

Nanotubi e nanofibre di carbonio: esposizione occupazionale e possibili effetti sulla salute

ENRICO BERGAMASCHI⁽¹⁾, FRANCESCA DONATO⁽¹⁾, ENRICO PIRA⁽¹⁾, GIACOMO GARZARO⁽¹⁾,
FEDERICA ROSSI⁽¹⁾, IVANA FENOGLIO⁽²⁾

⁽¹⁾ *Dipartimento di Scienze della Sanità Pubblica e Pediatriche, Università di Torino*

⁽²⁾ *Dipartimento di Chimica, Università di Torino*

Introduzione

I nanotubi di carbonio (CNT) sono una classe di nanomateriali/nano-oggetti a struttura fibrosa a base di carbonio, composti da fogli di grafite, principalmente distinti in due categorie: a parete singola (SWCNT), con diametri da 0,5 a pochi nanometri, ed a parete multipla (MWCNT), costituiti da una o più pareti singole di tubi coassiali e diametri da 5 a 100-200 nm, ma lunghezze sino a diversi millimetri. I CNT possono differire notevolmente in termini di dimensioni, forma e composizione chimica, sia in base alla progettazione che come risultato di contaminazione durante la produzione. Come conseguenza del numero di strati di grafene, della disposizione degli esagoni di carbonio ibridato sp², o ancora della presenza di difetti, i CNT possono avere diverse geometrie. Essi possono essere dritti e sottili, curvi o arrotolati, rigidi o parzialmente flessibili. Gli attuali metodi di sintesi generano in genere SWCNT o MWCNT di morfologia molto eterogenea. Inoltre, a seconda del mezzo in cui sono dispersi, possono esistere come entità singole, ma più facilmente come aggregati o agglomerati che si comportano come particelle piuttosto che fibre ^[1].

I CNT attualmente prodotti sono ben lontani dall'essere strutture perfette, anzi, contengono vari tipi di difetti generati durante il processo di crescita o durante i trattamenti post-sintesi, quali la sostituzione degli atomi di carbonio con l'azoto. I CNT disponibili in commercio possono anche contenere carbonio amorfo, fullereni, particelle grafite, metalli derivati dai catalizzatori usati nella loro sintesi (ad esempio Fe, Co, Ni, Y) e materiali inerti (allumina o silice) usati come supporto per i catalizzatori. Le impurità possono raggiungere fino al 20-30% p/p di prodotto. Tali aspetti condizionano non soltanto la performance tecnologica, ma anche gli effetti biologici ^[2].

Sebbene siano trascorsi quasi 30 anni dalla loro scoperta, le attuali aree di utilizzo dei CNT sono attualmente molto limitate, principalmente a causa di problemi con una produzione di massa ben controllata. Il maggior campo di applicazione è rappresentato dai materiali compositi, che non richiedono purezza elevata e caratteristiche ben definite come per molte applicazioni

elettroniche ^[1,3]. Attualmente i CNT sono utilizzati principalmente nei materiali plastici per renderli più leggeri o più resistenti, con un contenuto di 1-10% di CNT, per la produzione di parti per automobili e velivoli, pale eoliche e attrezzature. Il mercato produce anche telefoni cellulari e computer portatili con batterie agli ioni di litio che contengono CNT. La produzione globale di CNT è attualmente superiore a 2,5 tonnellate/giorno. Alcune potenziali applicazioni future proposte per i CNT sono tessili, materiali da costruzione, elettronica, sistemi energetici, biomedicina, tecnologia a membrana e applicazioni mediche. Possono anche essere funzionalizzati con un'ampia varietà di prodotti chimici sulla superficie per migliorare le proprietà elettriche o fisiche o per veicolare altre sostanze organiche, specialmente farmaci (antineoplastici). Altre potenziali applicazioni sono nella produzione di tessuti artificiali, di *scaffolds* per la rigenerazione del tessuto osseo, di substrati per la crescita neuronale ^[1,3].

