

NANOPLAST

Nanoteknologiske materialer og produkter i
plastindustrien: Eksponeringsvurdering og toksiske
egenskaber

Af Per Axel Clausen, Nicklas Raun Jacobsen og Keld Alstrup Jensen på vegne af
resten af NANOPLAST projektgruppen.

Projektet er støttet af Arbejds miljø forskningsfonden
Projektnummer: 2007-0014937 Nanoplast



Slutrapport til Arbejds miljø forskningsfonden

Titel	Nanoteknologiske materialer og produkter i plastindustrien: Eksponeringsvurdering og toksiske egenskaber
Forfattere	Af Per Axel Clausen, Nicklas Raun Jacobsen og Keld Alstrup Jensen på vegne af resten af NANOPLAST projektgruppen.
Institution	Det Nationale Forskningscenter for Arbejds miljø (NFA)
Udgiver	Det Nationale Forskningscenter for Arbejds miljø (NFA)
Udgivet	Juni 2012
Finansiel støtte	Projektet blev støttet af Arbejds miljø forskningsfonden (2007-0014937 Nanoplast)
Sidetæl	50

Det Nationale Forskningscenter for Arbejds miljø

Lersø Parkallé 105
2100 København Ø
Tlf.: 39165200
Fax: 39165201
e-post: nfa@arbejds miljoforskning.dk
Hjemmeside: www.arbejds miljoforskning.dk

INDHOLDSFORTEGNELSE

NANOPLAST	1
Resumé	4
Summary.....	5
Indledning.....	6
Organo-ler	6
Kulstofnanorør.....	7
Toksicitet og eksponering.....	8
Risikovurdering.....	10
Formål og problemstilling.....	11
Forsøg og resultater	12
Forsøgsoversigt og de undersøgte nano-materialer	12
Fysisk-kemisk karakterisering.....	14
<i>Organo-ler</i>	14
<i>Kulstofnanorør</i>	17
Toksiske effekter	18
<i>In vitro</i> toksicitet.....	19
<i>In vivo</i> toksicitet.....	20
<i>Resultater Bentonit og organo-ler</i>	22
<i>Resultater Printex 90 og kulstofnanorør</i>	22
Eksponering	24
<i>Støvningstest af organo-ler og Bentonit</i>	25
<i>Dosering af polymer-granualet og nano-ler under compounding i udviklingslaboratorium</i>	27
<i>Udportionering af MWCNT i højventileret arbejdstelt</i>	30
Teoretisk modellering af eksponeringsniveauer	34
Erfaringer og konklusioner	38
Referencer	39
Videnskabelig formidling (peer reviewed artikler).....	47
Konferencebidrag (foredrag, posters og abstracts)	48
Populærvidenskabelig formidling.....	49
Undervisning.....	50

RESUMÉ

NANOPLAST-projektet har haft til formål at karakterisere de fysiske, kemiske og toksiske egenskaber af de nanoteknologiske materialer, der potentielt vil opnå massiv anvendelse i den fremtidige produktion af plastprodukter. Projektet har fokuseret på fiberforstærkede polymer nano kompositter (PNC) af termoplast, hvori der indgår en polymer matrix, organo-ler eller kulstofnanorør (CNT). Hovedprojektet har systematiseret viden på tværs af 3 delprojekter, og gennemført en dansk og international formidling i samarbejde med plastindustriens parter.

Projektet har omfattet 3 delprojekter med hvert deres formål:

Delprojekt 1: Fysisk- kemisk karakterisering af udvalgte organo-ler og kulstofnanorør, samt kemiske omdannelsesprodukter, der opstår under testproduktioner af PNC.

Delprojekt 2: Karakterisering af toksiske egenskaber af udvalgte organo-ler og kulstofnanorør, der kan anvendes i plast.

Delprojekt 3: Vurdering af eksponeringsrisici - Eksponeringsscenerier i laboratoriet ved testproduktioner af PNC.

NANOPLAST-projektet har vist at hvert eneste nano-mateiale er en unik kemisk forbindelse med unikke fysiske, kemiske og toksikologiske egenskaber. Organo-lers toksiske egenskaber ved inhalation har sandsynligvis kun korttidseffekt, men en høj dosis vil være uheldig. Derimod ser nogle af de lange og stive kulstofnanorør (CNT) ud til ved inhalation at kunne forårsage langvarig inflammation og celledskader ved en mekanisme, der minder om den, som asbest virker ved, og som derfor på sigt måske kan medføre kræft. Vi har også observeret stor forskel på hvor toksisk den enkelte organo-ler og CNT er og kan sammenholde det med deres fysiske og kemiske egenskaber. Vi har også vist at der under produktion af polymer nanokompositter (PNC) af termoplast i *worst case*-scenerier kan opstå situationer med en uønsket høj luftbåren eksponering. Disse situationer er i forbindelse med håndteringen af de rene nano-materialer og hverken i forbindelse med compoundingprocessen eller sprøjttestøbningen. Vi har også vist at støvnings-egenskaberne af beslægtede nano-materialer kan være meget forskellig og dermed den potentielle eksponering i en håndteringssituation. Denne viden om nano-materialernes fysiske, kemiske og toksikologiske egenskaber kan bruges til at udvælge de nano-materialer med de mindst toksiske egenskaber og optimale materiale egenskaber til den fremtidige industrielle anvendelse.

SUMMARY

NANOPLAST: Nano-technological materials and products in the plastics industry: Exposure assessment and toxicological properties

The aim of the NANOPLAST project was to investigate physical, chemical, and toxicological properties of engineered nanomaterials (ENMs) that will obtain massive use in the future production of plastic products. Focus was on organoclays and carbon nanotubes for use in production of fiber-reinforced *polymer nano composites* (PNCs) of injection moulded thermoplastics. In addition, the aim was to estimate the exposure risk during production of PNCs.

The main project organized the obtained knowledge across three work packages and carried out a comprehensive dissemination in collaboration with partners of the Danish plastics industry. The three work packages were:

Work package 1: Characterisation of toxicologically relevant physical and chemical properties of organoclays and carbon nanotubes.

Work package 2: Characterization of toxicological properties of organoclays and carbon nanotubes for use in plastic products.

Work package 3: Assessment of the risk of exposure to ENMs in the plastics industry – Exposure scenarios carried out during test productions in the laboratory.

The NANOPLAST project has shown that every ENM is a unique chemical compound with unique physical, chemical and toxicological properties. The toxic properties of organoclay by inhalation probably only cause short-term effect, but a high dose would be harmful. In contrast, some of the long and rigid carbon nanotube (CNT) appeared at inhalation to cause prolonged inflammation and cell damage by a mechanism similar to that by which asbestos acts and therefore at long term might lead to cancer. We have also observed large differences in toxicity of individual organoclays and CNTs and can correlate this with their physical and chemical properties. In addition, we have shown that undesirably high airborne exposure may occur during the production of PNC of thermoplastics in worst case scenarios. These situations are related to the handling of the pure ENM, and neither during the compounding process or injection moulding. We have also shown that the dustiness characteristics of related ENM can be very different and therefore result in a very different potential exposure in a handling situation. This knowledge of ENM's physical, chemical and toxicological properties can be used to select the ENM with the least toxic properties and optimum material properties for future industrial use.

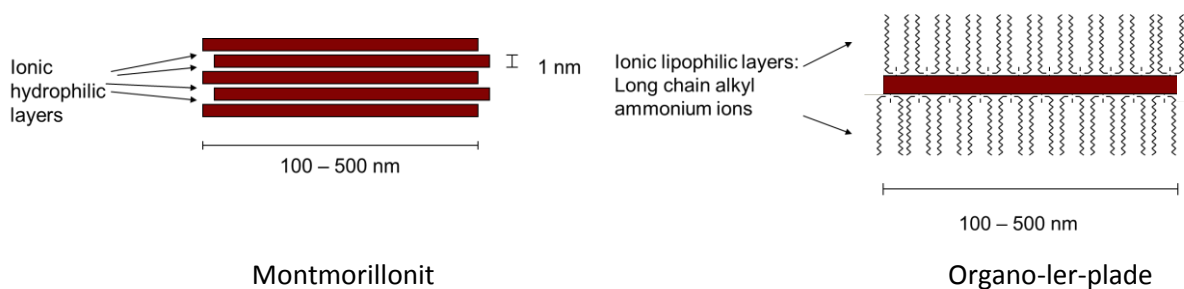
INDLEDNING

Begrebet nanoteknologi dækker over en meget bred vifte af kemiske stoffer og teknikker til håndtering af dem. Fælles er, at de forekommer som funktionelle molekylstrukturer i slutprodukter, i molekulære lag eller som partikler, hvor en af dimensionerne er i nanometerskala (én milliontedel millimeter). I denne rapport beskrives fysik-kemiske, toksikologiske og eksponeringsmæssige egenskaber af de rene nano-materialer organo-ler (engelsk: nanoclay eller organoclay) og kulstofnanorør (CNT af engelsk: Carbon nanotubes). Det nanoteknologiske slutprodukt er polymer nanokompositter (PNC af engelsk: Polymer nanocomposites), som her i projektet er termoplast, hvori der indgår organo-ler (Ray and Okamoto, 2003; Hussain et al., 2006; Pavlidou and Papaspyrides, 2008; Patel et al., 2006; Liu et al., 2006; Morgan, 2007). Organo-ler og CNT forventes at blive blandt de mest anvendte nano-tilsætningstoffer til forstærkning af plast i form af PNC.

