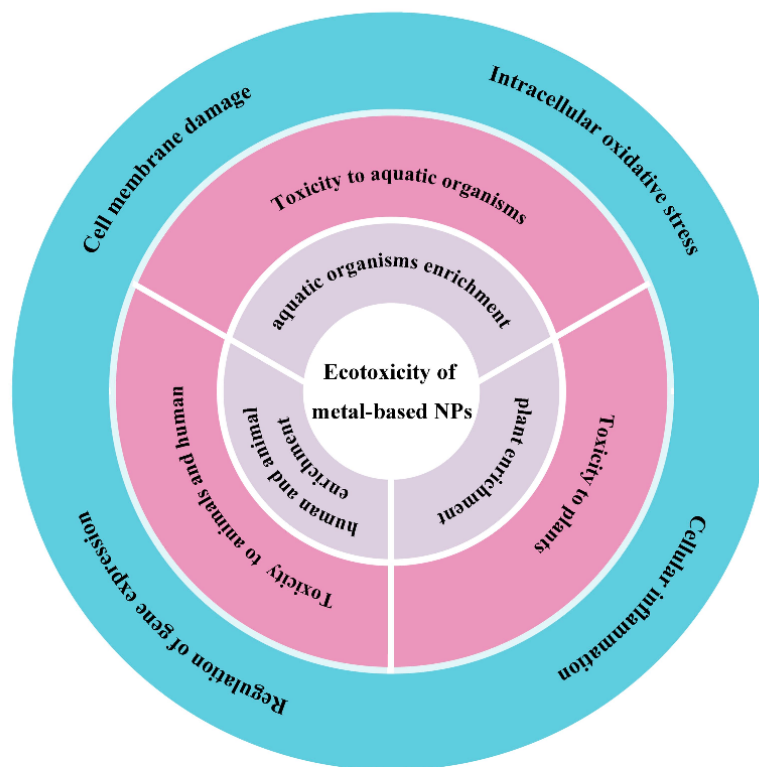


Figura 4 = Ecotoxicity of metal-based NPs

1.8 Biomonitoraggio e monitoraggio degli inquinanti respirabili: un approccio integrato

Il monitoraggio ambientale (MA) delle nanoparticelle nell'aria inalabile e il biomonitoraggio (MB) umano rappresentano strategie complementari per valutare l'esposizione reale e identificare gruppi a rischio. Le matrici più usate includono sangue, plasma, urina e condensato dell'aria espirata (EBC). Tuttavia, i dati di MB sono ancora preliminari e mancano protocolli standardizzati per campionamento e analisi.

In questo progetto di dottorato, è stato sviluppato un protocollo per il monitoraggio biologico e ambientale. Per quanto riguarda il MB il protocollo analitico è basato principalmente sulla Spettrometria di Massa al Plasma Accoppiato Induttivamente a Particella Singola (sp-ICP-MS), per determinare concentrazione e dimensione delle NP metalliche in plasma, urina e EBC di saldatori di acciaio inox e no e di controlli non esposti. Sono state analizzate in particolare le NP di Cr e Ni, in quanto costituenti principali delle leghe e degli elettrodi utilizzati e noti per i loro effetti tossici (rilascio di ioni metallici, produzione di ROS, riduzione delle difese antiossidanti, inibizione della proliferazione cellulare e danni al DNA). Abbiamo inoltre utilizzato strumentazioni di microscopia elettronica per definire la morfologia delle NP.

Per quanto riguarda invece il MA abbiamo utilizzato uno spettrometro portatile ad ampio raggio Grimm 1371 Mini-WRAS che permette di quantificare le particelle disperse in aria.

L'integrazione del MA delle nanoparticelle aerodisperse con il MB rappresenta un approccio essenziale per comprendere in modo completo l'esposizione reale dei lavoratori e identificare precocemente potenziali rischi per la salute. Sebbene i dati di biomonitoraggio siano ancora preliminari e manchino protocolli standardizzati per il campionamento e l'analisi, l'uso combinato di tecniche avanzate e complementari — dalla sp-ICP-MS per la quantificazione e caratterizzazione delle nanoparticelle nelle matrici biologiche, alla microscopia elettronica per la definizione della loro morfologia, fino alla strumentazione portatile per la misura delle particelle nell'aria — permette di ottenere un quadro più accurato, affidabile e rappresentativo dell'esposizione.

L'approccio integrato consente infatti di collegare in modo diretto ciò che è presente nell'ambiente di lavoro con ciò che effettivamente entra nell'organismo, superando i limiti dei singoli metodi e migliorando la valutazione dei rischi associati alle nanoparticelle metalliche, come Cr e Ni, note per la loro tossicità. Questo tipo di strategia multidimensionale non solo rafforza la qualità delle evidenze scientifiche, ma rappresenta un passo fondamentale verso lo sviluppo di nuovi biomarcatori e verso una protezione più efficace della salute occupazionale e non solo.

Analizziamo ora nello specifico la strumentazione utilizzata.

1.9 Metodi analitici per la caratterizzazione delle nanoparticelle

Tra le tecniche più utilizzate per la caratterizzazione vi sono:

- Diffrazione a raggi X (XRD): identifica la struttura cristallina.
- Microscopia elettronica (SEM, TEM): permette di osservare dimensioni, forma, composizione e struttura atomica.
- Microscopia a forza atomica (AFM): analizza altezza, attrito e magnetismo delle superfici.
- Spettroscopia di assorbimento atomico (AAS) e plasma accoppiato induttivamente (ICP): determinano la composizione elementare.
- DLS (Dynamic Light Scattering): analizza la distribuzione dimensionale delle particelle in sospensione.
- Potenziale zeta (ζ): misura la carica superficiale.
- Spettroscopia UV-Vis, magnetometria (VSM, SQUID) e analisi termogravimetrica (TGA) completano il quadro.
- Strumenti come CPC, SMPS, ELPI e TEOM consentono il monitoraggio in tempo reale della concentrazione, distribuzione dimensionale e massa delle NP nell'aria.

Il crescente impiego delle NP in ambiti quali medicina, elettronica, cosmetica e materiali avanzati ha stimolato un parallelo interesse per la valutazione del rischio e della tossicità, nonché per la quantificazione della loro presenza nei fluidi biologici e negli ecosistemi.

Tuttavia, la bassa concentrazione con cui queste particelle si presentano nelle matrici ambientali e biologiche e la loro elevata eterogeneità dimensionale e compositiva rendono indispensabile lo sviluppo di tecniche analitiche estremamente sensibili e specifiche.

Tradizionalmente, l'analisi delle NP si è avvalsa di metodiche di imaging come la microscopia elettronica a scansione (SEM), la microscopia elettronica a trasmissione (TEM) e la microscopia a forza atomica (AFM), che permettono di visualizzare morfologia, dimensioni e struttura superficiale. Tali tecniche, pur offrendo un'elevata risoluzione spaziale, richiedono tempi di analisi prolungati, preparazioni complesse e non sempre consentono una quantificazione diretta del numero o della concentrazione delle particelle in campione.

In questo contesto, si è affermata la Spettrometria di massa al plasma accoppiato induttivamente a particelle singole (sp-ICP-MS), considerata oggi una delle tecniche di riferimento per la caratterizzazione quantitativa e dimensionale delle nanoparticelle metalliche in sospensioni acquose e matrici biologiche complesse.

1.10 Spettrometria di massa al plasma accoppiato induttivamente per particelle singole

La tecnica sp-ICP-MS, normalizzata secondo la ISO/TS 19590:2017, permette di rilevare singole nanoparticelle attraverso l'analisi di impulsi ionici generati quando ciascuna NP entra nel plasma induttivamente accoppiato (ICP). Durante la misura, la sospensione contenente le NP viene introdotta in modo altamente diluito, così da garantire che ogni particella raggiunga il plasma separatamente. L'interazione il plasma produce la vaporizzazione, atomizzazione e ionizzazione completa dei costituenti elementari della particella, che viene poi rivelata dal rilevatore di massa (MS) come un impulso di segnale di durata di poche centinaia di microsecondi.

L'intensità del segnale registrato è proporzionale alla massa della singola particella, e la frequenza degli impulsi è correlata alla concentrazione numerica delle NP (PNC, Particle Number Concentration). Assumendo una densità nota e una forma geometrica (solitamente sferica), la tecnica consente di calcolare la dimensione media e la distribuzione dimensionale della popolazione di nanoparticelle.

Il principio di base prevede che un campione, generalmente in soluzione, venga nebulizzato in un aerosol e trasportato nel plasma di argon (a circa 6000–10.000 K), dove gli atomi vengono ionizzati. Gli ioni prodotti vengono poi separati in base al rapporto massa/carica (m/z) all'interno dello spettrometro di massa e infine rilevati da un rilevatore elettronico, producendo un segnale proporzionale all'abbondanza isotopica dell'elemento analizzato.

Nel contesto tradizionale, l'ICP-MS misura una corrente ionica stazionaria derivante da una concentrazione uniforme di analita disciolto. Tuttavia, per l'analisi delle NP, è necessaria una modalità di acquisizione temporale diversa, capace di distinguere singoli eventi di ionizzazione discreti: nasce così la modalità single particle ICP-MS.

La tecnica sp-ICP-MS rappresenta un'estensione dell'ICP-MS convenzionale, sviluppata per la rilevazione e caratterizzazione di nanoparticelle individuali in sospensioni liquide estremamente diluite.

Il concetto chiave è che ciascuna NP, introdotta nel plasma una alla volta, genera un impulso transitorio di ioni il cui segnale è nettamente distinguibile dal fondo continuo prodotto dalle specie ioniche disciolte.

Ogni evento di ionizzazione produce un impulso segnale la cui intensità è proporzionale alla massa dell'elemento contenuto nella singola particella.

In termini pratici:

- un segnale continuo indica la presenza dell'analita in forma ionica disciolta;
- un segnale impulsivo isolato corrisponde alla vaporizzazione e ionizzazione di una singola nanoparticella.

Questa distinzione consente di discriminare tra la frazione disciolta e quella particolata dello stesso elemento all'interno del campione.

Rispetto alle metodiche di imaging, la sp-ICP-MS offre numerosi vantaggi:

- Altissima sensibilità elementare, fino a livelli di parti per trilione (ppt);
- Analisi quantitativa diretta del numero e della massa delle particelle;
- Semplicità di preparazione del campione e ridotto consumo di reagenti;
- Elevata produttività analitica, con tempi di misura di pochi minuti;
- Applicabilità a matrici complesse, quali fluidi biologici (urina, plasma) e campioni ambientali.

Queste caratteristiche la rendono una tecnica di elezione per il biomonitoraggio dell'esposizione professionale a nanomateriali metallici.

La sp-ICP-MS si conferma una metodica chiave per la quantificazione elementare e la caratterizzazione dimensionale delle nanoparticelle in matrici complesse, offrendo un livello di dettaglio impensabile fino a pochi anni fa. La possibilità di rilevare singole particelle e di distinguerle dallo ione disciolto corrispondente consente di ottenere informazioni critiche non solo per la valutazione del rischio tossicologico, ma anche per la comprensione dei meccanismi di interazione biologica.

Un sistema sp-ICP-MS è composto da quattro sezioni principali:

1. Sistema di introduzione del campione – Nebulizzatore e camera di nebulizzazione che trasformano la soluzione in aerosol e regolano la portata per ridurre l'interferenza tra particelle.
2. Sorgente al plasma (ICP) – Campo elettromagnetico generato da una bobina di induzione che ionizza l'argon; temperatura elevata che assicura completa atomizzazione delle particelle.
3. Interfaccia e analizzatore di massa – Sistema di coni (sampler e skimmer) che estraggono gli ioni dal plasma e li focalizzano nel quadrupolo o nel settore magnetico, dove vengono separati in base al rapporto m/z .
4. Rivelatore (Detector) – Conta individualmente gli ioni incidenti, convertendo l'intensità in segnale elettrico temporale.

Il tempo di risoluzione del rivelatore deve essere sufficientemente breve (dell'ordine di microsecondi) per discriminare impulsi successivi derivanti da nanoparticelle distinte.

Ogni impulso generato nel plasma rappresenta la risposta di una singola NP. L'integrale dell'area di ciascun picco è proporzionale alla massa dell'elemento contenuto nella particella. Attraverso una calibrazione basata su standard di nanoparticelle note (es. Au o Ag NP di diametro certificato), è possibile correlare l'intensità del segnale con la dimensione effettiva delle particelle ignote.

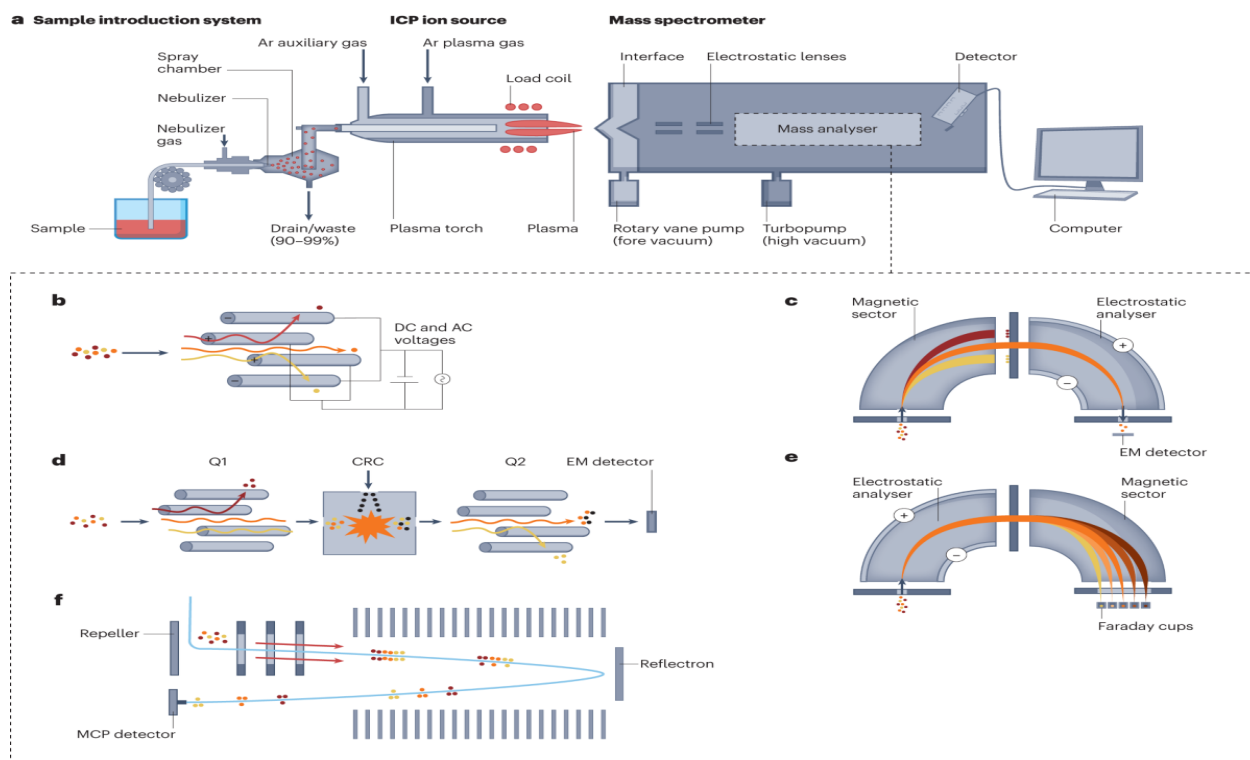


Figura 5 = Funzionamento ICP-MS

Dalla distribuzione temporale degli impulsi si possono ottenere:

- la concentrazione numerica delle particelle (PNC, *Particle Number Concentration*);
- la distribuzione dimensionale (istogramma delle dimensioni);
- la massa media e mediana delle NP;
- la differenziazione tra forma ionica e particolata dell'elemento.

La sp-ICP-MS consente di rilevare concentrazioni estremamente basse di nanoparticelle, anche inferiori a 50 particelle per millilitro, e di determinarne il diametro con una sensibilità fino a pochi nanometri, a seconda della natura del materiale e delle condizioni di calibrazione.

I principali vantaggi comprendono:

- rapidità analitica (pochi minuti per campione);
- capacità di analizzare matrici biologiche o ambientali senza separazioni preliminari;
- determinazione simultanea di ioni e particelle metalliche;
- possibilità di monitorare processi di dissoluzione, aggregazione o trasformazione delle NP nel tempo.

I limiti principali risiedono nella necessità di:

- diluizioni controllate per evitare coincidenze di particelle;
- calibrazioni rigorose in funzione della densità e forma del materiale;
- accuratezza nella correzione del fondo ionico e delle interferenze isotopiche.

L'applicazione della sp-ICP-MS si estende dal monitoraggio ambientale (acque, suoli, aerosol) e biologico (urina, plasma, EBC) alla tossicologia occupazionale, fino alla nanomedicina, dove è impiegata per studiare il destino biologico delle nanoparticelle metalliche [1-21-22-23].

1.11 NanoSight – Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

NanoSight è un sistema analitico sviluppato da Malvern Panalytical (ex Malvern Instruments) basato sulla tecnologia Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). Lo strumento consente di misurare dimensione, concentrazione e distribuzione dimensionale di particelle nanoscopiche sospese in liquido, tipicamente con diametri compresi tra 10 e 1000 nanometri.

Il principio di funzionamento si basa sull'osservazione diretta del moto browniano delle particelle illuminate da un fascio laser.

- Un laser colpisce la sospensione, facendo diffondere la luce dalle particelle individuali.
- Una telecamera ad alta sensibilità (solitamente CMOS o CCD) registra i movimenti casuali delle particelle in un breve intervallo temporale.
- Un software di analisi segue (tracking) la traiettoria di ogni particella nel campo visivo.
- Dalla velocità media del moto browniano (D , coefficiente di diffusione), ricavata tramite analisi di tracciamento, si calcola il diametro idrodinamico di ciascuna particella utilizzando l'equazione di Stokes–Einstein:

$$d_H = \frac{k_B T}{3\pi\eta D}$$

dove:

- d_H = diametro idrodinamico,
- k_B = costante di Boltzmann,
- T = temperatura assoluta (K),
- η = viscosità del mezzo,
- D = coefficiente di diffusione.

Il risultato finale è una distribuzione dimensionale basata sul numero di particelle.

Con NanoSight si ottengono informazioni quantitative su:

- Diametro idrodinamico medio (in nanometri);
- Distribuzione dimensionale (numero e deviazione standard);
- Concentrazione di particelle (numero di particelle per mL);
- Eventuale fluorescenza.

Il NanoSight è ampiamente utilizzato in diversi ambiti scientifici e industriali:

a) Ricerca biologica e biomedica

- Caratterizzazione di vescicole extracellulari, esosomi e microvescicole;
- Analisi di virus e vettori virali (AAV, adenovirus, lentivirus);
- Studio di liposomi, nanoparticelle lipidiche (LNP) e nanocarrier per il drug delivery;
- Controllo della purezza e della dimensione di nanoparticelle proteiche o polimeriche.

b) Nanotecnologie e materiali

- Analisi di nanoparticelle metalliche (Au, Ag, Fe₃O₄, TiO₂, ecc.);
- Caratterizzazione di colloidali e sospensioni industriali;
- Valutazione della stabilità colloidale nel tempo o sotto stress termico/pH.

c) Farmaceutica e diagnostica

- Controllo di qualità in formulazioni contenenti nanoparticelle;
- Studio della distribuzione dimensionale dei vettori nanometrici in soluzioni biologiche;
- Supporto a processi di purificazione e filtrazione.