Pericolosità dei CNT

Per diversi anni la potenziale tossicità dei CNT venne sottovalutata, dato che la produzione avveniva prevalentemente in laboratori e non su larga scala, ma nel 1998 un articolo su *Science* ipotizzò una connessione tra CNT e amianto, sulla base delle analogie strutturali e del comportamento biologico (“biopersistenza”) ^[4]. Per diverso tempo venne tuttavia considerato soltanto l'aspetto dimensionale e “*fiber-like*”, non l'intero pattern delle caratteristiche chimico-fisiche rilevanti per la loro tossicità. La maggior parte degli studi sperimentali si sono concentrati sugli effetti a carico del sistema respiratorio, perché la via inalatoria rappresenta la via di esposizione più rilevante in contesti occupazionali. Studi *in vivo* hanno evidenziato che i CNT inducono effetti infiammatori e fibrosi polmonare nei roditori in seguito ad instillazione intra-tracheale o esposizione per via inalatoria ^[1-3]. Flogosi e fibrosi polmonare sono state associate ad un aumentato rischio di cancro ai polmoni, giustificando così la valutazione di eventuali eventi genotossici che accompagnano l'esposizione a CNT.

L'induzione di neoplasie mesoteliali sia pleuriche che peritoneali è stata dimostrata da diversi autori, ma non mancano dati conflittuali. Infatti è stata evidenziata sia la capacità di indurre il mesotelioma ^[5] che l'assenza di qualsiasi risposta cancerogena ^[6]. Diversi Autori hanno evidenziato la capacità da parte di MWCNT > 10 mm di indurre infiammazione e lesioni peritoneali, la cui severità era proporzionale alla lunghezza delle fibre ^[7,8]. Gli studi per via inalatoria hanno consentito di effettuare esperimenti cronici (oltre 1 anno o più) a basse dosi ^[9] e confermare gli specifici effetti profibrogenici dei CNT evidenziati nel corso degli esperimenti acuti e subacuti. I ricercatori hanno successivamente iniziato a prestare maggiore attenzione agli effetti extrapulmonari: alterazioni sistemiche a livello vascolare, effetti sul sistema nervoso centrale, tossicità riproduttiva e immunotossicità. Nel novembre 2014, la IARC ha classificato un tipo di MWCNT (MWCNT-7, prodotto dalla Mitsui Ltd., Giappone) come agente di gruppo 2B (possibilmente cancerogeno per l'uomo), con limitata evidenza per altri tipi di MWCTN simili e nessuna evidenza di cancerogenicità per SWCNT, puntando tuttavia l'attenzione sulla genotossicità dei CNTs ^[10]. Un aspetto rilevante negli studi tossicologici è la confrontabilità rispetto a reali scenari di esposizione. Gli agglomerati o gli aggregati hanno spesso un diametro aerodinamico maggiore rispetto ai singoli tubi e quindi si depositano nelle vie respiratorie superiori, dove meccanismi di clearance possono rimuoverli o degradarli. Di conseguenza, negli studi in cui i CNT sono stati somministrati per instillazione o aspirazione intra-tracheale, l'aggregazione non

ha solo un effetto sulla sede di deposizione, ma anche sulla risposta biologica. In questo scenario complesso, diventa difficile trarre conclusioni univoche circa la cancerogenicità dei CNT.