Der er generelt et stort behov for mere praktisk og teoretisk viden om udsættelse for og eventuelle toksiske effekter af organo-ler og CNT samt de kemiske transformationer, der kan opstå under produktion og ved bearbejdning af PNC (SCENIHR, 2006; Oberdorster et al., 2005b; Maynard and Kuempel, 2005). Dette gælder i høj grad også for anvendelse af nanoteknologi i plastindustrien. Plastindustrien i Danmark anvender i dag kun nanoteknologiske materialer i beskedent omfang, men forventer en stærk vækst i de kommende år.

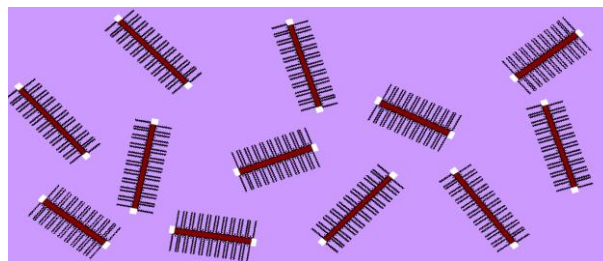
Organo-ler

Organo-ler er baseret på mineralet montmorillonit, som også kaldes Bentonit, og det findes naturligt bl.a. på Lolland. Som det fremgår af Figur 1 har montmorillonit en lagdelt struktur med plader, som er ca. 1 nm tykke og med en længde på 100-500 nm i én retning (Pavlidou and Papaspyrides, 2008; Kamena, 2005; Ray and Okamoto, 2003). For at omdanne det hydrofile montmorillonit til en lipofil organo-ler, som kan bindes til den organiske plastpolymer i en PNC, er det nødvendigt at modificere overfladen (se Figur 1). Dertil bruges kvaternære ammonium-ioner eller phosphonoium-ioner med forskellige alifatiske eller aromatiske sidegrupper (Ray and Okamoto, 2003; Singla et al., 2012). Organo-ler er således ikke blot montmorillonit-partikler men en række forskellige kemiske forbindelser heraf. Montmorillonits evne til at reagere med organiske ioner (Smith, 1934) og kvaternære ammonium-ioner (Rahn and Vaneseltine, 1947) har været kendt



Figur 1. Opbygningen af rent ler mineral (montmorillonit) og strukturen af organo-ler.

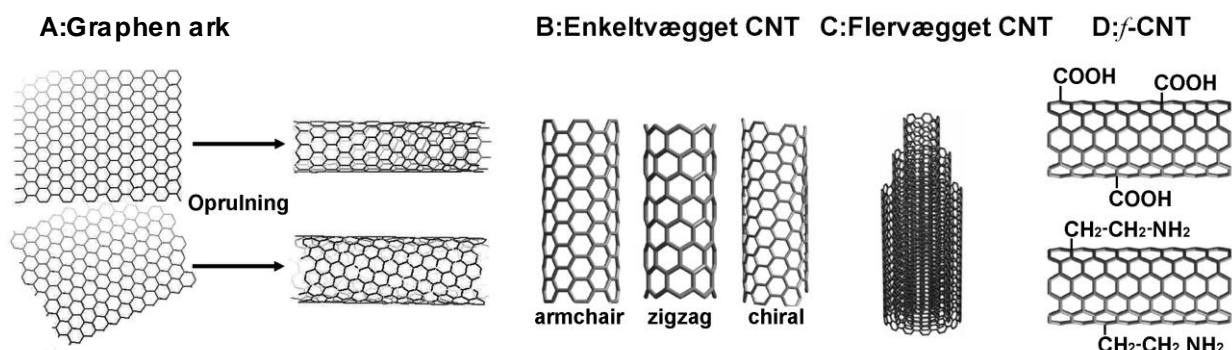
siden 1930'erne og processerne er blevet forfinet gennem alle årene. Det potentielt store overfladeareal af organo-ler på ca. 750 m²/g (Kamena, 2005) betyder en væsentlig interaktion med polymermolekylerne i en PNC, og dermed ændrede egenskaber. Samtidig forbedres andre egenskaber, så man opnår en unik egenskabsprofil. En PNC bestående af organo-ler og organiske plastpolymerer (se Figur 2), kan skabe yderst gode tekniske egenskaber til en pris, som forventes at ligge under prisen for at opnå samme egenskaber ved traditionel teknologi. 5% organo-ler kan fx give samme styrkeforbedring som 30% korte fibre. De forbedrede egenskaber gælder blandt andet barriere egenskaber, trækstyrke, stivhed, slagstyrke, slidbestandighed, og brandhæmmende egenskaber (Pavlidou and Papaspyrides, 2008; Hussain et al., 2006; Ray and Okamoto, 2003).



Figur 2. Eksempel på fiber-plade-forstærkning af polymer-materiale. Her plader af organo-ler fuldt udfoldet i en polymermatrix.

Kulstofnanorør

CNT er en meget stor gruppe af fysisk og kemisk forskellige stoffer, som har det til fælles at de består af graphen (rent kulstof ordnet i sekskantede ringe i ark a la et stykke hønsetrådnet), som er rullet til sømløse, hule rør på forskellig måde som vist i Figur 3 (Tasis et al., 2006; Iqbal and Goyal, 2005; Lu and Chen, 2005; Breuer and Sundararaj, 2004; Thostenson et al., 2001). CNT har helt unikke egenskaber, bl.a. en trækstyrke der er 10-100 gange ståls, men kun en brøkdel af dets massefylde (Thostenson et al., 2001). Dette er med til at gøre CNT meget attraktiv som fibre i PNC. Diameteren af CNT varierer fra lige under én nanometer til flere hundrede nanometer, og længden kan være flere hundrede mikrometer. I enderne kan CNT være aflukket med fulleren (fodboldmolekyle) strukturer. Graphen-arket kan være sammenrullet på forskellig vis som er af betydning for om CNT er metalliske eller halvledende (Figur 1B), hvad der er af interesse i



Figur 3. Kulstofnanorør (CNT) er opbygget som et oprullet grafen ark (A). Vinklen ved oprulning medfører forskellige materialeegenskaber (B). Flere koncentriske enkeltvæggede CNT danner flervæggede CNT (C). Eksempler på overfladefunktionaliserede CNT (f-CNT)(D).

forbindelse med anvendelse af CNT i elektronik-industrien. Herudover kan CNT være enkeltvæggede (single-walled CNT: SWCNT) eller flervæggede (multi-walled CNT: MWCNT). MWCNT består af flere koncentriske rør bundet sammen af van der Waals kræfter. Som tilfældet er med organo-ler, er det også nødvendigt at CNT kan fordeles homogent i polymeren og at der dannes stærke bindinger i grænsefladen mellem CNT og polymermatricen. Strategier for at opnå dette for polymer CNT kompositter involvere fysisk blanding i opløsning, *in situ* polymerisering, anvendelse af overflade aktive stoffer eller kemisk modifikation (derivatisering) af CNT-overfalden, så der kan opnås binding til de organiske plastpolymerer (Singh et al., 2010a; Tasis et al., 2006; Dyke and Tour, 2004; Iqbal and Goyal, 2005). CNT er også blevet gjort vandopløseligt ved at indpakke det i polymerer som polyvinyl-pyrrolidon, polyethylen-imin, eller en-strengt DNA (Zheng et al., 2003). PNC med CNT vil typisk blive brugt i konstruktioner der kræver stor styrke og lav vægt som fx vindmøllevinger, fly, biler, cykler og forskelligt sportsudstyr (Moniruzzaman and Winey, 2006; Coleman et al., 2006; Qian et al., 2010; Breuer and Sundararaj, 2004). Ud over PNC arbejdes der også med CNT-forstærket keramiske kompositter (Samal and Bal, 2008) og metal-matrix kompositter (Bakshi et al., 2010).

Toksicitet og eksponering

Inhalation er den vigtigste eksponeringsvej for partikler i arbejdsmiljøet. Når støv indåndes, vil en del af det deponeres i luftvejene afhængig af partikelstørrelse, således at de største partikler bliver opfanget i øvre luftveje (bronkier og bronkioler), mens de mindre partikler primært deponeres dybt i lungernes alveoler. Støv deponeret i de øvre luftveje transporteres via det såkaldte mukociliære system op i svælget hvor det synkes. Det vil sige, at både lunger og mave-tarmkanalen eksponeres for partiklerne. De mindste partikler (nanostørrelse) som når alveolerne, hvor der ikke findes et mukociliært system, kan kun fjernes af makrofager ved fagocytose. Undersøgelser har vist at nanopartikler kan være svære at genkende/finde og at nanopartikler sommetider kan forblive i måneder eller år i lungerne. Dette medfører at personer, som udsættes for nanopartikler i arbejdsmiljøet sandsynligvis har øget risiko for ophobning af partikler i lungerne i løbet af deres arbejdsliv.