Vantaggio	Descrizione
Analisi individuale	Ogni particella viene seguita singolarmente, fornendo distribuzioni realistiche e non pesate per intensità.
Quantificazione diretta	Permette di ottenere la concentrazione assoluta di particelle per unità di volume.
Visualizzazione ottica	Le particelle sono visibili in tempo reale, utile per verificare aggregazione o contaminazioni.
Ampio range dimensionale	Da circa 10 nm a 1000 nm, in funzione del materiale e della potenza del laser.
Opzione fluorescenza (NTA-F)	Permette l'identificazione selettiva di sottopopolazioni fluorescenti (es. particelle etichettate).

Tabella 2 = Vantaggi della tecnologia NTA

Nonostante la sua efficacia, il NanoSight presenta alcuni limiti metodologici:

- Accuratezza ridotta per particelle < 30 nm, a causa del basso segnale di scattering;
- difficoltà con sospensioni molto concentrate, dove il tracking individuale è ostacolato;
- sensibilità alla temperatura e viscosità del campione, che devono essere controllate con precisione;
- analisi qualitativa della forma limitata (si assume una sfericità ideale);
- non distingue tra particelle di diversa densità o composizione se hanno dimensioni simili.

Per ottenere risultati affidabili, sono fondamentali:

- una diluizione ottimale (10^7 – 10^9 particelle/mL);
- una calibrazione accurata;
- la verifica di ripetibilità e linearità con standard di riferimento certificati (es. NIST).

Un sistema NanoSight include:

- Laser a diodo (405, 488, 532 o 642 nm);
- Camera ottica ad alta sensibilità;
- Sistema di microfluidica con iniezione controllata del campione;
- Sensori di temperatura integrati;
- Software NTA per acquisizione e analisi automatizzata delle traiettorie.

Il software elabora i dati per fornire:

- Grafici di distribuzione dimensionale (numero, volume, intensità);
- Istogrammi cumulativi e curve di densità;
- Valori di media, mediana e moda;
- Concentrazione assoluta di particelle/mL.

Questi dati permettono di:

- Valutare la stabilità colloidale (es. presenza di aggregati);
- Confrontare lotti di produzione;
- Studiare l'effetto di trattamenti fisico-chimici (pH, temperatura, salinità, ecc.).

Il NanoSight rappresenta oggi uno strumento di riferimento nella nanocaratterizzazione. Grazie alla sua capacità di analizzare in tempo reale singole nanoparticelle, fornisce informazioni quantitative e affidabili su distribuzione dimensionale e concentrazione, con un approccio visivo e intuitivo. La combinazione di tracciamento ottico, analisi statistica e sensibilità fluorescente lo rende uno strumento estremamente versatile, utilizzato in ricerca accademica, industria farmaceutica, biotecnologie e nanotecnologie avanzate [24-25-26-27-28].

1.12 Cryo-EM (Cryogenic Electron Microscopy)

La cryo-EM (Cryogenic Electron Microscopy) è una tecnica di microscopia elettronica a trasmissione (TEM) che consente di osservare campioni biologici o nanostrutturati a temperature criogeniche ($-180\text{ }^{\circ}\text{C}$ o inferiori) mantenendoli nel loro stato idratato e nativo, senza la necessità di fissazione chimica o colorazione.

È oggi una metodologia chiave per determinare strutture tridimensionali ad alta risoluzione di: proteine, complessi macromolecolari, ribosomi, virus, vescicole extracellulari, nanoparticelle lipidiche, liposomi e nanocarrier farmaceutici.

Grazie ai progressi in rivelatori diretti di elettroni, algoritmi di ricostruzione 3D e software di elaborazione, la cryo-EM ha raggiunto una risoluzione sub-nanometrica, tanto da essere considerata una “rivoluzione della biologia strutturale” (premio Nobel per la Chimica 2017 a Dubochet, Frank e Henderson).

La cryo-EM si basa sul principio di immobilizzare istantaneamente il campione biologico in uno stato vetrificato (non cristallino) mediante congelamento ultraveloce in azoto liquido o etano liquido. In questo modo l'acqua non forma cristalli di ghiaccio, ma una matrice amorfa trasparente agli elettroni.

Le particelle rimangono così nella loro configurazione naturale, sospese in un sottile strato di ghiaccio amorfo ($\sim 100\text{ nm}$).

L'osservazione avviene a basse temperature ($-180\text{ }^{\circ}\text{C}$) per minimizzare i danni da radiazione elettronica.

Procedura sperimentale tipica

a) Preparazione del campione

1. Una piccola quantità ($3\text{--}5\text{ }\mu\text{L}$) di sospensione di particelle o macromolecole viene depositata su una griglia metallica (Cu o Au) rivestita con film di carbonio o grafene.
2. L'eccesso di liquido viene rimosso tramite “blotting” controllato.
3. La griglia viene immediatamente immersa in etano liquido ($\approx -180\text{ }^{\circ}\text{C}$) per ottenere la vetrificazione istantanea.

b) Acquisizione delle immagini

- Il campione congelato viene trasferito nel microscopio elettronico criogenico (solitamente da $200\text{--}300\text{ kV}$).
- L'immagine viene registrata con rivelatori diretti di elettroni (DED) che catturano filmati (movie frames) di alta qualità.
- Ogni fotogramma rappresenta una proiezione bidimensionale di particelle orientate casualmente nel ghiaccio.

c) Elaborazione e ricostruzione

- Le immagini vengono allineate, filtrate e mediate per ridurre il rumore.
- Tramite software specializzati (RELION, cryoSPARC, cisTEM, EMAN2) si selezionano migliaia di singole particelle.
- L'orientamento 3D di ciascuna particella è stimato per ricostruire un modello tridimensionale ad alta risoluzione (fino a 1.5 nm per proteine rigide).

Modalità	Descrizione e uso principale
Single-Particle Analysis (SPA)	Ricostruzione 3D di singole macromolecole o complessi biologici da migliaia di immagini 2D.
Cryo-Electron Tomography (cryo-ET)	Acquisizione di serie angolate (-60° a $+60^\circ$) per ricostruire il volume 3D di cellule o organelli intatti.
Cryo-Electron Diffraction (MicroED)	Studio di cristalli nanometrici (es. peptidi, piccole molecole) tramite diffrazione elettronica.
Cryo-Focused Ion Beam (cryo-FIB)	Preparazione di sezioni sottili (lamelle) di cellule per osservazioni in cryo-ET.

Tabella 3 = Modalità principali della Cryo-EM

Applicazioni scientifiche

a) Biologia strutturale

- Determinazione della struttura 3D di proteine di membrana, complessi ribosomiali, recettori, virus, canali ionici.
- Analisi conformazionale di complessi dinamici (es. ribosomi in diverse fasi di traduzione).

b) Nanomedicina e biotecnologie

- Studio della morfologia di liposomi, nanoparticelle lipidiche (LNP) e nanocarrier per il drug delivery.
- Caratterizzazione di virus ricombinanti e vettori AAV per terapia genica.
- Osservazione diretta di vescicole extracellulari, esosomi e microvescicole nel loro stato nativo.

c) Scienza dei materiali

- Analisi di nanoparticelle metalliche, semiconduttori o catalizzatori con risoluzione atomica.
- Studio della cristallinità e difettologia in nanostrutture.

Vantaggi	Descrizione
Osservazione di campioni nativi	Nessuna colorazione o fissazione: preserva lo stato idratato e biologico reale.
Alta risoluzione (fino a livello atomico)	Possibilità di ottenere mappe 3D a < 2 nm.
Versatilità	Applicabile a proteine, virus, liposomi, EV e materiali inorganici.
Compatibilità con software avanzati	Elaborazione automatica e ricostruzione 3D ad alta fedeltà.
Limiti	Descrizione
Costo elevato e complessità operativa	Richiede microscopia criogenica dedicata e operatori esperti.
Sensibilità alla radiazione elettronica	Necessario equilibrio tra dose e qualità dell'immagine.
Preparazione delicata	La vetrificazione deve essere ottimale per evitare artefatti da ghiaccio.

Tabella 4 = Vantaggi e limiti

La cryo-EM ha trasformato la microscopia elettronica da strumento descrittivo a metodo di determinazione strutturale ad alta risoluzione. Con la capacità di osservare campioni biologici nello stato nativo, rappresenta oggi una tecnica fondamentale per biologia, medicina, chimica dei materiali e nanotecnologia.

L'analisi cryo-EM, integrata con tecniche complementari (come NTA, DLS, cryo-ET, X-ray crystallography o NMR), consente una comprensione tridimensionale e funzionale delle strutture biologiche e dei nanomateriali con un dettaglio senza precedenti [29-30-31].

1.13 Grimm 1371 Mini-WRAS

Il Grimm 1371 Mini-WRAS (Wide Range Aerosol Spectrometer) è uno strumento portatile per il monitoraggio in tempo reale dell'aerosol, che copre un ampio spettro dimensionale delle particelle, dalle nanoparticelle fino a particelle micrometriche. È utile per misure sia ambientali che per la qualità dell'aria indoor, per la verifica di esposizioni professionali, e per applicazioni industriali.

Il Mini-WRAS combina due tecnologie principali per misurare particelle aerodisperse su un ampio intervallo dimensionale:

1. Contatore ottico di particelle (OPC, Optical Particle Counter / diffrazione laser): questa parte misura particelle più grandi (micrometriche) usando la diffrazione o la dispersione della luce da parte delle particelle quando attraversano un fascio laser, il segnale ottico è proporzionale alla grandezza e/o al numero di particelle che attraversano il fascio.
2. Elettrometro / separazione per mobilità elettrica: per le dimensioni più piccole (nanoparticelle) il Mini-WRAS utilizza la carica elettrica delle particelle e la loro mobilità elettrica, questo permette di discriminare nanoparticelle sulla base della loro mobilità, che dipende dalla dimensione, carica e condizioni del mezzo.

Combinando queste due tecnologie, lo strumento è in grado di coprire un intervallo dimensionale che va da circa 10 nm fino a 35 μm .

Per operare correttamente lo strumento, è necessario tener conto di alcune condizioni e procedure:

- Campionamento dell'aria: l'aria viene aspirata nello strumento; per le nanoparticelle, la parte elettrometrica richiede che le particelle siano caricate elettricamente e che il flusso d'aria sia controllato per evitare perdite per diffusione o deposizione.
- Separazione dimensionale: l'OPC discrimina per dimensione basandosi sulla diffrazione/diffusione luminosa; l'elettrometro utilizza la mobilità elettrica, che dipende dalla carica e dimensione della particella.
- Distribuzione dimensionale: lo strumento suddivide l'intervallo 10 nm – 35 μm in classi, permettendo di ottenere istogrammi di dimensione e conteggio per ogni classe.
- Determinazione della massa del particolato: oltre al conteggio, lo strumento calcola in tempo reale la massa per le frazioni più rilevanti (PM₁, PM_{2.5}, PM₁₀) secondo standard normativi.
- Calibrazione: è necessaria una taratura delle classi di dimensione, della sensibilità ottica, dell'efficienza del caricamento elettrico (nell'elettrometro), per garantire che la risposta dello strumento sia precisa.

- Interfacce e acquisizione dati: tramite USB/Bluetooth/RS-232 lo strumento comunica con un computer o dispositivi di raccolta dati, per logging, visualizzazione in tempo reale, analisi successiva.

Vantaggi principali:

- Copertura molto ampia dell'intervallo dimensionale delle particelle, inclusa la gamma delle nanoparticelle.
- Misura in tempo reale, utile per monitoraggi di continuo o dinamici.
- Portabilità: lo strumento è progettato per essere relativamente leggero e usabile in vari ambienti (interni, esterni, veicoli, habitat di lavoro).
- Capacità di fornire indicazioni sia sul numero di particelle che sulla massa del particolato, incluse le frazioni normative (PM1, PM2.5, PM10).

Limiti:

- Sensibilità dei segnali per le nanoparticelle: dimensioni molto piccole implicano segnali deboli, possibili errori dovuti a rumore di fondo, perdita per diffusione o deposizione lungo il sistema di campionamento.
- Influenza della carica elettrica: la misura basata su mobilità elettrica dipende da come le particelle sono caricate, dal tipo di carica (statica, etc.), e questo può introdurre incertezze.
- Dipendenza dalla calibrazione: la corretta assegnazione delle classi dimensionali e delle risposte ottiche o elettriche richiede standard di riferimento affidabili.
- Ambiente operativo: umidità, temperatura, condizioni del flusso d'aria possono influenzare le misure specialmente per particelle piccole o leggermente caricate.
- Complessità nello strumento combinato: unendo due tecnologie (OPC + mobilità elettrica) si aumenta anche la complessità di gestione, manutenzione, calibrazione, e interpretazione dei dati.

Il Grimm 1371 Mini-WRAS rappresenta uno strumento potente e versatile per il monitoraggio aerodisperso che abbraccia un esteso range dimensionale, offrendo misure in tempo reale di conteggio, dimensione e massa del particolato. Sebbene non sostituisca le tecniche chimiche o microscopiche per componenti specifiche, è particolarmente utile nelle fasi esplorative, nelle campagne di monitoraggio continuo o nelle applicazioni ambientali / occupazionali dove la rapidità e la dimensione delle particelle sono parametri chiave [32].

1.14 Percezione Pubblica delle Nanotecnologie: Stato dell'Arte e Fattori Psicologici, Sociali e Comunicativi

Le nanotecnologie rappresentano oggi una delle frontiere più dinamiche dell'innovazione, con applicazioni crescenti nei settori industriale, medico, ambientale, energetico e dei beni di consumo. Accanto a tali opportunità emergono tuttavia interrogativi riguardo ai rischi per la salute umana, la sicurezza e gli ecosistemi. L'evoluzione rapida di queste tecnologie ha reso evidente la necessità di comprendere non solo la loro tossicità, ma anche come il pubblico percepisce tali rischi e quali fattori influenzano l'accettazione sociale, la fiducia nelle istituzioni e il processo decisionale collettivo.

La letteratura analizzata evidenzia che la percezione pubblica delle nanotecnologie è un fenomeno complesso e multidimensionale, modulato da variabili cognitive, valoriali, culturali e comunicative. Una delle evidenze più consolidate riguarda il basso livello di conoscenza sulle nanotecnologie da parte dei cittadini. Numerosi studi mostrano che il pubblico possiede informazioni superficiali, frammentarie o confuse riguardo a:

- natura e funzionamento dei nanomateriali,
- applicazioni reali,
- potenziali rischi,
- implicazioni etiche e regolatorie.

Questa condizione di *bassa literacy tecnologica* porta spesso a giudizi basati non su evidenze scientifiche, ma su:

- valori personali,
- percezioni intuitive,
- immagini sociali della tecnologia,
- fiducia o sfiducia verso le istituzioni.

Senza un'adeguata base informativa, gli individui tendono a delegare la valutazione del rischio a scienziati, autorità sanitarie o media, risultando più vulnerabili sia a paure ingiustificate sia, al contrario, a un ottimismo non critico.

Un risultato ricorrente nella letteratura riguarda il ruolo del bilanciamento rischi–benefici, che orienta fortemente l'atteggiamento del pubblico verso le nanotecnologie.

I benefici sono giudicati particolarmente elevati nelle applicazioni:

- mediche (drug delivery, imaging, terapie mirate),
- farmaceutiche,
- ambientali (depurazione, monitoraggio).

I rischi vengono percepiti maggiori quando le nanotecnologie riguardano:

- alimenti e packaging alimentare,
- cosmetici e prodotti per la cura del corpo,
- beni di uso quotidiano in contatto diretto con il corpo.

La percezione del rischio non coincide quasi mai con la valutazione del rischio, ma dipende da:

- familiarità con l'applicazione,
- volontarietà dell'esposizione,
- trasparenza delle informazioni disponibili,
- fiducia negli attori coinvolti (ricercatori, imprese, istituzioni),
- caratteristiche simboliche della tecnologia (novità, invisibilità, artificialità).

Nanomateriali percepiti come “*nuovi*”, “*invisibili*” o “*non naturali*” tendono a generare maggiore allarme, anche in assenza di dati tossicologici definitivi.

La fiducia è uno dei fattori più determinanti nella percezione delle nanotecnologie.

Una maggiore fiducia verso: università e centri di ricerca, enti regolatori, autorità sanitarie comunicazione scientifica professionale; è associata a: più alta accettazione delle nanotecnologie, minore percezione del rischio, maggiore apertura verso l'innovazione.

Al contrario, sfiducia verso: industrie tecnologiche, multinazionali, governi o organi regolatori; tende a: aumentare l'allarme, amplificare i rischi percepiti, generare resistenze sociali.

La governance del rischio deve pertanto includere strategie di trasparenza, responsabilità e partecipazione, fondamentali per rafforzare la credibilità delle istituzioni.

I media influenzano profondamente la rappresentazione pubblica delle nanotecnologie.

L'informazione tende spesso a enfatizzare: benefici straordinari (tecno-entusiasmo), rischi estremi (tecno-catastrofismo).

Queste cornici narrative polarizzate ostacolano una comprensione equilibrata da parte del pubblico.

La comunicazione del rischio è complicata da:

- semplificazioni eccessive,
- scarsa capacità dei media di spiegare fenomeni fisico-chimici complessi,
- ridotta disponibilità di dati tossicologici chiari,
- forte incertezza scientifica.

Questi elementi contribuiscono a: incomprensioni, confusione, atteggiamenti ambivalenti o contraddittori, potenziali conflitti tra cittadini, istituzioni e comunità scientifica.

Una comunicazione efficace dovrebbe essere multilivello, interattiva, partecipativa e orientata alla costruzione di fiducia reciproca.

La percezione pubblica non dipende solo dalle informazioni disponibili, ma da un insieme articolato di fattori soggettivi e contestuali.

Un'efficace governance delle nanotecnologie deve integrare:

- valutazione scientifica del rischio,
- trasparenza delle procedure e dei dati,
- chiarezza e accessibilità dell'informazione,
- coinvolgimento degli stakeholder,
- partecipazione attiva del pubblico.

La gestione del rischio non può limitarsi al controllo dei possibili danni, ma deve includere la costruzione di fiducia, la riduzione delle asimmetrie informative e il rafforzamento dei canali di dialogo tra esperti e cittadini.

La percezione pubblica delle nanotecnologie è il risultato di una complessa interazione tra conoscenze scientifiche, valori personali, fiducia istituzionale, narrazioni mediatiche e fattori psicologici e culturali. La limitata alfabetizzazione tecnologica del pubblico, combinata con un elevato livello di incertezza scientifica, rende indispensabile sviluppare strategie di comunicazione del rischio più efficaci, partecipative e trasparenti.

L'accettazione sociale delle nanotecnologie non dipende esclusivamente dalle loro proprietà intrinseche o dai rischi misurabili, ma dalla capacità delle istituzioni e dei comunicatori di costruire un rapporto di fiducia e di offrire informazioni chiare, bilanciate e comprensibili [19].