Proprietà fisico-chimiche rilevanti per la tossicità

Come per altri nanomateriali, le proprietà fisico-chimiche influenzano la tossicità dei CNT. Vi sono indicazioni che, a seconda della purezza, del diametro, della lunghezza, della carica superficiale, della funzionalizzazione e dello stato di aggregazione, i CNT possano provocare diversi effetti tossici. La lunghezza $>4-10 \mu\text{m}$ è considerata quasi una soglia per la patogenicità (risposta infiammatoria) dei CNT. La maggior nocività dei CNT lunghi e rettilinei ($> 10 \mu\text{m}$) parrebbe correlata alla loro interazione meccanica con le cellule a causa della fagocitosi inefficace dei macrofagi nei confronti delle fibre lunghe. Anche il diametro dei CNT è un parametro importante. Uno studio con due campioni di MWCNT di lunghezza simile ($<5 \mu\text{m}$) e reattività della superficie ma diametro diverso (9.4 e 70 nm) hanno mostrato che gli MWCNT sottili sembravano significativamente più tossici rispetto a quelli più spessi sia *in vivo* (ratti, polmoni) che *in vitro* (macrofagi alveolari murini) ^[11]. La presenza di difetti strutturali è stata associata all'infiammazione, ma non alla cancerogenicità ^[11]. Il grado ed il tipo di funzionalizzazione appare cruciale nella modulazione delle risposte biologiche e la clearance dall'organismo. Il rapporto fra grado di funzionalizzazione e risposta infiammatoria ed attivazione macrofagica è stato studiato recentemente da Allegri et al ^[12]. Recentemente, alcuni autori hanno suggerito che i CNT possono essere attaccati e degradati da ossidanti endogeni o enzimi ossidanti, es. mieloperossidasi (MPO), a contatto con fluido fagolisosomiale. Ciò è stato dimostrato in animali carenti di MPO i quali presentavano maggiori effetti infiammatori e fibrosi polmonare ^[13]. Una struttura a parete singola e alcuni tipi di funzionalizzazione favoriscono la biodegradazione. I CNT carbosilati, per esempio, sono parzialmente degradabili rispetto ai CNT non funzionalizzati, che sono più resistenti. Tuttavia, non è chiaro se la degradazione *in vivo* consenta di prevenire gli effetti nocivi dei CNT. Infine, la presenza di residui catalitici, ad es. metallici, aumenta drasticamente la tossicità di CNT ^[14]

Effetti in lavoratori professionalmente esposti

Sebbene gli studi sugli animali suggeriscano che l'esposizione a CNT/F può causare effetti nocivi sulla salute, gli studi epidemiologici sull'uomo sono di piccole dimensioni e con numerose lacune nella valutazione dell'esposizione. In una coorte di lavoratori esposti professionalmente a MWCNT, Shvedova et al. ^[15] hanno evidenziato variazioni significative nei profili di espressione genica tra esposti a concentrazioni di carbonio elementare CE di $14.42 \pm 3.8 \text{ mg/m}^3$ (inalabile) e di $2.83 \pm 0.6 \text{ mg/m}^3$ (respirabile) in zona respiratoria rispetto ai lavoratori non esposti. In particolare, in 8 lavoratori in contatto diretto con aerosols contenenti MWCNT nei sei mesi precedenti sono state evidenziate alterazioni del profilo dei geni coinvolti nel controllo del ciclo cellulare, nell'apoptosi, nella proliferazione cellulare e dei pathways connessi alla cancerogenesi. In uno studio concomitante sullo stesso gruppo ^[16] è stato evidenziato come l'esposizione a MWCNT nell'ordine di 3 volte superiore al livello di esposizione raccomandato (REL) proposto dal NIOSH ($1 \mu\text{g/m}^3$) fosse associata con un aumento significativo di IL-1 β , IL-4, IL-5, IL6, TNF- α , citochine infiammatorie e KL-6 (biomarcatore di fibrogenesi) nei campioni di espettorato indotto. Inoltre, il livello di TGF- β 1 era aumentato nel siero dei lavoratori più giovani (<30 anni). Nei campioni di siero, i livelli di IL-1 β , IL-4, IL-10 e TNF- α erano

significativamente elevati nel gruppo esposto a MWCNT. Vlaanderen et al. ^[17] hanno valutato 51 marcatori immunitari e pneumoproteine nel siero tra 22 lavoratori di una struttura di produzione MWCNT e 39 controlli evidenziando significativi trend del marcatore Ligand 20, il fattore di crescita dei fibroblasti e il recettore IL-1 solubile con esposizione crescente a MWCNT. I primi risultati dello studio epidemiologico promosso dal NIOSH, comprendente una coorte di 108 lavoratori di 12 imprese negli USA ed iniziato nel 2013, finalizzato a valutare l'associazione tra esposizione professionale a CNT/F ed indicatori di effetto precoce nell'espettorato e nel sangue ha rivelato una associazione fra l'esposizione (valore medio di EC inalabile corretto rispetto al background: 0,24 mg/m³) ed alcuni biomarcatori di infiammazione ed attività antiossidante, di rimodellamento strutturale del tessuto e di fibrosi polmonare, con indicatori di attivazione endoteliale, sebbene le direzioni delle associazioni non fossero sempre come atteso ^[18].

