

Esposizione a silice e rischio di neoplasia polmonare: consensus document della Società Italiana di Medicina del Lavoro ed Igiene Industriale (SIMLII)

Premessa

In un Congresso tenuto a Firenze nel Settembre 2005, Enrico Pira ha partecipato, quale rappresentante della a ciò delegato dall'allora Direttivo nazionale di SIMLII, ad una Tavola Rotonda sulle prove epidemiologiche relative agli effetti dannosi sulla salute a seguito di esposizione a silice (24). Nello stesso anno, Giorgio Piolatto ha presentato al Congresso Nazionale della SIMLII di Parma (23) il documento di lavoro elaborato dalla SIMLII sullo stesso argomento. Successivamente si sono discusse anche nel nostro direttivo le diverse posizioni che su questa complessa materia si sono registrate sia a livello nazionale che internazionale (Vedi relativi verbali sul sito della SIMLII). Il direttivo nazionale SIMLII partendo dall'aggiornamento presentato dal gruppo di lavoro e in quanto tale pubblicato sul numero monografico in lingua inglese da "La Medicina del Lavoro" in datalo ha discusso ed nella forma di seguito riportata.

Il Consiglio Direttivo ha approvato il documento di cui sopra in data all'.....

Ringrazia i Prof G Piolatto, E Pira, PA Bertazzi, P. Carta che hanno fatto parte in e per tempi diversi del gruppo di lavoro.

Parole-chiave: silice, silicosi, cancro polmonare

Background

La decisione, in qualche modo controversa, presa nel 1997 dalla Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) di classificare la frazione respirabile della silice cristallina (RCS) come un carcinogeno di gruppo 1 per l'Uomo (12), ha dato seguito a numerosi studi (indagini epidemiologiche in diversi ambiti industriali, meta-analisi e reviews) giunti però a conclusioni non univoche e talora contraddittorie (alcuni studi indicano un aumentato rischio di neoplasia polmonare a seguito di esposizione alla silice, altri restringono tale associazione agli individui con silicosi e altri ancora non evidenziano alcuna associazione con la silice).

Questa situazione, determinata dal frequente conflitto tra consolidate posizioni e nuove acquisizioni scientifiche, non è insolita in medicina, ma diventa di estrema rilevanza allorché agenzie regolatorie o analoghe istituzioni sono tenute ad emettere opinioni "ufficiali" e raccomandazioni che vengono utilizzate dai governi per la promulgazione di decreti, direttive o linee-guida.

Questa revisione, in accordo con le norme editoriali, non analizza i risultati della sperimentazione animale, né si propone di esaminare in dettaglio gli studi epidemiologici pubblicati, ma vuole riportare i più accreditati lavori disponibili in letteratura, pubblicati sotto forma di studi policentrici, meta-analisi, reviews e commenti, sullo stato attuale delle conoscenze della relazione silice-silicosi-cancro.

Prove Epidemiologiche

Lo studio multicentrico IARC (27) rappresenta, con le sue 10 coorti e i circa 66.000 lavoratori coinvolti (per lo più minatori cinesi e ceramisti), "il più ampio set di dati esistenti che analizza in termini di esposizione-risposta il rapporto silice/neoplasia polmonare". I risultati sembrerebbero "supportare la conclusione della IARC che la silice cristallina inalata in ambito occupazionale sia un carcinogeno per l'Uomo". Noi presumiamo che lo scopo degli autori fosse quello di eseguire una ricerca che, per le notevoli dimensioni della coorte globale e per l'accuratezza della stima delle pregresse esposizioni, potesse essere considerata uno studio definitivo, atto a porre fine al dibattito. Questa opinione è condivisa da un altro autore (14) che ha scritto che "il cancro del polmone deve ora essere definitivamente aggiunto all'elenco degli effetti tossici della silice". Tuttavia, lo studio

non è esente da limiti, quali la inclusione di soggetti con silicosi “che se fossero stati esclusi dall’analisi dei dati potrebbero aver determinato una minore stima del rischi” (3). C’è anche una notevole eterogeneità tra le varie coorti nei risultati dell’analisi interna, dove non sono adeguatamente esplicitati i criteri di inclusione ed esclusione di ampie componenti della coorte globale [es. i minatori di superficie sono stati considerati non esposti, essendo stato loro attribuito un livello minimo di esposizione pari a 0.01 mg/m³ (!?)]. Infine, noi condividiamo l’opinione di Brown e Rushton (3), i quali riportano che “la labile relazione esposizione-risposta è di assai difficile interpretazione”.

Inoltre, uno studio caso-controllo (4) articolato in 3 coorti di minatori e ceramisti cinesi, in cui sono stati considerati gli effetti della co-esposizione ad arsenico, fumo di sigaretta, idrocarburi policiclici aromatici e radon non “ha dato alcuna prova che l’esposizione a silice provochi cancro del polmone in assenza di fattori di confondimento”.

Malgrado queste perplessità, il gruppo di lavoro IARC ha ribadito (28) la carcinogenicità della polvere di silice cristallina sulla sola base dello studio citato (27). Il meccanismo d’azione ipotizzato è stato “una riduzione della capacità di clearance, che determina un’attivazione dei macrofagi e un persistente processo infiammatorio”, che, per inciso, è il meccanismo all’origine della silicosi e non del cancro del polmone.

Kurihara et al (15) hanno selezionato 30 studi (17 studi di coorte e 13 caso-controllo) pubblicati tra il 1966 ed il 2001, al fine di valutare il rischio di cancro del polmone in soggetti affetti o non affetti da silicosi. Il rischio relativo (RR) di tutti i soggetti analizzati è risultato pari a 1.32 (95% CI 1.23-1.41), ma analizzando separatamente i soggetti con silicosi (16 studi) e senza silicosi (8 studi), nei primi era pari a 2.37 (95% CI 1.98-2.84) mentre nei secondi non è stato rilevato un aumento del rischio (RR 0.96, 95% CI 0.81-1.15). Le conclusioni dello studio sono state che la silice può indurre il cancro del polmone per via indiretta, probabilmente attraverso la silicosi.

Pelucchi et al (22) hanno eseguito una revisione sistematica degli studi epidemiologici pubblicati dopo la citata monografia IARC (12): sono stati presi in esame 28 studi di coorte, 15 studi caso-controllo e 2 studi di rapporto proporzionale di mortalità (RPM). Gli RR cumulativi di cancro del polmone, calcolati mediante l’uso di modelli di effetto random, erano 1.34 (95% CI 1.25-1.45) per gli studi di coorte e 1.41 (95% CI 1.18-1.67) per gli studi caso-controllo. Dati diversi erano però rilevati analizzando differenti sottogruppi di studi e di pazienti. Infatti l’RR era 1.69 (95% CI 1.32-2.16) negli studi di coorte e 3.27 (95% CI 1.32-8.2) negli studi caso-controllo riguardanti i soggetti con silicosi; 1.25 (95% CI 1.18-1.33) negli studi di coorte e 1.41 (95% CI 1.18-1.70) negli studi

caso-controllo riguardanti i soggetti di cui non era certa la presenza o assenza di silicosi; e 1.19 (95% CI 0.87-1.57) negli studi di coorte e 0.97 (95% CI 0.68-1.38) negli studi caso-controllo riguardanti i soggetti con assenza di silicosi.

Le conclusioni dello studio erano che vi è una consistente associazione con il cancro del polmone nei soggetti con silicosi, mentre lo scarso numero di dati (due studi soltanto) non permette conclusioni definitive per i soggetti senza silicosi. Di più difficile interpretazione sono i dati riguardanti i lavoratori senza diagnosi certa di silicosi (che tra l'altro rappresentano la maggioranza dei soggetti inclusi nella meta-analisi), per cui non è possibile escludere sulla base di questa meta-analisi che la silice possa di per sé incrementare il rischio di cancro del polmone in assenza di silicosi. Gli autori hanno inoltre evidenziato molti limiti degli studi presi in considerazione che possono aver influenzato i risultati (in particolare: l'uso di dati locali di riferimento invece di dati nazionali, l'inclusione dell'abitudine al fumo, la possibilità di stratificare i dati in base alla presenza di silicosi, la co-esposizione ad altri carcinogeni, la pregressa esposizione, la correlazione dose-risposta e, in alcuni casi, anche l'appropriata interpretazione dei dati da parte degli autori). Alcuni di questi limiti, in particolare la pregressa esposizione, sono stati presi in considerazione anche da Brown e Rushton (3).

Due studi sono stati successivamente pubblicati da Lacasse et al (16,17). Il primo (16) era una meta analisi di 31 studi (27 studi di coorte e 4 studi caso-controllo) focalizzata sul rapporto silicosi-cancro ed ha evidenziato una SMR per il cancro del polmone pari a 1.60 (95% CI 1.33-1.93), dopo aggiustamento per il fumo. Gli autori hanno concluso che "...c'è tuttavia evidenza, dai dati limitati ai non fumatori e da una "analisi dose-risposta, che la silicosi e il cancro del polmone siano associati". Una ulteriore puntualizzazione era che "questa associazione non implica necessariamente che la silice sia un carcinogeno polmonare".

Il secondo studio (17) giunge a differenti conclusioni ed è di più difficile interpretazione. La meta analisi comprendeva 10 studi (4 studi di coorte e 6 studi caso-controllo che soddisfacevano i criteri di inclusione rappresentati dalla presenza di analisi dose-risposta e di aggiustamento per il fumo). Sulla base di un aumento di rischio di cancro del polmone con l'aumento dell'esposizione cumulativa alla silice gli autori concludono che "La silice è un carcinogeno polmonare. L'aumento del rischio si appalesa quando l'esposizione cumulativa alla silice supera abbondantemente i limiti di esposizione raccomandati per il lungo termine".

Il problema (nota dell'autore) è: questo limite di esposizione cumulativo è anche in grado di indurre silicosi? Questo dubbio appare più che lecito sulla base della conclusione finale degli autori che

affermano “l’interpretazione...è peraltro limitata... dall’effetto di confondimento della silicosi, che non è stato possibile valutare compiutamente”. Critiche al lavoro sono state espresse anche da Morfeld (19) circa la scelta dei livelli di esposizione di riferimento, il livello con RR di 1 [per maggiori informazioni vedi il testo completo e la replica di Lakhali e Lacasse (18)].

Nelle Linee Guida di Pratica Clinica Basata sull’Evidenza dell’ American College of Chest Physicians, viene semplicemente affermato (1) “L’evidenza sull’esposizione alla silice, in assenza di valutazione della presenza di silicosi, è meno chiara. Nel 1997, la IARC ha classificato la silice cristallina come un carcinogeno per l’uomo; tuttavia ci sono dubbi da parte di alcuni circa la sua carcinogenicità e sul ruolo dell’esposizione a silice rispetto a quello della fibrosi nei soggetti con silicosi.”

Lo studio di Erren et al (8) ha dato risultati in apparenza simili (sebbene non in accordo) con quelli di Pelucchi et al (22). Infatti, nell’analisi dei soggetti con silicosi (38 studi considerati al 1/2007) la media degli RR era 2.1 (95% CI 2.0-2.3 con modello ad effetto fisso 1.9-2.3 con modello ad effetto random). La carenza di studi su individui esposti a silice senza silicosi è stata rimarcata anche da questi autori (solo 3 studi avevano dati che permettevano l’aggiustamento per il fumo). In questo caso la stima del rischio era pari ad 1 (95% CI 0.8-1.3). Gli autori suggeriscono che “la silicosi potrebbe essere un biomarcatore di suscettibilità” e che sono necessarie ulteriori ricerche “con informazioni scaglionate nel tempo sulla silicosi e sulla polvere di silice” così come “relativamente poco usate, ma potenti procedure statistiche quali la stima-G, atte a districare la complessità dei dati osservazionali” e “a rispondere all’importante domanda di salute pubblica: la silicosi è una condizione necessaria per aumentare il rischio di cancro del polmone associato a silice?”

In una approfondita revisione Brown (2) ha commentato che “se la silicosi fosse il passo necessario allo sviluppo del cancro del polmone, il rafforzamento degli standard attualmente in vigore per la silice proteggerebbe anche dal cancro al polmone. In alternativa, la suggerita diretta associazione silice-cancro polmonare implica una revisione contestuale degli standard regolatori”. In conclusione “Sono necessarie ulteriori ricerche per comprendere le complesse interazioni che determinano lo sviluppo della neoplasia polmonare nei lavoratori esposti alla silice” .

Una contemporanea pubblicazione di Brown e Rushton (3), commissionata da EUROSIL per dare risposta ad una serie di quesiti aperti sul tema, consta di 172 pagine che includono il maggior numero di studi rispetto ad altre revisioni ed è finalizzata non solo a valutare il rapporto silice-cancro del polmone, ma anche quello con BPCO ed NMRD, silicosi, altre neoplasie e patologia autoimmune.

Per quel che riguarda il cancro del polmone, è difficile riassumere le complesse conclusioni degli autori, anche perché noi dissentiamo dalla loro interpretazione dei risultati di alcuni studi come quello di Kurihara (15), Chen (4) ed in particolare di Pelucchi (22).

Riteniamo tuttavia che alcuni punti siano correttamente trattati, come ad esempio la comune affermazione che “pochi studi hanno investigato il rischio silice-cancro del polmone in assenza di silicosi”. In linea generale, gli autori supportano l’evidenza “che l’esposizione a dosi crescenti di silice cristallina...” aumenta il rischio di cancro del polmone, ma “La forma e l’entità della relazione esposizione-risposta dipende dall’industria e dal modello statistico applicato ed è particolarmente oscura nel range di bassa esposizione fino a 0.15 mg/m³ per 40 anni”.

Una puntualizzazione finale (comune ad altri studi) era “L’effetto del fumo e la presenza di silicosi e le loro interazioni sulla correlazione cancro polmonare-esposizione a silice cristallina rimane da chiarire e ulteriori studi sono necessari per valutare l’esatta natura di tale relazione”.

Il lavoro di Morfeld (20), anche questo commissionato da EUROSIL, riassume l’evidenza epidemiologica attualmente disponibile sul rapporto cancro del polmone-silice-silicosi come base per il principale proposito dello scritto, orientato a fornire per la silice cristallina un “Razionale per la classificazione secondo il regolamento CLP (Classification, labeling and packaging) e nell’ambito del sistema globalmente armonizzato (GHS) di classificazioni ed etichettatura degli agenti chimici” (titolo del lavoro).

La regolamentazione della classificazione ed etichettatura degli agenti chimici (CLP) [Regolamentazione (EC) N. 1272/2008] (7) implementa in Europa il sistema globalmente armonizzato sviluppato con gli auspici delle Nazioni Unite.

Vengono qui riportate solo le considerazioni finali: “Il rischio di cancro del polmone è limitato ai soggetti con pregressa silicosi. E’ accettato che riducendo al minimo il rischio di silicosi si minimizza anche il rischio di cancro del polmone da silice cristallina. Questa osservazione supporta la modalità d’azione suggerita che la silice cristallina provochi il cancro per via indiretta tramite l’infiammazione (5). Un potenziale diretto effetto genotossico può verificarsi solo per livelli di esposizione ben al di sopra di quelli necessari a provocare l’infiammazione. In conclusione, non vi è alcuna necessità di classificare la silice cristallina come carcinogeno se si usa la silicosi come cruciale punto di riferimento per la classificazione”

Alcune azioni intraprese nella Comunità Europea

La Commissione Scientifica per i Livelli di Esposizione Occupazionale (SCOEL) (26) ha pubblicato la sua raccomandazione 5 anni dopo la classificazione IARC della silice cristallina (SCOEL/SUM/94-final, 2003), affermando che “Il principale effetto nell’Uomo dell’inalazione della polvere di silice respirabile è la silicosi. Ci sono sufficienti evidenze per affermare che il rischio relativo di cancro del polmone sia aumentato in persone con silicosi (e apparentemente, non in lavoratori esenti da silicosi esposti alla polvere di silice nelle cave e nell’industria della ceramica). Pertanto, la prevenzione della silicosi riduce anche il rischio di cancro. Poiché non può essere chiaramente identificata una soglia di rischio per la silicosi, qualsiasi riduzione dell’esposizione ridurrà il rischio di silicosi. Ne deriva che un valore limite di esposizione (OEL) dovrebbe essere al di sotto di 0.05 mg/m³”.

Tale opinione e le conseguenti raccomandazioni sono state condivise dal British Health and Safety Executive (HSE) (10).

Sulla base di questo documento la Comunità Europea ha accettato e supportato, sotto la sua egida, la proposta di un accordo tra le parti sociali (Lavoratori e Datori di Lavoro) finalizzato a preparare una linea guida per prevenire l’esposizione a silice cristallina in ambito occupazionale. All’epoca, la CE non ritenne necessario includere la silice cristallina tra le sostanze da valutare per potenziale carcinogenicità.

L’accordo sulla protezione della salute dei lavoratori tramite il buon uso della silice cristallina e dei prodotti che la contengono è stato pubblicato nel 2006 (6).

L’obiettivo principale dell’accordo era quello di proteggere la salute dei lavoratori esposti a silice cristallina respirabile attraverso l’applicazione delle “Buone Pratiche”, come specificato nelle precedenti Direttive. Allegati al documento erano i protocolli per il monitoraggio ambientale e per la sorveglianza sanitaria dei lavoratori. Non veniva fornita alcuna indicazione sulla necessità di classificare la silice cristallina respirabile come un carcinogeno per l’Uomo.

Una ulteriore iniziativa è stata intrapresa nel 2008, quando l’Istituto di Medicina del Lavoro (IOM) di Edinburgo ed i suoi partners sono stati contattati dalla Commissione Europea per eseguire un’analisi socio-economica, sanitaria ed ambientale dei cambiamenti proposti alla Direttiva sui Carcinogeni (111). Il primo obiettivo è di valutare l’impatto dell’introduzione di un sistema per definire gli OEL sulla base di oggettivi criteri di rischio. La silice cristallina respirabile è stata

inclusa tra le sostanze da valutare (Work Packages 6 and 8.1) anche (crediamo) per il gran numero (3.200.000) di lavoratori presumibilmente esposti alla silice nell'Unione Europea.

Sono passati più di 13 anni dalla pubblicazione della monografia della IARC sulla silice (12). Un ulteriore documento della IARC (13), elaborato sulla base anche di studi ed osservazioni successive, nonché di stime di trends quantitativi esposizione-risposta (utili a suggerire un rapporto causale) dovrebbe essere disponibile in breve tempo. Peraltro, questo documento dovrebbe riproporre la conclusione dell'esistenza di una "sufficiente evidenza che il quarzo è cancerogeno", sebbene gli studi considerati non siano ritenuti univocamente e concordemente interpretabili a favore di tale conclusione (9). In particolare l'Autore, nel commentare le conclusioni IARC fondate sui 10 "maggiori" studi su silice cristallina e cancro polmonare, propone la metanalisi di 18 studi per complessivi 2000 casi di tumore (contro i 1000 da IARC). La conclusione è che "il peso dell'evidenza derivante dall'epidemiologia occupazionale non supporta un'associazione causale tra tumore polmonare e esposizione a silice, contrariamente a quanto concluso da IARC praticamente sugli stessi dati"

Tali conclusioni si fondano sull'osservazione tra l'altro di: 4 studi con un RR > 2;3 tra 1.5 e 2;6 tra 1 ed 1.5;5< ad 1; 3 studi che mostrano una relazione dose risposta chiaramente positiva; 3 suggestiva; 12 nessuna, di cui 9 non rilevanti o negative, in ogni studio lo slope delle dosi risposte è sempre negativo per le esposizioni più elevate" (9).

Pertanto, nonostante il numero considerevole di lavori, anche recenti, pubblicati sul problema dell'associazione silice-cancro del polmone. A nostro avviso, poco è cambiato sulla questione della intrinseca carcinogenicità della silice, per contro l'associazione silicosi/cancro del polmone sembra definitivamente confermata (25). E' comunque opinione della maggior parte dei ricercatori che siano necessari ulteriori studi di buona qualità su questo argomento.

Riteniamo tuttavia improbabile che l'epidemiologia tradizionale possa dare in futuro una solida base per risolvere il problema, dato che anche le più sofisticate procedure statistiche non possono bilanciare la scarsa qualità dei dati, specie quelli riguardanti la valutazione dell'esposizione, e la difficoltà di eseguire analisi separate per non silicotici e "veri silicotici."

Un promettente approccio è stato suggerito da Cocco et al (5), allorchè affermano che "I futuri studi sul rischio di cancro del polmone nei lavoratori esposti a polvere contenente silice dovrebbe considerare la quantificazione del rilascio di ROS e TNF-alpha indotto da campioni di polveri del posto di lavoro quale parametro intermedio per predire il rischio di cancro del polmone più

accuratamente delle concentrazioni di silice, permettendo così di indirizzare più efficacemente l'azione di prevenzione".

Si tratta indubbiamente di un approccio innovativo; ma come applicarlo a dati riguardanti le pregresse esposizioni?

Riteniamo che allo stato attuale delle conoscenze, l'attenzione dovrebbe essere focalizzata sui seguenti aspetti:

- Sulla base dell'attuale orientamento della UE sull'argomento non c'è alcuna necessità di etichettare la silice cristallina respirabile con la dicitura H350i (ex R49-carcinogeno per inalazione).
- Incrementare la compliance con gli attuali OEL attraverso uno stretto controllo degli ambienti industriali di primaria rilevanza. Un ulteriore abbassamento dei limiti espositivi è in linea con il principio che ridurre al minimo il rischio di silicosi implica ridurre al minimo il rischio di cancro. Infatti SCOEL (26) ha proposto un OEL al di sotto di 0.05 mg/m³. L'American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) ha già abbassato il suo TLV a 0.025 mg/m³. Tuttavia, sebbene una ulteriore riduzione dei limiti sia intuitivamente più protettiva, essa comporterebbe un notevole incremento della possibilità di errore delle misurazioni (anche in rapporto ai metodi di campionamento dell'aria e delle successive analisi strumentali).
- L'implementazione della sorveglianza sanitaria dovrebbe essere inclusa nelle future linee-guida specifiche per il rischio legato all'esposizione a silice. Come prima indicazione suggeriamo che lavoratori con segni radiologici anche iniziali di silicosi, oltre a sospendere l'abitudine al fumo di tabacco se fumatori, siano attentamente valutati per il rischio oncologico globale al fine dell'immissione in un eventuale programma di monitoraggio nel tempo con TC spirale per la precoce diagnosi di cancro del polmone (21, 29)
- A livello individuale sembra ragionevole, per ragioni medico-legali, che solo il cancro del polmone con inequivocabile diagnosi di silicosi sia riconosciuto come dipendente da causa lavorativa.

BIBLIOGRAFIA

1. Alberg AJ, Ford IG, Samet IM: Epidemiology of Lung Cancer. ACCP Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (2nd Ed). Chest 2007;132:29S-55S
2. Brown T: Silica exposure, smoking, silicosis and lung cancer-complex interactions. Occup Med 2009;59:89-95
3. Brown T, Rushton L: A review of the literature of the health effects of occupational exposure to crystalline silica: silicosis, cancer and autoimmune diseases. In: Sponsor: EUROSIL. European Association of Industrial Silica Producers, ed. Brussels 2009:1-178
4. Chen W, Bochmann F, Sun Y: Effects of work related confounders on the associations between silica exposure and lung cancer: a nested case-control study among Chinese miners and pottery workers. Int Arch Occup Environ Health 2007;80:320-6
5. Cocco P, Dosemeci M, Rice C: Lung cancer among silica-exposed workers: the quest for truth between chance and necessity. Med Lav. 2007;98:3-17
6. EC Official Journal (OJ2006/C279/02): Agreement on worker's Health Protection Through the Good Handling and Use of Crystalline Silica and Products Containing it
7. ECHA Guidance to the CLP Regulation: Guidance to regulation (EC) N. 1272/2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures. 25 August 2009. IHCP: DG Joint Research Centre, European Commission. 2009
8. Erren TC, Glende CB, Morfeld P, Piekarski C: Is exposure to silica associated with lung cancer in the absence of silicosis? A meta-analytical approach to an important public health question. Int Arch Occup Environ Health. 2009;82:997-1004
9. Gamble JF: Crystalline silica and lung cancer: a critical review of the occupational epidemiology literature of exposure-response studies testing this hypothesis. Crit Rev Toxicol. 2011; 41 (5): 404-465.
10. HSE: Respirable crystalline silica-phase 2. In: Hazard Assessment, ed. London : Health & Safety Executive. 2002:1-66
11. Institute of Occupational Medicine (IOM). Edinburgh. Research Proposal: PP-02565. September 17,2008. An analysis at EU-level of health, socio-economics and environmental

aspects in connection with possible amendments to Directive 2004/37/EC on the protection of workers from the risks related to exposure to carcinogens and mutagens at work

12. International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 68, Silica, some silicates, coal dust and para-aramid fibrils. Lyon: IARC, 1997
13. International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 100C, Metals, Particles and Fibres. Lyon: IARC, 2009 (citata da : Gamble GF).
14. Kriebel D, Rosenberg BJ: Lung cancer: another good reason to control silica. *Cancer Causes Control* 2001;12:785-7
15. Kurihara N, Wada O: Silicosis and smoking strongly increase lung cancer risk in silica-exposed workers. *Ind Health*. 2004;42:303-14
16. Lacasse Y, Martin S, Simard S, Desmeules M: Meta-analysis of silicosis and lung cancer. *Scand J Work Environ Health* 2005;31:450-8.
17. Lacasse Y, Martin S, Gagné D, Lakhali L: Dose-response meta-analysis of silica and lung cancer. *Cancer Causes Control* 2009;20:925-33
18. Lakhali L, Lacasse Y: Reply to: Dr. Peter Morfeld's Letter to the Editor (Manuscript Number: CACO2009): "Comment on Lacasse Y, Martin S, Gagne D, Lakhali L (2009) Dose-response meta-analysis of silica and lung cancer. *Cancer Causes and Control*; [e-pub ahead of print] doi: 10.1007/s10552-009-9296-0" *Cancer Causes Control* 2009;20:1537-8
19. Morfeld P: "Comment on: Lacasse Y, Martin S, Gagne D, Lakhali L (2009) Dose-response meta-analysis of silica and lung cancer. *Cancer Causes Control* (e-published ahead of print) doi:10.1007/s10552-009-9296-0" *Cancer Causes Control* 2009;20:1535-6
20. Morfeld P: Respirable Crystalline Silica: Rationale For Classification According to the CLP* Regulation and within the Framework of the Globally Harmonised System (GHS) of Classification and Labelling of Chemicals. 2010. Available at: http://www.crystallinesilica.eu/fileadmin/crystallinesilica/documents/Classification_CLP_GHS_RCS_Morfeld_27April2010_final.pdf
21. National Cancer Institute: Lung cancer trial results show mortality benefit with low-dose CT. 2010. Available at:

<http://www.cancer.gov/newscenter/pressreleases/NLSTresultsRelease>

22. Pelucchi C, Pira E, Piolatto G et al: Occupational silica exposure and lung cancer risk: a review of epidemiological studies 1996-2005. *Ann Oncol.* 2006;17:1039-50
23. Piolatto G: Silice e cancro: documento di lavoro della Società Italiana di Medicina del Lavoro e Igiene Industriale. In: Atti del 68° Congresso della SIMLII. Parma 5-8 Ottobre 2005. Monte Università Parma Editore. 2005;pp.56-52
24. Pira E: Intervento nella Tavola Rotonda: Attualità per le evidenze epidemiologiche. In: Atti del Convegno: Silice libera cristallina nei luoghi di lavoro. Verso la predisposizione di Linee Guida per la prevenzione. Firenze 8 Settembre
25. Scarselli A, Binazzi A, Forastiere F, et al: Industry and job-specific mortality after occupational exposure to silica dust. *Occup Med.* 2011 2005;pp. 86-92 (online)
26. SCOEL: Recommendation from scientific committee on occupational exposure limits for silica, crystalline (respirable dust) SCOEL/SUM/94-final. 2002
27. Steenland K, Mannetje A, Boffetta P et al: Pooled exposure-response analyses and risk assessment for lung cancer in 10 cohorts of silica-exposed workers: an IARC multicentre study. *Cancer Causes Control.* 2001;12:773-84
28. Straif K, Benbrahim-Tallaa L, Baan R et al: A review of human carcinogens - part C: metals, arsenic, dusts, and fibres. *Lancet Oncol.* 2009;10:453-4
29. The National Lung Screening Trial Research Team: Reduced Lung-Cancer Mortality with Low-Dose Computed Tomographic Screening. *N Engl J Med.* 2011 Jun 29.

Le SRC di natura non radicalica, invece, possiedono una struttura molecolare in cui tutti gli elettroni sono disposti in coppie, generalmente impegnati a formare legami di tipo covalente tra i vari atomi costituenti (Iorio, 2007).

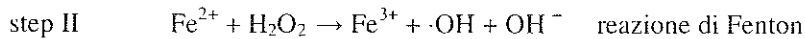
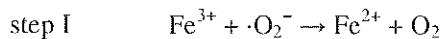
È noto che le SCR hanno un duplice ruolo nei sistemi biologici, sia benefico che dannoso. (Valko et al., 2006). Mostrano un effetto benefico quando, ad esempio, vengono utilizzate dal sistema immunitario come agenti in grado di bloccare l'azione patogena di diversi microrganismi o quando sono utilizzate come forma di comunicazione cellulare mediando la trasmissione di segnali biochimici tra le cellule (Corti et al., 2009). Al contrario, se le sostanze ossidanti sono presenti ad alte concentrazioni, e/o il sistema antiossidante non è in grado di neutralizzarle, possono essere danneggiate diverse componenti della cellula: i fosfolipidi di membrana, con perdita di compartimentazione cellulare e dei trasporti selettivi; gli acidi nucleici, con accumulo di mutazioni ed alterazioni dell'espressione genica e le proteine, dove l'ossidazione di alcuni gruppi amminoacidici causa modificazioni della struttura e perdita di funzione enzimatica, recettoriale e di trasporto (Corti et al., 2009).

I radicali liberi centrati sull'ossigeno sono i principali sottoprodotti formati nelle cellule degli organismi aerobi (Rahman, 2007). Le ROS rappresentano la maggior parte dei radicali che, se prodotti in eccesso, danneggiano i sistemi biologici; più precisamente, possono dare il via a reazioni autocatalitiche in modo tale che le molecole con le quali reagiscono sono esse stesse convertite in radicali liberi che, a loro volta, sono in grado di propagare il danno (Rahman, 2007). Tra le ROS prodotte a livello cellulare, le più comuni sono il radicale idrossile ($\text{OH}\cdot$), l'anione superossido ($\cdot\text{O}_2^-$) e l'ossido nitrico ($\text{NO}\cdot$) (Uttara et al., 2009).

Anche le forme non radicaliche come il perossido di idrogeno (H_2O_2) e il perossinitrito (ONOO^-) possono, in molti casi, indurre danno cellulare generando radicali attraverso varie reazioni chimiche (Uttara et al., 2009).

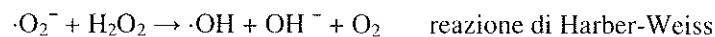
In tutti i meccanismi di generazione delle ROS, la prima tappa è l'attivazione dell'ossigeno molecolare (O_2) da parte di sistemi cellulari che hanno evoluto una serie di metallo-enzimi in grado di facilitare la produzione delle ROS, a seguito delle interazioni dei metalli ridotti con l'ossigeno. Poiché i radicali liberi sono tossici, le cellule hanno un efficiente sistema di regolazione che regola la produzione di ROS e di radicali liberi (Uttara et al., 2009).

L' $\cdot\text{O}_2^-$ può ridurre lo ione ferrico (Fe^{3+}) a ferroso (Fe^{2+}); quest'ultimo, a sua volta, può decomporre il H_2O_2 secondo la reazione di Fenton:



in cui lo ione Fe^{2+} , ossidandosi a ione Fe^{3+} , cede il suo elettrone ad una molecola di H_2O_2 e ne scinde uno dei legami covalenti generando un radicale libero, il radicale idrossile ($\text{OH}\cdot$), ed un anione, lo ione idrossile (OH^-) (Iorio, 2007).

Combinando gli step I e II otteniamo la reazione di Harber-Weiss, secondo la quale, l' $\cdot\text{O}_2^-$ può reagire con il H_2O_2 e indurre la formazione del $\cdot\text{OH}$ e dello ione OH^- , come mostrato nella seguente reazione:



2.2.1 Meccanismi di generazione delle specie chimiche reattive.

La quantità totale delle SRC che vengono generate nelle cellule è determinata da diversi fattori; in generale, si possono distinguere le due fonti di produzione delle SCR in endogene ed esogene (Valko et al., 2006; Rahman, 2007).

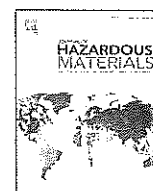
Le risorse endogene includono i mitocondri, il metabolismo del citocromo P450, i perossisomi e l'attivazione delle cellule infiammatorie (Valko et al., 2006; Rahman, 2007).

I mitocondri sono responsabili della produzione di ATP, attraverso la fosforilazione ossidativa, che fornisce l'energia necessaria per le funzioni cellulari (Iorio, 2007).

In condizioni fisiologiche, l'1%-2% di O_2 molecolare consumato dalle cellule animali è convertito a ROS attraverso la perdita di elettroni dalla catena di trasporto mitocondriale (ETC: mitochondrial electron transport chain). Per tale motivo, i mitocondri rappresentano una fonte primaria di ROS endogene (McCord, 2000; Mancuso et al., 2006; Liu et al., 2009).

Diverse evidenze in letteratura dimostrano che la produzione e l'accumulo di ROS, aumenta quando la catena respiratoria mitocondriale è danneggiata da componenti chimiche (inibitori respiratori) o mutazioni in geni mitocondriali implicati nella biosintesi di polipeptidi che costituiscono gli enzimi respiratori (Liu et al., 2009).

Sono stati identificati almeno due siti nella ETC dove si registra una sostanziale perdita di elettroni: a livello del gruppo flavinico del complesso I e a livello del sito dell'ubichinone del complesso III; da qui gli elettroni possono sfuggire e reagire con l' O_2 molecolare portando



Physico-chemical properties of quartz from industrial manufacturing and its cytotoxic effects on alveolar macrophages: The case of green sand mould casting for iron production



Francesco Di Benedetto^{a,b,*}, Elena Gazzano^{c,d}, Maura Tomatis^{d,e}, Francesco Turci^{d,e}, Luca A. Pardi^f, Simona Bronco^f, Gabriele Fornaciai^g, Massimo Innocenti^g, Giordano Montegrossi^b, Maurizio Muniz Miranda^g, Alfonso Zoleo^h, Fabio Capacciⁱ, Bice Fubini^{d,e}, Dario Ghigo^{c,d}, Maurizio Romanelli^a

^a Department of Earth Sciences, Università di Firenze, Firenze, Italy

^b Institute of Geosciences and Earth Resources (CNR-IGG), Florence, Italy

^c Department of Oncology, Università degli studi di Torino, Torino, Italy

^d "G. Scansetti" Interdepartmental Center for Studies on Asbestos and other Toxic Particulates, Università degli studi di Torino, Torino, Italy

^e Department of Chemistry, Università degli studi di Torino, Torino, Italy

^f Institute for Chemical and Physical processes (CNR-IPCF), Pisa, Italy

^g Department of Chemistry, Università di Firenze, Sesto Fiorentino, Italy

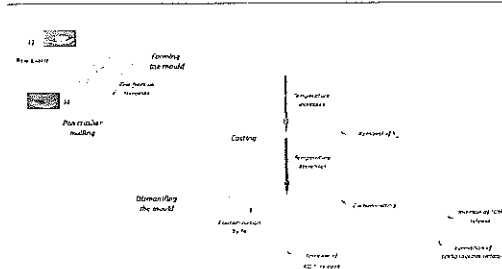
^h Department of Chemical Sciences, Università di Padova, Padova, Italy

ⁱ Health Agency of Florence, Firenze, Italy

HIGHLIGHTS

- Industrial processing of SiO₂ contributes to the variability of its hazard.
- Modifications affecting a SiO₂-rich sand in cast iron production were investigated.
- Numerous changes in sample morphology and surface reactivity were traced.
- No cellular responses were observed with the processed powder.
- Temperature change and contamination by C represent critical steps in the process.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 October 2015

Received in revised form 17 February 2016

Accepted 5 March 2016

Available online 7 March 2016

This paper is dedicated to the memory of Prof. Dario Ghigo, who recently passed away. We all remember our friend as a gifted teacher and a brilliant researcher and we hope he will continue to help us from the place where he is now.

* Corresponding author at: Department of Earth Sciences, Università di Firenze, Firenze (Italy), Via G. La Pira 4, I50121 Firenze, Italy.
E-mail address: francesco.dibenedetto@unifi.it (F. Di Benedetto).

ABSTRACT

Industrial processing of materials containing quartz induces physico-chemical modifications that contribute to the variability of quartz hazard in different plants. Here, modifications affecting a quartz-rich sand during cast iron production, have been investigated. Composition, morphology, presence of radicals associated to quartz and reactivity in free radical generation were studied on a raw sand and on a dust recovered after mould dismantling. Additionally, cytotoxicity of the processed dust and ROS and NO generation were evaluated on MH-S macrophages. Particle morphology and size were marginally affected by casting processing, which caused only a slight increase of the amount of respirable fraction. The raw sand was able to catalyze $\cdot\text{OH}$ and $\text{CO}_2^{\cdot-}$ generation in cell-free test, even if in a lesser extent than the reference quartz (Min-U-Sil), and shows h_{AI} radicals, conventionally found in any quartz-bearing raw materials. Enrichment in iron and extensive coverage with amorphous carbon were observed during processing.

Keywords:

Quartz
Hole and Al centres
EPR/ESEEM
Free radicals
Cytotoxicity
ROS
NO
Macrophages
Health effects
Carbon coating

They likely contributed, respectively, to increasing the ability of processed dust to release CO₂– and to suppressing •OH generation respect to the raw sand. Carbon coverage and repeated thermal treatments during industrial processing also caused annealing of radiogenic h_M defects. Finally, no cellular responses were observed with the respirable fraction of the processed powder.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Professional exposure to quartz and cristobalite may cause relevant health effects, such as silicosis and lung cancer [1]. Lung diseases, however, do not occur in all occupational settings since biological effects depend on physico-chemical properties of quartz, which may differ from one dust to another and may be modified during industrial processing [2–4]. Grinding, heating, mixing are the most common processes that can be experienced by silica-bearing materials and several efforts have been addressed in the past to better understand their effects on the quartz toxicity. Nevertheless, to date, few data on properties and biological activity of the workplace silica dusts are available [5–9].

Foundries operating the sand casting of the cast iron are listed among the industrial sectors with the longest tracks of exposure to silica, and larger occurrence of silica-related diseases [10–14]. Moreover, this industrial sector has a high carcinogenic risk: beyond silica, workers being also exposed to formaldehyde, metallic smokes, asbestos, and organic products related to the combustion process. Accordingly, the IARC [15] rated the production of cast iron and steel as having a proven carcinogenicity for humans. This rate was successively verified through epidemiological studies [16–20].

The purpose of this study is to characterize a quartz-rich sand used in the “green sand” iron casting and investigate the main physico-chemical modifications, which occur during processing and may affect its toxicity [2].

The quartz rich sand, before enter in the industrial process and after mould demolition, was analysed to assess the changes in the speciation of inorganic radicals associated with quartz and in the potential to generate free radicals in cell-free environment. Free radicals generated by reactive sites at the silica surface (particle-derived free radicals) together with oxidant species produced by phagocytes (cell-derived ROS) are thought to play a significant role, namely during a late stage of toxicity of silica [21,22]. Inorganic radical speciation was carried out by Electron Paramagnetic Resonance (EPR) and Electron Spin Echo Envelope Modulation (ESEEM) spectroscopies. Free radical release was monitored by spin trapping technique associated to EPR spectroscopy. Changes in size and particle morphology, mineralogical composition, and amount of bioavailable iron were also evaluated.

The respirable fraction of the sand recovered after mould demolition was also tested for its ability in activating alveolar macrophages. Cytotoxicity and the potential to stimulate the production of Reactive Oxygen Species (ROS) and nitric oxide (NO) from cells were evaluated on a murine alveolar macrophage (MH-S) cell line and compared with cellular damage induced by Min-U-Sil, a fibrogenic quartz widely employed in experimental studies on silicosis and lung cancer.

2. Materials and methods

2.1. Sample description

The two considered samples belong to the processing line of the sand mould casting. In this process, cast iron coming from blast-furnace is introduced as raw material, melt and poured in moulds. These, in turn, are assembled by suitably modelling quartz (or quartz rich) sands. There are two ways to accomplish the mould assemblage by loose sands of mineral: pressing them (the so-called “green sand” procedure) or mixing them with resins, and then pressing and forming them. In both cases, after casting, sands are recovered by the demolition of the mould and by homogenisation in a pan crusher. Then, they are fed back into the industrial cycle, to prepare a new mould. If mixed with resins, sands undergo a thermo-mechanical treatment, the “regeneration”, to remove most of the residual resin, before being re-used.

The two sands, hereafter labelled as I3 and I4, were sampled at a foundry operating just with the “green sand” processing line, so they were not mixed with resins. I3 consists of raw quartz rich sands, sampled before they enter in the industrial process. Sands are white at the sight (Fig. S1). I4 consists of powder materials sampled in the industrial process point where sands, recovered after the mould demolition, were stocked. The only relevant difference is the colour, turned to black (Fig. S1). Both samples were considered in previous studies by our group [9,23].

2.2. Mineralogical investigation

The samples were characterised as concerns the particle morphology and the phase composition through a set of techniques well established in the solid state investigations. Micromorphological information was provided by the Scanning Electron Microscopy (SEM), whereas phase composition was obtained through the combined use of X-ray Powder Diffraction (XRPD), Fourier Transform Infrared spectroscopy in the Attenuated Total Reflectance mode (FTIR/ATR), and micro-Raman spectroscopy. Specific surface information was provided by the BET technique. Further experimental details are summarised in the Supplementary materials (Section B).

2.3. Speciation of inorganic radicals

The investigation of inorganic radicals was mainly performed through X-band EPR spectroscopy. In order to get a certain attribution of the radical species, three set of measurements were done: a preliminary survey through conventional continuous-wave (cw) EPR at room temperature, followed by a characterisation at 35 K, and by a set of measurements through pulsed EPR spectroscopy (field swept Echo-EPR and time-domain ESE experiments). The samples were analysed without any manipulation. Further details

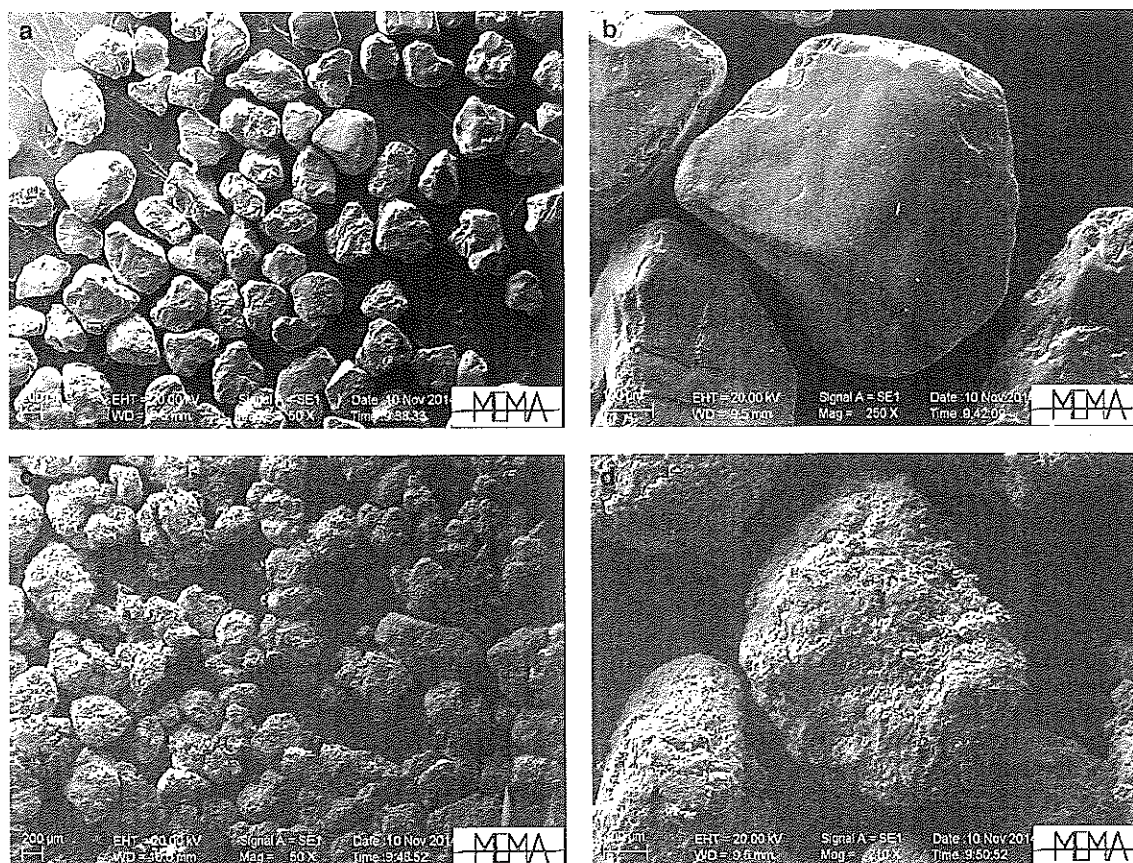


Fig. 1. Secondary electron micrographs of the I3 (a and b) and I4 (c and d) samples. The (a) and (c) micrographs were obtained at 50 \times (scale bar 200 μm), the (b) and (d) micrographs were obtained at 250 \times and 210 \times , respectively (scale bar 100 μm).

of the measurements are provided in the Supplementary materials (Section C).

2.4. Oxidative potential in cell free environment

Free radical generation ($\cdot\text{OH}$ and $\text{CO}_2^{\cdot-}$) was monitored by EPR spectroscopy using DMPO as trapping agent. Further technical details are given in the Supplementary materials (Section D).

2.5. Bio-available iron

The amount of removable ferrous and ferric ions on the sample surfaces was determined upon incubation of silica dusts in an aqueous solution containing ferrozine (a strong chelator specific for Fe^{2+} determination) or ferrozine and ascorbic acid, which fully reduces Fe^{3+} ions to Fe^{2+} , allowing the detection of total (Fe^{2+} and Fe^{3+}) removable iron. Details of the incubation procedure are provided in the Supplementary materials (Section E).

2.6. Cellular toxicity

Cytotoxicity was evaluated by measuring the release of LDH into the extracellular medium, and NO generation by quantifying the nitrite accumulation. DCFH-DA assay was used for the detection of intracellular ROS. All experiments were performed on murine alveolar macrophages (MH-S). Details are provided in the Supplementary materials (Section F).

3. Results

3.1. Mineralogical and chemical composition; granulometric distribution

In Fig. 1, the secondary electron micrographs obtained on the I3 and I4 samples are shown. Sample granulometry is conceivably high. Particles exceed 300 μm , thus allowing the classification of the samples as “fine sands”, according to the Udden-Wentworth grain scale [24]. Particles with a size considerably smaller are present only in I4 sample (Fig. 1c). This fine fraction is generated during the mulling step in the pan crusher. Both I3 and I4 showed a very low BET surface (0.9 and 1.1 m^2/g respectively), in agreement with their large average diameter.

The SEM investigation of the I3 particles reveals sub-rounded edges and corners, and relatively smooth surfaces. This suggests that almost no recent new surfaces were created by any industrial pre-treatment of the sands. Conversely, the particle surface of I4 sample is no longer smooth. The roughness of the surface can be attributed to the partial covering by additional phases.

XRPD investigation of the I3 and I4 evidences the presence of quartz only (Fig. S2). Therefore, we can conclude that impurities added to the sample during or after the cast are in an amorphous state, or it can be considered below the detection limit of XRPD (under the adopted experimental conditions, 1 wt%).

The two vibrational spectroscopies were focused on the determination of the chemical nature of the coating. The ATR investigations (Fig. S3), while confirming the obvious presence of bands at $\sim 1000\text{cm}^{-1}$ due to crystalline SiO_2 , rule out the

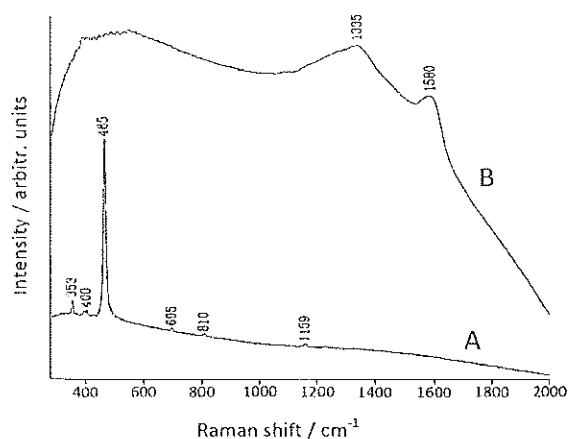


Fig. 2. Raman spectra of the A) I3 and B) I4 samples.

possible presence in the coating of any other component but crystalline/amorphous carbon. These latter species are weak and badly determined in FTIR, due to small changes in the dipole moment. The microRaman spectra of the I3 and I4 samples, shown in Fig. 2, are more informative. The I3 spectrum consists of some narrow bands (at 353, 400, 465, 695, 810 and 1159 cm^{-1}): all these bands can be safely attributed to modes arising from the SiO_2 crystal structure. In contrast, the spectrum of I4 reveals two marked features, a huge fluorescence background and the presence of two main bands at 1335 and 1580 cm^{-1} . These two bands can be attributed to the amorphous/graphitic carbon (whose reference band wavenumbers are 1360 and 1580 cm^{-1} , respectively). Namely, the first one is closely resembling that of the sp^3 carbon, the presence of which could thus be inferred, in admixture with some sp^2 carbon.

3.2. Speciation of inorganic radicals

The RT cw-EPR spectra of I3 and I4 samples are shown in Fig. 3. The spectrum of the I3 sample is characterized by the presence of three superimposed signals. The first line, definitely narrow (labelled I in Fig. 3a), is very common in all the investigated raw quartz materials [23] and is attributed to inorganic radicals. The second one, a broad line (II in Fig. 3a), is attributed to some metal impurity. A obvious attribution is to Fe(III) oxides, which often exhibit signals in this region. From the asymmetric shape, and the width of the line (~ 85 mT), a tentative attribution to Oxygen coordinated Cu(II) is also proposed. This is in agreement with the trace element analyses reported by Di Benedetto et al. [9]. The broad II line is probably tracing the contributions of both Fe(III) and Cu(II). The two lines, marked by arrows and labelled as III in Fig. 3a, are due to Fe(III) in a strong ligand field, in a highly crystalline surrounding. We attribute them to Fe in quartz, in agreement with the literature [25].

The spectrum of the I4 sample is characterized by the presence of two superimposed lines, both different from the formerly described. The main spectral line (IV in Fig. 3b) is a very broad (~ 106 mT in width), almost symmetric signal, whose features were already associated to Fe oxide crystalline or cryptocrystalline species [26]. In contrast, the V line (Fig. 3b) is very narrow and even more symmetric. The V line is attributed to radical species. Further details of the narrow lines of both samples are shown in Fig. 3c. Line II presents a peak-to-peak width of ~ 1.6 mT and a more asymmetric shape than line V, whose peak-to-peak width is ~ 1.0 mT.

Cw-EPR spectral investigation was also performed at 35 K, in order to confirm the spectral attribution of the radical species. The line II of the spectrum of I3 at low temperature shows the characteristic superhyperfine ^{27}Al and ^1H structure of the h_{Al} centre, already

described for this sample ([23]; Fig. S4). No evidence of further spectral contributions was provided, thus pointing to the attribution of the radical speciation of I3 to the h_{Al} centres only (within the minimum detection limit). In contrast, the V line of the spectrum of I4 does not reveal any hyperfine or superhyperfine structure at low temperature. The width of the signal, ~ 0.6 mT, is apparently reduced. The peak-to-noise ratio is ~ 1400 . On these bases, a final attribution of the V line to an inorganic or organic radical cannot be fostered. Nevertheless, the attribution of this line to one of the known radical species associated to quartz is ruled out [27].

In Fig. 4a, the Echo-EPR spectra of the two samples are shown. The spectrum of I3 consists of an asymmetric broad absorption signal, where parallel and perpendicular g components are estimated at 337 ($g_{\text{par}} = 2.050$) and 344 mT ($g_{\text{perp}} = 2.009$), respectively. The spectrum of I4 is characterized by the presence of a single narrow line, centred at 345.5 mT ($g \sim 2.00$), with a full width at half maximum of ~ 1.5 mT. The comparison of the EchoEPR spectra allows to better visualize the apparent difference in Zeeman anisotropy between the two species, as well as the difference in the position of their maxima.

To perform the 3-pulse time domain ESE spectra, the magnetic field value corresponding to the maximum intensity of each spectrum was applied. The results are shown in Fig. 4b. Both patterns consist of two spectral features: the decay of the signal in the time domain and the nuclear modulation pattern. The I3 sample exhibits a faint nuclear modulation up to ≈ 400 ns; its intensity decreases in the remaining time domain and it is masked by the background noise. The overall decay of the signal looks like a monotonous exponential law. In contrast, the pattern of I4 sample exhibits a nuclear modulation that persists in the whole investigated time domain with an almost constant intensity. Moreover, the decay of the signal follows a monotonous exponential law as well, but it is by far more rapid than that of I3 sample.

The ESEEM of the two spectra, extracted from the time-domain data of Fig. 4b by removing the decay of the 3P ESE, is shown in Fig. 5(a and b) together with the corresponding Fourier transforms (Fig. 5c and d). The ESEEM of the I3 spectrum was already investigated in a previous study [23] and it is assigned to the species h_{Al} , thus confirming the result obtained by cw data. The modulation pattern (Fig. 5a and c) can be attributed to protons coupled to the Al paramagnetic centre [23]. Conversely, the spectral features of the ESEEM of the I4 sample (Fig. 5b) cannot be related to the h_{Al} centre. The FT of I4 ESEEM (Fig. 5d) shows a strong peak at the frequency value corresponding to the Larmor frequency of 'free' protons, i.e. protons not chemically coupled to a paramagnetic centre, and located at distances where the dipolar coupling is almost negligible. A second feature is present at very low frequency values, corresponding to the large period of the experimental ESEEM of Fig. 5b. The origin of this contribution has been found by simulation procedure [23]; the best fit data (Fig. 5e) are obtained for a centre related via superhyperfine interaction to one surrounding ^{13}C nucleus at ~ 2.38 Å coupled by a Fermi constant $a_{\text{iso}} = 8.5$ MHz. Thus, we attribute the V line in Fig. 3b to an inorganic carbonaceous radical species.

3.3. Bio-available iron

Bio-available iron, which corresponds to iron ions that can be easily removed from the surface of the particles, was detected in relevant amount on the dust recovered after mould demolition. The amount of iron released in solution upon 72 h was 7.4 ± 0.8 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ (average of two separate experiments) and less than half of that was in the reduced form. Conversely, raw sand released only trace of iron in the oxidized form.

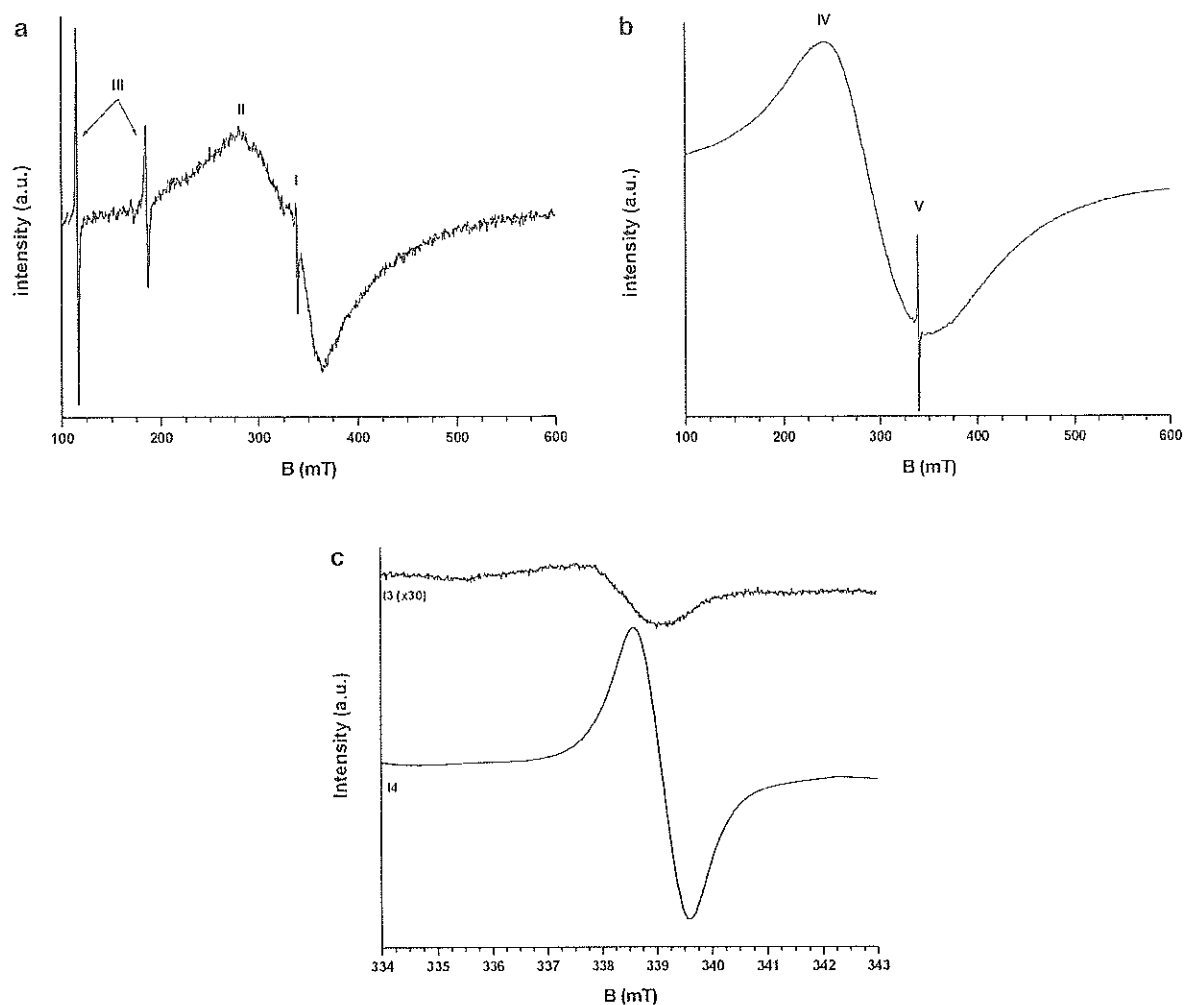


Fig. 3. Room temperature cw-EPR spectra of (a) the I3 sample, (b) the I4 sample, (c) detailed view of the radical lines in a) and b) spectra. To be plotted to the same scale, the II line of I3 in (c) is multiplied by a factor 30. Magnetic field values in milliTesla (mT), intensity in arbitrary units.

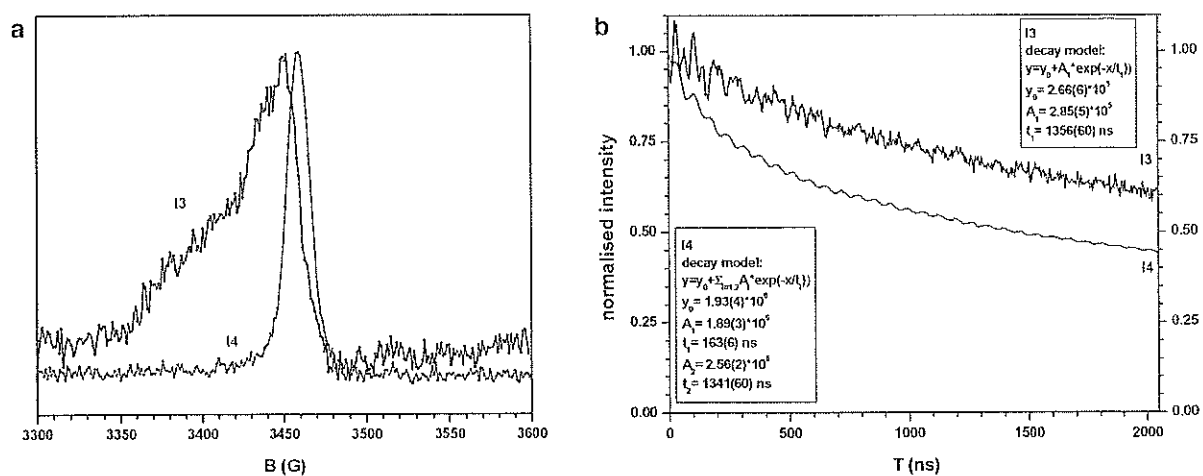


Fig. 4. (a) field swept Echo-EPR spectra registered after a 2-pulse sequence on the I3 and I4 samples; (b) time domain ESE decay pattern after a 3-pulse sequence on the I3 and I4 samples. In the insets, the results of the best least squares fit of the decay law, included the used function, are listed. Magnetic field values are expressed in Gauss. Time values are expressed in nanoseconds. Intensities are normalized.

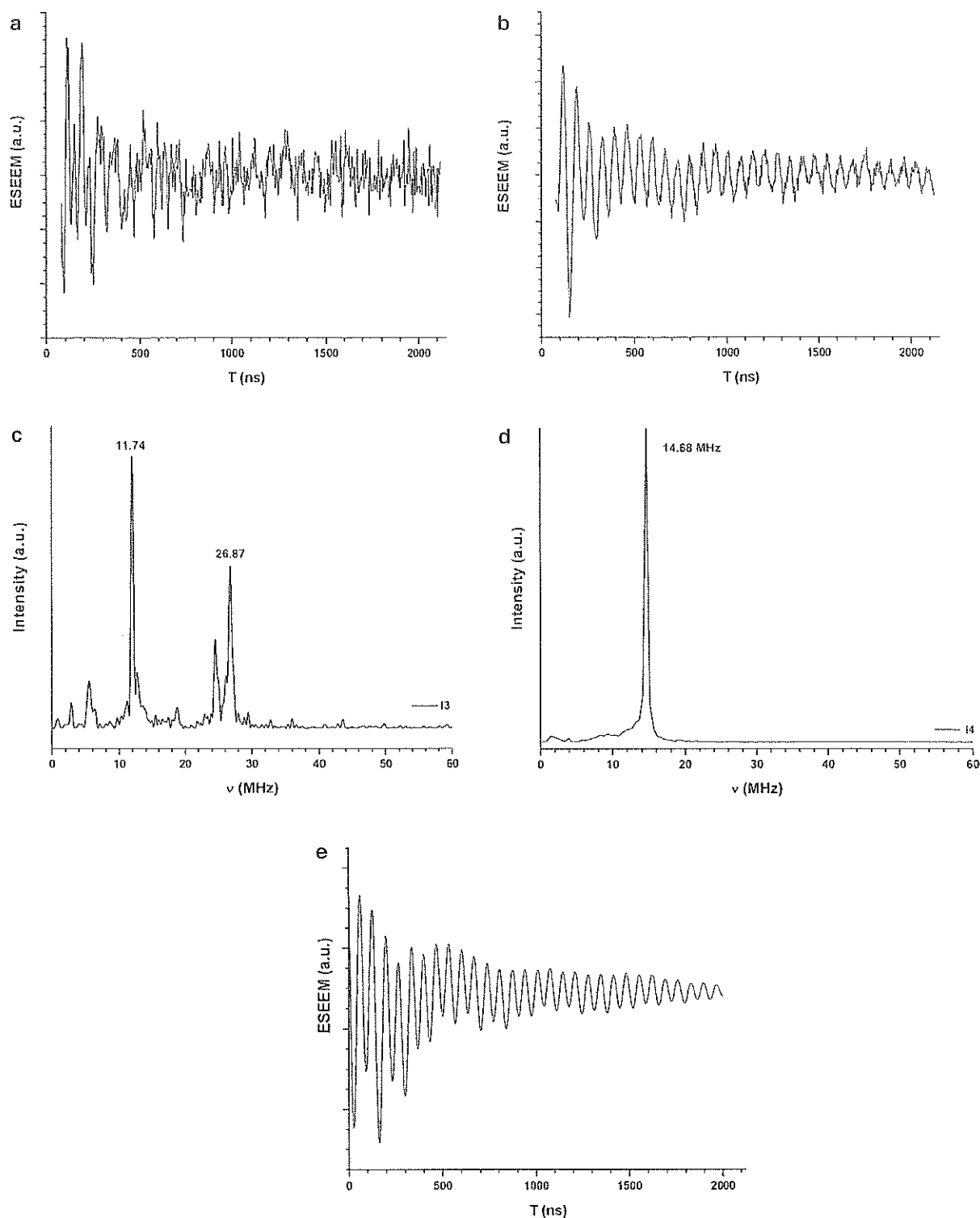


Fig. 5. (a) and (b) ESEEMs and (c) and (d) Fourier transforms of the spectra of the I3 and I4 samples, respectively. (e) Fourier transform of the ^{13}C simulated modulation. Time values are expressed in nanoseconds. Frequencies are expressed in MegaHertz. The plot in (c) is modified after Romanelli et al. [23].