2. OBIETTIVI E DISEGNO DELLO STUDIO

La tossicologia delle nanoparticelle è un campo in rapida evoluzione, nel quale emerge con forza la necessità di armonizzare i metodi di studio e le strategie regolatorie, al fine di valutare in modo adeguato i rischi associati alla loro crescente esposizione. L'obiettivo generale della ricerca internazionale è quello di conciliare l'innovazione tecnologica con la tutela della salute umana e dell'ambiente. È ormai evidente come servano linee guida condivise e metodi analitici standardizzati per la valutazione dei rischi dei nanomateriali, considerando che tale valutazione deve avvenire caso per caso: ogni nanomateriale, infatti, presenta proprietà chimico-fisiche specifiche che determinano comportamenti biologici e tossicologici differenti. Le metodologie tradizionali di valutazione della tossicità non risultano quindi pienamente applicabili ai nanomateriali, rendendo necessaria l'adozione di approcci armonizzati e innovativi. Nonostante le conoscenze attuali non consentano ancora una valutazione del tutto affidabile del rischio, la ricerca si sta orientando verso modelli di tossicologia predittiva e integrata, capaci di tenere conto della complessità delle interazioni tra nanoparticelle e organismo.

L'obiettivo generale di questa tesi è approfondire in maniera sistematica la caratterizzazione delle nanoparticelle metalliche nei fluidi biologici, con particolare attenzione al comparto urinario, al fine di comprendere meglio la loro presenza in differenti scenari di esposizione, il loro comportamento biologico e il loro potenziale impatto sulla salute umana. Tale obiettivo nasce dalla limitata disponibilità di studi presenti in letteratura e dalla crescente diffusione delle NP nella vita quotidiana e negli ambienti di lavoro, in un contesto caratterizzato da regolamentazioni ancora insufficienti.

In quest'ottica è stata condotta la determinazione dei metalli nei salivatori, distinguendo le diverse forme in cui gli elementi metallici possono essere presenti nel campione biologico. I metalli possono infatti trovarsi come elementi liberi, in forma ionica o come ossidi, oppure sotto forma di nanoparticelle. Un'ulteriore categoria riguarda i metalli contenuti nelle vescicole extracellulari, all'interno delle quali possono comparire sia in forma libera sia come nanoparticelle, e potenzialmente essere trasportati verso differenti distretti biologici dell'organismo. Per ciascuna di queste componenti è stata effettuata una valutazione quali-quantitativa, includendo l'analisi di dimensioni, numero, forma, caratteristiche biofisiche, mediante diverse tecniche analitiche quali sp-ICP-MS, NTA e CRYO-EM. L'integrazione dei dati ottenuti permette di avanzare verso l'identificazione di nuovi biomarcatori di esposizione-effetto, con possibili ricadute nel biomonitoraggio dei lavoratori esposti, ma anche delle popolazioni non professionalmente esposte.

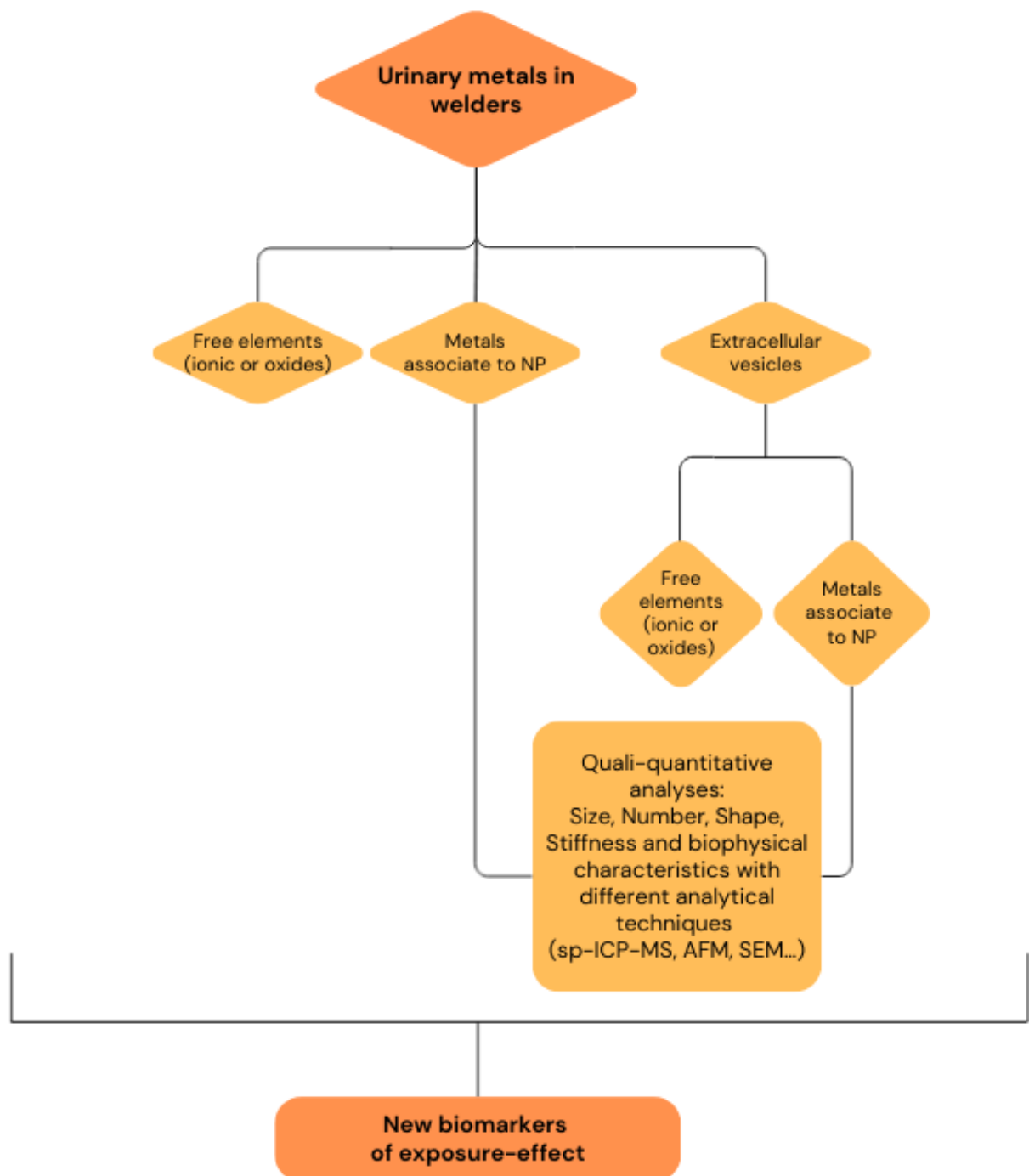


Figura 6 = schema progettuale

3. MATERIALI E METODI

3.1 Monitoraggio ambientale

Il monitoraggio ambientale è stato condotto mediante l'impiego di uno spettrometro portatile per aerosol ad ampio raggio, miniWRAS modello 1371. Sono state monitorate complessivamente 19 stazioni di saldatura appartenenti a due diverse aziende metallurgiche. Le misurazioni sono state effettuate posizionando la strumentazione a circa 3 metri di distanza dalle postazioni di lavoro; l'elenco delle stazioni monitorate è riportato nella tabella sottostante.

La durata dei campionamenti è variata tra 20 e 40 minuti.

Il dispositivo miniWRAS consente la classificazione delle particelle aerodisperse presenti nell'ambiente in quattro frazioni dimensionali: ultrafini, respirabili, toraciche e inalabili.

I parametri rilevati includono: numero totale di particelle (conteggi totali [1/cc]), diametro medio geometrico [nm], diametro medio geometrico di massa [nm] e diametro medio geometrico superficiale [nm].

ID
TIG on Stainless Steel
TIG on Stainless Steel
TIG on Stainless Steel
TIG on Stainless Steel
TIG on Stainless Steel
TIG on Iron
TIG on Al-Si
MIG on Stainless Steel
OK 48.50 on Iron
OK 48.50 on iron
OK 48.50 on iron
OK 43.39 on Stainless Steel
OK 43.39 on Stainless Steel
OK 61.30 on Stainless Steel
OK 61.30 on Stainless Steel
OK 61.30 on Stainless Steel
INEFIL on Iron
Bohler on Stainless Steel
128 ca2 on iron

Tabella 5 = Elenco delle 19 postazioni di saldatura

3.2 Monitoraggio biologico

Il monitoraggio biologico è stato condotto seguendo diversi approcci sperimentali. Sono stati analizzati campioni di urina, plasma e condensato dell'aria espirata.

In tali matrici sono stati valutati i metalli cromo e nichel sia nella loro forma ionica sia in forma di nanoparticelle.

Per alcuni campioni di urina è stata inoltre effettuata l'estrazione di vescicole extracellulari, seguita dalla successiva analisi dei campioni ottenuti tramite sp-ICP-MS. Alcuni campioni di EV estratte sono stati osservati al microscopio NanoSight per la loro caratterizzazione mentre altri di questi sono stati ulteriormente analizzati mediante Cryo-EM, al fine di approfondire la caratterizzazione morfologica delle vescicole e la possibile interazione con le nanoparticelle metalliche.

Le principali strumentazioni utilizzate sono state:

- sp-ICP-MS
- NanoSight
- Cryo-EM

Campioni e popolazione in studio

Sono stati arruolati saldatori di acciaio inossidabile e di acciaio dolce, di sesso maschile e di età compresa tra 30 e 40 anni, appartenenti a due differenti aziende metallurgiche.

Le postazioni di lavoro erano dotate di sistemi di ventilazione generale e di aspirazione localizzata (Local Exhaust Ventilation, LEV). Tutti i saldatori utilizzavano dispositivi di protezione individuale (DPI), comprendenti maschera respiratoria, guanti da saldatura e indumenti ignifughi.

I campioni biologici sono stati raccolti all'inizio turno (IT) e al termine del turno lavorativo (FT) nella medesima giornata. A fini di confronto, sono stati inoltre raccolti campioni da soggetti non esposti, impiegati in mansioni differenti dalla saldatura (personale sanitario e amministrativo), di pari sesso ed età rispetto ai soggetti esposti.

Si precisa che i campioni relativi alle diverse matrici biologiche non sono stati sempre prelevati dagli stessi soggetti né all'interno delle medesime aziende. Pertanto, sia per l'assenza di corrispondenza tra i campioni sia per il numero limitato di dati disponibili, non è stato possibile stabilire una correlazione delle nanoparticelle nei diversi comparti biologici in relazione al medesimo saldatore.

In particolare, sono stati raccolti:

- Urina:
 - 45 campioni IT e 47 campioni FT analizzati per il Cr tramite sp-ICP-MS;
 - 32 campioni IT e 32 campioni FT analizzati per il Ni tramite sp-ICP-MS;
 - 13 campioni IT e 13 campioni FT sono stati selezionati per l'estrazione delle EV e successiva analisi tramite sp-ICP-MS.
 - 5 campioni IT e 5 campioni FT sono stati selezionati per l'estrazione delle EV, caratterizzazione tramite NanoSight e Cryo-EM e analisi tramite sp-ICP-MS.
 - inclusi 20 campioni di soggetti non esposti come gruppo di confronto analizzati per Cr e Ni tramite sp-ICP-MS.
- Condensato dell'aria espirata:
 - 26 campioni IT e 22 campioni FT analizzati per il Cr tramite sp-ICP-MS;
 - inclusi 6 campioni di soggetti non esposti come gruppo di confronto analizzati per il Cr tramite sp-ICP-MS.
- Plasma:
 - 6 campioni FT analizzati per il Cr tramite sp-ICP-MS;
 - inclusi 8 campioni di soggetti non esposti come gruppo di confronto analizzati per il Cr tramite sp-ICP-MS.

Analisi strumentale sp-ICP-MS

Poiché non esistono standard certificati per le nanoparticelle di Cr e Ni, è stato necessario impiegare come standard di riferimento:

- uno standard di oro (Au) per la frazione nanoparticellare;
- standard di Cr e Ni per la frazione metallica disciolta.

Gli standard di riferimento per le nanoparticelle di oro (50 nm Gold Nanosphere, PEG-COOH, 50 ppm) sono stati acquistati da *PerkinElmer Italia*. Lo standard Au NP (50 nm) è stato utilizzato per valutare l'efficienza di trasporto del sistema di introduzione del campione nell'ICP-MS.

Tutti i campioni e gli standard sono stati sottoposti a diluizione e sonicazione (*Sonic Dismembrator Ultrasonic Liquid Processor, Fisher Scientific*) prima dell'analisi in sp-ICP-MS, per evitare l'aggregazione delle NP e garantire la corretta determinazione del diametro.

Durante le prove preliminari è stato osservato che l'uso diretto della sonda del sonicatore nella soluzione causava contaminazione metallica del campione, in seguito al rilascio di metalli dalla sonda stessa. Per questo motivo, è stata adottata una procedura di sonicazione indiretta. Una provetta contenente gel ECG (8 mL) è stata posta tra la sonda e la provetta contenente il campione,

consentendo il trasferimento delle onde ultrasoniche senza contatto diretto e minimizzando il rischio di contaminazione.

Per ciascun punto della curva di calibrazione e per i campioni, sono state utilizzate provette separate; per evitare contaminazioni, è consigliato sostituire la provetta contenente gel ECG ogni quattro utilizzi circa.

Parametri di analisi

Per la quantificazione sono stati utilizzati gli isotopi ^{52}Cr e ^{62}Ni , con un tempo di permanenza (dwell time) di 50 μs , e tempi di acquisizione di 120 s per il Cr e 180 s per il Ni.

Le concentrazioni di nanoparticelle sono state determinate calcolando la massa basandosi sul peso molecolare e sulla densità del metallo, assumendo una morfologia sferica delle particelle.

I seguenti parametri sono stati ottenuti dal software *PerkinElmer sp-ICP-MS Nexion 2000*:

- dimensione media delle NP,
- dimensione più frequente,
- numero di picchi,
- concentrazione di particelle per millilitro (part/mL).

Instrument	PerkinElmer sp-ICP–MS Nexion 2000
Flow rate	Differenti per le sedute analitiche
Transport Efficiency (TE)	Differenti per le sedute analitiche
Dwell time	50 μs (per Cr e Ni)
Scan time	120 s per Cr e 180 s per Ni
Isotopes	^{52}Cr , ^{62}Ni .
Mode	DRC ammonia per Cr and Standard per Ni

Tabella 6 = Parametri di analisi

Validazione del metodo sp-ICP-MS

Il processo di validazione è stato eseguito in conformità alla norma ISO 9001:2015.

Lo strumento utilizzato è: PerkinElmer Sciex sp-ICP-MS Nexion 2000.

I parametri rilevati durante la convalida del metodo sono i seguenti:

Instrument	PerkinElmer sp-ICP-MS Nexion 2000
Dwell time	50 μ s (per Cr e Ni)
Scan time	120 s per Cr e 180 μ per Ni
Isotopes	^{52}Cr , ^{62}Ni .
Mode	DRC ammonia per Cr e Standard per Ni
CV	Da 10 a 15% per Diametro medio (nm) e Part. Conc (parts/ml)
LOQ	< 20 Picchi per scan time

Tabella 7 = Validazione del metodo

Analisi strumentale NanoSight

Sono stati selezionati 5 campioni di urina di IT e 5 di FT per l'estrazione delle EV, e successiva caratterizzazione tramite NanoSight.

Lo strumento utilizzato è il seguente: NanoSight NS300 system (Malvern, Panalytical LTD, Malvern, UK).

I preparati di EV sono stati risospesi in 100 μ l di acqua HPLC sterile (Milli-Q; Merck Millipore) per la caratterizzazione mediante Nanoparticles Tracking Analysis della concentrazione e della distribuzione dimensionale delle EV. Il sistema è dotato di un laser Blue488 e di una telecamera sCMOS. Prima dell'analisi del campione, il PBS filtrato (filtrato a 0,22 μ m) è stato analizzato per verificare la presenza di contaminazione da particelle. Per l'analisi, tutti i campioni sono stati diluiti in PBS filtrato (1:1000) fino a un volume finale di 1 ml per ottenere un numero ottimale di particelle per valore di frame (20-120 particelle/frame). I campioni di EV sono stati iniettati nella camera del campione attraverso una pompa a siringa Nanosight (Malvern, Panalytical LTD, Malvern, UK) che fornisce un flusso continuo (50 μ l/min) utilizzando una siringa da 1 ml a temperatura ambiente. Le registrazioni dei movimenti delle particelle sono state raccolte per 60 secondi, cinque volte per ciascun campione a un livello della telecamera di 12 utilizzando la soglia di rilevamento ottimale. La media, la moda e la mediana delle dimensioni delle EV di ciascun video sono state utilizzate per calcolare la concentrazione del campione, espressa in particelle per ml.

Analisi strumentale CRYO-EM

Sono stati selezionati 5 campioni di urina di IT e 5 di FT per l'estrazione delle EV, e successiva caratterizzazione tramite Cryo-Electron-Microscopy con strumento Talos Artica 200kv, Detector Falcon3 and Ceta16M.

Lo strumento in questione si trova presso il Dipartimento di Bioscienze, Università degli Studi Di Milano, UNITECH.

4. RISULTATI

4.1 Monitoraggio ambientale

Risultati ottenuti tramite la strumentazione miniWRAS modello 1371 delle 19 postazioni lavorative.

ID	TOT CONC [parts/m3]	Geometric Mean Diameter [nm]
TIG on Stainless Steel	4,79E+06	37
TIG on Stainless Steel	7,63E+05	37
TIG on Stainless Steel	1,70E+06	46
TIG on Stainless Steel	4,75E+06	31
TIG on Stainless Steel	2,00E+06	41
TIG on Iron	2,88E+06	51
TIG on Al-Si	9,58E+06	60
MIG on Stainless Steel	2,47E+07	58
OK 48.50 on Iron	4,34E+05	61
OK 48.50 on iron	1,37E+06	57
OK 48.50 on iron	4,38E+05	57
OK 43.39 on Stainless Steel	2,26E+06	61
OK 43.39 on Stainless Steel	3,89E+05	60
OK 61.30 on Stainless Steel	2,70E+06	55
OK 61.30 on Stainless Steel	4,87E+05	59
OK 61.30 on Stainless Steel	3,65E+05	62
INEFIL on Iron	6,69E+06	60
Bohler on Stainless Steel	4,93E+06	38
128 ca2 on iron	3,49E+06	36

Tabella 8 = Concentrazione e diametro geometrico medio delle particelle nelle
19 postazioni di saldatura

Di seguito i valori della tabella riportati sotto forma di grafico.