Til dato er der kun en meget begrænset viden om eksponering for og toksiske effekter af organo-ler og CNT. Organo-ler anses normalt ikke for at udgøre nogen større sundhedsrisiko bortset fra generelle betragtninger om nanopartiklers toksicitet (Hussain et al., 2006). Organo-ler kan dog indeholde op til 0,5 % kvartsstøv (Kamena, 2005). Det er velkendt at inhalation af kvarts på lang sigt kan forårsage lungekræft og silikose. Derudover kan det være problematisk med indholdet af kvaternære phosphonioium- eller ammonium-ioner, der i deres rene form kan give anledning til astmasymptomer (Purohit et al., 2000). Den til dato eneste peer-reviewed artikel, som beskriver toksicitet af organo-ler, finder da også kun en moderat genotoksicitet, som skyldes frigivelse af overfladmodificeringen fra organo-leret og ikke organo-ler-partiklerne i sig selv (Sharma et al., 2010). Ydermere antyder forsøg at organo-ler kan frigives fra PNC film, idet bladgrøntsager indpakket i organo-ler PNC film fik flere gange forøgelse af indholdet af silicium, som er en hovedbestanddel af organo-ler (Avella et al., 2005).

SWCNT og MWCNT har vist at kunne give mange forskellige effekter i *in vitro* og *in vivo* studier, heriblandt forskellige inflammationstilstande og mutationer (Shvedova et al., 2009; Folkmann et

al., 2009; Jacobsen et al., 2008a; Jacobsen et al., 2009). Nogle studier har endda indikeret ligheder mellem lange MWCNT og kræftfremkaldende asbest fibre (Takagi et al., 2008; Poland et al., 2008; Sakamoto et al., 2009). Der er dog i flere tilfælde modstridende resultater som muligvis kan skyldes at de fysik-kemiske egenskaber af de CNT, der er eksponeret med, ikke er tilstrækkeligt karakteriseret (Helland et al., 2007; Singh et al., 2010b). Toxiciteten af CNT afhænger nemlig helt af de fysiske og kemiske karakteristika som biopersistens, længde, diameter, stivhed, struktur, agglomereringstilstand, funktionalisering (herunder oxidativ syrebehandling), urenheder, defekter, etc. (Kayat et al., 2010; Helland et al., 2007). Der findes indtil nu kun tre publicerede studier, der viser at håndtering af CNT kan resultere i støvning (Maynard et al., 2004; Han et al., 2008; Lee et al., 2010). I de to Koreanske studier var de hhv. maksimalt 0,2-0,4 mg/m³ (Han et al., 2008) og 0,008-0,3 mg/m³ (Lee et al., 2010), mens de i Maynards studie kun var op til 0,05 mg/m³ (Maynard et al., 2004). Nye amerikanske forskningsresultater (Johnson et al., 2010) antyder, at MWCNT kan slippe ud i luften både når man afvejer CNT og homogeniserer væsker ved hjælp af ultralyd (sonikering). MWCNT har generelt diametre på 20 nm til > 200 nm og længder fra 1 µm og op til ~100 µm, og forskellige former (fx lige, bøjet, krøllet) og de kan forekomme enkeltvis, i klumper eller reb (Donaldson et al., 2006). Nye dyreforsøg har vist at en luftvejseksponering i mus på 30 mg/m³ MWCNT kan nå den subpleurale del i den nedre del af lungen (Ryman-Rasmussen et al., 2009a) og at de kan forstærke luftvejsfibrose i mus der i forvejen har en allergisk inflammation (Ryman-Rasmussen et al., 2009b). Hvis CNT når ned i lungerne er de mere toksiske end carbon black og kvarts og bør betragtes som et alvorligt arbejdsmiljøproblem selv ved begrænset støvning (Lam et al., 2006).

Det er velkendt at der ved ekstrudering og sprøjtstøbning af termoplast afgives gasser, flygtige organiske stoffer og aerosoler (Tikuisis et al., 1995; Patel and Xanthos, 1995; Forrest et al., 1995; Adams et al., 1999; Tikuisis et al., 2010). Men emissionerne er oftest under de hygiejniske grænseværdier og endda ofte under detektionsgrænserne for målemetoderne (Tikuisis et al., 1995; Forrest et al., 1995; Tikuisis et al., 2010). Ved ekstrudering af PNC kan det pulverformige nanomateriale tænkes potentielt at være en kilde til aerosoler. Dette bekræftes af det formodentlig eneste peer-reviewed studie af partikel-emissionen ved ekstrudering af en PNC bestående af nano-aluminium oxid og polymethylmethacrylat (PMMA) (Tsai et al., 2008). Forfatterne finder forhøjede niveauer af nanopartikler, der består af de rene nano-aluminium oxid partikler og agglomerater og polymer-damp-partikler. Et andet studie har studeret partikel emissionerne ved fremstilling (afvejning af CNT) og bearbejdning (slibning) af en epoxy/CNT PNC (Cena and Peters, 2011). De fandt forhøjede niveauer af respirable partikler både ved afvejningen og slibningen. En del af slibepartiklerne havde CNT strittende ud af overfladen.

I de fleste af de få undersøgelser af emissioner fra bearbejdning af PNC (slibning, boring, savning, fræsning, drejning) frigives der ikke de rene tilsatte nanopartikler (Wohlleben et al., 2011), dog med én undtagelse ved tør-boring i en PNC, hvor der frigives klumper af CNT (Bello et al., 2010). Derimod ser det ud til at generel forvitring og nedbrydning af vejr, vind og lys og måske brand kan frigive de rene nanopartikler (Kaegi et al., 2008; Kaegi et al., 2010; Wohlleben et al., 2011; Liu et al., 2012; Nguyen et al., 2011; Petersen et al., 2011). Bello et al. (2009) bearbejdede PNC indeholdende CNT med både båndsav og rundsav begge med diamantskær. Der var ikke forskel i afgivelse af partikler for kompositter med og uden CNT og de fleste afgivne partikler var i mikrometer størrelse og der kunne ikke observeres frie CNT. Wohlleben et al. (2011) udsatte fire

forskellige PNC med bl.a. CNT for tre nedbrydningsscenarier og kun én PNC i ét scenarie opførte sig anderledes end polymeren uden nano-materiale. De viste, at slibning ikke afgiver frie nanopartikler af det tilsatte nano-materiale og at der ikke ser ud til at være forskel i partikel-afgivelsen fra PNC og polymer uden nano-materiale. Dette er i overensstemmelse med studier af slibning af bemalede overflader behandlet med malinger indeholdende nano-materialer udført af Göhler et al (2010) og Koponen et al. (2009; 2011). Saber et al. (2011b; 2011a) viste at slibestøvet fra de nano-holdige malinger fra de sidstnævnte studier ikke var særlig toksisk og at tilsætning af nano-materiale ikke ændre slibestøvet toksiske egenskaber i forhold til den samme maling uden nano-materiale.

Overordnet set ser det ud til at den umiddelbare risiko forbundet med produktion af nanoteknologiske plast-produkter er forbundet med håndtering af rene nano-materialer.

Risikovurdering

De senere år har flere forskere, politikere, interesseorganisationer og virksomheder efterlyst redskaber til at risikovurdere nano-materialer i diverse anvendelsessammenhænge. Det har resulteret i flere bud på risikovurderingsværktøjer og 'god praksis' manualer, som alle har deres styrker og svagheder f.eks. BSI (2007), Paik et al. (2008), Höck et al. (2008) og NIOSH (2009). De fleste af disse modeller er baseret på kvalitative vurderinger eller sjældent validerede risiko-indikatorer. Dvs. de overvejende kan anvendes til identifikation af om der er mulighed for eksponering, men ikke dens størrelse (Jensen, 2010). Den toksikologiske fare af nanopartiklerne vurderes også vha. risiko-indikatorer og de tidligere modeller placerer automatisk nye nanopartikler og nanorør i området med maksimal sundhedsrisiko. NFA har udviklet en ny internet-baseret model, NANOSAFER, som er en første version af en kvantitativ vurdering af eksponeringsfaren. Modellen indeholder også et modul til evaluering af potentielle sundhedsrisici.

Der findes intet i litteraturen om risikovurdering af nano-ler, men for CNT er der inden for de sidste par år publiceret flere forslag til grænseværdier for forskellige typer CNT. Én grænseværdi er foreslået for den flervæggede CNT, Baytubes®, der produceres af den tyske kemikoncern Bayer. For Baytubes® er der foreslået en grænseværdi på 0,05 mg/m³ bl.a. baseret på "no-observed adverse effect level" (NOAEL) for inhalationsstudier i rotter (Pauluhn, 2010). For en anden CNT, som også er flervægget, er der foreslået en hygiejnisk grænseværdi (eksponering i 8 timer/day, 5 dage om ugen) på 0,21 mg/m³ (Morimoto et al., 2010; Kobayakawa et al., 2009). Denne værdi er også baseret på NOAEL for inhalationsstudier i rotter. På det seneste har NIOSH (National Institute of Occupational Health, USA) nu foreslået en grænseværdi for CNT på helt ned til 7 µg/m³ (NIOSH, 2010).

FORMÅL OG PROBLEMSTILLING

Projektet skal ses som et vigtigt bidrag til at opfylde det strategiske mål om at understøtte den danske satsning i nanoteknologi med velunderbygget viden om eventuelle helbredsrisici ved denne teknologiudvikling. Under ledelse af NFA vil det samlede forskernetværk gennemføre forskningen i sundhedsmæssige effekter ved i faser at dække den nanoteknologiske produktion indenfor forskellige industriområder.