3.4. Oxidative potential in cell-free conditions

Free radical generation of the two sands is shown in Fig. 6. Ability to catalyze: a) carboxyl radical ($\text{CO}_2^{\cdot-}$) release from the formate ion, used as “model” target molecule for homolytic cleavage of a carbon-hydrogen bond in endogenous molecules and b) hydroxyl

radical ($\cdot\text{OH}$) release in the presence of H_2O_2 , mimicking contact of particles with the lysosomal fluid of alveolar macrophages, were investigated.

Both samples were able to generate carboxyl radicals (Fig. 6a) in the presence of ascorbic acid, a reducing agent present in the lung lining fluid, whereas no activity was found in a non-reducing envi-

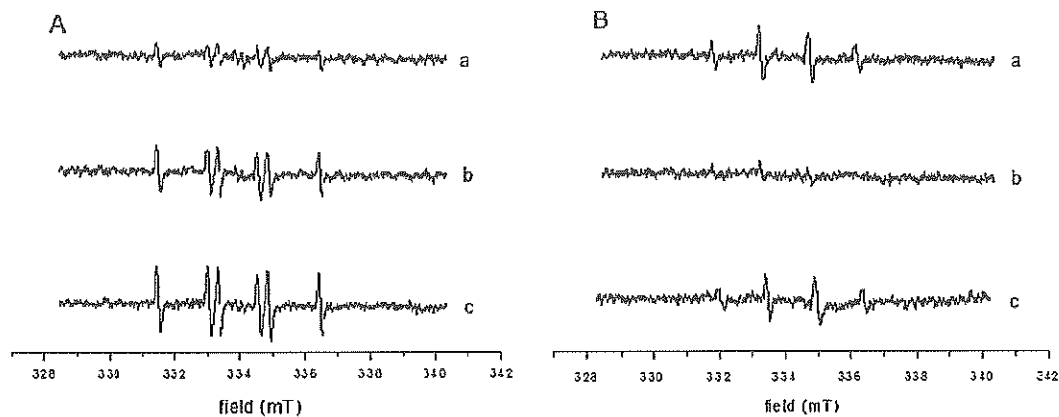


Fig. 6. Free radical generation from aqueous suspension of the raw sample and of the sample recovered after mould demolition. EPR spectra of $[\text{DMPO}-\text{CO}_2^-]$ ($a_N = 15.6\text{ G}$ and $a_H = 19\text{ G}$) (A) and $[\text{DMPO}-\text{HO}^\bullet]$ ($a_N = a_H = 14.9\text{ G}$) (B) adducts of (a) raw sand (I3), (b) sand recovered after mould demolition (I4), and (c) reference quartz (Min-U-Sil). Hydroxyl radicals were obtained in the presence of H_2O_2 , while carboxyl radicals via homolytic cleavage of a C–H bond in the formate ions. All spectra have been collected after 60 min of incubation of the dusts with target molecules.

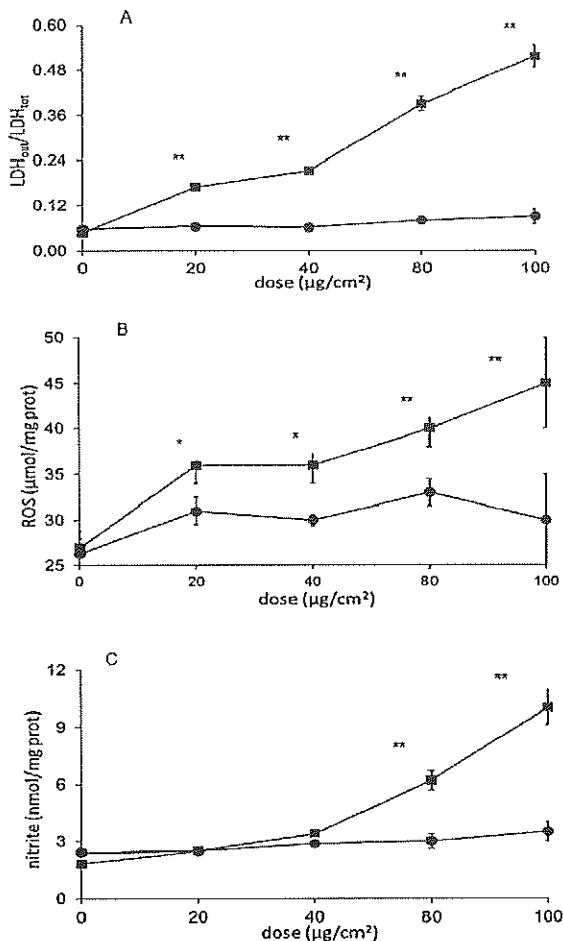


Fig. 7. Effect of I4 fine fraction on MH-S murine alveolar macrophage cells. MH-S cells were incubated for 24 h in the absence or presence of 20, 40, 80, 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of I4 fine fraction (●) Min-U-Sil quartz (■), used as reference quartz. (A) Cytotoxicity measured as LDH leakage following cell membrane damage, (B) ROS (reactive oxygen species) production and (C) NO (nitric oxide) production, measured as nitrite concentration. Data are presented as means \pm SE ($n = 3$). Vs CTRL: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

ronment (data not reported for brevity). The I4 sample was more reactive than the I3 sample, but less reactive than the reference quartz.

An opposite trend was observed for hydroxyl radical release. I3 generated $^{\bullet}\text{OH}$ in a similar extent to Min-U-Sil quartz, whereas I4 was fully inactive (Fig. 6b).

3.5. Cellular tests

The fine fraction of the I4 sample was tested to evaluate the ability to induce a cytotoxic effect upon a 24 h incubation with murine alveolar macrophages. This fraction amounts to about 10% of the sample and contain particles with heterogeneous size. Several particles with irregular shapes, sharp edges and acute spikes (a morphology characteristic of silica dusts obtained by grinding) were observed (Fig. S5). FPIA analysis showed that about 90% of particles has circle equivalent (CE) diameter $< 5\ \mu\text{m}$ (the diameter of a circle with the same area of the particle). The CE average diameter and the modal value are $2.3 \pm 1.7\ \mu\text{m}$ and $1.35\ \mu\text{m}$ respectively.

Cellular damage was investigated only for sand recovered after mould demolition, because the raw sand does not contain relevant amount of fine particles (less than 1%). I4 was not cytotoxic and did not stimulate ROS or NO generation, at any of the concentrations tested, differently from Min-U-Sil quartz (Fig. 7).

4. Discussion

The quartz rich sand investigated in this study undergoes physical and chemical changes when used in the green sand casting. Sand size and morphology are only partially affected by the industrial process. At the beginning of the process, the sand consists of sub-rounded grains of quartz, with a mean dimension of $\sim 350\ \mu\text{m}$. Size distribution is only slightly affected by a small increase in the content of fine particle (up to 10%) at the end of the production. The morphology is preserved, the main difference consisting in a black carbonaceous coating. Covering of the quartz surface by the carbonaceous material is associated to a thermal shock undergone by the sands, which are kept in contact with a melt at $\sim 1150\ ^\circ\text{C}$ [28], and abruptly cooled down to room temperature. The SiO_2 , under these conditions, reaches the transition temperature from the α -quartz to the β -quartz structures, transition which is fully reversible as associated to a displacive polymorphism. Although transition from β -quartz to tridimite is also achievable (in this case involving an irreversible reconstructive polymorphism), the absence of tridimite in the XRPD pattern rules out this occur-

Table 1
Correlation between observed changes of properties in the cast iron production and biological effects.

| Physico-chemical features | Main modification occurred after casting process | Main correlation between physico-chemical properties and biological effects |
|---------------------------|--|---|
| Morphology | Increase in the surface roughness | Particle shape affects silica cytotoxicity. Irregular particles with sharp edges are more cytotoxic in alveolar macrophages than rounded particles [48] |
| Size | Slightly increase in the amount of respirable fraction | Particle size affects the lung deposition. Only small particles (<5 μm) reach the alveoli, larger particles are cleared by the mucociliary system |
| Chemical composition | Addition of carbon phase and iron contamination | Particle impurities and external phases may act in different ways. Extensive carbon coating may hinder surface radicals, suppress free radical generation, and modify the topography of silanol groups which are involved in the interaction with cell membrane. Quartz mixed with carbon resulted less fibrogenic [43] and less cytotoxic [30] than the same amount of pure quartz |
| Quartz radical | Annihilation of quartz radicals | Contamination with iron may enhance the ability of crystalline silica to generate free radicals [21] and result in acute pulmonary inflammation in rats [49]. |
| Free radical generation | Suppression of the ability to release $\cdot\text{OH}$ radical in presence of H_2O_2 , slight increase of the ability to catalyze $\text{CO}_2^{\cdot-}$ release | Particle-derived radicals [5,33,34] with cell-derived radicals [22,36], contribute to oxidative stress observed in rat lung following exposure to quartz particles [21,37,39]. Oxidative stress contributes to the persistent inflammation and genotoxic effects in the lung parenchyma [15] |
| Bioavailable iron | Presence of bioavailable iron | Poorly coordinated, thus easily removable, iron ions at the particle surface may be involved in free radical generation. Moreover, alteration of iron homeostasis may contribute to cell damage [49] |

rence. This result is in line with those reported by Wahl et al. [29], who stated the impossibility to obtain tridimite simply by heating quartz.

The results of the vibrational spectroscopy measurements confirm that the coating consists mainly of carbon, prevailing in the sp^3 hybridization. The intensity of the bands arising from lattice vibrations of graphite indicates most of the carbon occurring in an amorphous state. The source of C, in the specific case of the green sand casting, has to be found in the melt Fe alloy, which intrinsically contains C, and to which some more C is added to fulfil specific rheological requirements of the casting process. As a consequence, the abrupt lowering of the temperature after the cast causes the release of excess of both the intrinsic and added C towards the mould and it covers the sands in contact with the Fe alloy. This coating occurs at high temperature (T in the range 800–1200 °C). The role of the temperature has a drastic effect on the population of the radiogenic defects of quartz [27]. In fact, they are not stable at high temperature, and annealing at 500 °C is able to annihilate the majority of h_{Al} radical centres in quartz. We were not able to detect the EPR and ESE traces of h_{Al} centres in the I4 sample. Taking into account the intrinsic detection limits of the ESE technique, and the partial interference of the carbonaceous radical (Fig. 3a), we can assess that, if present, the fraction of h_{Al} centres could not exceed few % units of the initial population (in I3). Both the coating by amorphous C and the change of radical speciation are supposed to locally occur in regions of the mould that are in contact with, or very near to, the cast. The fact that a random sample of sands, as I4, does not present detectable h_{Al} centres can be attributed to the re-cycling of the used sands in the production line. The reuse of sands in subsequent passages of the same industrial process gives rise to a uniform exposure to C coating and to thermal shock.

Coating with carbonaceous material is related to the addition of a new radical species to the sands. The occurrence of this addition and of the annihilation of the h_{Al} species points to a complete change of speciation of the radical population in the quartz sands. Indeed, most of the long living, and also the short living radicals proper of the crystalline silica, are warmed up to temperatures at which they undergo annihilation and/or recombination [27]. In contrast, the carbonaceous radicals, added to the system, are stable even at the considered temperatures. With respect to this new radical, the quartz sands act only as a carrier. Carbon coating probably suppresses the potential of the raw sands to generate hydroxyl radicals in presence of H_2O_2 . This effect was already observed in

two standard quartzes that lost their reactivity after grinding with carbon soot [30]. Metal transition ions and quartz surface radicals may be responsible for $\cdot\text{OH}$ release. Hiding these surface species, either in a non-specific way (by extensive coverage with an inert phase) or through specific interaction (e.g. between quartz surface radicals and radicals present on carbon surface) could account for the reduction in reactivity towards H_2O_2 . Moreover, a scavenger activity of the carbon coating may also occur. Scavenging of $\cdot\text{OH}$ is, in fact, well documented in a number of carbon-based materials [31,32]. From this point of view, a reactivity played by the C coating also on some h_{Al} , residual from the thermal annihilation, cannot be excluded.

Note that both surface radicals and silica-generated radicals [5,33,34] play a role in the induction of oxidative reactions leading to macrophage membrane damage [35], and contribute with cell-derived radicals [22,36] to the oxidative stress observed in lung following exposure to quartz particles [21,37–39].

Nor I3 neither I4 were able to generate carboxyl radical in the absence of a reducing agent, but when ascorbic acid was added to the reaction medium, both samples were activated, in agreement with the higher reactivity of Fe(II) than Fe(III) in the cleavage of C-H bond [40,41]. Opposite to $\cdot\text{OH}$ release, $\text{CO}_2^{\cdot-}$ generation was slightly higher for I4 than for I3 sample. This is due to the presence of poorly coordinated ions [42], accessible for reaction (bio-available iron) because of unsatisfied coordination valences, associated to the iron rich phase. One has to recall that a net enrichment in iron [9] occurs during the processing (Fig. 2). In this case, no scavenging effect towards carbon-centred radicals can be assumed.

Finally, despite the presence of quartz, I4 (fine fraction) was not able to induce a cytotoxic response or to stimulate ROS and NO generation in murine alveolar macrophages. The presence of the carbon coating, which modifies the silica surface, could account for the absence of cellular effects, as demonstrated for Min-U-Sil quartz loaded with carbon dust [30] and already suggested by an old study evidencing loss of biological activity when quartz is ground with coal dust [43–45]. Amorphous carbon per se shows low chemical reactivity, and does not induce cytotoxic effects [46] or inflammation responses [47] in macrophage cells. However, a possible effect of the high temperatures experienced by the sand during casting process, which contribute to annihilation of quartz radicals, may not be excluded. A synoptic view of the main correlations between changes in the physico-chemical properties and possible biological effects is shown in Table 1 and Fig. S6.

5. Conclusions and perspectives

As expected, some key physico-chemical characteristics relevant to quartz toxicity are modified during the green sand mould casting for iron production. The raw quartz material has a negligible respirable fraction, and contains radical species (i.e. h_{AI}) ubiquitarily observed in quartz [27]. The processed quartz is coated with amorphous carbon and contaminated by iron oxides, it has a moderate respirable fraction, and it shows an intriguing suppression of the original h_{AI} species accompanied by the occurrence of a new carbon-based radical. The presence of the carbon coating likely reduces the surface reactivity in terms of $\cdot OH$ generation with respect to the raw quartz, while contamination with the iron oxide may account for the slight increase in the generation of $\cdot CO_2^-$. Opposite to standard quartz, the respirable fraction of the processed quartz is not cytotoxic in murine alveolar macrophages. Interestingly, the absence of cytotoxic effect, the annealing of h_{AI} species, and the decreasing of the release of $\cdot OH$ species observed on the processed quartz, is counterbalanced by the increasing of bio-available iron, by the appearance of C-radicals and the increment of generation of $\cdot CO_2^-$ species. Even if the surface reactivity of the processed sample is lower than that of Min-U-Sil standard quartz, our results do not allow to exclude a potential toxicity and indicate once again that only a multi-technique approach need to be followed to correctly describe the potential harm of a particulate.

Author contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript. All authors contributed equally.

Funding sources

The authors acknowledge the Tuscany Administration for funding this research under the programmes "Progetto di ricerca per l'individuazione delle cause di variazione della reattività superficiale della silice cristallina, nei principali comparti di lavoro toscani, in relazione alla sua potenziale patogenicità" and "Progetto di ricerca per il controllo del rischio d'esposizione a silice libera cristallina (SLC) nei comparti lavorativi toscani, lo studio delle proprietà chimico-fisiche, morfologiche e biologiche delle polveri silicee in diversi comparti produttivi e lo studio dei meccanismi patogenetici e degli effetti dell'esposizione anche a basse dosi".

Fibre image analysis has been obtained with the equipment acquired by the Interdepartmental Center "G. Scansetti" for Studies on Asbestos and Other Toxic Particulates with a grant from Compagnia di San Paolo, Torino, Italy. The Centro di Servizi di Microscopia Elettronica e Microanalisi (MEMA), University of Florence, is acknowledged for kindly granting the use of the Scanning Electron Microscopy, as well as Mario Paolieri and Maurizio Ulivi are acknowledged for their assistance in the same investigations.

The MIUR (Italy) is also acknowledged for the PRIN 2010/2011 project prot. 2010MKHT9B, as is the Italian CNR, for support. FDB, MR, MI also benefited for departmental funding (ex 60%).

The authors express their warmest thanks to four anonymous reviewers for their constructive suggestions and criticisms.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.03.016>.

References

- [1] WHO-IARC, A review of human carcinogens: arsenic, metals, fibres, and dusts, in: IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans 100C, WHO-IARC, Lyon, France, 2012.
- [2] B. Fubini, Surface chemistry and quartz hazard, *Ann. Occup. Hyg.* 42 (1998) 521–530.
- [3] K. Donaldson, P.J. Borm, The quartz hazard: a variable entity, *Ann. Occup. Hyg.* 42 (1998) 287–294.
- [4] K. Donaldson, V. Stone, R. Duffin, A. Clouter, R. Schins, P. Borm, The quartz hazard: effects of surface and matrix on inflammatory activity, *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 20 (Suppl. 1) (2001) 109–118.
- [5] B. Fubini, V. Bolis, A. Cavenago, M. Volante, Physicochemical properties of crystalline silica dusts and their possible implication in various biological responses, *Scand. J. Work Environ. Health* 21 (Suppl. 2) (1995) 9–14.
- [6] A. Clouter, D. Brown, D. Höhr, P. Borm, K. Donaldson, Inflammatory effects of respirable quartz collected in workplaces versus standard DQ12 quartz: particle surface correlates, *Toxicol. Sci.* 63 (2001) 90–98.
- [7] G.D. Cakmak, R.P.F. Schins, T. Shi, I. Fenoglio, B. Fubini, P.J.A. Borm, In vitro genotoxicity assessment of commercial quartz flours in comparison to standard DQ12 quartz, *Int. J. Hyg. Environ. Health* 207 (2004) 105–113.
- [8] B. Fubini, I. Fenoglio, R. Ceschino, M. Ghiazza, G. Martra, M. Tomatis, P.J.A. Borm, R. Schins, J. Bruch, Relationship between the state of the surface of four commercial quartz flours and their biological activity in vitro and in vivo, *Int. J. Hyg. Environ. Health* 207 (2004) 89–104.
- [9] F. Di Benedetto, F. D'Acapito, F. Capacci, G. Fornaciai, M. Innocenti, G. Montegrossi, W. Oberhauser, L.A. Pardi, M. Romanelli, Variability of the health effects of crystalline silica: Fe speciation in industrial quartz reagents and suspended dusts—insights from XAS spectroscopy, *Phys. Chem. Minerals* 41 (2014) 215–225.
- [10] M. Zhang, Y.D. Zheng, X.Y. Du, Y. Lu, W.J. Li, C. Qi, Z.L. Wu, Silicosis in automobile foundry workers: a 29-year cohort study, *Biomed. Environ. Sci.* 23 (2010) 121–129.
- [11] P.J. Landrigan, M.G. Cherniack, F.A. Lewis, L.R. Catlett, R.W. Hornung, Silicosis in a grey iron foundry. The persistence of an ancient disease, *Scand. J. Work Environ. Health* 12 (1986) 32–39.
- [12] R.I. Erhlich, D. Rees, A.B. Zwi, Silicosis in non mining industry on the Witwatersrand, *S. Afr. Med. J.* 73 (1988) 704–708.
- [13] D. Rees, R. Weiner, Dust and pneumoconiosis in the South African foundry industry, *S. Afr. Med. J.* 84 (1994) 851–855.
- [14] J. Gomes, O.L. Lloyd, N.J. Norman, P. Pahwa, Dust exposure and impairment of lung function at a small iron foundry in a rapidly developing country, *Occup. Environ. Med.* 58 (2001) 656–662.
- [15] WHO-IARC, Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs volumes 1 to 42, IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Humans (Suppl. 7) (1987) 1–440.
- [16] T. Sorahan, M.A. Cooke, Cancer mortality in a cohort of United Kingdom steel foundry workers: 1946–85, *Brit. J. Ind. Med.* 46 (1989) 74–81.
- [17] E.H. Hansen, A cohort mortality study of foundry workers, *Am. J. Ind. Med.* 32 (1997) 223–233.
- [18] P.G. Barbieri, S. Lombardi, A. Candela, R. Festa, L. Miligi, Epithelial naso-sinusal cancer incidence and the role of work in 100 cases diagnosed in the Province of Brescia (northern Italy), in the period 1978–2002, *Med. Lav.* 96 (2005) 42–51.
- [19] H. Westberg, H. Löfstedt, A. Seldén, B.G. Lilja, P. Nayström, Exposure to low molecular weight isocyanates and formaldehyde in foundries using hot box core binders, *Ann. Occup. Hyg.* 49 (2005) 719–725.
- [20] T. Hoshuyama, G. Pan, C. Tanaka, Y. Feng, L. Yu, T. Liu, L. Liu, T. Hanaoka, K. Takahashi, Mortality of iron-steel workers in Ashan, China: a retrospective cohort study, *Int. J. Occup. Environ. Health* 12 (2006) 193–202.
- [21] B. Fubini, A. Hubbard, Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis, *Free Radic. Biol. Med.* 34 (2003) 1507–1516.
- [22] V. Castranova, J.M. Antonini, M.J. Reaser, L. Wu, K. Van Dyke, Oxidant release from pulmonary phagocytes, in: V. Castranova, V. Vallyathan, W.E. Wallace (Eds.), Silica and silica-induced lung diseases. CRC Press, Boca Raton, 1996, pp. 185–195.
- [23] M. Romanelli, F. Di Benedetto, L. Bartali, M. Innocenti, G. Fornaciai, G. Montegrossi, L.A. Pardi, A. Zoleo, F. Capacci, ESEM of industrial quartz powders: insights into crystal chemistry of Al defects, *Phys. Chem. Minerals* 39 (2012) 479–490.
- [24] S.J. Blott, K. Pye, Gradstat: a grain size distribution and statistics package for the analysis of unconsolidated sediments, *Earth Surf. Process. Landforms* 26 (2001) 1237–1248.
- [25] S.U. Cortezão, W.M. Pontuschka, M.S.F. Da Rocha, A.R. Blak, Depolarisation currents (TSDC) and paramagnetic resonance (EPR) of iron in amethyst, *J. Phys. Chem. Solids* 64 (2003) 1151–1155.
- [26] C. Carbone, F. Di Benedetto, C. Sangregorio, P. Marescotti, L.A. Pardi, L. Sorace, Multifrequency EMR and magnetic characterization of synthetic powdered hematite, *J. Phys. Chem. C* 112 (2008) 9988–9995.
- [27] M. Ikeya, New Applications of Electron Paramagnetic Resonance: ESR Dating, Dosimetry and Spectroscopy, World Scientific, Singapore, 1993.
- [28] F. Candura, Elementi di tecnologia industriale a uso dei cultori di medicina del lavoro, 2nd edition, Aurora, Pavia, 1974 (in Italian).

- [29] F.M. Wahl, R.E. Grim, R.B. Graf, Phase transformations in silica as examined by continuous x-ray diffraction, *Am. Mineral.* 46 (1961) 196–208.
- [30] M. Ghiazza, M. Tomatis, S. Doublier, F. Grendene, E. Gazzano, D. Ghigo, B. Fubini, Carbon in intimate contact with quartz reduces the biological activity of crystalline silica dusts, *Chem. Res. Toxicol.* 26 (2013) 46–54.
- [31] I. Fenoglio, M. Tomatis, D. Lison, J. Muller, A. Fonseca, J.B. Nagy, B. Fubini, Reactivity of carbon nanotubes: free radical generation or scavenging activity? *Free Radic. Biol. Med.* 40 (2006) 1227–1233.
- [32] J.J. Yin, F. Lao, P.P. Fu, W.G. Wamer, Y. Zhao, P.C. Wang, Y. Qiu, B. Sun, G. Xing, J. Dong, X.J. Liang, C. Chen, The scavenging of reactive oxygen species and the potential for cell protection by functionalized fullerene materials, *Biomaterials* 30 (2009) 611–621.
- [33] V. Vallyathan, J.H. Kang, K. Van Dyke, N.S. Dalal, V. Castranova, Response of alveolar macrophages to in vitro exposure to freshly fractured versus aged silica dust: the ability of Prosil 28 an organosilane material, to coat silica and reduce its biological reactivity, *J. Toxicol. Environ. Health* 33 (1991) 303–315.
- [34] V. Castranova, N.S. Dalal, V. Vallyathan, Role of surface free radicals in the pathogenicity of silica, in: V. Castranova, V. Vallyathan, W.E. Wallace (Eds.), *Silica and Silica-induced Lung Diseases*, CRC Press, Boca Raton, 1996, pp. 91–105.
- [35] N.S. Dalal, X. Shi, V. Vallyathan, Role of free radicals in the mechanisms of hemolysis and lipid peroxidation by silica: comparative ESR and cytotoxicity studies, *J. Toxicol. Environ. Health A* 29 (1990) 307–316.
- [36] Z. Zhang, H.M. Shen, Q.F. Zhang, C.N. Ong, Involvement of oxidative stress in crystalline silica-induced cytotoxicity and genotoxicity in rat alveolar macrophages, *Environ. Res.* 82 (2000) 245–252.
- [37] V. Vallyathan, V. Castranova, D. Pack, S. Leonard, J. Shumaker, A.F. Hubbs, J.L. McLaurin, Freshly fractured quartz inhalation leads to enhanced lung injury and inflammation. Potential role of free radicals, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 152 (1995) 1003–1009.
- [38] J.A. Holley, Y.M. Janssen, B.T. Mossman, D. Taatjes, Increased manganese superoxide dismutase protein in type II epithelial cells of rat lungs after inhalation of crocidolite asbestos or cristobalite silica, *Am. J. Pathol.* 141 (1992) 475–485.
- [39] Y.M. Janssen, J.P. Marsh, M.P. Absher, D. Hemenway, P.M. Vacek, K.O. Leslie, B.T. Mossman, Expression of antioxidant enzymes in rat lungs after inhalation of asbestos or silica, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 10625–10630.
- [40] I. Fenoglio, L. Prandi, M. Tomatis, B. Fubini, Free radical generation in the toxicity of inhaled mineral particles: the role of iron speciation at the surface of asbestos and silica, *Redox Rep.* 6 (2001) 235–241.
- [41] M. Tomatis, L. Prandi, S. Bodoardo, B. Fubini, Loss of surface reactivity upon heating amphibole asbestos, *Langmuir* 18 (2002) 4345–4350.
- [42] F. Turci, M. Tomatis, I.G. Lesci, N. Roveri, B. Fubini, The iron-related molecular toxicity mechanism of synthetic asbestos nanofibres: a model study for high-aspect-ratio nanoparticles, *Chem. Eur. J.* 7 (2011) 350–358.
- [43] L. Le Bouffant, H. Daniel, J.C. Martin, S. Bruyere, Effect of impurities and associated minerals on quartz toxicity, *Ann. Occup. Hyg.* 26 (1982) 625–634.
- [44] J.C. Martin, H. Daniel-Moussard, L. Le Bouffant, A. Policard, The role of quartz in the development of coal workers' pneumoconiosis, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 200 (1972) 127–141.
- [45] H.F. Ross, E.J. King, M. Yognathan, G. Nagelschmidt, Inhalation experiments with coal dust containing 5 percent, 10 percent, 20 percent and 40 percent quartz: tissue reactions in the lungs of rats, *Ann. Occup. Hyg.* 5 (1962) 149–161.
- [46] W.J. Ma, A.J. Ruys, R.S. Mason, P.J. Martin, A. Bendavid, Z. Liu, M. Ionescu, H. Zreiqat, DLC coatings: effects of physical and chemical properties on biological response, *Biomaterials* 28 (2007) 1620–1628.
- [47] L.A. Thomson, F.C. Law, N. Rushton, J. Franks, Biocompatibility of diamond-like carbon coating, *Biomaterials* 12 (1991) 37–40.
- [48] M. Ghiazza, M. Polimeni, I. Fenoglio, E. Gazzano, D. Ghigo, B. Fubini, Does vitreous silica contradict the toxicity of the crystalline silica paradigm? *Chem. Res. Toxicol.* 23 (2010) 620–629.
- [49] A.J. Ghio, R.H. Jaskot, G.E. Hatch, Lung injury after silica instillation is associated with an accumulation of iron in rats, *Am. J. Physiol.* 267 (1994) 1686–692.



Physico-chemical properties of quartz from industrial manufacturing and its cytotoxic effects on alveolar macrophages: The case of green sand mould casting for iron production



Francesco Di Benedetto^{a,b,*}, Elena Gazzano^{c,d}, Maura Tomatis^{d,e}, Francesco Turci^{d,e}, Luca A. Pardi^f, Simona Bronco^f, Gabriele Fornaciai^g, Massimo Innocenti^g, Giordano Montegrossi^b, Maurizio Muniz Miranda^g, Alfonso Zoleo^h, Fabio Capacciⁱ, Bice Fubini^{d,e}, Dario Ghigo^{c,d}, Maurizio Romanelli^a

^a Department of Earth Sciences, Università di Firenze, Firenze, Italy

^b Institute of Geosciences and Earth Resources (CNR-IGG), Florence, Italy

^c Department of Oncology, Università degli studi di Torino, Torino, Italy

^d "G. Scansetti" Interdepartmental Center for Studies on Asbestos and other Toxic Particulates, Università degli studi di Torino, Torino, Italy

^e Department of Chemistry, Università degli studi di Torino, Torino, Italy

^f Institute for Chemical and Physical processes (CNR-IPCF), Pisa, Italy

^g Department of Chemistry, Università di Firenze, Sesto Fiorentino, Italy

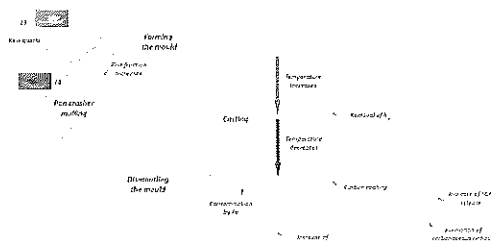
^h Department of Chemical Sciences, Università di Padova, Padova, Italy

ⁱ Health Agency of Florence, Firenze, Italy

HIGHLIGHTS

- Industrial processing of SiO₂ contributes to the variability of its hazard.
- Modifications affecting a SiO₂-rich sand in cast iron production were investigated.
- Numerous changes in sample morphology and surface reactivity were traced.
- No cellular responses were observed with the processed powder.
- Temperature change and contamination by C represent critical steps in the process.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 October 2015

Received in revised form 17 February 2016

Accepted 5 March 2016

Available online 7 March 2016

This paper is dedicated to the memory of Prof. Dario Ghigo, who recently passed away. We all remember our friend as a gifted teacher and a brilliant researcher and we hope he will continue to help us from the place where he is now.

ABSTRACT

Industrial processing of materials containing quartz induces physico-chemical modifications that contribute to the variability of quartz hazard in different plants. Here, modifications affecting a quartz-rich sand during cast iron production, have been investigated. Composition, morphology, presence of radicals associated to quartz and reactivity in free radical generation were studied on a raw sand and on a dust recovered after mould dismantling. Additionally, cytotoxicity of the processed dust and ROS and NO generation were evaluated on MH-S macrophages. Particle morphology and size were marginally affected by casting processing, which caused only a slight increase of the amount of respirable fraction. The raw sand was able to catalyze •OH and CO₂^{•-} generation in cell-free test, even if in a lesser extent than the reference quartz (Min-U-Sil), and shows h_{AI} radicals, conventionally found in any quartz-bearing raw materials. Enrichment in iron and extensive coverage with amorphous carbon were observed during processing.

* Corresponding author at: Department of Earth Sciences, Università di Firenze, Firenze (Italy), Via G. La Pira 4, I50121 Firenze, Italy.

E-mail address: francesco.dibenedetto@unifi.it (F. Di Benedetto).

Keywords:

Quartz
Hole and Al centres
EPR/ESEEM
Free radicals
Cytotoxicity
ROS
NO
Macrophages
Health effects
Carbon coating

They likely contributed, respectively, to increasing the ability of processed dust to release CO₂— and to suppressing *OH generation respect to the raw sand. Carbon coverage and repeated thermal treatments during industrial processing also caused annealing of radiogenic h₁ defects. Finally, no cellular responses were observed with the respirable fraction of the processed powder.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Professional exposure to quartz and cristobalite may cause relevant health effects, such as silicosis and lung cancer [1]. Lung diseases, however, do not occur in all occupational settings since biological effects depend on physico-chemical properties of quartz, which may differ from one dust to another and may be modified during industrial processing [2–4]. Grinding, heating, mixing are the most common processes that can be experienced by silica-bearing materials and several efforts have been addressed in the past to better understand their effects on the quartz toxicity. Nevertheless, to date, few data on properties and biological activity of the workplace silica dusts are available [5–9].

Foundries operating the sand casting of the cast iron are listed among the industrial sectors with the longest tracks of exposure to silica, and larger occurrence of silica-related diseases [10–14]. Moreover, this industrial sector has a high carcinogenic risk: beyond silica, workers being also exposed to formaldehyde, metallic smokes, asbestos, and organic products related to the combustion process. Accordingly, the IARC [15] rated the production of cast iron and steel as having a proven carcinogenicity for humans. This rate was successively verified through epidemiological studies [16–20].

The purpose of this study is to characterize a quartz-rich sand used in the “green sand” iron casting and investigate the main physico-chemical modifications, which occur during processing and may affect its toxicity [2].

The quartz rich sand, before enter in the industrial process and after mould demolition, was analysed to assess the changes in the speciation of inorganic radicals associated with quartz and in the potential to generate free radicals in cell-free environment. Free radicals generated by reactive sites at the silica surface (particle-derived free radicals) together with oxidant species produced by phagocytes (cell-derived ROS) are thought to play a significant role, namely during a late stage of toxicity of silica [21,22]. Inorganic radical speciation was carried out by Electron Paramagnetic Resonance (EPR) and Electron Spin Echo Envelope Modulation (ESEEM) spectroscopies. Free radical release was monitored by spin trapping technique associated to EPR spectroscopy. Changes in size and particle morphology, mineralogical composition, and amount of bioavailable iron were also evaluated.

The respirable fraction of the sand recovered after mould demolition was also tested for its ability in activating alveolar macrophages. Cytotoxicity and the potential to stimulate the production of Reactive Oxygen Species (ROS) and nitric oxide (NO) from cells were evaluated on a murine alveolar macrophage (MH-S) cell line and compared with cellular damage induced by Min-U-Sil, a fibrogenic quartz widely employed in experimental studies on silicosis and lung cancer.

2. Materials and methods

2.1. Sample description

The two considered samples belong to the processing line of the sand mould casting. In this process, cast iron coming from blast-furnace is introduced as raw material, melt and poured in moulds. These, in turn, are assembled by suitably modelling quartz (or quartz rich) sands. There are two ways to accomplish the mould assemblage by loose sands of mineral: pressing them (the so-called “green sand” procedure) or mixing them with resins, and then pressing and forming them. In both cases, after casting, sands are recovered by the demolition of the mould and by homogenisation in a pan crusher. Then, they are fed back into the industrial cycle, to prepare a new mould. If mixed with resins, sands undergo a thermo-mechanical treatment, the “regeneration”, to remove most of the residual resin, before being re-used.

The two sands, hereafter labelled as I3 and I4, were sampled at a foundry operating just with the “green sand” processing line, so they were not mixed with resins. I3 consists of raw quartz rich sands, sampled before they enter in the industrial process. Sands are white at the sight (Fig. S1). I4 consists of powder materials sampled in the industrial process point where sands, recovered after the mould demolition, were stocked. The only relevant difference is the colour, turned to black (Fig. S1). Both samples were considered in previous studies by our group [9,23].

2.2. Mineralogical investigation

The samples were characterised as concerns the particle morphology and the phase composition through a set of techniques well established in the solid state investigations. Micromorphological information was provided by the Scanning Electron Microscopy (SEM), whereas phase composition was obtained through the combined use of X-ray Powder Diffraction (XRPD), Fourier Transform Infrared spectroscopy in the Attenuated Total Reflectance mode (FTIR/ATR), and micro-Raman spectroscopy. Specific surface information was provided by the BET technique. Further experimental details are summarised in the Supplementary materials (Section B).

2.3. Speciation of inorganic radicals

The investigation of inorganic radicals was mainly performed through X-band EPR spectroscopy. In order to get a certain attribution of the radical species, three set of measurements were done: a preliminary survey through conventional continuous-wave (cw) EPR at room temperature, followed by a characterisation at 35 K, and by a set of measurements through pulsed EPR spectroscopy (field swept Echo-EPR and time-domain ESE experiments). The samples were analysed without any manipulation. Further details

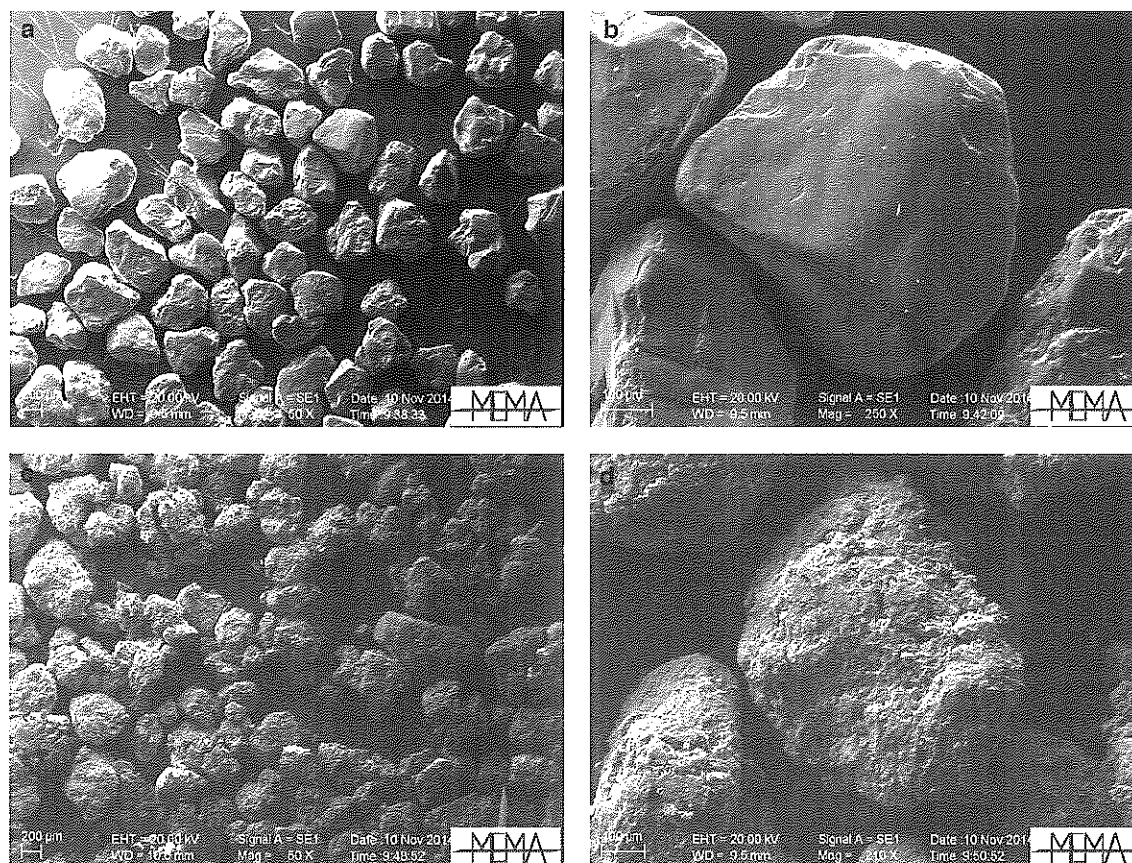


Fig. 1. Secondary electron micrographs of the I3 (a and b) and I4 (c and d) samples. The (a) and (c) micrographs were obtained at 50× (scale bar 200 μm), the (b) and (d) micrographs were obtained at 250× and 210×, respectively (scale bar 100 μm).

of the measurements are provided in the Supplementary materials (Section C).

2.4. Oxidative potential in cell free environment

Free radical generation ($\cdot\text{OH}$ and $\text{CO}_2^{\cdot-}$) was monitored by EPR spectroscopy using DMPO as trapping agent. Further technical details are given in the Supplementary materials (Section D).

2.5. Bio-available iron

The amount of removable ferrous and ferric ions on the sample surfaces was determined upon incubation of silica dusts in an aqueous solution containing ferrozine (a strong chelator specific for Fe^{2+} determination) or ferrozine and ascorbic acid, which fully reduces Fe^{3+} ions to Fe^{2+} , allowing the detection of total (Fe^{2+} and Fe^{3+}) removable iron. Details of the incubation procedure are provided in the Supplementary materials (Section E).

2.6. Cellular toxicity

Cytotoxicity was evaluated by measuring the release of LDH into the extracellular medium, and NO generation by quantifying the nitrite accumulation. DCFH-DA assay was used for the detection of intracellular ROS. All experiments were performed on murine alveolar macrophages (MH-S). Details are provided in the Supplementary materials (Section F).

3. Results

3.1. Mineralogical and chemical composition; granulometric distribution

In Fig. 1, the secondary electron micrographs obtained on the I3 and I4 samples are shown. Sample granulometry is conceivably high. Particles exceed 300 μm, thus allowing the classification of the samples as “fine sands”, according to the Udden-Wentworth grain scale [24]. Particles with a size considerably smaller are present only in I4 sample (Fig. 1c). This fine fraction is generated during the mulling step in the pan crusher. Both I3 and I4 showed a very low BET surface (0.9 and 1.1 m²/g respectively), in agreement with their large average diameter.

The SEM investigation of the I3 particles reveals sub-rounded edges and corners, and relatively smooth surfaces. This suggests that almost no recent new surfaces were created by any industrial pre-treatment of the sands. Conversely, the particle surface of I4 sample is no longer smooth. The roughness of the surface can be attributed to the partial covering by additional phases.

XRPD investigation of the I3 and I4 evidences the presence of quartz only (Fig. S2). Therefore, we can conclude that impurities added to the sample during or after the cast are in an amorphous state, or it can be considered below the detection limit of XRPD (under the adopted experimental conditions, 1 wt%).

The two vibrational spectroscopies were focused on the determination of the chemical nature of the coating. The ATR investigations (Fig. S3), while confirming the obvious presence of bands at $\sim 1000\text{ cm}^{-1}$ due to crystalline SiO_2 , rule out the

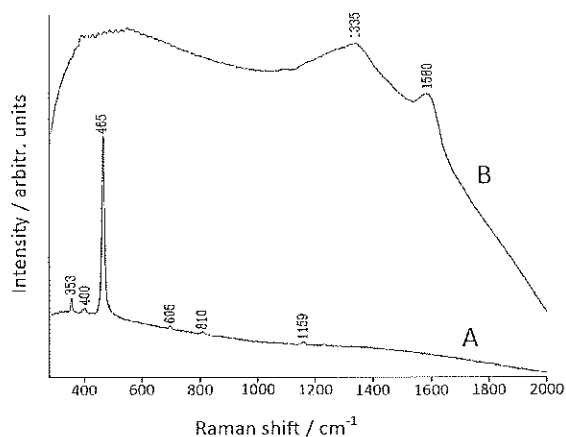


Fig. 2. Raman spectra of the A) I3 and B) I4 samples.

possible presence in the coating of any other component but crystalline/amorphous carbon. These latter species are weak and badly determined in FTIR, due to small changes in the dipole moment. The microRaman spectra of the I3 and I4 samples, shown in Fig. 2, are more informative. The I3 spectrum consists of some narrow bands (at 353, 400, 465, 695, 810 and 1159 cm^{-1}): all these bands can be safely attributed to modes arising from the SiO_2 crystal structure. In contrast, the spectrum of I4 reveals two marked features, a huge fluorescence background and the presence of two main bands at 1335 and 1580 cm^{-1} . These two bands can be attributed to the amorphous/graphitic carbon (whose reference band wavenumbers are 1360 and 1580 cm^{-1} , respectively). Namely, the first one is closely resembling that of the sp^3 carbon, the presence of which could thus be inferred, in admixture with some sp^2 carbon.

3.2. Speciation of inorganic radicals

The RT cw-EPR spectra of I3 and I4 samples are shown in Fig. 3. The spectrum of the I3 sample is characterized by the presence of three superimposed signals. The first line, definitely narrow (labelled I in Fig. 3a), is very common in all the investigated raw quartz materials [23] and is attributed to inorganic radicals. The second one, a broad line (II in Fig. 3a), is attributed to some metal impurity. A obvious attribution is to Fe(III) oxides, which often exhibit signals in this region. From the asymmetric shape, and the width of the line (~ 85 mT), a tentative attribution to Oxygen coordinated Cu(II) is also proposed. This is in agreement with the trace element analyses reported by Di Benedetto et al. [9]. The broad II line is probably tracing the contributions of both Fe(III) and Cu(II). The two lines, marked by arrows and labelled as III in Fig. 3a, are due to Fe(III) in a strong ligand field, in a highly crystalline surrounding. We attribute them to Fe in quartz, in agreement with the literature [25].

The spectrum of the I4 sample is characterized by the presence of two superimposed lines, both different from the formerly described. The main spectral line (IV in Fig. 3b) is a very broad (~ 106 mT in width), almost symmetric signal, whose features were already associated to Fe oxide crystalline or cryptocrystalline species [26]. In contrast, the V line (Fig. 3b) is very narrow and even more symmetric. The V line is attributed to radical species. Further details of the narrow lines of both samples are shown in Fig. 3c. Line II presents a peak-to-peak width of ~ 1.6 mT and a more asymmetric shape than line V, whose peak-to-peak width is ~ 1.0 mT.

Cw-EPR spectral investigation was also performed at 35 K, in order to confirm the spectral attribution of the radical species. The line II of the spectrum of I3 at low temperature shows the characteristic superhyperfine ^{27}Al and ^1H structure of the h_{Al} centre, already

described for this sample ([23]; Fig. S4). No evidence of further spectral contributions was provided, thus pointing to the attribution of the radical speciation of I3 to the h_{Al} centres only (within the minimum detection limit). In contrast, the V line of the spectrum of I4 does not reveal any hyperfine or superhyperfine structure at low temperature. The width of the signal, ~ 0.6 mT, is apparently reduced. The peak-to-noise ratio is ~ 1400 . On these bases, a final attribution of the V line to an inorganic or organic radical cannot be fostered. Nevertheless, the attribution of this line to one of the known radical species associated to quartz is ruled out [27].

In Fig. 4a, the Echo-EPR spectra of the two samples are shown. The spectrum of I3 consists of an asymmetric broad absorption signal, where parallel and perpendicular g components are estimated at 337 ($g_{\text{par}} = 2.050$) and 344 mT ($g_{\text{perp}} = 2.009$), respectively. The spectrum of I4 is characterized by the presence of a single narrow line, centred at 345.5 mT ($g \sim 2.00$), with a full width at half maximum of ~ 1.5 mT. The comparison of the EchoEPR spectra allows to better visualize the apparent difference in Zeeman anisotropy between the two species, as well as the difference in the position of their maxima.

To perform the 3-pulse time domain ESE spectra, the magnetic field value corresponding to the maximum intensity of each spectrum was applied. The results are shown in Fig. 4b. Both patterns consist of two spectral features: the decay of the signal in the time domain and the nuclear modulation pattern. The I3 sample exhibits a faint nuclear modulation up to ≈ 400 ns; its intensity decreases in the remaining time domain and it is masked by the background noise. The overall decay of the signal looks like a monotonous exponential law. In contrast, the pattern of I4 sample exhibits a nuclear modulation that persists in the whole investigated time domain with an almost constant intensity. Moreover, the decay of the signal follows a monotonous exponential law as well, but it is by far more rapid than that of I3 sample.

The ESEEM of the two spectra, extracted from the time-domain data of Fig. 4b by removing the decay of the 3P ESE, is shown in Fig. 5(a and b) together with the corresponding Fourier transforms (Fig. 5c and d). The ESEEM of the I3 spectrum was already investigated in a previous study [23] and it is assigned to the species h_{Al} , thus confirming the result obtained by cw data. The modulation pattern (Fig. 5a and c) can be attributed to protons coupled to the Al paramagnetic centre [23]. Conversely, the spectral features of the ESEEM of the I4 sample (Fig. 5b) cannot be related to the h_{Al} centre. The FT of I4 ESEEM (Fig. 5d) shows a strong peak at the frequency value corresponding to the Larmor frequency of 'free' protons, i.e. protons not chemically coupled to a paramagnetic centre, and located at distances where the dipolar coupling is almost negligible. A second feature is present at very low frequency values, corresponding to the large period of the experimental ESEEM of Fig. 5b. The origin of this contribution has been found by simulation procedure [23]; the best fit data (Fig. 5e) are obtained for a centre related via superhyperfine interaction to one surrounding ^{13}C nucleus at ~ 2.38 Å coupled by a Fermi constant $a_{\text{iso}} = 8.5$ MHz. Thus, we attribute the V line in Fig. 3b to an inorganic carbonaceous radical species.

3.3. Bio-available iron

Bio-available iron, which corresponds to iron ions that can be easily removed from the surface of the particles, was detected in relevant amount on the dust recovered after mould demolition. The amount of iron released in solution upon 72 h was 7.4 ± 0.8 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ (average of two separate experiments) and less than half of that was in the reduced form. Conversely, raw sand released only trace of iron in the oxidized form.

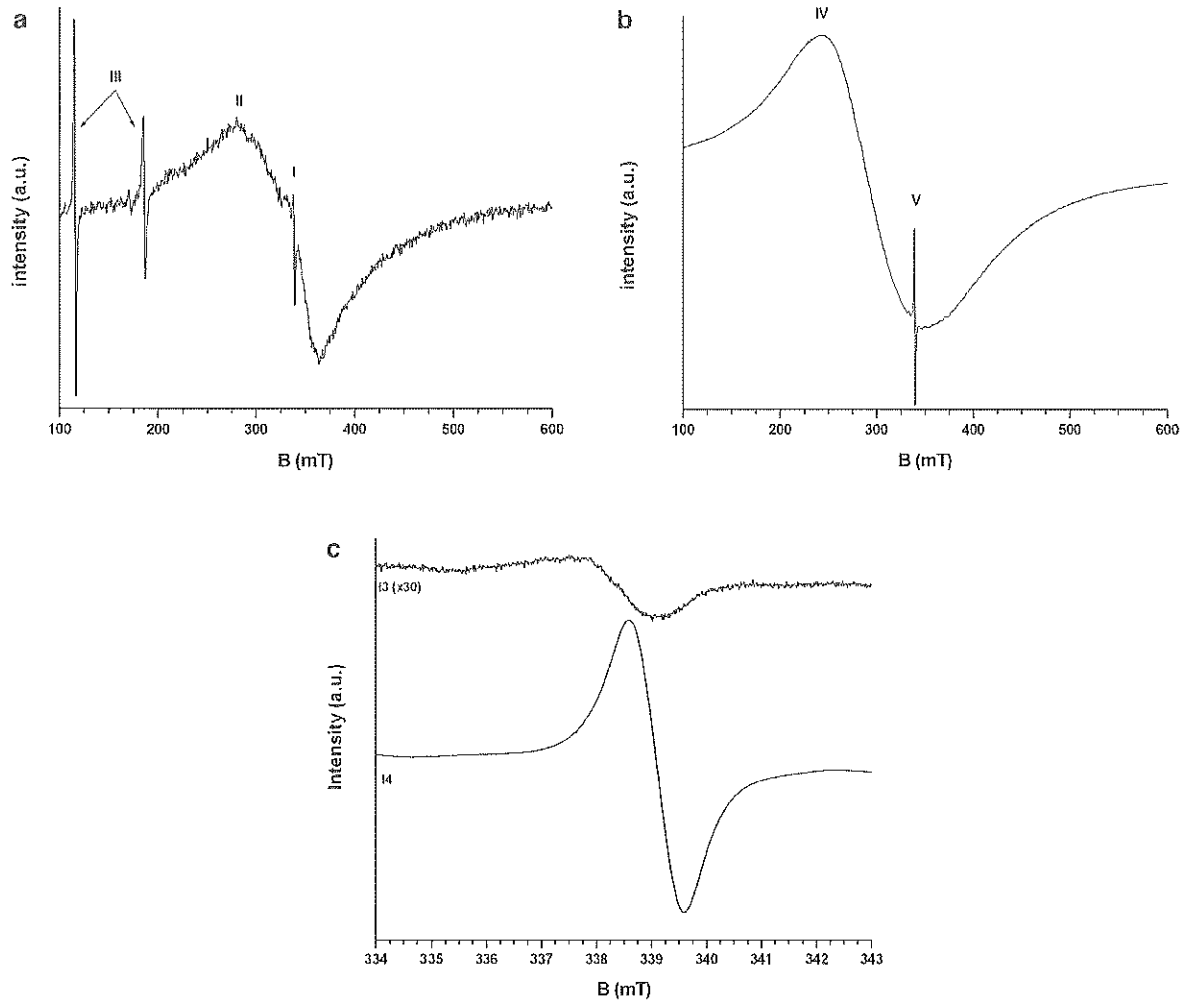


Fig. 3. Room temperature cw-EPR spectra of (a) the I3 sample, (b) the I4 sample, (c) detailed view of the radical lines in a) and b) spectra. To be plotted to the same scale, the II line of I3 in (c) is multiplied by a factor 30. Magnetic field values in milliTesla (mT), intensity in arbitrary units.

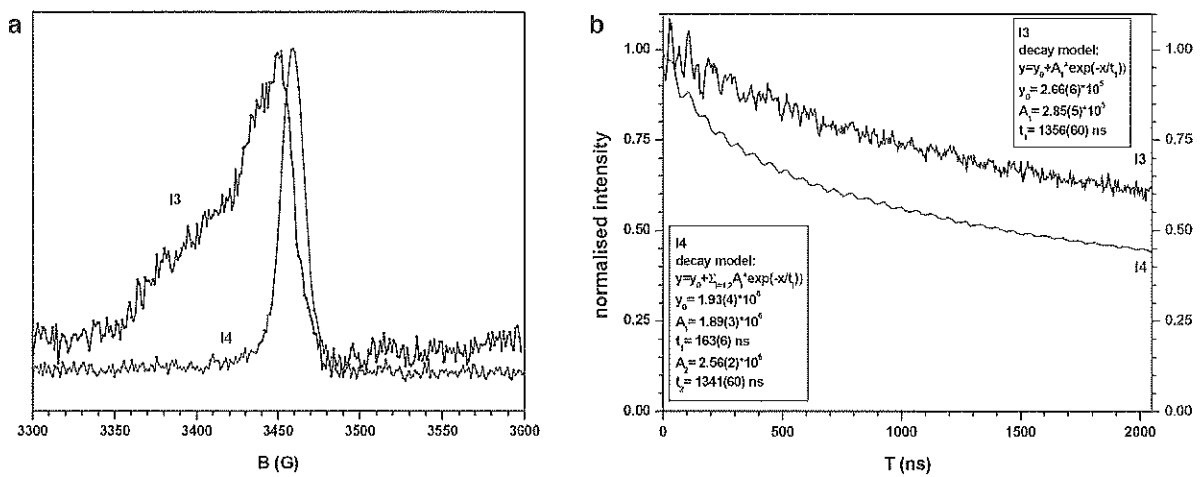


Fig. 4. (a) field swept Echo-EPR spectra registered after a 2-pulse sequence on the I3 and I4 samples; (b) time domain ESE decay pattern after a 3-pulse sequence on the I3 and I4 samples. In the insets, the results of the best least squares fit of the decay law, included the used function, are listed. Magnetic field values are expressed in Gauss. Time values are expressed in nanoseconds. Intensities are normalized.

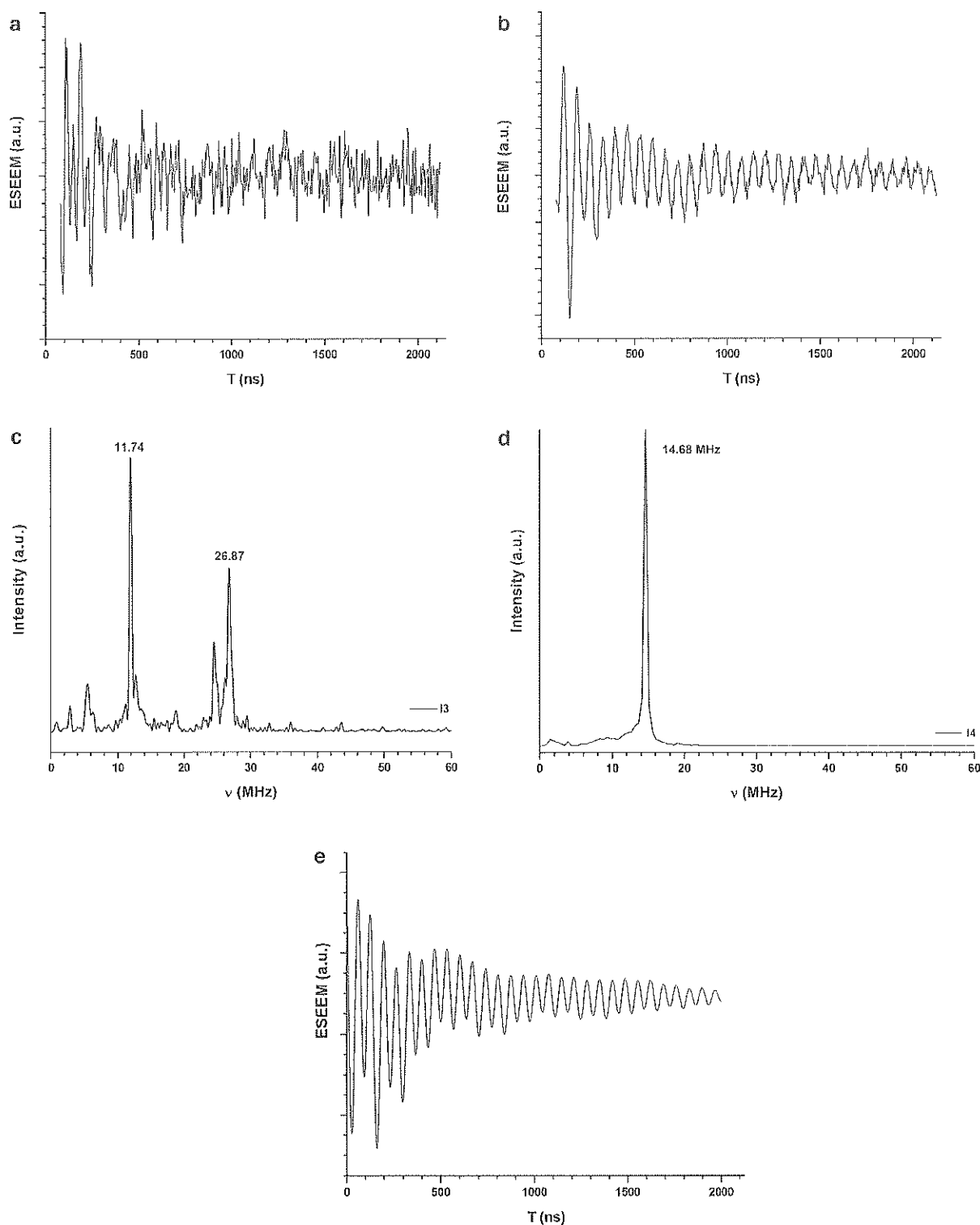


Fig. 5. (a) and (b) ESEEMs and (c) and (d) Fourier transforms of the spectra of the I3 and I4 samples, respectively. (e) Fourier transform of the ^{13}C simulated modulation. Time values are expressed in nanoseconds. Frequencies are expressed in MegaHertz. The plot in (c) is modified after Romanelli et al. [23].

3.4. Oxidative potential in cell-free conditions

Free radical generation of the two sands is shown in Fig. 6. Ability to catalyze: a) carboxyl radical ($\text{CO}_2^{\cdot-}$) release from the formate ion, used as "model" target molecule for homolytic cleavage of a carbon-hydrogen bond in endogenous molecules and b) hydroxyl

radical ($\cdot\text{OH}$) release in the presence of H_2O_2 , mimicking contact of particles with the lysosomal fluid of alveolar macrophages, were investigated.

Both samples were able to generate carboxyl radicals (Fig. 6a) in the presence of ascorbic acid, a reducing agent present in the lung lining fluid, whereas no activity was found in a non-reducing envi-

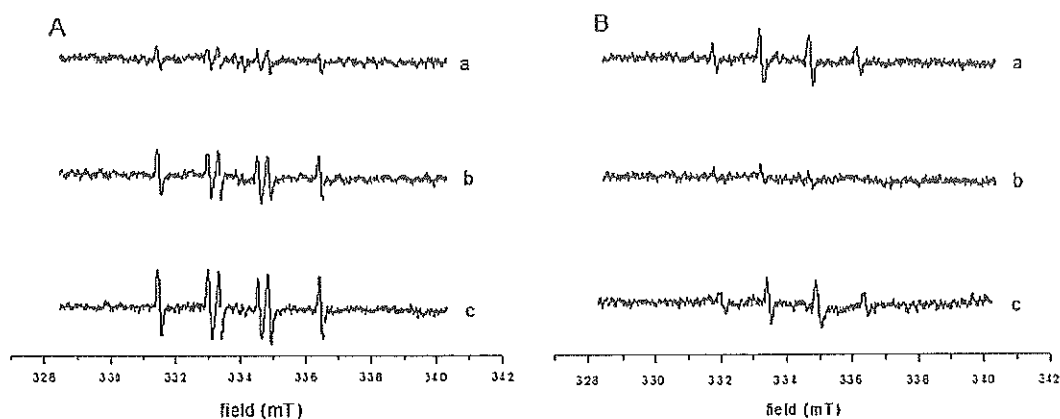


Fig. 6. Free radical generation from aqueous suspension of the raw sample and of the sample recovered after mould demolition. EPR spectra of $[\text{DMPO}-\text{CO}_2^-]$ ($a_N = 15.6\text{ G}$ and $a_H = 19\text{ G}$) (A) and $[\text{DMPO}-\text{OH}]$ ($a_N = a_H = 14.9\text{ G}$) (B) adducts of (a) raw sand (I3), (b) sand recovered after mould demolition (I4), and (c) reference quartz (Min-U-Sil). Hydroxyl radicals were obtained in the presence of H_2O_2 , while carboxyl radicals via homolytic cleavage of a C–H bond in the formate ions. All spectra have been collected after 60 min of incubation of the dusts with target molecules.