Esposizione all'ambiente di lavoro e metodi di misurazione

L'esposizione occupazionale a particolato contenente CNT/CNF è potenzialmente possibile lungo tutto il ciclo di vita dei materiali ^[19]. Il rilascio di strutture fibrose può avvenire sia durante processi sperimentali in strutture di ricerca e sviluppo (R&D), che durante eventi accidentali e durante i processi di produzione ed utilizzazione. In linee di produzione chiuse, l'emissione e l'esposizione possono verificarsi solo dopo l'apertura del reattore, per la raccolta di campioni di prova o in caso di perdite o sversamenti. La frammentazione, l'abrasione di prodotti nanotecnologici e altre attività (riciclo e trattamento dei rifiuti) rappresentano altri potenziali scenari. Va considerato che nell'atmosfera degli ambienti di lavoro i CNT/F sono presenti principalmente come aggregati di dimensioni micrometriche e raramente come fibre singole ^[20]. La maggior parte delle misurazioni dell'esposizione in diversi luoghi di lavoro in cui vengono prodotti o utilizzati CNT sono state le misure tradizionali delle polveri, in cui è stata determinata la concentrazione in massa. I livelli misurati sono nell'ordine di decine di mg/m³, ma sono state segnalate concentrazioni più elevate in alcune tipologie di attività (Tabella I, modificata da ^[19]). I campionamenti di CNT sono stati effettuati con filtri a cassetta con filtro al quarzo da analizzare successivamente mediante analisi termo-ottica con un rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID) o con filtri MCE per l'analisi in microscopia elettronica a trasmissione per garantire la specificità. I risultati di questo tipo di misurazione sono incerti, poiché il metodo non misura in modo specifico i CNT, ma include anche altri particolati presenti nell'aria. Perché le misure siano valide, occorre quindi distinguere i CNT da altri particolati costituenti il background ambientale. Le misurazioni sono state effettuate su brevi periodi e su un numero limitato di operazioni/situazioni di esposizione. Inoltre, sono stati utilizzati diversi tipi di apparecchiature di campionamento, rendendo difficile il confronto dei risultati. Una metrica più specifica è rappresentata dalla concentrazione di massa specifica chimica del C totale e C elementare (CE), come specificato dal metodo NIOSH 5040 ^[21] per stabilire il REL ^[22]. Sebbene il conteggio delle strutture contenenti CNT/F in microscopia elettronica rappresenti un metodo sufficientemente selettivo e sensibile per la quantificazione dell'esposizione, è prematuro proporre valori medi e range, a causa di importanti variazioni nei protocolli di conteggio e l'eterogeneità del materiale campionato. La tabella I riporta i risultati della valutazione dell'esposizione a CNT/CNF in alcune operazioni lavorative, distinte in base alla metrica adottata.