NANOPLAST-projektet har til formål at karakterisere toksiske egenskaber ved de nanoteknologiske materialer, der potentielt opnår massiv anvendelse i den fremtidige produktion af plastprodukter. Projektet fokuserer på *polymer nano composittes* (PNC) af termoplast, hvori der indgår en polymer matrix, **organo-ler** eller kulstofnanorør (CNT). Hovedprojektet systematiserer viden på tværs af 3 delprojekter, og vil gennemføre en dansk og international formidlingsindsats i samarbejde med plastindustriens parter.

Projektet omfatter 3 delprojekter med hvert deres formål:

Delprojekt 1: Fysisk- kemisk karakterisering af såvel nano-materialer og tekniske derivater heraf samt kemiske omdannelsesprodukter, der opstår under testproduktioner af PNC.

Delprojekt 2: Karakterisering af toksiske egenskaber af udvalgte nano-materialer, der anvendes i plast.

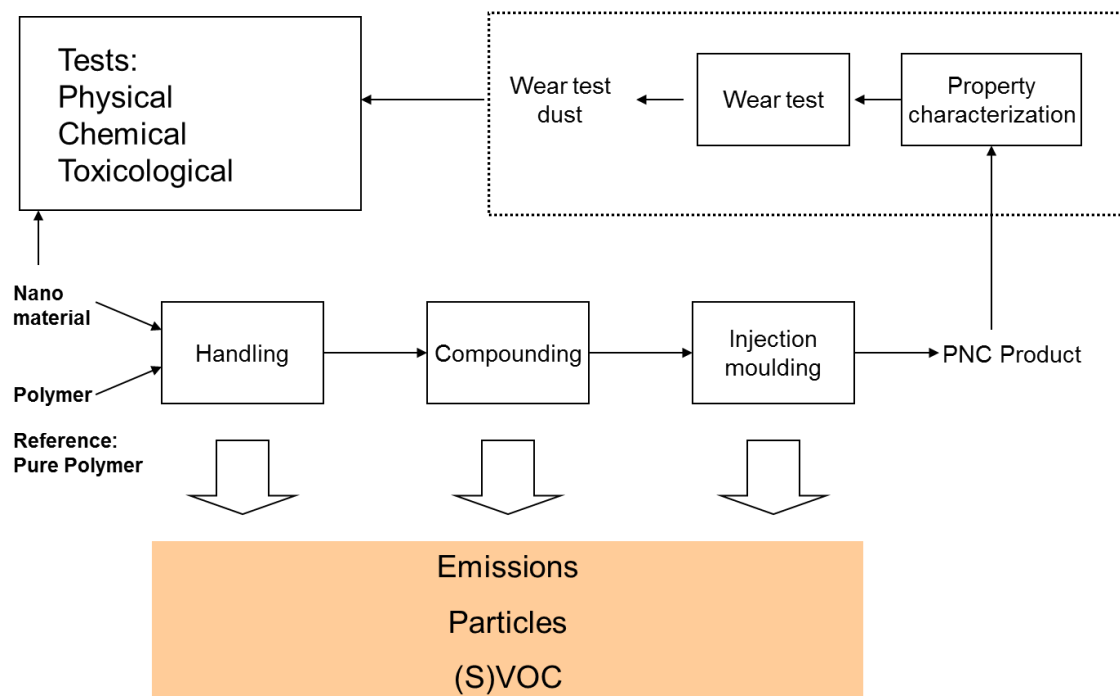
Delprojekt 3: Vurdering af eksponeringsrisici - Eksponeringsscenarier i laboratoriet ved testproduktioner af PNC.

Hoved-problemstillingerne er at finde ud af hvor i produktionen af PNC af termoplast, der kan være den største risiko for eksponering for uønskede kemiske stoffer, hvilke stoffer der er tale om, samt at undersøge disse stoffers toksicitet. Hermed kan den samlede risiko vurderes.

FORSØG OG RESULTATER

Forsøgsoversigt og de undersøgte nano-materialer

Den oprindelige plan var at udføre projektet som et helhedsorienteret projekt hvor alle arbejdsmiljø-aspekter ved produktion af polymernanokompositter (PNC) af termoplast skulle belyses. Det betød at de rene nano-materialer, som man kan eksponeres for ved håndtering, skulle undersøges for deres fysiske, kemiske og toksikologiske egenskaber. Hertil kom at hele produktionsprocessen, fra håndtering og blanding af nano-materiale og polymer til compounding og sprøjttestøbning, skulle undersøges for emissioner af partikler og gasser. Ydermere var det ambitionen at undersøge om støvpartikler fra en PNC, som kan dannes ved forarbejdning (skæring, boring, slibning), kunne være toksiske på linie med de nano-materialer de indeholdt. Dette PNC-støv skulle genereres ved en standard slid-test metode. Flere årsager betød at det ikke var muligt at gennemføre denne oprindelige plan (se Figur 4). Efter projektstart kom



Figur 4. Den oprindelige plan for undersøgelser i projektet. Undersøgelser i den punkterede boks blev taget ud.

der flere rapporter, der antydede ligheder mellem lange MWCNT og kræftfremkaldende asbest fibre (Takagi et al., 2008; Poland et al., 2008; Sakamoto et al., 2009). Da vi ikke havde de fornødne faciliteter til at arbejde med kræftfremkaldende stoffer i store mængder betød dette, at vi ikke kunne arbejde med CNT ved produktion af PNC. Men vi gennemførte en eksponeringsmåling ved håndtering og omhældning af CNT i et arbejdstelt ("asbesttelt") (Jensen et al., 2012a), se afsnittet om eksponering. Desuden udvidede vi det antal CNT der blev undersøgt fysisk/kemisk og toksikologisk (Se Tabel 1.). Det blev også opgivet at fremstille slidteststøv dels pga. den bløde plast og dels fordi de meget lipofile afslidningspartikler ville være svære at suspendere i de vandige

eksponeringsmedier. Desuden viste resultaterne fra NanoKem-projektet at slibestøvet fra nano-materiale-holdige malinger ikke var særlig toksisk og at tilsætning af nano-materiale ikke ændrede slibestøvet toksiske egenskaber i forhold til den samme maling uden nano-materiale (Saber et al., 2011b; Saber et al., 2011a). Dermed blev det besluttet ikke at bruge kræfter på at generere slidteststøv fra de fremstillede PNC og prøve at suspendere det i et eksponeringsmedier.

Tabel 1. Nano-materialer undersøgt i NANOPLAST, og polymerer anvendt til fremstilling af PNC.

Short name	Nano material	Primary Thickness (nm)	Primary Diameter (nm)	Primary Length (µm)	Tox. tests	Polymer 1: Polyethylen	Polymer 2: PMMA	Polymer 3: PS
NanoFil 5	Organo-ler 1: Nanofil® 5, SüdChemie	1	100 - 500	-	X	X	X	X
NanoFil 8	Organo-ler 2: Nanofil® 8, SüdChemie	1	100 - 500	-	X	X	X	X
NanoFil 9	Organo-ler 3: Nanofil® 9, SüdChemie	1	100 - 500	-	X	X	X	X
NanoFil SE3000	Organo-ler 4: Nanofil® SE3000, SüdChemie	1	100 - 500	-	X	X	X	X
NT1	MWNT 2: Sigma Aldrich, > 90%, Product no. 659258		110 - 170	5- 9	X			
NT2	MWNT 3: Manuf. ARKEMA INC., Sigma Aldrich, > 90%, Product no. 677248		2 - 6	0.1 - 10	X			
NT3	SWNT 2: Sigma Aldrich, 90%, Product no. 652512		1 - 2	0.5 - 2	X			
NT4	SWNT 1: EliCarb® SWCNT, Thomas Swan, > 95%		0.9 - 1.7	≤ 1	X			
NT5	MWNT 1: XNRI MWCNT-7, Hadoga Chemical Industry (formerly Mitsui), 99.8%		40 - 50	1 - 5; 13?	X			
NT6	MWNT 4: Cheap Tubes Inc., >95%		8 - 15	10 - 50	X			
NT7	MWNT 5: Nagano Bended Tubes		20 - 40	≤ 20				
NT8	SWNT 3: Sigma Aldrich		1.1	0.5 -100				
CB Printex 90	Tox. reference: Carbon Black: Printex 90, Evonic Degussa, >98%		14		X			
Bentonite	Tox. Physico-chemical reference. 100% Montmorillonite (Schneider and Jensen, 2008)				X			

Alt i alt kom NANOPLAST-projektet til at omfatte fysik/kemisk og toksikologisk karakterisering af de rene nano-materialer vist i Tabel 1 plus 10 kvaternære ammonium forbindelser, eksponeringsstudie af NT5 og NT6 (se Tabel 1) i "asbestelt", eksponeringsstudie af emissionerne af aerosoler og gasser ved laboratorie-skala fremstilling af 12 forskellige PNC baseret på 4 forskellige typer organo-ler og tre forskellige polymerer (se Tabel 1). Forsøgene er nærmere beskrevet i de følgende afsnit.

Fysisk-kemisk karakterisering

Delprojektet 1's formål var at foretage en toksikologisk relevant fysisk-kemisk karakterisering af organo-ler og kulstofnanorør (CNT) til brug i PNC af termoplast.