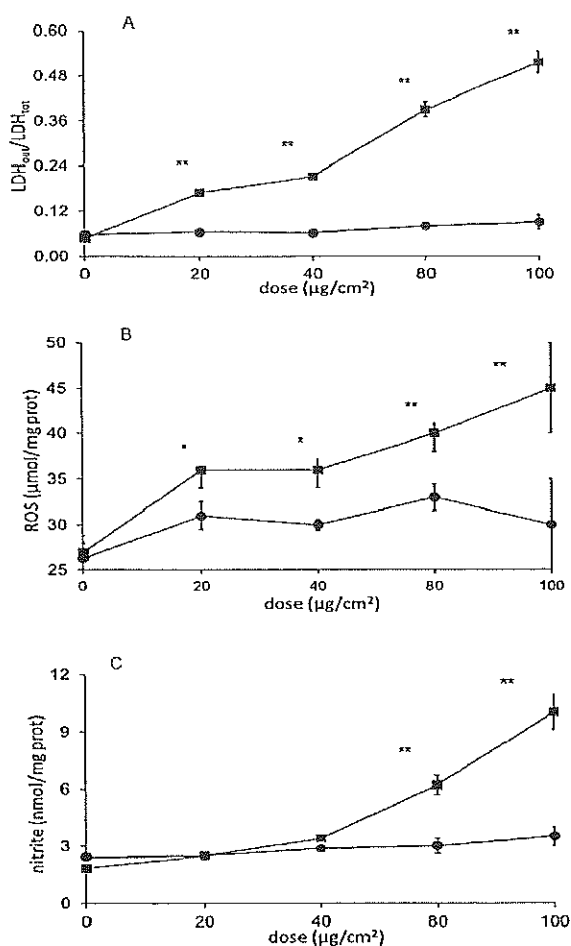


Fig. 7. Effect of I4 fine fraction on MH-S murine alveolar macrophage cells. MH-S cells were incubated for 24 h in the absence or presence of 20, 40, 80, 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of I4 fine fraction (●) Min-U-Sil quartz (■), used as reference quartz. (A) Cytotoxicity measured as LDH leakage following cell membrane damage, (B) ROS (reactive oxygen species) production and (C) NO (nitric oxide) production, measured as nitrite concentration. Data are presented as means \pm SE ($n = 3$). Vs CTRL: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

ronment (data not reported for brevity). The I4 sample was more reactive than the I3 sample, but less reactive than the reference quartz.

An opposite trend was observed for hydroxyl radical release. I3 generated $\cdot\text{OH}$ in a similar extent to Min-U-Sil quartz, whereas I4 was fully inactive (Fig. 6b).

3.5. Cellular tests

The fine fraction of the I4 sample was tested to evaluate the ability to induce a cytotoxic effect upon a 24 h incubation with murine alveolar macrophages. This fraction amounts to about 10% of the sample and contain particles with heterogeneous size. Several particles with irregular shapes, sharp edges and acute spikes (a morphology characteristic of silica dusts obtained by grinding) were observed (Fig. S5). FPIA analysis showed that about 90% of particles has circle equivalent (CE) diameter $< 5\ \mu\text{m}$ (the diameter of a circle with the same area of the particle). The CE average diameter and the modal value are $2.3 \pm 1.7\ \mu\text{m}$ and $1.35\ \mu\text{m}$ respectively.

Cellular damage was investigated only for sand recovered after mould demolition, because the raw sand does not contain relevant amount of fine particles (less than 1%). I4 was not cytotoxic and did not stimulate ROS or NO generation, at any of the concentrations tested, differently from Min-U-Sil quartz (Fig. 7).

4. Discussion

The quartz rich sand investigated in this study undergoes physical and chemical changes when used in the green sand casting. Sand size and morphology are only partially affected by the industrial process. At the beginning of the process, the sand consists of sub-rounded grains of quartz, with a mean dimension of $\sim 350\ \mu\text{m}$. Size distribution is only slightly affected by a small increase in the content of fine particle (up to 10%) at the end of the production. The morphology is preserved, the main difference consisting in a black carbonaceous coating. Covering of the quartz surface by the carbonaceous material is associated to a thermal shock undergone by the sands, which are kept in contact with a melt at $\sim 1150\ ^\circ\text{C}$ [28], and abruptly cooled down to room temperature. The SiO_2 , under these conditions, reaches the transition temperature from the α -quartz to the β -quartz structures, transition which is fully reversible as associated to a displacive polymorphism. Although transition from β -quartz to tridimite is also achievable (in this case involving an irreversible reconstructive polymorphism), the absence of tridimite in the XRPD pattern rules out this occur-

Table 1
Correlation between observed changes of properties in the cast iron production and biological effects.

| Physico-chemical features | Main modification occurred after casting process | Main correlation between physico-chemical properties and biological effects |
|---|---|--|
| Morphology | Increase in the surface roughness | Particle shape affects silica cytotoxicity. Irregular particles with sharp edges are more cytotoxic in alveolar macrophages than rounded particles [48] |
| Size | Slightly increase in the amount of respirable fraction | Particle size affects the lung deposition. Only small particles (<5 µm) reach the alveoli, larger particles are cleared by the mucociliary system |
| Chemical composition | Addition of carbon phase and iron contamination | Particle impurities and external phases may act in different ways. Extensive carbon coating may hinder surface radicals, suppress free radical generation, and modify the topography of silanol groups which are involved in the interaction with cell membrane. Quartz mixed with carbon resulted less fibrogenic [43] and less cytotoxic [30] than the same amount of pure quartz |
| Quartz radical Free radical generation | Annihilation of quartz radicals Suppression of the ability to release *OH radical in presence of H ₂ O ₂ , slight increase of the ability to catalyze CO ₂ * ⁻ release | Contamination with iron may enhance the ability of crystalline silica to generate free radicals [21] and result in acute pulmonary inflammation in rats [49]. Particle-derived radicals [5,33,34] with cell-derived radicals [22,36], contribute to oxidative stress observed in rat lung following exposure to quartz particles [21,37,39]. Oxidative stress contributes to the persistent inflammation and genotoxic effects in the lung parenchyma [15] |
| Bioavailable iron | Presence of bioavailable iron | Poorly coordinated, thus easily removable, iron ions at the particle surface may be involved in free radical generation. Moreover, alteration of iron homeostasis may contribute to cell damage [49] |

rence. This result is in line with those reported by Wahl et al. [29], who stated the impossibility to obtain tridimite simply by heating quartz.

The results of the vibrational spectroscopy measurements confirm that the coating consists mainly of carbon, prevailing in the sp³ hybridization. The intensity of the bands arising from lattice vibrations of graphite indicates most of the carbon occurring in an amorphous state. The source of C, in the specific case of the green sand casting, has to be found in the melt Fe alloy, which intrinsically contains C, and to which some more C is added to fulfil specific rheological requirements of the casting process. As a consequence, the abrupt lowering of the temperature after the cast causes the release of excess of both the intrinsic and added C towards the mould and it covers the sands in contact with the Fe alloy. This coating occurs at high temperature (T in the range 800–1200 °C). The role of the temperature has a drastic effect on the population of the radiogenic defects of quartz [27]. In fact, they are not stable at high temperature, and annealing at 500 °C is able to annihilate the majority of h_{AI} radical centres in quartz. We were not able to detect the EPR and ESE traces of h_{AI} centres in the I4 sample. Taking into account the intrinsic detection limits of the ESE technique, and the partial interference of the carbonaceous radical (Fig. 3a), we can assess that, if present, the fraction of h_{AI} centres could not exceed few % units of the initial population (in I3). Both the coating by amorphous C and the change of radical speciation are supposed to locally occur in regions of the mould that are in contact with, or very near to, the cast. The fact that a random sample of sands, as I4, does not present detectable h_{AI} centres can be attributed to the re-cycling of the used sands in the production line. The reuse of sands in subsequent passages of the same industrial process gives rise to a uniform exposure to C coating and to thermal shock.

Coating with carbonaceous material is related to the addition of a new radical species to the sands. The occurrence of this addition and of the annihilation of the h_{AI} species points to a complete change of speciation of the radical population in the quartz sands. Indeed, most of the long living, and also the short living radicals proper of the crystalline silica, are warmed up to temperatures at which they undergo annihilation and/or recombination [27]. In contrast, the carbonaceous radicals, added to the system, are stable even at the considered temperatures. With respect to this new radical, the quartz sands act only as a carrier. Carbon coating probably suppresses the potential of the raw sands to generate hydroxyl radicals in presence of H₂O₂. This effect was already observed in

two standard quartzes that lost their reactivity after grinding with carbon soot [30]. Metal transition ions and quartz surface radicals may be responsible for *OH release. Hiding these surface species, either in a non-specific way (by extensive coverage with an inert phase) or through specific interaction (e.g. between quartz surface radicals and radicals present on carbon surface) could account for the reduction in reactivity towards H₂O₂. Moreover, a scavenger activity of the carbon coating may also occur. Scavenging of *OH is, in fact, well documented in a number of carbon-based materials [31,32]. From this point of view, a reactivity played by the C coating also on some h_{AI} residual from the thermal annihilation, cannot be excluded.

Note that both surface radicals and silica-generated radicals [5,33,34] play a role in the induction of oxidative reactions leading to macrophage membrane damage [35], and contribute with cell-derived radicals [22,36] to the oxidative stress observed in lung following exposure to quartz particles [21,37–39].

Nor I3 neither I4 were able to generate carboxyl radical in the absence of a reducing agent, but when ascorbic acid was added to the reaction medium, both samples were activated, in agreement with the higher reactivity of Fe(II) than Fe(III) in the cleavage of C–H bond [40,41]. Opposite to *OH release, CO₂*⁻ generation was slightly higher for I4 than for I3 sample. This is due to the presence of poorly coordinated ions [42], accessible for reaction (bio-available iron) because of unsatisfied coordination valences, associated to the iron rich phase. One has to recall that a net enrichment in iron [9] occurs during the processing (Fig. 2). In this case, no scavenging effect towards carbon-centred radicals can be assumed.

Finally, despite the presence of quartz, I4 (fine fraction) was not able to induce a cytotoxic response or to stimulate ROS and NO generation in murine alveolar macrophages. The presence of the carbon coating, which modifies the silica surface, could account for the absence of cellular effects, as demonstrated for Min-U-Sil quartz loaded with carbon dust [30] and already suggested by an old study evidencing loss of biological activity when quartz is ground with coal dust [43–45]. Amorphous carbon per se shows low chemical reactivity, and does not induce cytotoxic effects [46] or inflammation responses [47] in macrophage cells. However, a possible effect of the high temperatures experienced by the sand during casting process, which contribute to annihilation of quartz radicals, may not be excluded. A synoptic view of the main correlations between changes in the physico-chemical properties and possible biological effects is shown in Table 1 and Fig. S6.

5. Conclusions and perspectives

As expected, some key physico-chemical characteristics relevant to quartz toxicity are modified during the green sand mould casting for iron production. The raw quartz material has a negligible respirable fraction, and contains radical species (i.e. h_{Al}) ubiquitarily observed in quartz [27]. The processed quartz is coated with amorphous carbon and contaminated by iron oxides, it has a moderate respirable fraction, and it shows an intriguing suppression of the original h_{Al} species accompanied by the occurrence of a new carbon-based radical. The presence of the carbon coating likely reduces the surface reactivity in terms of $\cdot OH$ generation with respect to the raw quartz, while contamination with the iron oxide may account for the slight increase in the generation of $\cdot CO_2^-$. Opposite to standard quartz, the respirable fraction of the processed quartz is not cytotoxic in murine alveolar macrophages. Interestingly, the absence of cytotoxic effect, the annealing of h_{Al} species, and the decreasing of the release of $\cdot OH$ species observed on the processed quartz, is counterbalanced by the increasing of bio-available iron, by the appearance of C-radicals and the increment of generation of $\cdot CO_2^-$ species. Even if the surface reactivity of the processed sample is lower than that of Min-U-Sil standard quartz, our results do not allow to exclude a potential toxicity and indicate once again that only a multi-technique approach need to be followed to correctly describe the potential harm of a particulate.

Author contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript. All authors contributed equally.

Funding sources

The authors acknowledge the Tuscany Administration for funding this research under the programmes “Progetto di ricerca per l'individuazione delle cause di variazione della reattività superficiale della silice cristallina, nei principali comparti di lavoro toscani, in relazione alla sua potenziale patogenicità” and “Progetto di ricerca per il controllo del rischio d'esposizione a silice libera cristallina (SLC) nei comparti lavorativi toscani, lo studio delle proprietà chimico-fisiche, morfologiche e biologiche delle polveri silicee in diversi comparti produttivi e lo studio dei meccanismi patogenetici e degli effetti dell'esposizione anche a basse dosi”.

Fibre image analysis has been obtained with the equipment acquired by the Interdepartmental Center “G. Scansetti” for Studies on Asbestos and Other Toxic Particulates with a grant from Compagnia di San Paolo, Torino, Italy. The Centro di Servizi di Microscopia Elettronica e Microanalisi (MEMA), University of Florence, is acknowledged for kindly granting the use of the Scanning Electron Microscopy, as well as Mario Paolieri and Maurizio Ulivi are acknowledged for their assistance in the same investigations.

The MIUR (Italy) is also acknowledged for the PRIN 2010/2011 project prot. 2010MKHT9B, as is the Italian CNR, for support. FDB, MR, MI also benefited for departmental funding (ex 60%).

The authors express their warmest thanks to four anonymous reviewers for their constructive suggestions and criticisms.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.03.016>.

References

- [1] WHO-IARC, A review of human carcinogens: arsenic, metals, fibres, and dusts, in: IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans 100C, WHO-IARC, Lyon, France, 2012.
- [2] B. Fubini, Surface chemistry and quartz hazard, *Ann. Occup. Hyg.* 42 (1998) 521–530.
- [3] K. Donaldson, P.J. Borm, The quartz hazard: a variable entity, *Ann. Occup. Hyg.* 42 (1998) 287–294.
- [4] K. Donaldson, V. Stone, R. Duffin, A. Clouter, R. Schins, P. Borm, The quartz hazard: effects of surface and matrix on inflammatory activity, *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 20 (Suppl. 1) (2001) 109–118.
- [5] B. Fubini, V. Bolis, A. Cavenago, M. Volante, Physicochemical properties of crystalline silica dusts and their possible implication in various biological responses, *Scand. J. Work Environ. Health* 21 (Suppl. 2) (1995) 9–14.
- [6] A. Clouter, D. Brown, D. Höhr, P. Borm, K. Donaldson, Inflammatory effects of respirable quartz collected in workplaces versus standard DQ12 quartz: particle surface correlates, *Toxicol. Sci.* 63 (2001) 90–98.
- [7] G.D. Cakmak, R.P.F. Schins, T. Shi, I. Fenoglio, B. Fubini, P.J.A. Borm, In vitro genotoxicity assessment of commercial quartz flours in comparison to standard DQ12 quartz, *Int. J. Hyg. Environ. Health* 207 (2004) 105–113.
- [8] B. Fubini, I. Fenoglio, R. Ceschino, M. Ghiazza, G. Martra, M. Tomatis, P.J.A. Borm, R. Schins, J. Bruch, Relationship between the state of the surface of four commercial quartz flours and their biological activity in vitro and in vivo, *Int. J. Hyg. Environ. Health* 207 (2004) 89–104.
- [9] F. Di Benedetto, F. D'Acapito, F. Capacci, G. Fornaciai, M. Innocenti, G. Montegrossi, W. Oberhauser, L.A. Pardi, M. Romanelli, Variability of the health effects of crystalline silica: Fe speciation in industrial quartz reagents and suspended dusts—insights from XAS spectroscopy, *Phys. Chem. Minerals* 41 (2014) 215–225.
- [10] M. Zhang, Y.D. Zheng, X.Y. Du, Y. Lu, W.J. Li, C. Qi, Z.L. Wu, Silicosis in automobile foundry workers: a 29-year cohort study, *Biomed. Environ. Sci.* 23 (2010) 121–129.
- [11] P.J. Landrigan, M.G. Chermiack, F.A. Lewis, L.R. Catlett, R.W. Hornung, Silicosis in a grey iron foundry. The persistence of an ancient disease, *Scand. J. Work Environ. Health* 12 (1986) 32–39.
- [12] R.I. Erhlich, D. Rees, A.B. Zwi, Silicosis in non mining industry on the Witwatersrand, *S. Afr. Med. J.* 73 (1988) 704–708.
- [13] D. Rees, R. Weiner, Dust and pneumoconiosis in the South African foundry industry, *S. Afr. Med. J.* 84 (1994) 851–855.
- [14] J. Gomes, O.E. Lloyd, N.J. Norman, P. Pahwa, Dust exposure and impairment of lung function at a small iron foundry in a rapidly developing country, *Occup. Environ. Med.* 58 (2001) 656–662.
- [15] WHO-IARC, Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs volumes 1 to 42, IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Humans (Suppl. 7) (1987) 1–440.
- [16] T. Sorahan, M.A. Cooke, Cancer mortality in a cohort of United Kingdom steel foundry workers: 1946–85, *Brit. J. Ind. Med.* 46 (1989) 74–81.
- [17] E.H. Hansen, A cohort mortality study of foundry workers, *Am. J. Ind. Med.* 32 (1997) 223–233.
- [18] P.G. Barbieri, S. Lombardi, A. Candela, R. Festa, L. Miligi, Epithelial naso-sinusal cancer incidence and the role of work in 100 cases diagnosed in the Province of Brescia (northern Italy), in the period 1978–2002, *Med. Lav.* 96 (2005) 42–51.
- [19] H. Westberg, H. Löfstedt, A. Seldén, B.G. Lilja, P. Nayström, Exposure to low molecular weight isocyanates and formaldehyde in foundries using hot box core binders, *Ann. Occup. Hyg.* 49 (2005) 719–725.
- [20] T. Hoshuyama, G. Pan, C. Tanaka, Y. Feng, L. Yu, T. Liu, L. Liu, T. Hanaoka, K. Takahashi, Mortality of iron-steel workers in Ashan, China: a retrospective cohort study, *Int. J. Occup. Environ. Health* 12 (2006) 193–202.
- [21] B. Fubini, A. Hubbard, Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis, *Free Radic. Biol. Med.* 34 (2003) 1507–1516.
- [22] V. Castranova, J.M. Antonini, M.J. Reasor, L. Wu, K. Van Dyke, Oxidant release from pulmonary phagocytes, in: V. Castranova, V. Vallyathan, W.E. Wallace (Eds.), Silica and silica-induced lung diseases, CRC Press, Boca Raton, 1996, pp. 185–195.
- [23] M. Romanelli, F. Di Benedetto, L. Bartali, M. Innocenti, G. Fornaciai, G. Montegrossi, L.A. Pardi, A. Zoleo, F. Capacci, ESEEM of industrial quartz powders: insights into crystal chemistry of Al defects, *Phys. Chem. Minerals* 39 (2012) 479–490.
- [24] S.J. Blott, K. Pye, Gradistat: a grain size distribution and statistics package for the analysis of unconsolidated sediments, *Earth Surf. Process Landforms* 26 (2001) 1237–1248.
- [25] S.U. Cortezão, W.M. Pontuschka, M.S.F. Da Rocha, A.R. Blak, Depolarisation currents (TSDC) and paramagnetic resonance (EPR) of iron in amethyst, *J. Phys. Chem. Solids* 64 (2003) 1151–1155.
- [26] C. Carbone, F. Di Benedetto, C. Sangregorio, P. Marescotti, L.A. Pardi, L. Sorace, Multifrequency EPR and magnetic characterization of synthetic powdered hematite, *J. Phys. Chem. C* 112 (2008) 9988–9995.
- [27] M. Ikeya, New Applications of Electron Paramagnetic Resonance: ESR Dating, Dosimetry and Spectroscopy, World Scientific, Singapore, 1993.
- [28] F. Candura, Elementi di tecnologia industriale a uso dei cultori di medicina del lavoro, 2nd edition, Aurora, Pavia, 1974 (in Italian).

- [29] F.M. Wahl, R.E. Grim, R.B. Graf, Phase transformations in silica as examined by continuous x-ray diffraction, *Am. Mineral.* 46 (1961) 196–208.
- [30] M. Ghiazza, M. Tomatis, S. Doublier, F. Grendene, E. Gazzano, D. Ghigo, B. Fubini, Carbon in intimate contact with quartz reduces the biological activity of crystalline silica dusts, *Chem. Res. Toxicol.* 26 (2013) 46–54.
- [31] I. Fenoglio, M. Tomatis, D. Lisou, J. Muller, A. Fonseca, J.B. Nagy, B. Fubini, Reactivity of carbon nanotubes: free radical generation or scavenging activity? *Free Radic. Biol. Med.* 40 (2006) 1227–1233.
- [32] J.J. Yin, F. Lao, P.P. Fu, W.G. Wamer, Y. Zhao, P.C. Wang, Y. Qiu, B. Sun, G. Xing, J. Dong, X.J. Liang, C. Chen, The scavenging of reactive oxygen species and the potential for cell protection by functionalized fullerene materials, *Biomaterials* 30 (2009) 611–621.
- [33] V. Vallyathan, J.H. Kang, K. Van Dyke, N.S. Dalal, V. Castranova, Response of alveolar macrophages to in vitro exposure to freshly fractured versus aged silica dust: the ability of Prasil 28 an organosilane material, to coat silica and reduce its biological reactivity, *J. Toxicol. Environ. Health* 33 (1991) 303–315.
- [34] V. Castranova, N.S. Dalal, V. Vallyathan, Role of surface free radicals in the pathogenicity of silica, in: V. Castranova, V. Vallyathan, W.E. Wallace (Eds.), *Silica and Silica-induced Lung Diseases*, CRC Press, Boca Raton, 1996, pp. 91–105.
- [35] N.S. Dalal, X. Shi, V. Vallyathan, Role of free radicals in the mechanisms of hemolysis and lipid peroxidation by silica: comparative ESR and cytotoxicity studies, *J. Toxicol. Environ. Health A* 29 (1990) 307–316.
- [36] Z. Zhang, H.M. Shen, Q.F. Zhang, C.N. Ong, Involvement of oxidative stress in crystalline silica-induced cytotoxicity and genotoxicity in rat alveolar macrophages, *Environ. Res.* 82 (2000) 245–252.
- [37] V. Vallyathan, V. Castranova, D. Pack, S. Leonard, J. Shumaker, A.F. Hubbs, J.L. McLaurin, Freshly fractured quartz inhalation leads to enhanced lung injury and inflammation. Potential role of free radicals, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 152 (1995) 1003–1009.
- [38] J.A. Holley, Y.M. Janssen, B.T. Mossman, D. Taatjes, Increased manganese superoxide dismutase protein in type II epithelial cells of rat lungs after inhalation of crocidolite asbestos or cristobalite silica, *Am. J. Pathol.* 141 (1992) 475–485.
- [39] Y.M. Janssen, J.P. Marsh, M.P. Absher, D. Hemenway, P.M. Vacek, K.O. Leslie, B.T. Mossman, Expression of antioxidant enzymes in rat lungs after inhalation of asbestos or silica, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 10625–10630.
- [40] I. Fenoglio, L. Prandi, M. Tomatis, B. Fubini, Free radical generation in the toxicity of inhaled mineral particles: the role of iron speciation at the surface of asbestos and silica, *Redox Rep.* 6 (2001) 235–241.
- [41] M. Tomatis, L. Prandi, S. Bodoardo, B. Fubini, Loss of surface reactivity upon heating amphibole asbestos, *Langmuir* 18 (2002) 4345–4350.
- [42] F. Turci, M. Tomatis, I.G. Lesci, N. Roveri, B. Fubini, The iron-related molecular toxicity mechanism of synthetic asbestos nanofibres: a model study for high-aspect-ratio nanoparticles, *Chem. Eur. J.* 7 (2011) 350–358.
- [43] L. Le Bouffant, H. Daniel, J.C. Martin, S. Bruyere, Effect of impurities and associated minerals on quartz toxicity, *Ann. Occup. Hyg.* 26 (1982) 625–634.
- [44] J.C. Martin, H. Daniel-Moussard, L. Le Bouffant, A. Policard, The role of quartz in the development of coal workers' pneumoconiosis, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 200 (1972) 127–141.
- [45] H.F. Ross, E.J. King, M. Yognathan, G. Nagelschmidt, Inhalation experiments with coal dust containing 5 percent, 10 percent, 20 percent and 40 percent quartz: tissue reactions in the lungs of rats, *Am. Occup. Hyg.* 5 (1962) 149–161.
- [46] W.J. Ma, A.J. Ruys, R.S. Mason, P.J. Martin, A. Bendavid, Z. Liu, M. Ionescu, H. Zreiqat, DLC coatings: effects of physical and chemical properties on biological response, *Biomaterials* 28 (2007) 1620–1628.
- [47] L.A. Thomson, F.C. Law, N. Rushton, J. Franks, Biocompatibility of diamond-like carbon coating, *Biomaterials* 12 (1991) 37–40.
- [48] M. Ghiazza, M. Polimeni, I. Fenoglio, E. Gazzano, D. Ghigo, B. Fubini, Does vitreous silica contradict the toxicity of the crystalline silica paradigm? *Chem. Res. Toxicol.* 23 (2010) 620–629.
- [49] A.J. Chio, R.H. Jaskot, G.E. Hatch, Lung injury after silica instillation is associated with an accumulation of iron in rats, *Am. J. Physiol.* 267 (1994) L686–692.

IL PROBLEMA SILICE ALLA LUCE DELLA NUOVA DIRETTIVA EUROPEA

Silice silicosi e cancro, dibattito "antico": convegno Padova 10 maggio 1985

Valutazione IARC del 1997 : la silice cristallina inalata in forma di quarzo o cristobalite, proveniente da sorgenti a carattere occupazionale, è cancerogena per l'uomo. Nella valutazione conclusiva la IARC rileva che la cancerogenicità per l'uomo non si manifesta in tutte le circostanze di lavoro studiate e ciò può dipendere da caratteristiche intrinseche della SLC o da fattori esterni in grado di influenzare la sua attività biologica.

La valutazione IARC non ha posto fine all'annoso dibattito su silice silicosi e cancro, viste le incertezze sugli effetti cancerogeni della silice, oltre che la grande diffusione della SLC in natura e le numerose circostanze, soprattutto lavorative, che possono esporre alla sua frazione respirabile.

La comprensione dei meccanismi alla base della variabilità degli effetti della SLC rappresenta una sfida per la ricerca scientifica, ma non può essere motivo di ridotta attenzione al controllo delle esposizioni.

Date queste premesse, nel 2002, in occasione di un altro convegno su silice, silicosi e cancro, tenutosi a Santa Margherita Ligure, un gruppo di professionisti, prevalentemente del sistema pubblico, medici del lavoro, igienisti industriali, tecnici della prevenzione crearono una rete, definitasi network italiano silice (NIS), per affrontare le difficili sfide legate alla misura dell'esposizione a silice ed all'applicazione di adeguate misure di prevenzione. La situazione era resa ancor più complessa dalla mancanza di un valore limite di esposizione definito per legge e dalla incertezza sul valore da adottare o da fare adottare, visto l'ampio range di valori proposti in letteratura ed il loro diverso significato sanitario. ACGIH aveva appena proposto 0.025 mg/m³ come valore in grado di prevenire il manifestarsi, quantomeno in misura epidemiologicamente rilevabile, di patologie correlate alla silice; la maggior parte degli Enti di prevenzione, compreso NIOSH e SCOEL, indicavano 0.05 mg/m³, come valore in grado di prevenire patologie silico correlate nella maggior parte della popolazione esposta; le regolamentazioni della maggior parte dei paesi industrializzati indicavano 0.1 mg/m³; in USA tale valore solo nel 2016 sarebbe stato dimezzato da OSHA, adottando 0.05 mg/m³, non senza opposizione da parte dell'industria, contro la quale si è espressa la Corte d'Appello della Columbia che lo ha confermato.

Nel 2002 il NIS, con l'appoggio degli Istituti Centrali (INAIL CONTARP, ISS, ISPESL), è stato individuato dal Coordinamento delle Regioni, come gruppo tecnico sul tema della silice.

L'attività del NIS si è svolta per gruppi di lavoro tematici:

normativa

epidemiologia e ricerca

igiene industriale

sorveglianza sanitaria

Buone prassi

ceramica (piastrelle, sanitari, artistica)

edilizia

fonderie in terra di seconda fusione

gallerie

estrazione e lavorazione lapidei

Il risultato di questo lavoro ha portato alla pubblicazione, curata dalla Regione Toscana, dei documenti preparatori per le Linee Guida nell'esposizione professionale a silice libera cristallina ed alla predisposizione di buone prassi, messi a disposizione sul sito NIS (oggi ospitati da INAIL nella sezione "Conoscere il rischio). Questo materiale fu presentato e discusso in occasione del Convegno di Firenze nel settembre del 2005, ma non ha mai completato il percorso definito dal dlgs 81/08 per l'approvazione di linee guida e buone prassi attraverso la *Commissione Consultiva permanente per la salute e sicurezza sul lavoro*, prevista dall'art. 6. Purtroppo l'impegno della Commissione su questo fondamentale aspetto per la costruzione di regole tecniche condivise non è mai stato sufficiente.

Al Convegno di Firenze, particolare interesse lo sollevò il contributo della prof.ssa Bice Fubini del Centro Scansetti di Torino, che portò la sua esperienza di ricercatrice sulla questione della variabilità degli effetti della silice. Da quell'intervento nacque una proficua collaborazione con il NIS, che ha contribuito alla ricerca curando, in particolare, il rapporto con il territorio. Altri centri si sono impegnati in questa direzione, sempre grazie allo stimolo dal NIS: i Dipartimenti di Chimica e di Scienza della Terra dell'Università di Firenze lavorano ancora oggi in rapporto con l'Università di Torino con l'obiettivo comune di aggiungere qualche tassello al complesso mosaico che caratterizza la patogenicità delle silici. L'interesse del NIS nasce dalla convinzione che la comprensione di questi meccanismi possa contribuire a spiegare le apparenti contraddizioni degli studi epidemiologici e facilitare gli interventi di prevenzione. Lo studio delle caratteristiche Mineralogiche e Spettroscopiche dei campioni di comparto, provenienti da fasi diverse del ciclo di lavorazione, raccolti grazie al coordinamento del NIS, può produrre informazioni utili alla comprensione dei meccanismi di interazione tra SLC e tessuti. I meccanismi indagati includono la presenza e tipologia di radicali associati ai materiali e la presenza e speciazione di specifici ioni (Al, Fe), noti per modulare la tossicità attraverso cicli catalitici (ad es. Fenton).

Grande attenzione è stata rivolta alla lavorazione delle pietre artificiali, responsabili del più importante cluster di silicosi recentemente descritto in vari paesi (Israele, Spagna, USA e in Italia in Piemonte, Veneto e Toscana). I risultati finora pubblicati giustificano una particolare attenzione per

questo tipo di esposizione. Le polveri respirabili che si liberano dalla lavorazione delle pietre artificiali, infatti, sono risultate forti attivatori di marker di fibrosi; la presenza di ioni metallici di transizione ad attività redox, oltre che l'elevata quantità di quarzo nella pietra artificiale, sono responsabili della forte attività ossidativa; anche in questo caso si conferma l'osservazione che la reattività è assai maggiore nelle polveri abrasi di fresco.

Sono state esaminate anche le terre di fonderia, per le quali l'abbondante contaminazione da parte di Carbonio amorfo, comporta completa distruzione della speciazione radicalica preesistente (radicali associate alla SLC) e aggiunge specie radicaliche proprie; lavoratori esposti a differenti stadi del processo industriale possono essere in contatto con polveri aerodisperse differenti per proprietà chimico-fisiche.

Sono tuttora in corso ulteriori ricerche sulla Pietra sintetica e sulla SLC in campioni di tessuto polmonare

I più recenti risultati pubblicati su questi argomenti sono i seguenti:

- C Pavan, M. Polimeni, M. Tomatis, I Corazzari, F. Turci, D. Ghigo e B. Fubini. *Abrasion of artificial stones as a new cause of an ancient disease, Physicochemical feature and cellular responses*. Toxicological Sciences, 153(1), 2016, 4-17
- F.Di Benedetto, E. Gazzano, M. Tomatis, F. Turci, L. Pardi, S.Bronco, G.Fornaciai, M. Innocenti, G.Montegrossi, M M Miranda, A. Zoleo, F. Capacci, B. Fubini, D.Ghigo, M. Romanelli. *Physico-Chemical properties of quartz from industrial manufacturing and its cytotoxic effects on alveolar macrophages: the case of green sand mould casting for iron production*. J.Haz.Mat. 312 (2016) 18-27.
- C.Pavan, B.Fubini. *Unveiling the variability of "quartz hazard" in light of recent toxicological findings* Chem. Res. Toxicol.. 2017, 30, 469-485

Normativa

La IARC ha confermato la sua valutazione di cancerogenicità con la monografia 100C del 2009, mentre in Europa, la lunga discussione sulla regolamentazione del rischio lavorativo da silice, sulla cancerogenicità e sul VLE è giunta a termine nel 2017 con la pubblicazione della direttiva comunitaria che modifica la precedente direttiva cancerogeni. Come noto le lavorazioni che espongono a SLC sono classificate fra quelle cancerogene ed è definito un VLE di 0,1mg/m³ per la SLC in frazione respirabile. L'attenzione è concentrata dunque sulle lavorazioni che comportano rischio di esposizione a SLC in frazione respirabile (nella traduzione italiana c'è un errore nella nota 78 dell'allegato III che riporta polvere *inalabile* al posto di *respirabile*, errore già segnalato alla Commissione per la correzione).

La direttiva richiede di organizzare le lavorazioni che possono esporre a polveri respirabili di SLC

in cicli chiusi, ma poiché la gestione delle esposizioni è spesso difficile, sottolinea che *gli orientamenti e gli esempi di buone prassi elaborati dalla Commissione, dagli Stati membri o dalle parti sociali o altre iniziative, quali l'«accordo di dialogo sociale sulla protezione della salute dei lavoratori attraverso la manipolazione e l'uso corretti della silice cristallina e dei suoi prodotti» (NEPSi), costituiscono strumenti preziosi e necessari per integrare le misure normative e, in particolare, per sostenere l'efficace applicazione dei valori limite, e dovrebbero pertanto essere tenuti debitamente in conto. Essi comprendono misure tese a evitare o ridurre al minimo l'esposizione quali, nel caso della silice cristallina respirabile, l'abbattimento ad acqua delle polveri affinché queste non siano aerodisperse.*"

E' importante richiamare i casi della microfusione a cera persa (orafi e odontotecnici), della sabbiatura del denim e della lavorazione della pietra artificiale, che rappresentano i più recenti esempi di *cluster* di silicosi insorti in condizioni d'esposizione facilmente prevenibili: il ciclo chiuso adottato nella preparazione dei così detti "gessi" per formare (in realtà un preparato in polvere ad elevato contenuto in cristobalite) ha eliminato il problema nelle microfusioni a cera persa, dopo il rilievo di casi di silicosi evidenziati sul finire degli anni '90, nel distretto orafico aretino. Diverso il destino della sabbiatura del Denim, per la quale la soluzione avrebbe potuto essere quella di sostituire il quarzo con prodotti esenti da silice o con nuove tecnologie come il laser, piuttosto che esportare la lavorazione a rischio, come è avvenuto, in paesi meno "attenti", dapprima in Turchia dove sono stati descritti circa 40 casi di silicosi molto grave prima che questa lavorazione venisse vietata e migrasse verso altri paesi, come Cina, India, Bangladesh, ecc.. Per la pietra artificiale, la consapevolezza del rischio e l'applicazione di buone prassi durante la lavorazione dell'articolo avrebbe scongiurato il rischio.

Il valore limite di esposizione definito dalla direttiva di 0.1 mg/m³, è da considerare transitorio e nell'articolato se ne prevede la revisione alla luce di quanto segnalato dagli Stati sul grado di attuazione della direttiva: *"Nel quadro della prossima valutazione dell'attuazione della presente direttiva nell'ambito della valutazione di cui all'articolo 17 bis della direttiva 89/391/CEE, la Commissione valuta inoltre la necessità di modificare il valore limite per la polvere di silice cristallina respirabile. La Commissione propone, se del caso, le modifiche necessarie relativamente a tali sostanze." Questo significa che a fronte delle relazioni sull'attuazione della normativa da parte degli Stati, la Commissione potrà decidere aggiornamenti sul valore limite*" (Articolo 1 comma 3).

Il recepimento della direttiva in Italia è previsto entro il 17 gennaio 2020 e potrà già avvenire adottando valori limite più cautelativi. Presso ECHA è attiva una proposta di classificazione armonizzata presentata dalla Francia per la silice cristallina: quarzo, tridimite e cristobalite, ancora priva dei documenti tecnici.

Il quadro complessivo è oggi meglio definito che in passato e il controllo del rischio SLC nei luoghi di lavoro richiederà l'applicazione del Capo II del Titolo IX del dlgs 81/08, relativo alla protezione da agenti cancerogeni e mutageni. Attualmente però, nelle more del recepimento normativo, l'applicazione del capo II rimane una opzione, quantomai opportuna ma non obbligatoria. Le differenze di protezione fra l'applicazione del Capo I o II del Titolo IX non sono poi così elevate. Le questioni più spinose, almeno dal punto di vista applicativo, riguardano il monitoraggio delle esposizioni tramite campionamenti e l'attivazione del registro degli esposti. Sono questioni molto correlate fra loro, perché la registrazione degli esposti richiede anche la registrazione dell'esposizione in termini di dose ponderata, soprattutto al fine di mettere in atto le misure di prevenzione che possono permettere di togliere i lavoratori esposti dal registro. Sull'argomento, vale la pena richiamare alcune delle posizioni espresse dal Gruppo Cancerogeni del Coordinamento delle Regioni, che aiutano ad affrontare alcune questioni preliminari, da cui derivano impegni e responsabilità specifiche, fra cui la sorveglianza sanitaria e la registrazione degli esposti:

- quando si può dire che in un'azienda esista una esposizione a rischio cancerogeno di tipo professionale, anche solo potenziale?
- quando l'esposizione professionale ad un cancerogeno va considerata sicuramente pericolosa per la salute dei lavoratori?

La risposta, anche da parte dell'organo di vigilanza, può risultare indebitamente rassicurante o, all'opposto, burocratica, forse formalmente corretta, ma sostanzialmente inappropriata ed orientata ad imporre obblighi senza alcuna efficacia preventiva e non condivisi. E' compito dell'organo di vigilanza cimentarsi non solo sulla correttezza formale di ciò che si impone, ma anche sulla sua appropriatezza, oltre che sulla condivisione da parte degli altri attori della prevenzione, affinché sia realmente strumento di prevenzione.

Premessa indispensabile è che ogni ragionamento sugli esposti reali o potenziali a cancerogeni deve essere preceduto dall'applicazione delle misure generali di prevenzione e solo dopo ci si dovrà chiedere se esiste ancora un rischio residuo d'esposizione a cancerogeni e se rimangono fonti di generazione o diffusione, anche solo potenziale, di agenti cancerogeni. In altri termini dobbiamo chiederci se il rischio residuo prefigura un'esposizione dei lavoratori maggiore rispetto a quella della popolazione generale di riferimento, non professionalmente esposta. Rispondere a questa domanda non è facile e richiede di avere accesso a:

1. dati sui livelli di esposizione di gruppi o popolazioni, omogenei per caratteristiche personali, geografiche, ambientali con quelli dei lavoratori in esame.
2. dati di esposizione relativi ai lavoratori della ditta in questione

Su queste basi è possibile stabilire se i lavoratori sono:

- potenzialmente esposti: rischio di esposizione ma, al momento, non risultano incrementati i

valori di esposizione propri della popolazione di riferimento

- professionalmente esposti: documentato eccesso di esposizione nel luogo di lavoro rispetto a quello presente in una popolazione confrontabile, non professionalmente esposta.

Oltre alla frequente mancanza di dati di riferimento, non è sempre facile valutare l'entità dell'esposizione, anche per i lavoratori, in termini di frequenza-durata ed intensità delle esposizioni. Per quanto riguarda la valutazione frequenza-durata, un gruppo di autori ha proposto di definire **esposizione sporadica**, quella che risponde ai seguenti 3 requisiti (AA.VV. SNOP 2/9/2016: Applicazione degli artt. 236, 242, 243 e 244 del Dlgs 81/08. *Valutazione dell'esposizione ad agenti cancerogeni e del rischio che ne consegue. Indicazioni per la classificazione dei lavoratori come "professionalmente esposti ad agenti cancerogeni", la loro conseguente registrazione e lo svolgimento di programmi di sorveglianza sanitaria ad hoc. La questione degli ex esposti ad agenti cancerogeni negli ambienti di lavoro*):

- non più di 60 ore in un anno solare
- non più di 4 ore/die per singola occasione di esposizione
- non più di due occasioni di "esposizione" al mese

Per quanto riguarda, invece, il concetto di **esposizione di debole intensità**, in presenza di un *range* di valori di riferimento sui livelli di inquinamento in popolazioni non esposte professionalmente, possiamo considerare esposizione professionale di debole intensità quella che è sicuramente inferiore al valore superiore di tale range. Se non disponiamo di valori di riferimento, il gruppo di autori afferma che sia sufficiente rintracciare sul luogo di lavoro una quantità anche minima di un cancerogeno che può oggettivamente essersi liberato dal ciclo di lavoro per considerare professionalmente esposti i lavoratori interessati.

Esposizioni sporadiche di debole intensità permettono, dunque, di considerare i lavoratori non professionalmente esposti.

Per quanto arbitraria, la definizione mette ben a fuoco il problema e può costituire un indirizzo, anche se rimangono in ombra altri aspetti, come la finalità della registrazione e le potenzialità della sorveglianza sanitaria in considerazione del rischio specifico legato ai vari cancerogeni.

Cercando di condurre questo ragionamento sul rischio SLC, si rileva che, nonostante l'ampia diffusione in natura della SLC, non esistono, a mia conoscenza, dati sulle esposizioni ambientali della popolazione e, pertanto, il solo rilievo della presenza di silice dovrebbe far scattare gli obblighi di registrazione e sorveglianza sanitaria. Credo, invece, che il TLV ACGIH di 0.025 mg/m³, visto il suo significato sanitario di assenza di malattia, potrebbe costituire un corretto cut-off con il significato di fattore di qualità utile a stimolare alla riduzione delle esposizioni ben al di sotto del VLE approvato.

Sorveglianza sanitaria

Il Gruppo di lavoro del NIS sulla sorveglianza sanitaria ha prodotto un documento nel quale, più che un protocollo sanitario, si cerca di proporre un metodo per organizzare la sorveglianza sanitaria, fondato sulla conoscenza delle esposizioni nel tempo e dei meccanismi di sviluppo dei relativi danni da lavoro. La silice si presta a questo esercizio che vorrebbe aiutare i medici competenti ad evitare alcuni vizi che spesso affliggono la sorveglianza sanitaria, più orientata verso protocolli di tipo “difensivo”, che non alla prevenzione e promozione della salute nei luoghi di lavoro.

Il documento NIS richiama l'importanza di una precisa ricostruzione dell'esposizione nell'impostazione della sorveglianza sanitaria e nella scelta della sua attivazione, percorsi diagnostici mirati al rischio e propone collaborazione fra medici competenti e strutture pubbliche di prevenzione.

Valutazione dell'esposizione

Nel protocollo si richiamano i criteri per l'analisi dell'esposizione ed il significato della sua intensità, frequenza e durata in funzione dei danni attesi, partendo dal presupposto che il principale obiettivo del medico competente, sia la collaborazione all'applicazione delle misure generali di controllo delle esposizioni, attraverso la partecipazione attiva al processo di valutazione e di gestione dei rischi. Il documento di valutazione dei rischi deve fornire al medico competente gli elementi necessari per correlare gli accertamenti sanitari al rischio, con la consapevolezza che, sia nel caso degli agenti chimici pericolosi che di quelli cancerogeni o mutageni (titolo IX (sostanze pericolose) capo I e II), la sorveglianza sanitaria entra (artt. 225, 242 e 236 dlgs 81/08) fra le *misure specifiche di protezione e di prevenzione* ed è, pertanto, da adottare nel caso che le misure generali non siano state sufficienti a dare garanzie di riduzione del rischio. Anche la Commissione per gli Interpelli (di cui all'art. 12 del dlgs 81/08), intervenuta su questo argomento su richiesta dalla Federazione Nazionale degli Ordini dei Medici, ricorda che il medico competente nell'ambito della sua attività “*prima di redigere il protocollo sanitario deve avere una conoscenza dei rischi presenti e quindi deve collaborare alla valutazione dei rischi*”, non solo nella prima fase di valutazione, ma anche quando a valutazione già eseguita, ne deve prendere atto in maniera critica e non formale.

Nonostante i principi sopra richiamati, la materia dell'igiene industriale applicata alla sorveglianza sanitaria non è diffusamente utilizzata e si preferisce adottare protocolli ridondanti, piuttosto che tenere conto della valutazione delle esposizioni attuali e/o pregresse in termini d'intensità, durata, modello (acuto, subacuto, cronico, intermittente) e dei loro adeguati descrittori, quali la misura o stima dell'esposizione ponderata e/o della dose cumulativa. L'adozione di protocolli eccessivi, ritenuti più cautelativi dal punto di vista medico legale, porta invece ad un aggravio di accertamenti non utili alla ricerca di malattie professionali e neppure come strumento di indirizzo e monitoraggio

delle iniziative tecniche, organizzative e procedurali di prevenzione da mettere o già messe in atto per la tutela della salute.

I dati aggregati sanitari e di rischio dei lavoratori sottoposti a sorveglianza sanitaria inviati dai medici competenti ai sensi dell'art. 40 del dlgs 81/08 (allegato 3b), dimostrano quanto l'uso a fini epidemiologici di queste informazioni sia limitato dal fatto che la reale esposizione di quei gruppi di lavoratori non è correttamente valutata e la ricerca degli eventuali danni, consistenti spesso in malattie a bassa frazione eziologica occupazionale, è viziata dalla mancanza del principale elemento diagnostico rappresentato proprio dalla dimostrazione di un'esposizione efficace.

Accertati il rischio d'esposizione e l'opportunità di attivare un programma di sorveglianza sanitaria, quest'ultimo deve garantire particolare accuratezza e qualità diagnostica, sia per cogliere segni precoci di danno, spesso ignorati più di quanto la lunga storia della silice possa giustificare, sia per non indurre inutili allarmi e limitazioni d'idoneità, talvolta più dannose per il lavoratore della stessa esposizione. Dietro i già citati casi di silicosi è sempre stata individuata una sorveglianza sanitaria disattenta ed inadeguata.

E' ben nota la scarsa attenzione dei medici verso la possibile eziologia professionale delle patologie; indagini su casistiche ospedaliere condotte su patologie attribuibili alla silice (ma il discorso potrebbe essere valido per molte altre patologie), mostrano che quasi mai compare una minima anamnesi lavorativa. Le indagini d'igiene industriale, in Italia come all'estero, indicano un numero ancora elevato di esposti, in particolare nel settore delle costruzioni. La latenza della silicosi per esposizioni quali quelle oggi ipotizzabili nei settori a rischio, suggerisce che al momento del suo manifestarsi questi lavoratori non siano più esposti né sottoposti a sorveglianza sanitaria ed i quadri patologici sfuggano, siano diversamente diagnosticati o siano riconosciuti tardi, in occasione di accertamenti eseguiti per altre cause. Da queste considerazioni emerge la necessità di un diverso rapporto fra medici competenti e Dipartimenti di Prevenzione, orientato a sostenere la crescita di qualità della sorveglianza sanitaria e la continuità degli accertamenti nei casi in cui è indicato il loro proseguimento anche dopo la cessazione dell'esposizione.

Il servizio pubblico dovrebbe saper sostenere il medico competente di fronte al datore di lavoro quando le sue scelte sono orientate all'efficacia e non all'osservanza formale della norma; per fare questo al sistema pubblico di prevenzione è richiesta autorevolezza, che può essere raggiunta solo attraverso l'adozione di strumenti di lavoro condivisi: le azioni di controllo orientate alla verifica della qualità della sorveglianza sanitaria devono fondarsi su orientamenti condivisi, dunque su documenti di consenso o linee guida, possibilmente nazionali, ma, in mancanza, su linee d'indirizzo condivise anche localmente. Nel campo della diagnostica, deve diffondersi nella pratica il concetto che un accertamento di qualità inadeguato o prescritto senza sufficienti indicazioni, è più dannoso

di un accertamento diagnostico non fatto e che l'uso di test di screening non qualificati in soggetti non selezionati non ha giustificazioni ed è gravato da bassa resa, alto costo per diagnosi, eccesso di falsi positivi, rischio di inidoneità non giustificate e fuorvianti rispetto ai piani di miglioramento da attuare per la prevenzione, perdita di tempo nella gestione, esecuzione, interpretazione, elaborazione dei risultati e nella loro comunicazione, sia come dato individuale che collettivo; tempo che viene sottratto ad attività attinenti la diretta partecipazione ai processi di valutazione e di gestione dei rischi.

Igiene industriale

L'INAIL ha effettuato uno studio di valutazione delle caratteristiche di tre campionatori personali di polveri respirabili ad alto flusso di aspirazione (> 4 lt/min), finalizzato alla scelta di un modello da utilizzare nei monitoraggi ambientali per l'accertamento del rischio silicosi ai fini assicurativi, in sostituzione del modello tipo Higgins-Dewell a basso flusso (2,2 L/min) attualmente in uso.

Un maggiore flusso di aspirazione aumenta il volume d'aria campionata e quindi accresce la massa di polvere raccolta, migliorando di conseguenza l'affidabilità delle misure diffrattometriche dei SLC.

In tale prospettiva, sono stati pre-selezionati tre selettori di polveri respirabili, fra quelli ad alto flusso disponibili sul mercato:

- CIP-10R, campionatore francese che utilizza spugne come substrato di raccolta, con flusso 10 L/min;
- FSP-10, ciclone tedesco che utilizza filtri da 37 mm di diametro, con flusso 11,2 L/min;
- GK-2.69, ciclone statunitense che utilizza filtri da 37 mm di diametro, con flusso 4,4 L/min.

Bisogna evidenziare che i valori di flusso sopra riportati per i due cicloni non sono quelli indicati dai costruttori, ma quelli proposti dal NIOSH americano e dall'HSE inglese per ottenere il minor scarto fra la curva di efficienza dei campionatori e la curva di efficienza della convenzione respirabile UNI EN 481 (Lee et al, 2010; Stacey et al, 2014). Parallelamente alla sostituzione del selettore, altri elementi del sistema di misura devono essere sostituiti, per es. il substrato di raccolta della polvere, la pompa per il campionamento personale ed il metodo analitico di laboratorio. Per il prelievo della polvere con i cicloni FSP-10 e GK-2.69 abbiamo scelto di testare i classici filtri in PVC, con diametro 37 mm e porosità 5 micron. Con il campionatore CIP-10R è invece necessario l'utilizzo di spigne poliuretaniche.

I tre selettori sono stati valutati rispetto ai seguenti criteri:

- Minimo scarto fra curva di efficienza del selettore e convenzione respirabile;
- campionamento: facilità di utilizzo, comfort del lavoratore, minime interferenze con le normali attività di lavoro, robustezza;

- minima laboriosità della procedura di preparazione dei campioni per l'analisi in DRX;
- minima durata dell'analisi DRX e massima riduzione del limite di quantificazione del metodo analitico DRX;
- estensione del range di misura, miglioramento dell'incertezza estesa (relativa all'insieme campionamento-analisi) per il rispetto (o la migliore approssimazione ottenibile) dei requisiti normativi della UNI 482.

In riferimento ai criteri sopra elencati, alla luce delle evidenze ad oggi raccolte, si è dell'avviso che la migliore scelta adottabile ricada sul selettore FSP-10, utilizzato ad una portata di campionamento 11.2 L/min.

Queste considerazioni dell'INAIL sono tutt'altro che definitive e vi sono anche diverse valutazioni, all'interno dello stesso NIS, che rilevano l'inadeguatezza del ciclone FSP-10 e relativa pompa Gilian a operare a flussi superiori a 10 Lt/min e difficoltà di calibrazione a queste portate.

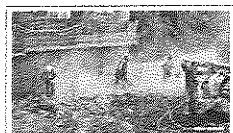
Banca dati INAIL

La nota difficoltà nel condurre un efficace monitoraggio delle esposizioni a polveri contenenti SLC, in particolare per le piccole aziende e per il comparto edile, ha sempre spinto il NIS ad impegnarsi nel progetto di "Monitoraggio Silice Italia", ossia nella raccolta di dati di monitoraggio utili a ricostruire il quadro delle esposizioni per comparto. L'obiettivo è quello di fornire uno strumento facilitato di valutazione a lavoratori, datori di lavoro e consulenti, valido anche a termini di legge, sul modello del PAF (Portale Agenti Fisici). La mole di dati raccolti è rilevante, ma al momento non ha trovato le risorse per essere messa a disposizione dell'utenza. Recentemente INAIL ha predisposto ad uso interno un applicativo sul quale sta caricando i propri dati storici ed attuali, per costituire una banca dati da utilizzare per fini assicurativi. I risultati dei campionamenti fatti dall'Istituto, in particolare nei primi anni 2000, ha notevole interesse soprattutto per la omogeneità delle tecniche di campionamento utilizzate. All'interno del NIS, al quale come già accennato, partecipa anche INAIL CONTARP, si discute sulla possibilità nel prossimo futuro, di aprire la banca dati anche ai servizi pubblici che potrebbero caricare i propri dati, garantendone la qualità rispetto a definiti criteri, e di aprirne poi la consultazione a soggetti esterni.

NEWS LIST

12 January 2018

United States: court of appeals rejects an industry request to reduce the level of protection of workers against crystalline silica



On 22 December 2017 the District of Columbia Court of Appeals rejected the challenges to the US Standard on the exposure of workers to crystalline silica.

In its ruling, the Court of Appeals rejected all of the arguments presented by the employers' organisations and confirmed the validity of the Standard on crystalline silica. The permissible exposure limit therefore remains at

0.05 mg/m³. In the European Union the recent Directive (EU) 2017/2398

adopted a limit value of 0.1 mg/m³, which considerably increases the risk of death among exposed European workers in comparison to their counterparts on the other side of the Atlantic.

The Standard on crystalline silica was adopted by the US Occupational Safety and Health Administration (OSHA) in 2016. Numerous industry associations wanted to challenge the application of these new rules on protection, which, according to OSHA estimates, should save 600 lives every year. The political context, with Donald Trump taking his place in the White House, appeared to pose a threat to the rules on health in the workplace, and the crystalline silica case was therefore seen as an important test for the future of the legislation on occupational health.

It is estimated that more than 2 million workers in the United States are exposed to this carcinogen. In addition to lung cancer and silicosis, crystalline silica causes other kidney and pulmonary diseases.

[The ruling \(pdf - 272.14 Kb\)](#)

[ALL NEWS](#)



NEWS

21 December 2017

European trade unions demand a roadmap for the elimination of occupational cancers

20 November 2017

Social health inequalities top of the agenda at ETUI's 'Work and Cancer' conference

6 November 2017

Adoption of the first part of the revision of the Directive on work-related cancers

12 July 2017

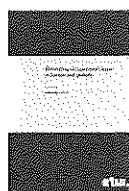
Key milestone in the fight against occupational cancers

RELATED PUBLICATIONS



Cancer risks in the workplace: better regulation, stronger protection

Tony Musu (ETUI), Laurent Vogel (ETUI) and Henning Wriedt (Beratungs- und Informationsstelle Arbeit & Gesundheit, Hamburg)



Eliminating occupational cancer in Europe and globally

Jukka Takala

IL PROBLEMA SILICE ALLA LUCE DELLA NUOVA DIRETTIVA EUROPEA

Silice silicosi e cancro, dibattito "antico": convegno Padova 10 maggio 1985

Valutazione IARC del 1997 : la silice cristallina inalata in forma di quarzo o cristobalite, proveniente da sorgenti a carattere occupazionale, è cancerogena per l'uomo. Nella valutazione conclusiva la IARC rileva che la cancerogenicità per l'uomo non si manifesta in tutte le circostanze di lavoro studiate e ciò può dipendere da caratteristiche intrinseche della SLC o da fattori esterni in grado di influenzare la sua attività biologica o dalla distribuzione dei suoi polimorfi.

La valutazione IARC non ha posto fine all'annoso dibattito su silice silicosi e cancro. Le incertezze sugli effetti cancerogeni della silice, oltre che la grande diffusione della SLC sia in natura che nei luoghi di lavoro e le numerose circostanze, soprattutto lavorative, che possono esporre alla sua frazione respirabile. Se la comprensione dei meccanismi alla base della variabilità degli effetti della SLC rappresenta una sfida per la ricerca scientifica, non può tuttavia essere motivo di ridotta attenzione al controllo delle esposizioni.

Date queste premesse, nel 2002, in occasione di un altro convegno su silice, silicosi e cancro, tenutosi a Santa Margherita Ligure, un gruppo di professionisti del sistema pubblico, medici del lavoro ed igienisti industriali, crearono una rete, definitasi network italiano silice (NIS), per affrontare le difficili sfide legate alla misura dell'esposizione a silice ed all'applicazione di adeguate misure di prevenzione. La situazione era resa ancor più complessa dalla mancanza di un valore limite di esposizione definito per legge, sulla incertezza sul valore da adottare o da fare adottare, visto l'ampio range di valori proposti in letteratura ed il loro diverso significato sanitario. ACGIH aveva appena proposto 0.025 mg/m³ come valore in grado di prevenire il manifestarsi, quantomeno in misura epidemiologicamente rilevante, di patologie correlate alla silice; la maggior parte delle organizzazioni di ricerca, compreso NIOSH e SCOEL, indicavano 0.05 mg/m³, come valore in grado di prevenire patologie silico correlate nella maggior parte della popolazione esposta; le regolamentazioni della maggior parte dei paesi industrializzati indicavano 0.1 mg/m³; in USA tale valore era ancora adottato, sebbene in fase di revisione, ma solo nel 2016 sarebbe stato dimezzato, da OSHA adottando 0.05 mg/m³, valore recentemente confermato dalla Corte d'Appello della Columbia che si è espressa riguardo alla richiesta di un'industria di riportarlo al precedente valore. Nel 2002 il NIS, integrato da altri professionisti, in particolare dagli Istituti Centrali (INAIL, CONTARP, ISS, ISPEL), fu identificato dal Coordinamento Tecnico delle Regioni, come proprio gruppo tecnico sul tema della silice. L'attività del NIS si è svolta per gruppi di lavoro tematici:

- normativa
- epidemiologia e ricerca

igiene industriale
sorveglianza sanitaria
Buone prassi

ceramica (piastrelle, sanitari, artistica)
edilizia
fonderie in terra di seconda fusione
gallerie
estrazione e lavorazione lapidei

Il risultato di questo lavoro portò alla pubblicazione, curata dalla Regione Toscana, dei documenti preparatori per le Linee Guida nell'esposizione professionale a silice libera cristallina ed a predisporre i documenti di buone prassi, condivisi con le parti sociali, per i comparti elencati, messi a disposizione sul sito NIS. Questo materiale fu presentato e discusso in occasione di un convegno tenutosi a Firenze nel settembre del 2005. Con il dlgs 81/08 linee guida e buone prassi devono passare per l'esame ed approvazione della Commissione Consultiva permanente per la salute e sicurezza sul lavoro, prevista dall'art. 6. L'impegno della Commissione su questo fondamentale punto per la costruzione di regole tecniche condivise non è mai stato sufficiente ed anche il percorso verso la predisposizione di linee guida nazionali e buone prassi in realtà non si è mai completato. Al Convegno di Firenze, particolare interesse lo sollevò il contributo della prof.ssa Bice Fubini del Centro Scansetti di Torino che portò la sua esperienza di ricercatrice proprio sulla questione della variabilità degli effetti della silice. Da quell'intervento nacque una proficua collaborazione con il NIS, che ha partecipato a questi approfondimenti svolgendo un'attività di stimolo, orientamento, coordinamento e, soprattutto, ha curato il rapporto fra mondo della ricerca e territorio. Altri centri si sono impegnati in questa direzione, sempre grazie allo stimolo dal NIS. I Dipartimenti di Chimica e di Scienza della Terra dell'Università di Firenze lavorano ancora oggi in rapporto con l'Università di Torino con l'obiettivo comune di aggiungere qualche tassello al complesso mosaico che caratterizza la patogenicità della silice, o meglio delle silici, con l'intento di aggiungere conoscenza orientata alla prevenzione dei danni. Lo studio delle caratteristiche Mineralogiche e Spettroscopiche dei campioni di comparto può produrre informazioni utili alla comprensione dei meccanismi di interazione tra SLC e tessuti. I meccanismi indagati includono la presenza e tipologia di radicali associati ai materiali, e la presenza e speciazione di specifici ioni (Al, Fe), noti per modulare la tossicità attraverso cicli catalitici (ad es. Fenton).

Recentemente, grande attenzione è stata rivolta alla lavorazione delle pietre artificiali, responsabili del più importante cluster di silicosi recentemente descritto in vari paesi (Israele, Spagna, Italia e USA). In Italia casi di silicosi correlati a questa lavorazione sono emersi in Piemonte, Veneto e Toscana. Il NIS ha coordinato la raccolta dei campioni e l'invio sia al Centro Scansetti che ai

ricercatori dell'Università di Firenze ed i risultati finora pubblicati giustificano una particolare attenzione per questo tipo di esposizione. Le polveri respirabili che si liberano dalla lavorazione delle pietre artificiali, infatti, sono risultate forti attivatori di marker di fibrosi piuttosto che di membranolisi. La presenza di ioni metallici di transizione ad attività redox oltre che l'elevata quantità di quarzo nella pietra artificiale sono responsabili della forte attività ossidativa. Anche in questo caso si conferma l'osservazione ormai classica che la reattività è assai maggiore nelle polveri abrasive di fresco.

I ricercatori di Torino e Firenze hanno esaminato anche le terre di fonderia. In questo caso l'abbondante contaminazione da parte di Carbonio amorfo, comporta la completa distruzione della speciazione radicalica preesistente (radicali associate alla SLC) e aggiunge specie radicaliche proprie. Lavoratori esposti a differenti stadi del processo industriale possono essere in contatto con polveri aerodisperse differenti per proprietà chimico-fisiche.

Sono tuttora in corso ulteriori ricerche sulla Pietra sintetica e su SLC in campioni autoptici di tessuto polmonare

I più recenti risultati pubblicati su questi argomenti sono i seguenti:

- C Pavan, M. Polimeni, M. Tomatis, I Corazzari, F. Turci, D. Ghigo e B. Fubini. *Abrasion of artificial stones as a new cause of an ancient disease, Physicochemical feature and cellular responses*. Toxicological Sciences, 153(1), 2016, 4-17
- F.Di Benedetto, E. Gazzano, M. Tomatis, F. Turci, L. Pardi, S.Bronco, G.Fornaciai, M. Innocenti, G.Montegrossi, M M Miranda, A. Zoleo, F. Capacci, B. Fubini, D.Ghigo, M. Romanelli. *Physico-Chemical properties of quartz from industrial manufacturing and its cytotoxic effects on alveolar macrophages: the case of green sand mould casting for iron production*. J.Haz.Mat. 312 (2016) 18-27.
- C.Pavan, B.Fubini. *Unveiling the variability of "quartz hazard" in light of recent toxicological findings* Chem. Res. Toxicol.. 2017, 30, 469-485

Normativa

La valutazione di cancerogenicità da parte della IARC è stata confermata nella monografia 100C del 2009. In Europa, la discussione sulla regolamentazione del rischio lavorativo da silice, sulla cancerogenicità e sul VLE è giunta a termine con la pubblicazione nello scorso dicembre della direttiva comunitaria che modifica la precedente direttiva cancerogeni. Come noto le lavorazioni che espongono a SLC sono classificate fra quelle cancerogene ed è definito un VLE di 0,1mg/m³ per la SLC in frazione respirabile. E' importante sottolineare come l'attenzione sia sulla lavorazione che comporta rischio di esposizione alla SLC in frazione respirabile (nella direttiva tradotta in

italiano c'è un errore nella nota 78 dell'allegato III che riporta polvere *inalabile* al posto di *respirabile*, errore già segnalato alla Commissione per la correzione).

La direttiva richiede di organizzare le lavorazioni che possono esporre a polveri respirabili di SLC in cicli chiusi, ma poiché la gestione delle esposizioni è spesso difficile, sottolinea che *gli orientamenti e gli esempi di buone prassi elaborati dalla Commissione, dagli Stati membri o dalle parti sociali o altre iniziative, quali l'«accordo di dialogo sociale sulla protezione della salute dei lavoratori attraverso la manipolazione e l'uso corretti della silice cristallina e dei suoi prodotti» (NEPSi), costituiscono strumenti preziosi e necessari per integrare le misure normative e, in particolare, per sostenere l'efficace applicazione dei valori limite, e dovrebbero pertanto essere tenuti debitamente in conto. Essi comprendono misure tese a evitare o ridurre al minimo l'esposizione quali, nel caso della silice cristallina respirabile, l'abbattimento ad acqua delle polveri affinché queste non siano aerodisperse.* La microfusione a cera persa (orafi e odontotecnici), la sabbiatura del denim e la lavorazione della pietra artificiale rappresentano i più recenti esempi d'esposizione correlate all'insorgenza nota di patologia silico correlata ed anche di come l'applicazione di buone prassi avrebbe potuto evitare i danni in maniera pressoché completa, in alcuni casi eliminando il rischio, in altri, come nel caso delle lavorazioni dei lapidei, abbattendo l'esposizione a livelli molto contenuti: il ciclo chiuso adottato nella preparazione dei così detti "gessi" per formare (in realtà un preparato in polvere ad elevato contenuto in cristobalite) ha eliminato il problema nelle microfusioni a cera persa, dopo il rilievo di casi di silicosi evidenziati sul finire del '900, in particolare nell'allora ricco distretto orafa aretino. Diverso il destino della sabbiatura del Denim, per la quale la soluzione è stata quella di esportare la lavorazione a rischio in paesi meno "attenti", in particolare in Turchia, invece di sostituire la sabbiatura al quarzo con prodotti alternativi esenti da silice che in quella specifica lavorazione avrebbero potuto costituire alternativa pienamente applicabile.