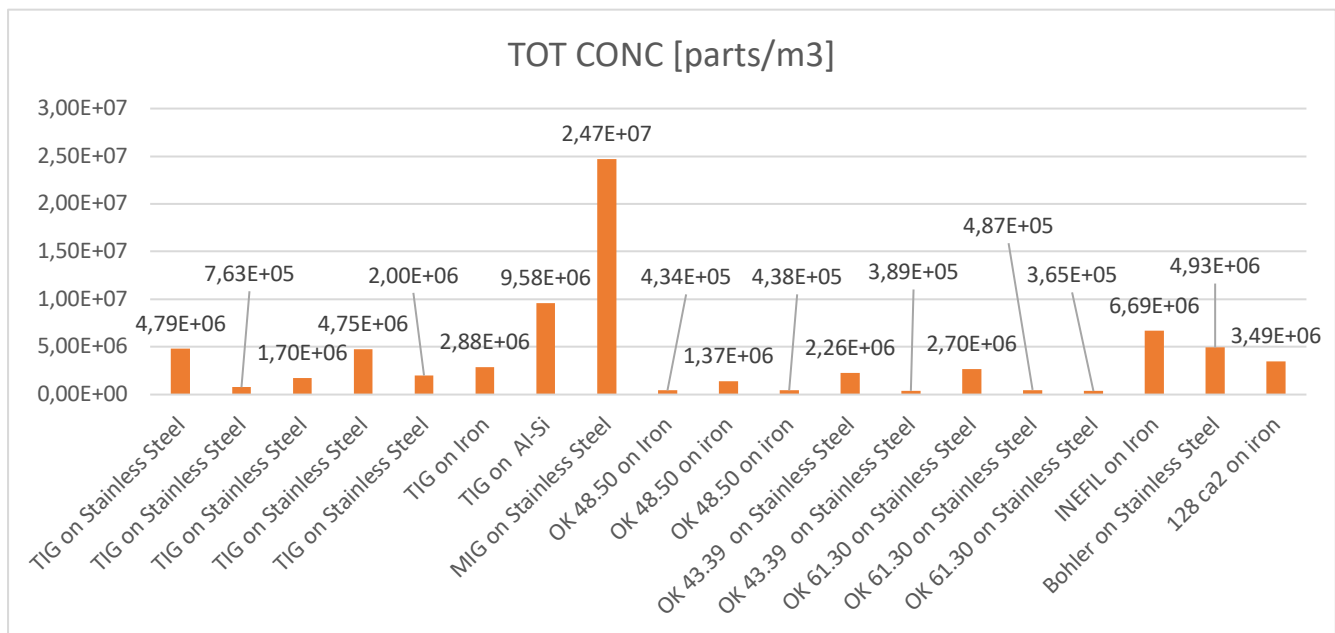


Grafico 1 = Concentrazione delle particelle disperse in aria ambiente

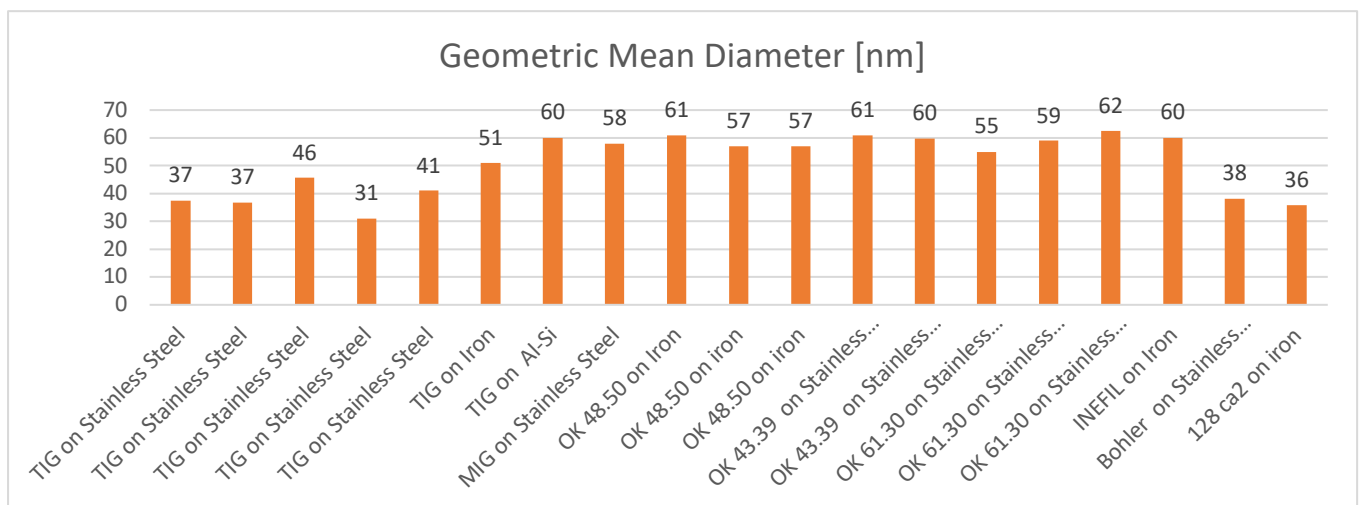


Grafico 2 = Diametro delle particelle disperse in aria ambiente

Esempio di grafici rappresentativi del monitoraggio dell'intero ciclo lavorativo: i picchi osservabili nel grafico 3 e nel grafico 4 corrispondono alla fase temporale in cui è stato svolto il processo di saldatura.

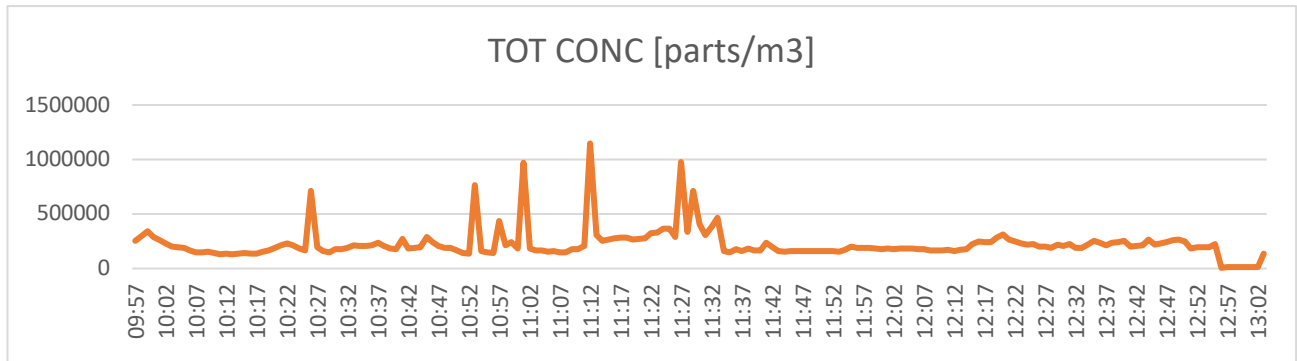


Grafico 3 = Concentrazione delle particelle disperse in aria ambiente

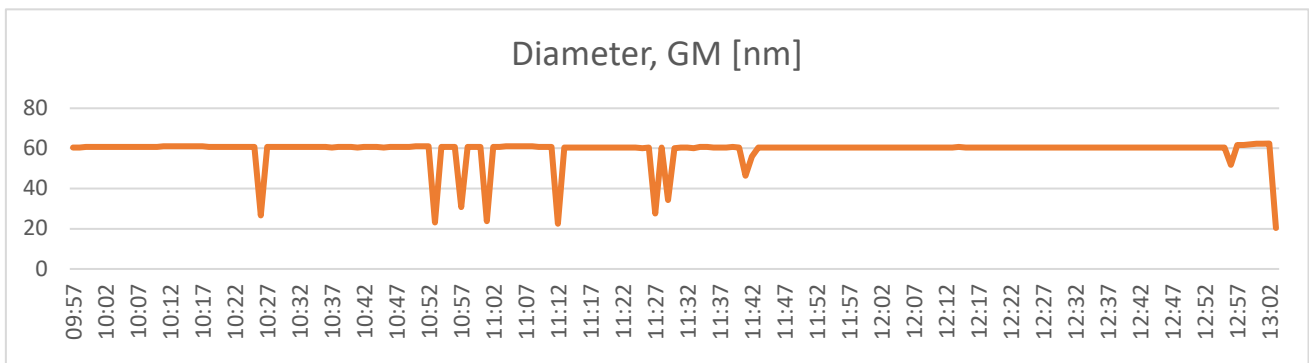


Grafico 4 = Diametro delle particelle disperse in aria ambiente

4.2 Monitoraggio biologico

Urina totale

I risultati ottenuti con ICP-MS ci hanno permesso di ottenere la concentrazione di metallo ionico totale (Cr e Ni).

I risultati ottenuti con sp-ICP-MS ci hanno permesso di ottenere le caratteristiche delle NP di Cr e Ni indicandone: la dimensione media, la dimensione più frequente, il numero di picchi e il numero di particelle per ml.

I campioni analizzati e riportati sono:

- 45 campioni IT e 47 FT analizzati per il Cr;
- 32 campioni IT e 32 FT analizzati per il Ni;
- 20 campioni di soggetti non esposti come gruppo di confronto analizzati per Cr e Ni.

Le tabelle seguenti riportano i risultati delle analisi.

Concentrazione Cr disciolto

Popolazione	Cr tot ug/L
Inizio-Turno	0,50
Fine-Turno	0,60
Non Esposti	0,14

Tabella 9 = Concentrazione Cr disciolto nelle urine (IT,FT,NE)

Concentrazione NP Cr

- 20 campioni di soggetti non esposti

Parametri	Media	Mediana
Diametro Medio (nm)	41	41
Diametro più frequente (nm)	60	59
Picchi, No	256	190
Part Conc parts/mL*	2863	2370

* Part Conc parts/mL: concentrazione di nanoparticelle per mL

Tabella 10 = Risultati Cr NP NE

- 45 campioni IT

Parametri	Media	Mediana
Diametro Medio (nm)	55	51
Diametro più frequente (nm)	35	33
Picchi, No	624	280
Part Conc parts/mL*	38090	9390

* Part Conc parts/mL: concentrazione di nanoparticelle per mL

Tabella 11 = Risultati Cr NP IT

- 47 campioni FT

Parametri	Media	Mediana
Diametro Medio (nm)	50	52
Diametro più frequente (nm)	33	33
Picchi, No	1502	390
Part Conc parts/mL*	62828	12740

* Part Conc parts/mL: concentrazione di nanoparticelle per mL

Tabella 12 = Risultati Cr NP FT

Parametri	IT	FT	NE
Diametro Medio (nm)	55	50	41
Diametro più frequente (nm)	35	33	60
Picchi, No	624	1502	256
Part Conc parts/mL*	38090	62828	2863

* Part Conc parts/mL: concentrazione di nanoparticelle per mL

Tabella 13 = Risultati Cr NP IT-FT-NE

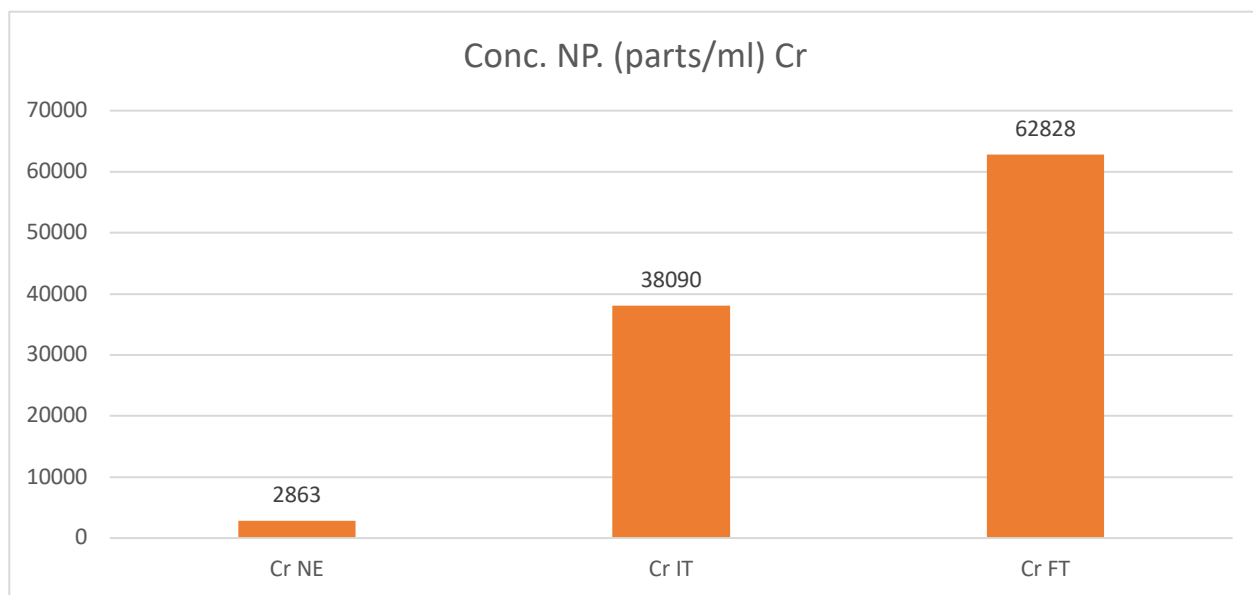


Grafico 5 = Concentrazione delle NP di Cr IT-FT-NE

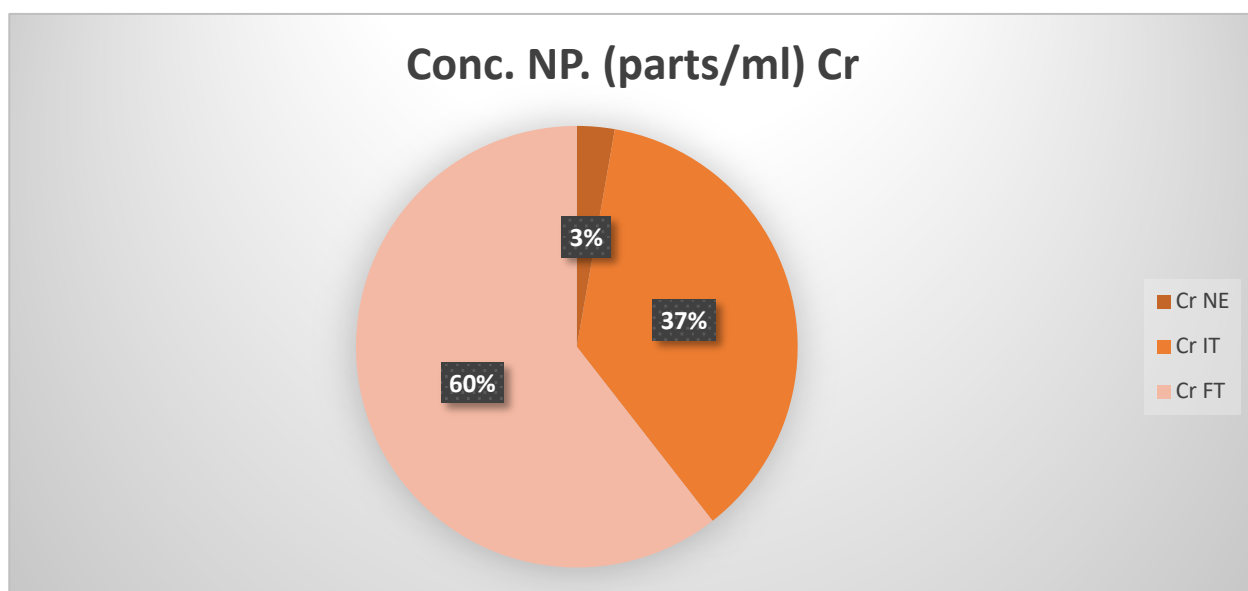


Grafico 6 = Concentrazione delle NP di Cr IT-FT-NE

Concentrazione Ni disciolto

Popolazione	Ni tot ug/L
Inizio-Turno	2,97
Fine-Turno	1,78
Non Esposti	0,97

Tabella 14 = Concentrazione Ni disciolto nelle urine (IT,FT,NE)

Concentrazione NP Ni

- 20 campioni di soggetti non esposti

Parametri	Media	Mediana
Diametro Medio (nm)	62	60
Diametro più frequente (nm)	56	54
Picchi, No	41170	30200
Part Conc parts/mL*	613540	450050

* Part Conc parts/mL: concentrazione di nanoparticelle per mL

Tabella 15 = Risultati Ni NP NE

- 32 campioni IT

Parametri	Media	Mediana
Diametro Medio (nm)	61	58
Diametro più frequente (nm)	56	56
Picchi, No	689981	33300
Part Conc parts/mL*	73912082	496250

* Part Conc parts/mL: concentrazione di nanoparticelle per mL

Tabella 16 = Risultati Ni NP IT

- 32 campioni FT

Parametri	Media	Mediana
Diametro Medio (nm)	56	57
Diametro più frequente (nm)	52	54
Picchi, No	942443	69800
Part Conc parts/mL*	102123543	1135550

* Part Conc parts/mL: concentrazione di nanoparticelle per mL

Tabella 17 = Risultati Ni NP FT

Parametri	IT	FT	NE
Diametro Medio (nm)	61	56	62
Diametro più frequente (nm)	56	52	56
Picchi, No	689981	942443	41170
Part Conc parts/mL*	73912082	102123543	613540

* Part Conc parts/mL: concentrazione di nanoparticelle per mL

Tabella 18 = Risultati Ni NP IT-FT-NE

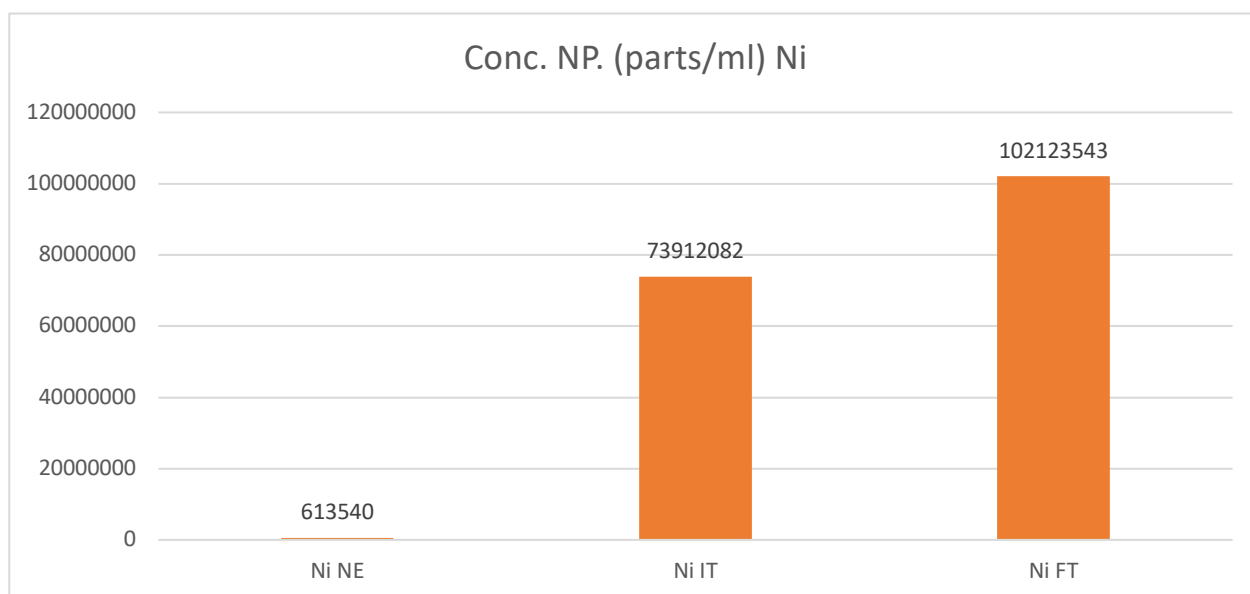


Grafico 7 = Concentrazione delle NP di Ni IT-FT-NE

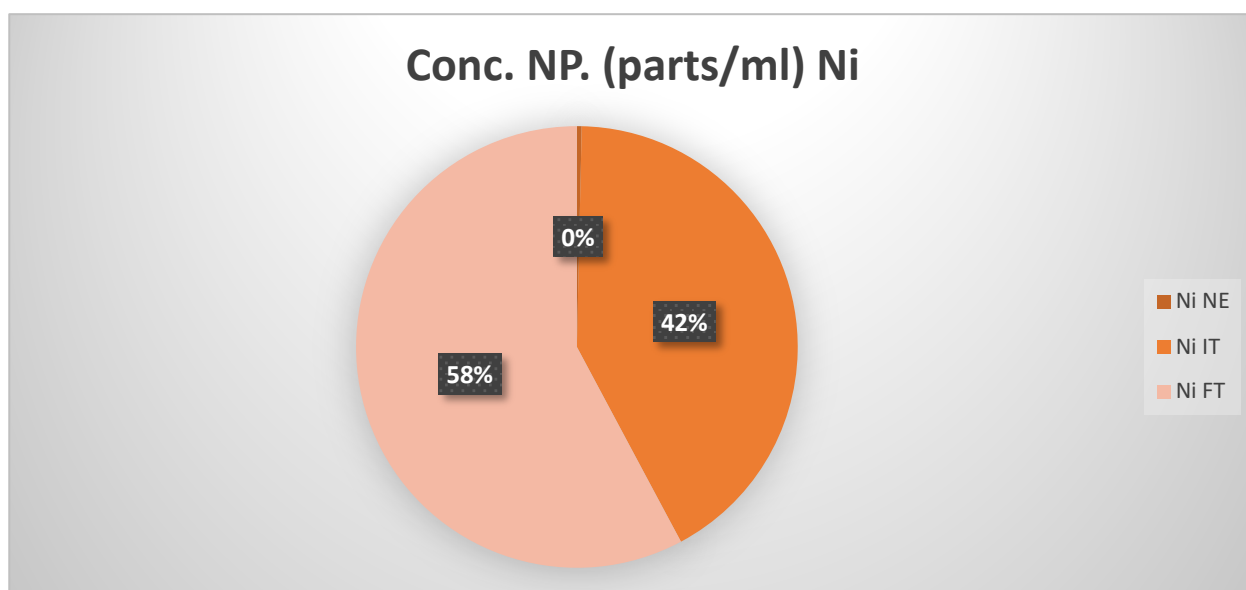


Grafico 8 = Concentrazione delle NP di Ni IT-FT-NE

Urine estrazione vescicole extracellulari

13 campioni IT e 13 campioni FT sono stati selezionati per l'estrazione delle EV e successiva analisi tramite sp-ICP-MS.