Partiklers fysisk-kemiske egenskaber spiller en vigtig rolle for partiklernes sundhedsskadelige effekter. Toksikologiske tests antyder at de vigtigste partikelparametre er partiklernes størrelse, specifikke overfladeareal, overflade-kemi, redox-potentiale, biologiske opløselighed og indhold af specifikke toksiske stoffer (Maynard and Kuempel, 2005; Oberdorster et al., 2005a; Hassellöv et al., 2008; Stone et al., 2010; Bouwmeester et al., 2011). Der kan være en stærk sammenhæng mellem partiklers redox potentiale eller evne til radikaldannelse og deres toksiske egenskaber; specielt celletoksicitet og DNA-skade (Oberdorster et al., 2005a; Becker et al., 2002; Donaldson et al., 1996). Der er dog endnu lang vej til en forståelse af, hvilke parametre der spiller den største rolle. Endvidere er der mangelfuld viden om både nanopartiklers fysisk-kemiske egenskaber og stabilitet i komplekse støvaggregater. I Delprojekt 1 har vi derfor foretaget en omfattende fysisk-kemisk karakterisering af nano-materialerne ved hjælp af en række forskellige metoder til bestemmelse af specifikt overfladeareal (BET), fase, fase-andele og krystallit-størrelse (XRD), partikelform, generel størrelse, aggregerings- og agglomereringsgrad (SEM), grundstofkemisk sammensætning (XRF), overfladekemisk sammensætning, OH-radikal-dannelsespotentiale, samt nano-materialernes hydrokemiske reaktivitet og biodurabilitet i simulerede biologiske væsker. Disse karakteristika indgår som en vigtig komponent i den toksikologiske karakterisering af materialerne og især i fortolkningen af hvad der forårsager de observerede toksiske effekter. I tillæg til de primære partikelkarakteristika er der foretaget størrelsesfordelingsmålinger i alle partikelsuspensioner anvendt til eksponeringsforsøgene (*in vitro* og *in vivo*) med DLS. Resultaterne fra den fysisk-kemiske karakterisering af de fire undersøgte organo-ler er ved at blive skrevet sammen i en videnskabelig artikel (Clausen et al., 2012a), men resultaterne vil ellers overvejende blive publiceret sammen med de toksikologiske resultater, fx (Jacobsen et al., 2012a). I det følgende bringes her uddrag af resultaterne af de fysik-kemiske målinger.

Organo-ler

Højtryks-væske-ekstraktion (pressurized liquid extraction: PLE) og væske chromatografi kombineret med massespektrometri (LC-MS) blev brugt til at vise at de fire organo-ler alle var overflademodificeret med kvaternære ammonium forbindelser (QAC) (Clausen et al., 2012a). Nanofil®5, Nanofil®8 og Nanofil®SE3000 var overflademodificeret med samme type QAC, mens Nanofil®9 var modificeret med en anden type QAC af benzalkonium-typen. Kommercielle QAC er aldrig rene stoffer, men en blanding af beslægtede stoffer med forskellige længder kulstof-kæder, som har betydning for deres antimikrobielle og dermed celletoksiske effekt (Gilbert and Moore, 2005). Derfor var det nødvendigt at kortlægge sammensætningen af QAC (dvs. kortlægge de forskellige kædelængder) på hver organo-ler for at kunne evaluere toksiciteten på lungeceller (se afsnittet om Toksiske effekter). Uddrag af den kortlægning er vist i Tabel 2 og den viser at Nanofil®5, Nanofil®8 og Nanofil®SE3000 er overflade modificeret med den samme QAC blanding og at Nanofil®9 er overflademodificeret med en blanding af benzalkonium QAC. PLE ekstraktionerne viste også at QAC på de fire organo-ler var bundet mere eller mindre stærkt. QAC på Nanofil®5, Nanofil®9 og Nanofil®SE3000 var bundet nogenlunde lige stærkt, mens en stor del

Tabel 2. Kortlægning af sammensætningen af QAC på de fire organo-ler. DDA = dialkyl-dimethyl ammonium, benzalkonium = alkyl-benzyl-dimethyl ammonium. +, ++, +++ = lidt, moderat, meget.

Type	Kædelængde i antal kulstofatomer	Nanofil®5	Nanofil®8	Nanofil®9	Nanofil®SE3000
DDA	C14	+	+		+
DDA	C16	++	++		++
DDA	C18	+++	+++		+++
Benzalkonium	C14			+	
Benzalkonium	C16			++	
Benzalkonium	C18			+++	

af QAC på Nanofil®8 var løst bundet. Det var ikke muligt at kvantificere mængden af QAC på de fire organo-ler, da de ikke kunne ekstraheres 100% med PLE, og der blev derfor brugt termogravimetrisk analyse i stedet for.

Den termogravimetrisk analyse (TGA) blev brugt til at bestemme mængden af QAC på overfladen af de fire organo-ler. Mængden af QAC blev bestemt til at være 31%, 41%, 35% og 51% for henholdsvis NanoFil®5, NanoFil®8, NanoFil®9, NanoFil®SE3000. Det er meget store mængder af QAC på ler-overfladen, men for NanoFil®SE3000's vedkommende har det været muligt at bekræfte det med litteraturredata, der angiver ca. 55% QAC (Filippi et al., 2006; Haurie et al., 2007; Opalko, 2008). TGA resultaterne viser også NanoFil®5 og NanoFil®SE3000 har identisk kurvefacon, men at NanoFil®SE3000 har langt større mængde QAC. Dette stemmer også overens med at Nanofil®SE3000 er en videreforarbejdning af Nanofil®5 (Seeling, 2009). NanoFil®8 og NanoFil®9 har forskellige TGA kurver som også er forskellige fra TGA kurverne for NanoFil®5 og NanoFil®SE3000.

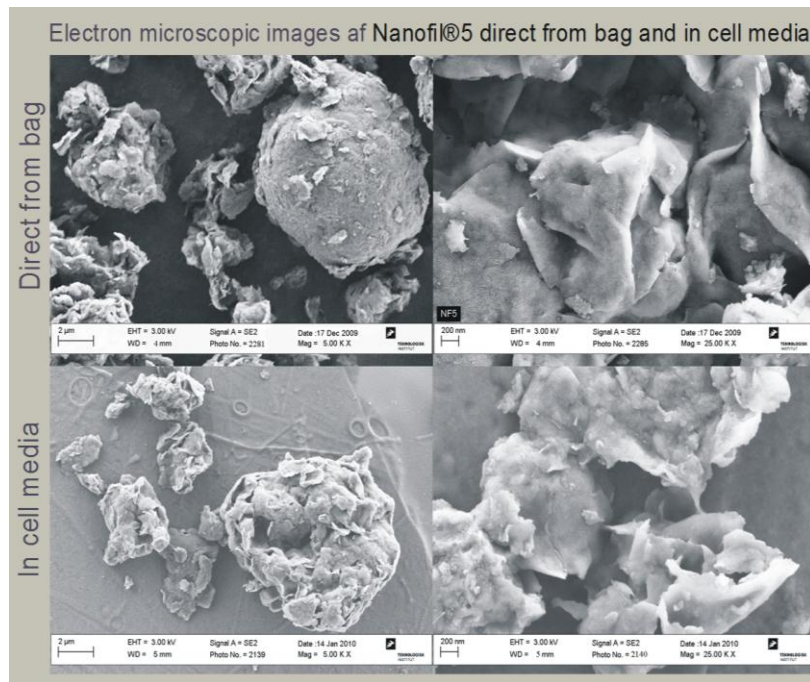
Der blev også udført forsøg til at klarlægge hvor meget frit QAC der afgives fra de fire organo-ler i eksponeringsmedierne, da sådan en frigivelse af QAC fra nogle andre typer organo-ler tidligere er vist at kunne forklare toksiciteten (Sharma et al., 2010). Det viste sig at de fire organo-ler kun afgav små mængder QAC, men at Nanofil®8 afgav mest.

Overfladearealerne af de fire organo-ler blev med BET-metoden (Brunauer et al., 1938) bestemt til at være 3 – 24 m²/g. Dette er langt under det teoretiske areal på 750 m²/g (Kamena, 2005).

De fire organo-lers evne til at danne OH-radikal i kunstig lungevæske blev ligesom for CNT målt med benzosyre som probe (Palomäki et al., 2011). Hverken efter 24 timer eller 96 timer i kunstig lungevæske kunne der ikke måles dannelse af OH-radikal.

Scanning elektron-mikroskopi (SEM) blev brugt til at bestemme de fire organo-lers partikelform, generelle størrelse, aggregerings- og agglomerationsgrad både for primære partikler taget direkte fra opbevaringsbeholderen og for organo-leret suspenderet i eksponeringsmedie (se Figur 5). SEM billederne afslører at alle fire organo-ler består af agglomerater af primær-partiklerne og til en vis grad "fedtet" sammen. Denne sammenfedtning kan tænkes at skyldes det lille overskud af fri

QAC eller simpelt hen at de lange lipofile kulstofkæder i QAC fuldstændig dækker organo-lerets overflade og dermed gør organo-ler-pladerne fedtede. Tilsyneladende ændrer suspenderingsprocessen i eksponeringsmedie ikke agglomeraternes størrelse og udsende. Dog kunne det godt se ud som der er "ætset" lidt i overfladen, hvad der måske kan tilskrives den smule QAC der frigives fra organo-leret i suspension (se Figur 5). Dette betyder at organo-ler partiklerne der kan indåndes fra aerosoler ved håndtering af det pulverformige organo-ler meget ligner de partikler, der udføres toksikologiske tests på.