Il valore limite di esposizione definito dalla direttiva di 0.1 mg/m³, è da considerare transitorio e nell'articolato si prevede che debba essere rivisto alla luce di quanto segnalato dagli Stati in tema di valutazione sul grado di attuazione della direttiva:

"Nel quadro della prossima valutazione dell'attuazione della presente direttiva nell'ambito della valutazione di cui all'articolo 17 bis della direttiva 89/391/CEE, la Commissione valuta inoltre la necessità di modificare il valore limite per la polvere di silice cristallina respirabile. La Commissione propone, se del caso, le modifiche necessarie relativamente a tali sostanze." Questo significa che a fronte delle relazioni sull'attuazione della normativa da parte degli stati la Commissione potrà decidere aggiornamenti sul valore limite" (Articolo 1 comma 3)

Il recepimento, previsto in Italia entro il 17 gennaio 2020 può avvenire adottando valori limite più cautelativi. Presso ECHA è attiva una proposta di classificazione armonizzata presentata dalla

Francia per cristalline silice: quarzo (SiO_2), tridymite e cristobalite, ma non sono stati ancora depositati i documenti tecnici.

Il quadro complessivo che oggi emerge sembra meglio definito che in passato; in particolare sembra ormai chiaro che il controllo del rischio SLC nei luoghi di lavoro richiederà l'applicazione del Capo II del Titolo IX del dlgs 81/08, relativo alla protezione da agenti cancerogeni e mutageni.

Attualmente però, nelle more del recepimento normativo, l'applicazione del capo II rimane una opzione, quantomai opportuna ma non obbligatoria. Da un punto di vista concreto, sono del parere (personale) che le differenze di protezione fra l'applicazione del Capo I o II del Titolo IX non siano poi così elevate. Sicuramente le questioni più spinose, almeno dal punto di vista dei problemi applicativi, riguardano il monitoraggio delle esposizioni tramite campionamenti e l'attivazione del registro degli esposti. Questioni molto correlate fra loro, perché la registrazione degli esposti richiede anche la registrazione dell'esposizione in termini di dose ponderata, soprattutto al fine di mettere in atto le misure necessarie per ridurre l'esposizione e togliere i lavoratori esposti dal registro. Sull'argomento, in genere di particolare interesse per i medici competenti, vale la pena richiamare alcune delle posizioni espresse dal Gruppo Cancerogeni del Coordinamento delle Regioni, che aiutano a rispondere ad alcuni quesiti preliminari dai quali derivano impegni e responsabilità specifiche, fra cui la sorveglianza sanitaria specifica e la registrazione degli esposti:

- quando si può dire che in un'azienda esista una esposizione a rischio cancerogeno di tipo professionale, anche solo potenziale?
- Quando l'esposizione professionale ad un cancerogeno va considerata sicuramente pericolosa per la salute dei lavoratori?

Sono quesiti importanti anche per chi esercita le azioni di vigilanza, perché dalla risposta può derivare un'azione indebitamente rassicurante o, all'opposto, un'azione burocratica, forse formalmente corretta, ma sostanzialmente inappropriata, orientata ad imporre obblighi di cui non è dimostrata alcuna efficacia preventiva, poco o per nulla condivisi. L'autorevolezza di chi esercita la vigilanza dovrebbe misurarsi non solo sulla correttezza formale di ciò che si impone, ma anche sulla appropriatezza e sulla verificabilità della sua efficacia, oltre che sulla condivisione da parte degli altri attori della prevenzione, affinché sia realmente strumento di prevenzione.

Premessa indispensabile è che ogni ragionamento sugli esposti reali o potenziali a cancerogeni deve essere preceduto dall'applicazione delle misure di prevenzione per abbattere il rischio. Solo dopo ci si dovrà chiedere se potrebbe ancora esserci una esposizione residua a cancerogeni, se rimangono fonti di generazione o diffusione, anche solo potenziale, di agenti cancerogeni.

E' a questo punto che dobbiamo chiederci se l'entità complessiva dell'inquinamento residuo è tale da prefigurare un'esposizione dei lavoratori maggiore rispetto a quella della popolazione generale di riferimento, non professionalmente esposta. Rispondere a questa domanda non è sempre facile e

richiede di avere due tipi di dati:

1. dati sui livelli di esposizione di gruppi o popolazioni, omogenei per caratteristiche personali, geografiche, ambientali con quelli dei lavoratori in esame.
2. dati di esposizione relativi ai lavoratori della ditta in questione

Sulla base di questi dati dovrebbe essere possibile stabilire in quale condizione si trovano i lavoratori:

- potenzialmente esposti: rischio di esposizione ma, al momento, non risultano incrementati i valori di esposizione propri della popolazione di riferimento
- esposizione professionale dannosa per la loro salute: documentato eccesso di esposizione nel luogo di lavoro rispetto a quello presente in una popolazione confrontabile, non professionalmente esposta.

La questione, apparentemente semplice, in realtà non lo è affatto, proprio per le difficoltà che esistono nel valutare l'entità delle esposizioni, non solo della popolazione di riferimento, ma anche dei lavoratori, in termini di frequenza-durata ed intensità delle esposizioni.

Per quanto riguarda la valutazione della frequenza-durata, un gruppo di autori (AA.VV. SNOP 2/9/2016: Applicazione degli artt. 236, 242, 243 e 244 del Dlgs 81/08. *Valutazione dell'esposizione ad agenti cancerogeni e del rischio che ne consegue. Indicazioni per la classificazione dei lavoratori come "professionalmente esposti ad agenti cancerogeni", la loro conseguente registrazione e lo svolgimento di programmi di sorveglianza sanitaria ad hoc. La questione degli ex esposti ad agenti cancerogeni negli ambienti di lavoro*) ha proposto di definire esposizione sporadica, quella che risponde ai seguenti 3 requisiti:

- non più di 60 ore in un anno solare
- non più di 4 ore per singola occasione di esposizione
- non più di due occasioni di "esposizione" al mese *in 3 mesi*

Il secondo aspetto da considerare è come definire una esposizione di debole intensità. Se disponiamo di un range di valori di riferimento sui livelli di inquinamento in popolazioni non esposte professionalmente, possiamo considerare esposizione professionale di debole intensità quella che è sicuramente inferiore al valore superiore di tale range. Il problema è se non disponiamo di valori di riferimento: in questo caso l'indirizzo è che se sia sufficiente rintracciare sul luogo di lavoro una quantità anche minima di un cancerogeno che può oggettivamente essersi liberato dal ciclo di lavoro per considerare professionalmente esposti i lavoratori interessati.

Per essere considerati non professionalmente esposti entrambe le condizioni dovrebbero realizzarsi

Per quanto arbitraria, la definizione mette ben a fuoco il problema e può costituire un indirizzo.

Rimangono ancora nell'ombra altri aspetti, come la finalità della registrazione e le potenzialità della

sorveglianza sanitaria in considerazione del rischio specifico legato ai vari cancerogeni.

Cercando di condurre questo ragionamento sul rischio SLC, si rileva che non esistono, a mia conoscenza, dati sulle esposizioni ambientali della popolazione e che, pertanto, il solo rilievo della presenza di silice dovrebbe far scattare gli obblighi di registrazione e sorveglianza sanitaria. Credo che il TLV ACGIH di 0.025 mg/m³, visto il suo significato sanitario di assenza di malattia, potrebbe costituire un corretto cut-off per questi obblighi, costituendo così anche uno stimolo alla riduzione delle esposizioni ben al di sotto del VLE approvato. Tuttavia non garantisco che questa personale posizione sia condivisa.

Sorveglianza sanitaria

Il Gruppo di lavoro del NIS sulla sorveglianza sanitaria ha prodotto un documento nel quale, più che un protocollo sanitario, si cerca di proporre un metodo per la definizione del protocollo fortemente fondato sulla conoscenza delle esposizioni nel tempo e dei meccanismi di sviluppo dei relativi danni da lavoro. La silice si presta bene a questo esercizio e può essere un buon esempio da proporre per aiutare i medici competenti a uscire da alcuni vizi diffusamente presenti nella sorveglianza sanitaria, più orientata verso protocolli sanitari di tipo “difensivo”, poco agganciati alla prevenzione ed alla emersione del danno o, per dirla con un autore, Giovanni Pianosi, che con ironia qualche anno addietro ha affrontato il tema dei “vizi” della sorveglianza sanitaria, si spera possa aiutare i medici competenti a sopravvivere alla sorveglianza sanitaria mettendo al centro della loro professione la prevenzione e la promozione della salute nei luoghi di lavoro.

Il documento NIS propone un percorso fondato sui seguenti principi:

- l'importanza di una precisa ricostruzione dell'esposizione nell'impostazione della sorveglianza sanitaria e nella scelta della sua attivazione;
- percorsi diagnostici mirati al rischio effettivo e non al pericolo;
- collaborazione fra medici competenti e strutture pubbliche di prevenzione.

Valutazione dell'esposizione

Il ricorso alla sorveglianza sanitaria, la frequenza e la tipologia degli accertamenti, prevedono un'ottima conoscenza della storia espositiva del lavoratore. Nel protocollo si richiamano i criteri per l'analisi dell'esposizione ed il significato della sua intensità, frequenza e durata in funzione dei danni attesi. Si vuole ribadire che il principale obiettivo del medico competente, prima dell'espressione del giudizio d'idoneità, è il controllo e la riduzione delle esposizioni, attraverso la partecipazione attiva al processo di valutazione e di gestione dei rischi. Il documento di valutazione dei rischi deve fornire al medico competente gli elementi necessari per correlare gli accertamenti

sanitari al rischio, con la consapevolezza che, sia nel caso degli agenti chimici pericolosi che di quelli cancerogeni o mutageni (titolo IX (sostanze pericolose) capo I e II), la sorveglianza sanitaria entra (artt. 225, 242 e 236 dlgs 81/08) fra le *misure specifiche di protezione e di prevenzione* ed è, pertanto, da adottare nel caso che le misure generali per la prevenzione non siano state sufficienti a dare garanzie di riduzione del rischio. Anche la Commissione per gli Interpelli (di cui all'art. 12 del dlgs 81/08), intervenuta su questo argomento su richiesta dalla Federazione Nazionale degli Ordini dei Medici, ricorda che il medico competente nell'ambito della sua attività "*prima di redigere il protocollo sanitario deve avere una conoscenza dei rischi presenti e quindi deve collaborare alla valutazione dei rischi*", non solo nella prima fase di valutazione, ma anche quando a valutazione già eseguita, ne deve prendere atto in maniera critica e non formale.

Nonostante i principi sopra richiamati, dobbiamo ammettere che la materia dell'igiene industriale applicata alla sorveglianza sanitaria non è diffusamente utilizzata. Si preferisce adottare protocolli ridondanti, piuttosto che tenere conto della valutazione delle esposizioni attuali e/o pregresse in termini d'intensità, durata, modello (acuto, subacuto, cronico, intermittente) e sulla misura o stima dell'esposizione ponderata e/o della dose cumulativa. L'adozione di protocolli eccessivi, ritenuti più cautelativi dal punto di vista medico legale, porta ad un aggravio di accertamenti non utili alla ricerca di malattie professionali e, ancor meno, quale strumento di indirizzo e monitoraggio delle iniziative tecniche, organizzative e procedurali di prevenzione da mettere o già messe in atto per la tutela della salute.

I dati aggregati sanitari e di rischio dei lavoratori sottoposti a sorveglianza sanitaria inviati dai medici competenti ai sensi dell'art. 40 del dlgs 81/08 (allegato 3b), dimostrano quanto l'uso a fini epidemiologici di queste informazioni sia limitato dal fatto che la reale esposizione di quei gruppi di lavoratori non è correttamente valutata e la ricerca degli eventuali danni, consistenti quasi sempre in malattie a bassa frazione eziologica occupazionale, è viziata dalla mancanza del principale elemento diagnostico rappresentato, in medicina del lavoro, dalla dimostrazione di un'esposizione efficace.

Nel caso della silice, siamo ancora in assenza di un limite d'esposizione riconosciuto nella nostra normativa, ed è anche compito del medico competente orientare il datore di lavoro verso l'applicazione delle più idonee iniziative di prevenzione. Accertati il rischio d'esposizione e l'opportunità di attivare un programma di sorveglianza sanitaria, quest'ultimo deve essere improntato ad una particolare accuratezza, sia per cogliere segni precoci di danno, spesso ignorati più di quanto la lunga storia della silice possa giustificare, sia per non indurre inutili allarmi e limitazioni d'idoneità, talvolta più dannose per il lavoratore della stessa esposizione.

I più recenti casi di esposizione evidenziati ed accompagnati da casi di silicosi hanno sempre mostrato di avere alle spalle una sorveglianza sanitaria disattenta ed inadeguata. E' accaduto nei casi

rilevati nelle ditte orafe che eseguivano fusione a cera persa o nella lavorazione delle pietre artificiali, ma accade anche nei settori tradizionali, come nella lavorazione tradizionale dei lapidei.

Del resto è ben nota la scarsa attenzione verso la possibile eziologia professionale delle patologie; indagini su casistiche ospedaliere condotte su patologie attribuibili alla silice (ma il discorso potrebbe essere valido per molte altre patologie), mostrano che quasi mai l'origine è indagata tramite adeguata anamnesi lavorativa, nonostante tutte le indagini d'igiene industriale, in Italia come all'estero, indichino un numero ancora elevato di esposti, in particolare nel settore delle costruzioni. La latenza della silicosi per esposizioni quali quelle oggi ipotizzabili nei settori a rischio, suggerisce che al momento del suo manifestarsi questi lavoratori non siano più esposti né sottoposti a sorveglianza sanitaria ed i quadri patologici sfuggano o siano diversamente diagnosticati o siano riconosciuti tardi, spesso in occasione di accertamenti sanitari per altre cause.

Da queste considerazioni emerge la necessità di un diverso rapporto fra medici competenti e Dipartimenti di Prevenzione, orientato a sostenere la crescita di qualità della sorveglianza sanitaria e la continuità degli accertamenti nei casi in cui è indicato il loro proseguimento anche dopo la cessazione dell'esposizione.

Il servizio pubblico deve sostenere le scelte del medico competente di fronte al datore di lavoro quando orientate all'efficacia e non all'osservanza formale della norma; e per fare questo al sistema pubblico di prevenzione è richiesta autorevolezza anche per imporre, all'occorrenza, azioni improntate all'*evidence based* più che al *law imposed*. Le azioni di controllo orientate alla verifica della qualità della sorveglianza sanitaria devono fondarsi su orientamenti condivisi, dunque su documenti di consenso o linee guida, possibilmente nazionali, ma, in mancanza, su linee d'indirizzo condivise anche localmente. Nel campo della diagnostica, deve diffondersi nella pratica il concetto che un accertamento di qualità inadeguato o prescritto senza sufficienti indicazioni, è più dannoso di un accertamento diagnostico non fatto e che l'uso di test di screening non qualificati in soggetti non selezionati non ha giustificazioni ed è gravato da bassa resa, alto costo per diagnosi, eccesso di falsi positivi con rischio di inidoneità non giustificate e fuorvianti rispetto ai piani di miglioramento da attuare per la prevenzione, perdita di tempo nella gestione, esecuzione, interpretazione, elaborazione dei risultati e nella loro comunicazione, sia come dato individuale che collettivo; tempo che viene sottratto ad attività attinenti la diretta partecipazione ai processi di valutazione e di gestione dei rischi.

Igiene industriale

L'INAIL ha effettuato uno studio di valutazione delle caratteristiche di tre campionatori personali di polveri respirabili ad alto flusso di aspirazione (> 4 lt/min), finalizzato alla scelta di un modello da

utilizzare nei monitoraggi ambientali per l'accertamento del rischio silicosi ai fini assicurativi, in sostituzione del modello tipo Higgins-Dewell a basso flusso (2,2 L/min) attualmente in uso.

Un maggiore flusso di aspirazione aumenta il volume d'aria campionata e quindi accresce la massa di polvere raccolta, migliorando di conseguenza l'affidabilità delle misure diffrattometriche dei SLC.

In tale prospettiva, sono stati pre-selezionati tre selettori di polveri respirabili, fra quelli ad alto flusso disponibili sul mercato:

- CIP-10R, campionatore francese che utilizza spugne come substrato di raccolta, con flusso 10 L/min;
- FSP-10, ciclone tedesco che utilizza filtri da 37 mm di diametro, con flusso 11,2 L/min;
- GK-2.69, ciclone statunitense che utilizza filtri da 37 mm di diametro, con flusso 4,4 L/min.

Bisogna evidenziare che i valori di flusso sopra riportati per i due cicloni non sono quelli indicati dai costruttori, ma quelli proposti dal NIOSH americano e dall'HSE inglese per ottenere il minor scarto fra la curva di efficienza dei campionatori e la curva di efficienza della convenzione respirabile UNI EN 481 (Lee et al, 2010; Stacey et al, 2014). Parallelamente alla sostituzione del selettore, altri elementi del sistema di misura devono essere sostituiti, per es. il substrato di raccolta della polvere, la pompa per il campionamento personale ed il metodo analitico di laboratorio. Per il prelievo della polvere con i cicloni FSP-10 e GK-2.69 abbiamo scelto di testare i classici filtri in PVC, con diametro 37 mm e porosità 5 micron. Con il campionatore CIP-10R è invece necessario l'utilizzo di spigne poliuretaniche.

I tre selettori sono stati valutati rispetto ai seguenti criteri:

- Minimo scarto fra curva di efficienza del selettore e convenzione respirabile;
- campionamento: facilità di utilizzo, comfort del lavoratore, minime interferenze con le normali attività di lavoro, robustezza;
- minima laboriosità della procedura di preparazione dei campioni per l'analisi in DRX;
- minima durata dell'analisi DRX e massima riduzione del limite di quantificazione del metodo analitico DRX;
- estensione del range di misura, miglioramento dell'incertezza estesa (relativa all'insieme campionamento-analisi) per il rispetto (o la migliore approssimazione ottenibile) dei requisiti normativi della UNI 482.

In riferimento ai criteri sopra elencati, alla luce delle evidenze ad oggi raccolte, si è dell'avviso che la migliore scelta adottabile ricada sul selettore FSP-10, utilizzato ad una portata di campionamento 11.2 L/min.

Queste considerazioni dell'INAIL sono tutt'altro che definitive e vi sono anche diverse valutazioni,

all'interno dello stesso NIS, che rilevano l'inadeguatezza del ciclone FSP-10 e relativa pompa Gilian a operare a flussi superiori a 10 Lt/min e difficoltà di calibrazione a queste portate.

Banca dati INAIL

IL NIS appoggia il progetto INAIL di costituzione di una banca dati delle esposizioni a SLC. Al momento il progetto è interno ad INAIL, che ha già predisposto l'applicativo su l quale sta caricando lo storico dei campionamenti fatti dall'Istituto, in particolare fin ai primi anni 2000. Questa mole di dati ha notevole interesse soprattutto per la omogeneità delle tecniche di campionamento utilizzate. La banca dati è stata strutturata da e per INAIL, ma l'obbiettivo finale è quello di aprirla anche a soggetti esterno pubblici ed accreditati ad aggiornarla con monitoraggi eseguiti nel rispetto di corretti principi d'igiene industriale. E' prevista anche la possibilità per soggetti privati di implementare la banca dati. Lo scopo della banca dati è di fornire uno strumento utile e riconosciuto per la valutazione dei rischi, accessibile ad aziende, consulenti e lavoratori, sul modello del PAF, che permetta di superare le criticità ben note per le aziende nell'eseguire monitoraggi della SLC, difficili sia nella strategia di campionamento che nell'interpretazione in termini d'esposizione, come dimostrano anche le annose discussioni sul campionatore da scegliere, le discordanze rilevate fra campionatori differenti, anche quando utilizzati in parallelo sulla stessa postazione di lavoro o, addirittura, sullo stesso lavoratore.

Zimbra

fabio.capacci@uslcentro.toscana.it

Re: NIS

Da : fabio capacci <fabio.capacci@uslcentro.toscana.it>

gio, 01 feb 2018, 16:55

Oggetto : Re: NIS**A :** Malaguti Aliberti Ludovica <ludovica.malaguti@iss.it>**Cc :** Alessandrelli Maria <maria.alessandrelli@iss.it>, Russo Maria
Teresa <mariateresa.russo@iss.it>

Grazie! Credo che dimostrare la possibilità di un contenimento delle esposizioni attraverso l'applicazione di buone prassi debba essere davvero il prossimo obiettivo del NIS.

A presto

Fabio

----- Messaggio originale -----

Da: "Malaguti Aliberti Ludovica" <ludovica.malaguti@iss.it>

A: "fabio capacci" <fabio.capacci@uslcentro.toscana.it>, "Alessandrelli Maria" <maria.alessandrelli@iss.it>, "Russo Maria Teresa" <mariateresa.russo@iss.it>

Inviato: Giovedì, 1 febbraio 2018 13:53:41

Oggetto: R: NIS

Caro Fabio

Credo sia sempre importante ricordare in tutte le sedi ove se ne parla che è cancerogena la lavorazione che espone alla silice libera cristallina respirabile e non certamente la silice di per sé. Ti ricordo che nella direttiva tradotta in italiano c'è anche un errore nella nota 78 dell'allegato III che riporta polvere inalabile al posto di polvere respirabile, ma questo errore è stato segnalato alla Commissione e quindi si sta procedendo alla correzione.

Poiché la gestione delle esposizioni sono spesso difficili da organizzare in cicli chiusi (come sarebbe richiesto dalla norma) la direttiva al considerando 19 dice:

"Gli orientamenti e gli esempi di buone prassi elaborati dalla Commissione, dagli Stati membri o dalle parti sociali o altre iniziative, quali l'«accordo di dialogo sociale sulla protezione della salute dei lavoratori attraverso la manipolazione e l'uso corretti della silice cristallina e dei suoi prodotti» (NEPSi), costituiscono strumenti preziosi e necessari per integrare le misure normative e, in particolare, per sostenere l'efficace applicazione dei valori limite, e dovrebbero pertanto essere tenuti debitamente in conto. Essi comprendono misure tese a evitare o ridurre al minimo l'esposizione quali, nel caso della silice cristallina respirabile, l'abbattimento ad acqua delle polveri affinché queste non siano aerodisperse."

Per quanto riguarda invece il valore definito dalla direttiva 0.1 mg/m3, si prevede nell'articolato che tale valore debba essere rivisto alla luce di quanto segnalato dagli stati in tema di valutazione sul grado di attuazione della direttiva.

Articolo 1 comma 3 "Nel quadro della prossima valutazione dell'attuazione della presente direttiva nell'ambito della valutazione di cui all'articolo 17 bis della direttiva 89/391/CEE, la Commissione valuta inoltre la necessità di modificare il valore limite per la polvere di silice cristallina respirabile. La

Commissione propone, se del caso, le modifiche necessarie relativamente a tali sostanze."

Questo significa che a fronte delle relazioni sull'attuazione della normativa da parte degli stati la Commissione potrà decidere aggiornamenti sul valore limite. Per ora non mi vengono in mente altre osservazioni. Il nostro recepimento è previsto entro il 17 gennaio 2020. Gli Stati possono recepire individuando valori limite più restrittivi.

Ti ricordo anche che presso ECHA è attiva una proposta di classificazione armonizzata presentata dalla Francia per cristalline silica: quartz (SiO₂); [1] tridymite; [2] cristobalite; [3]. Non ci sono ancora documenti

A presto Ludovica

-----Messaggio originale-----

Da: fabio capacci [mailto:fabio.capacci@uslcentro.toscana.it]

Inviato: mercoledì 31 gennaio 2018 08:09

A: Malaguti Aliberti Ludovica; Alessandrelli Maria; Russo Maria Teresa

Oggetto: NIS

Buongiorno, come vi ho accennato, a metà marzo dovrei andare ad Asti per conto del NIS ad un evento formativo per medici competenti associati alla SIML, a cui parteciperanno Pira per la SIMLII, e rappresentanti del NEPSI. Mi farebbe molto comodo un breve aggiornamento sulle questioni aperte sul tavolo europeo ed eventuali informazioni sui recepimenti dopo la recente approvazione dell'aggiornamento della direttiva cancerogeni. Se potete mandarmi qualche riga da riferire in quella occasione sarebbe molto utile. Spero di sentirvi presto

Ciao

Fabio

--

dr Fabio Capacci

medico del lavoro

Unità Sanitaria Locale Toscana Centro

Dipartimento di Prevenzione

Area Funzionale di Prevenzione, Igiene e Sicurezza nei Luoghi di Lavoro (PISLL)

Unità Funzionale di Firenze via della Cupola 64 - 50145 Firenze tel 055 6939281

- cell. 338 1834241 Ambulatorio di Medicina del Lavoro c/o Presidio Ospedaliero "Palagi"

viale Michelangelo - Firenze

tel 055 6937687 - 792



Ministero della Sanità
DIREZIONE GENERALE
DIREZIONE GENERALE
DIREZIONE GENERALE

**SEMINARI DI AGGIORNAMENTO
IN MEDICINA DEL LAVORO**

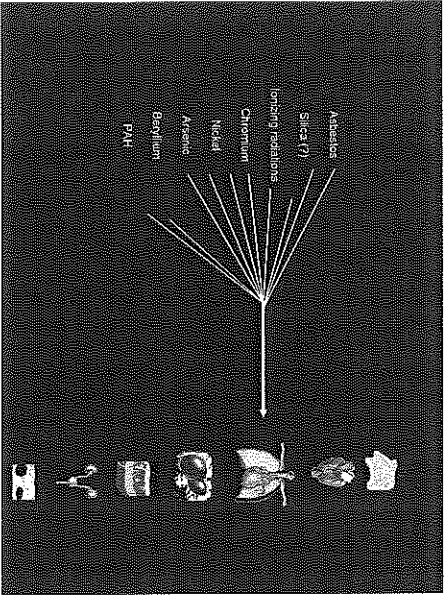
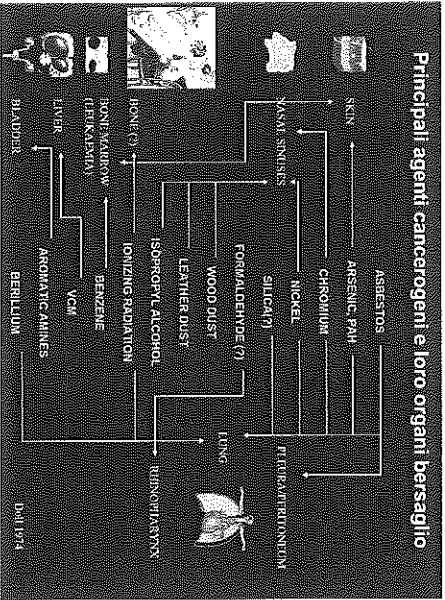
2013

Atene, 14-15-16-17-18-19-20-21-22-23-24-25-26-27-28-29-30-31
El Caire, 1-2-3-4-5-6-7-8-9-10-11-12-13-14-15-16-17-18-19-20-21-22-23-24-25-26-27-28-29-30-31
Varna, 1-2-3-4-5-6-7-8-9-10-11-12-13-14-15-16-17-18-19-20-21-22-23-24-25-26-27-28-29-30-31
MAGGIO - OTTOBRE 2013

La partecipazione agli aggiornamenti è gratuita
L'iscrizione è gratuita per gli studenti e per i medici
L'iscrizione è gratuita per gli studenti e per i medici

**Il nuovo
aggiornamento
delle
Linee Guida
SIMILI
per la
sorveglianza
sanitaria degli
esposti ad agenti
cancerogeni e
mutageni in
ambiente di
lavoro**

E. Pirà
Università di Torino



Secondo CAREX

Secondo CAREX (banca dati sull'esposizione ai cancerogeni) in Italia si stimano circa 4,2 milioni di lavoratori esposti ad agenti cancerogeni che rappresentano circa 24% dell'intera forza lavorativa italiana.

- La stima considera diversi tipi di cancerogeni:
 - fumo passivo (770,000 lavoratori esposti)
 - radiazioni solari (550,000 lavoratori esposti)
 - fumi derivanti dai gas di scarico (550,000)
 - asbesto (350,000)
 - polveri di legno (300,000)
 - silice cristallina (280,000)
 - Piombo e composti inorganici (220,000)
 - benzene (180,000)
 - Cromo esavalente e composti (130,000)
 - IPA (130,000).

Il registro dei lavoratori esposti ad agenti cancerogeni: quadro legislativo e analisi dei dati

Autore: Ministero del Lavoro, Direzione Generale del Lavoro, Roma, 2008

Registrazione SIREP al 31 dicembre 2008

6,000 Dite

79,000 Lavoratori (di cui 89% uomini) [CAREX circa 4,2 milioni]

164,700 Esposizioni

100,000 Misurazioni

Agente cancerogeno più frequentemente notificato: polvere di legno duro (circa 32,000 lavoratori)

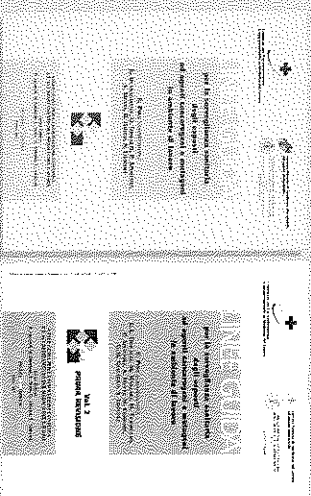
Seguono benzene (16,000 lavoratori), IPA (14,000 lavoratori), cromo esavalente (10,000 lavoratori)

Linee guida pubblicate dalla

Società italiana di Medicina del Lavoro e di Igiene Industriale

Edizione 2002

I Revisione 2007



**DLGS 41/03
AMMIANTO**

- ✓ Art. 259 – Accertamenti sanitari e norme preventive e protettive specifiche
 - ✓ Anamnesi
 - ✓ Esame clinico generale e del torace
 - ✓ Prove funzionali
 - ✓ Altri accertamenti a discrezione del MC
- ✓ Art. 260 – Registro di esposizione e cartelle sanitarie
- ✓ Art. 261 – Registrazione dei mesoteiomi (segnalazione all'INAIL Ex ISPESL tramite I COR)

DM 9 aprile 2008

MINISTERO DEL LAVORO E DELLA PREVIDENZA SOCIALE
DECRETO 9 aprile 2008
Nome tabelle delle malattie professionali nell'industria e nell'agricoltura.
(GU n. 149 del 21-7-2008)

- ✓ INDUSTRIA → 24 malattie
- ✓ AGRICOLTURA → 3 malattie

DM 11 dicembre 2009

**MINISTERO DEL LAVORO
E DELLE POLITICHE SOCIALI**

Aggiornamento dell'elenco delle malattie per le quali è obbligatoria la denuncia ai sensi e per gli effetti dell'articolo 139 del testo unico approvato con decreto del Presidente della Repubblica 30 giugno 1965, n. 1124, e successive modifiche e integrazioni.

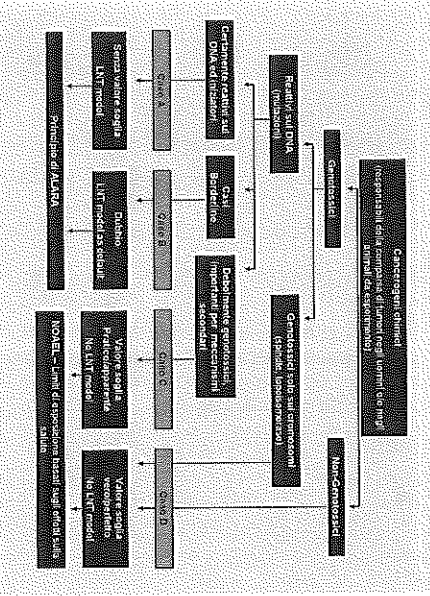
DM 11 dicembre 2009

- ✓ LISTA I - Gruppo 6 - Malattie neoplastiche la cui origine lavorativa è di elevata probabilità → 44 voci
- ✓ LISTA I - Gruppo 6 - Malattie neoplastiche la cui origine lavorativa è di limitata probabilità → 28 voci
- ✓ LISTA II - Gruppo 6 - Malattie neoplastiche la cui origine lavorativa è possibile → 9 voci

Categorie di pericolo per le sostanze cancerogene

| Categoria | Critici |
|---------------------|--|
| CATEGORIA 1 | Sostanze cancerogene per l'uomo accertate e presumite La classificazione di una sostanza come cancerogena di categoria 1 presuppone sulla base di dati sperimentali o epidemiologici la dimostrazione di un nesso causale tra l'esposizione alla sostanza e l'insorgenza di tumori maligni nell'uomo. La classificazione di una sostanza come cancerogena di categoria 1A è possibile anche in caso di dati sperimentali per l'uomo sulla base di dati non sono sufficienti. |
| Categoria 1B | Categoria 1 B per le sostanze di cui si presuppone effetti cancerogeni per l'uomo. La classificazione di una sostanza nelle categorie 1A e 1B si basa sulla stessa procedura dei dati sperimentali sull'uomo da cui risulta un rapporto di causalità tra l'esposizione alla sostanza e l'insorgenza di tumori maligni nell'uomo. La classificazione di una sostanza nella categoria 1B è possibile anche in caso di dati sperimentali per l'uomo sulla base di dati non sono sufficienti per stabilire la classificazione della sostanza e l'insorgenza di tumori maligni nell'uomo. La classificazione di una sostanza nella categoria 1B è possibile anche in caso di dati sperimentali per l'uomo sulla base di dati non sono sufficienti per stabilire la classificazione della sostanza e l'insorgenza di tumori maligni nell'uomo. |
| CATEGORIA 2 | Sostanze cancerogene per l'uomo presumite o probabili La classificazione di una sostanza come cancerogena di categoria 2 presuppone sulla base di dati sperimentali o epidemiologici la dimostrazione di un nesso causale tra l'esposizione alla sostanza e l'insorgenza di tumori maligni nell'uomo. La classificazione di una sostanza come cancerogena di categoria 2 è possibile anche in caso di dati sperimentali per l'uomo sulla base di dati non sono sufficienti per stabilire la classificazione della sostanza e l'insorgenza di tumori maligni nell'uomo. La classificazione di una sostanza nella categoria 2 è possibile anche in caso di dati sperimentali per l'uomo sulla base di dati non sono sufficienti per stabilire la classificazione della sostanza e l'insorgenza di tumori maligni nell'uomo. |

| Caratteristiche | | Elementi dell'etichetta | |
|-------------------------------|--|------------------------------|-------------|
| Chimicamente | Categoria 1 o categoria 2 | Categoria 1 o categoria 2 | Categoria 2 |
| Programmi GHS | | | |
| Bianchezza | Escluso | Ammissibile | |
| Bianchezza di per sé | HEP: può provocare il cancro - H350. Sospetto di provocare il cancro. H351. Sospetto di provocare il cancro. H352. Sospetto di provocare il cancro. H360D. Sospetto di provocare il cancro. H360DF. Sospetto di provocare il cancro. H370. Sospetto di provocare il cancro. H373. Sospetto di provocare il cancro. H410. Sospetto di provocare il danno ambientale. H411. Sospetto di provocare il danno ambientale. H412. Sospetto di provocare il danno ambientale. H413. Sospetto di provocare il danno ambientale. | | |
| Cole pol. - Pericolosità | P201 P202 P281 P501 | P201 P202 P281 P501 | |
| Con. prod. - Reazione | P273 P501 | P273 P501 | |
| Con. prod. - Contatto | P273 P501 | P273 P501 | |
| Con. prod. - Surriscaldamento | P273 P501 | P273 P501 | |



REGOLAMENTO (CE) n. 1907/2006 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO
del 18 dicembre 2006

concernente la registrazione, la valutazione, l'etichettatura e la restriction delle sostanze chimiche (REACH), che istituisce un'Agenzia europea per le sostanze chimiche, che modifica la direttiva 1999-45/CE che attua il regolamento (CE) n. 99-45/CE del Consiglio e il regolamento (CE) n. 1831/04 della Commissione nonché in materia "67/541/CEE del Consiglio e le direttive della Commissione 91/155/CEE, 93/61/CEE, 93/105/CE e 2006/21/CE

Per le sostanze prodotte e importate in quantitativi superiori a 10 tonnellate/anno e prevista, ai fini della registrazione REACH, l'elaborazione del Rapporto sulla sicurezza chimica, che delinea gli scenari di esposizione pertinenti e rilevanti per l'impiego delle sostanze che dovranno figurare in allegato alla Scheda di Sicurezza

Tab. 11 Definizioni di soglia

SOGGIA ASSOLUTA: quella quantità di agente non sufficiente a produrre un effetto avverso, in analogia al concetto della tossicologia generale, di dose che non produce alcuna alterazione osservabile. In altri termini l'agente cancerogeno è presente ma praticamente non interagisce con il bersaglio cellulare.

SOGGIA REALE O BIOLOGICA O PERFETTA: quella quantità di agente che, anche se presente a livello del bersaglio in quantità definite, almeno in linea teorica non produce alcun danno per inspiegata di indurre, al di sotto di una concentrazione soglia, le reazioni biochimiche richieste per manifestare l'effetto avverso; l'agente è presente e può interagire con il bersaglio, ma non riesce ad indurre alcun effetto negativo.

SOGGIA APPARENTE O PRATICA: quella quantità di agente che non porta all'evento multigeno a causa di una concentrazione non critica a livello del bersaglio. Una soglia apparente potrebbe essere attribuita alla tossicologica propria dell'agente o ad altri fattori che limitano l'effetto avverso a livello del bersaglio (preparazione del DNA, apoptosi, sovraregolazione immunologica).

SOGGIA STATISTICA: la quantità più bassa dell'agente che riesce ad indurre un incremento statisticamente significativo dell'indicatore che viene misurato

Caratterizzazione di gruppi

- Gruppo A: Cancerogeni genotossici senza soglia, ovvero quelli per i quali appare appropriato il modello ossideno-NT (Linear Non-Threshold)
- Gruppo B: Cancerogeni genotossici per i quali non è adeguatamente supportata al presente, l'esistenza di una soglia (in questi casi, resta l'incertezza scientifica, si può utilizzare il modello LNT)
- Gruppo C: Cancerogeni genotossici per i quali è possibile definire un limite pratico
- Gruppo D: Cancerogeni non genotossici e cancerogeni non DNA-dannanti, per i quali il vero ("perfetto") limite è associato con un chiaro ed evidente No Observed Adverse Effect Level (NOAEL).

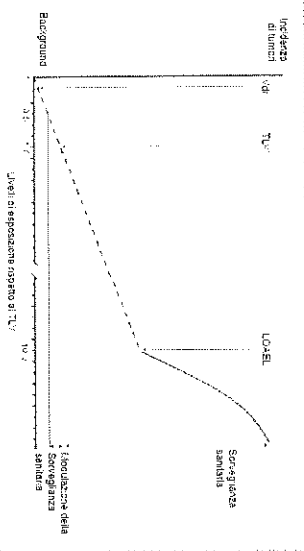
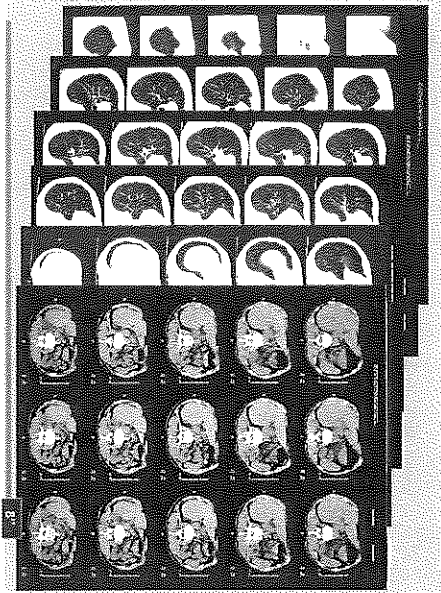
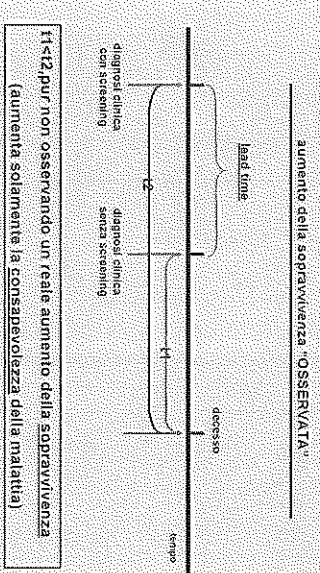


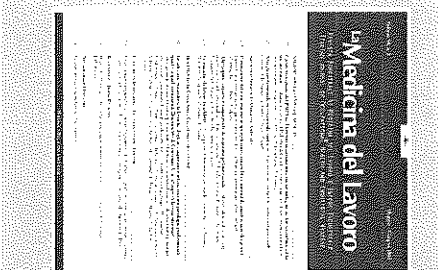
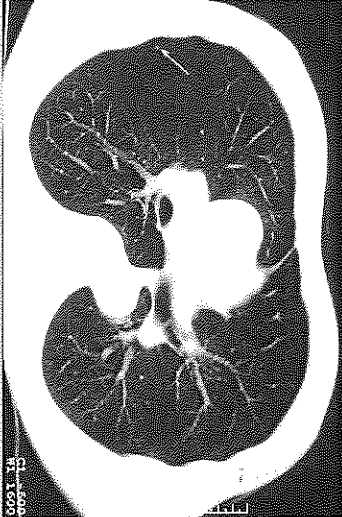
Figura 3: Relazione dose risposta per agenti cancerogeni. In base, continua l'andata la parte non dose risposta, mentre in base non risposta il LOAEL. Il vero Observed Adverse Effect Level, il TV e il Threshold Limit Value, positivamente a valori < 1/10 rispetto al LOAEL, ed il limite superiore dei valori di riferimento (VIR), che spiega l'esposizione di origine ambientale da quella professionale. La sorveglianza sanitaria dovrebbe essere modulata in funzione dei livelli di esposizione.



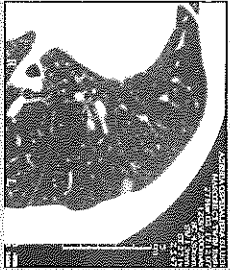
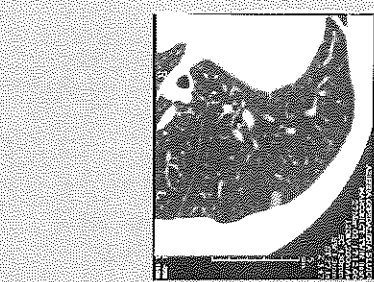
BIAS - lead time



t1 < t2, pur non osservando un reale aumento della sopravvivenza (aumenta solamente la consapevolezza della malattia)

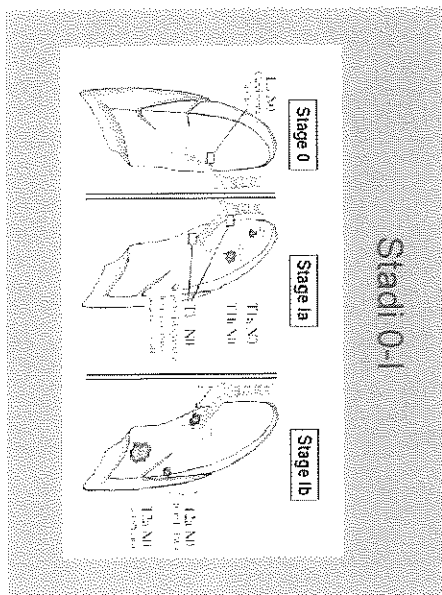
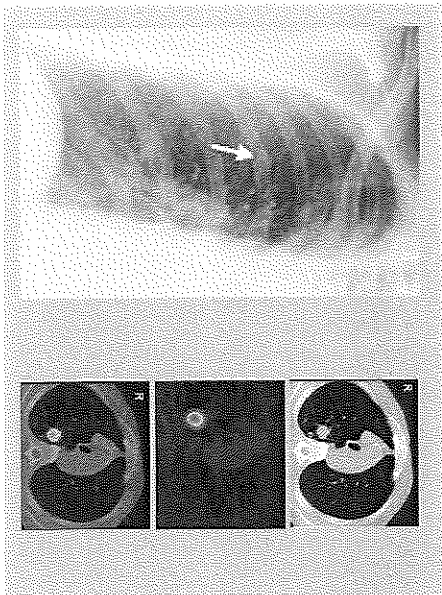
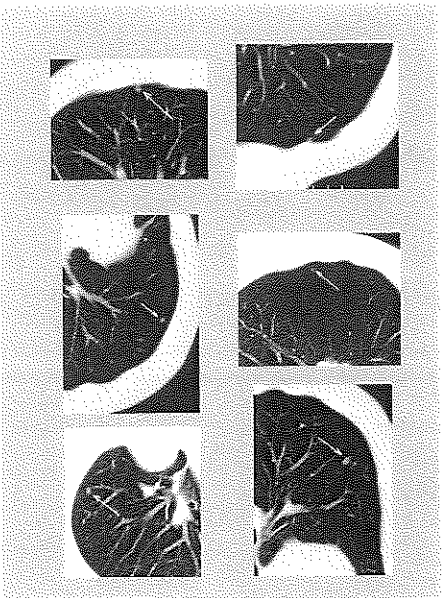


Quali strategie siano applicabili nei confronti di un certo tipo di rischio...
 Per strategie di nuova o meglio ancora preventiva...

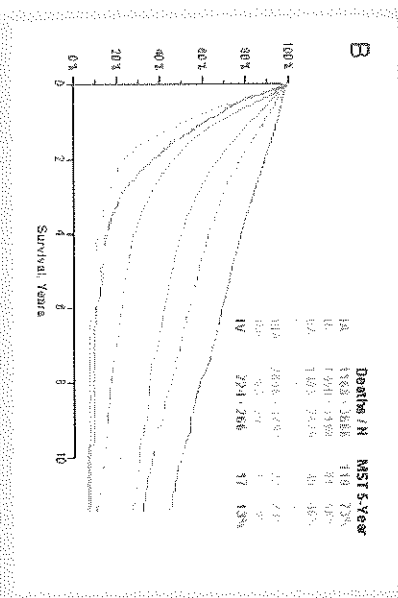


...di un certo tipo di rischio...
 Per strategie di nuova o meglio ancora preventiva...

...di un certo tipo di rischio...
 Per strategie di nuova o meglio ancora preventiva...



Sopravvivenza complessiva secondo lo Stadio Patologico



Nuova Stadiazione Tumore Polmonare e Sopravvivenza a 5 anni

| Stadio | TNM | Sopravvivenza a 5 anni (percentuale Standard) |
|--------|---------------------------------------|---|
| Ia | T1a,b N0 M0 | 73% |
| Ib | T2a N0 M0 | 58% |
| Ic | T1a,b N1 M0 T2a N1 M0 T2b N0 M0 | 46% |
| Iib | T2b N1 M0 T3 N0 M0 | 36% |
| Iiia | T1-3 N2 M0 T3 N1 M0 | 24% |
| Iiib | T4 N0-1 M0 | 9% |
| IV | T1-4 N3 M0 ogni T, ogni N, M1a,b | 13% |

CT Screening for Lung Cancer Spiraling Into Contusion?

Editorial
By Black, WC, and Baron, JA

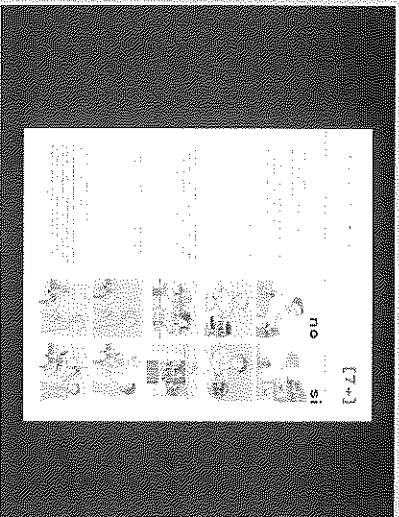
JAMA March 7, 2007—Vol 297, No. 9 995-997

Formulation of screening policy should await the rigorous assessment provided by ongoing randomized controlled trials (National Lung Screening Trial and NELSON Trial)... Although expensive and time-consuming, rigorous trials of cancer screening are far more cost-effective than what might be the alternative—widespread adoption of costly screening interventions that cause more harm than good.

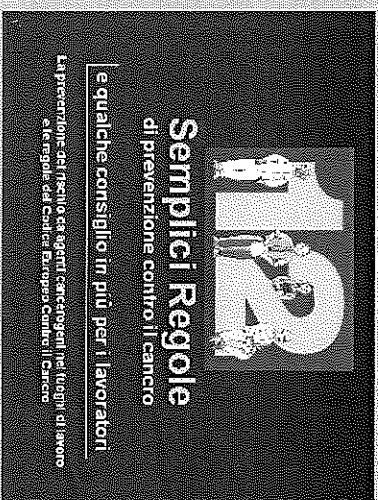
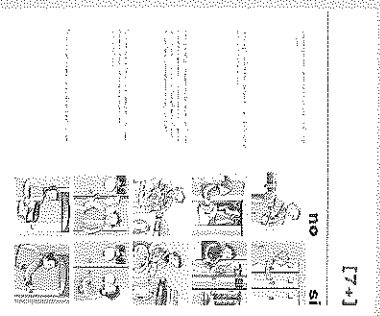
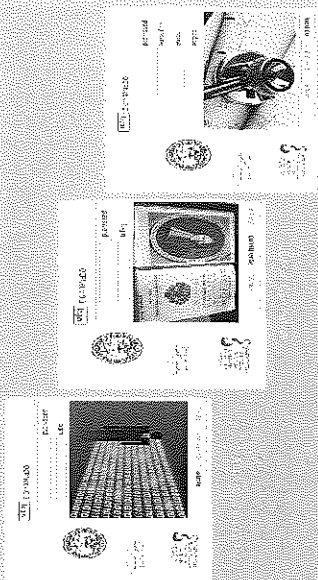
320-Slice CT Reduces Radiation Exposure by 90 Percent

February 24, 2010

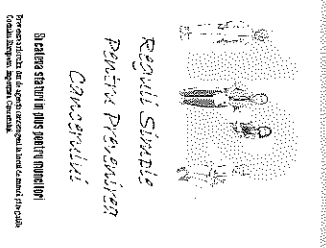
- Researchers found that when using standard 64-detector row helical scanning as a benchmark, the effective radiation dose was reduced by 91 percent using optimized 320-detector row volume scanning.



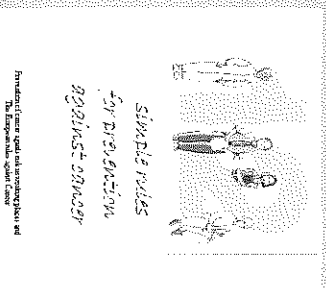
OCCPnet Occupational Cancer Prevention network



Versione in lingua romena



Versione in lingua inglese



RIUNIONE DEL GRUPPO CANCEROGENI 19.1.18

Livelli di esposizione professionale dannosi per la salute e valori di riferimento ambientali

MATERIALI PRINCIPALMENTE TRATTI DA :

AUSL RE - CRA RE - LAPAM RE e MO - UNINDUSTRIA RE e Fiom CGIL RE
L'esposizione a cancerogeni professionali (cromo e nichel) nel taglio laser di acciaio inox: problemi e soluzioni
Criteri generali per l'individuazione dei lavoratori soggetti alla sorveglianza sanitaria e alla registrazione degli esposti a cancerogeni
(dr.ssa Corti Marina, dr. Fulvio Ferri)
Sala Convegni RES Edili, 6 Dicembre 2016

AUSL RE - CRA RE - LAPAM RE e MO - UNINDUSTRIA RE e Fiom CGIL RE
SEMINARIO PER MEDICI COMPETENTI IN AZIENDE IMPEGNATE IN LAVORAZIONI SU ACCIAIO INOX
INQUINAMENTO AMBIENTALE ED INDICATORI BIOLOGICI: DATI DI RIFERIMENTO
(dr.ssa Corti Marina, dr. Fulvio Ferri)
REGGIO EMILIA 20/10/2017

VALUTAZIONE DELL'ESPOSIZIONE PROFESSIONALE - LIVELLI DI ESPOSIZIONE

Ovvero stabilire IN QUALE CONDIZIONE SI TROVINO I LAVORATORI : cioè se

- **POTENZIALMENTE ESPOSTI**: il valore di esposizione ad agenti cancerogeni e/o mutageni risulta superiore a quello della popolazione generale, solo per eventi imprevedibili e non sistematici. Oppure
- **ESPOSTI**: il valore di esposizione ad agenti cancerogeni e/o mutageni potrebbe risultare superiore a quello della popolazione generale (di riferimento) -> da cui ->

-> Sorv. Sanitaria, -> Registraz. Esposti

Definizioni de l COORDINAMENTO TECNICO PER LA SICUREZZA NEI LUOGHI DI LAVORO DELLE REGIONI E DELLE PROVINCE AUTONOME - PROTEZIONE DA AGENTI CANCEROGENI E/O MUTAGENI - LINEE GUIDA (2002)

E' necessario chiarire preliminarmente alcuni concetti fondamentali:

Quando si può dire che, in un'azienda, esiste una esposizione a rischio cancerogeno di tipo professionale (anche solo potenziale) ?

Quand'è che l'esposizione professionale ad un cancerogeno va considerata sicuramente pericolosa per la salute dei lavoratori ?

IL PROBLEMA VA AFFRONTATO CON SERIETA' e ONESTA' CULTURALE PER EVITARE I CASI «PER ASSURDO» O «DIMENTICARE» REALTA' A RISCHIO

Se si rimane nella grossolanità e nell'indeterminatezza delle valutazioni, si corrono due opposti rischi (talora entrambi)

di intraprendere azioni inadeguate, inutili o addirittura controproducenti nei confronti di lavoratori a rischio "marginale", E / O

di non fare alcunché di utile per abbattere esposizioni occupazionali, magari insidiose, che sarebbe possibile e doveroso ridurre

un'aggregazione perversa di peccati di azione e di omissione

Sono domande importanti perché dalle loro risposte derivano impegni e responsabilità gravose per il DDL e per chi lo coadiuva (tra cui la sorveglianza sanitaria specifica e la registrazione degli esposti) (artt. 242 e 243).

Sono importanti anche per noi, Organo di vigilanza, in quanto dalle risposte che daremo può derivare:

- un'azione indebitamente rassicurante, indotta da dati mancanti o carenti, volti a disconoscere una esposizione pure presente, ancorché lontana dai valori limite, (che x il CrVI sono, oggi, assolutamente anacronistici (v. dati epidemiologici)), oppure
- un'azione burocratica, forse formalmente corretta (?!), ma sostanzialmente inappropriata, orientata ad imporre vincoli ed obblighi
 - di cui non è possibile verificare la efficacia,
 - poco o nulla condivisa dagli altri attori chiamati ad applicare le misure di Igiene e Sicurezza (= impatto nullo nel medio termine), oppure
- una azione che, oltre che essere formalmente corretta, è anche APPROPRIATA e VERIFICABILE nella sua EFFICACIA, maggiormente CONDIVISIBILE e GESTIBILE dagli altri attori (DDL, RSPP, MC, RLS e Lavoratori) e quindi destinata a migliorare le condizioni utili alla prevenzione

PER AFFRONTARE CONVENIENTEMENTE IL TEMA,

dopo aver applicato le misure di prevenzione per abbattere gli inquinanti aerodispersi,

BISOGNA PORSI DUE DOMANDE

La prima è di tipo qualitativo

A - NELL'AZIENDA C'E' O CI POTREBBE ESSERE UNA ESPOSIZIONE PROFESSIONALE (RESIDUA) A CANCEROGENI?

In altre parole, sono individuabili (o meno), all'interno del luogo di lavoro, FONTI di generazione o di diffusione - anche solo potenziale - di agenti cancerogeni ?

Se la risposta a questa PRIMA domanda e' positiva, va posta la seconda (Quantitativa)

B - L' ENTITA' COMPLESSIVA DELL' INQUINAMENTO RESIDUO E' TALE DA PREFIGURARE UN' ESPOSIZIONE DEI LAVORATORI MAGGIORE RISPETTO A QUELLA DELLA POPOLAZIONE GENERALE O DI RIFERIMENTO, non professionalmente esposta, della stessa area (o analoga) in cui si trova l'azienda ?

(Escluse le aree particolarmente contaminate per ragioni industriali o altro).

Ciò dovrebbe consentire di stabilire IN QUALE CONDIZIONE SI TROVANO I LAVORATORI :

"POTENZIALE ESPOSIZIONE" (le condizioni di lavoro sono tali da comportare una possibile esposizione (= rischio), ma ogni non «aggiuntiva» rispetto a quella della popolazione di riferimento (cioè NON risultano incrementati i valori di esposizione PROPRI della popolazione di riferimento)

Oppure di

"ESPOSIZIONE PROFESSIONALE DANNOSA PER LA LORO SALUTE": e' documentato un eccesso di esposizione (= rischio) nel luogo di lavoro rispetto a quello presente in una popolazione confrontabile, non professionalmente esposta

Per rispondere a quest'ultima, seconda domanda, occorre ottenere due gruppi di dati :

- 1 _ relativi alle popolazioni non professionalmente esposte (se il cancerogeno e' ubiquitario)
- dati affidabili (da Istituzioni o da riviste scientifiche di adeguato livello) sui livelli di inquinamento di gruppi o popolazioni, omogenei, per caratteristiche personali e geografiche / ambientali, con quelli dei lavoratori in esame
- 2 _ relativi ai lavoratori della ditta in questione
- frequenza / durata ("timing") dell'esposizione
- livelli di inquinamento / esposizione personale dei lavoratori (MISURANDO la concentr. dell'inquinante in condizioni di massima, verosimile esposizione)

Il Cromo esavalente - Cr(VI) : un cancerogeno molto pericoloso

D.: Perché i SP5AL insistono così tanto a chiedere alle aziende la piena applicazione delle BUONE PRASSI di prevenzione in metallmeccanica e, in particolare, per i lavoratori esposti a Cr(VI)? Oppure

D.: Perché chiedono ai consulenti tecnici delle Aziende interessate di affinare le loro metodiche di indagine per definire in modo preciso i livelli di esposizione residui?

R.: Perché il Cr(VI) e' uno dei cancerogeni più potenti, collocato dall'OMS nel gruppetto di testa, precisamente nel 1° quartile (tra i primi 14) dei 53 composti studiati da EPA Carcinogen Assessment Group, per la loro potenza carcinogenetica relativa.

10

Il suo potere carcinogenetico e' molto alto :

infatti, secondo l'OMS EU, il suo I.U.R. (Inhalation Unit Risk), ovvero il rischio incrementale di neoplasie per una esposizione continuata per via respiratoria, per 70 anni (lifetime) ad $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$, e' pari a 4×10^{-2} (secondo l'ISS e' $1,84 \times 10^{-2}$, secondo l'EPA California e' $1,5 \times 10^{-2}$!!!)

il che significa che, secondo l'OMS, per ogni 100 persone esposte lifetime a tale livello, ben 4 di queste (= 4%) si ammalano di cancro a causa del Cr(VI).

Con una semplice proporzione, quindi, e' possibile calcolare un livello di inquinamento aereo socialmente accettabile per la società: una concentrazione di Cr(VI) aerodisperso che procuri, ad esempio, «solo» 1 caso di cancro da Cr(VI) ogni 100.000 persone esposte (1×10^{-5}) a tale concentrazione.