Protocollo di separazione

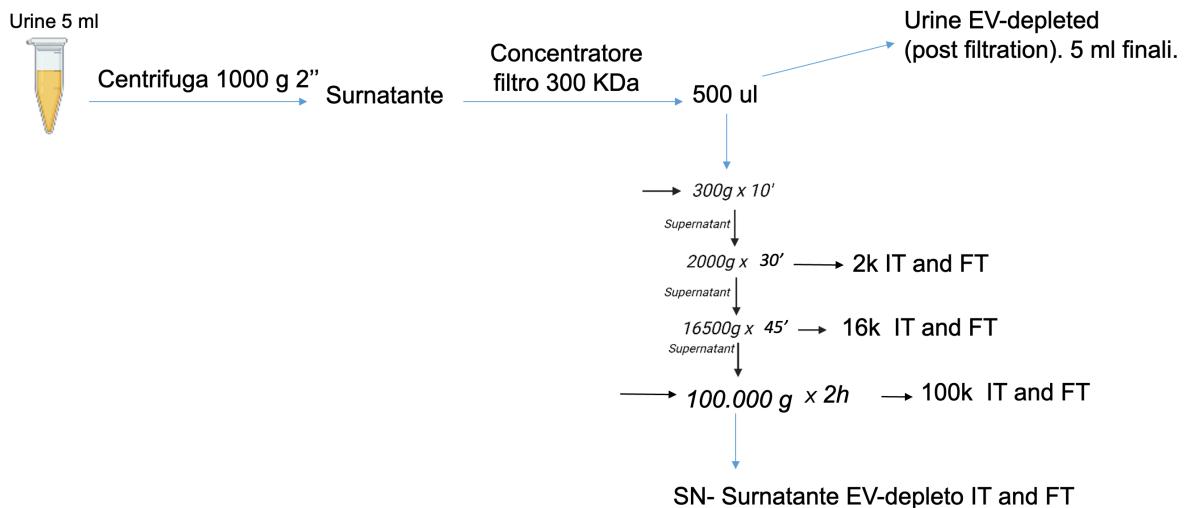


Figura 7 = Protocollo di separazione vescicole extracellulari

Per ciascun campione, mediante ultracentrifugazione sono state ottenute le seguenti frazioni: una post-filtrata, priva di EV e NP, e tre arricchite in EV di dimensioni progressivamente decrescenti (2, 16 e 100K), con il surnatante finale costantemente privo di NP e di EV.

Le tabelle seguenti mostrano i risultati dell'analisi delle NP di Cr nelle diverse frazioni (2, 16 e 100K).

- 13 campioni IT

Parametri	Frazioni dopo centrifugazione		
	2K	16K	100K
Diametro medio (nm)	36	38	25
Picchi, No	764	615	246

Tabella 19 = Risultati Cr NP IT

- 13 campioni FT

Parametri	Frazioni dopo centrifugazione		
	2K	16K	100K
Diametro medio (nm)	37	37	29
Picchi, No	868	946	1085

Tabella 20 = Risultati Cr NP FT

Picchi, No	Frazioni dopo centrifugazione		
	2k	16k	100k
IT	764	615	246
FT	868	946	1085

Tabella 21 = Numero picchi Cr NP IT-FT

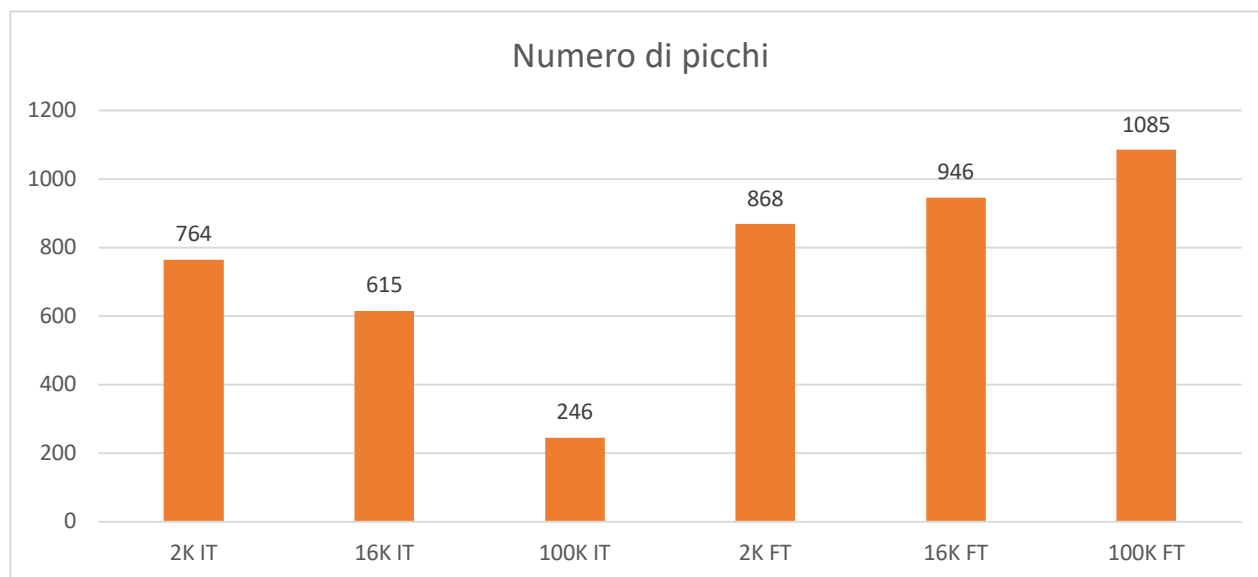


Grafico 9 = Numero picchi delle NP di Cr IT-FT

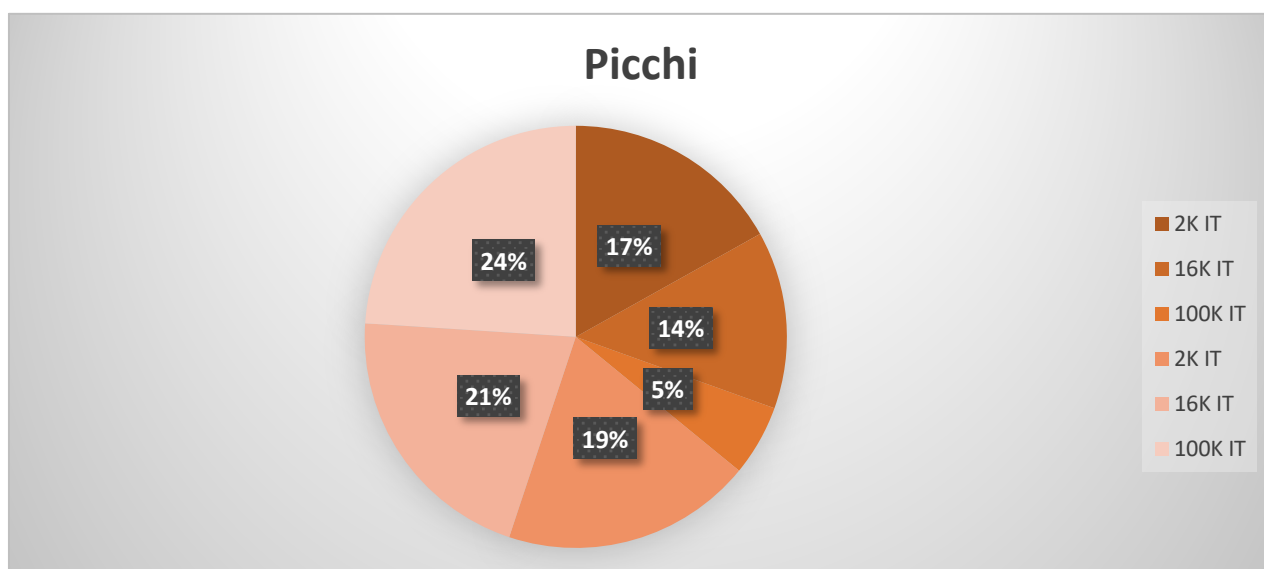


Grafico 10 = Numero picchi delle NP di Cr IT-FT

Diametro medio (nm)	Frazioni dopo centrifugazione		
	2k	16k	100k
IT	36	38	25
FT	37	37	29

Tabella 22 = Diametro Cr NP IT-FT

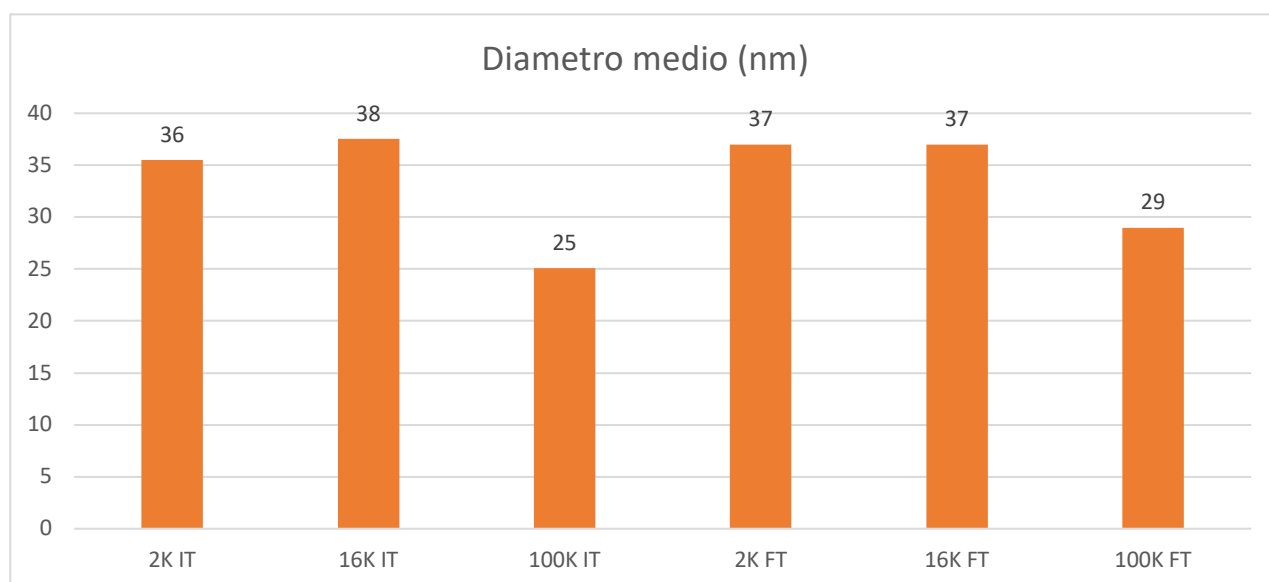


Grafico 11 = Diametro delle NP di Cr IT-FT

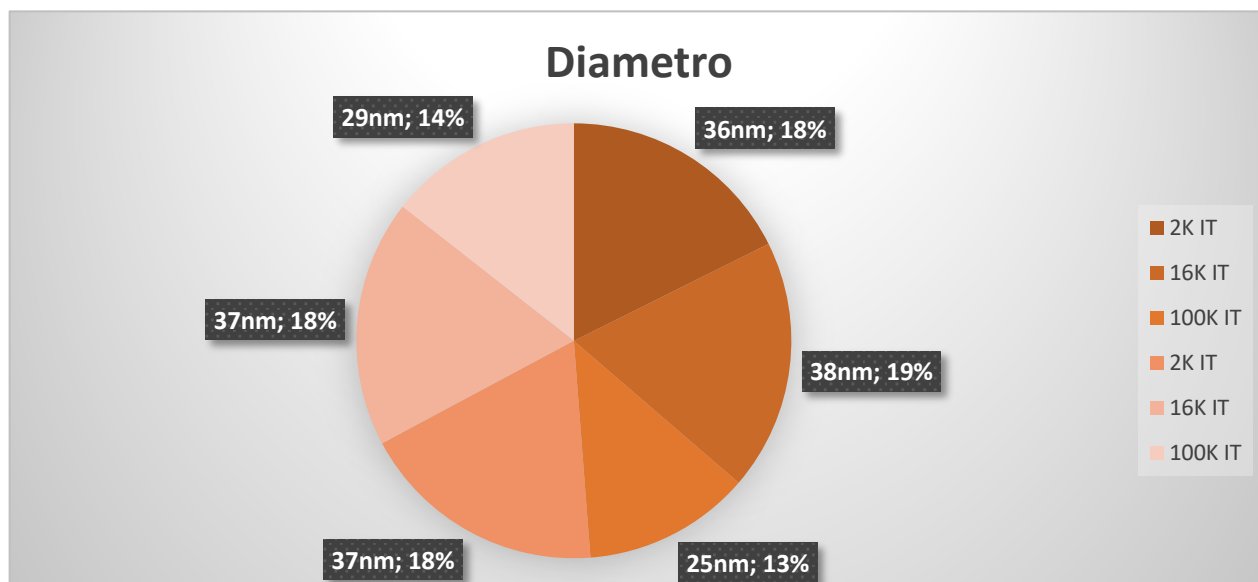


Grafico 12 = Diametro delle NP di Cr IT-FT

Analisi strumentale NanoSigh e CRYO-EM

Sono stati selezionati 5 campioni di urina di IT e 5 di FT per l'estrazione delle EV, caratterizzazione tramite NanoSight e Cryo-EM e analisi tramite sp-ICP-MS.

Di seguito i risultati ottenuti.

- 5 campioni urina IT NP Cr sp-ICP-MS

Parametri	Media	Mediana
Diametro Medio (nm)	39	35
Diametro più frequente (nm)	25	27
Picchi, No	183	200
Part Conc parts/mL*	11810	12880

* Part Conc parts/mL: concentrazione di nanoparticelle per mL

Tabella 23 = Risultati Cr NP IT

- 5 campioni urina FT NP Cr sp-ICP-MS

Parametri	Media	Mediana
Diametro Medio (nm)	29	29
Diametro più frequente (nm)	27	27
Picchi, No	145	145
Part Conc parts/mL*	9340	9340

* Part Conc parts/mL: concentrazione di nanoparticelle per mL

Tabella 24 = Risultati Cr NP FT

Parametri	IT	FT
Diametro Medio (nm)	39	29
Diametro più frequente (nm)	25	27
Picchi, No	183	145
Part Conc parts/mL*	11810	9340