Figur 5. Scanning elektron-mikroskopi billeder i to forskellige forstørrelser af NanoFil®5 direkte fra opbevaringsbeholderen (posen) og efter suspension i vandigt cellemedie.

Konklusion

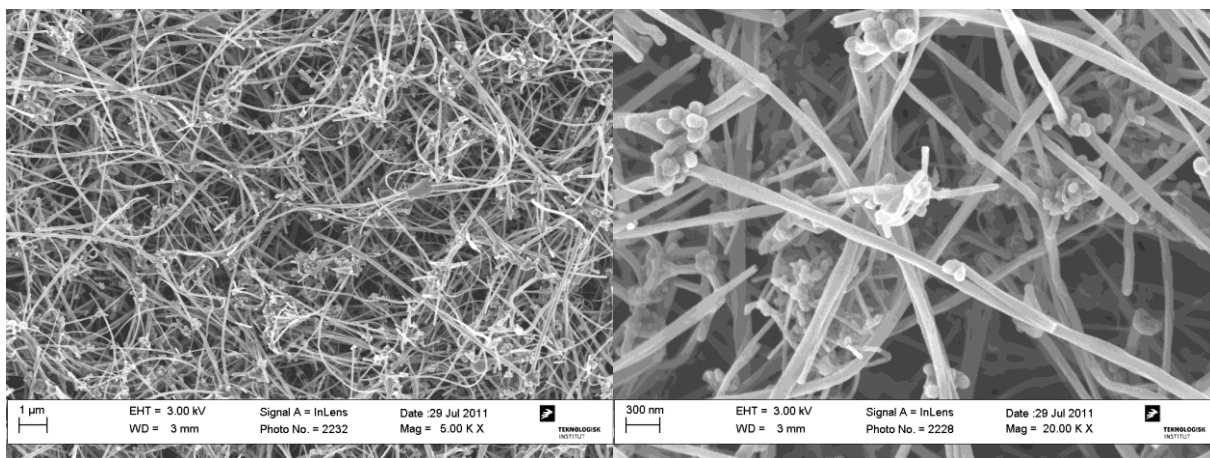
De fire undersøgte organo-ler var alle overflade modificeret med store mængder QAC (30-50%) som består af kulstofkæder med forskellige længder; én organo-ler var modificeret med en anden type QAC, men stadig med forskellige længder af kulstofkæder. Alligevel var QAC bundet godt til organo-lerets overflade og kun meget små mængder QAC blev afgivet til det vandige eksponeringsmedie efter suspendering. Dette er muligvis medvirkende til at de relativt store agglomerater, som organo-leret forekommer i, bevares efter suspendering. Den tilsyneladende fedtede overflade af organo-ler-pladerne er muligvis årsag til at de agglomerere og dermed også årsag til at det specifikke overfladeareal er meget lille. Ingen af de fire organo-ler var i stand til i væske at generere OH-radikaler som dermed ikke vil indgå i den toksiske virkning af disse fire nano-ler.

Kulstofnanorør

Ingen af de valgte kulstofnanorør (CNT) i Tabel 1 er overflade-modificeret og det var derfor ikke nødvendigt at bruge komplicerede analyser for at klarlægge identiteten og mængden af en sådan overflade-modificering. Termogravimetrisk analyse (TGA) (Pang et al., 1993; Itkis et al., 2005) og Raman spektroskopi (Itkis et al., 2005; Dresselhaus et al., 2010; Dresselhaus et al., 2005) blev brugt til at undersøge renheden af de forskellige CNT. Ved TGA analysen blev prøverne varmet op til 1000 °C i luft og den ufordampelige rest blev analyseret for grundstoffer med Røntgen diffraktion (XRD). Resultaterne viser en stor spredning med op til 10% ufordampelig rest, som hovedsagelig består jern, nikkel og calcium, men igen med stor spredning på hvilke grundstoffer de indeholder. Undersøgelserne viser desuden at de undersøgte CNT generelt har mange strukturelle defekter såsom 5-ledede og 7-ledede ringe.

Evnen af de udvalgte kulstofnanorør (CNT) i Tabel 1 til at danne OH-radikal i kunstig lungevæske blev målt med benzosyre som probe (Palomäki et al., 2011). Både efter 24 timer og 96 timer i kunstig lungevæske kunne der enten måles ingen dannelse eller dannelse af kun lidt OH-radikal (< 6 nmol OH-radikal/mg).

Scanning elektron-mikroskopi (SEM) blev brugt til at belyse de udvalgte CNT's længde, diameter, forskellige former (lige, bøjet, krøllet) og om de forekommer enkeltvis, i klumper eller reb (se eksempel i Figur 6).



Figur 6. Scanning elektron-mikroskopi billeder i to forskellige forstørrelser af Mitsui XNRI-7 direkte fra opbevaringsbeholderen. Kugleformationerne på disse CNT er formodentlig resterne af den metal-katalysator der er blevet anvendt ved produktionen.

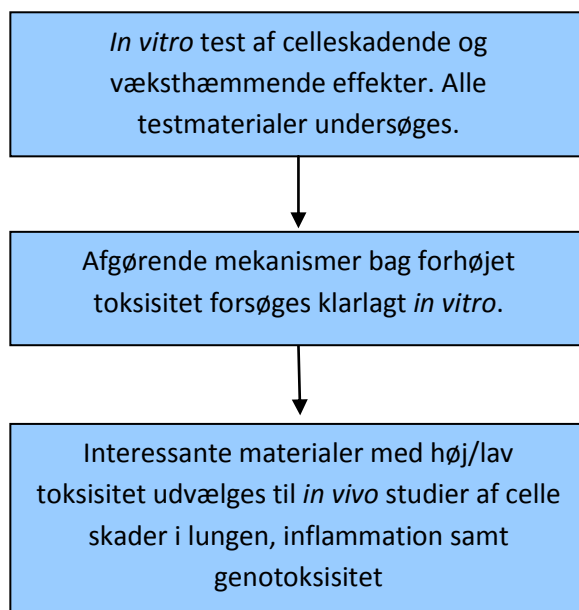
Konklusion

Det generelle billede som de fysisk-kemiske analyser giver af de udvalgte CNT er at de er urene og inhomogene blandinger, men at det dækker over en meget stor spredning. Et par af de udvalgte CNT er rimelig rene mht. kulstofindhold og katalysator-rester og relativt homogene mht. diameter, men at der stadig er tale om blandinger af mange længder og forskellige typer CNT (fx flervægget, enkeltvægget). Alt i alt er det svært at give et entydigt billede af hver af de udvalgte CNT.

Toksiske effekter

Delprojekt 2's formål var at undersøge, om udsættelse for organo-ler og kulstofnanorør (CNT) kan føre til celledskader, fremkalde inflammation og/eller DNA-skadende effekter, associeret med øget risiko for kræft.

Test strategien (Figur 7) var at screene alle 8 indsamlede CNT, 4 organo-ler samt reference materialer (Bentonite og carbon black) i *in vitro* assays, hvor celledskadende og væksthæmmende effekter blev bestemt i en lunge epithel cellelinie fra mus (FE1-MML). Celle linien FE1-MML er spontant immortaliseret og formodes derfor at være tættere på det naturlige respons (primære cellelinier) end sædvanlige cancer cellelinier. På denne baggrund blev de 5 mest potente/interessante kandidatpartikler, sammen med Bentonit (udgangsmaterialet for organo-ler) og reference materialet carbon black Printex 90 udvalgt til intratracheal instillation i C57 mus. Vi har tidligere har påvist at 14 nm carbon black (Printex 90) forårsager både DNA strengbrud og oksidative skader *in vitro* og *in vivo* (Jacobsen et al., 2007; Jacobsen et al., 2011; Bourdon et al., 2012a) samt at disse skader ved længere eksponering fikseres som mutationer forårsaget af produktion af radikaler (Jacobsen et al., 2007; Jacobsen et al., 2011). Printex 90 minder i sammensætning om CNT ved næsten udelukkende at bestå af rent kul (>99%) samt indeholdende meget små mængder af metaller og PAH. Her analyseres for celle skadende effekter i lungen, inflammation og DNA skade (comet assay) for alle udvalgte materialer.



Figur 7. Test strategi for organo-ler og kulstofnanorør.

Celledskader: Svære celledskader medfører at celleindhold (cytosol) lækkes til omgivelserne. Dette medfører stigning i mængden af protein som direkte kan korreleres med skadernes omfang.