Ebbene, questo livello di inquinamento / esposizione «accettabile» corrisponderebbe a

$$1 \mu\text{g}/\text{m}^3 : 4 \times 10^{-2} = X : 1 \times 10^{-5}$$

$$\text{da cui } X = 0,00025 \mu\text{g}/\text{m}^3 \text{ ovvero } 0,25 \text{ ng}/\text{m}^3 \text{ ovvero } 250 \text{ pg}/\text{m}^3$$

DATI RELATIVI ALLA POPOLAZIONE NON PROFESSIONALMENTE ESPOSTA

Per stimare o conoscere l'esposizione della popolazione di riferimento sono necessari dati affidabili (da Istituzioni Nazionali o Internazionali, Riviste Scientifiche) sui livelli di inquinamento di gruppi o popolazioni, omogenei (per caratteristiche personali e geografiche/ambientali) con quelle dei lavoratori in esame

Rispetto ai livelli di Cromo, Nichel, Cadmio ambientali (outdoor) sono disponibili alcuni dati raccolti dalle fonti citate

RASSEGNA DATI AMBIENTALI DA BIBLIOGRAFIA INTERNAZIONALE- CROMO TOTALE

| Area geografica | Valore ng/m ³ | Range ng/m ³ | Autori |
|--------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Polo Sud | 0.005 | | Maenhaut e Zoller (1977) |
| Oceano Atlantico | | 0.007 - 1.1 | Duce e Zoller (1975) |
| Isole Shetland, Norvegia | 0.7 | | |
| Canada | 0.6 | | Bowen (1979) |
| Europa | | 1 - 140 | |
| Nord America | | 1 - 300 | |
| Giappone | | 20 - 70 | |

Biological and environmental aspects of chromium- SVERRE LANGARD - 1982

RASSEGNA DATI AMBIENTALI DA BIBLIOGRAFIA INTERNAZIONALE- NICHEL

| Area geografica | Valore ng/m ³ | Range ng/m ³ | Autori |
|---|--------------------------|-------------------------|-----------------|
| Zone remote | 1 | | Grandjean(1984) |
| Ambienti urbani e rurali | | 5 - 35 | Bennet (1984) |
| In USA | | | |
| Aree urbane (in estate) | 17 | | |
| Aree urbane (in inverno) | 25 | | N.R.C (1975) |
| Aree non urbane | 6 | | |
| In Inghilterra | | | |
| Zone semirurali | 19 | 10 - 50 | Salmon (1978) |
| Grandi città (zone fortemente industrializzate) | | 110 - 180 | Bennet (1984) |

RASSEGNA DATI AMBIENTALI DA BIBLIOGRAFIA INTERNAZIONALE

| Elemento metallico | Area geografica | Valore ng/m ³ | Range ng/m ³ |
|--------------------|--------------------------------|--------------------------|-------------------------|
| CROMO TOTALE | | | 5 - 200 |
| NICHEL TOTALE | Aree urbane | | 1 - 10 |
| | Aree industrializzate | | 110 - 180 |
| CADMIO TOTALE | Aree urbane e industrializzate | 6 | |

Air Quality Guidelines for Europe

WHO EUROPE AIR QUALITY GUIDELINES-2000

VALORI OBIETTIVO E VALORI LIMITE PER LA QUALITA' DELL'ARIA

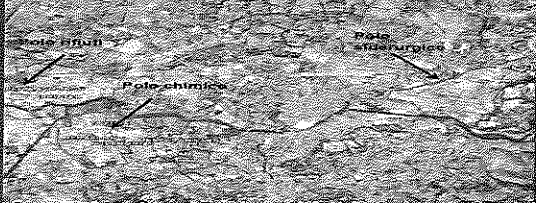
| Inquinante | Valore Obiettivo | Valore limite |
|----------------|------------------------------------|---------------------|
| Arsenico | 6 ng/m ³ | |
| Cadmio | 5 ng/m ³ (anche da OMS) | |
| Nichel | 20 ng/m ³ | |
| Benzo(a)pirene | 1 ng/m ³ | |
| Benzene | | 5 µg/m ³ |

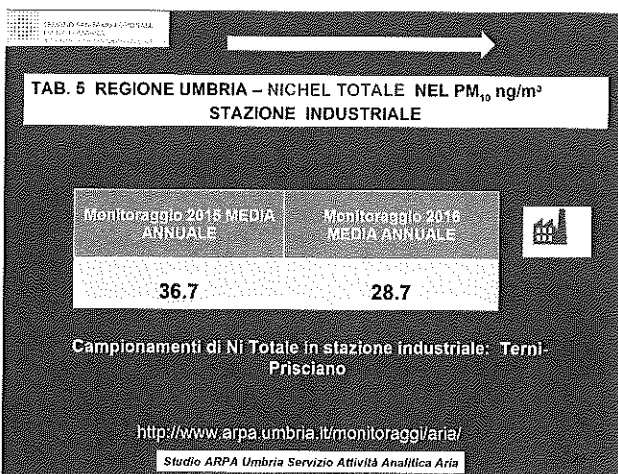
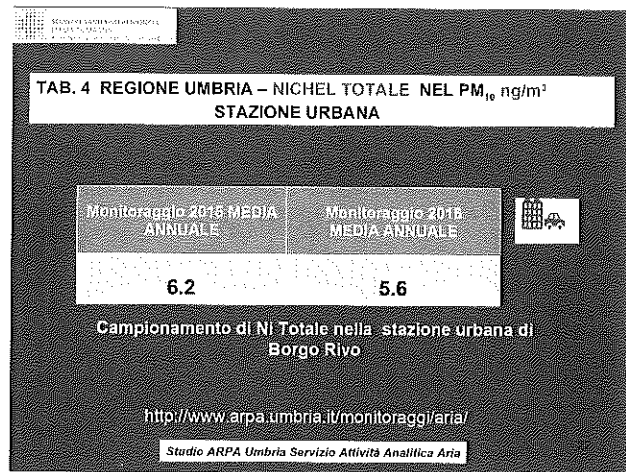
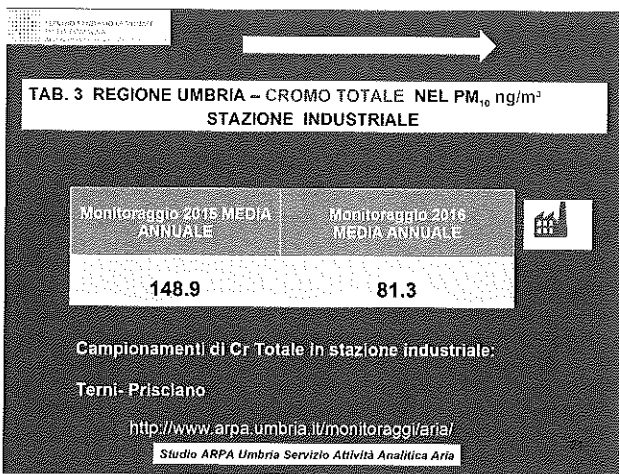
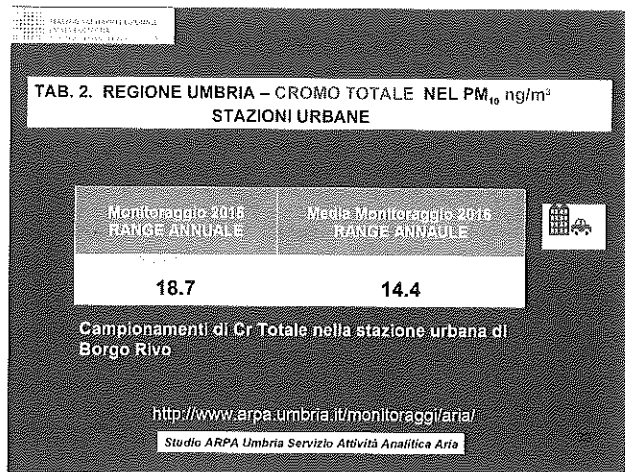
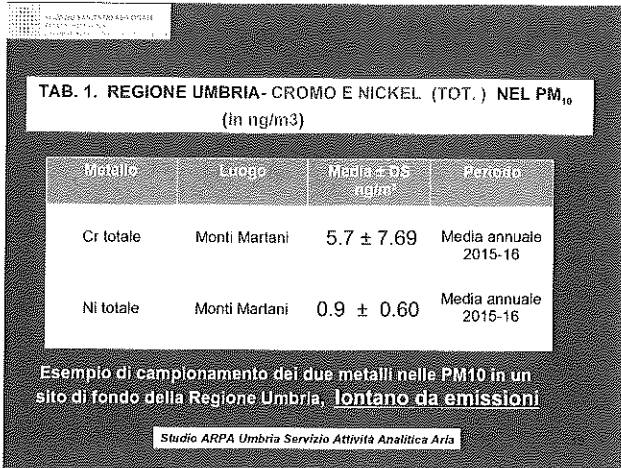
D. Lgs 155/2010, «Attuazione della direttiva 2008/50/CE relativa alla qualità dell'aria ambiente e per un'aria più pulita in Europa»

ATTIVITA' DI ARPA UMBRIA NEL CONTESTO DELLA CONCA TERNANA

Studi di monitoraggio della qualità dell'aria in Umbria evidenziano sistematicamente la presenza di elevate concentrazioni di metalli nel particolato sospeso e nelle deposizioni atmosferiche della Conca Ternana.

In particolare in questa zona è presente un importante polo siderurgico specializzato nella produzione di acciai speciali che risulta essere il maggiore responsabile degli elevati livelli di Cr e Ni misurati in atmosfera, tanto più elevati quanto più prossimi al punto di emissione.



TAB. 6 REGIONE UMBRIA – Cr TOTALE E Cr (VI) NEL PM₁₀ ng/m³

| Stazione | Cr Totale (ng/m ³) | Cr (VI) (ng/m ³) | Periodo |
|-------------------|--------------------------------|------------------------------|-----------------------|
| Monti Martani | 5.7 | 0.9 | Media annuale 2015-16 |
| Borgo Rivo | 18.7 | 6.2 | Media annuale 2015-16 |
| Terni-Prisciano | 148.9 | 36.7 | Media annuale 2015-16 |
| Monti Martani | 5.7 | 0.9 | Media annuale 2016-17 |
| Borgo Rivo | 14.4 | 5.6 | Media annuale 2016-17 |
| Terni-Prisciano | 81.3 | 28.7 | Media annuale 2016-17 |
| Media del periodo | 4.2 | 1.8 | Media del periodo |
| Monti Martani | 5.7 | 0.9 | Media annuale 2017-18 |
| Borgo Rivo | 18.7 | 6.2 | Media annuale 2017-18 |
| Terni-Prisciano | 148.9 | 36.7 | Media annuale 2017-18 |
| Media del periodo | 4.2 | 1.8 | Media del periodo |

PERIODO PRIMAVERILE, IMPIANTO FUNZIONANTE

PERIODO ESTIVO, IMPIANTO FERMO

PERIODO ESTIVO, IMPIANTO FUNZIONANTE

REGIONE UMBRIA –Cr TOTALE NEL PM10 ng/m3 - RIEPILOGO

| Stazioni di monitoraggio | Media del periodo invern/primaverile (impianto funzionante) per Cr totale | Media del periodo estivo (impianto fermo) per Cr totale | Media del periodo estivo (impianto funzionante) per Cr totale |
|------------------------------|---|---|---|
| Area urbana (Borgo Rivo) | 14.8 | 4.2 | 10.8 |
| Area industriale (Prisciano) | 85.3 | 10 | 29.9 |

REGIONE UMBRIA –Cr (VI) NEL PM10 ng/m3

RIEPILOGO

| Stazioni di monitoraggio | Range valori Cr (VI) |
|------------------------------|----------------------|
| Area urbana (Borgo Rivo) | < 0.20 – 2.03 |
| Area industriale (Prisciano) | < 0.20 – 6.65 |


TAB 7. REGIONE EMILIA ROMAGNA – NICHEL NEL PM₁₀ IN ng/m³

| Media ng / m ³ | Città | Periodo |
|---------------------------|-------------------|-----------------------|
| 1.6 | Modena | Media annuale (2015) |
| 5 | Castelnuovo Monti | Mensile dicembre 2015 |
| 1.8 | Vetto | Mensile agosto |
| 1.6 | Parma | Media annuale |

Dati ARPA anno 2015
Rapporto Annuale sulla qualità dell'aria
Rete Regionale Qualità dell'aria

REGIONE E.R. E ARPA-ER- ILPROGETTO SUPERSITO

Il Progetto SUPERSITO, realizzato da Regione Emilia Romagna ed ARPAE-ER ha l'obiettivo di migliorare le conoscenze relative agli aspetti ambientali e sanitari del particolato fine (PM 2.5 e PM 1) e ultrafine (inferiore al PM 0.1) presente in atmosfera sia all'interno delle abitazioni (ambiente indoor) che all'esterno (outdoor).



Tra gli obiettivi del progetto anche quello di eseguire determinazioni tossicologiche per la valutazione delle tipologie di particelle contenenti elementi, composti o miscele di composti che hanno effetti sulla salute



Tab 8. SUPERSITO- VALORI DI INQUINAMENTO AMBIENTALE- CROMO TOTALE (ng/m³) nel PM_{2.5}

| Periodo 2011-2015 | PARMA | BOLOGNA | SAN PIETRO CAPOFIUME | RIMINI |
|-------------------|-------|---------|----------------------|--------|
| Media | 1,53 | 1,54 | 1,58 | 1,57 |
| D.S. | 0,84 | 0,633 | 1,46 | 1,056 |
| Mediana | 1,49 | 1,41 | 1,28 | 1,26 |
| 95° percentile | 2,58 | 2,59 | 3,16 | 2,96 |
| Min. | 0,85 | 0,68 | 0,68 | 0,69 |
| Max | 6,39 | 4,55 | 9,95 | 5,96 |

Dati cortes. Forniti da ARPAE- ER Dott. Vanes Poluzzi

Tab 9. SUPERSITO- VALORI DI INQUINAMENTO AMBIENTALE-
NICHEL TOTALE (ng/m³) nel PM_{2,5}

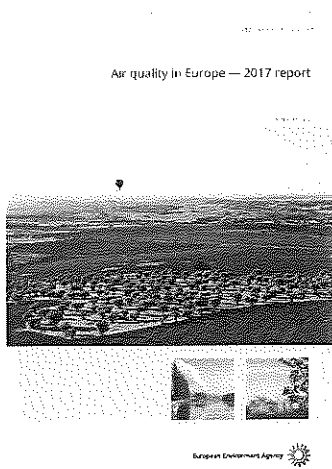
| Periodo 2011-2015 | PARMA | BOLOGNA | SAN PIETRO CAPOFUME | RIMINI |
|-------------------|-------|---------|---------------------|--------|
| Media | 1,99 | 1,82 | 2,46 | 2,17 |
| D.S. | 2,092 | 0,949 | 4,45 | 3,573 |
| Mediana | 1,62 | 1,55 | 1,59 | 1,51 |
| 95° percentile | 3,36 | 3,51 | 4,93 | 4,13 |
| Min. | 0,69 | 0,69 | 0,84 | 0,69 |
| Max | 26 | 8,79 | 40,61 | 39,18 |

Dati cortes. Forniti da ARPAE- ER Dott. Vanes Poluzzi

Tab 10. SUPERSITO- VALORI DI INQUINAMENTO AMBIENTALE-
CADMIO TOTALE (ng/m³) nel PM_{2,5}

| Periodo 2011-2015 | PARMA | BOLOGNA | SAN PIETRO CAPOFUME | RIMINI |
|-------------------|-------|---------|---------------------|--------|
| Media | 0.14 | 0.18 | 0.17 | 0.18 |
| D.S. | 0.114 | 0.224 | 0.239 | 0.291 |
| Mediana | 0.1 | 0.11 | 0.11 | 0.11 |
| 95° percentile | 0.37 | 0.48 | 0.55 | 0.41 |
| Min. | 0.02 | 0.01 | 0.01 | 0.02 |
| Max | 0.93 | 3.30 | 3.06 | 2.98 |

Dati cortes. Forniti da ARPAE- ER Dott. Vanes Poluzzi



Vedi

. pag. 47 - Benzene ref.value : 1,7 ng/m³ Limit Value : 5 ng/m³

. Pag. 48 – Cadmio Target Value: 5,0 ng/m³ LAT : 2 ng/m³

. Pag. 49 – Nickel Target Value : 20,0 ng/m³ LAT : 10 ng/m³

-LAT = Lower Assessment Threshold : soglia di valutazione minima (??)

4 Particulate matter

| Stato | Valore medio annuo (µg/m ³) | Valore limite (µg/m ³) |
|---------------------|---|------------------------------------|
| Albania | 10 | 10 |
| Andorra | 10 | 10 |
| Austria | 10 | 10 |
| Belgio | 10 | 10 |
| Bulgaria | 10 | 10 |
| Cipro | 10 | 10 |
| Croazia | 10 | 10 |
| Danimarca | 10 | 10 |
| Francia | 10 | 10 |
| Germania | 10 | 10 |
| Grecia | 10 | 10 |
| Irlanda | 10 | 10 |
| Italia | 10 | 10 |
| Lituania | 10 | 10 |
| Lussemburgo | 10 | 10 |
| Malta | 10 | 10 |
| Paesi Bassi | 10 | 10 |
| Polonia | 10 | 10 |
| Portogallo | 10 | 10 |
| Repubblica Ceca | 10 | 10 |
| Regno Unito | 10 | 10 |
| Repubblica Slovacca | 10 | 10 |
| Spagna | 10 | 10 |
| Svezia | 10 | 10 |
| Svizzera | 10 | 10 |
| Turchia | 10 | 10 |
| Ungheria | 10 | 10 |

TORNIAMO ALLA QUESTIONE :

per rispondere al quesito : « L'esposizione dei lavoratori e' tale da comportare un rischio per la salute MAGGIORE di quello che grava sulla POPOLAZIONE GENERALE ?» occorre ottenere due gruppi di dati :

1_ relativi alle popolazioni non professionalmente esposte

dati affidabili (da Istituzioni o da riviste scientifiche di adeguato livello) sui livelli di inquinamento di gruppi o popolazioni, omogenei, per caratteristiche personali e geografiche / ambientali, con quelli dei lavoratori in esame.

E QUESTI LI ABBIAMO VISTI : esistono 1 e non li vede solo chi non vuole farlo 1

2_ relativi ai lavoratori della ditta in questione

. frequenza / durata ("timing") dell'esposizione

. livelli di inquinamento / esposizione personale dei lavoratori (MISURANDO la concentr. dell'inquinante in condizioni di massima, verosimile esposizione)

Problema Frequenza:

Qualcuno ha cercato di dare un significato "numerico" alla «scarsa frequenza» con cui un evento si può verificare, scoprendo che il significato di tali termini può variare a seconda dell'intervallo di tempo che consideriamo a riferimento:

- rispetto a tutta la vita ? (dalla nascita alla morte per vecchiaia?),
- durante la vita lavorativa? (dai 18 ai 65 anni?)
- nell'arco di un anno? O di un mese? Una settimana? Un turno lavorativo?

Per offrire un riferimento sul "TIMING", cioè sulle condizioni di frequenza / durata dell'esposizione si può utilmente prendere a riferimento la proposta del gruppo nazionale di esperti (v.) che ha formulato la seguente definizione di "Esposizione Sporadica"

AA.VV. Applicazione degli artt. 245, 242, 243 e 244 del D.Lgs. 81/08. Valutazione delle esposizioni ad agenti cancerogeni e del rischio che ne consegue. Indicatori per la classificazione dei lavoratori come "potenzialmente esposti" ad agenti cancerogeni, tenuto conto delle registrazioni e l'individuazione di potenziali di esposizione in itinere ad essi. La gestione degli esposti ad agenti cancerogeni in ambiente di lavoro. SINOP, 6 settembre 2006.

Come definiremo una ESPOSIZIONE SPORADICA:

quell'esposizione che si protrae

per non piu' di sessanta ore in un anno solare

(vale a dire una settimana e mezza di lavoro, in tutto, con settimana lavorativa di 40 ore)

per non piu' di quattro ore per singola occasione di "esposizione"

Per non piu' di due occasioni di "esposizione" al mese.

E' una definizione arbitraria, pensata per definire una condizione, rivedibile

IL SECONDO ASPETTO DA CONSIDERARE

Come definire una «ESPOSIZIONE DI DEBOLE INTENSITA'»

Se disponiamo di un range di valori di riferimento

(livelli di inquinamento in gruppi o popolazioni non professionalmente esposte ma omogenee, per caratteristiche personali e geografiche / ambientali, con quelle dei lavoratori in esame)

ed il livello di esposizione / inquinamento in ambiente di lavoro e' sicuramente inferiore (v. EN 689/97 ???) a quello dell'estremità superiore di tale range, allora possiamo considerare tale esposizione professionale di debole intensità.

(ATTENZIONE: debole intensità non significa non efficace rispetto a possibili effetti cancerogeni, ai danni della popolazione !!)

E se non esistono valori di riferimento ?

Allora basterà rintracciare anche quantità minime di un cancerogeno che può essersi oggettivamente liberato da una lavorazione prevista, per considerare PROFESSIONALMENTE ESPOSTI al rischio i lavoratori interessati.

Secondo tale gruppo di esperti, per NON essere considerati esposti professionalmente (semmai SOLO potenzialmente esposti), mutuando la definizione di ESEDI dall'art. 249 DL 81/08, presso i lavoratori interessati devono realizzarsi entrambe le condizioni:

Esposizione Sporadica E di Debole Intensità

Metodiche analitiche x Cromo VI e Nickel recenti:

Nickel : OSHA ID 121 - 2002

Nickel : NIOSH 7301, Issue 1 - 2003

Nickel : OSHA ID-215 (version 2) Cr VI - Revised 2006

CrVI : METHOD: 7605, Issue 1 - 2003

Cr VI : METHOD: 7703, Issue 2 - 2015

Cr VI : OSHA ID-215 (version 2)

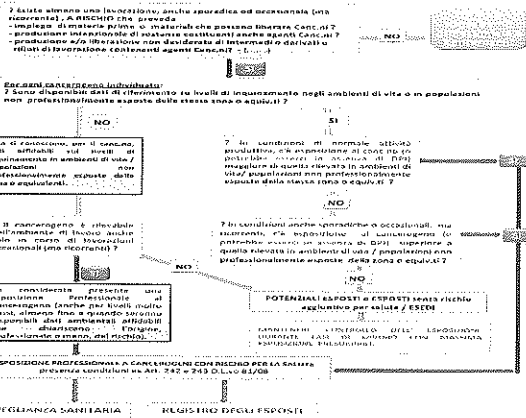
The detection limits of the overall procedure are 0.94 ng/sample (0.98 ng/m3) for Cr (VI)

| L'esposizione è SPORADICA ? | L' esposizione è DI DEBOLE INTENSITA' ? | | Si considera PROFESSIONALMENTE ESPOSTO ? | Si considera solo POTENZIALMENTE ESPOSTO ? |
|-----------------------------|---|--------|--|--|
| | | Allora | SI | (S) |
| NO | SI | Allora | SI (S) (???) | (???) — |
| SI | NO | Allora | SI (*) | — |
| NO | NO | Allora | SI (*) | — |

(S) Senza obbligo di Sorveglianza Sanitaria e Registrazione degli esposti. Resta l'obbligo del controllo del "timing" dell'esposizione o del livello della stessa.

(*) Con obbligo di Sorveglianza Sanitaria e Registrazione degli esposti (art.242 e 243 D.L.vo 81/08)

COME CLASSIFICARE L'ESPOSIZIONE PROFESSIONALE RESIDUA A CANCEROGENI



Per valutare l'esposizione professionale a cancerogeni ci si basa su analisi del ciclo produttivo e sui dati ambientali (sprtt di esposizione, ma non solo)

I dati biologici sono fondamentali x valutare l'esposizione se si sospetta un assorbimento anche per via cutanea (o digerente) .

In genere non vanno considerati come sostitutivi dei dati ambientali .

Per i cancerogeni ubiquitari, dispersi anche nell'ambiente outdoor e che comportano esposizione della popolazione generale, vanno cercate e sollecitate le relative informazioni per assicurare un confronto adeguato con l'intensità dell'esposizione professionale .

Sarebbe opportuno che per il CrVI si conoscessero i livelli di inquinamento outdoor della nostra regione (nelle polveri PM10)

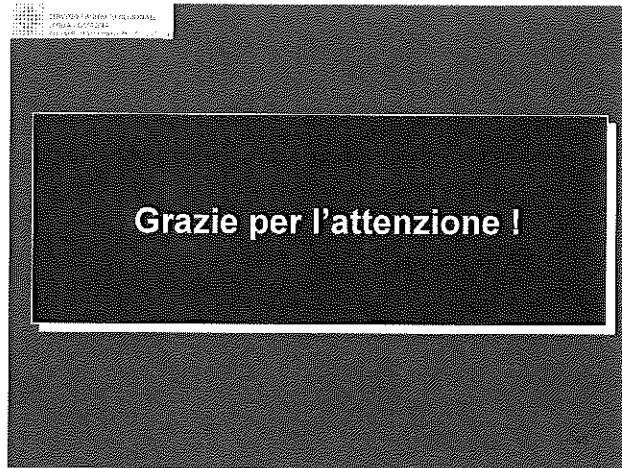
Affinare la capacità analitica adottando le metodiche sperimentate piu' congrue a definire livelli anche minimali di cancerogeni aerodispersi , confrontabili con quelli di popolazione .

Negli ambienti di lavoro vanno utilizzati al meglio le informazioni disponibili su altri possibili **«traccianti»**, indicatori indiretti della possibile esposizione ai cancerogeni (come, ad es., il Ni o il Cr totale, nella saldatura inox quali indicatori di esposizione **«anche»** a CrVI).

In caso di **«indisponibilità dei dati di riferimento «outdoor»**, la presenza accertata del cancerogeno (dosato al di sopra del LOD) depone per la presenza di una esposizione professionale .

In caso di **«mancata rilevazione del cancerogeno (dati < al LOD)»** va verificato se la metodica impiegata e' aggiornata e il suo LOD si colloca almeno all'interno del range dei valori di popolazione (sufficiente sensibilità). In tal caso la mancata rilevazione del tossico, se confermata da analisi ripetute, eseguite nelle condizioni di massima , possibile esposizione, puo' deporre per la condizione di **«Potenziale Esposizione»**

Se la metodica impiegata prevede una limitata sensibilità, tale da non consentire un effettivo confronto con dati di popolazione e i dati così raccolti risultano inferiori ad un LOD di molto superiore ai valori di popolazione, o si ripete l'analisi con metodica piu' appropriata o si considerano «esposti» i lavoratori fino «a prova contraria» .



VALORI BIOLOGICI DI RIFERIMENTO

Molte delle sostanze a cui i lavoratori sono esposti sono inquinanti diffusi (ubiquitari)

Diventa quindi necessario distinguere l'esposizione lavorativa da quella derivante da altre fonti (aria, acqua, alimenti, fumo etc)

- ✓ La disponibilità di indicatori riferiti a soggetti non professionalmente esposti, consente di verificare se l'esposizione del lavoratore è superiore rispetto a quella della popolazione generale

DATI BIOLOGICI DI POPOLAZIONE: RAPPORTO ISTISAN 11/9 -CROMO

- ✓ Nella popolazione generale il National Research Council ha stimato un'escrezione urinaria media di Cromo pari a 0.22 µg/L
- ✓ Dati di letteratura per la popolazione italiana generale riportano livelli medi di cromo urinario ≤ 0.61 µg/L (*)
- ✓ Anche il Cromo nel sangue rappresenta un altro biomarcatore di esposizione a Cromo per la popolazione generale ed in Italia sono riportati valori medi ≤ 0.78 µg/L (*)
- ✓ Altre matrici biologiche: siero ≤ 0.17 µg/L (*)

(*) (Alimonti et al. 2005, Alimonti et al. 2009, Minola et al. 1990)

Programma per il biomonitoraggio dell'esposizione della popolazione italiana (PROBE): dose interna dei metalli: ISS 2011

ISTITUTO ITALIANO DI IGIENE E SANITÀ PUBBLICA
 Istituto Nazionale di Tumori
 Via Venezian, 1 - 00138 Roma, Italia
 Tel. +39 06 49901 - Fax +39 06 4990211
 www.iss.it

DATI BIOLOGICI DI POPOLAZIONE: RAPPORTO ISTISAN 11/9 -NICKEL

- ✓ Proposto un VR di 3.0 µg/L per il Nichel urinario sulla base di studi effettuati su soggetti adulti in Danimarca, Finlandia, Germania, Italia, Norvegia, Russia e Stati Uniti (German Human Biomonitoring Commission, 2001)
- ✓ Studi hanno riportato un valore mediano per il Ni urinario di 1.7 µg/L nei cittadini del Regno Unito (White & Sabbioni) ed un contenuto medio di 0.87 µg/L nella popolazione italiana (Almona et al. 2009)
- ✓ VR per il Ni nel sangue : 0.89 µg/L come media in Italia (Almona et al. 2005)
- ✓ Proposto un VR per il Ni sierico pari a 0.47 µg/L con un intervallo di 0.23-1.03 (Bosca et al. 2006)

ISTITUTO ITALIANO DI IGIENE E SANITÀ PUBBLICA
 Istituto Nazionale di Tumori
 Via Venezian, 1 - 00138 Roma, Italia
 Tel. +39 06 49901 - Fax +39 06 4990211
 www.iss.it

DATI BIOLOGICI DI POPOLAZIONE: RAPPORTO ISTISAN 11/9 -CADMIO

- ✓ Livelli di Cd nel sangue riflettono sia esposizioni recenti che croniche
- ✓ In generale le donne mostrano livelli più elevati di Cd amatici ed urinari rispetto a uomini della stessa età (Hoguchi et al. 2004; Osson et al. 2002; Wastberg et al. 2005)
- ✓ Nei fumatori i livelli di Cadmio nel sangue e nelle urine sono generalmente più alti, anche il doppio, rispetto ai non fumatori (Becker et al. 2003; Marinou et al. 2004; Osson et al. 2002)
- ✓ La concentrazione di Cd nel sangue della popolazione generale varia da circa 0.4 a 1.0 µg/L per i non fumatori
- ✓ e tra 1.4 e 4.0 µg/L per i fumatori (Ehrhard 1995)

Programma per il biomonitoraggio dell'esposizione della popolazione italiana (PROBE)- dose Interna dei metalli- ISS 2011

ISTITUTO ITALIANO DI IGIENE E SANITÀ PUBBLICA
 Istituto Nazionale di Tumori
 Via Venezian, 1 - 00138 Roma, Italia
 Tel. +39 06 49901 - Fax +39 06 4990211
 www.iss.it

DATI BIOLOGICI DI POPOLAZIONE : VALORI DI RIFERIMENTO LISTA SIVR 2011

| Elementi metallici | U.M. | Intervallo di concentrazione 5°- 95° percentile | | | Fattori di variabilità |
|--------------------|------|---|------------|-------------|------------------------|
| | | Sangue | Siero | Urine | |
| Cd | µg/l | 1,0 - 1,5 | 0,1 - 0,15 | 0,1 - 1,5 | R, F, E, S |
| Cr | µg/l | 0,1 - 0,5 | 0,1 - 0,20 | 0,05 - 0,35 | E, R, F |
| Ni | µg/l | 0,1 - 2,0 | 0,1 - 1,0 | 0,1 - 5,0 | F, S, E |

Fattori di variabilità: Sesso (S), Età (E), Residenza (R), Alimentazione (D), Consumo di alcool (A), Bevande (B), Farmaci o medicinali, integratori dietetici (Far)

www.valoriinferimento.it

CONCLUSIONI

Per la valutazione dei soggetti professionalmente esposti importante prendere in considerazione, quando disponibili, anche i valori di riferimento sia ambientali che biologici.

Questi possono assumere il ruolo di valori guida di estrema utilità nel campo della medicina ambientale e del lavoro

Non sono soltanto indicatori dell'inquinamento dell'ecosistema MA possono essere utilizzati come termine di confronto per evidenziare chi, presentando livelli di assorbimento di tali inquinanti superiori a quelli attesi, va considerato particolarmente a rischio.

ISTITUTO ITALIANO DI IGIENE E SANITÀ PUBBLICA
 Istituto Nazionale di Tumori
 Via Venezian, 1 - 00138 Roma, Italia
 Tel. +39 06 49901 - Fax +39 06 4990211
 www.iss.it

BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

- ✓ IARC, Arsenic, Metals, Fibres and Dusts. VOL. 100 C A Review of human Carcinogens (2012)
- ✓ COORDINAMENTO TECNICO PER LA SICUREZZA NEI LUOGHI DI LAVORO «Previdenza da agenti cancerogeni e/o mutageni- Linee Guida » 2002
- ✓ SVERRE LANGARD : Biological and environmental aspects of chromium (1982)
- ✓ WHO: «Air Quality Guidelines for Europe» second edition (2000)
- ✓ ARPA Umbria: Cromo esavalente nell'aria della Città di Terni: uno studio preliminare anno 2015-2016
- ✓ ARPA UMBRIA: Monitoraggi ARPA- Metalli su PM10- Monitoraggio anno 2015 e 2016
- ✓ ARPAE Report Annuale Rete Regionale Qualità dell'aria Parma anno 2015
- ✓ ARPAE Rapporto Annuale sulla qualità dell'aria Reggio Emilia anno 2015
- ✓ SIMILI: Linee guida per il monitoraggio biologico (2013)
- ✓ SIMILI: Linee guida per la sorveglianza sanitaria degli esposti ad agenti cancerogeni e mutageni in ambienti di lavoro (2013)
- ✓ SOCIETÀ ITALIANA VALORI DI RIFERIMENTO: Terza lista dei valori di riferimento per elementi, composti organici e loro metaboliti edizione 2011
- ✓ ISS: «Rapporto ISTISAN 11/9 IT. Programma per il biomonitoraggio dell'esposizione della popolazione italiana (PROBE)- dose interna dei metalli (2011)
- ✓ ARPAE, SIMILI, SIVR: Position Paper: Criteri Metodologici per la valutazione e proposta di valori-guida (VG) nazionali per il controllo dell'esposizione professionale a fattori di rischio chimici (2015)

AA.VV. Applicazione degli artt. 236, 242, 243 e 244 del Dlg. n.108. Valutazione dell'esposizione ad agenti cancerogeni e del rischio che ne consegue: indicazioni per la classificazione dei lavoratori come "professionalmente esposti ad agenti cancerogeni", la loro conseguente registrazione e lo svolgimento di programmi di sorveglianza sanitaria ad hoc. La questione degli ex-esposti ad agenti cancerogeni in ambiente di lavoro. SINDP - 6 Settembre 2016

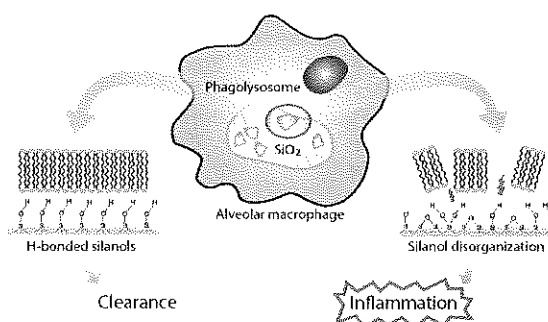
Unveiling the Variability of “Quartz Hazard” in Light of Recent Toxicological Findings

Cristina Pavan and Bice Fubini*[✉]

Department of Chemistry, University of Torino, Via P. Giuria 7, 10125 Turin, Italy

“G. Scansetti” Interdepartmental Center for Studies on Asbestos and Other Toxic Particulates, University of Torino, Via P. Giuria 9, 10125 Turin, Italy

ABSTRACT: The variability of quartz hazard stands as one of the most puzzling issues in particle toxicology, notwithstanding the fact that silicosis, the most ancient occupational disease, was the very topic from which the study of the toxicity of particulates developed. Over the years, other adverse effects of silica particles (i.e., lung cancer and autoimmune diseases) were detected and described. However, a few gaps are still present in the physico-chemical determinants and cellular pathways involved in the mechanisms of silica pathogenicity. In this perspective, we illustrate how pooling together studies in occupational health and nanotoxicology might fill such gaps, yielding a consistent picture of what imparts toxicity to a given silica source. Recent investigations have shown that crystallinity is not implied in the pathogenic process of silica per se, while patches of disorganized silanols at the surface of both crystalline and amorphous particles can promote membrane damage and inflammation, a process at the origin of silica-related diseases. Introducing these new findings into the accepted multistep model of silica pathogenicity, we obtain a picture of the chemical features of silica governing each cellular step in agreement with the outcomes of major previous studies. We ascribe the origin of the variability of silica hazard mainly to the distribution of various moieties at the particle surface, with silanols playing the major role. Toxicity turns out to be likely predictable by an ad hoc surface characterization. Tailored modifications of the surface can be envisaged to prepare safe materials or blunt toxicity in existing ones.



CONTENTS

| | | | |
|--|-----|---|-----|
| 1. Variability of Quartz Hazard | 470 | 2.2. Central Role of the Particle Surface | 473 |
| 1.1. Occurrence of Silica-Related Diseases: Circumstances and Peculiarities | 470 | 2.3. Subsequent Steps of the Mechanism of Silica Toxicity As Modulated by Different Surface Properties | 473 |
| 1.2. Variability in Cell Responses to Particulate Silica | 470 | 3. Filling the Gaps in the Association between Particle Surface Features and the Single Steps in the Cascade of Events Causing Silica Pathogenicity | 474 |
| 1.3. Silica Itself as a Variable Entity: The Physicochemical Basis of Its Intrinsic Variability | 471 | 3.1. Objections to the Paradigm of Crystallinity in Silica-Related Diseases | 474 |
| 1.3.1. Flexibility of the Si–O–Si Bond and the Presence of a Large Variety of Silica | 471 | 3.1.1. Not All Crystalline Silica Particles Are Pathogenic | 475 |
| 1.3.2. Covalence and Polarity Give Rise to the Coexistence of Several Radical Functionalities | 471 | 3.1.2. Ground Vitreous Silica Behaves Like a Quartz Dust | 475 |
| 1.3.3. Polarity and Interaction with Water Determine Silanol Population, Surface Acidity and H-Bonding Potential | 471 | 3.1.3. Amorphous Silica Particles May Exert Toxic Effects on Cells | 475 |
| 1.3.4. Why Is Silica Unique? | 472 | 3.1.4. Crystal Order of the Bulk Seldom Shows up at the Particle Surface | 475 |
| 2. Brief Overview on the Approaches to the Mechanism(s) of Silica Pathogenicity: From Simple Association between Particle Exposure and Injury to a Multistep Pathological Process Governed by Different Physicochemical Features | 472 | 3.2. Simplified Systems to Build up a Comprehensive Model | 476 |
| 2.1. Cells and Mediators Implicated | 473 | | |

Special Issue: CRT30

Received: October 30, 2016

Published: December 1, 2016

| | |
|--|-----|
| 3.2.1. Simplified Solids | 476 |
| 3.2.2. Simplified Biological Systems | 476 |
| 3.3. New Adverse Outcome Pathway (AOP) for Silica Inflammogenicity | 476 |
| 3.3.1. How the Molecular Initiating Event (MIE) May Be Figured Out | 476 |
| 3.3.2. How the Key Events (KE) May Be Associated | 476 |
| 3.3.3. New Proposal of AOP for Silica Inflammogenicity | 477 |
| 4. Is the Model Proposed Consistent with Past Research? | 478 |
| 4.1. Crystallinity, Polymorphs, and Poorly Active Quartz | 479 |
| 4.2. How Do Silicosis Antidotes Act? | 479 |
| 4.3. Are Quartz Particles Nongenerated by Crystal Fracturing Pathogenic? | 479 |
| 4.4. Where Are We with the Toxicity of Amorphous Silica? | 479 |
| 5. State of the Art and Future Perspectives | 479 |
| Author Information | 480 |
| Corresponding Author | 480 |
| ORCID | 480 |
| Funding | 480 |
| Notes | 480 |
| Biographies | 480 |
| Acknowledgments | 480 |
| Abbreviations | 480 |
| References | 480 |

1. VARIABILITY OF QUARTZ HAZARD

1.1. Occurrence of Silica-Related Diseases: Circumstances and Peculiarities. Silicosis, the most ancient occupational disease, occurs with very variable severity depending on the source of crystalline silica, while no significant cases were reported following exposure to the most common sources of amorphous silica.¹ Lung cancer is associated with crystalline silica exposure, but does not occur in all circumstances of exposure to crystalline silica.^{2,3} Such a situation was summarized at the end of the century as "The quartz hazard: a variable entity".⁴ Silica is present worldwide in nature, rocks, sand, biogenic deposits, fly, and volcanic ashes, and employed in a large variety of manufacturing, glass, cement, ceramics, nanomedicine, yet diseases occur in a limited number of cases. The compound SiO₂ cannot thus be

considered pathogenic as such. The question is how and when does SiO₂ become a toxic agent?

Since ancient times, crystallinity was considered to be the prerequisite feature for silica pathogenicity, in spite of some reports on nonpathogenic quartz dusts^{5,6} and the general notion among mineralogists that quartz particles generated by grinding yield irregular distributions of crystallographic surfaces, expose conchoidal fractures,^{7,8} and are mostly covered by an amorphous layer.^{9–12} The cells and tissue would have indeed been in direct contact with amorphous surfaces. Observing the occurrence of major occupations associated with silica exposure and related disasters (Table 1), one feature emerges: in nearly all cases, crystalline silica (more often quartz, but also the other common polymorphs cristobalite and tridymite) was ground, crushed, or abraded. This is also the case with the very recently reported outbursts of silicosis due to denim sandblasting,^{13,14} hydraulic fracturing of gas and oil wells,¹⁵ and polishing of artificial stones.^{16–18}

Major pathologies caused by particulate matter, asbestos and silica, have been for a long time associated merely to physical factors, e.g., fibrous shape and crystallinity, disregarding any role of surface reactivity. Only at the end of the past century, a large number of *in vivo* and *in vitro* experimental studies have shed light on several surface physicochemical features of the particles related to their adverse effects on cells and tissues.

1.2. Variability in Cell Responses to Particulate Silica.

Many studies showed that crystalline silica particles are cytotoxic, inflammogenic, trigger the production of inflammatory substances, oxidants and growth factors from cells, can damage membranes, etc.^{9,24} However, when the same test was performed on a variety of silica samples either collected or prepared ad hoc, the extent and even the nature of the cellular response varied.^{5,25–34} If the quartz particles were associated with other minerals or elements (such as aluminum, iron, and carbon), effects were in some cases enhanced^{35–37} or blunted in others.^{35,38–40} Also, deposition of polymers or other substances on the particle surface modified (mostly inhibited) cellular responses.^{41–45}

Remarkable differences were also found among various forms or preparation of amorphous silica. The interest in synthetic nanosilica, nearly always amorphous, has grown exponentially in the last few years due to its huge potential in medical, cosmetic, and food applications. Thus, silica nanoparticles, for which a special abbreviation has been coined, SiNPs, have become one of the major issues of particle

Table 1. Major Occupations Associated with Silica Exposure and Related Disease Outbreaks

| occupations | industries | associated disease outbreaks |
|-------------------------------|--|--|
| sandblasting | construction, painting, shipbuilding, ironworking, denim, and hydraulic fracturing | sandblasters in oil fields, 1970–2000s, Texas and Mississippi (USA) ¹⁹ denim-sandblasting in the garment industry, 2000s, Turkey ¹³ and Bangladesh ¹⁴ |
| mining | mines (construction, metals and nonmetals, diatomaceous earth, and coal mining) | gold mines: 1900s, Delamar, Nevada (USA); 1940s, Australia; 1980–90s Minas Gerais, Brazil, ²⁰ 2000s, South Africa, ²¹ and China ²² Hawks Nest tunnel, 1930s, West Virginia (USA) ¹⁹ Val Camonica construction site, 1950s, Brescia (Italy) granite workers, 1970s, Vermont (USA) ² |
| granite processing and mining | quarries (granite) | |
| grinding | industrial sand, granite industry | |
| ceramic production | pottery, ceramics, sanitary ware, tiles, porcelain | ceramic workers, 1970s–1980s, Italy, ²³ USA, and UK ² |
| glassmaking | glass production | |
| casting and blasting | foundry | |
| polishing and cutting | construction, granite and artificial stone industry, jewelry, and dental products | countertop workers, 2000s, Israel, ¹⁸ Spain, ¹⁷ and Italy ¹⁶ |
| drilling and fracking | hydraulic fracturing | hazard alert, 2016, USA ¹⁵ |

and nanotoxicology. A review appeared few years ago entitled "The Nanosilica Hazard: Another Variable Entity".⁴⁶ Further studies confirmed such variability⁴⁷⁻⁴⁹ and showed that some amorphous silica types elicited cell responses considered relevant to the accepted mechanism of toxicity of crystalline silica. The effects of some amorphous silica particles were sometimes comparable to or even more pronounced than those of crystalline silica particles.^{50,51}

1.3. Silica Itself as a Variable Entity: The Physico-chemical Basis of Its Intrinsic Variability. Silica, the most ancient material used by humankind (flint stones mainly consist of silica), has a simple chemical formula, SiO_2 . Opposite to other oxides, e.g., ZnO , NiO , and TiO_2 , silica is always stoichiometric. Yet silica occurs in a wide variety of polymorphs and forms, which give rise to very different materials.^{52,53} One should therefore refer to the plural term "silicas", as silica is not a single entity, or just use silica as a plural noun. Nothing similar happens with any other oxide. The reason for this peculiarity mainly stems from the specific nature of the silicon-oxygen bond: a covalent *sigma* bond, with polar character and with a large degree of flexibility of the Si-O-Si angle that connects two tetrahedra.⁵²

1.3.1. Flexibility of the Si-O-Si Bond and the Presence of a Large Variety of Silica. The silicon-oxygen tetrahedron [SiO_4] is the basic unit of all silica forms, with the only exception of stishovite where silicon is hexa-coordinated. In the tetrahedron, each silicon atom is surrounded by four oxygen atoms, and each oxygen atom is shared by two tetrahedra. While the [SiO_4] unit is rigid, the Si-O-Si angle that connects two tetrahedra can easily change upon temperature, pressure, or geometrical constraints. Because of this high flexibility, a large number of silica-based materials are found in nature or may be prepared industrially for different purposes, from dense crystalline and amorphous structures (e.g., quartz or glasses) to porous light systems (e.g., aerogels, zeolites, and microporous/mesoporous materials). Most common natural sources of silica are of mineral or biogenic (i.e., silica materials produced by living matter) origin. Both natural and synthetic sources of silica may exhibit amorphous or crystalline forms.⁵²

Crystalline silica is characterized by regular arrangements of the tetrahedra and exists in a relatively large number of natural polymorphs depending on the different orientation and position of the tetrahedra,² a direct consequence of the flexibility of the bond joining the tetrahedra. Alpha-quartz is the thermodynamically stable polymorph in ambient conditions and thus the most present in nature (12% of the earth crust). The other polymorphs, tridymite, cristobalite, coesite, and stishovite may be found in a metastable state at room temperature and atmospheric pressure over extremely long periods of time² (for details on stability and metastability, see the phase diagram).⁵⁴ When heated above ca. 1700 °C, silica melts. The cooling down of the melt gives rise to vitreous silica, made up by a disordered network of [SiO_4] tetrahedra. Thus, vitreous silica is amorphous, albeit very similar to quartz.⁵⁰ Synthetic crystalline silica particles are not very common, but examples are some high silica forms (i.e., porosils) similar to the most common aluminosilicates (zeolites)⁵⁵ or cultured quartz crystals.^{56,57}

In amorphous structures, the [SiO_4] units are linked in random networks, and the orientation of the bonds lacks any periodicity, which yields disordered systems. Amorphous natural forms are either of mineral origin, such as hydrous silica (e.g., opal) and vitreous silica, or of biogenic origin.

Two major biogenic silica sources are diatomaceous earth, formed by deposition of diatoms frustules, or crop plants such as sugar cane, rice, and millet, which accumulate silica in their tissues to promote structural integrity and protect against pathogens and insects. Synthetic silica is generally produced in amorphous form, examples being pyrogenic and precipitated silica.

1.3.2. Covalence and Polarity Give Rise to the Coexistence of Several Radical Functionalities. The nature of the Si-O bond being covalent with a polar character explains why two types of cleavage are possible:⁹ (i) a homolytic fracture leaving an unpaired electron on both silicon and oxygen atoms (dangling bonds), which readily react with atmospheric components, mostly O_2 , forming oxygen-based surface radicals;⁵⁸ (ii) a heterolytic fracture which because of polarity generates a positive charge on silicon and a negative one on oxygen, which may either coordinate metal ions or attract smaller particles at the surface of bigger ones by electrostatic interactions.

Interestingly, beside the gaseous environment, the chemical composition of the grinding chamber will also determine the surface topography and location of possible contaminants.^{36,59} In very moist atmosphere, water will assist saturation of broken bonds reducing radicals and generating silanols (see the next section).⁶⁰

1.3.3. Polarity and Interaction with Water Determine Silanol Population, Surface Acidity and H-Bonding Potential. Any ideal termination of pure silica envisages arrays of Si-O-Si bonds, i.e., siloxane bridges, either ordered (crystalline) or disordered (amorphous). Because of the polarity of the Si-O bond, in the presence of water, siloxanes tend to dissociate the H_2O molecule to form two silanols ($-\text{SiOH}$)⁶¹ (Figure 1a). This process may readily occur upon exposure to atmospheric moisture with strained siloxane bridges or be extremely slow with regular ordered ones.

Conversely, silanols may condense into siloxanes upon heating via the reverse reaction (Figure 1b).⁶² At the silica surface, the condensation process may also form siloxane rings (SiO_n) from the highly strained two- and three-membered siloxane rings, (SiO_2) and (SiO_3), respectively, to larger unstrained ones.^{48,52} A full surface hydration, i.e., complete reaction of siloxanes with water, mainly takes place when silica particles are synthesized by precipitation from an aqueous solution, while full conversion of silanols into siloxanes may be only attained at very high temperature.⁶² Besides these two extreme situations, all other silica surfaces will be partially hydrated, in a metastable state toward water molecules. Opposite to what happens with metal oxides, silanols are acidic moieties with a potential for H-bonding, the strength of which depends upon their location at the surface.

Any silica surface is characterized by different types of $-\text{SiOH}$ groups and by different H-bonding patterns resulting from mutual interactions among them.⁵² The various "families" of silanols that coexist on most silica surfaces, as illustrated in Figure 1c, are isolated, when the distance to the closest $-\text{SiOH}$ groups is such (more than ca. 3.3 Å) that they are unable to establish mutual interactions; geminals, two hydroxyl groups ($-\text{OH}$) linked to the same silicon atom that also cannot be involved in mutual H-bonding because of the $-\text{OH}$ orientations; vicinals, belonging to tetrahedra that share a common oxygen vertex. Even if separated by less than 3 Å, vicinal silanols usually do not establish mutual H-bonds or, as consequence of local geometrical constraints, are involved in weakly H-bonding. The isolated and geminal silanol groups are

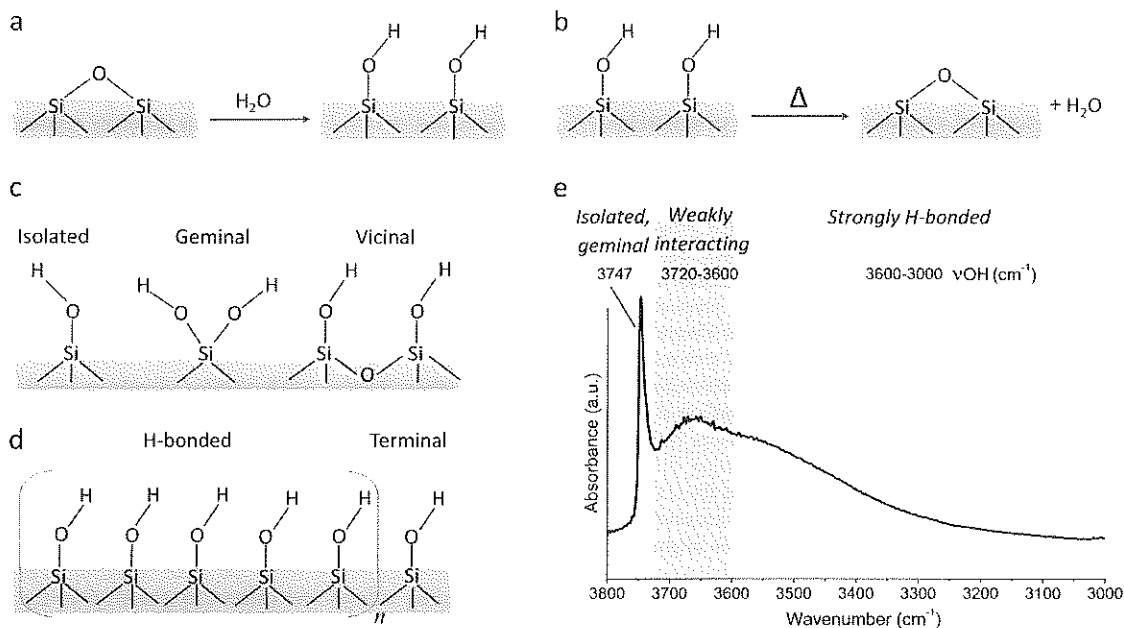


Figure 1. Silanol groups and patterns on a silica surface. (a) Formation of silanol groups from siloxane opening in the presence of water. (b) Condensation of silanols into siloxanes upon heating. (c) Different silanol groups and (d) H-bonding patterns on a silica surface. (e) FT-IR spectrum in the hydroxyl spectral region ($3800\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$) of a pyrogenic silica. The narrow peak at 3747 cm^{-1} is associated with isolated or geminal silanols, the band at $3720\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$ to silanol interacting via van der Waals, or weak H-bonding, the broad band at $3600\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ to silanols interacting via strong H-bonding.

then free to establish H-bond interactions with external molecules as H-bond donor and acceptor sites but only if in the right position, as the nature of H-bonding is strongly directional. Two silanols that do not belong to directly connected tetrahedra (as the vicinal ones) or the same tetrahedra (as the geminal ones) but nonetheless are closer than 3.3 \AA will establish H-bonding, and are called *interacting* or *H-bonded* (Figure 1d). According to Rimola et al.,⁵² the optimum O...O distance between the two -OHs involved in a H-bond lies between ca. 2.5 and 2.8 \AA . The H-bond patterns strongly depend on the disposition and on the density of the -SiOH groups at the surface.

The presence of these silanol patterns on a silica surface gives rise to different spectroscopic manifestations due to -OH stretching (νOH)⁶³ as shown in Figure 1e where a typical FT-IR spectrum in the hydroxyl spectral region ($3800\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$) of a pyrogenic silica is taken as an example.²⁶ The narrow peak at 3747 cm^{-1} is associated with isolated or geminal silanols (distinguishable only by NMR spectroscopy),⁵² the band at $3720\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$ to -SiOH interacting via van der Waals or weak H-bonding, the broad band at $3600\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ to -SiOH interacting via strong H-bonding.⁶⁴

Because of the complex kinetics governing surface hydration-dehydration, the surface distribution of siloxanes and of the various silanol families varies from one to the other source of silica particles and may slowly evolve with time. Siloxanes and isolated silanols impart hydrophobicity to the surface, while all other types of silanols cause hydrophilicity.⁶² A highly dehydrated surface is hydrophobic, while a fully hydrated one is hydrophilic. Besides these two extremes, any silica surface will bear hydrophilic and hydrophobic patches, the distribution of which will be characteristic of that specimen and its thermal history.

For more details, extensive literature (both past or recent) on the chemistry of silica is available.^{52,53,65,66}

1.3.4. Why Is Silica Unique? The above description accounts for a variability of silica hazard, as there is now agreement (see below) that it is the surface of the particle which interacts with living matter and that several surface features, typically dangling bonds, free radical generating centers, silanols, are implicated at different stages in the pathogenic mechanism underlying silica health effects. Moreover, most of the surface functionalities may react with many of the impurities in contact with the surface, such as charges or silanols with metal ions, further enhancing surface heterogeneity, hence variability.⁶⁷ The answer to the question as to why silica is unique is so straightforward. Silica is one of the few stable, nonionic oxides always present in solid state in ambient conditions. An ionic oxide, particularly when in aqueous medium, will easily undergo surface reconstruction, healing of defects, release of metal ions, and compensation of charges, yielding surface states much simpler than those of silica.

2. BRIEF OVERVIEW ON THE APPROACHES TO THE MECHANISM(S) OF SILICA PATHOGENICITY: FROM SIMPLE ASSOCIATION BETWEEN PARTICLE EXPOSURE AND INJURY TO A MULTISTEP PATHOLOGICAL PROCESS GOVERNED BY DIFFERENT PHYSICOCHEMICAL FEATURES

The search for the characteristics of crystalline silica particles causing adverse effects took place much time later than the detailed description of the diseases and of its anatomical features, e.g., the silicotic nodule. It must, however, be mentioned that well-conducted pioneering studies in the 1950s already indicated a possible role of chemistry underlying the toxicity

of silica.^{11,68–70} Research then continued in search of one single physicochemical property responsible for the toxic effects of silica. Some features of crystalline silica absent in amorphous ones appeared the best candidates.

2.1. Cells and Mediators Implicated. In the mid-20th century, it became clear that several cell types are involved in damage of the lung tissue in silicotics, including macrophages, granulocytes, epithelial cells, and fibroblasts. A mechanistic model implying macrophage activation and/or damage, release of several reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS, respectively), pro-inflammatory and chemotactic mediators (e.g., cytokines, chemokines, growth factors, alarmins, arachidonic acid derivatives, and enzymes), followed by fibroblast proliferation was proposed and progressively implemented with new findings.^{4,71,72} Inflammation was considered a crucial step not only in silicosis but also in silica-related bronchogenic carcinoma.^{3,73} Yet the physicochemical features of crystalline silica responsible for all the above adverse outcomes were still obscure. When the need to unveil the basic reasons behind toxicity was required for prevention and therapy, attention was finally focused on the physicochemical characteristics of the particles.

2.2. Central Role of the Particle Surface. Much time later, the particle surface was recognized as the chemical entity in direct dialogue with cells and tissues and particularly with cell membranes. Accordingly, the majority of the antidotes used for silicosis were substances that would modify or cover the particle surface. Surface modifications such as etching with HF, aluminum contamination, polymer deposition, and impurities, appeared indeed to modulate cellular responses.^{33,38,41,42,74–77} The crucial role of the particle surface in evoking toxic effects was then accepted. Research was, however, still focused on one single feature that would have explained silica toxicity. When a limited number of crystalline silica dusts or of chemically modified crystalline silica particles were tested, several surface properties appeared to parallel some of the adverse cellular responses or even toxicity *in vivo*: the type of polymorph,^{6,31,33,69,71,78} particle shape and size,^{28,79} free radical release,^{29,41,58,80–82} and the

degree of hydrophilicity.^{30,83} However, when the association of a given feature to toxicity was checked across different studies, the hypothesis did not hold anymore. Sticking to one single feature is probably the cause which limited the physicochemical understanding of the molecular mechanisms until recent times.

In experiments on sets of crystalline silica samples with a wide range of toxicity, when different cellular end points were investigated, it became clear that most of the biological responses relevant to the toxic activity were independent one from the other, e.g., the most fibrogenic silica was not the most genotoxic,^{5,25} membranolysis was not directly related to cytotoxicity nor was cellular oxidative stress.^{33,34,84} Clearly, the mechanism of toxicity of crystalline silica was not only complicated by the occurrence of several biochemical events contributing to pathogenicity but also by the various silica features associated with each one of the events. Several physicochemical features, which are reported in Table 2, have been indicated as determinants for some steps of the pathogenic mechanism of silica particles.

2.3. Subsequent Steps of the Mechanism of Silica Toxicity As Modulated by Different Surface Properties.

The following scenario leading to silica pathogenicity is set up, still holding a few gaps, as illustrated in Figure 2. The inhaled silica particle attains the alveolar space where proteins and surfactants tend to cover the particle surface,⁹ while endogenous antioxidants might react with the particle surface and be inactivated, a process involving ascorbic acid and glutathione which may enhance the oxidative stress caused by cell and particle-derived ROS.^{85,86} The particle is engulfed by alveolar macrophages (AMs) into a phagosome that fuses with lysosomes to form a phagolysosome. AMs will then attempt to digest or clear the particle out of the lung.^{4,67} Clearance will be successful only with some/few dust specimens, not yet well-defined, while AM will be mostly activated, and eventually, the phagolysosome membrane will be damaged inducing pro-inflammatory and cell death pathways.^{51,87–92} The particle itself and all of AM products will consequently be deposited onto the alveolar epithelium. New macrophages and neutrophils will

Table 2. Bulk and Surface Physico-Chemical Features of Silica Determining the Variability of Its Toxic Effects

| | type | origin and details |
|------------------|---------------------------------------|--|
| bulk features | crystal structure | ordered (crystalline silica) or irregular (amorphous silica) arrangement of the [SiO ₄] tetrahedra different orientations and positions of the ordered [SiO ₄] tetrahedra (crystalline polymorphs) |
| | size and morphology | dependent on particle origin. Particles obtained by grinding processes usually exhibit irregular surfaces, acute spikes, and edges. Their size is usually heterogeneous, from few microns to nanoscale fragments. Particles obtained by combustion or precipitation show smooth and roundish surfaces of almost the same size, from few micron to nanometers. |
| surface features | solid-based radicals and ROS | solid-based radicals associated with fracturing: silyl radical (–Si [•]) (E' center) and siloxy radical (–SiO [•]) surface ROS associated with surface reconstruction of solid-based radicals reacting with atmospheric components: hydroxyl radical (HO [•]), superoxide radical (–Si [•] O ₂ [•]), and peroxy radical (–SiO ₂ [•]) |
| | silanol/siloxane groups | associated to surface reconstruction and hydration/dehydration processes: isolated silanol (–SiOH), geminal silanol (–Si(OH) ₂), vicinal silanols (from SiO ₄ sharing a common oxygen vertex), H-bonded silanols, symmetric siloxane bridge (Si–O–Si), distorted siloxane bridge (Si–O–Si), and siloxane rings (SiO) _n (n = 2–6) |
| | charges | associated with fracturing: silyl cation (–Si ⁺) and siloxy anion (–SiO [–]) associated with silanol deprotonation in aqueous suspension: silanolate (–SiO [–]) |
| | presence of metal ions and impurities | substituting for Si in the [SiO ₄] framework: Al ³⁺ and Fe ³⁺ adsorbed on silica surface: Al ³⁺ , Fe ²⁺ , Fe ³⁺ , Cu ²⁺ , Na ⁺ , K ⁺ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , and C |

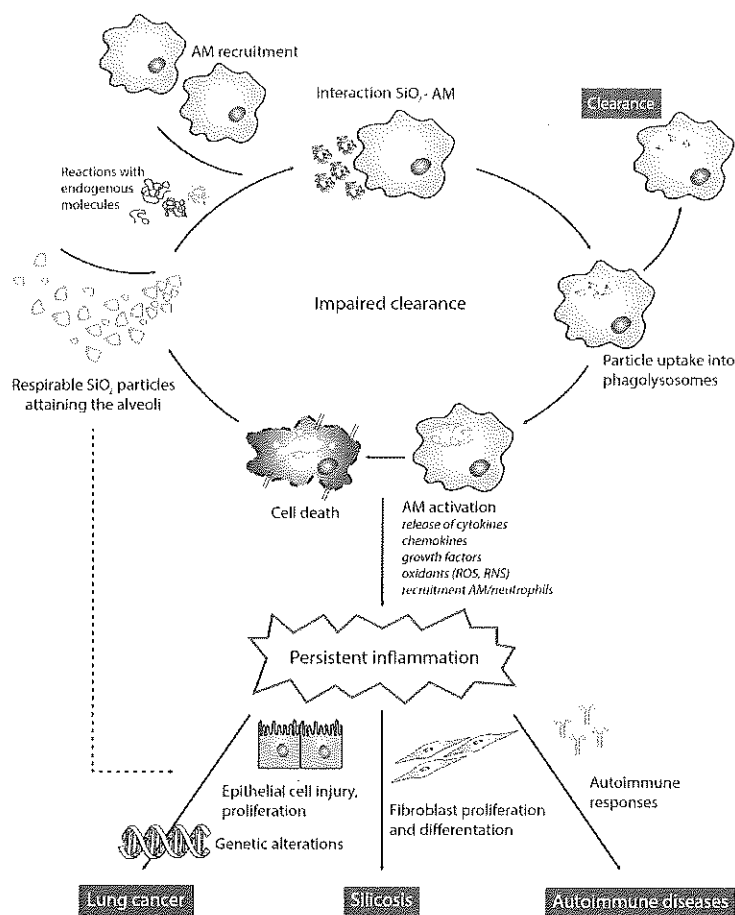


Figure 2. Proposed mechanism of toxicity of a silica particle attaining the alveolar space. The particle may directly stress the epithelium (dotted line), while the major pathway, following interaction with endogenous matter (antioxidant inactivation and surface coverage by proteins), involves recruitment of alveolar macrophages (AMs) → phagocytosis by AMs → clearance or AM activation (release of pro-inflammatory, pro-fibrotic mediators, and chemotactic factors) following damage to the phagolysosome membrane → eventually cell death → release of particles and AM products → recruitment of new AMs and neutrophils. A continuous ingestion–reingestion cycle, AM activation, and death are established. The prolonged recruitment/activation of AM and neutrophils causes a persistent inflammation which may evoke (i) epithelial cell injury and proliferation, genetic alterations, and ultimately lung cancer; (ii) fibroblast proliferation and differentiation, collagen production, and finally silicosis; (iii) autoimmune responses ending in autoimmune diseases (such as systemic lupus erythematosus, systemic sclerosis, rheumatoid arthritis, vasculitis, and chronic renal disease).

be then recruited, a circular process causing a persistent inflammation which will proceed as long as the particle remains in the alveolar space. The sustained inflammatory response, accompanied by fibroblast stimulation and growth, abnormal collagen synthesis, and fibrosis, will cause a cascade of events (such as oxidants release, epithelial cell injury, and genetic damage) ending up with bronchogenic carcinoma.^{3,24,73,93} An additional pathway whereby release of oxidants and direct injury of the particles on the epithelial cells is also hypothesized,^{43,94,95} which would add further damage.

Clearly, the mechanism proposed for silica pathogenicity is made up by various subsequent steps. This fairly accounts for the variability of quartz hazard, the overall toxic potential being the result of the contribution of the different characteristics involved in each step and their abundance at the particle surface. The association of a given physicochemical property to each of the steps, however, is far from being completed.

3. FILLING THE GAPS IN THE ASSOCIATION BETWEEN PARTICLE SURFACE FEATURES AND THE SINGLE STEPS IN THE CASCADE OF EVENTS CAUSING SILICA PATHOGENICITY

Gaps to be filled require, on the one hand, to consider in a new perspective past paradigms, and, on the other hand, to carry out studies where the interaction particle–living matter, in each step contributing to silica pathogenicity is simplified as much as possible.

3.1. Objections to the Paradigm of Crystallinity in Silica-Related Diseases. The crystal structure is seldom in direct contact with cells and tissues. Some recent studies even suggest that crystallinity per se is not a cause of pathogenicity.⁹⁶ Main points to consider are that

- not all crystalline silica particles are pathogenic;
- ground vitreous silica behaves like a quartz dust;

- some amorphous silica particles exert toxic effects on cells similarly to crystalline ones; and that
- the crystalline order of the bulk seldom shows up at the particle surface

3.1.1. Not All Crystalline Silica Particles Are Pathogenic.

It is known that not all crystalline silica polymorphs are toxic. Indeed, the dense polymorphs coesite and stishovite were found inert in toxicological studies if compared to quartz, cristobalite, and tridymite.^{6,28,71,97} Interestingly, physicochemical investigations have shown that stishovite is characterized by a more densely packed structure of the $-OH$ groups, which involves stronger H-bonding interactions among silanol groups, and stishovite does not generate surface radicals even when ground.⁹⁸ Moreover, some quartz dusts were occasionally found inactive in experimental studies.^{3,5,25,32}

3.1.2. Ground Vitreous Silica Behaves Like a Quartz Dust.

Vitreous silica (or silica glass) is obtained by rapid solidification of the melt and is fully amorphous. Opposite to amorphous forms obtained by combustion or precipitation, vitreous silica is present in particulate form only by fracturing, grinding, or abrading. Vitreous silica particles show the same micro-morphology (irregular surfaces and pointed edges) and reactivity of quartz in acellular and cellular tests.^{26,27,50} These include the potential to generate free radicals in simulated biological fluid, hemolytic activity, and cytotoxic and pro-inflammatory activity in alveolar macrophages. Significantly, several cases of silicosis and lung cancer have been reported in the past among workers who use quartz as the primary raw material but are mostly exposed to vitreous silica particles in glass factories.^{99–101}

3.1.3. Amorphous Silica Particles May Exert Toxic Effects on Cells.

The potential pathogenicity of amorphous silica is still controversial, but some amorphous silica powders induce on cells some of the effects which determine crystalline silica pathogenicity.^{46–49,84,102–105} When prepared via pyrolysis (e.g., pyrogenic or fumed silica), amorphous silica is much more active *in vitro* than when obtained via wet processes (e.g., precipitated, colloidal, and mesoporous silica).¹⁰⁶ Pyrogenic silica is more membranolytic,^{26,48} causes stronger oxidative stress and cytotoxic and pro-inflammatory effects both in macrophages^{47–49,51,102} and epithelial cells⁴⁸ than the precipitated one. Several hypothesis have been proposed to explain these results such as a different degree of hydrophilicity/hydrophobicity⁴⁹ and the presence of strained siloxane rings on pyrogenic silica.⁴⁸ Inhalation studies regarding pyrogenic silica reported remarkable expression of lung inflammatory and histopathological markers, which were much milder or even absent with precipitated silica.^{48,107,108} It has to be stressed, however, that *in vivo* both pyrogenic and precipitated silica, opposite to crystalline dusts, cause only transient and reversible lung inflammation with no progressive lung fibrosis.^{3,46,107–111} This notwithstanding, the difference reported among amorphous silica types may be a clue to discover the nature of the surface sites involved in crystalline silica pathogenicity.