Materiale	Attività	Campione	Range di esposizione	Operazioni che generano emissioni
Carbonio totale ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)				
CNF	R&D lab	area	15-1094	taglio a umido del composito
		PBZ	64-1094	taglio a umido del composito
	Industria	area	31-1839	essiccazione
Carbonio elementare ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)				
CNF	R&D lab	area	ND-1900	taglio a umido all'interno della cabina ventilata
		PBZ	ND-1000	taglio a umido senza controlli
	Industria	area	ND-476	miscelazione in locale ventilato a pressione negativa
		PBZ	ND-7.54	pesatura, miscelazione e sonicazione
		area (f. respirabile)	11.3-13	sintesi in reattore (CVD)
		PBZ (f. respirabile)	27.3-80	sintesi in reattore (CV)
MWCNT	R&D lab	area	<i>Non misurata</i>	<i>Non disponibile</i>
		PBZ	<i>Non misurata</i>	<i>Non disponibile</i>
	Industria (produttore) PBZ	area	ND-470	pulizia di depositi senza controllo
		ND-7.4	produzione mediante scarica ad arco	
	Industria (produttore) PBZ	area	ND-1.89	miscelazione in cabina e impiego di DPI
		ND-7.86	miscelazione in cabina e impiego di DPI	
SWCNT	Industria	area	ND-39	carico containers contenenti CNTs
		PBZ	ND-38	raccolta dei CNTs dal reattore

Materiale	Attività	Campione	Range di esposizione	Operazioni che generano emissioni
	PBZ (f. respirabile)	area (f. respirabile)	media= 0.26	tutte le operazioni eseguite durante la produzione
		media= 0.05	tutte le operazioni eseguite durante la produzione	
<i>CNT/NCF (strutture/cm3)</i>				
CNF	R&D lab	PBZ	<i>Non misurata</i>	<i>Non disponibile</i>
	Industria	area	0.003-0.295	trasferimento di CNF
		PBZ	0.07-1.16	trasferimento di CNF
MWCNT	R&D lab	area	ND-172.9	miscelazione di CNTs in assenza di controlli
		PBZ	ND-193.6	miscelazione di CNTs in assenza di controlli
	Industria	area	ND-11	setacciatura, versamento e pesatura
		PBZ	ND-2	tutte le operazioni di produzione con scarica ad arco
SWCNT	Industria	area	0.007-0.012	sintesi, recupero, pulizia del reattore
		PBZ	0.003-0.01	sintesi, recupero, pulizia del reattore

Tabella I. Risultati della valutazione dell'esposizione a CNT/CNF in alcune attività lavorative e relative metriche (Modificato da: Guseva Canu et al., 2016, ^[19]). PBZ= personal breathing zone.

Standard igienici per i luoghi di lavoro

Al fine di procedere alla valutazione del rischio nei luoghi di lavoro e nell'ambiente, abbiamo necessità di dati sui livelli accettabili di esposizione ai CNT, ma il loro sviluppo ha incontrato varie difficoltà, tra cui la varietà di tipi di CNT, la complessità della loro identificazione e valutazione quantitativa nell'ambiente, approcci metodologici inadeguati e dati insufficienti sugli effetti biologici. Un modo per determinare livelli di esposizione sicuri (approximate safe exposure levels - ASEL) consiste nell'extrapolare i risultati di esperimenti su animali basati sull'uso dell'OAEL e l'istituzione di fattori di incertezza. La Nanocyl Company (Belgio), dopo

aver valutato il rischio e ottenuto un fattore di incertezza di 40 sulla base delle più basse concentrazioni di effetti avversi osservate negli esperimenti di inalazione subcronica (90 giorni) su ratti, ha suggerito una concentrazione media ponderata per 8 ore per i propri MWCNT pari a $2,5 \mu\text{g}/\text{m}^3$. La Bayer ha suggerito un ASEL di $2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ed un TLV di $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ per i Baytubes (TM). L'Istituto nazionale Giapponese di Scienza e Tecnologia Industriale ha proposto un livello di esposizione accettabile di $30 \mu\text{g}/\text{m}^3$ per tutti i tipi di CNT [2]. Nel 2010, il NIOSH, dopo aver eseguito una valutazione quantitativa del rischio sulla base dei precedenti studi *in vivo*, ha suggerito che la concentrazione media di CNT durante il turno di lavoro ($0,2-2 \mu\text{g}/\text{m}^3$) si associa ad un rischio del 10% di malattie respiratorie (fibrosi). Dopo aver proposto un limite REL di $7 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (come CE), dal 2013 il NIOSH ha stabilito un REL pari a $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ per tutti i tipi di CNT. Il British Standards Institution ha suggerito un livello massimo consentito di $0,01 \text{ fibre}/\text{m}^3$.