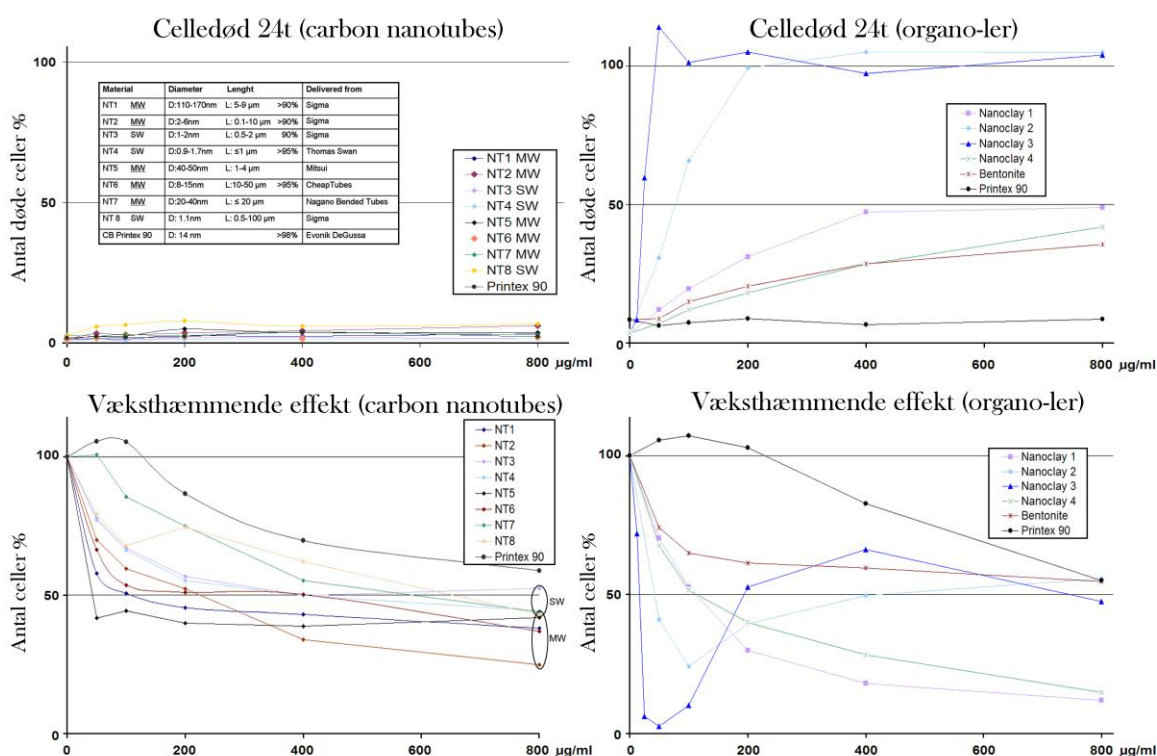
Inflammation i lungen: Vi benyttede celledsammensætningen i lungen skylbare celler til at definere niveauet af lungeinflammation. Antallet af rekrutterede neutrophile celler kan direkte

relateres til inflammationsniveauet. Dette mål er det mest udbredte og anerkendte mål for inflammation (Concalves et al., 2011; Jacobsen et al., 2009).

Genotoksisitet/DNA skade: DNA skade blev påvist ved comet assay (Moller, 2005), som er en meget følsom teknik, som kan bruges til at estimere antallet af DNA strengbrud og evt. oksiderede DNA baser. Begge typer af DNA-skader som kan føre til mutationer og øget kræftisiko. Vi har lang erfaring med assay'et såvel på *in vitro* celler som på celler fra lungeskyllvæske, og varierende væv (Møller et al., 1998; Bornholdt et al. 2002; Dybdahl et al., 2004; Saber et al., 2005; Jacobsen et al., 2007; Jacobsen et al., 2008b; Jacobsen et al., 2009; Bourdon et al., 2012a).

In vitro toksicitet.

Alle materialer blev testet for celledød og væksthæmmende effekter i muse lunge-epitel-cellelinien FE1-MML. Som illustreret i figur 8 forårsagede ingen af de 8 CNT celledød uanset eksponeringsdosen. Det er velkendt at partikeleksponering kan sænke cellernes vækst/delingshastighed. Disse forsøg viste at alle 8 CNT påvirkede væksthastigheden negativt i højere grad end Printex 90. Ydermere kunne noget tyde på at flervæggede CNT hæmmer cellevækst marginalt mere end enkeltvæggede CNT.



Figur 8. Viser de celledød og væksthæmmende effekter ved eksponering af muse lunge epitel cellelinie for kulstofnanorør og organo-ler.

Udover disse *in vitro* forsøg blev Mitsui XNRI-7 og Cheap Tubes (NT5 og NT6 i Tabel 1) testet i en særlig celle-linie og sammenlignet med asbest (Palomäki et al., 2011). Her antydede resultaterne at Mitsui XNRI-7 aktiverede den samme toksicitetsmekanisme som asbest og at det hang sammen med den lange nålelignende form.

Modsat CNT så viste alle 4 organo-ler sig at være mere giftige for muse lunge-epitel cellelinien end både Bentonite og Printex 90, dog i meget varierende grad. Hvor de to mindst giftige lå på niveau lignende Bentonite (24t LD₅₀: >800 µg/ml), var de to andre organo-ler (Nanofil®8 og 9) langt mere giftige (24t LD₅₀: <80 µg/ml) (Jacobsen et al., 2012a).

For at få en bedre forståelse af denne opdeling af organo-ler materialerne blev molekylerne på overfladen af organo-ler partiklerne analyseret i detaljer med HPLC-MS. Materialer viste sig at indeholde en kombination af 15 forskellige kvaternære ammonium-forbindelser. Da farligheden af disse stoffer er ukendt besluttede vi at kigge nærmere på de giftige egenskaber ved de kvaternære ammonium-forbindelser (QAC). Ti kvaternære ammonium-forbindelse (alle som er tilgængelige på markedet) blev indkøbt og testet i det samme system som nano-materialerne (Jacobsen et al., 2012a).

Resultaterne viste klart at giftigheden af organo-ler med kvaternær ammonium (QAC) falder:

- Jo mindre QAC som tilsættes
- Jo flere lange alkyl kæder det tilsatte QAC har
- Jo længere alkyl kæderne på QAC er

Baseret på ovenstående retningslinjer er det forståeligt at Nanofil®9 er klart mest giftig. Derimod er differentieringen i giftighed mellem de øvrige materialer (Nanofil®SE3000, Nanofil®5 og Nanofil®8) sværere at forklare idet de er dannet ud fra samme udgangsprodukt (blanding af kvaternære ammonium forbindelser). Vore analyser viste dog at QAC var løsere bundet på Nanofil®8 hvilket øgede eksponeringen og giftigheden for cellerne. Dog ikke i en sådan grad at det kunne forklare den kraftigt øgede giftighed af Nanofil®8. Da dele af produktionen er hemmelig har det ikke været muligt at finde ud af hvilke elementer der indgår i efterproduktionsbehandlingen af Nanofil®8, og som muligvis forklarer den resterende del af giftigheden.

***In vivo* toksicitet.**

På basis af resultaterne fra *in vitro* studierne samt viden fra den videnskabelige litteratur blev følgende materialer udvalgt til dyreforsøg. CNT materiale 4, 5, og 8 som er en kort (Thomas Swan) og en lang enkeltvægget (Sigma) CNT samt en flervægget (Mitsui) CNT. Den mest giftige (Nanofil®9) og den mindst giftige (Nanofil®SE3000) blev udvalgt blandt organo-lerene. Ydermere blev Bentonit (udgangsmaterialet for organo-ler) og carbon black Printex 90 (reference materiale). Alle forsøg blev udført med tre doser (lav 18 µg, middel 54 µg og høj 162 µg) samt tre tidspunkter; akut (24t), intermediær (3 dage) og kronisk (28 dage)(Jacobsen et al., 2012b).

Alt efter deponeringsmodel og de inhalerede nanopartiklers præcise størrelse kan det forventes at en mus placeret i støvholdigt arbejdsmiljø ved grænseværdien for inert støv vil deponere mellem 2 og 4.5 µg/time. Dette medfører at de benyttede doser svarer til lidt under 1 arbejds dag (laveste), til

ca. 2 arbejdsdage (mellemste) og ca. 6 fulde arbejdsdage (højeste). Det skal dog noteres at vi på baggrund af in vitro resultaterne for Nanofil®9 valgte at fravige det valgte design (18, 54 og 162 µg/dyr) for denne partikel til fordel for en lavere eksponering (6, 18 og 54 µg/dyr). Vi har i NANOPLAST valgt at benytte instillation ved deponeringen af partiklerne i lungen af dyrene. Dette skyldes at en del partikler, som eksempelvis CNT kan være svære eller ligefrem farlige at aerosolisere på tilfredsstillende måde i laboratoriet. Andre fordele ved at benytte instillation er at den deponerede dose kan bestemmes præcist og kun varierer minimalt mellem dyrene. Vi har god dokumenteret erfaring med denne teknik, og leverer instillationer med partikler jævnt fordelt i hele lungen (Mikkelsen et al., 2011). Vi har her valgt at fokusere på tre udbredte endepunkter. Direkte celleskade målt som protein lækket fra cellerne til lungevæsken. Inflammation (betændelsestilstand) målt som antallet af neutrophile celler rekrutteret til lungen. Neutrophile celler er sammen med macrophager forsvarsværket som skal eliminere partikler fra alveolerne. Genotoksicitet (DNA skader) som eks. DNA streng brud. Øget genotoksicitet vil ofte medføre øget antal af mutationer og øget kræftisiko.

Tabel 3. Antallet af celleskader målt som mængden af cellevæske (cytocol protein) frigivet til lunge væsken. Subjektiv vurdering af alle resultater 3 doser (lav, mellem og høj) for hver af de 3 tider fordelt på skalaen -, +, ++, +++. NB: Doserne var for alle materialer 18, 54 og 162 µg/dyr dog ikke for Nanofil®9; 6, 18 og 54 µg/dyr.