3.1.4. Crystal Order of the Bulk Seldom Shows up at the Particle Surface. Native uncontaminated quartz particles made up of perfect crystal faces as the ones showed in Figure 3a very rarely are in direct contact with living matter, an aspect highly underestimated by toxicologists. Workers are mostly exposed to

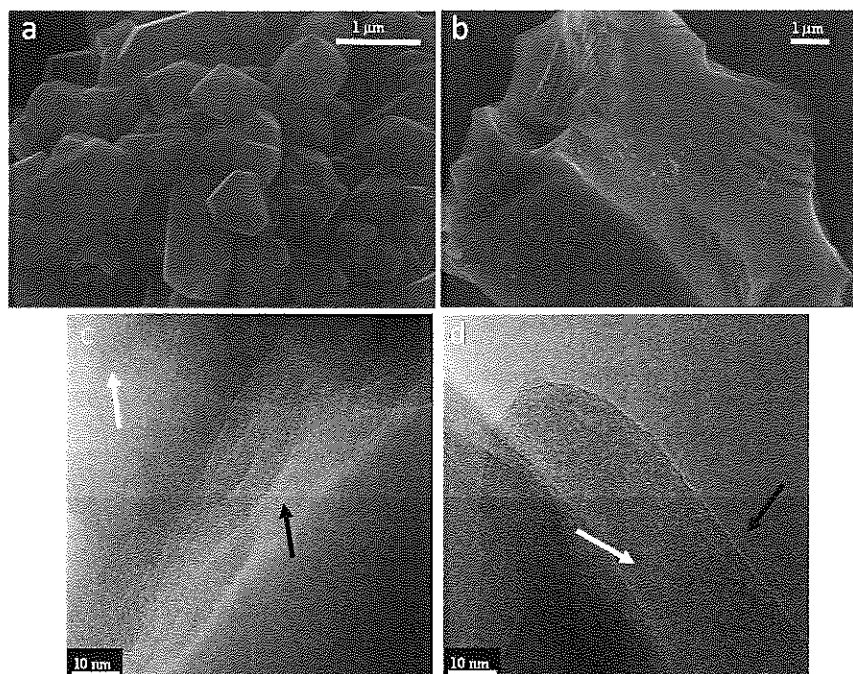


Figure 3. Scanning electron microscopy (SEM) image of pure quartz particles laboratory-grown via hydrothermal synthesis (a); SEM (b) and transmission electron microscopy (TEM) (c,d) images of quartz particles obtained by ball milling of large quartz crystals. Synthetic quartz particles show intact, flat, and smooth crystal surfaces (a), while conchoidal fractures are evident on milled particles (b,c). For milled particles, crystal structure (diffraction fringes, white arrows) is clear only in the bulk, while disorganization of the surface lattice and an amorphous layer (black arrows) are evident at the edges (c,d).

crystalline silica dusts generated by grinding/abrading macroscopic quartz crystals of mineral origin. In quartz, opposite to brittle solids such as asbestos, crystallographic planes of weakness (i.e., cleavage planes) are absent. Thus, breakage causes a curved irregular fracture described as conchoidal, which does not follow a defined crystal plane but crosses a variety of crystal planes.^{7,8,112} The resulting exposed surface is characterized by a concatenation of numerous microscopic patches of single crystallographic arrangements, which likely will yield, upon contact with atmospheric moisture, a random distribution of silanols and siloxanes, similarly to what happens with amorphous materials.^{52,112} The perturbed external amorphous layer (known as Beilby layer), which often covers quartz particles, stems from such a process.^{10–12,113} As a consequence, the surface of a crystalline silica particle with whom cells interact is not a perfect and regular crystalline face, but rather an almost amorphous and irregular one. A scanning electron microscopy (SEM) image showing conchoidal fractures on a microscopic quartz particle obtained by ball milling of larger crystals is reported in Figure 3b. Transmission electron microscopy (TEM) images of the same quartz dust prepared by milling (Figure 3c and d) show that the crystal lattice is only evident in the bulk of the quartz particle, while a nonordered thickness and displaced fractures are noticed at the edges.

Silica pathogenicity is mostly confined to crystalline particles, but many of the surface features known to be implied in crystalline silica toxicity are also shared by amorphous silica particles

3.2. Simplified Systems to Build up a Comprehensive Model. As already stressed, a direct association between particle physicochemical features and the corresponding steps in the pathogenicity process is not straightforward because of both the extreme variability of the surface states of silica compounds and the complexity of cellular models. To learn more, the adoption of simplified yet scientifically sound and reproducible models of the interaction between particles and biological systems is required.¹¹⁴

3.2.1. Simplified Solids. A perfect crystal interacting with a membrane is the most simplified approach to evidence the role of the crystal structure. If synthesized in respirable size, such crystals can offer to cells regular and ordered crystal planes and interacting silanol arrays in the absence of radical-generating centers, thus providing information on the role of sole crystallinity in the biological responses elicited.^{57,96}

3.2.2. Simplified Biological Systems. Modeling of tissues and organelles have to be associated with the solid model particles, so as to evidence at the molecular level the nature and extent of interactions taking place. The cell membrane is the first site of interaction of the particle with cells. Since early toxicological studies, the role of membrane damage in the toxicity mechanism of silica was considered.^{115–117} The outer plasma membrane and the inner phagolysosome membrane are the possible membrane target of silica particles. To probe membranolytic effects of toxic particulates, red blood cells (RBCs) have traditionally been employed as convenient models of cell membranes that can release measurable hemoglobin following membrane perturbation and lysis. RBCs play no part in the pathogenesis of silicosis or lung cancer induced by silica, but already in the early 1960s, the rupture of such a simple membrane was considered a measure of the cytotoxicity of mineral particles.^{77,118–120} RBC lysis was even proposed to predict the fibrogenicity of industrial dusts.¹²¹ Far from being

connected to fibrogenicity, the hemolytic activity turned out to be one of the best predictive tests of the inflammatory response induced by silica and other inorganic particles.^{32,43,122,123} Artificial biomimetic membrane models and computer simulations may provide further mechanistic insights to confirm the results obtained with the natural model of cell membranes.^{124–127} The search of the surface moieties imparting to silica particles the potential to disrupt membranes appears therefore as one of the best candidates for clarifying the association between surface properties and inflammation.

3.3. New Adverse Outcome Pathway (AOP) for Silica Inflammogenicity. **3.3.1. How the Molecular Initiating Event (MIE) May Be Figured Out.** We have recently shown that synthetic quartz crystals grown in respirable size and with intact crystalline surfaces do not elicit any of the usual reactivity in a series of acellular and cellular assays relevant for the toxicity of crystalline silica.⁹⁶ Instead, when the same synthetic quartz was fractured, cytotoxicity and membranolysis were induced to a similar extent as one reference pathogenic quartz. These findings imply, on the one hand, that crystallinity per se is not the key factor in the toxic effects of silica particles, and, on the other hand, that, only after fracturing a regular quartz particle becomes toxic. Besides the formation of surface radical species, fracturing causes loss of the long-range order of the nonradical surface moieties, i.e., silanols, silanolates, and siloxanes, formed as a consequence of the reaction of the fractured surface with atmospheric components. The surface reconstruction yields mixed hydrophilic and hydrophobic patches and disordered silanol arrays similar to the irregular surface of some types of amorphous silica^{52,112} reported as highly membranolytic,^{26,48} so that also these irregular surfaces created on perfect quartz crystals may interact strongly with both biological and artificial membranes inducing lysis.⁹⁶

The above findings are consistent with previous studies reporting membranolysis (measured on RBCs or lipid vesicles) as poorly associated with radical chemistry, but mostly related to the concentration of some silanol groups, either isolated¹²⁸ or geminal.¹¹² Considering a wide set of silica particles, both crystalline and amorphous, we recently found out that membranolysis is not merely related to silanol density or to a specific group of silanols but rather to a peculiar pattern of silanols, silanolates, and siloxanes.²⁶ We speculate here, also on the grounds of data about to be published,¹²⁹ that silica surfaces characterized by a large silanol disorganization, imparted by fracturing, presence of metal impurities, and physical treatments, are the most membranolytic ones.

3.3.2. How the Key Events (KE) May Be Associated. Hemolysis has been recently reported as one of the best predictive tests of *in vivo* inflammation following particle exposure,^{122,123} including quartz,^{32,41} but no explanation was proposed so far on the reasons of this correlation.

Recent studies have shown that silica particles induce the release of pro-inflammatory cytokines from different cell types via a membranolytic mechanism involving phagolysosomal membrane destabilization.^{89,90,92,130} Rupture of the lysosome membrane following particle phagocytosis by AMs was reported since early studies on toxic particulates but acquired a clearer significance only at the beginning of the 21st century after the discovery of the inflammasome machinery as the triggering factor of the inflammatory response induced by pathogenic particles and fibers, including silica.^{90,131,132} Indeed, one of the upstream biochemical mechanisms governing the silica-mediated activation of the NLRP3 inflammasome entails

phagolysosomal damage and release of the lysosomal content into the cytosol. When activated, the NLRP3 inflammasome can induce the proteolytic enzyme caspase-1 which is crucial in initiating cell death pathways and promoting secretion of pro-inflammatory cytokines (e.g., IL-1 β and IL-18).^{89,91} To understand the biochemical basis underlying the relationship between the hemolytic activity of silica and inflammation, we investigated the inflammasome-mediated pro-inflammatory response of a panel of silica samples selected for their different RBC lytic activity.²⁷ A clear-cut correlation was evidenced between the hemolytic activity of the silica particles investigated and the release of IL-1 β from macrophages following phagocytosis, phagolysosome permeabilization, and inflammasome activation. Consequently, we may infer that what is relevant for RBC membranolytic activity is also implicated in phagolysosome labilization, thus mediating inflammasome activation.

3.3.3. New Proposal of AOP for Silica Inflammogenicity. The AOP¹³³ proposed in Figure 4 stems from the association between recent physicochemical and biochemical results suggesting that silanol disorganization is at the origin of the mechanism triggering the inflammatory reaction induced by silica particles.

For the first time in the study of silica toxicity, the heterogeneity of surface functionalities is proposed as the key factor in the MIE leading to the inflammatory response in the lungs (adverse outcome, AO) through a number of key events. The events recognized as essential are cell membrane damage associated with the destabilization of the phagolysosomal membrane in alveolar macrophages and release of the phagolysosome content into the cytosol (key event 1, KE1). This latter event triggers the activation of the inflammasome machinery (KE2) which leads to the release of active pro-inflammatory

cytokines (i.e., IL-1 β and IL-18) (KE3), ultimately inducing and sustaining the inflammatory response in the lungs. Some studies further report that the inflammasome machinery may ultimately affect fibroblast activation and proliferation,¹³⁴ thus contributing to the development of fibrosis and silicotic nodules.

Surface heterogeneity of oxides is a well-established concept in adsorption and catalysis^{61,135} but less so in particle toxicology. As mentioned before, this is true not only for amorphous silica. Even crystalline silica, with a regular structure of the bulk, exhibits a lower organization at the fractured surface^{135,136} where an amorphous layer is progressively formed during mechanical comminution of quartz crystals.^{10,67,113} Opposite to metal oxides, the -OH functionalities in silica never release hydroxyl anions but are strong H-bond donor and acceptor sites which may bind other molecules.^{9,52,113,118}

We propose here that, when most silanols are mutually H-bonded in long-range arrays, such as on real crystal planes and highly hydroxylated surfaces, the silica surface is unreactive toward membranes (Figure 5a). The same happens on highly dehydrated surfaces where few isolated silanols are present on a surface mostly characterized by siloxanes (Figure 5b). In both of these situations, strong H-bonds cannot be established with external molecules. In the first case because the long chains of mutually H-bonding silanols are stabilized by delocalized charges, it would be energy demanding to interrupt bonding among silanols and to establish new ones.¹³⁷ A different scenario is given by the intermediate situation in which a variety of more or less free silanols (e.g., isolated, geminals, weakly interacting silanols, and terminals) provide a distribution of strong H-bonding points on the surface, each one oriented in a well-defined direction and able to interact with external molecules

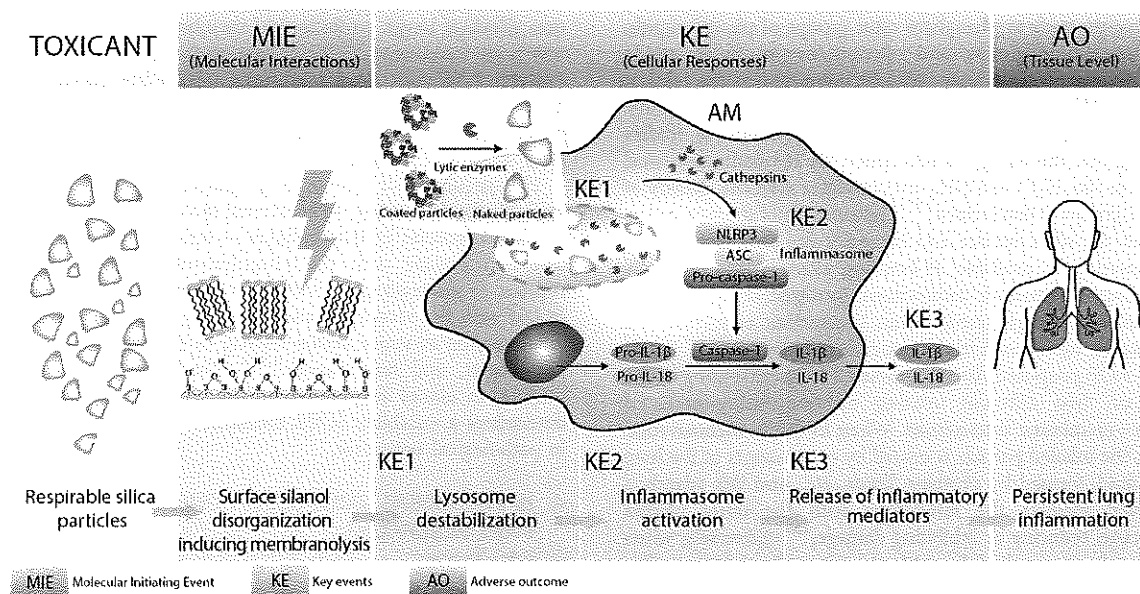


Figure 4. Proposed AOP for silica-induced inflammogenicity. Respirable silica particles deposited in the alveolar space (Toxicant), if in the membranolytic configuration characterized by silanol disorganization (MIE), can disrupt the phagolysosomal membrane (key event, KE1) when engulfed by alveolar macrophages (AMs). Within the phagolysosome, the particle surface coating due to adsorbed proteins and surfactants of the lung lining layer is removed by lysosomal enzymes. The unmasked silica surface can then react with the inner phagolysosomal membrane causing damage (inset to KE1). Release of the phagolysosomal content into the cytosol, such as the proteases cathepsins B and S, triggers the activation of the inflammasome machinery (KE2) which leads to activation of the proteolytic enzyme Caspase-1 and release of active pro-inflammatory cytokines (i.e., IL-1 β and IL-18) (KE3). This process induces and sustains the inflammatory response in the lungs (adverse outcome, AO).

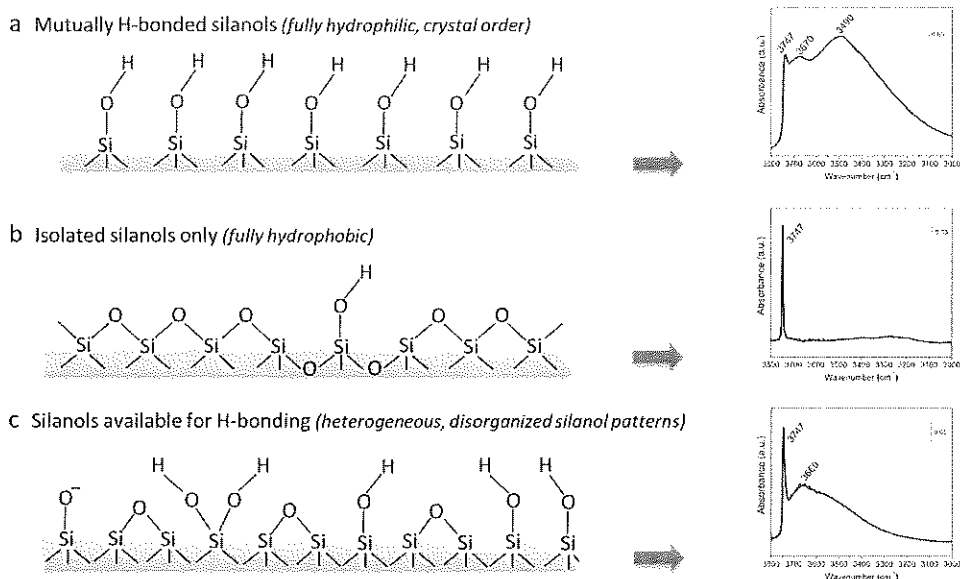


Figure 5. Chemical bases of the proposed MIE for silica consisting of silanol patterns which can be measured by IR spectroscopy. Silica surfaces characterized by (a) mutually H-bonded silanols, such as on real crystal planes and highly hydroxylated surfaces, or (b) few isolated silanols and siloxanes, such as on fully hydrophobic surfaces, are nonmembranolytic. Silica surfaces characterized by silanols available for H-bonding with external molecules, such as in the case of heterogeneous and disorganized silanol patterns containing geminal, isolated, and weakly interacting silanols, are membranolytic (c). In the right side of the figure, the FT-IR spectra in the hydroxyl spectral region ($3800\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$) of three silica particles representative of the three surface silanol patterns are represented. IR spectra recorded after outgassing at room temperature (RT) of (a) a fully hydrophilic precipitated silica, showing the predominance of strongly H-bonded silanols (broad band at $3600\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$), (b) a pyrogenic silica heated at $800\text{ }^{\circ}\text{C}$ in vacuum, showing isolated/geminal silanols only (narrow peak at 3747 cm^{-1}), and (c) an as-produced pyrogenic silica, exhibiting isolated/geminal silanols (narrow peak at 3747 cm^{-1}), and weakly interacting silanols (band at $3720\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$).²⁶

(Figure 5c). Under such circumstances, some membrane components, such as phosphate ester groups of phospholipids, secondary amide groups, and nitrogen/oxygen in an amide of membrane proteins, may strongly interact with the particle surface.^{124,126}

Such a view is supported by some computational studies revealing that the energy of adsorption via H-bonding of small molecules like H_2O and NH_3 anticorrelates with the density of $-\text{SiOH}$ groups at the surface.¹³⁷ The strength of the interaction between the silica surface and biomolecules thus depends on the presence of available H-bonding silanols, not mutually interacting. Electrostatic interactions, localized charges on the particles, and charged moieties on the surface of membranes may also be superposed to the network of H-bonds.^{77,120,125,138}

The AOP proposed for silica-induced lung inflammogenicity relies on two different coating or noncoating-mediated particle–membrane interactions. When in the bronchoalveolar region, the inhaled particle is coated by components of the lung lining fluid, formed by proteins, lipids, etc., and this adsorbed layer will mediate the interaction with the outer plasma membrane, reducing or inhibiting damage;¹³⁹ conversely, when the particle is engulfed by AM and internalized into a phagolysosome, the surface coating will be removed from the particle surface by lysosomal enzymes.^{87,114,140} The unmasked silica surface can then react with the inner phagolysosome membrane causing membrane damage (Figure 4, insight) and consequently inflammation.

The disruption of phagolysosomal membrane leading to its permeabilization is not a unique phenomenon for silica particles. It has long been proposed for other particles, and

most recently, a unified theory for particle-induced inflammation which is based on lysosomal membrane permeabilization was introduced.¹⁴¹ Thus, investigations similar to those presented here for silica performed with other particles and fibers might elucidate similarities or differences in the mechanisms involved in their ability to induce permeabilization of phagolysosomal membranes.

The sequence of events here proposed, that is, silanols available for H-bonding with external molecules \rightarrow engulfment of coated particles by macrophages \rightarrow strong interaction of the uncoated particle with the phagolysosomal membrane and rupture \rightarrow macrophage activation \rightarrow inflammatory response, is in line with the recent literature stressing acute and persistent inflammation as major causes leading to silicosis, autoimmune pathologies, and lung cancer.^{2,3,7,3} The variability, which is intrinsic in silanol distribution on the silica surfaces, therefore determines a variability in the inflammatory response and thus in pathological outcomes.

4. IS THE MODEL PROPOSED CONSISTENT WITH PAST RESEARCH?

Earliest works considering chemical modifications of quartz^{33,142,143} reported a variation in toxicity following treatments with HF or KOH. Both treatments do indeed modify the silanol distribution. Similarly, a rough correspondence can be noted between the evaluated toxicity and the expected abundance of reactive silanols in those studies where a different biological activity among silica specimens was reported.^{4–6,25–33,35–45} Here, we would like to discuss the most obvious questions that our proposal may elicit.

4.1. Crystallinity, Polymorphs, and Poorly Active Quartz. The reason for the long-term pathogenicity being confined to crystalline particles likely relies on the extremely low solubility,⁵³ hence high biopersistence of crystalline forms³ and on free radical-generating centers, typically detected on quartz and cristobalite.^{58,144–147}

The intrinsic differences in pathogenicity among the various polymorphs may be due to their density. The two most dense polymorphs, coesite and stishovite, are inert, which might be well ascribed to a dense packing of mutually interacting silanols. This was indeed the case on stishovite.⁹⁸ As to cristobalite, tridymite, and quartz, the differences reported among them^{6,28,31,33,69,112} are not larger than what is reported among some sets of quartz dusts of different origin.^{5,25} They are all potentially toxic. Note that tridymite was not classified by the International Agency for Research on Cancer (IARC) simply because of the lack of data.

4.2. How Do Silicosis Antidotes Act? The major treatments which decrease or blunt silica toxicity are either metal ions, carbon, surface functionalization, or coating. The most typical metal decreasing the adverse effects of quartz is aluminum in the form of aluminum salts,^{41–43,74,77,148} as proposed long ago by Haldane,¹⁴⁹ or as clay/kaolin¹⁵⁰ in direct contact with quartz. Aluminum ions may react with silanols, thus reducing their H-bonding potential. Also, other ions may act similarly. Iron is a double-edged sword because on the one hand, at low concentration, it acts as free radical-generating center on quartz surfaces,^{4,151} and on the other hand, when in large amount, it offers a masking effect of silanols and silanolates.^{29,39}

Carbon in intimate contact with quartz was also shown to completely inhibit particle and cell-derived oxidative stress, and to reduce inflammatory responses and cytotoxicity in macrophages. None of these effects took place when the same experiments were carried out with mechanically mixed samples, suggesting that carbon acts not just as a radical quencher but also because of its association to the quartz surface.¹⁵²

Probably the most employed antidote against silicosis was the polymer PVPNO (polyvinylpyridine-*N*-oxide), which can coat the quartz surface.^{42,43,77} Recent studies by Dr. Schins' group have confirmed the specific function of PVPNO in inhibiting the activation of the inflammasome and attenuating the grade of inflammation and lymphocyte influx.⁴⁵ Several hypotheses have been made on the binding mechanism.^{9,153} The polar groups on the polymer exposing an oxygen atom with a dense negative charge are ideal points for strong H-bonding with those silanols identified as responsible for the inflammatory potential of silica. Functionalization of the silica particles, obtained by silanol reaction, is a very common procedure in nanomedicine, generally adopted to graft specific molecules at the surface. Organosilanes covalently bound to silanols have also been recently proposed as a good alternative to PVPNO.¹⁵⁴

4.3. Are Quartz Particles Nongenerated by Crystal Fracturing Pathogenic? This is still an open question because accurate *in vivo* tests and large epidemiology studies are required to assess the absence of pathogenicity. We may, however, speculate on the various circumstances in which exposure to respirable crystalline silica nonobtained by fracturing might occur. The intact synthetic quartz crystals described above are a very useful laboratory tool, but exposure to this type of silica is not likely to occur in the real world. Crystalline silica particles are formed when small silicon/silica clusters are exposed at extremely

high temperatures such as in the case of flying ash, volcanic ash, and heated biogenic silica sources (e.g., typically diatoms). In flying and volcanic ashes, crystalline silica is usually concealed by mixed amorphous matter, and toxicity, if any, has been ascribed to other components of the mixed dust.¹⁵⁵ The case of biogenic silica is different. Indeed, the products of diatom transformation, diatomite earths or kieselgur, are very fibrogenic materials recognized as such long time ago⁷⁰ and also reported as carcinogenic in one large epidemiological study.¹⁵⁶ Most recent activities, such as burning sugar cane crops,¹⁵⁷ also appear to produce crystalline silica-containing particulate which may be potentially toxic. Diatoms undergo complex procedures aimed to eliminate the organic components and to prepare an appropriate material during which heating and grinding are required.^{158,159} Thus, we may infer that such procedures are likely to induce disorganized and reactive surfaces.

4.4. Where Are We with the Toxicity of Amorphous Silica? The toxicity of amorphous silica is under much debate, particularly in view of the application of SiNPs in nanomedicine. As far as our model is concerned, the variability of outcomes in cellular and *in vivo* tests reflects variability in the distribution of surface functionalities in the same way as discussed for crystalline silica. The balance between acute inflammation and low biopersistence will establish specimen by specimen its ultimate toxicity. *In vivo*, amorphous silica mostly produce transient effects.^{3,46} However, the presence in few cases of granulomatous lesions and silicotic nodules^{110,111,160,161} suggests a precautionary approach in cases of exposure to such materials.

5. STATE OF THE ART AND FUTURE PERSPECTIVES

The variability of quartz hazard can be fully justified by the large variations occurring in surface silanol distribution, which implies different levels of inflammation. However, besides inflammasome activation, the inflammatory response to silica is the result of several activated biochemical cascades such as the transcriptional regulators nuclear factor- κ B (NF- κ B) and activator protein-1 (AP-1), the activity of a number of soluble and cell-derived mediators, and oxidant-mediated triggering mechanisms,^{162–164} which will also contribute to the variability insofar as related to some physicochemical features of the particles. For instance, particle- and cell-derived ROS establish a robust oxidant milieu; meanwhile, the major antioxidant defenses present in the bronchoalveolar space, ascorbate and glutathione, both react with the quartz surface, with silanols⁸⁰ and iron ions,⁸⁵ respectively. Such reactions deprive the alveoli of their defense against the released oxidants, exacerbating the oxidant stress and adding other surface functionalities to the list of those implied in toxicity.

Deconstructing the paradigm of crystallinity, however, does not mean that amorphous and crystalline silica could be similarly pathogenic. Amorphous silicas are per se much more soluble than crystalline silicas; moreover, they are usually in ultrafine size (SiNP) which also facilitates dissolution. Therefore, only crystalline silica would be biopersistent and consequently establish in the alveoli the continuous cycle of AM ingestion, release of phagolysosomal content, recruitment, and reingestion (as described in Figure 2), which is at the base of persistent inflammation. Moreover, crystalline forms only give rise to stable surface radicals and free radical-generating centers which may directly stress both macrophage and epithelial cells,^{58,82,95,147,162} thus contributing to a parallel step yielding the pathogenic response.

As a whole, different particle characteristics contribute to the overall pathogenicity of a given source of silica; on the basis of

this perspective, however, one could hypothesize that blocking one single step of the mechanism of toxicity induced by a specific and measurable particle feature, we could reduce or eliminate the pathogenic potential of a given silica particle. Particularly in the absence of surface functionalities (i.e., silanols) that originate inflammation, the particle could be considered nonpathogenic if it will be confirmed that stopping the inflammatory step will also stop the pathogenicity. This is not an easy task, considering the complex reactivity of silica with water vapor, obviously ubiquitous in the real world. However, we now have the techniques, FT-IR and NMR spectroscopy, to identify the active silanol sites, which may become useful tools to predict the toxicity potential of a given silica dust, as well as to evaluate the efficiency of the various detoxification routes proposed. We suggest that this could be the way to carry out research aiming to elucidate the safe use of silica.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Department of Chemistry, University of Torino, Via P. Giuria 7, 10125 Turin, Italy. Tel: +39 0116707566. E-mail: bice.fubini@unito.it.

ORCID

Bice Fubini: 0000-0002-5473-8102

Funding

We gratefully acknowledge the Italian Workers' Compensation Authority (Istituto Nazionale Assicurazione Infortuni sul Lavoro - INAIL) of Piemonte for the doctoral fellowship to C.P.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

Biographies



Dr. Bice Fubini has just retired from the University of Torino, where she was full professor of Chemistry. Her main research interest is the chemical basis of the toxicity of inhaled particles and fibers which she developed by promoting multidisciplinary studies and heading the Interdepartmental Center "G. Scansetti" for Studies on Asbestos and Other Toxic Particulates. This coordinates research and formation activities in a large spectrum of departments, from earth sciences to occupational medicine. She has taken part in various "consensus workshops" and has served in working groups at International Agency for Research on Cancer; JRC European Centre for the Validation of Alternative Methods; International Sciences Institute (US); Institut National de Recherche et de Sécurité (F); Environmental Protection Agency (US); and Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (F).



Dr. Cristina Pavan is a postdoc research fellow in the Toxicology and Biocompatibility of Material group, Department of Chemistry, and Interdepartmental Centre "G. Scansetti" for Studies on Asbestos and Other Toxic Particulates, University of Torino. She graduated in Drug Chemistry and Technology in 2012 and obtained a Ph.D. degree in Pharmaceutical and Biomolecular Sciences, under the supervision of Professor B. Fubini in 2016 and in collaboration with the Louvain Centre for Toxicology and Applied Pharmacology group, headed by Professor Dominique Lison, Université catholique de Louvain. Her research interests concern the interaction of materials with living matter, with particular emphasis on the toxicity mechanisms of cell responses to particulates.

■ ACKNOWLEDGMENTS

Research on the mechanisms of silica pathogenicity has been carried out in our group since the beginning of the 1980s. Conclusions reported in the present perspective have therefore to be considered not as due to ourselves alone but more as the product of the efforts of many people. Besides a number of Masters and Ph.D. students, we recall here, from past to recent times, Vera Bolis, Elio Giamello, Ivana Fenoglio, Mara Ghiazza, Maura Tomatis, and Francesco Turci. No real achievement would have been attained without the strong interdisciplinary exchanges within our Interdepartmental center with the group of Gianmario Martra on the chemical side and that of the late Dario Ghigo on the biochemical one. Equally vital proved to be a long lasting collaboration with Dominique Lison and his co-workers of the Louvain Center for Toxicology and Applied Pharmacology, Université Catholique de Louvain, Brussels. We also thank Alessandro Pavan for his support in graphic design and Edoardo Garrone for his valuable proofreading.

■ ABBREVIATIONS

AM, alveolar macrophage; AO, adverse outcome; AOP, adverse outcome pathway; AP-1, activator protein-1; IARC, International Agency for Research on Cancer; KE, key event; MIE, molecular initiating event; NF- κ B, nuclear factor- κ B; PVPNO, polyvinylpyridine-*N*-oxide; RBC, red blood cell; RNS, reactive nitrogen species; ROS, reactive oxygen species; RT, room temperature; SEM, scanning electron microscopy; SiNPs, silica nanoparticles; TEM, transmission electron microscopy

■ REFERENCES

- (1) Leung, C. C., Yu, I. T. S., and Chen, W. (2012) Silicosis. *Lancet* 379, 2008–2018.
- (2) International Agency for Research on Cancer (1997) *Silica, Some Silicates, Coal Dust and Para-Aramid Fibriils*, Vol. 68, IARC, Lyon, France.

- (3) International Agency for Research on Cancer (2012) *A Review of Human Carcinogens: Arsenic, Metals, Fibres, and Dusts*, Vol. 100C, IARC, Lyon, France.
- (4) Donaldson, K., and Borm, P. J. (1998) The quartz hazard: a variable entity. *Ann. Occup. Hyg.* 42, 287–294.
- (5) Seiler, F., Rehn, B., Rehn, S., and Bruch, J. (2004) Different toxic, fibrogenic and mutagenic effects of four commercial quartz flours in the rat lung. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 207, 115–124.
- (6) Wiessner, J. H., Henderson, J. D., Sohnle, P. G., Mandel, N. S., and Mandel, G. S. (1988) The effect of crystal structure on mouse lung inflammation and fibrosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 138, 445–450.
- (7) Margolis, S. V., and Krinsley, D. H. (1974) Processes of formation and environmental occurrence of microfeatures on detrital quartz grains. *Am. J. Sci.* 274, 449–464.
- (8) Murashov, V. V., and Demchuk, E. (2005) A comparative study of unrelaxed surfaces on quartz and kaolinite, using the periodic density functional theory. *J. Phys. Chem. B* 109, 10835–10841.
- (9) Fubini, B. (1998) Health Effects of Silica, in *The Surface Properties of Silica* (Legrand, A. P., Ed.) pp 415–464, J. Wiley & Sons, Chichester, UK.
- (10) Li, I., Bandara, J., and Shultz, M. (2004) Time evolution studies of the H₂O/quartz interface using sum frequency generation, atomic force microscopy, and molecular dynamics. *Langmuir* 20, 10474–10480.
- (11) Nagelschmidt, G., Gordon, R. L., and Griffin, O. G. (1952) Surface of finely-ground silica. *Nature* 169, 539–540.
- (12) Steinike, U., Hennig, H.-P., Richter-Mendau, J., and Kretzschmar, U. (1982) Investigations of dissolving mechanically processed quartz grains. *Cryst. Res. Technol.* 17, 1585–1590.
- (13) Ozmen, C. A., Nazaroglu, H., Yildiz, T., Bayrak, A. H., Senturk, S., Ates, G., and Akyildiz, L. (2010) MDCT findings of denim-sandblasting-induced silicosis: a cross-sectional study. *Environ. Health* 9, 17.
- (14) Barmania, S. (2016) Deadly denim: sandblasting-induced silicosis in the jeans industry. *Lancet Respir. Med.* 4, 543–543.
- (15) Esswein, E. J., Breitenstein, M., Snawder, J., Kiefer, M., and Sieber, W. K. (2013) Occupational exposures to respirable crystalline silica during hydraulic fracturing. *J. Occup. Environ. Hyg.* 10, 347–356.
- (16) Pavan, C., Polimeni, M., Tomatis, M., Corazzari, I., Turci, F., Ghigo, D., and Fubini, B. (2016) Abrasion of artificial stones as a new cause of an ancient disease. Physico-chemical features and cellular responses. *Toxicol. Sci.* 153, 4–17.
- (17) Pérez-Alonso, A., Córdoba-Doña, J. A., Millares-Lorenzo, J. L., Figueroa-Murillo, E., García-Vadillo, C., and Romero-Morillos, J. (2014) Outbreak of silicosis in Spanish quartz conglomerate workers. *Int. J. Occup. Environ. Health* 20, 26–32.
- (18) Kramer, M. R., Blanc, P. D., Fireman, E., Amital, A., Guber, A., Rhaman, N. A., and Shitrit, D. (2012) Artificial stone silicosis: Disease resurgence among artificial stone workers. *Chest* 142, 419–424.
- (19) Thomas, C. R., and Kelley, T. R. (2010) A brief review of silicosis in the United States. *Environ. Health Insights* 4, 21–26.
- (20) Carneiro, A. P., Barreto, S. M., Siqueira, A. L., Cavariani, F., and Forastiere, F. (2006) Continued exposure to silica after diagnosis of silicosis in Brazilian gold miners. *Am. J. Ind. Med.* 49, 811–818.
- (21) Nelson, G., Girdler-Brown, B., Ndlovu, N., and Murray, J. (2010) Three decades of silicosis: disease trends at autopsy in South African gold miners. *Environ. Health Perspect.* 118, 421–426.
- (22) Tse, L. A., Li, Z. M., Wong, T. W., Fu, Z. M., and Yu, I. T. (2007) High prevalence of accelerated silicosis among gold miners in Jiangxi, China. *Am. J. Ind. Med.* 50, 876–880.
- (23) Cavariani, F., Di Pietro, A., Miceli, M., Forastiere, F., Biggeri, A., Scavalli, P., Petti, A., and Borgia, P. (1995) Incidence of silicosis among ceramic workers in central Italy. *Scand. J. Work Environ. Health* 21 (Suppl 2), 58–62.
- (24) Kawasaki, H. (2015) A mechanistic review of silica-induced inhalation toxicity. *Inhalation Toxicol.* 27, 363–377.
- (25) Bruch, J., Rehn, S., Rehn, B., Borm, P. J. A., and Fubini, B. (2004) Variation of biological responses to different respirable quartz flours determined by a vector model. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 207, 203–216.
- (26) Pavan, C., Tomatis, M., Ghiazza, M., Rabolli, V., Bolis, V., Lison, D., and Fubini, B. (2013) In search of the chemical basis of the hemolytic potential of silicas. *Chem. Res. Toxicol.* 26, 1188–1198.
- (27) Pavan, C., Rabolli, V., Tomatis, M., Fubini, B., and Lison, D. (2014) Why does the hemolytic activity of silica predict its pro-inflammatory activity? *Part. Fibre Toxicol.* 11, 76.
- (28) Fenoglio, I., Fubini, B., Tiozzo, R., and Di Renzo, F. (2000) Effect of micromorphology and surface reactivity of several unusual forms of crystalline silica on the toxicity to a monocyte-macrophage tumor cell line. *Inhalation Toxicol.* 12 (Suppl 3), 81–89.
- (29) Fubini, B., Fenoglio, I., Elias, Z., and Poirot, O. (2001) Variability of biological responses to silicas: effect of origin, crystallinity, and state of surface on generation of reactive oxygen species and morphological transformation of mammalian cells. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 20 (Suppl 1), 95–108.
- (30) Fubini, B., Zanetti, G., Altia, S., Tiozzo, R., Lison, D., and Saffiotti, U. (1999) Relationship between surface properties and cellular responses to crystalline silica: studies with heat-treated cristobalite. *Chem. Res. Toxicol.* 12, 737–745.
- (31) Hemenway, D. R., Absher, M. P., Trombley, L., and Vacek, P. M. (1990) Comparative clearance of quartz and cristobalite from the lung. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 51, 363–369.
- (32) Clouter, A., Brown, D., Høhr, D., Borm, P., and Donaldson, K. (2001) Inflammatory effects of respirable quartz collected in workplaces versus standard DQ12 quartz: particle surface correlates. *Toxicol. Sci.* 63, 90–98.
- (33) Daniel, L. N., Mao, Y., Wang, T. C., Markey, C. J., Markey, S. P., Shi, X., and Saffiotti, U. (1995) DNA strand breakage, thymine glycol production, and hydroxyl radical generation induced by different samples of crystalline silica in vitro. *Environ. Res.* 71, 60–73.
- (34) Cakmak, G. D., Schins, R. P., Shi, T., Fenoglio, I., Fubini, B., and Borm, P. J. (2004) In vitro genotoxicity assessment of commercial quartz flours in comparison to standard DQ12 quartz. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 207, 105–113.
- (35) Donaldson, K., Stone, V., Duffin, R., Clouter, A., Schins, R., and Borm, P. (2001) The quartz hazard: effects of surface and matrix on inflammatory activity. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 20 (Suppl 1), 109–118.
- (36) Fenoglio, I., Martra, G., Prandi, L., Tomatis, M., Coluccia, S., and Fubini, B. (2000) The role of mechanochemistry in the pulmonary toxicity caused by particulate minerals. *J. Mater. Synth. Process.* 8, 145–153.
- (37) Saffiotti, U., and Ahmed, N. (1995) Neoplastic transformation by quartz in the BALB/3T3/A31–1 cell line and the effects of associated minerals. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 15, 339–356.
- (38) Fubini, B., Fenoglio, I., Ceschino, R., Ghiazza, M., Martra, G., Tomatis, M., Borm, P., Schins, R., and Bruch, J. (2004) Relationship between the state of the surface of four commercial quartz flours and their biological activity in vitro and in vivo. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 207, 89–104.
- (39) Ghiazza, M., Scherbart, A. M., Fenoglio, I., Grendene, F., Turci, F., Martra, G., Albrecht, C., Schins, R. P., and Fubini, B. (2011) Surface iron inhibits quartz-induced cytotoxic and inflammatory responses in alveolar macrophages. *Chem. Res. Toxicol.* 24, 99–110.
- (40) Ghiazza, M., Tomatis, M., Doublier, S., Grendene, F., Gazzano, E., Ghigo, D., and Fubini, B. (2013) Carbon in intimate contact with quartz reduces the biological activity of crystalline silica dusts. *Chem. Res. Toxicol.* 26, 46–54.
- (41) Duffin, R., Gilmour, P. S., Schins, R. P. F., Clouter, A., Guy, K., Brown, D. M., MacNee, W., Borm, P. J., Donaldson, K., and Stone, V. (2001) Aluminium lactate treatment of DQ12 quartz inhibits its ability to cause inflammation, chemokine expression, and nuclear factor-κB activation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 176, 10–17.
- (42) Schins, R. P., Duffin, R., Høhr, D., Knaepen, A. M., Shi, T., Weishaupt, C., Stone, V., Donaldson, K., and Borm, P. J. (2002) Surface modification of quartz inhibits toxicity, particle uptake, and

oxidative DNA damage in human lung epithelial cells. *Chem. Res. Toxicol.* 15, 1166–1173.

(43) Knaapen, A. M., Albrecht, C., Becker, A., Höhr, D., Winzer, A., Haenen, G. R., Borm, P. J., and Schins, R. P. (2002) DNA damage in lung epithelial cells isolated from rats exposed to quartz: role of surface reactivity and neutrophilic inflammation. *Carcinogenesis* 23, 1111–1120.

(44) Albrecht, C., Knaapen, A. M., Becker, A., Höhr, D., Habertzell, P., van Schooten, F. J., Borm, P. J., and Schins, R. P. (2005) The crucial role of particle surface reactivity in respirable quartz-induced reactive oxygen/nitrogen species formation and APE/Ref-1 induction in rat lung. *Respir. Res.* 6, 129.

(45) Peeters, P. M., Eurlings, I. M. J., Perkins, T. N., Wouters, E. F., Schins, R. P. F., Borm, P. J. A., Drommer, W., Reynaert, N. L., and Albrecht, C. (2014) Silica-induced NLRP3 inflammasome activation in vitro and in rat lungs. *Part. Fibre Toxicol.* 11, 58.

(46) Napierska, D., Thomassen, L. C. J., Lison, D., Martens, J. A., and Hoet, P. H. (2010) The nanosilica hazard: another variable entity. *Part. Fibre Toxicol.* 7, 39.

(47) Di Cristo, L., Movia, D., Bianchi, M. G., Allegri, M., Mohamed, B. M., Bell, A. P., Moore, C., Pinelli, S., Rasmussen, K., Riego-Sintes, J., Prina-Mello, A., Bussolati, O., and Bergamaschi, E. (2016) Pro-inflammatory effects of pyrogenic and precipitated amorphous silica nanoparticles in innate immunity cells. *Toxicol. Sci.* 150, 40–53.

(48) Zhang, H. Y., Dunphy, D. R., Jiang, X. M., Meng, H., Sun, B. B., Tarn, D., Xue, M., Wang, X., Lin, S. J., Ji, Z. X., Li, R. B., Garcia, F. L., Yang, J., Kirk, M. L., Xia, T., Zink, J. I., Nel, A., and Brinker, C. J. (2012) Processing pathway dependence of amorphous silica nanoparticle toxicity: colloidal vs pyrolytic. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 15790–15804.

(49) Gazzano, E., Ghiazza, M., Polimeni, M., Bolis, V., Fenoglio, I., Attanasio, A., Mazzucco, G., Fubini, B., and Ghigo, D. (2012) Physicochemical determinants in the cellular responses to nanostructured amorphous silicas. *Toxicol. Sci.* 128, 158–170.

(50) Ghiazza, M., Polimeni, M., Fenoglio, I., Gazzano, E., Ghigo, D., and Fubini, B. (2010) Does vitreous silica contradict the toxicity of the crystalline silica paradigm? *Chem. Res. Toxicol.* 23, 620–629.

(51) Rabolli, V., Badissi, A. A., Devosse, R., Uwambayinema, F., Yakoub, Y., Palmi-Pallag, M., Lebrun, A., De Gussem, V., Couillin, I., Ryffel, B., Marbaix, E., Lison, D., and Huaux, F. (2014) The alarmin IL-1 α is a master cytokine in acute lung inflammation induced by silica micro- and nanoparticles. *Part. Fibre Toxicol.* 11, 69.

(52) Rimola, A., Costa, D., Sodupe, M., Lambert, J. F., and Ugliengo, P. (2013) Silica surface features and their role in the adsorption of biomolecules: computational modeling and experiments. *Chem. Rev.* 113, 4216–4313.

(53) Iler, R. K. (1979) *The Chemistry of Silica: Solubility, Polymerization, Colloid and Surface Properties, and Biochemistry*, John Wiley & Sons, New York.

(54) Koike, C., Noguchi, R., Chihara, H., Suto, H., Ohtaka, O., Imai, Y., Matsumoto, T., and Tsuchiyama, A. (2013) Infrared spectra of silica polymorphs and the conditions of their formation. *Astrophys. J.* 778, 60.

(55) Fenoglio, I., Croce, A., Di Renzo, F., Tiozzo, R., and Fubini, B. (2000) Pure-silica zeolites (Porosils) as model solids for the evaluation of the physicochemical features determining silica toxicity to macrophages. *Chem. Res. Toxicol.* 13, 489–500.

(56) Pastero, L., Turci, F., Leinardi, R., Pavan, C., and Monopoli, M. (2016) Synthesis of α -quartz with controlled properties for the investigation of the molecular determinants in silica toxicology. *Cryst. Growth Des.* 16, 2394–2403.

(57) Warheit, D. B., Webb, T. R., Colvin, V. L., Reed, K. L., and Sayes, C. R. (2007) Pulmonary bioassay studies with nanoscale and fine-quartz particles in rats: toxicity is not dependent upon particle size but on surface characteristics. *Toxicol. Sci.* 95, 270–280.

(58) Fubini, B., and Hubbard, A. (2003) Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free Radical Biol. Med.* 34, 1507–1516.

(59) Fubini, B., Giamello, E., and Volante, M. (1989) The possible role of surface oxygen species in quartz pathogenicity. *Inorg. Chim. Acta* 162, 187–189.

(60) Giamello, E., Fubini, B., Volante, M., and Costa, D. (1990) Surface oxygen radicals originating via redox reactions during the mechanical activation of crystalline SiO₂ in hydrogen-peroxide. *Colloids Surf.* 45, 155–165.

(61) Fubini, B., Bolis, V., Cavenago, A., Garrone, E., and Ugliengo, P. (1993) Structural and induced heterogeneity at the surface of some SiO₂ polymorphs from the enthalpy of adsorption of various molecules. *Langmuir* 9, 2712–2720.

(62) Bolis, V., Fubini, B., Marchese, L., Martra, G., and Costa, D. (1991) Hydrophilic and hydrophobic sites on dehydrated crystalline and amorphous silicas. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 87, 497–505.

(63) Morrow, B. A., and Gay, I. D. (2000) Infrared and NMR Characterization of the Silica Surface, in *Adsorption on Silica Surfaces* (Papirer, E., Ed.) pp 9–34, Marcel Dekker, New York.

(64) Catalano, F., Alberto, G., Ivanchenko, P., Dovbeshko, G., and Martra, G. (2015) Effect of silica surface properties on the formation of multilayer or submonolayer protein hard corona: Albumin adsorption on pyrolytic and colloidal SiO₂ nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* 119, 26493–26505.

(65) (2000) *Adsorption on Silica Surfaces*, Vol. 90, Marcel Dekker Inc., New York.

(66) Legrand, A., Ed. (1998) *The Surface Properties of Silicas*, Wiley, Chichester, UK.

(67) Fubini, B. (1998) Surface chemistry and quartz hazard. *Ann. Occup. Hyg.* 42, 521–530.

(68) King, E. J., Mohanty, G. P., Harrison, C. V., and Nagelschmidt, G. (1953) Effect of modifications of the surface of quartz on its fibrogenic properties in the lungs of rats. 1. Quartz leached with ringer's solution. 2. Quartz etched with hydrofluoric acid. 3. Quartz coated with coal extract. *AMA Arch. Ind. Hyg. Occup. Med.* 7, 455–477.

(69) King, E. J., Mohanty, G. P., Harrison, C. V., and Nagelschmidt, G. (1953) The action of different forms of pure silica on the lungs of rats. *Occup. Environ. Med.* 10, 9–17.

(70) Vigliani, E. C., and Mottura, G. (1948) Diatomaceous earth silicosis. *Occup. Environ. Med.* 5, 148–160.

(71) Driscoll, K. E. (1995) The toxicology of crystalline silica studied in vitro. *Appl. Occup. Environ. Hyg.* 10, 1118–1125.

(72) Donaldson, K., and Seaton, A. (2012) A short history of the toxicology of inhaled particles. *Part. Fibre Toxicol.* 9, 13.

(73) Borm, P. J., Tran, L., and Donaldson, K. (2011) The carcinogenic action of crystalline silica: a review of the evidence supporting secondary inflammation-driven genotoxicity as a principal mechanism. *Crit. Rev. Toxicol.* 41, 756–770.

(74) Bégin, R., Massé, S., Sébastien, P., Martel, M., Bossé, J., Dubois, F., Geoffroy, M., and Labbé, J. (1987) Sustained efficacy of aluminum to reduce quartz toxicity in the lung. *Exp. Lung Res.* 13, 205–222.

(75) Fubini, B., Bolis, V., Cavenago, A., and Volante, M. (1995) Physicochemical properties of crystalline silica dusts and their possible implication in various biological responses. *Scand. J. Work Environ. Health* 21, 9–14.

(76) Vallyathan, V., Kang, J. H., Van Dyke, K., Dalal, N. S., and Castranova, V. (1991) Response of alveolar macrophages to in vitro exposure to freshly fractured versus aged silica dust: The ability of Prosil 28, an organosilane material, to coat silica and reduce its biological reactivity. *J. Toxicol. Environ. Health* 33, 303–315.

(77) Nolan, R. P., Langer, A. M., Harington, J. S., Oster, G., and Selikoff, I. J. (1981) Quartz hemolysis as related to its surface functionalities. *Environ. Res.* 26, 503–520.

(78) Elias, Z., Poirot, O., Daniere, M. C., Terzetti, F., Marande, A. M., Dzwigaj, S., Pezerat, H., Fenoglio, I., and Fubini, B. (2000) Cytotoxic and transforming effects of silica particles with different surface properties in Syrian hamster embryo (SHE) cells. *Toxicol. In Vitro* 14, 409–422.

(79) Wiessner, J. H., Mandel, N. S., Sohnle, P. G., and Mandel, G. S. (1989) Effect of particle size on quartz-induced hemolysis and on lung inflammation and fibrosis. *Exp. Lung Res.* 15, 801–812.

- (80) Vallyathan, V., Shi, X. L., Dalal, N. S., Irr, W., and Castranova, V. (1988) Generation of free radicals from freshly fractured silica dust. Potential role in acute silica-induced lung injury. *Am. Rev. Respir. Dis.* 138, 1213–1219.
- (81) Dalal, N. S., Shi, X. L., and Vallyathan, V. (1990) ESR spin trapping and cytotoxicity investigations of freshly fractured quartz: mechanism of acute silicosis. *Free Radical Res. Commun.* 9, 259–266.
- (82) Schins, R. P., Knaapen, A. M., Cakmak, G. D., Shi, T., Weishaupt, C., and Borm, P. J. (2002) Oxidant-induced DNA damage by quartz in alveolar epithelial cells. *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 517, 77–86.
- (83) Hemenway, D., Absher, A., Fubini, B., Trombley, L., Vacek, P., Volante, M., and A. C. (1994) Surface functionalities are related to biological response and transport of crystalline silica. *Ann. Occup. Hyg.* 38, 447–454.
- (84) Rabolli, V., Thomassen, L. C. J., Princen, C., Napierska, D., Gonzalez, L., Kirsch-Volders, M., Hoet, P. H., Huaux, F., Kirschhock, C. E. A., Martens, J. A., and Lison, D. (2010) Influence of size, surface area and microporosity on the in vitro cytotoxic activity of amorphous silica nanoparticles in different cell types. *Nanotoxicology* 4, 307–318.
- (85) Fenoglio, I., Fonsato, S., and Fubini, B. (2003) Reaction of cysteine and glutathione (GSH) at the freshly fractured quartz surface: A possible role in silica-related diseases? *Free Radical Biol. Med.* 35, 752–762.
- (86) Fenoglio, I., Martra, G., Coluccia, S., and Fubini, B. (2000) Possible role of ascorbic acid in the oxidative damage induced by inhaled crystalline silica particles. *Chem. Res. Toxicol.* 13, 971–975.
- (87) Hamilton, R. F., Thakur, S. A., and Holian, A. (2008) Silica binding and toxicity in alveolar macrophages. *Free Radical Biol. Med.* 44, 1246–1258.
- (88) Thibodeau, M. S., Giardina, C., Knecht, D. A., Helble, J., and Hubbard, A. K. (2004) Silica-induced apoptosis in mouse alveolar macrophages is initiated by lysosomal enzyme activity. *Toxicol. Sci.* 80, 34–48.
- (89) Rabolli, V., Lison, D., and Huaux, F. (2016) The complex cascade of cellular events governing inflammasome activation and IL-1 β processing in response to inhaled particles. *Part. Fibre Toxicol.* 13, 40.
- (90) Hornung, V., Bauernfeind, F., Halle, A., Samstad, E. O., Kono, H., Rock, K. L., Fitzgerald, K. A., and Latz, E. (2008) Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat. Immunol.* 9, 847–856.
- (91) Mossman, B. T., and Churg, A. (1998) Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157, 1666–1680.
- (92) Sayan, M., and Mossman, B. T. (2016) The NLRP3 inflammasome in pathogenic particle and fibre-associated lung inflammation and diseases. *Part. Fibre Toxicol.* 13, 51.
- (93) Wynn, T. A. (2011) Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. *J. Exp. Med.* 208, 1339–1350.
- (94) Schins, R. P. (2002) Mechanisms of genotoxicity of particles and fibers. *Inhalation Toxicol.* 14, 57–78.
- (95) Knaapen, A. M., Borm, P. J., Albrecht, C., and Schins, R. P. (2004) Inhaled particles and lung cancer. Part A: Mechanisms. *Int. J. Cancer* 109, 799–809.
- (96) Turci, F., Pavan, C., Leinardi, R., Tomatis, M., Pastoro, L., Garry, D., Angussola, S., Lison, D., and Fubini, B. (2016) Revisiting the paradigm of silica pathogenicity with synthetic quartz crystals: the role of crystallinity and surface disorder. *Part. Fibre Toxicol.* 13, 32.
- (97) Brieger, H., and Gross, P. (1967) On the theory of silicosis. 3. Stishovite. *Arch. Environ. Health* 15, 751–757.
- (98) Cerrato, G., Fubini, B., Baricco, M., and Morterra, C. (1995) Spectroscopic, structural and microcalorimetric study of stishovite, a non-pathogenic polymorph of SiO₂. *J. Mater. Chem.* 5, 1935–1941.
- (99) Sankila, R., Karjalainen, S., Pukkala, E., Oksanen, H., Hakulinen, T., Teppo, L., and Hakama, M. (1990) Cancer risk among glass factory workers: An excess of lung cancer? *Occup. Environ. Med.* 47, 815–818.
- (100) Guldner, K. (1999) Development of silicosis in the ceramics and glass industry. *Gefahrstoffe - Reinhalt. Luft* 59, 189–191.
- (101) Cordioli, G., Cuoghi, L., Solari, P. L., Berrino, F., Crosignani, P., and Riboli, E. (1987) Tumor mortality in a cohort of glass industry workers. *Epidemiol. Prev.* 9, 16–18.
- (102) Sandberg, W. J., Lag, M., Holme, J. A., Friede, B., Gualtieri, M., Kruszewski, M., Schwarze, P. E., Skuland, T., and Refsnes, M. (2012) Comparison of non-crystalline silica nanoparticles in IL-1 β release from macrophages. *Part. Fibre Toxicol.* 9, 32.
- (103) Morishige, T., Yoshioka, Y., Inakura, H., Tanabe, A., Yao, X. L., Narimatsu, S., Monobe, Y., Imazawa, T., Tsunoda, S., Tsutsumi, Y., Mukai, Y., Okada, N., and Nakagawa, S. (2010) The effect of surface modification of amorphous silica particles on NLRP3 inflammasome mediated IL-1 β production, ROS production and endosomal rupture. *Biomaterials* 31, 6833–6842.
- (104) Maser, E., Schulz, M., Sauer, U. G., Wiemann, M., Ma-Hock, L., Wohleben, W., Hartwig, A., and Landsiedel, R. (2015) In vitro and in vivo genotoxicity investigations of differently sized amorphous SiO₂ nanomaterials. *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 794, 57–74.
- (105) Napierska, D., Quarck, R., Thomassen, L. C., Lison, D., Martens, J. A., Delcroix, M., Nemery, B., and Hoet, P. H. (2013) Amorphous silica nanoparticles promote monocyte adhesion to human endothelial cells: size-dependent effect. *Small* 9, 430–438.
- (106) Maynard, A. D. (2014) Old materials, new challenges? *Nat. Nanotechnol.* 9, 658–659.
- (107) Warheit, D. B. (2001) Inhaled amorphous silica particulates: what do we know about their toxicological profiles? *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 20 (Suppl 1), 133–141.
- (108) Arts, J. H., Muijsers, H., Duistermaat, E., Junker, K., and Kuper, C. F. (2007) Five-day inhalation toxicity study of three types of synthetic amorphous silicas in Wistar rats and post-exposure evaluations for up to 3 months. *Food Chem. Toxicol.* 45, 1856–1867.
- (109) Warheit, D. B., McHugh, T. A., and Hartsy, M. A. (1995) Differential pulmonary responses in rats inhaling crystalline, colloidal or amorphous silica dusts. *Scand. J. Work Environ. Health* 21 (Suppl 2), 19–21.
- (110) Renzel, P. G., Bruijntjes, J. P., Feron, V. J., and Woutersen, R. A. (1991) Subchronic inhalation toxicity of amorphous silicas and quartz dust in rats. *Food Chem. Toxicol.* 29, 341–354.
- (111) Lee, K. P., and Kelly, D. P. (1992) The pulmonary response and clearance of Ludox colloidal silica after a 4-week inhalation exposure in rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* 19, 399–410.
- (112) Murashov, V., Harper, M., and Demchuk, E. (2006) Impact of silanol surface density on the toxicity of silica aerosols measured by erythrocyte haemolysis. *J. Occup. Environ. Hyg.* 3, 718–723.
- (113) Jones, R. C., and Uehara, G. (1973) Amorphous coatings on mineral surfaces. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 37, 792–798.
- (114) Fenoglio, I., Fubini, B., Ghibaudi, E., and Turci, F. (2011) Multiple aspects of the interaction of biomacromolecules with inorganic surfaces. *Adv. Drug Delivery Rev.* 63, 1186–1209.
- (115) Nash, T., Allison, A. C., and Harington, J. S. (1966) Physico-chemical properties of silica in relation to its toxicity. *Nature* 210, 259–261.
- (116) Allison, A. C., Harington, J. S., and Birbeck, M. (1966) An examination of the cytotoxic effects of silica on macrophages. *J. Exp. Med.* 124, 141–154.
- (117) Nadler, S., and Goldfischer, S. (1970) The intracellular release of lysosomal contents in macrophages that have ingested silica. *J. Histochem. Cytochem.* 18, 368–371.
- (118) Summerton, J., and Hoehnig, S. (1977) The mechanism of hemolysis by silica and its bearing on silicosis. *Exp. Mol. Pathol.* 26, 113–128.
- (119) Harley, J. D., and Margolis, J. (1961) Haemolytic activity of colloidal silica. *Nature* 189, 1010–1011.
- (120) Depasse, J. (1980) Mechanism of the Haemolysis by Colloidal Silica, in *The In Vitro Effects of Mineral Dusts* (Brown, R. C., Gormley, I. P., Chamberlain, M., and Davies, R., Eds.) pp 125–130, Academic Press, London.
- (121) David, A. (1976) Hemolysis in vitro in the study of fibrogenicity of industrial dusts. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 37, 289–300.