* Part Conc parts/mL: concentrazione di nanoparticelle per mL

Tabella 25 = Risultati Cr NP IT-FT

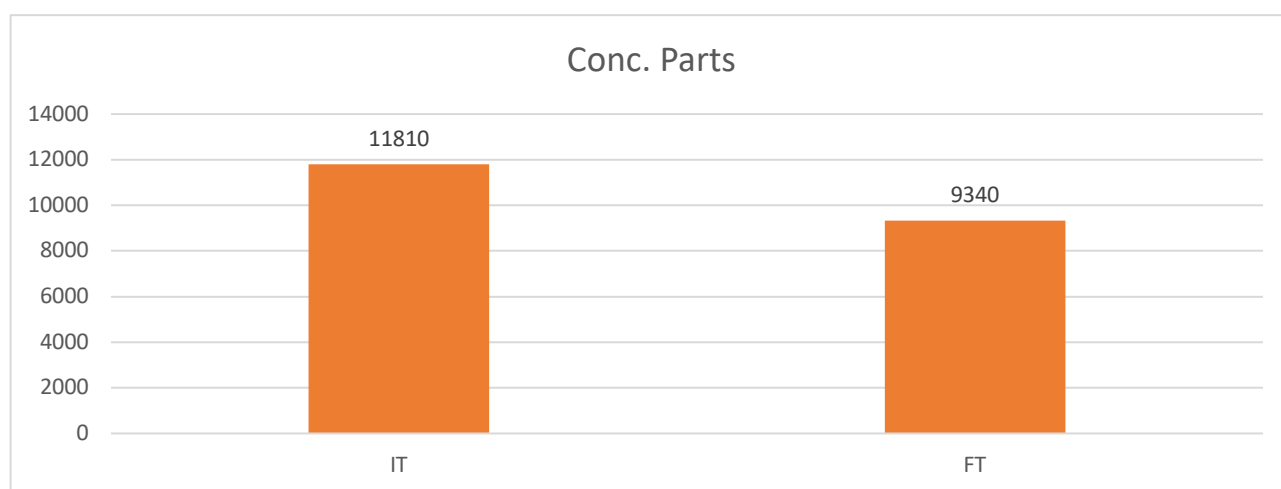


Grafico 13 = Concentrazione delle NP di Cr IT-FT

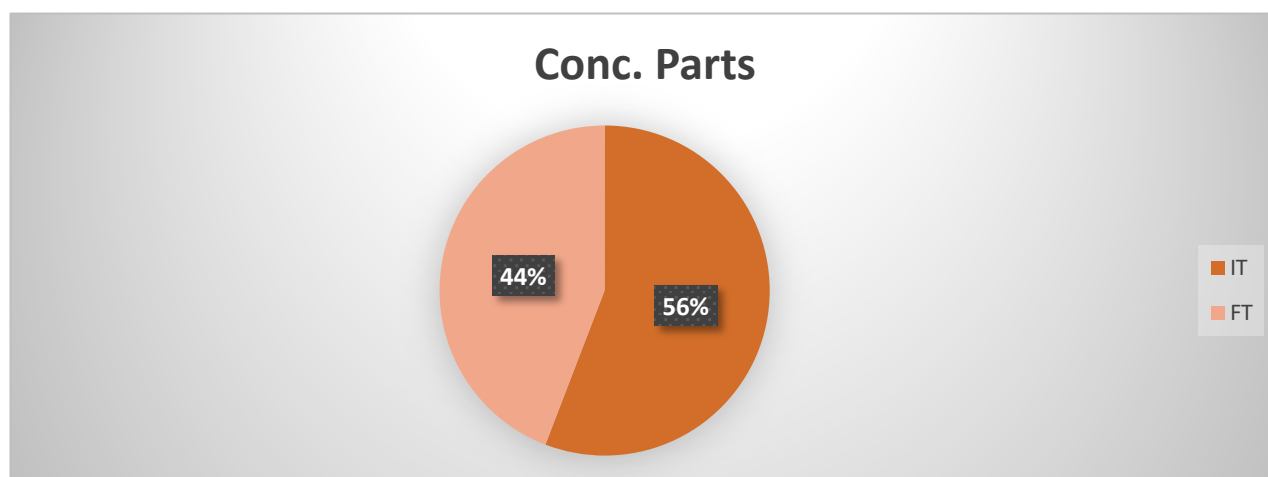


Grafico 14 = Concentrazione delle NP di Cr IT-FT

- 5 campioni urina IT dopo estrazione di EV NP Cr sp-ICP-MS

Parametri	Frazioni dopo centrifugazione
	100K
Diametro medio (nm)	34
Picchi, No	2140

Tabella 26 = Risultati Cr NP IT

- 5 campioni urina FT dopo estrazione di EV NP Cr sp-ICP-MS

Parametri	Frazioni dopo centrifugazione
	100K
Diametro medio (nm)	35
Picchi, No	3535

Tabella 27 = Risultati Cr NP FT

Picchi, No	Frazioni dopo centrifugazione
	100k
IT	2140
FT	3535

Tabella 28 = Numero picchi Cr NP IT-FT

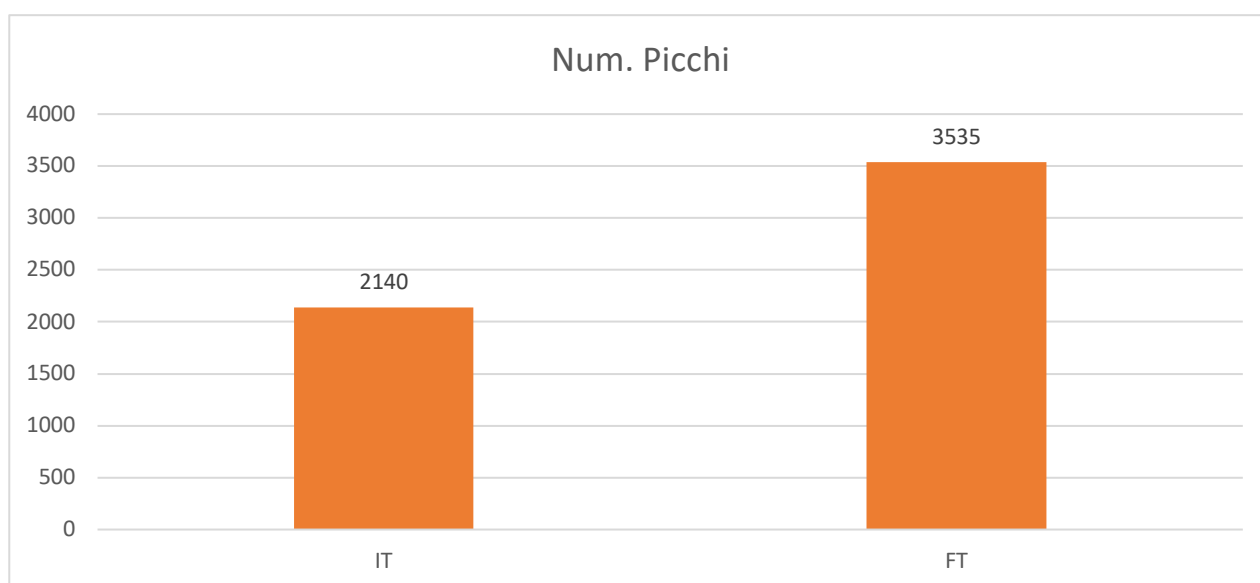


Grafico 15 = Numero picchi delle NP di Cr IT-FT

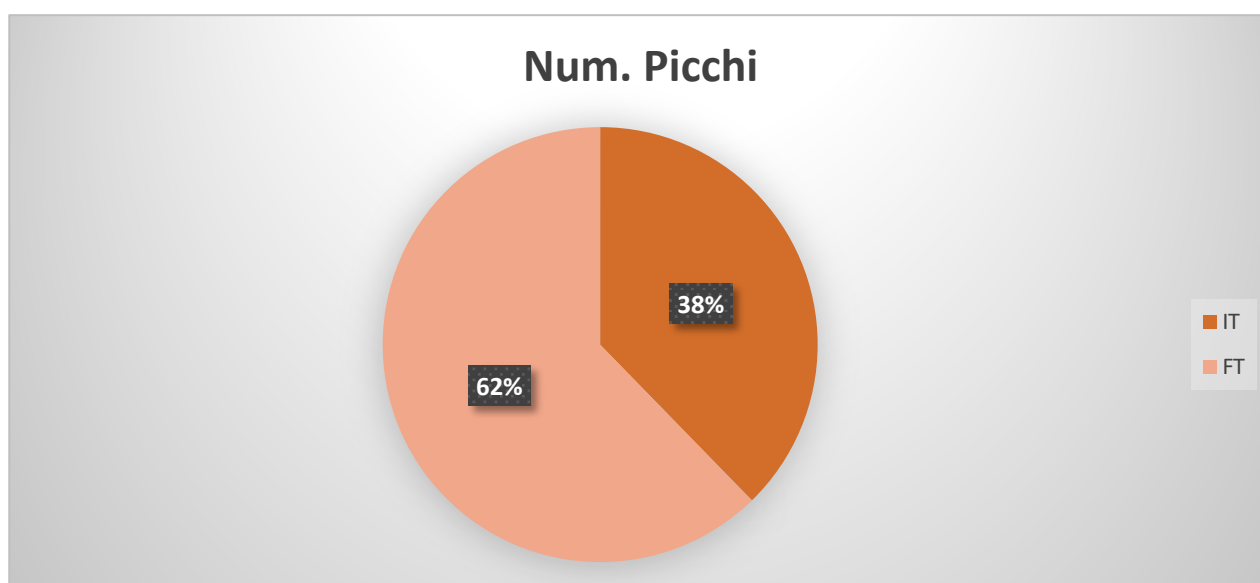


Grafico 16 = Numero picchi delle NP di Cr IT-FT

- 5 campioni urina IT dopo estrazione di EV caratterizzazione della frazione 100K tramite NanoSight

Campione	Concentration (Particles/mL)	Diametro Medio (nm)
1 IT	1,24E+10	95
2 IT	1,25E+10	105
3 IT	7,66E+09	111
4 IT	9,67E+09	95
5 IT	3,31E+10	126

IT	Concentration (Particles/mL)	Diametro Medio (nm)
Media	1,51E+10	106

Tabella 29 = Risultati NanoSight campioni IT

- 5 campioni urina FT dopo estrazione di EV caratterizzazione della frazione 100K tramite NanoSight

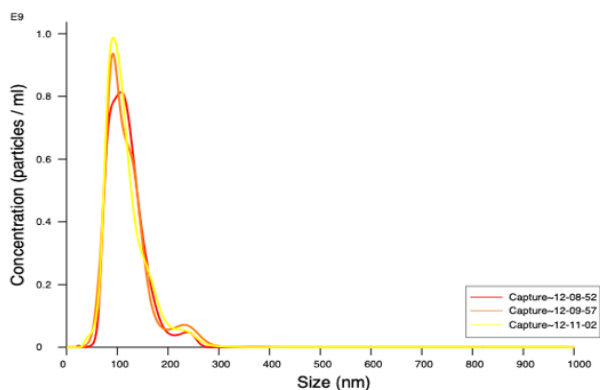
Campione	Concentration (Particles/mL)	Diametro Medio (nm)
1 FT	4,07E+10	92
2 FT	2,73E+09	101
3 FT	6,77E+10	118
4 FT	9,37E+09	90
5 FT	8,94E+09	104

FT	Concentration (Particles/mL)	Diametro Medio (nm)
Media	2,59E+10	101

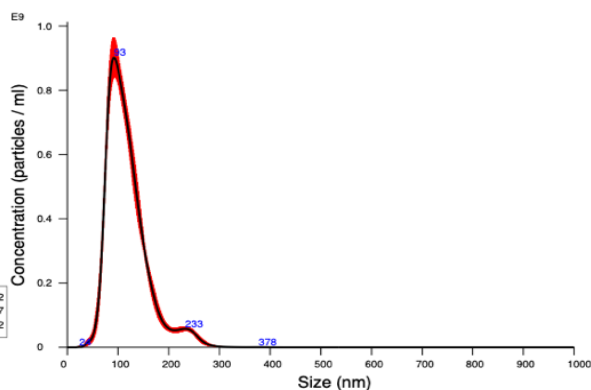
Tabella 30 = Risultati NanoSight campioni FT

NANOSIGHT

Capture 2025-10-29 12-08-41



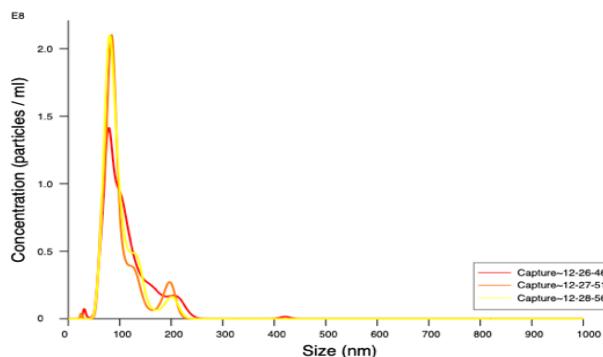
FTLA Concentration / Size graph for Experiment:
Capture 2025-10-29 12-08-41



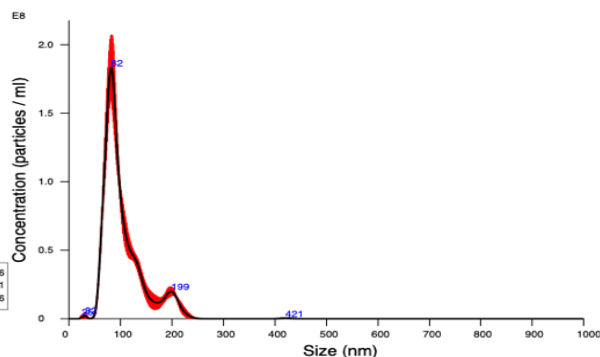
Averaged FTLA Concentration / Size for Experiment:
Capture 2025-10-29 12-08-41
Error bars indicate + / - 1 standard error of the mean

NANOSIGHT

Capture 2025-10-29 12-26-36



FTLA Concentration / Size graph for Experiment:
Capture 2025-10-29 12-26-36



Averaged FTLA Concentration / Size for Experiment:
Capture 2025-10-29 12-26-36
Error bars indicate + / - 1 standard error of the mean

Figura 8 = Elaborazione grafica dei risultati ottenuti tramite NanoSight

- 5 campioni urina IT-FT dopo estrazione di EV caratterizzazione della frazione 100K tramite Cryo-EM.

Di seguito vengono riportati i passaggi per la preparazione e per la successiva analisi dei campioni in esame.

I/Vitrification

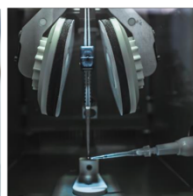
6 grids/each sessions Minimum of 2 grids/sample, maximum of 3 samples.



Vitrobot



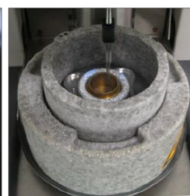
Grid 3mm ø



Deposition
& waiting time



Blotting time



Plunge-freezing

For the samples :

- 1) For Evs' concentration : maximum possible ($>10^{10}$ particles per mL)
- 2) For Protein concentration : 1mg/mL (if detergent 4mg/mL)

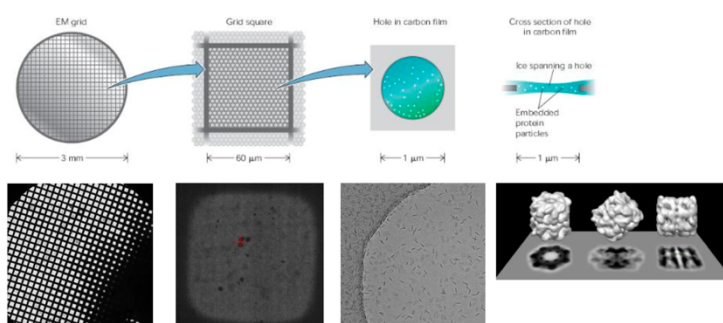
II/Clipping



III/Transfer



IV/ Observation



- 20 images will be taken (if possible) for each sample



Talos Artica 200kv
Detector: Falcon3 and Ceta16M

V/ Data transfer

- Each image is saved in both compressed and full-resolution files

Name of **compressed** image : grid1-df3-45kx-pic1

Name of the **full-resolution** image : grid1-df3-45kx-pic1-1

	Magnification	Å/pixel	nm/pixel
Grid observed	22kx	4,66	0,466
Defocus	28kx	3,67	0,367
Magnification	36kx	2,91	0,291
Picture number	45kx	2,29	0,229
	57kx	1,82	0,182
	73kx	1,43	0,143
	92kx	1,14	0,114
	120kx	0,86	0,086

This table will help you to calibrate
your scales correctly for each
image (on Fiji)

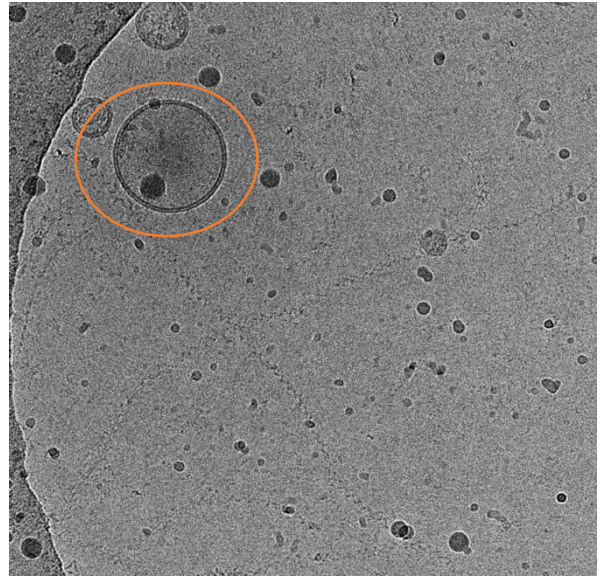
- By default, all your images will be transferred using WeTransfer.

NOTE : If you are planning to use the images we took in a scientific publication, please **acknowledge** the platform in the following way: 'Part of this work was carried out at NOLIMITS, an advanced imaging facility established by the Università degli Studi di Milano'.

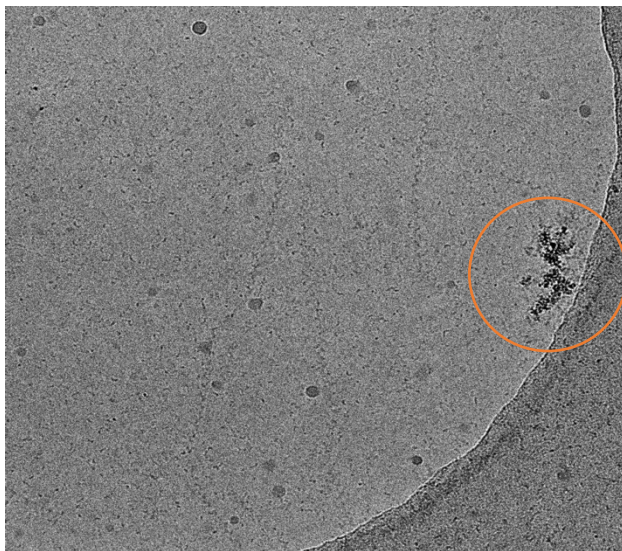
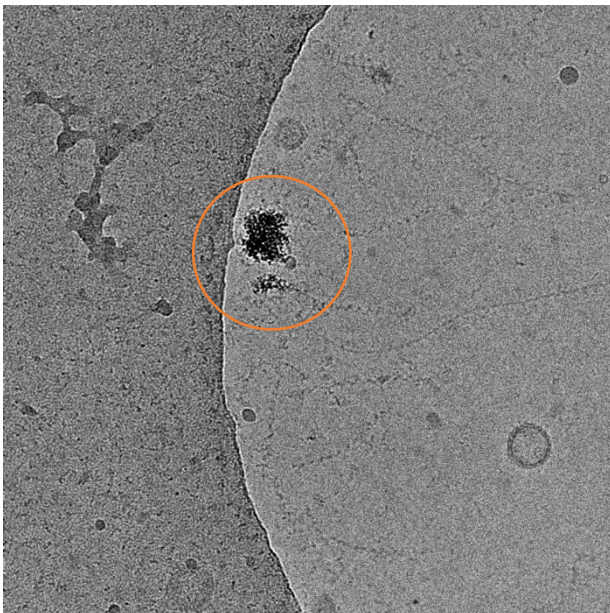