Criticità nella valutazione del rischio da CNT/F

La valutazione del rischio per i CNT/F è resa difficoltosa dalla mancanza di conoscenze a diversi livelli: 1) manca un consenso su quale metrica sia più appropriata per effetti sulla salute; 2) I CNT possono essere presenti in un gran numero di varianti che possono avere diverso grado di tossicità; 3) I dati tossicologici sono spesso insufficienti, ma indicano che esiste un rischio di reazione infiammatoria e di fibrosi polmonare in seguito all'inalazione a dosi relativamente basse, oltre che di effetti genotossici; 4) I livelli di esposizione a CNT sono caratterizzati in modo incompleto. Le misurazioni dell'esposizione sono limitate alle fasi iniziali del ciclo di vita e coprono un insieme limitato di compiti e mansioni. La fase di utilizzo è quasi interamente caratterizzata da studi sperimentali ed attività di fine vita mediante studi di modellizzazione. Questi studi si sono concentrati sul rilascio di CNT/F e sull'esposizione ambientale risultante piuttosto che sull'esposizione professionale individuale. I dati esistenti appaiono pertanto insufficienti per quantificare le quantità di CNT/CNF prodotti o utilizzati, o per quantificare l'esposizione. La mancanza di prassi convalidate preclude l'armonizzazione nelle strategie di misurazione, l'analisi e il reporting dei dati di misurazione. Ciò ostacola l'esposizione e le valutazioni del rischio. Gli approcci basati sulla massa sono un buon punto di partenza per valutare il rischio di esposizione, ma altri parametri appaiono più rilevanti; per esempio, la concentrazione di fibre o strutture CNT/F.

Conclusioni

I CNT sono attualmente al centro di un dibattito sul loro tossicità e cancerogenicità e, nonostante siano state pubblicate numerose recensioni, deve ancora essere raggiunto un consenso, dal momento che diversi studi evidenziano risultati conflittuali, non soltanto a causa della mancanza di protocolli standardizzati, ma a causa della variabilità stessa dei CNT impiegati. Questo indica in maniera inequivocabile che le risposte biologiche ai CNT sono modulate dalle loro proprietà fisico-chimiche. Le discrepanze nella definizione del profilo tossicologico dei CNT dovute alla mancanza di metodologie standardizzate di valutazione e la variabilità delle proprietà dei campioni utilizzati nei test tossicologici rendono difficoltosa una valutazione del rischio. La pericolosità di CNT corti ($< 4-5 \mu\text{m}$), monodispersi e funzionalizzati è senz'altro diversa da quella dei CNT utilizzati per applicazioni industriali. Le conoscenze attuali sugli effetti sulla salute o sui livelli di esposizione durante la manipolazione dei CNT sono in aumento e miglioramento qualitativo; in attesa di una miglior caratterizzazione del rischio dovrebbe

quindi prevalere un principio di precauzione nella produzione e nell'uso di CNT/CNF e nella lavorazione di materiali contenenti CNT/CNF.