- (122) Cho, W. S., Duffin, R., Bradley, M., Megson, I. L., MacNee, W., Lee, J. K., Jeong, J., and Donaldson, K. (2013) Predictive value of in vitro assays depends on the mechanism of toxicity of metal oxide nanoparticles. *Part. Fibre Toxicol.* 10, 55.
- (123) Lu, S. L., Duffin, R., Poland, C., Daly, P., Murphy, F., Drost, E., MacNee, W., Stone, V., and Donaldson, K. (2009) Efficacy of simple short-term in vitro assays for predicting the potential of metal oxide nanoparticles to cause pulmonary inflammation. *Environ. Health Perspect.* 117, 241–247.
- (124) Kettiger, H., Quebatte, G., Perrone, B., and Huwyler, J. (2016) Interactions between silica nanoparticles and phospholipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 1858, 2163–2170.
- (125) Alkhamash, H. I., Li, N., Berthier, R., and de Planque, M. R. (2015) Native silica nanoparticles are powerful membrane disruptors. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17, 15547–15560.
- (126) Murray, D., Harrison, J., and Wallace, W. (2005) A C-13 CP/MAS and P-31 NMR study of the interactions of dipalmitoylphosphatidylcholine with respirable silica and kaolin. *J. Colloid Interface Sci.* 288, 166–170.
- (127) Rascol, E., Devoisselle, J. M., and Chopineau, J. (2016) The relevance of membrane models to understand nanoparticles-cell membrane interactions. *Nanoscale* 8, 4780–4798.
- (128) Pandurang, R. S., Seehra, M. S., Razzaboni, B. L., and Bolsaitis, P. (1990) Surface and bulk infrared modes of crystalline and amorphous silica particles: a study of the relation of surface structure to cytotoxicity of respirable silica. *Environ. Health Perspect.* 86, 327–336.
- (129) Pavan, C. On the Variability of Silica Toxicity: Role of Surface Reactivity in Membranolysis and in the Activation of Inflammatory Pathways, Ph.D. Thesis, University of Torino, Turin, March 2016.
- (130) Hughes, C. S., Colhoun, L. M., Bains, B. K., Kilgour, J. D., Burden, R. E., Burrows, J. F., Lavelle, E. C., Gilmore, B. F., and Scott, C. J. (2016) Extracellular cathepsin S and intracellular caspase 1 activation are surrogate biomarkers of particulate-induced lysosomal disruption in macrophages. *Part. Fibre Toxicol.* 13, 19.
- (131) Cassel, S. L., Eisenbarth, S. C., Iyer, S. S., Sadler, J. J., Colegio, O. R., Tephly, L. A., Carter, A. B., Rothman, P. B., Flavell, R. A., and Sutterwala, F. S. (2008) The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 9035–9040.
- (132) Dostert, C., Pétrilli, V., Van Bruggen, R., Steele, C., Mossman, B. T., and Tschopp, J. (2008) Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* 320, 674–677.
- (133) Ankley, G. T., Bennett, R. S., Erickson, R. J., Hoff, D. J., Hornung, M. W., Johnson, R. D., Mount, D. R., Nichols, J. W., Russom, C. L., Schmieder, P. K., Serrano, J. A., Tietge, J. E., and Villeneuve, D. L. (2010) Adverse outcome pathways: a conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 730–741.
- (134) Peeters, P. M., Perkins, T. N., Wouters, E. F. M., Mossman, B. T., and Reynaert, N. L. (2013) Silica induces NLRP3 inflammasome activation in human lung epithelial cells. *Part. Fibre Toxicol.* 10, 3.
- (135) Rudzinski, W., Charnas, R., Piasecki, W., Thomas, F., Villieras, F., Prelot, B., and Cases, J. (1998) Calorimetric effects accompanying ion adsorption at the charged metal oxide/electrolyte interfaces: Effects of oxide surface energetic heterogeneity. *Langmuir* 14, 5210–5225.
- (136) Rudzinski, W., Charnas, R., Partyka, S., and Bottero, J. (1993) On the nature of the energetic surface heterogeneity in ion adsorption at a water oxide interface: theoretical studies of some special features of ion adsorption at low ion concentrations. *Langmuir* 9, 2641–2651.
- (137) Musso, F., Ugliengo, P., and Sodupe, M. (2011) Do H-bond features of silica surfaces affect the H₂O and NH₃ adsorption? Insights from periodic B3LYP calculations. *J. Phys. Chem. A* 115, 11221–11228.
- (138) Wiessner, J. H., Mandel, N. S., Sohnle, P. G., Hasegawa, A., and Mandel, G. S. (1990) The effect of chemical modification of quartz surfaces on particulate-induced pulmonary inflammation and fibrosis in the mouse. *Am. Rev. Respir. Dis.* 141, 111–116.
- (139) Shi, J., Hedberg, Y., Lundin, M., Wallinder, I., Karlsson, H., and Möller, L. (2012) Hemolytic properties of synthetic nano- and porous silica particles: The effect of surface properties and the protection by the plasma corona. *Acta Biomater.* 8, 3478–3490.
- (140) Wang, F., Yu, L., Monopoli, M. P., Sandin, P., Mahon, E., Salvati, A., and Dawson, K. A. (2013) The biomolecular corona is retained during nanoparticle uptake and protects the cells from the damage induced by cationic nanoparticles until degraded in the lysosomes. *Nanomedicine* 9, 1159–1168.
- (141) Bunderson-Schelvan, M., Hamilton, R. F., Trout, K. L., Jessop, F., Gulumian, M., and Holian, A. (2016) Approaching a Unified Theory for Particle-Induced Inflammation, in *Biological Effects of Fibrous and Particulate Substances* (Otsuki, T., Yoshioka, Y., and Holian, A., Eds.) pp 51–76, Springer, Tokyo, Japan.
- (142) Nolan, R. P., Langer, A. M., and Foster, K. W. (1985) Particle Size and Chemically-Induced Variability in the Membranolytic Activity of Quartz: Preliminary Observations, in *In Vitro Effects of Mineral Dusts* (Beck, E., and Bignon, G., Eds.) pp 39–50, Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- (143) Kriegseis, W., Scharmann, A., and Serafin, J. (1987) Investigations of surface properties of silica dusts with regard to their cytotoxicity. *Ann. Occup. Hyg.* 31, 417–427.
- (144) Fubini, B., Giamello, E., Pugliese, L., and Volante, M. (1989) Mechanically induced defects in quartz and their impact on pathogenicity. *Solid State Ionics* 32–33, 334–343.
- (145) Fubini, B., Giamello, E., Volante, M., and Bolis, V. (1990) Chemical functionalities at the silica surface determining its reactivity when inhaled - formation and reactivity of surface radicals. *Toxicol. Ind. Health* 6, 571–598.
- (146) Castranova, V., Dalal, N., and Vallyathan, V. (1996) Role of Surface Free Radicals in the Pathogenicity of Silica, in *Silica and Silica-Induced Diseases* (Castranova, V., Vallyathan, V., and Wallace, W., Eds.) pp 91–105, CRC Press, Boca Raton, FL.
- (147) Shi, X., Ding, M., Chen, F., Wang, L., Rojanasakul, Y., Vallyathan, V., and Castranova, V. (2001) Reactive oxygen species and molecular mechanism of silica-induced lung injury. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 20 (Suppl 1), 85–93.
- (148) Le Bouffant, L., Daniel, H., and Martin, J. C. (1977) The therapeutic action of aluminium compounds on the development of experimental lesions produced by pure quartz or mixed dust. *Inhaled Part. 4*, 389–400.
- (149) Haldane, J. S. (1917) The effects of dust inhalation. *Trans. Inst. Min. Eng.* 55, 264–293.
- (150) Stone, V., Jones, R., Rollo, K., Duffin, R., Donaldson, K., and Brown, D. M. (2004) Effect of coal mine dust and clay extracts on the biological activity of the quartz surface. *Toxicol. Lett.* 149, 255–259.
- (151) Elias, Z., Poirot, O., Daniere, M. C., Terzetti, F., Binet, S., Tomatis, M., and Fubini, B. (2002) Surface reactivity, cytotoxicity, and transforming potency of iron-covered compared to untreated refractory ceramic fibers. *J. Toxicol. Environ. Health, Part A* 65, 2007–2027.
- (152) Ghiazza, M., Tomatis, M., Doublier, S., Grendene, F., Gazzano, E., Ghigo, D., and Fubini, B. (2013) Carbon in intimate contact with quartz reduces the biological activity of crystalline silica dusts. *Chem. Res. Toxicol.* 26, 46–54.
- (153) Gulumian, M., and van Wyk, A. (1987) Free radical scavenging properties of polyvinylpyridine N-oxide: a possible mechanism for its action in pneumoconiosis. *Med. Lav.* 78, 124–128.
- (154) Ziemann, C., Escrig, A., Bonvicini, G., Monfort, E., Creutzenberg, O., and Salomoni, A. (2016) Organosilane-based coating of quartz species from the traditional ceramics industry: Proof of hazard reduction using in-vitro and in-vivo tests. *Ann. Occup. Hyg.*, in press.
- (155) Damby, D. E., Murphy, F. A., Horwell, C. J., Raftis, J., and Donaldson, K. (2016) The in vitro respiratory toxicity of cristobalite-bearing volcanic ash. *Environ. Res.* 145, 74–84.
- (156) Checkoway, H., Heyer, N. J., Demers, P. A., and Breslow, N. E. (1993) Mortality among workers in the diatomaceous earth industry. *Occup. Environ. Med.* 50, 586–597.

(157) Le Blond, J. S., Tomatis, M., Horwell, C. J., Dunster, C., Murphy, F., Corazzari, I., Grendene, F., Turci, F., Gazzano, E., Ghigo, D., Williamson, B. J., Oppenheimer, C., and Fubini, B. (2014) The surface reactivity and implied toxicity of ash produced from sugarcane burning. *Environ. Toxicol.* 29, 503–516.

(158) Natrass, C., Horwell, C. J., Damby, D. E., Keramanizadeh, A., Brown, D. M., and Stone, V. (2015) The global variability of diatomaceous earth toxicity: a physicochemical and in vitro investigation. *J. Occup. Med. Toxicol.* 10, 23.

(159) Ghiazza, M., Gazzano, E., Bonelli, B., Fenoglio, I., Polimeni, M., Ghigo, D., Garrone, E., and Fubini, B. (2009) Formation of a vitreous phase at the surface of some commercial diatomaceous earth prevents the onset of oxidative stress effects. *Chem. Res. Toxicol.* 22, 136–145.

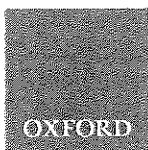
(160) Choi, M., Cho, W. S., Han, B. S., Cho, M., Kim, S. Y., Yi, J. Y., Ahn, B., Kim, S. H., and Jeong, J. (2008) Transient pulmonary fibrogenic effect induced by intratracheal instillation of ultrafine amorphous silica in A/J mice. *Toxicol. Lett.* 182, 97–101.

(161) Chen, X., Zhouhua, W., Jie, Z., Xinlu, F., Jinqiang, L., Yuwen, Q., and Zhiying, H. (2015) Renal interstitial fibrosis induced by high-dose mesoporous silica nanoparticles via the NF- κ B signaling pathway. *Int. J. Nanomed.* 10, 1–22.

(162) Castranova, V. (2004) Signaling pathways controlling the production of inflammatory mediators in response to crystalline silica exposure: role of reactive oxygen/nitrogen species. *Free Radical Biol. Med.* 37, 916–925.

(163) Øvrevik, J., Refsnes, M., Låg, M., Holme, J. A., and Schwarze, P. E. (2015) Activation of proinflammatory responses in cells of the airway mucosa by particulate matter: Oxidant- and non-oxidant-mediated triggering mechanisms. *Biomolecules* 5, 1399–1440.

(164) Hubbard, A. K., Mowbray, S., Thibodeau, M., and Giardina, C. (2005) Silica-Induced Inflammatory Mediators and Pulmonary Fibrosis, in *Fibrogenesis: Cellular and Molecular Basis* (Mohammed, S. R., Ed.) pp 199–210, Springer, New York, U.S.A.



Abrasion of Artificial Stones as a New Cause of an Ancient Disease. Physicochemical Features and Cellular Responses

Cristina Pavan,^{*,‡,1} Manuela Polimeni,^{†,‡,1} Maura Tomatis,^{*,‡,2}
Ingrid Corazzari,^{*,‡} Francesco Turci,^{*,‡} Dario Ghigo,^{†,‡,3} and Bice Fubini^{*,‡}

^{*}Department of Chemistry, University of Torino, Turin 10125, Italy, [†]Department of Oncology, University of Torino, Turin 10126, Italy and [‡]“G. Scansetti” Interdepartmental Center for Studies on Asbestos and Other Toxic Particulates, University of Torino, Turin 10125, Italy

¹These authors contributed equally to this study.

²To whom correspondence should be addressed at Department of Chemistry, University of Torino, Via P. Giuria 7, 10125 Turin, Italy. Fax: +39 0116707855. E-mail: m.tomatis@unito.it

³Professor Dario Ghigo passed away on October 7, 2015. He was not only a wonderful teacher and colleague but also a dear friend. He represented an uncommon example of correctness, honesty, and integrity. Dario will be always with us.

ABSTRACT

New outbursts of silicosis were recently reported among workers manufacturing an engineered material known as “artificial stone,” composed by high percentages of quartz (up to 98%) agglomerated with pigments and polymeric resins. Dusts released by abrasion during artificial stone polishing were characterized for particle size, morphology, and elemental composition and studied for (1) ability to catalyze free radical generation in acellular tests, (2) membranolytic potential on human erythrocytes, (3) cytotoxic activity (lactate dehydrogenase release) on murine alveolar macrophages (MH-S) and human bronchial epithelial (BEAS-2B) cell lines, (4) induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in BEAS-2B cells. Min-U-Sil 5 was used as reference quartz. Artificial stone dusts exhibited morphological features close to quartz, but contained larger amount of metal transition ions (mainly, Fe, Cu, and Ti), potentially responsible for the high reactivity in free radical generation observed. Opposite to Min-U-Sil 5, they were neither hemolytic nor cytotoxic on MH-S cells, a low cytotoxicity only being observed with BEAS-2B cells. The presence on the particle surface of residues of the resin accounts for this attenuated behavior, as hemolysis appeared and cytotoxicity increased after thermal degradation of the resin, when the free quartz surface was exposed. All dusts induced EMT with loss of E-cadherin expression and increased the expression of mesenchymal proteins (α -smooth muscle actin and vimentin). This may contribute to explain the development of fibrosis on workers exposed to artificial stone dusts.

Key words: quartz; artificial stone; free radical; membranolysis; cytotoxicity; epithelial–mesenchymal transition

Occupational exposure to dusts produced during manufacturing of “artificial stones,” also known as “quartz conglomerates,” was associated with an increased incidence of silicosis, one of the most ancient occupational diseases (Sauvé, 2015; Steenland and Ward, 2014). Several clusters of silicosis and lung-associated pathologies such as autoimmune diseases (Shtraichman et al., 2015) were reported in the past few years

due to fabrication and installation of artificial stones used primarily for kitchen and bathroom countertops in Spain (García Vadillo et al., 2011; Martínez et al., 2010; Pascual et al., 2011; Pérez-Alonso et al., 2014), Israel (Kramer et al., 2012), Italy (Bartoli et al., 2012), and in the United States (Bang et al., 2015; Friedman et al., 2015). Moreover, a recent hazard alert for workers manufacturing, finishing and installing countertops was

issued by the Occupational Safety and Health Administration and the Center for Disease Control and Prevention (NIOSH, 2015).

Concern for workers' health derives from the high crystalline silica content in artificial stones, which are blends of quartz (even over 90%) with pigments and polymeric resins providing the characteristic strength, water resistance, and color variety. Thus, during various steps in the manufacturing procedure (cutting, grinding, chipping, sanding, drilling, and polishing), workers may be exposed to respirable (aerodynamic diameter < 5 μm) crystalline silica dusts known to cause silicosis, lung cancer, or obstructive pulmonary disease, which may progress to respiratory failure and death (International Agency for Research on Cancer (IARC), 2012). Despite efforts to prevent crystalline silica exposure, all silicosis cases associated to artificial stone processing are related to a lack of preventive measures such as particulate abatement systems or personal respiratory protections. Thus, the large amount of dusts inhaled in a short period of time may, in part, explain the strikingly short-latency and the severity of the observed disease. Indeed, most epidemiological and clinical reports associated to artificial quartz conglomerates described cases of accelerated silicosis occurring within a few years of exposure and even affecting young subjects (Paolucci *et al.*, 2015; Pérez-Alonso *et al.*, 2015). Nevertheless—as proposed by Paolucci *et al.* (2015)—the extent of the damage suggests that besides high exposure levels, the chemical characteristics of the inhaled particles should also be taken into account, as dusts generated by cutting artificial conglomerates contain not only silica but also resins and pigments that may modify silica reactivity.

In this view, the aim of the present research was to explore the physicochemical properties and the *in vitro* biological reactivity that could be relevant for the reported high pathogenicity of artificial stone dusts. Size, morphology, chemical composition, and surface reactivity of the dusts were thoroughly evaluated. In particular, we investigated the generation of free radicals—a process known to contribute to the overall toxicity (Fubini and Hubbard, 2003)—in acellular systems, and membranolytic potential on human red blood cells (RBCs). Despite RBCs play no a direct role in the pathogenesis of silicosis or lung cancer, RBC membrane is a simple and convenient model to investigate damage to biological membranes, which represent one of the first sites of interaction with particulate matter. Moreover, the hemolysis test is one of the best predictive tests of particle-induced inflammatory response (Cho *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2009; Pavan *et al.*, 2014). Recent studies have shown that silica particles can induce the release of proinflammatory cytokines (eg, interleukin-1 β) via a membranolytic mechanism involving phagolysosomal membrane destabilization (Hornung *et al.*, 2008; Hughes *et al.*, 2016) and a correlation between the hemolytic activity of a set of silica particles, and release of IL-1 β from macrophages was observed (Pavan *et al.*, 2014). Cell toxicity was evaluated *in vitro* on human bronchial epithelial (BEAS-2B) cells, as well as on murine alveolar macrophages (MH-S), and the occurrence of the epithelial-mesenchymal transition (EMT) in BEAS-2B cells was also investigated. Fibrosis is a multiorigin disease but EMT has been recently recognized as an important pathway in cell transformation (Blanco *et al.*, 2004; Li and Li, 2015; Nowrin *et al.*, 2014) and in particulate-induced lung fibrosis such as silicosis (Hu Yong *et al.*, 2015; Liang *et al.*, 2015; Rong *et al.*, 2015).

The artificial stone dusts here considered were obtained by 2 types of processing—dry and wet—and were collected in different Italian companies where some cases of silicosis had been

reported (Bartoli *et al.*, 2012). The study was performed by comparing the physicochemical properties and the cellular effects of artificial stone dusts with those of a largely used reference quartz (Min-U-Sil 5) known for its cytotoxic and fibrogenic activity (International Agency for Research on Cancer (IARC), 1997).

MATERIALS AND METHODS

Materials

Artificial stone dust samples

A set of samples kindly supplied by the USL 11 of Empoli (FI, Italy) was collected in several Italian companies specialized in the manufacturing of quartz conglomerates. The samples consisted of dusts deposited *in situ* following 2 types of processing of the same material: a dry cutting (dry) using a grinding machine and a wet cutting (wet) using a circular saw or pantograph followed by water abatement to reduce airborne particles. All samples were examined for their chemical composition and oxidative activity in cell-free tests. Particle size, morphology, and cellular responses were performed on samples 1 and 2 (dry and wet), identified as the most reactive in generating free radicals. We report here the main results obtained on samples 1 and 2. The results obtained for samples 3, 4, 5, 6, and 7 are reported in the Supplementary data. One further sample (8-dry) was provided by the ASL 19 of Asti (AT, Italy) in the form of brick. A respirable dust was obtained by dry cutting of the brick using a diamond grinding wheel. The dust was tested 3 hours and 2, 8, and 15 days after preparation to evaluate the effect of aging on free radical release. Origins and acronyms of the samples dealt with in the text are listed in Table 1.

Reference quartz

The commercial quartz Min-U-Sil 5 purchased from U.S. Silica Co (Berkeley Springs, West Virginia; lot number 15062696) was used as positive control. Qz (Min-U-Sil 5) physicochemical features have been previously described by some of us (Gazzano *et al.*, 2012; Ghiazza *et al.*, 2013; Pavan *et al.*, 2013). A synthetic amorphous silica (MSS) from Fiber Optic Center Inc (New Bedford, Massachusetts) was used as negative control in EMT experiments. It is made up of regular monodispersed silica spheres ranging around 1 μm in diameter. It was characterized and found inert in previous *in vitro* studies (Gazzano *et al.*, 2012; Ghiazza *et al.*, 2010).

Chemical reagents

When not otherwise specified, all reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Milan, Italy). The water used was ultrapure Milli-Q water (Millipore, Billerica, Massachusetts), and 5,5'-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) was purchased from Cayman Chemical Company (Ann Arbor, Michigan).

Physicochemical Treatments of the Dusts

Heating of artificial stone dusts. Three grams of the dusts obtained either by dry and wet processing of sample 1 were heated in air at 500°C for 1 hour in order to promote degradation of the polymeric resin present in those samples. The samples thermally treated are indicated as 1-wet(h) and 1-dry(h).

Grinding of artificial stone dusts. Part of the dusts obtained either by dry and wet processing of sample 1 and previously heated in air at 500°C was further ground in a mixer mill (27 Hz) in agate jars (500 mg of sample per jar) for 1 hour in order to simulate the abrasion of the material at the time of processing. The samples

TABLE 1. List and Source of the Artificial Stone Dusts Studied

| Pristine Samples | Sampling Site/Origin | Treated Samples | Treatment |
|------------------|-----------------------------------|------------------------|--|
| 1-wet | Circular saw- water abatement | 1-wet(h) 1-wet(h/g) | Heated at 500 °C in air; heated/ground in a mixer mill for 1 hour |
| 1-dry | Dry grinding (grinding machine) | 1-dry(h) 1-dry(h/g) | Heated at 500 °C in air; heated/ground in a mixer mill for 1 hour |
| 2-wet | Circular saw-water abatement | | |
| 2-dry | Dry grinding (grinding machine) | | |
| 8-dry | Laboratory ground (diamond wheel) | | |
| Qz(Min-U-Sil 5) | Commercial (ground mineral) | | |

first heated and then ground are referred to as 1-wet(h/g) and 1-dry(h/g).

Physicochemical Characterization

Morphological investigation. Sample morphology was studied by Scanning Electron Microscope (SEM) in the secondary electron image mode using a Zeiss EVO 50 XVP (Oberkochen, Germany) with LaB₆ source. The samples were dispersed in ultrapure water (at 0.5 mg/ml), sonicated for 2 minutes in ice with an ultrasonic probe (40 W; Sonoplus, Bandelin, Berlin, Germany), dropped off on conductive stubs and coated with gold. The operating conditions were as follows: EHT 15–25 kV, WD 1–6 mm, and probe current 50–40 pA.

Size analysis. Particle size distribution was obtained by flow particle image analysis using the Sysmex FPIA-3000 apparatus (Malvern Instruments, UK, detection range, 0.8–300 μm). This instrument measures the diameter of a circle having the same projected area of the particle image optically detected (ie, the circle equivalent or CE diameter). Artificial stone dusts were dispersed in ultrapure water (0.5 mg/ml) and sonicated for 30 seconds at 10 W. Each sample was run at least 4 times with objective lens at ×20 magnification in high-power field mode. The 4 analyses were then pooled to obtain a statistically sound size distribution.

Specific surface area. The specific surface area was measured by means of the BET method based on N₂ or Kr adsorption (depending on the surface area expected) at -196 °C (ASAP 2020, Micromeritics, Norcross). Quartz samples have been degassed at 30 °C for hours prior to N₂ or Kr analysis.

Elemental composition. Elemental composition was assessed by micro-X-ray fluorescence spectroscopy (μ-XRF) using an Eagle III-XPL spectrometer equipped with a Rh X-ray tube, an EDS Si(Li) detector and an Edax Vision32 microanalytical system. The dusts were pressed into thin self-supporting pellet and each sample was analyzed in 12 different points, each point being collected choosing 30 kV and 250 μA as, respectively, the voltage and the current of the X-ray tube and 17 μs as integration time.

Free radical detection. The potential to generate hydroxyl (HO) radicals from hydrogen peroxide (Fenton Activity) and carboxyl (COO⁻) radicals from sodium formate (representative of the homolytic cleavage of C-H bonds in biomolecules) was investigated by Electron Paramagnetic Resonance (EPR) spectroscopy (Miniscope MS100; Magnetech, Berlin, Germany) coupled with the spin trapping technique. 5,5'-Dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) was used as trapping agent following a well-established procedure (Fenoglio et al., 2000; Fubini et al., 1995b). The spectra were recorded at 10, 30, and 60 minutes after particle incubation.

Thermogravimetric analysis coupled with Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Gas Chromatography Mass Spectrometry techniques. The nature and the amount of the residual volatiles evolved during the thermal analysis of artificial stone dusts were evaluated by means of an ultra-microbalance (sensitivity 0.1 μg) connected with a time-resolved Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) detector. Thermal analyses were performed under oxygen or nitrogen atmosphere. Under oxygen atmosphere (flow rate: 35 ml/minute), the dusts (ca. 10 mg) were heated from 30 °C to 600 °C at the rate of 20 °C/minute in a Pyris 1 Thermogravimetric (TGA) from Perkin-Elmer (Waltham, Massachusetts), whereas under nitrogen atmosphere (flow rate: 35 ml/minutes), the dusts were heated from 30 °C to 900 °C. The gas evolved during the heating ramp was piped (gas flow: 65 ml/min) via pressurized heated transfer line (Redshift S.r.l., Vicenza, Italy) and analyzed continuously by an FTIR spectrophotometer (Spectrum 100; Perkin-Elmer), equipped with a thermostated conventional gas cell. Temperature/time-resolved spectra were acquired in the 600–4000 cm⁻¹ wavenumber range with a resolution of 0.4 cm⁻¹ and analyzed with the Spectrum software (Perkin-Elmer). At the temperature where the main weight loss process reached the highest speed (ie, 450 °C) under N₂ atmosphere, the evolved gas (ca. 100 μl) was automatically pumped into a gas chromatograph (Clarus 500S; Perkin-Elmer) equipped with a standard nonpolar fused silica capillary column (Elite 5MS; Perkin-Elmer). Identification of the species contained in the eluate was performed with an integrated mass spectrometer (Clarus 560S; Perkin-Elmer). The results were reported as total ion count chromatograms, and the analysis of the average mass spectra at the chromatographic peak middle height was performed with the NIST MS Search Software.

In Vitro Cell Tests

Hemolysis assay on human erythrocytes. Erythrocytes were purified from fresh human blood obtained by healthy volunteer donors not receiving any pharmacological treatment. The method refers to Lu et al. (2009) with minor modifications given in Pavan et al. (2013). Briefly, erythrocytes were purified from blood collected in vacutainer tubes containing K₂EDTA as anticoagulant by centrifugation at 1200 × g for 10 minutes (Heraeus, Megafuge 11R; Thermo Scientific), they were washed 4 times with 0.9% NaCl (Eurospital S.p.a., Trieste, Italy), and finally suspended in 0.9% NaCl at the final concentration of 5% by volume. The dust samples were dispersed at the concentration of 200 cm²/ml in 0.9% NaCl and sonicated during 2 minutes (40 W, Sonoplus HD 2070; Bandelin, Berlin, Germany). Serial dilutions of the starting dispersion were performed to the final concentrations used for experiments (200, 100, 50, 25, 12.5, and 6.25 cm²/ml). Because RBC membranolysis is a surface-driven process, concentrations were calculated on the basis of the BET surface area for each sample. Particle suspensions were distributed in quadruplicate

in a 96-well plate (150 μl /well), and the RBC suspension was then added (75 μl /well). Negative and positive controls consisted in 0.9% NaCl and 0.1% Triton-X 100, respectively. The plate was incubated at room temperature on an orbital plate shaker for 30 minutes and then centrifuged at 1200 rpm for 5 minutes (Heraeus, Megafuge 1.0R; Thermo Scientific). Supernatants were finally transferred to a new plate (75 μl /well), and the absorbance of the hemoglobin released was determined at a wavelength of 540 nm on a microplate reader (Benchmark Plus, Bio-Rad, Hercules).

Cell cultures. Human bronchial epithelial cells (BEAS-2B; American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, Virginia) and murine alveolar macrophages (MH-S, a continuous cell line derived from Balb/cj mice; Istituto Zooprofilattico Sperimentale "Bruno Ubertini," Brescia, Italy) were cultured in Petri dishes in RPMI-1640 medium (Gibco, Paisley, UK) supplemented with 10% of fetal bovine serum and 1% penicillin (100 U/ml)—streptomycin (100 μg /ml) at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere.

Particle exposure. Particles were heated at 200°C for 2 hours in order to sterilize them and inactivate any trace of endotoxin, and then suspended in complete cell culture medium just before use and sonicated during 2 minutes (40 W, Sonoplus HD 2070). Cells were incubated with complete cell culture medium alone (negative control) or with different concentrations of the dusts, expressed as μg of dust per cm² of the dish surface area (20–40–80–100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), for different time periods according to the test performed.

Cytotoxicity assay-lactate dehydrogenase leakage. The cytotoxic activity of the dusts was assessed investigating cell membrane integrity after 24 hours of particle exposure by measuring the leakage of lactate dehydrogenase (LDH) activity into the extracellular medium at a wavelength of 340 nm (37°C) with a microplate reader (Benchmark Plus; Bio-Rad). The procedure described in Polimeni *et al.* (2008) was followed. Both intracellular and extracellular enzyme activity was expressed as μmol of NADH oxidized/minute/dish, then extracellular LDH activity (LDH out) was calculated as a percentage of the total LDH activity (LDH tot = intracellular + extracellular) in the dish.

Morphological analysis by optical microscopy. BEAS-2B cells (0.1×10^6) were incubated for 96 hours with the dusts at the concentration of 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Cells were then washed with PBS and observed with a Leica DC100 microscope (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) in order to perform a preliminary coarse evaluation of cell morphology parameters after particle incubation. For each experimental point, a minimum of 5 microscopic fields was examined.

Cytosolic and nuclear extracts. Cytosolic and nuclear extracts were obtained with the Nuclear Extraction Kit (Active Motif; Vinci-Biochem, Florence, Italy), according to the manufacturer's recommendations. The protein content of cellular lysates was assessed with the BCA kit.

Quantitative real-time PCR. Total RNA (2 μg) was reverse transcribed into cDNA using the iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad), and quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was performed using IQTM SYBR Green Supermix (Bio-Rad). The same cDNA preparation was used for quantification of human E-cadherin, vimentin, α -smooth muscle actin (α -SMA), and the housekeeping gene ribosomal subunit protein S14. The relative

quantification of each sample was performed comparing each PCR gene product with the S14 product using the Gene Expression Macro (<http://www3.bio12rad.com/LifeScience/jobs/2004/04-/genex.xls>; Bio-Rad). Primers used were as follows: S14 (forward: 5'-AGGTGCAAGGAGCTGGGTAT-3'; reverse: 5'-TCCAGGGTCTTGGTCCTATTT-3'), E-cadherin (forward: 5'-TACGCCTGGGACTCCACCTA-3'; reverse: 5'-CCAGAAACGGAGGCCTGAT-3'), α -SMA (forward: 5'-GACAATGGCTCTGGGCTCTGTAA-3'; reverse: 5'-ATGCCATGTTCTATCGGGTACTTCA-3'), vimentin (forward: 5'-AGGAAATGGCTCGTCACCTTCGTGAATA-3'; reverse: 5'-GGACTGTCGGTTGTTAAGAACTAGAGCT-3').

Western blotting. Aliquots of cytosolic extracts (10 μg) were separated by SDS-PAGE (8%–10%–12%). The blots were probed with anti-human antibodies and then with horseradish peroxidase-conjugated antibodies diluted in PBS-0.1% Tween with 5% Blocker Not-Fat Dry Milk. Proteins were detected by enhanced chemiluminescence using a ChemiDoc MP system (Bio-Rad) with Image Lab image acquisition. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) expression was used as loading control.

Antibodies. Primary antibodies to E-cadherin and GAPDH were purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc (Santa Cruz, CA); primary antibody to vimentin was from Sigma; primary antibody to α -SMA was from GeneTex (Irving, CA). Secondary horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse antibodies were from goat (Bio-Rad).

Statistical Analysis

Results are presented as mean \pm SEM or SD, as indicated. Differences between groups were analyzed by 1-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test (software: SPSS 21.0 for Windows; SPSS Inc, Chicago, IL). Differences with $P < .05$ were considered statistically significant.

RESULTS

Morphological and Chemical Characterization of Artificial Stone Dusts

The SEM images of artificial stone dusts 1 and 2, and of Qz (Min-U-Sil 5) are reported in Figure 1. The dusts generated by both types of processing (wet and dry) exhibited irregular shapes and sharp edges similarly to the reference quartz. Artificial stone dusts also showed conchoidal fractures and roughness typical of quartz obtained by grinding (Fubini, 1998a; Margolis and David, 1974). Opposite to the reference quartz, particles produced during artificial stone processing showed a minor amount of small particles stuck on the surface of the bigger ones, probably due to a difference in the electrostatic interaction.

Particle size of samples 1, 2, and 8 measured by automated flow particle image analysis (FP-IA) is reported in Table 2. All samples contained 90% of particles with average diameter $< 4 \mu\text{m}$, calculated as the diameter of a circle of equivalent area to the particle (the circle equivalent or CE diameter). The average diameters were around 2 μm , the dry cutting resulting in a slightly finer dust than wet processing. In general, artificial stone dusts were coarser than the reference quartz Qz (Min-U-Sil 5). The SD associated with the average diameter of artificial stone dusts was higher than that of the reference quartz, meaning a higher heterogeneity in size. This heterogeneity was also confirmed by SEM images (Supplementary Figure S1) and size

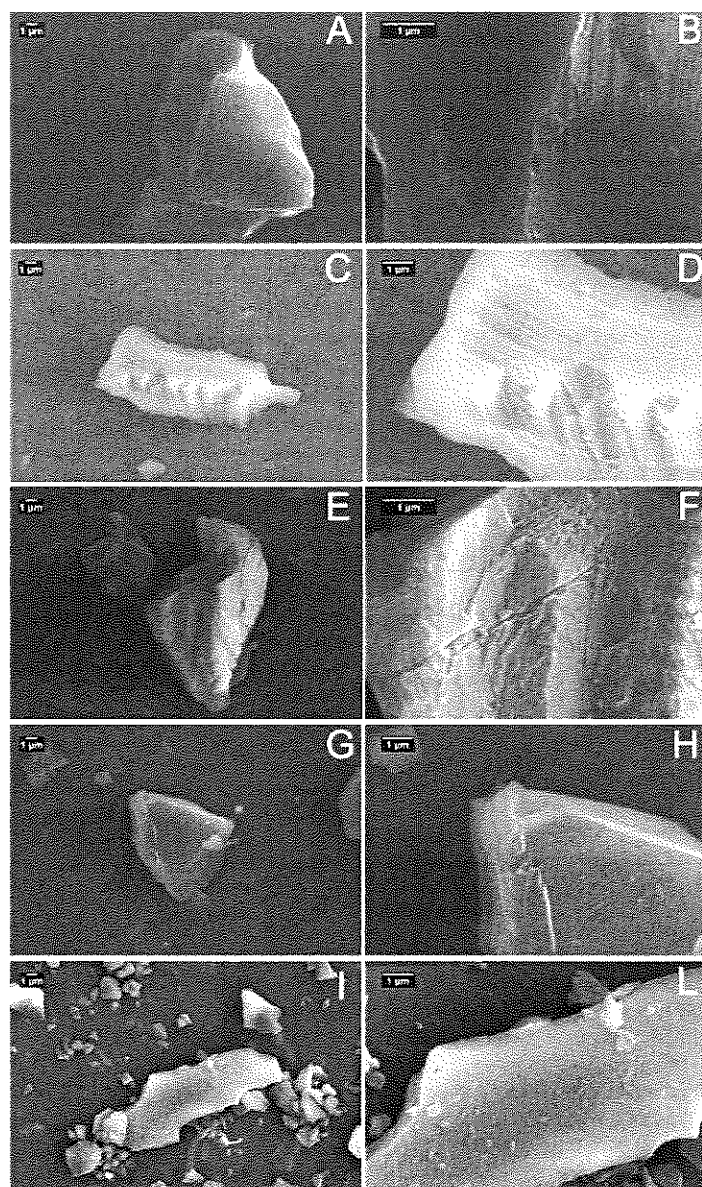


FIG. 1. SEM images of artificial stone dusts 1-wet (A and B), 1-dry (C and D), 2-wet (E and F), 2-dry (G and H), and the reference quartz Qz(Min-U-Sil 5) (I and L).

frequency distribution curves measured by FPIA (Supplementary Figure S2), which both revealed the presence of a coarse fraction around $10\ \mu\text{m}$. Accordingly, the specific surface area of sample 1 (wet and dry) was around $1.0\ \text{m}^2/\text{g}$ and was lower than the specific surface area of the reference sample ($5.1\ \text{m}^2/\text{g}$) (Table 2).

The elemental composition relative to Si content of artificial stone dusts is reported in Table 3 for samples 1 and 2 (wet and dry) and sample 8-dry, in Supplementary Table S1 for samples from 3- to 7-dry. All artificial stone dusts examined revealed high content of Si (approximately from 80% to 98%), except sample 2-wet (about 60%). Large differences in terms of minor elements were observed among the samples. Al was often present in different amounts, depending also from the type of cutting. Alkaline metals (K and Na) and alkaline earth metals (Ca and Mg) were found in all samples even in large percentages,

especially K and Ca; remarkable is the amount of Ca in sample 2-wet and of K in sample 8-dry. Transition metals such as Fe, Cu, Zn, and Ti were also detected in traces or in larger content, depending on the sample.

Artificial Stone Dusts Showed a Robust Potential to Generate Oxygen and Carbon-Centered Free Radicals Strongly Dependent Upon the Working Process (Dry or Wet Cutting) and Aging

Artificial stone dusts were evaluated for their potential to generate free radicals in aqueous suspensions reproducing the cellular environment (Fubini and Hubbard, 2003; Fubini *et al.*, 1995b). All samples were tested for their ability to generate hydroxyl radicals (HO) from hydrogen peroxide and carboxyl radicals (COO^-) from sodium formate used as a model molecule for the

TABLE 2. Particle Size and Specific Surface Area of Artificial Stone Dusts

| Sample | Particle Size (μm) ^a | | Specific Surface Area (m^2/g) ^b |
|-----------------|--|-----------|--|
| | Average Diameter \pm SD | 90% Value | |
| 1-wet | 2.2 \pm 3.8 | 3.6 | 0.8 \pm 0.1 |
| 1-dry | 1.9 \pm 2.2 | 2.9 | 1.0 \pm 0.1 |
| 2-wet | 2.1 \pm 3.3 | 3.8 | ND |
| 2-dry | 1.7 \pm 3.4 | 3.8 | ND |
| 8-dry | 1.9 \pm 1.4 | 3.0 | ND |
| Qz(Min-U-Sil 5) | 1.4 \pm 0.6 | 2.0 | 5.1 \pm 0.45 |

ND, not determined.

^aParticle size was evaluated by FPIA which measures the average diameter expressed as circle equivalent (CE) diameter \pm SD. The 90% value is the value of the CE diameter below which 90% observations fall.

^bSpecific surface area was evaluated by BET.

TABLE 3. Elemental Composition of Artificial Stone Dusts by μ -XRF

| Sample | Element wt%/Si wt% | | | | | | |
|-----------------|--------------------|-------|-------|--------|------|------|------|
| | Al | K | Ca | Ti | Fe | Cu | Zn |
| 1-wet | 0.95 | 0.49 | 0.81 | < 0.1% | 0.38 | 0.12 | – |
| 1-dry | – | 0.34 | 0.82 | < 0.1% | 0.60 | 0.36 | – |
| 2-wet | 2.22 | 0.96 | 52.68 | 1.08 | 1.87 | 0.23 | – |
| 2-dry | – | 0.80 | 0.51 | 0.38 | 0.34 | 0.24 | – |
| 8-dry | 4.35 | 11.34 | – | 3.13 | 0.27 | 0.34 | 0.16 |
| Qz(Min-U-Sil 5) | 1.53 | – | – | – | 0.29 | – | – |

Notes: data are reported as weight percent of each detected element normalized by the amount of Si.

homolytic cleavage of C-H bonds in organic biomolecules. The yield of free radicals was monitored at different timing points (10, 30, and 60 minutes). The EPR signal associated with the [DMPO-OH] or [DMPO-COO]⁻ adducts was double integrated to obtain the kinetic curves reported in Figure 2 and Supplementary Figure S3. Artificial stone dusts 1 and 2 showed a high potential to generate HO radicals (Figs. 2A and B), especially after 10 minutes of incubation when they were much more reactive than Qz(Min-U-Sil 5). However, opposite to Qz(Min-U-Sil 5), the rate of HO formation due to artificial stone dusts decreased over time, and after 60 minute the yield of HO radicals was close to that of Qz(Min-U-Sil 5) or even lower. There was no significant difference between the amount of HO radicals released by the samples obtained by wet (Figure 2A) or dry (Figure 2B) cutting. Instead, a large variation was observed in their ability to cleave the C-H bonds. Artificial stone dusts obtained by wet processing did not generate carboxyl radicals (Figure 2C), whereas dry processing produced highly reactive dusts, up to 10 times more than the reference Qz(Min-U-Sil 5) (Figure 2D). The kinetics of COO⁻ radical formation for artificial stone dusts was complex, but in general it was more sustained over time than the kinetics of HO release even if a decrease after 60 minute of incubation was observed for both artificial stone dusts 1 and 2. The same trend was observed for the samples 3, 4, 5, 6, and 7, with few exceptions (Supplementary Figure S3). The high SD recorded for some samples is noteworthy, and probably due to the high heterogeneity in composition of these materials.

The yield in COO⁻ radicals was also measured for 1 sample (8-dry) just after cutting the artificial stone and after 2, 8, and 15

days. Figure 2E shows a progressive reduction in the ability to generate COO⁻ radicals by ageing of the dust, as known in literature for HO radicals from quartz (Vallyathan et al., 1988). In particular, a remarkable decrease was observed up to 8 days from cutting then the amount of COO⁻ radicals released became stable.

Artificial Stone Dusts Showed Absence of Hemolytic Activity and Slight Cytotoxic Effect Only on Human Bronchial Epithelial Cells

Artificial stone dusts were tested on purified human RBCs to evaluate their membranolytic activity (hemolysis), and on MH-S and BEAS-2B cells to assess the leakage of intracellular LDH into the extracellular medium, taken as an index of augmented cell membrane permeability and cytotoxicity. Artificial stone dusts were inactive in inducing RBC lysis at any of the concentrations investigated as shown in Figures 5A and B for samples 1-wet and 1-dry, respectively. No difference was observed between the 2 types of processing, and the same inactivity was also found for samples 2 and 4 (data not shown).

Although MH-S cells incubated for 24 hours with increasing concentrations of artificial stone dusts did not elicit any significant cytotoxicity (data not shown), BEAS-2B cells showed a low increase in LDH activity into the extracellular medium as reported in Figure 3 for sample 1 (both wet and dry). The increment was significant only with the dry sample. Surprisingly, the freshly generated dust (8-dry) did not show any hemolytic activity or cytotoxic effect (data not shown for brevity).

Among the cellular models used, BEAS-2B cells were more sensitive to contact with artificial stone dusts and were therefore selected as primary cells for subsequent experiments.

Removal of the Resin From Artificial Stone Dusts Revealed a Strong Hemolytic Activity and Cytotoxic Effect on Human Bronchial Epithelial Cells

In order to verify the presence on the particle surface of residues of a polymeric resin, one of the main components with quartz of artificial stone, which could affect the biological activity, sample 1 was analyzed under O₂ atmosphere by TGA coupled on-line with FTIR and Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS) analysis. The thermal behaviors of samples 1-dry and 1-wet are reported in Figure 4A and Supplementary Figure S4, respectively. The thermogram of sample 1-dry shows an overall weight loss of about 8% and is characterized by 3 processes, the first one, which occurred at lower temperature and was responsible for a negligible weight loss, was assigned to the desorption of water as confirmed by FTIR analysis; the second one identified by a well-defined minimum peak on the derivative curve, started at about 150°C and continued up to 450°C where a second process of lower extent took place. The correspondent derivative curve attained the zero value at about 570°C. The thermogram of sample 1-wet was similar to sample 1-dry, even if the weight loss was lower (5.5%) (Supplementary Figure S4). The resultant weight loss is in agreement with the nominal content of resin (5%–8%) and conceivably corresponds to the oxidative degradation of the polymeric resin.

The TGA analysis was repeated under dynamic N₂ atmosphere (Figure 4B) up to 900°C, and the evolved species were monitored with FTIR and GC-MS. Three weight loss processes were observed: a first one, characterized by a very broad minimum on the derivative curve, involved a slight weight loss, attributed to the desorption of H₂O; a main second process, with a

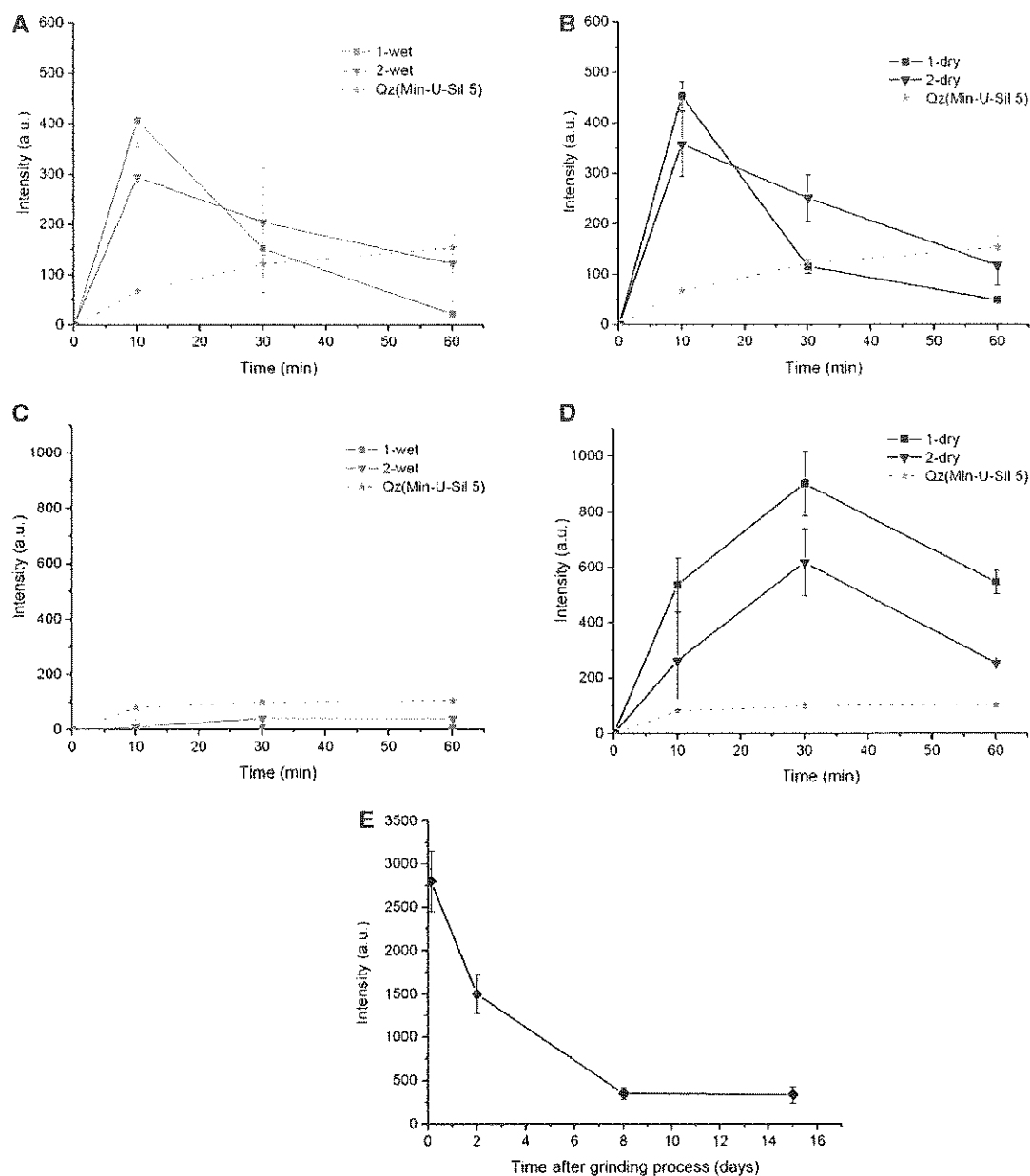


FIG. 2. Effect of the working process and of the ageing of the dusts on free radical generation. Kinetics of formation of hydroxyl (HO) (A and B) and carboxyl (COO⁻) radicals (C and D) after incubation of artificial stone dusts 1 and 2 obtained by wet (A and C) or dry processing (B and D) with 5,5'-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) as trapping agent and hydrogen peroxide or sodium formate as target molecules, respectively. The amount of radicals released was measured after 10, 30, and 60 minute of incubation and is proportional to the intensity of the Electron Paramagnetic Resonance signal of the [DMPO-OH] or [DMPO-COO⁻] adducts measured by double integration and reported as arbitrary units. E, Amount of carboxyl (COO⁻) radicals generated by sample 8-dry after 3 hours, and 2, 8, and 15 days after preparation (dry cutting in laboratory of an artificial stone). The results for artificial stone dusts are compared with the reference quartz Qz(Min-U-Sil 5) and are reported as mean \pm SD of 3 independent experiments ($n = 3$).

well-resolved minimum peak on the derivative curve at ca. 450°C; a third process occurring at higher temperature and involving a negligible weight loss. The FTIR spectrum (Figure 4C) and the gas chromatogram (Figure 4D) of the gas evolved at 450°C confirmed the organic nature of the products released during degradation of sample 1-dry. The presence of toluene, styrene, and α -methylstyrene is indeed consistent with the degradation of an unsaturated polyester resin (Kandare *et al.*, 2008). Sample 1-wet showed the same FTIR-GC/MS profiles of sample 1-dry (data not reported for brevity).

Based on TGA curves, sample 1-wet and 1-dry were heated at 500°C in order to remove the resin, and a fraction of these samples was also ground in a ball mill in order to simulate the material abrasion during processing. Particle size was only partially affected by the thermal treatment. Conversely, a slight decrease of the average diameter and an increase of the BET area were observed after milling (Supplementary Table S2), as expected.

RBCs and BEAS-2B cells were incubated with increasing concentrations of artificial stone dusts untreated (1-wet and 1-dry)

or heated (h) or heated and then ground (h/g). After heating, both samples showed a significant increase of the hemolytic activity if compared with the starting material (Figs. 5A and B). On BEAS-2B cells, the increase was less evident (Figs. 5C and D) as only sample 1-wet(h) showed a significant increment of LDH

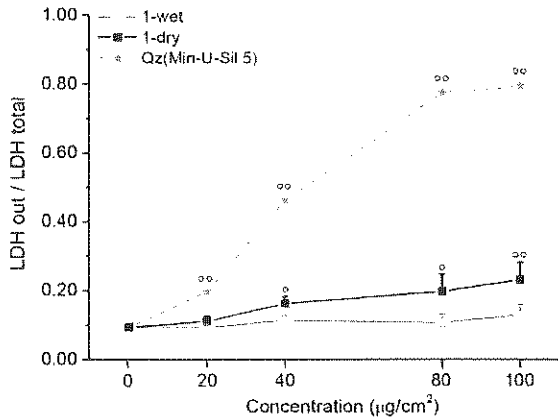


FIG. 3. Effect of artificial stone dusts (sample 1 dry and wet) on lactate dehydrogenase (LDH) release into the extracellular medium of bronchial epithelial (BEAS-2B) cells. Cells were incubated for 24 hours in either the absence ($0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, control) or presence of sample 1-wet, sample 1-dry or reference quartz Qz(Min-U-Sil 5) at the concentration of 0, 20, 40, 80, and $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. After a 24-hour incubation, LDH activity was calculated as percentage of total LDH activity of the dish. Data are presented as mean \pm SEM of 3 independent experiments ($n=3$). Significant differences versus control * $P < .001$, ** $P < .0001$.

leakage (Figure 5C). After heating and grinding, both the hemolytic activity (Figs. 5A and B) and the cytotoxicity (Figs. 5C and D) induced by artificial stone dusts increased with respect to untreated samples.

Chronic Exposure to as-Abraded or resin-Deprived Artificial Stone Dusts Induce Epithelial-Mesenchymal Transition in Human Bronchial Epithelial Cells

Microscope images of BEAS-2B cells incubated for 96 hours with $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ of artificial stone dusts (sample 1, wet and dry, before and after the different treatments) are reported in Figure 6. After 96 hours, no LDH leakage was observed (data not reported for brevity). Cells exposed to untreated samples had completely lost their organization in compact islets, taking on a tapered and spindle shape with pointed ends and elongated protrusions, assuming a fibroblast-like appearance with cells arranged in parallel, whereas control cells reached confluence and showed their typical epithelial morphology. The same morphology alteration was observed in BEAS-2B cells incubated with samples 2 and 4 (Supplementary Figure S5).

To assess whether EMT could be the mechanism behind these changes, we examined the expression of classic epithelial and mesenchymal markers using qRT-PCR and Western blotting (WB) in BEAS-2B cells exposed to $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ of (wet and dry) sample 1. As shown in Figure 7A, qRT-PCR data indicated that (wet and dry) sample 1 significantly enhanced the messenger RNA (mRNA) expression of the mesenchymal markers vimentin and α -SMA. At the same time the mRNA expression of E-cadherin—a typical epithelial molecule of cellular adherent

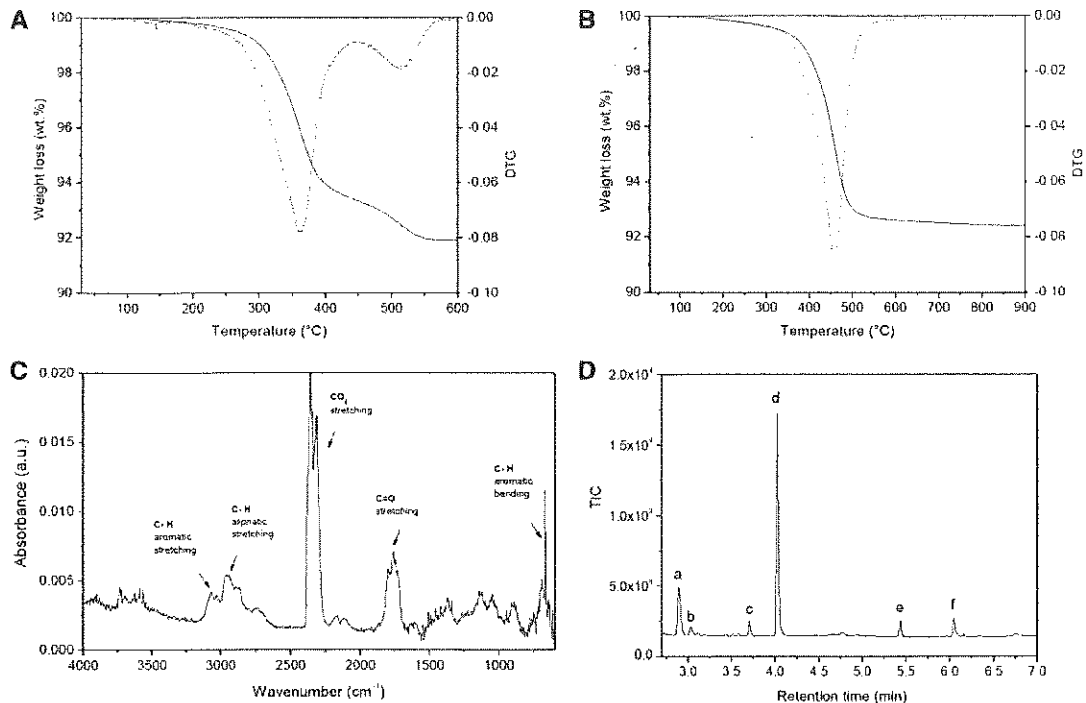


FIG. 4. Thermogravimetric (TGA)-Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)-Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS) analysis of artificial stone dust 1-dry. A, Thermogravimetric (solid line) and derivative (dotted line) curves of sample 1-dry heated up to 600°C under oxygen atmosphere. The TGA analysis evidenced an overall weight loss of about 8 wt.% in agreement with the content of resin declared by the manufacturer. B, TGA (solid line) and derivative (dotted line) curves of sample 1-dry heated up to 900°C under nitrogen atmosphere. C, FTIR spectra in the $4000\text{--}600 \text{ cm}^{-1}$ spectral region and (D) gas chromatogram of the volatiles generated from thermal degradation of sample 1-dry at 450°C under nitrogen atmosphere. The FTIR and GC-MS profiles were consistent with a polystyrene resin. GC chromatographic peaks correspond to: (a) toluene at 2.89 minutes, (b) 3-methylheptane at 3.03, (c) ethylbenzene at 3.70 minutes, (d) styrene at 4.03 minutes, (e) α -methylstyrene at 5.44 minutes, and (f) 2-ethyl-1-hexanol at 6.03 minutes.

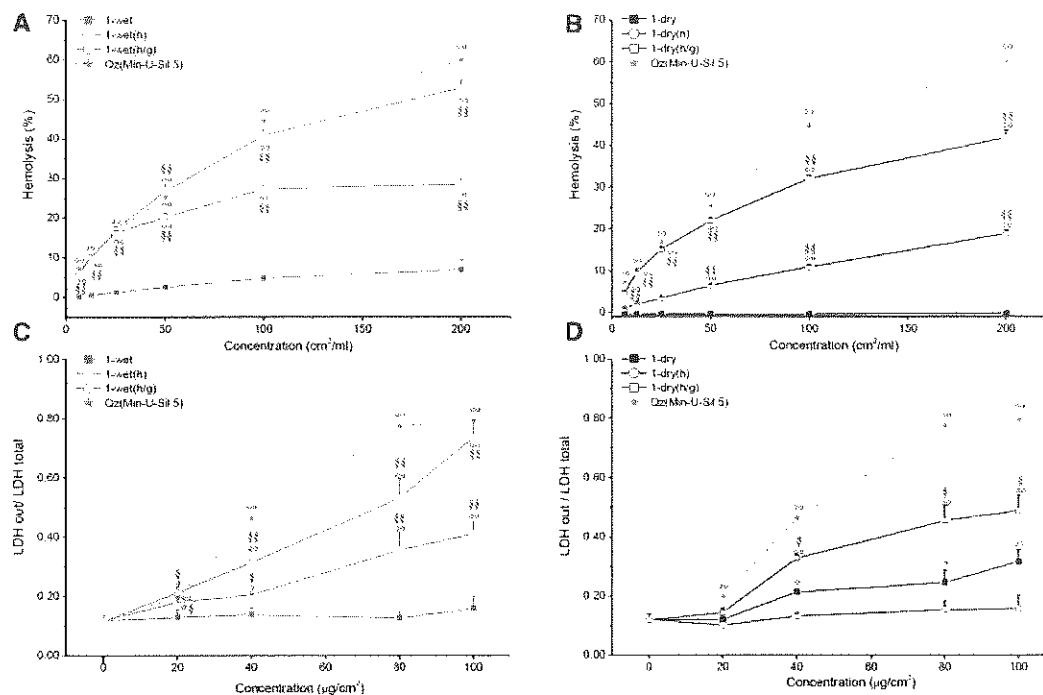


FIG. 5. Effect of resin removal on the cytotoxicity (A and B) and bronchial epithelial (BEAS-2B) cytotoxicity (C and D) of artificial stone dusts (samples 1-wet and 1-dry). A and B, red blood cells (RBCs) were incubated with increasing concentrations of sample 1 untreated, sample 1(h), sample 1(h/g) or reference Qz(Min-U-Sil 5) quartz and hemolytic activity was assessed. C and D, lactate dehydrogenase (LDH) release into the extracellular medium of BEAS-2B cells. Cells were incubated for 24 hours in either the absence ($0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, control) or presence of sample 1 untreated, sample 1(h), sample 1(h/g) or reference Qz(Min-U-Sil 5) quartz at the concentration of 0, 20, 40, 80, and $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. After a 24-hour incubation, LDH activity was calculated as percentage of total LDH activity of the dish. Data are presented as mean \pm SEM ($n=3$). Significant differences versus control $^{\#}P < .001$, $^{\circ}P < .0001$; versus untreated sample $^{\$}P < .001$, $^{\$}P < .0001$.

junctions—was significantly repressed. WB showed a significantly increased expression of vimentin and α -SMA, more marked with sample 1-wet, and loss of E-cadherin after incubation with (wet and dry) sample 1 (Figure 7B). Artificial stone samples were compared with the positive control Qz (Min-U-Sil 5) and MSS as negative control.

BEAS-2B cells exposed to heated (h) or heated and then ground (h/g) samples assumed a fibroblast-like appearance as BEAS-2B cells exposed to untreated samples (Figure 6). Similarly, qRT-PCR data indicated that both treatments altered the mRNA expression of vimentin and E-cadherin with respect to control cells to almost the same extent of the cells exposed to untreated samples (Figure 7A). In agreement, also WB data showed that the expression of vimentin and E-cadherin proteins in BEAS-2B cells was very similar to that found for the untreated samples (Figure 7B). Finally, α -SMA mRNA and protein levels increased for BEAS-2B cells exposed to treated samples with respect to control, even if only a modest increment was observed for the treated samples 1-wet(h) and 1-wet(h/g).

DISCUSSION

The unusual severity of the silicosis observed even in young workers within relatively short time of exposure (Pérez-Alonso et al., 2014) led to suppose that peculiar physicochemical properties and atypical surface features may drive the detrimental effects of artificial stone dusts (Paolucci et al., 2015). Indeed, although composed mainly by crystalline silica, artificial stones contain other components, both organic and inorganic, which may modify the well-known reactivity of quartz (Fubini, 1998b). To date, no study has been performed on the physicochemical

characteristics of artificial stone dusts or on the cellular effects elicited by this type of particles.

In the present research, a set of dusts obtained from both dry and wet cutting of artificial stones has been considered. The dusts here examined showed size and morphology typical of mineral quartz dusts obtained by grinding. Besides the high content (ca. 80%–98%) of quartz, our data indicated that residues of the polymeric resin used as conglomerant in the manufacture of the artificial stones were retained on the surface of the particles. K, Na, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, and Ti in different amounts were also found and may be associated to included pigments or to the cutting material.

Artificial stone dusts exhibited a strong potential to generate free radicals, mainly hydroxyl radicals, in acellular systems mimicking the cellular environment. Free radicals are highly reactive species involved in genotoxicity, and in inflammatory and fibrotic responses induced by quartz particles (Castranova, 2004; Fubini and Hubbard, 2003; Knaapen et al., 2004; Øvreivik et al., 2015). The reactivity in HO generation did not depend on the origin of the dust (no significant difference between dry and wet samples was observed) and largely exceeded that of the most part of quartz currently used in experimental studies (Pavan et al., 2013; Schins et al., 2002), Min-U-Sil 5 included. A similar high reactivity was observed by Clouter et al. (2001) for 2 workplace quartz and was explained by the large presence of redox active transition metals, such as Fe and Cu, able to trigger the Fenton reaction (Fubini and Hubbard, 2003). Opposite to HO generation, COO^- release varied from dry to wet samples. Wet-processing completely abolished the reactivity toward C-H bond likely by reducing the formation of surface radicals, which are present in large amount on silica surfaces fractured in a dry

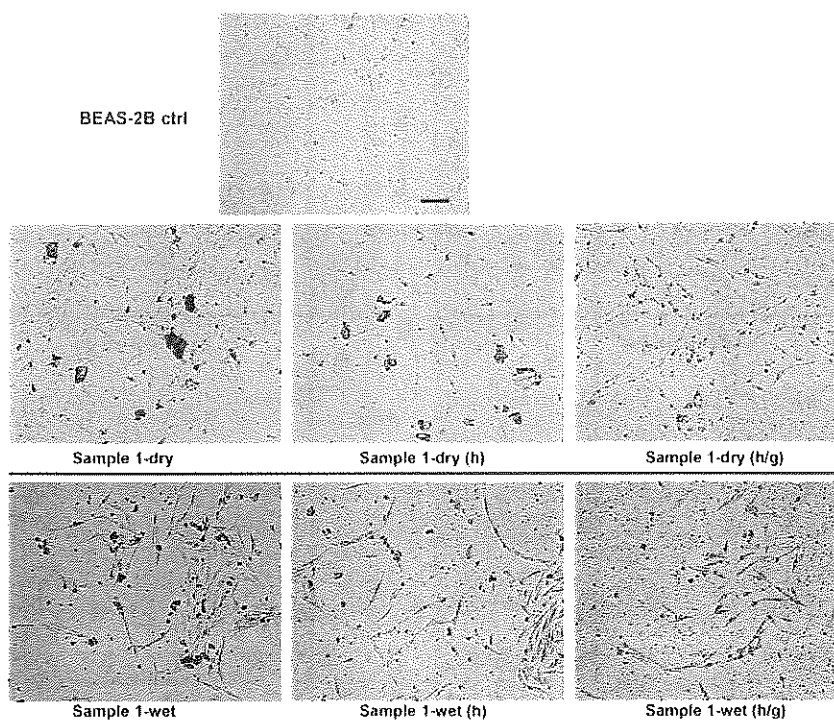


FIG. 6. Representative microscope images of bronchial epithelial (BEAS-2B) cells exposed to artificial stone dusts. Cells were incubated for 96 hours in either the absence ($0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, ctrl) or the presence of $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ of sample 1 untreated (1-wet and 1-dry), heated (h) or heated and then ground (h/g). After the incubation, cells were rinsed with PBS and observed by optical microscopy. Representative images are shown ($\times 10$; scale bar = $50 \mu\text{m}$).

oxygen atmosphere (Fubini *et al.*, 1989,1995a), and/or by oxidizing surface metals. As instance, Fe(III) was unreactive in catalyzing COO^- generation opposite to Fe(II) (Tomatis *et al.*, 2002).

Surface radicals rapidly decay, even if traces of these are usually visible on aged dusts (Fubini *et al.*, 1990), thus their amount is expected to be higher in recently cleaved than in aged quartz surfaces (Vallyathan *et al.*, 1988). This explains the high reactivity of the sample 8-dry in COO^- release when tested few hours after cutting and then the progressive decrease of the amount of radicals over time. This also suggests that the ability of the samples here analyzed to catalyze free radical generation is lower than that of the fresh particles inhaled by workers.