Talos Artica 200kv
Detector: Falcon3 and Ceta16M

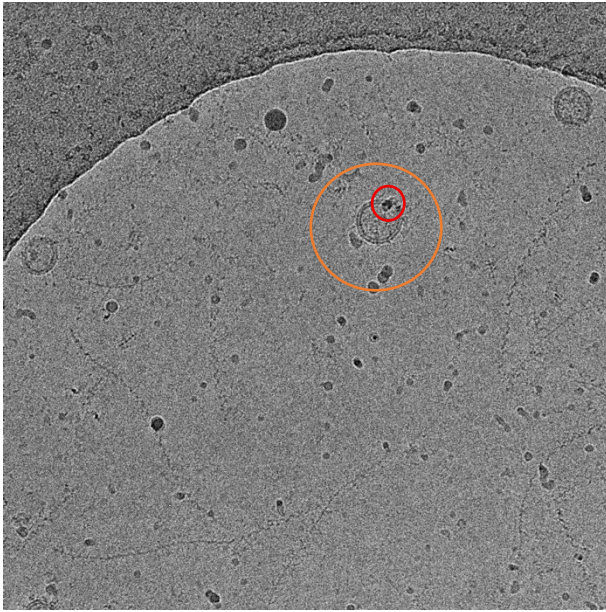
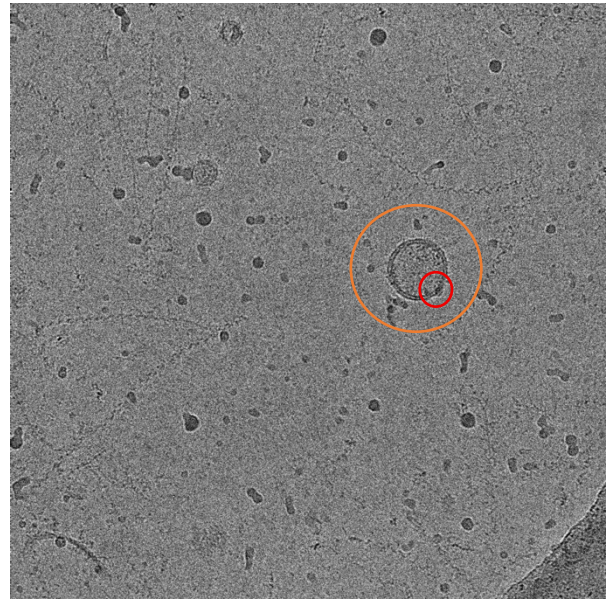
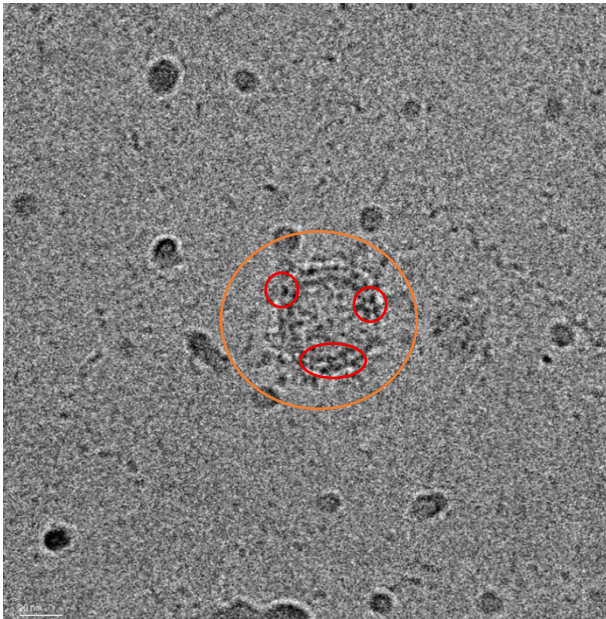
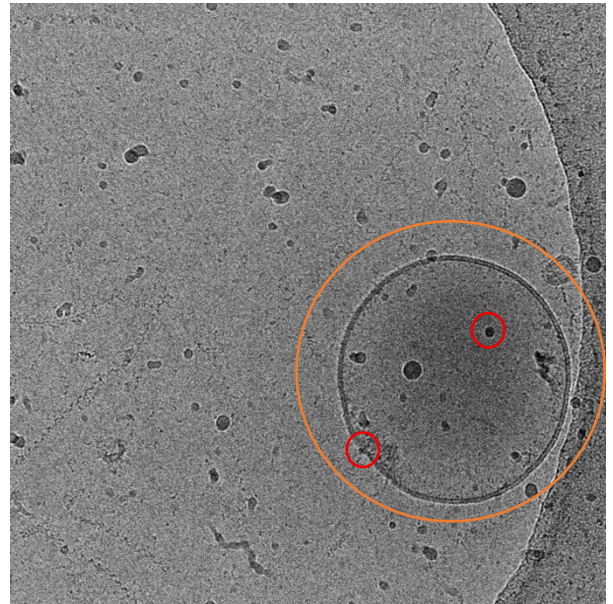
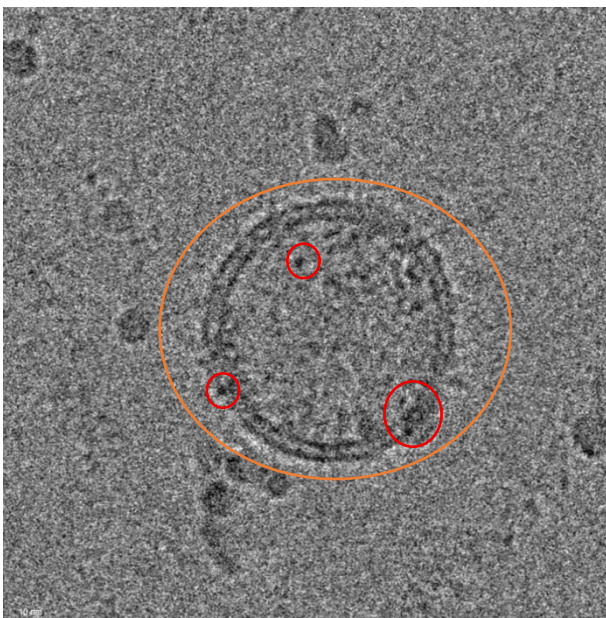
- Immagini Vescicole Extracellulari



- Immagini aggregati di NP metalliche fuori dalle EV



- Immagini singole NP metalliche all'interno e/o nella membrana fosfolipidica delle EV



Condensato totale dell'aria espirata

I risultati ottenuti con ICP-MS ci hanno permesso di ottenere la concentrazione del metallo disciolto.

I risultati ottenuti con sp-ICP-MS ci hanno permesso di ottenere la dimensione media, la dimensione più frequente, il numero di picchi e il numero di particelle per mL.

I campioni analizzati sono i seguenti:

- 26 campioni di IT e 22 campioni di FT analizzati per il Cr tramite sp-ICP-MS;
- inclusi 6 campioni di soggetti non esposti come controllo analizzati per il Cr tramite sp-ICP-MS.

Le tabelle successive riportano i risultati delle analisi.

Concentrazione Cr disciolto

Popolazione	Cr tot ug/L
Inizio-Turno	0,052
Fine-Turno	0,257
Non Esposti	0,184

Tabella 31 = Concentrazione Cr disciolto nel condensato (IT,FT,NE)

Concentrazione NP Cr

- 6 campioni di soggetti non esposti

Parametri	Media	Mediana
Diametro Medio (nm)	38	37
Diametro più frequente (nm)	12	11
Picchi, No	97	95
Part Conc parts/mL*	8305	8120

* Part Conc parts/mL: concentrazione di nanoparticelle per mL

Tabella 32 = Risultati Cr NP NE

- 26 campioni IT

Parametri	Media	Mediana
Diametro Medio (nm)	43	45
Diametro più frequente (nm)	17	13
Picchi, No	215	152
Part Conc parts/mL*	10058	7213

* Part Conc parts/mL: concentrazione di nanoparticelle per mL

Tabella 33 = Risultati Cr NP IT

- 22 campioni FT

Parametri	Media	Mediana
Diametro Medio (nm)	46	43
Diametro più frequente (nm)	18	16
Picchi, No	191	85
Part Conc parts/mL*	6872	3044

* Part Conc parts/mL: concentrazione di nanoparticelle per mL

Tabella 34 = Risultati Cr NP FT

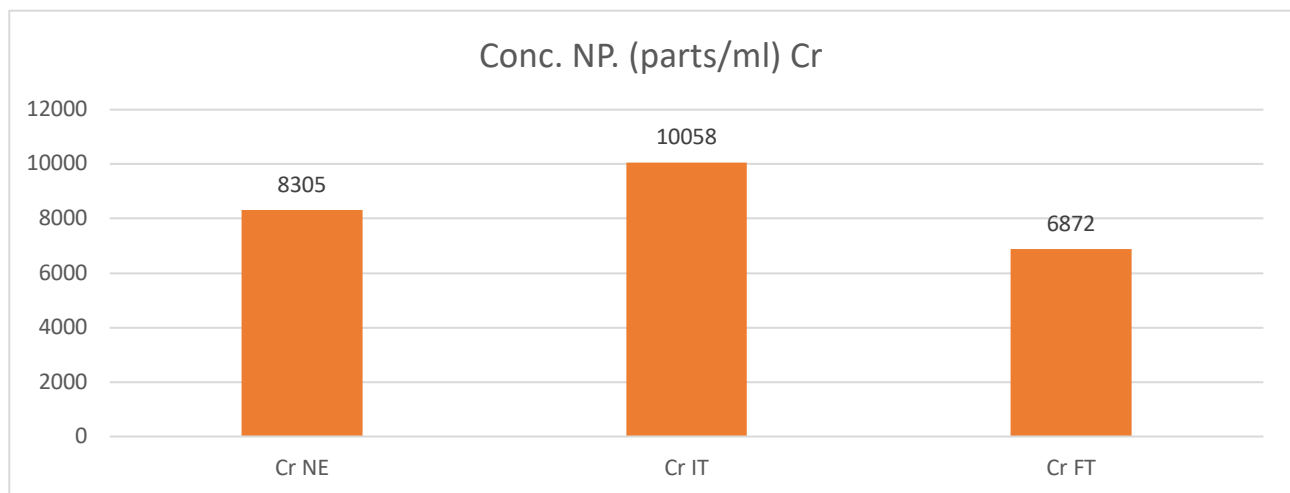


Grafico 17 = Concentrazione delle NP di Cr IT-FT-NE

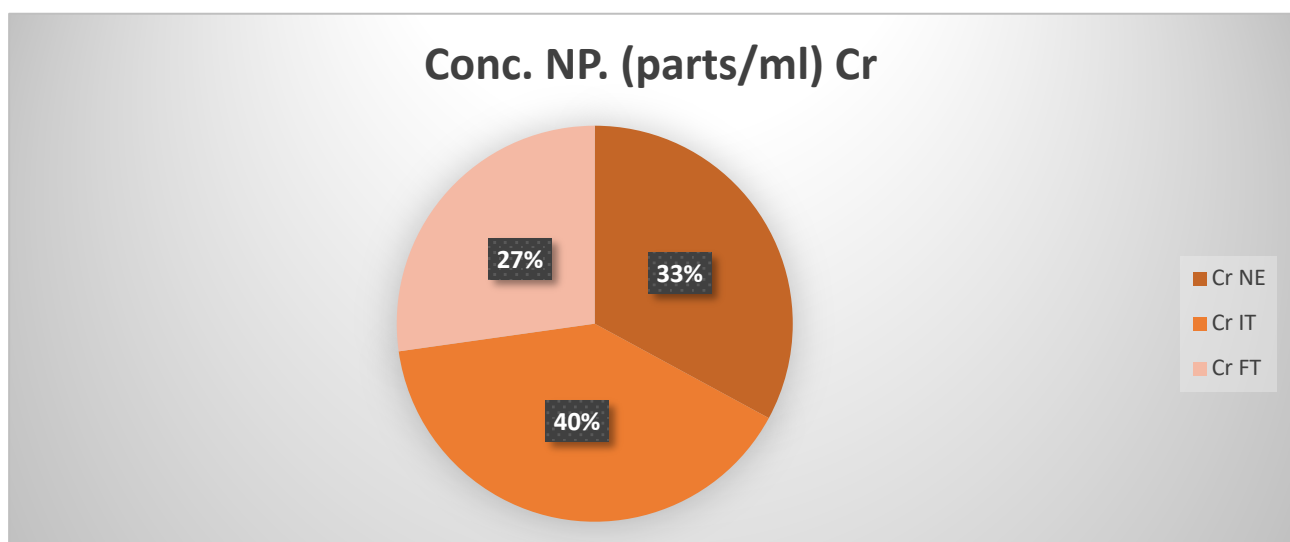


Grafico 18 = Concentrazione delle NP di Cr IT-FT-NE

Plasma totale

I risultati ottenuti con sp-ICP-MS ci hanno permesso di ottenere la dimensione media, la dimensione più frequente, il numero di picchi e il numero di particelle per mL.

I campioni analizzati sono i seguenti:

- 6 campioni del gruppo FT analizzati per il Cr tramite sp-ICP-MS;
- inclusi 8 campioni di soggetti non esposti a fini comparativi analizzati per il Cr tramite sp-ICP-MS.

Le tabelle successive riportano i risultati delle analisi.

Concentrazione NP Cr

- 8 campioni di soggetti non esposti

Parametri	Media	Mediana
Diametro Medio (nm)	20	20
Diametro più frequente (nm)	35	31
Picchi, No	19	15
Part Conc parts/mL*	651	511

* Part Conc parts/mL: concentrazione di nanoparticelle per mL

Tabella 35 = Risultati Cr NP NE

- 6 campioni FT

Parametri	Media	Mediana
Diametro Medio (nm)	17	14
Diametro più frequente (nm)	21	24
Picchi, No	317	240
Part Conc parts/mL*	6420	4990

* Part Conc parts/mL: concentrazione di nanoparticelle per mL

Tabella 36 = Risultati Cr NP FT

Parametri	FT	NE
Diametro Medio (nm)	17	20
Diametro più frequente (nm)	21	35
Picchi, No	317	19
Part Conc parts/mL*	6420	651

* Part Conc parts/mL: concentrazione di nanoparticelle per mL

Tabella 37 = Risultati Cr NP NE-FT

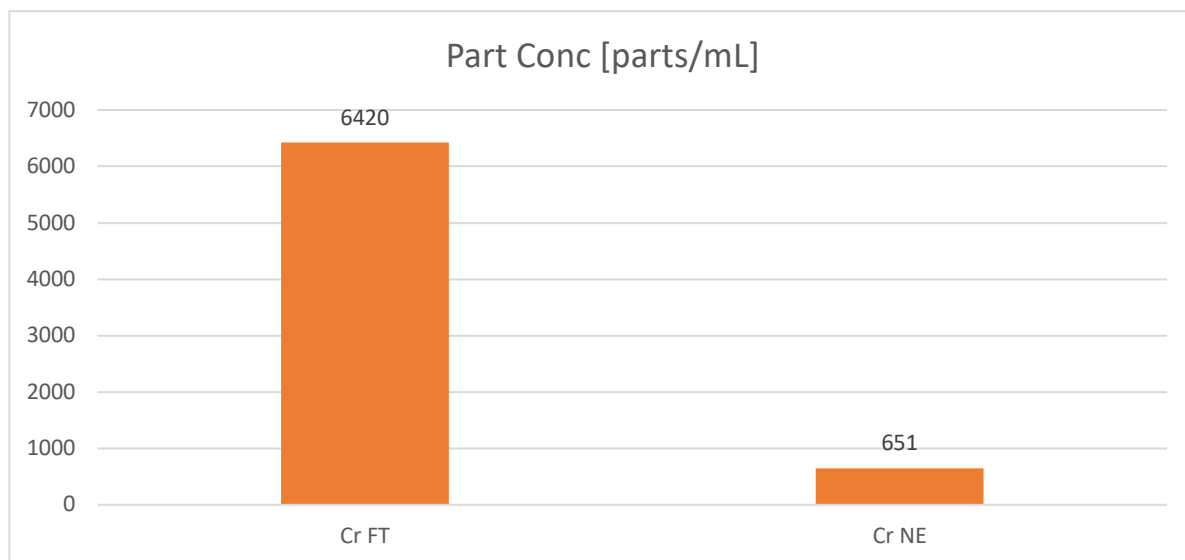


Grafico 19 = Concentrazione delle NP di Cr NE-FT

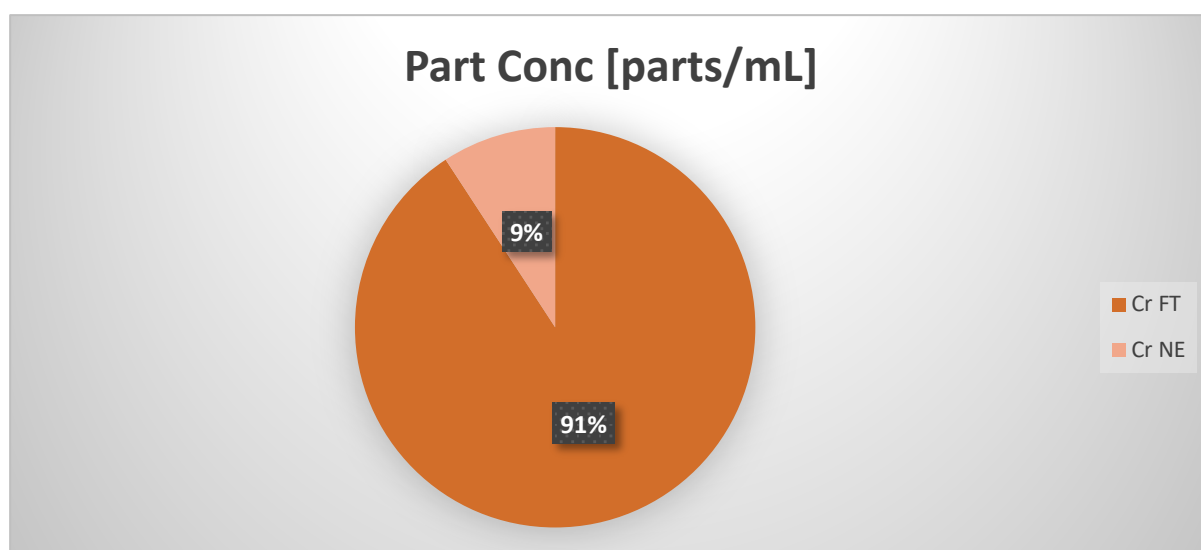


Grafico 20 = Concentrazione delle NP di Cr NE-FT

5. DISCUSSIONE

5.1 Monitoraggio ambientale

Le particelle aerodisperse sono state misurate in 19 postazioni di saldatura mediante uno spettrometro portatile per aerosol a largo spettro miniWRAS modello 1371. Durante periodi di campionamento della durata di 20–40 minuti sono stati registrati numero totale di particelle (conteggi totali [1/cc]), diametro medio geometrico [nm], diametro medio geometrico di massa [nm] e diametro medio geometrico superficiale [nm]. Le postazioni monitorate includevano saldatura tungsten inert gas (TIG) su acciaio inox, ferro e leghe Al–Si; saldatura metal inert gas (MIG) su acciaio inox; e saldatura ad arco con elettrodo rivestito utilizzando diversi elettrodi (OK 48.50, OK 43.39, OK 61.30, INEFIL, Bohler e 128 CA2).

Le misure delle particelle aerodisperse hanno evidenziato concentrazioni totali comprese tra 3.65×10^5 e 2.47×10^7 particelle m^{-3} , con diametri geometrici medi compresi tra 31 e 62 nm, indicando che le particelle emesse appartenevano prevalentemente alla frazione ultrafine. Durante il processo di saldatura è stata osservata una marcata crescita della concentrazione di particelle sospese nell'aria, accompagnata da una diminuzione del loro diametro medio rispetto alle altre fasi del ciclo lavorativo. In particolare, i picchi più elevati di concentrazione coincidevano temporalmente con la fase attiva di saldatura, mentre negli stessi intervalli si osservava una riduzione del diametro medio delle particelle, confermando che l'aumento della concentrazione e la contemporanea diminuzione delle dimensioni sono direttamente associati a questa specifica fase operativa (visibile nei grafici 3-4).