BIBLIOGRAFIA

1. Ghiazza M, Vietti E, Fenoglio I. Carbon nanotubes: properties, applications, and toxicity. Health and environmental safety of nanomaterials., Woodhead Publishing Limited 147-194, 2014.
2. Fatkhutdinova LM, Khaliullin TO, Shvedova AA. Carbon Nanotubes Exposure Risk Assessment: From Toxicology to Epidemiologic Studies (Overview of the Current Problem). *Nanotechnol Russ* 10(5): 501–509, 2015.
3. Jacobs MM, Ellenbecker M, Hoppin P, et al. Precarious Promise: A Case Study of Engineered Carbon Nanotubes. Lowell Center for Sustainable Production, University of Massachusetts Lowell, 2014.
4. Service RF. Nanotubes: the next asbestos? *Science*, 281(5379):941-942, 1998.
5. Takagi A, Hirose A, Nishimura T, et al. Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-walled carbon nanotubes. *J Toxicol Sci* 33(1):105-116, 2008.
6. Muller J, Delos M, Panin N, et al. Absence of carcinogenic response to multiwall carbon nanotubes in a 2-year bioassay in the peritoneal cavity of the rat. *Toxicol Sci* 110:442-448, 2009.
7. Poland C, Duffin R, Kinloch I, et al. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nat Nanotechnol* 3:423-428, 2008.
8. Murphy F, Poland C, Duffin R, et al. Length-dependent retention of carbon nanotubes in the pleural space of mice initiates sustained inflammation and progressive fibrosis on the parietal pleura. *Am J Pathol* 178(6):2587–2600, 2011.
9. Shvedova AA, Yanamala N, Kisin ER, et al. Long-term effects of carbon containing engineered nanomaterials and asbestos in the lung: one year post-exposure comparisons. *Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 306(2):170–182, 2014.
10. Grosse Y, Loomis D, Guyton KZ, et al. Carcinogenicity of fluoro-edenite, silicon carbide fibres and whiskers, and carbon nanotubes. *Lancet Oncol* 15(13):1427, 2014.
11. Fenoglio I, Aldieri E, Gazzano E, et al. Thickness of multiwalled carbon nanotubes affects their lung toxicity. *Chem Res Toxicol* 13;25(1):74-82, 2012. doi: 10.1021/tx200255h.
12. Allegri M, Perivoliotis DK, Bianchi MG, et al. Toxicity determinants of multi-walled carbon nanotubes: the relationship between functionalization and agglomeration. *Toxicology reports* 3, 230-243, 2016.
13. Shvedova AA, Kapralov AA, Feng WH, et al. Impaired clearance and enhanced pulmonary inflammatory/fibrotic response to carbon nanotubes in myeloperoxidase- deficient mice. *PLoS One*, 7 (3):0030923, 2012.
14. Aldieri E, Fenoglio I, Cesano F, et al. The role of iron impurities in the toxic effects exerted by short multiwalled carbon nanotubes in murine alveolar macrophages. *J Toxicol Environ Health A*. 76(18):1056-71, 2013.
15. Shvedova AA, Yanamala N, Kisin ER, et al. Integrated analysis of dysregulated ncRNA and mRNA expression profiles in humans exposed to Carbon Nanotubes. *PlosOne*, 11(3): e0150628, 2016.
16. Fatkhutdinova LM, Khaliullin TO, Vasil'yeva OL, et al. Fibrosis biomarkers in workers exposed to MWCNTs. *Toxicol Appl Pharmacol*, 299:125-131, 2015.

17. Vlaanderen J, Pronk A, Rothman N, et al. RA cross-sectional study of changes in markers of immunological effects and lung health due to exposure to multi-walled carbon nanotubes, *Nanotoxicology*, 11:3, 395-404, 2017.
18. Beard JD, Erdely A, Dahm MM. Carbon nanotube and nanofiber exposure and sputum and blood biomarkers of early effect among U.S. workers. *Environ Int* 116:214-228, 2018.
19. Guseva Canu I, Bateson TF, Bouvard V, et al. Human exposure to carbonbased fibrous nanomaterials: A review. *Int J Hyg Environ Health*, 219(2):166-75, 2016.
20. Dahm MM, Evans DE, Schubauer-Berigan MK, et al. Occupational exposure assessment in carbon nanotube and nanofiber primary and secondary manufacturers: mobile direct-reading sampling. *Ann Occup Hyg* 57:328-344, 2013.
21. Manual of analytical methods. Method 5040 diesel particulate matter(as elemental carbon). In: Schlecht, P.C., O'Connor, P.F. (Eds.), *NIOSH Method of Analytical Methods*. 4th ed., NIOSH, Cincinnati, 2016.
22. NIOSH Current Intelligence Bulletin 65: Occupational Exposure to Carbon Nanotubes and Nanofibers. US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control, National Institute for Occupational Safety and Health. DHHS (NIOSH), Cincinnati, OH, 2013.