Despite the high radical reactivity, classic *in vitro* endpoints commonly observed for a number of crystalline silica particles (International Agency for Research on Cancer (IARC), 1997) did not showed marked signs of cellular toxicity. Neither hemolytic activity nor cytotoxic effect on murine MH-S were observed. Only a slight cytotoxicity was observed on human bronchial epithelial cells. Moreover, the hemolytic activity and cytotoxicity of the freshly generated dust (sample 8-dry) did not significantly differ from those of the other samples. This is somewhat surprising given that in general freshly fractured surfaces are more cytotoxic than aged ones (Vallyathan *et al.*, 1991). The cellular inertness here observed may be ascribed to the presence of a polymeric resin that partially covers particle surface, preventing the interaction with cells without affecting the reactive surface sites involved in free radical generation. Similarly, it has been reported a reduction of the hemolytic and macrophage stimulatory activity of quartz after coating with an organosilane (Vallyathan *et al.*, 1991). After degradation of the resin by a thermal treatment, a substantial hemolytic activity appeared for sample 1 (both dry and wet), as well as a cytotoxic effect for

sample 1-wet. As expected, cytotoxicity further increased for dusts heated and then ground. The occurrence of a significant hemolytic activity after degradation of the polymeric resin confirms that particle surface needs to be accessible in order to interact with membranes, and that hemolysis is unrelated to free radical generation (Pavan *et al.*, 2013). The present data suggest that some of the classic endpoints used for evaluating *in vitro* quartz toxicity, such as cytotoxicity and hemolytic activity, may not be adequate to describe the biological activity of complex quartz-containing dusts. We may not exclude that in the long-term, a chronic permanence of artificial stone dusts in lung lining fluid may induce a degradation of the resin and expose the naked particle surface thus restoring the cytotoxic and membranolytic activity of quartz dust.

Contrary to hemolysis and cytotoxicity, EMT took place for all samples tested, regardless the presence of the resin. Epithelial-mesenchymal transition has been recently recognized as an important pathway in fibrosis. Differentiated epithelial cells may play an important role in the regulation of lung fibrosis by producing cytokines and growth factors (Guarino *et al.*, 2009) or may undergo transition to a mesenchymal phenotype, giving rise to generation of fibroblasts and myofibroblasts (Tanjore *et al.*, 2009). An altered expression of adhesion molecules and the EMT was first observed *in vivo* by Blanco demonstrating an association with silica-induced lung carcinogenesis in rats (Blanco *et al.*, 2004). Recently, the EMT process was observed *in vitro* in human bronchial epithelial cells (Gao *et al.*, 2011), and in human lung epithelial (A549) and BEAS-2B cells exposed to crystalline silica (Rong *et al.*, 2015). Finally, Antognelli demonstrated that Min-U-Sil 5 was able to induce EMT in BEAS-2B cells and that acquisition of an EMT-like phenotype was associated with a neoplastic-like cell transformation process

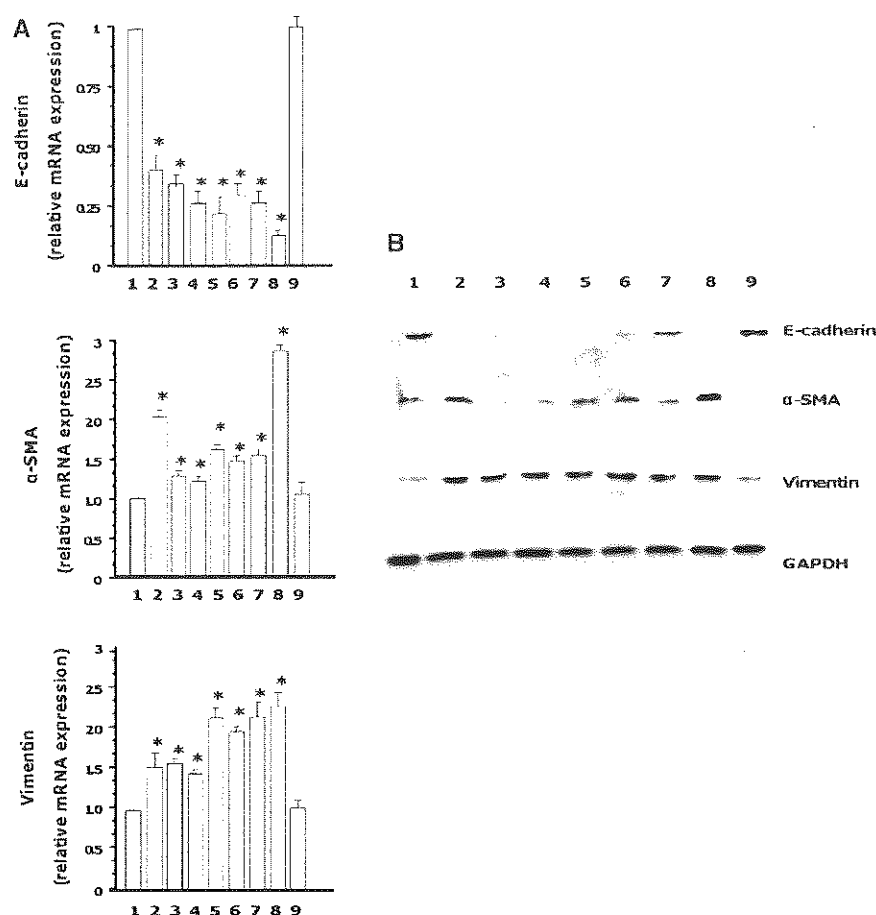


FIG. 7. Relative expression of epithelial and mesenchymal markers of bronchial epithelial (BEAS-2B) cells exposed to artificial stone dusts. Relative expression of epithelial and mesenchymal markers was checked by quantitative real-time PCR (A) and Western blotting (B). BEAS-2B cells were incubated for 96 hours in either the absence ($0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, control) or presence of $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ of artificial stone dusts (lane 1 = control; lane 2 = sample 1-wet; lane 3 = sample 1-wet(h); lane 4 = sample 1-wet(h/g); lane 5 = sample 1-dry; lane 6 = sample 1-dry(h); lane 7 = sample 1-dry(h/g); lane 8 = Qz(Min-U-Sil 5); lane 9 = MSS). A, Expression of E-cadherin, α -SMA and vimentin mRNA. Results were expressed in units of relative mRNA expression compared with control cells ($n=3$). versus control * $P < .0001$. B, Expression of E-cadherin, α -SMA and vimentin proteins. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as loading control. Each figure is representative of 3 experiments giving similar results.

(Antognelli et al., 2016), in agreement with recently findings from an *in vivo* study addressing the linkage of EMT-dependent tissue repair with neoplasia following silica exposure (Wang et al., 2015).

EMT is a process by which epithelial cell-cell adhesions are dissolved, the actin cytoskeleton is reorganized, and cells acquire increased cell-matrix contacts and enhanced migratory and invasive capabilities (Yilmaz and Christofori, 2009). After 96 hours of incubation, noncytotoxic concentrations of artificial stone dusts were able to induce a significant morphological alteration of BEAS-2B cells. Exposed cells appeared spindle-shaped and disorganized. The shape change was accompanied, in both cases, by a significant loss of E-cadherin expression, a typical marker of epithelial cells, which is downregulated when cells lose their polarity and cell-cell contact (Thiery et al., 2009). Moreover, transformed cells acquired mesenchymal characteristics such as a significant increase of cytoskeletal proteins (ie, vimentin) and rearrangement of actin with *de novo* synthesis of α -SMA, essential for enhanced motility and invasiveness (Thiery et al., 2009). These events are not clearly related to a specific physicochemical feature of the sample. The induction of EMT may be related to the high reactivity in

particle-derived generation of reactive oxygen species. The different treatments, ie, heating to expose free quartz surface, and heating followed by grinding, carried out on sample 1 (both dry and wet), did not modify the EMT response with respect to the pristine sample.

In conclusion, artificial stone dust may be a strong activator of fibrotic markers, as here suggested by the EMT, rather than a membranolysis inducer. The acquisition of the EMT-like phenotype was evident for all samples demonstrating the high fibrogenic activity of these dusts, regardless of the presence of the resin. The large amount of redox-active transition metal ions and the high content of quartz in artificial stone are responsible for the observed strong cell-free oxidative activity. Our study provides evidence that artificial stone workers are at risk of exposure to highly reactive and potentially fibrogenic dusts in respirable size. Cell-free oxidative tests confirmed that these dusts are much more reactive when freshly abraded at the time of cutting. These features may contribute, together with the high level of exposure recorded in workplaces, to the high incidence of silicosis reported by occupational survey and confirm the relevance of regulatory and preventive measures during processing of artificial stones.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data are available online at <http://toxsci.oxfordjournals.org/>.

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge the Network Italiano Silice (NIS) who coordinates research and prevention in the field of silica pathogenicity and in particular Dr Fabio Capacci, Dept. di Prevenzione ASL Firenze, not only for the support to the research but also for suggesting the subject of artificial stone dust toxicity and providing useful information and discussions all along the development of the study. We kindly acknowledge Dr Carla Poli, Dept. di Prevenzione, USL 11 of Empoli (FI, Italy), and Dr Mariangela Azzone, Dept. di Prevenzione, ASL 19 of Asti (AT, Italy) for sample collection.

FUNDING

This work was supported by Italian Workers' Compensation Authority (Istituto Nazionale Assicurazione Infortuni sul Lavoro - INAIL) of Piemonte as a doctoral fellowship given to CP and by the Local Health Authority (Azienda Sanitaria Locale - ASL) of Firenze (Italy). Particle image analysis has been obtained with the equipment acquired by the Interdepartmental Center "G. Scansetti" for Studies on Asbestos and Other Toxic Particulates with a grant from Compagnia di San Paolo, Torino, Italy.

REFERENCES

- Antognelli, C., Gambelunghe, A., Muzi, G., and Talesa, V. N. (2016). Glyoxalase I drives epithelial-to-mesenchymal transition via argpyrimidine-modified Hsp70, miR-21 and SMAD signalling in human bronchial cells BEAS-2B chronically exposed to crystalline silica Min-U-Sil 5: Transformation into a neoplastic-like phenotype. *Free Radic. Biol. Med.* **92**, 110–125. 10.1016/j.freeradbiomed.2016.01.009.
- Bang, K. M., Mazurek, J. M., Wood, J. M., White, G. E., Hendricks, S. A., and Weston, A. (2015). Silicosis mortality trends and new exposures to respirable crystalline silica - United States, 2001-2010. *MMWR Morb. Mortal Wkly Rep.* **64**, 117–120.
- Bartoli, D., Banchi, B., Di Benedetto, F., Farina, F. A., Iaia, T. E., Poli, C., Romanelli, M., Scancarello, G., and Tarchi, M. (2012). Silicosis in employees in the processing of kitchen, bar and shop countertops made from quartz resin composite. Provisional results of the environmental and health survey conducted within the territory of USL 11 of Empoli in Tuscany among employees in the processing of quartz resin composite materials and review of the literature. *Ital. J. Occup. Environ. Hyg* **3**, 138–143.
- Blanco, D., Vicent, S., Elizegi, E., Pino, I., Fraga, M. F., Esteller, M., Saffiotti, U., Lecanda, F., and Montuenga, L. M. (2004). Altered expression of adhesion molecules and epithelial-mesenchymal transition in silica-induced rat lung carcinogenesis. *Lab. Invest.* **84**, 999–1012. 10.1038/labinvest.3700129.
- Castranova, V. (2004). Signaling pathways controlling the production of inflammatory mediators in response to crystalline silica exposure: role of reactive oxygen/nitrogen species. *Free Radic. Biol. Med.* **37**, 916–925. 10.1016/j.freeradbiomed.2004.05.032.
- Cho, W. S., Duffin, R., Bradley, M., Megson, I. L., MacNee, W., Lee, J. K., Jeong, J., and Donaldson, K. (2013). Predictive value of in vitro assays depends on the mechanism of toxicity of metal oxide nanoparticles. *Part. Fibre Toxicol* **10**, 15. 10.1186/1743-8977-10-55.
- Clouter, A., Brown, D., Hohn, D., Borm, P., and Donaldson, K. (2001). Inflammatory effects of respirable quartz collected in workplaces versus standard DQ12 quartz: particle surface correlates. *Toxicol. Sci.* **63**, 90–98. 10.1093/toxsci/63.1.90.
- Fenoglio, I., Martra, G., Prandi, L., Tomatis, M., Coluccia, S., and Fubini, B. (2000). The role of mechanochemistry in the pulmonary toxicity caused by particulate minerals. *J. Mater. Synth. Process* **8**, 4), 145–153, 10.1023/A.1011303924468.
- Friedman, G. K., Harrison, R., Bojes, H., Worthington, K., and Filios, M. (2015). Notes from the field: silicosis in a countertop fabricator - Texas, 2014. *MMWR Morb. Mortal Wkly Rep.* **64**, 129–130.
- Fubini, B., Giamello, E., Pugliese, L., and Volante, M. (1989). Mechanically induced defects in quartz and their impact on pathogenicity. *Solid State Ionics* **32-3**, 334–343. 10.1016/0167-2738(89)90238-5.
- Fubini, B. (1998a). Health effects of silica. In *The Surface Properties of Silica* (A. P. Legrand, Eds.), pp. 415–464. John Wiley and Sons, Chichester, UK.
- Fubini, B. (1998b). Surface chemistry and quartz hazard. *Ann. Occup. Hyg* **42**, 521–530, 10.1016/s0003-4878(98)00066-0.
- Fubini, B., Bolis, V., Cavenago, A., and Volante, M. (1995a). Physicochemical properties of crystalline silica dusts and their possible implication in various biological responses. *Scand. J. Work Environ. Health* **21**, 9–14.
- Fubini, B., Giamello, E., Volante, M., and Bolis, V. (1990). Chemical functionalities at the silica surface determining its reactivity when inhaled - formation and reactivity of surface radicals. *Toxicol. Ind. Health* **6**, 571–598.
- Fubini, B., Mollo, L., and Giamello, E. (1995b). Free-radical generation at the solid/liquid interface in iron-containing minerals. *Free Radical Res.* **23**, 593–614. 10.3109/10715769509065280.
- Fubini, B., and Hubbard, A. (2003). Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free Radic. Biol. Med.* **34**, 1507–1516. 10.1016/S0891-5849(03)00149-7.
- Gao, Z., Hu, Y., Peng, J., Deng, Z., Liang, G., Jiang, H., and Zhou, J. (2011). ERK signaling pathway mediated epithelial-mesenchymal transition induced by SiO₂ in human bronchial epithelial cells. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* **36**, 1085–1089. 10.3969/j.issn.1672-7347.2011.11.009.
- García Vellido, C., Gómez, J., and Morillo, J. (2011). Silicosis in quartz conglomerate workers. *Arch. Bronconeumol.* **47**, 53.
- Gazzano, E., Ghiazza, M., Polimeni, M., Bolis, V., Fenoglio, I., Attanasio, A., Mazzucco, G., Fubini, B., and Ghigo, D. (2012). Physicochemical determinants in the cellular responses to nanostructured amorphous silicas. *Toxicol. Sci.* **128**, 158–170. 10.1093/toxsci/kfs128.
- Ghiazza, M., Polimeni, M., Fenoglio, I., Gazzano, E., Ghigo, D., and Fubini, B. (2010). Does vitreous silica contradict the toxicity of the crystalline silica paradigm? *Chem. Res. Toxicol.* **23**, 620–629. 10.1021/bx900369x.
- Ghiazza, M., Tomatis, M., Doublier, S., Grendene, F., Gazzano, E., Ghigo, D., and Fubini, B. (2013). Carbon in intimate contact with quartz reduces the biological activity of crystalline silica dusts. *Chem. Res. Toxicol.* **26**, 46–54. 10.1021/bx300299v.
- Guarino, M., Tosoni, A., and Nebuloni, M. (2009). Direct contribution of epithelium to organ fibrosis: epithelial-mesenchymal transition. *Hum. Pathol.* **40**, 1365–1376. 10.1016/j.humpath.2009.02.020.
- Hornung, V., Bauernfeind, F., Halle, A., Samstad, E. O., Kono, H., Rock, K. L., Fitzgerald, K. A., and Latz, E. (2008). Silica crystals

- and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat. Immunol.* 9, 847–856. 10.1038/ni.1631.
- Hu Yong, B., Li Fei, F., Deng Zheng, H., and Pan Pin, H. (2015). Transcriptional factor snail mediates epithelial-mesenchymal transition in human bronchial epithelial cells induced by silica. *Biomed. Environ. Sci.* 28(7), 544–548, 10.3967/bes2015.078.
- Hughes, C. S., Colhoun, L. M., Bains, B. K., Kilgour, J. D., Burden, R. E., Burrows, J. F., Lavelle, E. C., Gilmore, B. F., and Scott, C. J. (2016). Extracellular cathepsin S and intracellular caspase 1 activation are surrogate biomarkers of particulate-induced lysosomal disruption in macrophages. *Part. Fibre Toxicol.* 13, 19–10. 1186/s12989-016-0129-5.
- International Agency for Research on Cancer (IARC) (1997). Silica, some silicates, coal dust and para-aramid fibrils. In *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. Vol 68. IARC, Lyon, France.
- International Agency for Research on Cancer (IARC) (2012). A review of human carcinogens: arsenic, metals, fibres, and dusts. In *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human*. Vol 100C. IARC, Lyon, France.
- Kandare, E., Kandola, B. K., Price, D., Nazare, S., and Horrocks, R. A. (2008). Study of the thermal decomposition of flame-retarded unsaturated polyester resins by thermogravimetric analysis and Py-GC/MS. *Polym. Degrad. Stabil.* 93, 1996–2006, 10.1016/j.polymdegradstab.2008.03.032.
- Knaapen, A. M., Borm, P. J., Albrecht, C., and Schins, R. P. (2004). Inhaled particles and lung cancer. Part A: Mechanisms. *Int. J. Cancer* 109, 799–809. 10.1002/ijc.11708.
- Kramer, M. R., Blanc, P. D., Fireman, E., Amital, A., Guber, A., Rhahman, N. A., and Shitrit, D. (2012). Artificial stone silicosis: Disease resurgence among artificial stone workers. *Chest* 142, 419–424, 10.1378/chest.11-1321.
- Li, L., and Li, W. (2015). Epithelial-mesenchymal transition in human cancer: comprehensive reprogramming of metabolism, epigenetics, and differentiation. *Pharmacol. Ther.* 150, 33–46. 10.1016/j.pharmthera.2015.01.004.
- Liang, D., Wang, Y., Zhu, Z., Yang, G., An, G., Li, X., Niu, P., Chen, L., and Tian, L. (2015). Increased expression of bone morphogenetic protein-7 and its related pathway provides an anti-fibrotic effect on silica induced fibrosis in vitro. *Toxicol. Res.* 4, 1511–1522. 10.1039/c5tx00159e.
- Lu, S. L., Duffin, R., Poland, C., Daly, P., Murphy, F., Drost, E., MacNee, W., Stone, V., and Donaldson, K. (2009). Efficacy of simple short-term in vitro assays for predicting the potential of metal oxide nanoparticles to cause pulmonary inflammation. *Environ. Health Perspect.* 117, 241–247. 10.1289/ehp.11811.
- Margolis, S. V. K., and David, H. (1974). Processes of formation and environmental occurrence of microfutures on detrital quartz grains. *Am. J. Sci.* 274, 449–464.
- Martínez, C., Prieto, A., García, L., Quero, A., González, S., and Casan, P. (2010). Silicosis: a disease with an active present. *Arch. Bronconeumol.* 46, 97–100, 10.1016/j.arbres.2009.07.008.
- Nowrin, K., Sohal, S. S., Peterson, G., Patel, R., and Walters, E. H. (2014). Epithelial-mesenchymal transition as a fundamental underlying pathogenic process in COPD airways: fibrosis, remodeling and cancer. *Expert Rev. Respir. Med.* 8, 547–559. 10.1586/17476348.2014.948853.
- OSHA, NIOSH (2015). Hazard alert: Worker exposure to silica during countertop manufacturing, finishing and installation. Available at: <http://www.cdc.gov/niosh/docs/2015-106/pdfs/2015-106.pdf>. Accessed Feb 5, 2016.
- Øvrevik, J., Refsnes, M., Låg, M., Holme, J. A., and Schwarze, P. E. (2015). Activation of proinflammatory responses in cells of the airway mucosa by particulate matter: oxidant- and non-oxidant-mediated triggering mechanisms. *Biomolecules* 5, 1399–1440. 10.3390/biom5031399.
- Paolucci, V., Romeo, R., Sisinni, A. G., Bartoli, D., Mazzei, M. A., and Sartorelli, P. (2015). Silicosis in workers exposed to artificial quartz conglomerates: does it differ from chronic simple silicosis? *Arch. Bronconeumol.* 51, e57–e60.
- Pascual, S., Urrutia, I., Ballaz, A., Arrizubieta, I., Altube, L., and Salinas, C. (2011). Prevalence of silicosis in a marble factory after exposure to quartz conglomerates. *Arch. Bronconeumol.* 47, 50–51. 10.1016/j.arbres.2010.09.004.
- Pavan, C., Rabolli, V., Tomatis, M., Fubini, B., and Lison, D. (2014). Why does the hemolytic activity of silica predict its pro-inflammatory activity? *Part. Fibre Toxicol.* 11, 76. 10.1186/s12989-014-0076-y.
- Pavan, C., Tomatis, M., Ghiazza, M., Rabolli, V., Bolis, V., Lison, D., and Fubini, B. (2013). In search of the chemical basis of the hemolytic potential of silicas. *Chem. Res. Toxicol.* 26, 1188–1198. 10.1021/tx400105f.
- Polimeni, M., Gazzano, E., Ghiazza, M., Fenoglio, I., Bosia, A., Fubini, B., and Ghigo, D. (2008). Quartz inhibits glucose 6-phosphate dehydrogenase in murine alveolar macrophages. *Chem. Res. Toxicol.* 21, 888–894. 10.1021/tx7003213.
- Pérez-Alonso, A., Córdoba-Doña, J. A., and García-Vadillo, C. (2015). Silicosis: relevant differences between marble workers and miners. *Arch. Bronconeumol.* 51, 53–54.
- Pérez-Alonso, A., Córdoba-Doña, J. A., Millares-Lorenzo, J. L., Figueroa-Murillo, E., García-Vadillo, C., and Romero-Morillos, J. (2014). Outbreak of silicosis in Spanish quartz conglomerate workers. *Int. J. Occup. Environ. Health* 20, 26–32. 10.1179/2049396713Y.0000000049.
- Rong, Y., Shen, Y., Zhang, Z., Cui, X., Xiao, L., Liu, Y., Luo, X., and Chen, W. (2015). Blocking TGF- β expression inhibits silica particle-induced epithelial-mesenchymal transition in human lung epithelial cells. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 40, 861–869. 10.1016/j.etap.2015.09.014.
- Sauvé, J. F. (2015). Historical and emerging workplaces affected by silica exposure since the 1930 Johannesburg conference on Silicosis, with special reference to construction. *Am. J. Ind. Med* 58(Suppl. 1), 67–71. 10.1002/ajim.22507.
- Schins, R. P., Knaapen, A. M., Cakmak, G. D., Shi, T., Weishaupt, C., and Borm, P. J. (2002). Oxidant-induced DNA damage by quartz in alveolar epithelial cells. *Mutat. Res* 517, 77–86.
- Shtraichman, O., Blanc, P. D., Ollech, J. E., Fridel, L., Fuks, L., Fireman, E., and Kramer, M. R. (2015). Outbreak of autoimmune disease in silicosis linked to artificial stone. *Occup. Med. (Lond)* 65, 444–450. 10.1093/occmed/kqv073.
- Steenland, K., and Ward, E. (2014). Silica: a lung carcinogen. *CA Cancer J. Clin.* 64, 63–69. 10.3322/caac.21214.
- Tanjore, H., Xu, X. C., Polosukhin, V. V., Degryse, A. L., Li, B., Han, W., Sherrill, T. P., Plieth, D., Neilson, E. G., Blackwell, T. S., and, et al. (2009). Contribution of epithelial-derived fibroblasts to bleomycin-induced lung fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 180, 657–665. 10.1164/rccm.200903-0322OC.
- Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y., and Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871–890, 10.1016/j.cell.2009.11.007.
- Tomatis, M., Prandi, L., Bodoardo, S., and Fubini, B. (2002). Loss of surface reactivity upon heating amphibole asbestos. *Langmuir* 18, 4345–4350. 10.1021/la011609w.
- Vallyathan, V., Kang, J. H., Van Dyke, K., Dalal, N. S., and Castranova, V. (1991). Response of alveolar macrophages to

- in vitro exposure to freshly fractured versus aged silica dust: the ability of Prosil 28, an organosilane material, to coat silica and reduce its biological reactivity. *J. Toxicol. Environ. Health* 33, 303–315. 10.1080/15287399109531529.
- Vallyathan, V., Shi, X. L., Dalal, N. S., Irr, W., and Castranova, V. (1988). Generation of free radicals from freshly fractured silica dust. Potential role in acute silica-induced lung injury. *Am. Rev. Respir. Dis.* 138, 1213–1219. 10.1164/ajrccm/138.5.1213.
- Wang, X., Xu, D., Liao, Y., Zhong, S., Song, H., Sun, B., Zhou, B. P., Deng, J., and Han, B. (2015). Epithelial neoplasia coincides with exacerbated injury and fibrotic response in the lungs of Gprc5a-knockout mice following silica exposure. *Oncotarget* 6, 39578–39593. 10.18632/oncotarget.5532.
- Yilmaz, M., and Christofori, G. (2009). EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 28, 15–33. 10.1007/s10555-008-9169-0.

Studio Inail sui selettori ad alto flusso

L'Inail ha effettuato uno studio di valutazione delle caratteristiche di tre campionatori personali di polveri respirabili ad alto flusso di aspirazione (>4 L/min), finalizzata alla scelta di un modello da utilizzare nei monitoraggi ambientali per l'accertamento del rischio silicosi ai fini assicurativi Inail, in sostituzione del modello tipo Higgins-Dewell a basso flusso (2,2 L/min) attualmente in uso.

Un maggiore flusso di aspirazione aumenta il volume d'aria campionata e quindi accresce la massa di polvere raccolta, migliorando di conseguenza l'affidabilità delle misure diffrattometriche di SLC.

In tale prospettiva, sono stati pre-selezionati tre selettori di polveri respirabili, fra quelli ad alto flusso disponibili sul mercato (Fig. 1):

- CIP-10R, campionatore francese che utilizza spugne come substrato di raccolta, con flusso 10 L/min;
- FSP-10, ciclone tedesco che utilizza filtri da 37 mm di diametro, con flusso 11,2 L/min;
- GK-2.69, ciclone statunitense che utilizza filtri da 37 mm di diametro, con flusso 4,4 L/min.

Bisogna evidenziare che i valori del flusso sopra riportati per i due cicloni non sono quelli indicati dai costruttori, ma quelli proposti dal Niosh americano e dall'HSL inglese per ottenere il minor scarto fra la curva di efficienza dei campionatori e la curva di efficienza della convenzione respirabile UNI EN 481 (Lee et al, 2010; Stacey et al, 2014).

Parallelamente alla sostituzione del selettore, altri elementi del sistema di misura devono essere sostituiti, per es. il substrato di raccolta della polvere, la pompa per il campionamento personale e il metodo analitico di laboratorio. Per il prelievo della polvere con i cicloni FSP-10 e GK-2.69 abbiamo scelto di testare i classici filtri in PVC, con diametro 37 mm e porosità 5 μ m. Con il campionatore CIP-10R è invece necessario l'utilizzo di spugne poliuretatiche.

I tre selettori sono stati valutati rispetto ai seguenti criteri:

- minimo scarto fra curva di efficienza del selettore e convenzione respirabile;

- campionamento: facilità di utilizzo, comfort del lavoratore, minime interferenze con le normali attività di lavoro, robustezza;
- minima laboriosità della procedura di preparazione dei campioni per l'analisi DRX
- minima durata dell'analisi DRX e massima riduzione del limite di quantificazione del metodo analitico DRX;
- estensione del range di misura, miglioramento dell'incertezza estesa (relativa all'insieme campionamento + analisi) per il rispetto (o la migliore approssimazione ottenibile) dei requisiti normativi della UNI 482.

In riferimento ai criteri sopra elencati, alla luce delle evidenze ad oggi raccolte, si è dell'avviso che la miglior scelta adottabile ricada sul selettore FSP-10, utilizzato ad una portata di campionamento di 11,2 L/min.

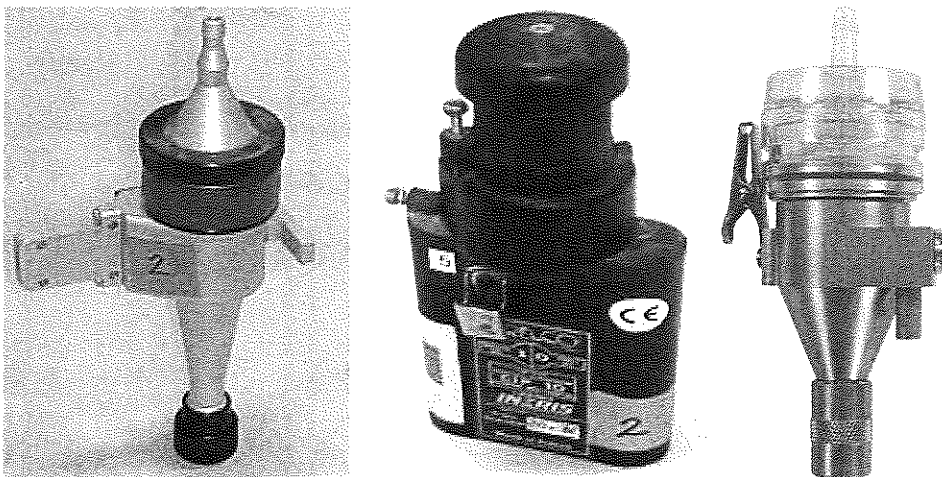
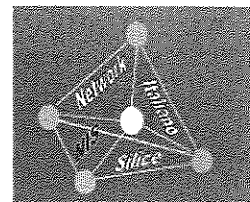


Figura 1. Selettori ad alto flusso di aspirazione oggetto della sperimentazione Contarp. A) FSP-10. B) CIP-10R. C) GK-2.69.

A cura di:

Fulvio Ferri (coordinatore), Antonio Barboni, Maria Cabona, Fabio Capacci, Francesco Carnevale, Marta Clemente, Renato Di Rico, Andrea Innocenti, Rita Leonori, Anna Maria Loi

Si ringraziano per la collaborazione Rossana Astengo, Enrica Crespi, Giuseppe Giubbarelli



INDICAZIONI PER LA SORVEGLIANZA SANITARIA DEI LAVORATORI ESPOSTI A SILICE LIBERA CRISTALLINA (SLC)

Breve premessa

Come noto, l'esposizione a polveri inorganiche è causa di pneumopatie interstiziali croniche, note come pneumoconiosi, caratterizzate da infiammazione e fibrosi progressiva. Tra gli agenti inorganici più frequentemente responsabili di pneumoconiosi compare la SLC, oltre al carbone e l'asbesto.

L'esposizione a polveri è inoltre responsabile di broncopneumopatie croniche, patologie molto diffuse nella popolazione in quanto legate a molteplici fattori di rischio, non solo occupazionali.

La SLC è classificata agente cancerogeno certo dalla IARC (IARC 2009) e, sebbene questa classificazione sia stata contestata da alcuni, nessuno ormai mette in dubbio l'associazione tra silicosi e cancro del polmone (Piolatto, 2011).

Non si deve ignorare l'associazione tra esposizione a silice (con o senza silicosi) e malattie autoimmuni come il lupus, l'artrite reumatoide (sindrome di Caplan), la sclerodermia (sindrome di Erasmus), le vasculiti e le nefropatie (Parks 1999, Rapiti 1999, Steenland 2001, Ghahramani 2010, Otsuki 2011, Teixeira Moreira Almeida 2012). Quadri polmonari di sarcoidosi sono variamente correlati con la silice, sia in termini eziologici (sarcosilicosi) che per problemi di diagnosi differenziale (Rafnsson 1998).

Infine, in silicotici l'infezione tubercolare ha frequenza e gravità maggiore ed un eccesso di rischio tubercolare è segnalato in soggetti lungamente esposti a silice, anche in assenza di silicosi (ATS, 1997).

Nei box che seguono, è riportato il protocollo sanitario consigliato dal NIS. Di questo protocollo si vuole sottolineare lo sforzo di rispondere all'esigenza non più procrastinabile di passare da una sorveglianza sanitaria di screening ad una medicina del lavoro orientata alla prevenzione e fondata sull'evidenza, che si fondi sulla esatta conoscenza dei luoghi di lavoro, del rischio d'esposizione e del rapporto esposizione/danno, non sulla semplice rilevazione del pericolo, e che abbia come obiettivo la sistematica raccolta, valutazione e confronto di dati riguardanti la salute dei lavoratori e sia associata ad azioni atte a ridurre i rischi. Per tali motivi si ritiene fondamentale sottolineare la necessità che la cartella sanitaria e di rischio con la notazione di tutti gli accertamenti diagnostici integrativi effettuati e le valutazioni delle esposizioni, segua sempre il lavoratore.

Nel testo che segue, oltre ad esporre il rationale del protocollo proposto, si affrontano alcune questioni controverse relative alla sorveglianza sanitaria dei lavoratori a rischio di esposizione a SLC, quali il registro degli esposti, la sorveglianza degli ex esposti e la valutazione del rischio in condizioni di elevata variabilità delle esposizioni.

BOX 1. Assunzione in attività che espongono a SLC

| Accertamento | Note |
|----------------------------|---|
| visita medica | verifica clinico-anamnestica dell'assenza di TBC e malattie reumatiche/autoimmuni in atto |
| Rx torace sec. ILO/BIT (*) | per esposizione > 25 µg/m ³ (*) o per esposizione pregressa consistente per intensità e durata |
| spirometria | completa di VR e DLCO (*) |

(*) probabilità di superamento del valore d'esposizione > 0,1% (in conformità alla norma UNI EN 689)

(*) Se non disponibili analoghi accertamenti eseguiti negli ultimi 3 anni

BOX 2. Visite periodiche (per attuali esposti)

| Accertamento | Periodicità | note |
|----------------------------|--|---|
| visita medica | annuale | verifica clinico-anamnestica dell'assenza di TBC e di malattie reumatiche/autoimmuni in atto |
| PFR (spirometria semplice) | annuale o biennale, a giudizio del medico competente | |
| Rx torace sec. ILO/BIT | 5 anni | Esposizione di durata complessiva < a 20 anni con intensità attuale e pregressa compresa tra 25 e 50 µg/m ³ Livelli di esposizione attuali o pregressi anche superiori a 50 µg/m ³ (*), ma con dose cumulata stimata < 1 mg/m ³ /anno (^) |
| RX torace sec. ILO/BIT | 2 anni | Rischio di esposizione >100 µg/m ³ (es. per scarsa garanzia di aderenza a corrette procedure di lavoro) Pregressa esposizione elevata e/o prolungata: - esposizione > 20 anni - intensità stabilmente superiori a 50 µg/m ³ - ricostruzioni della esposizione pregressa dubbie in comparti a rischio (ad esempio, in edilizia) - stima dell'esposizione cumulata > 1 mg/m ³ /anno (^) |

(*) probabilità di superamento del valore d'esposizione > 0,1% (in conformità alla norma UNI EN 689)

(^) Una esposizione cumulata di 1 mg/m³/anno corrisponde ad una condizione di esposizione ponderata giornaliera pari a 50 µg/m³ protrattasi per 20 anni di lavoro (oppure a 100 µg/m³ per 10 anni , ...)

La diagnosi precoce di pneumoconiosi

Lo standard ILO-BIT per l'esecuzione e la classificazione delle immagini radiografiche delle pneumoconiosi è l'unico riconosciuto internazionalmente; una diagnosi di pneumoconiosi può considerarsi sufficientemente documentata, almeno in prima battuta, se viene corredata

- da una coerente e documentata anamnesi lavorativa che confermi una pregressa e consistente (intensità per durata) esposizione a polveri pneumoconiogene;

- da un quadro radiologico ottenuto mediante una radiografia, eseguita ed interpretata secondo i criteri ILO-BIT, che documentino una profusione delle opacità $\geq 1/0$, avendo ragionevolmente escluso altre patologie in grado di produrre opacità analoghe (es. granulomatosi polmonari come la sarcoidosi).

Per quanto concerne i casi con quadro radiografico ILO-BIT 0/1, la loro interpretazione è fortemente correlata al contesto espositivo ed alle finalità: nel caso in cui interessi incrementare la sensibilità della diagnosi, come quando l'indagine si pone obiettivi di prevenzione in condizioni di esposizione elevata, è senz'altro opportuno considerare il significato epidemiologico anche di questa categoria. Nel caso, invece si prediliga la specificità dell'esame diagnostico, come ad esempio quando si opera in contesti a bassa esposizione e con finalità assicurative o giudiziarie, è indicato ricorrere alla diagnosi di silicosi per categorie ILO-BIT 1/0 o superiori. È opportuno che anche i casi 0/1 siano seguiti nel tempo, verificando l'impiego di misure di prevenzione, ma non si ritiene opportuno redigere il 1° certificato di malattia professionale.

Come indicatore precoce di danno, all'interno del programma di controllo si utilizzeranno test di funzionalità respiratoria, indispensabili anche a fini assicurativi, poiché una RX positiva in fase iniziale, in assenza di danno funzionale non dà luogo a indennizzo. Sulle modalità di valutazione della spirometria non ci si può limitare ad un'analisi "trasversale" basata sul solo confronto con i valori di riferimento misurati in soggetti sani. Le spirometrie ripetute periodicamente devono permettere soprattutto una valutazione longitudinale delle modificazioni della funzione ventilatoria nel tempo e per questo motivo abbiamo già richiamato l'importanza che i referti spirometrici, assieme alla cartella sanitaria, seguano il lavoratore nei successivi controlli (Innocenti 2011). Non è giustificata l'esecuzione di spirometrie di controllo con periodicità inferiore ad 1 anno.

L'affidabilità di una diagnosi di pneumoconiosi, soprattutto se in fase iniziale, basata sulla lettura di immagini radiografiche del torace secondo criteri ILO-BIT è al momento da considerare l'esame di elezione. Il ricorso sempre più diffuso alla radiografia digitale, ha spinto ILO a predisporre una versione digitalizzata del suo standard, pubblicato nel novembre 2011 ed utilizzabile in diagnostica digitale (NIOSH, 2011).

La tomografia computerizzata ad alta risoluzione (HRCT) non sembra garantire migliori risultati rispetto ad una lastra convenzionale di buona qualità. Sebbene sia disponibile un documento di *consenso* per l'interpretazione delle immagini HRCT (Kusaka, 2005), questo non ha ancora ottenuto l'approvazione dell'ILO; l'alto costo, l'esposizione a dosi più elevate di radiazione, seppure associate alla maggiore sensibilità dell'HRCT rispetto alla radiografia nell'individuare altre alterazioni, quali l'enfisema, ne sconsigliano l'utilizzo, se non nel caso di diagnosi differenziale dubbia con altre patologie.

In ambito di sorveglianza sanitaria, è dunque da preferire l'esame radiografico che presenta un'esposizione a minori dosi di radiazioni ed è meno costoso.

Per la sorveglianza sanitaria, è dunque da preferire l'esame radiografico, più sensibile, con minori dosi di radiazioni, meno costoso. Si consideri tuttavia, che anche questo esame, pur nelle migliori condizioni di esecuzione e nelle mani dei migliori B-Reader, può dare un buon numero di *falsi negativi* nelle fasi iniziali della pneumoconiosi, come segnalato in contesti con rischio d'esposizione ad elevata intensità (Hnizdo, 1993b).

La sorveglianza sanitaria in rapporto alle concentrazioni di SLC aerodispersa

Il Datore di Lavoro, identificata la presenza del *pericolo* silice nel luogo di lavoro, è tenuto a valutare l'esposizione per gli addetti. Rispetto ad altri fattori di rischio, la silice pone problemi particolari legati alla sua natura di agente chimico pericoloso al quale autorevoli

istituti di ricerca (IARC, NIOSH, ACGIH ed altri) hanno attribuito anche potere cancerogeno. A tale riconoscimento si oppongono alcuni autori ed associazioni scientifiche che mettono in discussione, non tanto il potere cancerogeno, quanto la definizione del meccanismo d'azione che considerano solo di tipo indiretto, cioè mediato dalle lesioni silicotiche.

Conseguenza di questa discussione scientifica è che in Europa ed in Italia non è stato adottato nessuno tra i differenti valori limite d'esposizione proposti dalle diverse fonti tecniche e scientifiche. In applicazione delle norme di prevenzione vigenti, il Datore di Lavoro deve pertanto osservare il principio generale per la prevenzione dei rischi da agenti chimici (art 224 dlgs 81/08), che impone la riduzione al minimo della durata e dell'intensità dell'esposizione; lo stesso principio, sia pure espresso con diverse parole, lo si ritrova anche all'art. 237 del dlgs 81/08 a proposito di misure tecniche, organizzative e procedurali da adottarsi per la prevenzione del rischio da agenti cancerogeni e mutageni: il Datore di Lavoro deve fare in modo che non vi sia emissione di agenti cancerogeni o mutageni nell'aria o, se ciò non è tecnicamente possibile, assicura l'eliminazione degli agenti cancerogeni o mutageni il più vicino possibile al punto di emissione e garantisce un adeguato sistema di ventilazione generale. In assenza di un VLP definito per legge, difficilmente potranno essere giustificati in futuro, soprattutto in caso di contenzioso giudiziario in ambito di danno professionale, interventi che non siano orientati al rispetto del più cautelativo fra i VLP, autorevolmente proposto nel 2006 dall'ACGIH proprio con lo scopo di eliminare il rischio silicosi e pari a $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$. A motivazione di tale scelta l'ACGIH richiama studi di follow up su ex esposti a $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (ACGIH, 2006), tra i quali il rischio di pneumoconiosi risulta ancora gravato da una probabilità, superiore al 5%, di sviluppare la silicosi a distanza di anni dalla fine dell'esposizione.

Nelle condizioni di lavoro nelle quali sussiste un rischio di esposizione a polvere respirabile di SLC superiore a $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$, resta dunque confermata la necessità di mantenere il controllo sanitario degli esposti integrato da esami funzionali dell'apparato respiratorio e, se ricorrono indicazioni cliniche, da test ed esami reumatologici. Tra 25 e $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$, su giudizio del medico competente, la periodicità dell'esame RX del torace può essere mantenuta quinquennale anche dopo 20 anni d'esposizione con analoghe caratteristiche. Al di sotto di questo valore d'esposizione ponderata il controllo radiografico per la ricerca della silicosi è da considerarsi non giustificato, anche sulla base dei principi della radioprotezione (Picano, 2008).

Frequenza degli esami radiografici del torace in rapporto alle condizioni di esposizione attuale e/o cumulata

La successione degli esami radiografici del torace indicata dal documento NIS del 2005 sul modello di quella proposta da OSHA (AAVV, 2005) prevedeva un esame all'assunzione e poi una periodicità di 5 anni fino a 20 anni d'esposizione e di 2 anni oltre i 20 anni d'esposizione.

Il Medico Competente, nell'applicazione ragionata del protocollo, deve necessariamente tenere in considerazione *l'esposizione cumulata*, parametro strettamente correlato con il rischio d'insorgenza della silicosi. Secondo alcuni Autori, un'esposizione cumulata di $2 \text{ mg}/\text{m}^3/\text{anno}$ di SiO_2 (frazione respirabile) (equivalente, ad esempio, ad un'esposizione ponderata di $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ per 40 anni oppure $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$ per 20 anni), produce comparsa di silicosi (ILO=>1/1) nel 5% circa degli esposti (Hnizdo, 1993a). Altri stimano la comparsa di silicosi (ILO 2/1) nello 0,5% degli esposti per 15 anni a $40 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (pari $0,6 \text{ mg}/\text{m}^3/\text{anno}$ di esposizione cumulata), valutati a distanza di 15 anni dalla cessazione dell'esposizione (Buchanan, 2003).

All'assunzione, se si tratta di soggetti giovani (età < 30 anni), senza precedenti esposizioni a fattori di rischio pneumoconigeno, clinicamente negativi per malattie polmonari ed in assenza di indicazioni anamnestico-epidemiologiche che prospettino un rischio endemico tubercolare, non trova indicazione l'esecuzione di esame radiografico.

Un'esposizione attorno a $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ all'inizio della storia lavorativa di un giovane operaio, non giustifica una frequenza di esami radiografici più ravvicinata di quella quinquennale in quanto si violerebbe il principio di giustificazione radioprotezionistica. Tuttavia in alcuni comparti produttivi (edilizia, miniere, lapidei, scavo gallerie, ecc.) o particolari lavorazioni (sabbatura, quarzature di pavimenti industriali, ristrutturazioni edili con demolizioni, e tracciature di pareti o pavimenti in edilizia) è documentata la possibilità di esposizioni molto elevate e concentrate nel tempo, tali da provocare, in assenza di adeguati provvedimenti di prevenzione, la comparsa di silicosi precoce (5-10 anni) ad evoluzione accelerata (CDC, 2002).

È indispensabile che il Medico Competente disponga dei dati di esposizione riferibili alle mansioni svolte, derivati da attendibili misure o da valutazioni per analogia su dati "di letteratura" o banche dati, oltre che da una buona conoscenza dell'effettiva *compliance* dell'azienda e dei lavoratori alle buone prassi di prevenzione, in modo da poter ricostruire con adeguata affidabilità l'esposizione cumulata e la rapidità con cui la "dose" si è cumulata e, in base ad essa, stabilire la frequenza degli accertamenti radiografici (Buchanan, 2003).

Controlli radiografici a scadenza più ravvicinata di quella quinquennale sono consigliabili, oltre che per chi ha un'anzianità lavorativa superiore a 20 anni, anche per:

- i lavoratori che, in modo documentato, possono aver maturato una esposizione cumulata $\geq 1 \text{ mg}/\text{m}^3/\text{anno}$ prima di 20 anni d'esposizione;
- i lavoratori che possono essersi trovati, anche in modo e frequenza non noti, in presenza di massivi livelli di inquinamento aereo ($>300 - 400 \mu\text{g}/\text{m}^3$) e in condizioni di carente o dubbia protezione personale.

Condizioni come quelle sopra descritte, se ancora attuali, dovrebbero ovviamente essere oggetto di immediato intervento ed adozione di misure di prevenzione. L'intensificazione della sorveglianza sanitaria non può in nessun caso costituire alibi al mantenimento o, peggio, alla giustificazione di un'esposizione superiore ai limiti previsti.

Resta da considerare l'ipotesi del rischio cancerogeno diretto, cioè non correlato esclusivamente alle lesioni silicotigene; in questa ipotesi, anche il valore di $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$, sebbene molto basso e spesso neppure facile da monitorare, potrebbe non assicurare completa protezione. In molti settori vi è difficoltà oggettiva ad eliminare il rischio d'esposizione alla frazione respirabile della SLC presente in prodotti o che si libera in corso di lavorazioni. Esempi di questo tipo sono tanto le attività estrattive che l'edilizia. In questi casi si deve condividere la proposizione teorica già adottata per altri cancerogeni, come ad esempio nel sistema di radioprotezione e nell'esposizione a polveri di legno, dell'assunzione di valori limite d'esposizione il cui rispetto induca un miglioramento certo rispetto alla realtà di molte situazioni lavorative e sia tanto basso da garantire una riduzione del rischio cancerogeno a livelli tali da rendere improbabile la rilevazione di eccessi di rischio nel confronto epidemiologico con popolazioni non professionalmente esposte (ICRP, 1991). Il valore ACGIH pari $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$ sembra rispondere a tali requisiti.

In queste condizioni d'esposizione, si conferma quanto sopra affermato e cioè che NON è appropriato ricorrere ad esami radiografici di controllo, ingiustificati sia dal punto di vista diagnostico che radioprotezionistico. Se dunque i dati di esposizione durante lavorazioni a rischio silice sono stati raccolti in modo corretto (cioè durante le fasi di lavorazioni più polverose e con metodologie di campionamento e di analisi adeguate) ed attestano, secondo i *metodi* proposti dalla Norma UNI EN 689 / 97, un livello d'esposizione inferiore

a $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$ con una probabilità di superamento inferiore allo 0,1%, non vi sono motivi per continuare il controllo radiografico in relazione ad un rischio silice attuale.

Il problema degli ex esposti a SLC

Nei casi con documentate, pregresse e protratte esposizioni a SLC, che abbiano determinato un'esposizione cumulativa elevata, ipotizzabile pari o superiore a $2 \text{ mg}/\text{m}^3/\text{anno}$, è opportuno che il controllo radiografico sia mantenuto, con periodicità almeno quinquennale, tramite opportuni programmi di sorveglianza sanitaria. Se esiste un rischio d'esposizione attuale, anche molto contenuta ($<25 \mu\text{g}/\text{m}^3$), gli accertamenti dovranno essere svolti a cura del Datore di Lavoro tramite il proprio medico competente. Infatti, non si può escludere la possibilità che, in relazione alla precedente esposizione, anche quella attuale, ancorché debole, possa influire sul decorso di una pneumoconiosi già in corso di sviluppo. Anche in questi casi, dunque, l'obbiettivo della sorveglianza sanitaria con RX del torace rimane la silicosi, che può manifestarsi e progredire a distanza di anni dalla cessazione dell'esposizione. La radiografia del torace e gli altri accertamenti di diagnostica per immagini (TC, HRCT), non trovano al momento indicazione come screening tumorale; la loro effettuazione, infatti, ha dimostrato efficacia molto limitata in popolazioni con esposizione e rischi contenuti a fronte di un elevato costo e di possibili effetti dannosi e, per questo, non rispetta i principi di ottimizzazione e giustificazione delle dosi in radioprotezione. Secondo recenti indicazioni, la TC a basse dosi può essere indicata come screening solo in forti fumatori (30 pacchetti/anno) di oltre 55 anni di età e fino ai 74 – 79 anni, o in forti fumatori che abbiano cessato da meno di 15 anni, senza però dimenticare che, anche in gruppi ad alto rischio, i falsi positivi sono di gran lunga più frequenti dei noduli maligni (Tramma 2012).

Il Medico Competente che si trovi a visitare un lavoratore precedentemente esposto a silice in altra azienda, qualora le condizioni di lavoro consentano di escludere una esposizione attuale, non è tenuto ad assicurare tramite il nuovo Datore di Lavoro, i controlli sanitari in rapporto alla pregressa esposizione. È invece opportuno che segnali al Medico Curante la pregressa esposizione, informandolo del rischio che si possano sviluppare una pneumoconiosi o altre patologie correlabili alla silice, indicando le modalità per un monitoraggio periodico del paziente come ex esposto e l'opportunità di tenere conto della pregressa esposizione a silice, specialmente nell'eventualità di dover affrontare quadri diagnostici dubbi (sarcoidosi e malattie autoimmuni, in particolare renali). Analoga segnalazione può essere fatta ai Servizi di Prevenzione nei luoghi di lavoro delle ASL che, possano offrire o coordinare prestazioni ambulatoriali specialistiche nei confronti di lavoratori, compresi gli ex esposti, come ad esempio in Toscana.

Esposizione a SLC ad alta variabilità

Il monitoraggio di esposizioni a silice caratterizzate da condizioni di lavoro molto variabili, come accade in edilizia, è impresa non banale e la conduzione di indagini ambientali attendibili e rigorose è complessa, lunga e costosa, difficilmente adatta alla mobilità dei cantieri ed a piccole aziende artigiane.

Sebbene l'attuale normativa sulla protezione dei lavoratori da agenti chimici pericolosi e, ancor più, da agenti cancerogeni e mutageni, non incoraggi all'uso di stime dei livelli di esposizione senza misure dirette dell'inquinamento ambientale, sarebbe tuttavia auspicabile, nelle particolari condizioni descritte, il ricorso a valutazioni di rischio per analogia con diverse tipologie d'attività lavorative, tramite l'uso di banche dati delle esposizioni alla cui costruzione anche il Servizio Pubblico dovrebbe dare un autorevole

contributo. Le microaziende potrebbero così orientare direttamente le loro azioni preventive verso l'applicazione di buone pratiche per contenere i livelli delle esposizioni piuttosto che verso il monitoraggio di condizioni di rischio già note, orientando semmai la misura delle esposizioni attuali alla verifica dell'efficacia di misure tecniche di abbattimento delle polveri adottate, in particolare se innovative ed originali.

In tutte queste condizioni, nelle quali è difficile valutare il rischio nonostante sia sicuramente presente, vale il principio secondo cui i lavoratori sono da considerare sempre esposti, salvo prova del contrario; tale prova si dovrà basare non solo su affidabili analisi sull'inquinamento ambientale da polveri di silice, ma anche sulla dimostrata applicazione di corrette procedure di lavoro, sulla scelta, ove possibile, di materiali esenti da silice, sull'uso costante di utensili aspirati, di procedure e strumenti per l'umidificazione, sull'impiego abituale di DPI nelle lavorazioni a rischio. Solo l'applicazione di tutte queste condizioni può permettere di considerare "contenuti" i livelli di rischio residuo.

Esposti a SLC e registro cancerogeni

L'Unione Europea e l'Italia non hanno ancora formalmente classificato la SLC fra gli agenti cancerogeni, non tanto per una non condivisione di tale valutazione, ma per la pressione di lobbies che temono in particolare i futuri risvolti assicurativi di questa scelta e per la difficoltà nel concordare un valore limite. A fronte di queste difficoltà le parti sociali hanno privilegiato un accordo per il contenimento delle esposizioni, affidandone la realizzazione, peraltro volontaria, alle aziende stesse ed il controllo ad un network europeo denominato NEPSI. Secondo tale accordo, è necessario un impegno serrato da parte di tutti i soggetti coinvolti sul tema della prevenzione, contro il rischio "silicosi", impegno che risulterà efficace nel ridurre anche il rischio "cancerogeno" ad essa correlato.

Rispetto alla normativa italiana, la SLC risponde ai criteri per la classificazione nelle categorie cancerogene 1 o 2, stabiliti ai sensi del dlgs 3 febbraio 1997 n. 52 e s.m. e pertanto risponde alla definizione di agente cancerogeno contenuta nell'art. 234 del dlgs 81/08. Nessuno oggi mette in dubbio che, almeno quando l'esposizione a SLC è tale da comportare un rischio di silicosi, è presente anche il rischio di cancro né sarebbe possibile ignorare la classificazione IARC della SLC come cancerogena, valutazione concorde con quelle del NIOSH, dell'ACGIH e di altri enti ed istituti di ricerca ed approfondimento. Il Medico Competente non può ignorare queste informazioni nell'onorare il suo obbligo di informare compiutamente i lavoratori sui rischi professionali, nel rispetto della norma e del codice ICOH per la salvaguardia della loro salute ed è anche tenuto ad informare il Datore di Lavoro dei rischi, anche cancerogeni, legati all'esposizione a silice e di conseguenza a promuovere le misure di prevenzione appropriate e gli adeguati protocolli di sorveglianza sanitaria, d'informazione e di formazione dei lavoratori.

Il Datore di Lavoro potrebbe non condividere l'applicazione di misure specifiche per gli agenti cancerogeni, non considerando la silice classificata nella normativa di riferimento e, in conseguenza, ritenersi esonerato dagli obblighi specifici, come l'istituzione del registro degli esposti. In considerazione dei diversi orientamenti su questo tema, anche fra gli stessi operatori dell'area dei Servizi della Prevenzione, è essenziale che, indipendentemente dalla presenza del registro, il Datore di Lavoro adotti tutte le misure idonee alla prevenzione del rischio da SLC indicate e suggerite anche dal Medico Competente, che risultano in buona sostanza protettive anche nei confronti del rischio cancerogeno.

In ogni caso le Aziende ed i Medici Competenti sono tenuti, ai sensi dell'art. 160 del DPR 1124/65, ad istituire e conservare l'elenco nominativo degli esposti a SLC soggetti a specifico protocollo sanitario.

BIBLIOGRAFIA

- ACGIH - **Silica, Crystalline: α -Quartz and Cristobalite: TLV[®] Chemical Substances 7th Edition Documentation**, Publication # 7DOC-743 (2006)
- American Thoracic Society (ATS). **Adverse effects of crystalline silica exposure**. Am J Respir Crit Care Med 1997;155:761-765
- AA.VV. **Sorveglianza sanitaria ed accertamenti diagnostici sugli esposti a silice**, in LINEE GUIDA NELL'ESPOSIZIONE A SILICE LIBERA CRISTALLINA a cura di Regione Toscana, Lavoro e Salute, Network Italiano Silice, Coordinamento Regioni-ISPEL-ISS-INAIL, Ed. Regione Toscana, Dicembre 2005
- Buchanan D, Miller BG, Soutar CA **Quantitative relations exposure to respirable quartz and risk of silicosis** Occup Environ Med 2003; 60:159-164
- CDC - Centers for Disease Control, DHHS(NIOSH) **Silicosis in sandblasters** – Publication Number 2002-105 (June 2002)
- Cherry NM e Al. **Crystalline silica and risk of lung cancer in the potteries** Occup Environ Med 1998; 55:779-785
- Ghahramani N. **Silica Nephropathy**. IJOEM (www.tkeijoem.com) 2010; 1,3:108-115
- Hnidzo E, Sluis-Cremer GK e Al. - **Risk of silicosis in a cohort of white south african gold miners**. Am J Ind Med 1993a;24:447-457
- Hnidzo E, Murray J e Al. - **Correlation between radiological and pathological diagnosis of silicosis: an autopsy population based study**. Am J Ind Med 1993b;24,4:427-45
- IARC. **Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. A Review of Human Carcinogens. Part C: Arsenic, Metals, Fibres, and Dusts**. Volume 100C, Lion 2009
- ICRP **Publication 60. Recommendations of the International Commission on Radiological Protection**. Annals of the ICRP 1991; 21,1-3 (edizione italiana a cura di ENEA DISP)
- Innocenti A, Quercia A, Roscelli F. **Appunti di spirometria per la sorveglianza sanitaria dei lavoratori e dei fumatori**. Seconda edizione a cura delle AUSL di Viterbo, Pistoia, e Parma. Viterbo 2011
- International Labour Office, Occupational Safety and Health Series - No. 22 - **Guidelines for the Use of the ILO International Classification of Radiographs of Pneumoconioses. Revised Edition 2011** – Geneva 2011
- Kusaka Y, Hering KG, Parker JE. **International classification of HRCT for occupational and environmental respiratory disease**. Springer editore, 2005
- Manzari G. e Al. **Controllo di qualità tecnica sui radiogrammi del torace effettuati per la sorveglianza sanitaria dei lavoratori esposti al rischio dai pneumoconiosi: proposta di un metodo di screening qualitativo**. Med Lav 2003; 2: 242-249
- Mirabelli D. **Stima del numero di lavoratori esposti a cancerogeni in Italia, nel contesto dello studio europeo CAREX**. Epidemiologia e Prevenzione 1999; 23: 346-59
- NIOSH. **Guideline: Application of Digital Radiography for the Detection and Classification of Pneumoconiosis**. Draft – For review and comment only – January 4, 2011
- NIOSH. **Hazard Review: Health Effects of Occupational Exposure to Respirable Crystalline Silica** - DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES - Centers for Disease Control and Prevention - National Institute for Occupational Safety and Health April 2002

Otsuki T, Hayashi H, Nishimura Y, Hyodo F, Maeda M, Kumagai N, Miura Y, Kusaka M, Uragami K. **Dysregulation of autoimmunity caused by silica exposure and alteration of Fas-mediated apoptosis in T lymphocytes derived from silicosis patients.** Int J Immunopathol Pharmacol 2011; 24 (1 suppl):1S-16S

Parks CG, Conrad K, Cooper GS, **Occupational exposure to crystalline silica and autoimmune disease.** Env Health Persp 1999; 197, suppl. 5:793-802

Picano E. - **Rischio-beneficio nella diagnostica per immagini: impatto dell'utilizzo di radiazioni ionizzanti** G Ital Cardiol 2008;9,12:808-814

Piolatto G, Pira E. **The opinion of the italian society of occupational medicine and industrial hygiene (SIMLII) on silica-exposure and lung cancer risk.** Med Lav 2011;102,4:336-342

Rafnsson V, Ingimarsson O, Hjalmarsson I, Gunnarsdottir H. **Association between exposure to grystalline silica and risk of sarcoidosis.** Occup Environ Med 1998;55:657-660

Rapiti E, Sperati A, Miceli M, Forastiere F, Di Lallo D, Goldsmith DF, **End-stage renal disease among silica exposed ceramic workers.** Occup Environ Med 1999;56:559-561

SCOEL - **Recommendation from Scientific Committee on Occupational Exposure Limits (SCOEL) for Silica, Crystalline (respirable dust)** SCOEL SUM Doc 94-final on respirable crystalline silica (June 2003)

Steenland K, Sanderson W, Calvert GM. **Kidney disease and arthritis in a cohort study of workers exposed to silica.** Epidemiology 2001;12,4:405-12

Teixeira Moreira Almeida M do S. **Scleroderma lung disease – Other lung complications in systemic sclerosis.** Rheumatology, 2012 (on line)

Tramma S, Storey E, Weissman D. **Lung cancer screening in the occupational setting – an update.** CDC 24/7 NIOSH Science Blog

UNI EN 689, **Atmosfera nell'ambiente di lavoro. Guida alla valutazione dell'esposizione per inalazione a composti chimici ai fini del confronto con i valori limite e strategia di misurazione**

In data 27.12.2017 è stata pubblicata sulla Gazzetta Ufficiale della Comunità Europea la Direttiva 2017/2398 che emenda la direttiva comunitaria sugli agenti cancerogeni (2004/37/EC).

In data 27.12.2017 è stata pubblicata sulla Gazzetta Ufficiale della Comunità Europea la Direttiva 2017/2398 che emenda la direttiva comunitaria sugli agenti cancerogeni (2004/37/EC).

La nuova direttiva ribadisce alcuni principi cardine già presenti nella precedente ed introduce alcuni elementi di novità.

Nelle premesse viene ribadito che il rispetto degli Occupational Exposure Level (OEL) riportati nell'allegato III non esime dall'applicazione degli altri obblighi previsti.

Sugli aspetti generali viene modificato l'articolo 14 ed in particolare il paragrafo 1 viene sostituito con: *"The Member States shall establish, in accordance with national law or practice, arrangements for carrying out relevant health surveillance of workers for whom the results of the assessment referred to in Article 3(2) reveal a risk to health or safety. The doctor or authority responsible for the health surveillance of workers may indicate that health surveillance must continue after the end of exposure for as long as they consider it to be necessary to safeguard the health of the worker concerned"*. Si valorizza pertanto il ruolo della sorveglianza sanitaria nella valutazione e gestione del rischio e attribuisce al medico competente (figura a cui è affidata dalla nostra normativa la sorveglianza sanitaria) la valutazione sull'efficacia – nei singoli processi di lavoro – della stessa sorveglianza sanitaria negli esposti e sulla susseguente necessità di attivarla. Rimane non chiarito a chi eventualmente risulti il carico.

Nello specifico vengono indicati 14 nuovi OEL, alcuni riguardanti sostanze o processi di nuova introduzione, altri modifiche di precedenti OEL.

In particolare viene modificato l'Occupational Exposure Level per la polvere di legni duri che passa da 10 mg/m^3 a 2 mg/m^3 con un OEL temporaneo (sino al 2023) di 3 mg/m^3 . La direttiva prevede che in caso di esposizione a miscele di polveri di legno derivanti dalla lavorazione contemporanea di hard e softwood adotti il valore previsto per i legni duri.

Altra novità è l'inserimento nell'allegato 1 della direttiva di un 6° processo di lavoro "Work involving exposure to respirable crystalline silica dust generated by a work process". In parallelo viene indicato un OEL per la silice cristallina in frazione respirabile di 0.1 mg/m^3 . Pertanto non viene considerata cancerogena la sostanza in quanto tale, ma i processi di lavoro che ne causano l'esposizione. Il razionale scientifico è legato alla differente ipotizzata azione cancerogena della silice correlata alle diverse condizioni di reattività di superficie. Ne consegue che non risulta automaticamente necessario classificare come H350 i prodotti immessi sul mercato contenenti concentrazioni maggiori allo 0.1% di silice cristallina.

Gli OEL riportati nell'aggiornamento della direttiva sono valori "binding". Pertanto gli stati membri, nel recepimento della direttiva che dovrà avvenire entro il 2020, potranno eventualmente solo stabilire valori limite inferiori a quelli riportati nell'allegato III.

(L'ipotesi di introdurre i tossici per la riproduzione nella direttiva cancerogeni (ventilata in un draft della direttiva stessa) è stata rinviata a future valutazioni.

Direttiva 2017/2398