Sebbene le diverse tecniche di saldatura mostrassero concentrazioni ambientali complessivamente comparabili, l'incremento più marcato è stato osservato durante la saldatura MIG su acciaio inox, che ha raggiunto una concentrazione massima di 2.47×10^7 particelle m^{-3} , suggerendo che questa tecnica rappresenti una fonte particolarmente rilevante di nanoparticelle nell'ambiente di lavoro.

Il diametro geometrico medio complessivo delle particelle aerodisperse è risultato simile a quello misurato nelle urine dei saldatori, suggerendo una possibile relazione tra l'esposizione ambientale e il successivo uptake biologico. Questi risultati supportano l'ipotesi che l'esposizione occupazionale durante le attività di saldatura contribuisca all'inalazione di particelle ultrafini, che possono successivamente entrare nella circolazione sistemica e distribuirsi in diversi compartimenti biologici.

5.2 Monitoraggio biologico

Urine totali

I dati mostrano che la concentrazione di nanoparticelle di Cr e Ni nelle urine è maggiore alla fine del turno lavorativo rispetto all'inizio. Inoltre, i soggetti non esposti presentano concentrazioni inferiori rispetto ai lavoratori esposti. Le NP di Cr presentano un diametro medio di circa 50 nm, mentre quelle di Ni misurano circa 60 nm.

Le concentrazioni di NP di Cr e Ni risultano coerenti tra loro e con le rispettive concentrazioni totali urinarie. Il Ni risulta presente in concentrazioni più elevate rispetto al Cr, sia nella frazione nanoparticellare sia in quella totale urinaria. In alcuni campioni a bassa concentrazione, le NP di Cr erano al di sotto del limite di quantificazione, suggerendo potenziali limitazioni di sensibilità per l'analisi diretta delle urine in queste condizioni e l'utilità del protocollo di centrifugazione pre-analisi.

Urine EV

Per il protocollo di estrazione sono stati selezionati diversi campioni di urina, successivamente analizzati mediante sp-ICP-MS. Per ciascun campione, il processo di ultracentrifugazione ha consentito di ottenere quattro frazioni: una frazione post-filtrata priva di EV e NP, tre frazioni arricchite in EV e NP (2K, 16K e 100K) e un surnatante finale costantemente privo sia di EV che di NP. L'analisi delle NP di Cr nelle diverse popolazioni di EV (2K, 16K e 100K) ha mostrato che le NP risultano distribuite in tutte le frazioni sia nei campioni IT che FT, sebbene nei campioni IT sia stato osservato un numero inferiore di picchi di NP in tutte le frazioni rispetto al FT. Il diametro delle NP risulta complessivamente omogeneo nelle diverse frazioni di EV e segue la tendenza attesa dal protocollo di ultracentrifugazione, in cui velocità di centrifugazione più elevate corrispondono a NP di dimensioni progressivamente inferiori. Nei campioni con concentrazioni di NP superiori al LOQ nelle urine totali, la somma dei picchi rilevati nelle diverse frazioni ultracentrifugate risulta comparabile al numero di picchi misurati nei campioni non trattati, indicando che il protocollo di isolamento delle EV non altera il contenuto complessivo di NP ma ne determina una redistribuzione tra le diverse frazioni in funzione della dimensione. Nei campioni invece in cui le NP di Cr risultavano inferiori al LOQ nelle urine totali, l'estrazione delle EV ha consentito la concentrazione e la successiva rilevazione delle NP, in particolare nella frazione 100K.

Inoltre, la frazione 100K risulta essere quella maggiormente arricchita in NP, per questo motivo, l'utilizzo di questa frazione finale rappresenta un approccio particolarmente sensibile e affidabile per l'analisi delle NP in campioni caratterizzati da concentrazioni limitate, che potrebbero altrimenti mostrare valori inferiori al LOQ se analizzati direttamente come urine totali.

Analisi NanoSight

La caratterizzazione delle vescicole extracellulari mediante NanoSight ha evidenziato una concentrazione nelle urine compresa tra 10^9 e 10^{10} particelle/mL, in linea con i valori attesi per questo tipo di campioni biologici. Il diametro medio delle vescicole rilevate si attesta intorno ai 100 nm, dimensione tipica delle vescicole extracellulari, confermando la corretta identificazione della popolazione analizzata.

Analisi Cryo-EM

L'osservazione mediante microscopia elettronica criogenica ha permesso di individuare tre differenti modalità di distribuzione delle nanoparticelle:

1. Aggregati di NP metalliche localizzati liberamente nel mezzo extracellulare, al di fuori delle strutture cellulari, incluse le EV.
2. NP con diametro medio di circa 5 nm contenute all'interno delle vescicole extracellulari.
3. NP di dimensioni analoghe (≈ 5 nm) associate alla membrana fosfolipidica delle EV.

Le nanoparticelle osservate tramite Cryo-EM presentano un diametro inferiore rispetto a quello rilevato con la sp-ICP-MS, risultato coerente con i limiti strumentali di quest'ultima tecnica, che non consente la rilevazione di particelle con diametro inferiore a circa 10 nm. Inoltre tale evidenza potrebbe suggerire che parte delle NP possano trovarsi in forma aggregata anche durante le analisi eseguite con sp-ICP-MS, nonostante l'impiego di trattamenti di sonicazione volti a disaggregare i campioni.

Inoltre, la presenza di NP singole e non aggregate legate alla membrana fosfolipidica o intrappolate all'interno delle EV indica un potenziale meccanismo biologico di trasporto di tali nanoparticelle attraverso le vescicole extracellulari, che sembrano agire come serbatoi naturali per la loro veicolazione all'interno dell'organismo.

Condensato aria esalata

Nel condensato dell'aria esalata, la concentrazione di NP di Cr mostra un andamento simile tra i soggetti non esposti, i campioni di inizio turno e quelli di fine turno, con valori generalmente inferiori rispetto a quelli osservati nelle urine. Il diametro medio delle particelle è di circa 40 nm, quindi inferiore rispetto a quello rilevato nei campioni urinari e maggiore rispetto a quello rilevato nei campioni di plasma.

Plasma

Le NP di Cr sono state rilevate anche nel plasma, con concentrazioni più elevate nel gruppo di FT rispetto al gruppo dei NE. Nei campioni FT il diametro medio delle particelle è risultato pari a circa 17 nm, con una concentrazione media di 6420 particelle/mL, mentre nei campioni NE il diametro medio è pari a circa 20 nm, con una concentrazione media di 651 particelle/mL. Il confronto tra i due gruppi evidenzia quindi un numero maggiore di NP nel gruppo esposto rispetto al gruppo non esposto. Inoltre, i diametri delle NP misurati nel plasma risultano inferiori rispetto a quelli osservati sia nelle urine sia nel condensato dell'aria espirata. Questo risultato suggerisce che le nanoparticelle di dimensioni più ridotte possano traslocare più facilmente dal tratto respiratorio al flusso sanguigno, dove possono circolare sistemicamente con dimensioni minori prima di essere ridistribuite in altri compartimenti biologici o eliminate.

6. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

L'insieme delle analisi condotte, comprendenti sia il monitoraggio ambientale sia il biomonitoraggio su diverse matrici biologiche, ha consentito di delineare un quadro integrato dell'esposizione a nanoparticelle metalliche durante le attività di saldatura e di comprendere meglio i possibili meccanismi di distribuzione e interazione di tali particelle con i sistemi biologici.

Dal punto di vista ambientale, è stato osservato un incremento significativo della concentrazione di particelle sospese durante le operazioni di saldatura, con valori più elevati associati alla modalità MIG rispetto alle altre tecniche considerate. Le particelle emesse risultano prevalentemente appartenenti alla frazione ultrafine, caratterizzata da diametri nell'ordine delle decine di nanometri. I risultati ottenuti suggeriscono la possibile esistenza di una correlazione tra monitoraggio ambientale e biomonitoraggio, che potrà essere ulteriormente confermata mediante studi futuri condotti con l'impiego di strumentazione ambientale specifica per il monitoraggio personale. In particolare, il diametro geometrico medio delle particelle aerodisperse è risultato comparabile a quello rilevato nelle urine dei saldatori, indicando una potenziale relazione diretta tra l'esposizione per via inalatoria e l'escrezione urinaria delle nanoparticelle.

Le analisi di biomonitoraggio condotte su diverse matrici biologiche (condensato dell'aria espirata, plasma e urine) hanno permesso di ottenere una valutazione più completa della distribuzione delle nanoparticelle nell'organismo a seguito dell'esposizione occupazionale.

Nel condensato dell'aria espirata sono state rilevate nanoparticelle di cromo con diametri medi di circa 40 nm. Le concentrazioni osservate risultano generalmente inferiori rispetto a quelle misurate nelle urine e mostrano andamenti simili tra soggetti non esposti e campioni raccolti a inizio e fine turno. Nel plasma invece sono state rilevate nanoparticelle di cromo con concentrazioni più elevate nei soggetti esposti rispetto ai non esposti. In questa matrice biologica le nanoparticelle presentano diametri medi più piccoli rispetto a quelli osservati nelle urine e nell'EBC, con valori compresi tra circa 17 e 20 nm. Questo dato suggerisce che le particelle di dimensioni minori possano traslocare più facilmente dal tratto respiratorio al flusso sanguigno, dove possono circolare sistemicamente prima di essere redistribuite in altri compartimenti biologici o eliminate.

Le analisi urinarie hanno evidenziato che le concentrazioni di nanoparticelle di cromo e nichel aumentano dall'inizio turno al fine turno nei lavoratori esposti, mentre nei soggetti non esposti sono state osservate concentrazioni significativamente inferiori. Il diametro medio delle nanoparticelle di cromo nelle urine è risultato pari a circa 50 nm, mentre quelle di nichel presentano dimensioni leggermente maggiori, con diametri medi di circa 60 nm.

In diversi campioni, tuttavia, le nanoparticelle di cromo nelle urine totali risultavano inferiori al limite di quantificazione (LOQ), indicando che l'analisi diretta dell'urina può presentare limitazioni di sensibilità in condizioni di basse concentrazioni.

Un aspetto particolarmente innovativo di questo studio riguarda l'introduzione delle vescicole extracellulari, sia come potenziali serbatoi di nanoparticelle, sia come processo estrattivo preliminare alle analisi in sp-ICP-MS. Le nanoparticelle risultano distribuite nelle diverse frazioni ottenute mediante ultracentrifugazione differenziale (2K, 16K e 100K), secondo il protocollo di separazione comunemente impiegato per l'isolamento delle EV.

Nei campioni con concentrazioni di nanoparticelle superiori al LOQ nelle urine totali, la somma dei picchi rilevati nelle diverse frazioni ultracentrifugate risulta comparabile a quella osservata nei campioni non trattati, indicando che il protocollo di isolamento delle EV-NP non altera il contenuto complessivo di nanoparticelle ma ne determina una redistribuzione tra le diverse frazioni in funzione della dimensione.

Nei campioni caratterizzati da concentrazioni inferiori al LOQ nelle urine totali, l'isolamento delle EV-NP ha invece consentito di concentrare e rilevare le nanoparticelle, in particolare nella frazione 100K. Questa frazione risulta infatti la più arricchita sia in termini di EV sia di nanoparticelle, dimostrando che l'utilizzo di tale approccio può migliorare significativamente la sensibilità analitica in campioni caratterizzati da basse concentrazioni.

Le osservazioni mediante microscopia elettronica criogenica (Cryo-EM) hanno inoltre permesso di visualizzare diverse modalità di interazione tra nanoparticelle ed EV: aggregati di nanoparticelle liberi nel mezzo extracellulare, nanoparticelle di circa 5 nm localizzate all'interno delle EV e nanoparticelle di dimensioni simili associate alla membrana fosfolipidica delle vescicole. Il diametro inferiore delle nanoparticelle osservato mediante Cryo-EM rispetto a quello misurato con sp-ICP-MS è coerente con i limiti di rilevabilità strumentali di quest'ultima tecnica, che generalmente non consente la rilevazione di particelle inferiori a circa 10 nm.

Queste osservazioni suggeriscono che le vescicole extracellulari possano contribuire al trasporto e alla distribuzione delle nanoparticelle metalliche all'interno dell'organismo, agendo potenzialmente come vettori biologici e serbatoi temporanei di tali particelle.

Nel complesso, i risultati ottenuti permettono di concludere che:

- È stato sviluppato e validato un metodo analitico per la determinazione delle nanoparticelle sia in aria ambiente sia nelle principali matrici di biomonitoraggio.
- Le attività di saldatura rappresentano una fonte rilevante di esposizione a nanoparticelle metalliche, in particolare di cromo e nichel.
- Le nanoparticelle inalate possono essere assorbite dall'organismo, raggiungere la circolazione sistemica e distribuirsi in diverse matrici biologiche.
- Le vescicole extracellulari possono svolgere un ruolo importante nel trasporto e nella distribuzione delle nanoparticelle.

Alla luce dei risultati ottenuti, si prospettano diversi sviluppi futuri. Tra questi, l'analisi su singoli saldatori per valutare le caratteristiche delle nanoparticelle nelle diverse matrici biologiche, lo studio del ruolo funzionale delle EV nei processi di trasporto e comunicazione intercellulare mediati da nanoparticelle, l'esplorazione della possibile interazione tra EV e nanoparticelle anche nel plasma e l'estensione delle analisi a ulteriori metalli potenzialmente tossici o cancerogeni.

In prospettiva, l'integrazione tra tecniche analitiche avanzate, quali sp-ICP-MS, Cryo-EM e NTA, e lo studio più approfondito delle vescicole extracellulari potrà rappresentare una nuova frontiera per il biomonitoraggio dell'esposizione ai nanomateriali sia in ambito occupazionale sia nella popolazione generale, contribuendo al miglioramento delle strategie di valutazione del rischio e alla tutela della salute dei lavoratori.

A nostro avviso, i risultati ottenuti rappresentano contributi innovativi e solidi sul piano scientifico: abbiamo standardizzato un insieme di metodi per la determinazione delle nanoparticelle in campioni biologici sia concentrati sia a basse concentrazioni, definito una procedura per la loro rilevazione nell'aria ambiente e acquisito nuove informazioni sulle modalità con cui esse possono essere trasportate nel corpo umano.

La ricerca, naturalmente, non si arresta. Il lavoro svolto costituisce una vera e propria piattaforma di partenza, una base consolidata da cui potranno svilupparsi nuovi progetti e ulteriori approfondimenti per ampliare la conoscenza nel campo della nanotossicologia.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Nordberg GF, Costa M, editors. Handbook on the Toxicology of Metals. Volume I: General Considerations. 5th ed. Amsterdam: Elsevier; 2022.
2. Li X, et al. Properties and applications of nanoparticles and nanomaterials. *International Journal of Molecular Sciences*. 2025.
3. Jiménez-Lamana J, et al. A novel strategy for the detection and quantification of nanoplastics by single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *Analytical Chemistry*. 2020.
4. Schulte PA, et al. Nanotechnologies and nanomaterials in the occupational setting. *Italian Journal of Occupational and Environmental Hygiene*. 2010.
5. Boccuni F, et al. Potential occupational exposure to manufactured nanoparticles in Italy. *Journal of Cleaner Production*. 2007.
6. Cena LG, et al. A novel method for assessing respiratory deposition of welding fume nanoparticles. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*. 2014.
7. McCarrick S, et al. High variability in toxicity of welding fume nanoparticles from stainless steel in lung cells and reporter cell lines: the role of particle reactivity and solubility. *Nanotoxicology*. 2019.
8. Pili S, et al. Exposure assessment to fine and ultrafine particulate matter during welding activity in the maintenance shop of a steelmaking factory. *Heliyon*. 2024.
9. Cena LG, et al. A field study on the respiratory deposition of the nano-sized fraction of mild and stainless steel welding fume metals. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*. 2015.
10. Carrillo-Romero J, et al. Assessing the toxicity of metal- and carbon-based nanomaterials in vitro: impact on respiratory, intestinal, skin, and immune cell lines. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024.
11. McCarrick S, et al. Gold nanoparticles dissolve extracellularly in the presence of human macrophages. *International Journal of Nanomedicine*. 2021.
12. Galbiati V, et al. Un breve excursus: diversa natura, diverso utilizzo e tra le nanoparticelle, diversi possibili approcci tossicologici. *SITOX*. 2023.
13. Badalova K, et al. Possibilities of single-particle ICP-MS for determining and characterizing titanium dioxide and silver nanoparticles in human urine. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2019.
14. Salou S, et al. Quantification of titanium dioxide nanoparticles in human urine by single-particle ICP-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2020.

15. Erdbrügger U, et al. Urinary extracellular vesicles: a position paper by the Urine Task Force of the International Society for Extracellular Vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2021.
16. Wu L, et al. Urinary extracellular vesicles are a novel tool to monitor allograft function in kidney transplantation: a systematic review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021.
17. Bocca B, et al. Human biomonitoring and personal air monitoring: an integrated approach to assess exposure of stainless-steel welders to metal-oxide nanoparticles. *Environmental Research*. 2023.
18. Bocca B, et al. Occupational exposure to metal engineered nanoparticles: a human biomonitoring pilot study involving Italian nanomaterial workers. *Toxics*. 2023.
19. Kumah EA, et al. Human and environmental impacts of nanoparticles: a scoping review of the current literature. *BMC Public Health*. 2023.
20. Wang F, et al. Current research on ecotoxicity of metal-based nanoparticles: from exposure pathways, ecotoxicological effects to toxicity mechanisms. *Frontiers in Public Health*. 2024.
21. PerkinElmer. *Single Cell ICP-MS Analysis: Quantification of Metal Content at the Cellular Level*. Technical note.
22. PerkinElmer. *An Introduction to Single Cell ICP-MS Analysis*. Technical note.
23. Mozhayeva D, et al. A critical review of single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry: a step towards an ideal method for nanomaterial characterization. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2019.
24. Malvern Panalytical. *Introduction to Nanoparticle Tracking Analysis (NTA): Principles, Methods and Applications*. Technical note; 2020.
25. ISO/TR 19430:2016. *Nanotechnologies — Nanomaterial risk evaluation — Nanoparticle tracking analysis (NTA)*.
26. Filipe V, et al. Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharmaceutical Research*. 2010.
27. Dragovic RA, et al. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using nanoparticle tracking analysis. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2011.
28. Théry C, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018). *Journal of Extracellular Vesicles*. 2018.
29. Dubochet J, et al. Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Quarterly Reviews of Biophysics*. 1988.
30. Cheng Y, et al. Single-particle cryo-EM—how did it get here and where will it go. *Science*. 2018.
31. Subramaniam S, et al. Cryo-EM at IUCrJ: the first year. *IUCrJ*. 2016.

32. Chen BT, et al. Performance of a scanning mobility particle sizer in measuring diverse types of airborne nanoparticles: multi-walled carbon nanotubes, welding fumes, and titanium dioxide spray. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*. 2016.

SITOGRAFIA

www.nanodb.dk

<https://osha.europa.eu/it>

<https://www.afnor.org/en/>

<https://www.malvernpanalytical.com/en/learn/knowledge-center>

xearpro.it+1