	Bentonit	NanoFil se3000	NanoFil 9		Printex 90	Mitsui XNRI-7	Thomas Swan Elicarp Dry	Sigma Long
Celleskader								
Akut (24 timer)	++	-	+		-	+	+	+
Intermediær (3 dage)	+++	-	+		-	++	+	+
Kronisk (28 dage)	-	-	-		-	+	(+)	(+)

Tabel 4. Inflammation bestemt ved antallet af neutrophile celler i lungevæsken. Subjektiv vurdering af alle resultater 3 doser (lav, mellem og høj) for hver af de 3 tider fordelt på skalaen -, +, ++, +++. NB: Doserne var for alle materialer 18, 54 og 162 µg/dyr dog ikke for Nanofil®9; 6, 18 og 54 µg/dyr.

	Bentonit	NanoFil se3000	NanoFil 9		Printex 90	Mitsui XNRI-7	Thomas Swan Elicarp Dry	Sigma Long
Inflammation								
Akut (24 timer)	+++	+	+		++	++	++	++
Intermediær (3 dage)	+++	-	+(+)		+	+++	+	+
Kronisk (28 dage)	-	-	-		+	++	+	++

Tabel 5. Genotoksicitet målt ved Comet assay i skylbare lungeceller. Subjektiv vurdering af alle resultater 3 doser (lav, mellem og høj) for hver af de 3 tider fordelt på skalaen -, +, ++, +++. NB: Doserne var for alle materialer 18, 54 og 162 µg/dyr dog ikke for Nanofil®9; 6, 18 og 54 µg/dyr.

	Bentonit	NanoFil se3000	NanoFil 9		Printex 90	Mitsui XNRI-7	Thomas Swan Elicarp Dry	Sigma Long
Genotoksicitet								
Akut (24 timer)	+++	-	+		++	++	+	+
Intermediær (3 dage)	-	++	(+)		+	++	(+)	-
Kronisk (28 dage)	-	-	(+)		+	++	-	-

Resultater Bentonit og organo-ler

For Bentonit viste resultaterne at på trods af lav giftighed *in vitro*, forårsagede Bentonit akut et meget højt niveau af celleskader, inflammation og genotoksicitet (Tabel 3, 4 og 5). Der blev ikke observeret nogen kronisk effekt eftersom alle tre parametre var normaliseret en måned efter eksponeringen (Jacobsen et al., 2012b).

Nanofil®SE3000 udviste *in vitro* effekter meget lig Bentonit, men i dyreforsøgene viste alle tre endepunkter at den var mindre giftig end Bentonit. En mulig forklaring er at de skarpe kanter (knivsæg) på Bentonitten bliver lidt mere "sløve" på Nanofil®SE3000 når en lang række af de mindst giftige QAC er påsat. Samtidig ses der på SEM billeder af Bentonit hundredvis af enkelte ler plader. Dette observeres ikke på SEM billeder af de fire organo-ler præparaterne som er mere klistret sammen (Jacobsen et al., 2012b).

For Nanofil®9 observeredes mange celleskader, inflammation og en svag men vedvarende genotoksicitet (Tabel 5). Efter de kraftige effekter observeret *in vitro* var det overraskende at Nanofil®9 ikke var mere potent i dyrestudierne. Denne forskel kan skyldes at luftvejenes slimproteiner kan inaktivere benzalkonium chlorid, som er hovedbestanddelen på overfladen Nanofil®9. Den meget svage men langvarige genotoksicitet observeret ved Nanofil®9 skyldes sandsynligvis indholdet af benzalkonium QAC som også før er vist genotoksisk i doser benyttet til konservering af næsesprays (Deutschle et al., 2006).

Konklusion

Samlet set er der ingen eller meget begrænset kronisk effekt efter instillation af de testede organo-ler og Bentonit. Det skal dog understreges at Nanofil®9 ikke blev testet ved så høje doser som de andre materialer, samt at den udviste længerevarende meget svag genotoksicitet også observeret af andre (Deutschle et al., 2006). Derudover vil det være forventeligt at mekanismen bag inaktivering af benzalkonium QAC på overfladen vil have en begrænset kapacitet hvorefter giftigheden øges hastigt.

Resultater Printex 90 og kulstofnanorør

Carbon black Printex 90 forårsagede ingen øget protein i lungen som følge af direkte celleskade (Tabel 3), hvilket er i overensstemmelse med observationerne *in vitro*. Derimod observeredes vedvarende inflammation og genotoksicitet (Tabel 4 og 5). Mekanismen bag den øgede genotoksicitet formodes at være en høj produktion af reaktive oxygen molekyler fra Printex 90 (Jacobsen et al., 2008b; Jacobsen et al., 2011). Vi har ydermere vist at genotoksiciteten fra Printex 90 kunne findes i lungeskylceller, i lungevævet samt i leveren gennem hele perioden (1, 3 og 28 dage) (Bourdon et al., 2012a; Bourdon et al., 2012b).

Alle 3 CNT forårsagede direkte celleskader i højere grad end Printex 90 (Tabel 3). Kraftigst for den stiveste flervægget fiber (Mitsui) efterfulgt af den lange og korte enkeltvægget CNT. Alle materialer forårsagede vedvarende inflammation (Tabel 4), men også her var responset kraftigst efter udsættelse for Mitsui og lange enkeltvægget CNT. Den vedvarende inflammation

udmundede sig i genotoksicitet som for Printex 90 og Mitsui viste sig at være vedvarende og for de tynde enkeltvægget CNT (Thomas Swan og Sigma Long) var kortvarig (Tabel 5).

Konklusion

Samlet set er det bekymrende at alle tre udvalgte kulstofnanorør forårsager langvarig inflammation og celledskader. Der er naturligvis en særlig bekymring omkring inhalation af biologisk ikke-nedbrydelige fibre. Hvis det inflammatoriske respons ikke formår at fjerne fibre, kan man forstille sig at de på sigt kan forårsage lignende sygdomme som eks asbest fibre. I denne forbindelse er det ikke overraskende at den stive, tykke fiber (Mitsui) (Palomäki et al., 2011) giver kraftigere effekter på alle parametre end de tynde fibre som nemt krøller sammen, og derfor nemmere kan fagocyteres af makrofager og neutrophile celler.

Eksponering

Delprojekt 3's formål var at måle emissioner samt vurdere eksponeringsrisiko ved fremstilling, bearbejdning og anvendelse af plast med eller uden organo-ler og kulstofnanorør.

Støveksponering i plastindustrien kan forekomme ved håndtering af pulverformige råmaterialer herunder også i up-stream virksomheder, der forblender råmaterialer (compoundering), under fremstilling samt ved efterfølgende bearbejdning. Selv i skrivende stund findes kun meget få målinger af eksponering for tekniske nanopartikler og de fleste er i forbindelse med håndtering af råmaterialer. Disse og egne undersøgelser, især fra NANOKEM-projektet og Arbejdsmiljøkataloget, (Kristensen et al., 2010) viser, at der især er fare for eksponering for frie partikulære nano-materialer i processer, hvor pulver håndteres eller doseres. Som diskuteret i indledningen findes der stadig kun spirende og ingen generaliserbar viden omkring eksponeringsfaren ved bearbejdning af nanokompositer, se f.eks. (Bello et al. 2009; Bello et al., 2010; Göhler et al., 2010; Koponen et al., 2009; Koponen et al., 2011; Wohlleben et al., 2011). Endnu mindre viden findes ang. de toksiske egenskaber for støv genereret ved bearbejdning af nanokompositer sammenlignet med kompositer uden nanopartikler (se (Wohlleben et al., 2011; Saber et al., 2011b)).

I dette projekt blev eksponeringsfaren for de fire forskellige organo-ler-pulvere (Nanofil®5, 8, 9, og SE3000) evalueret vha. støvningstest i en miniaturiseret EN15051 roterende støvtromle i forhold (Schneider and Jensen, 2008). Til sammenligning med organo-ler-pulverne testede vi også støvningen fra det konventionelle Bentonit, som er det principielle udgangspunkt for organo-ler. Et specielt studium undersøgte om kort-tids-kompaktering af et af organo-ler pulvere (Nanofil®5) og Bentonit kunne medføre ændringer i den potentielle eksponeringsfare (Jensen et al., 2009). Der blev ikke lavet støvningstest af kulstofnanorør, idet NFA i projektperioden ikke kunne håndtere de store mængder af potentielt meget sundhedsfarlige kulstofnanorør i vores laboratorier til støvningstest.

Procesrelaterede målinger af luftkoncentrationer og personlig eksponering blev foretaget i forbindelse med udportionering af kulstof nanorør fra batch beholdere til mindre prøve glas, hvor arbejdet blev udført i et midlertidigt isoleret arbejdsområde i form af et "asbestelt" (Jensen et al., 2012a). Dette arbejde blev udført af en professionel virksomhed med ekspertise i asbest-sanering. Vi gennemførte også måling af partikelniveauet og den personlige eksponering for inhalérbar støv under produktion af reference plast og polymer nanokompositer (PNC for Polymer Nano Composites) af termoplast med organo-ler i hele processen fra håndtering og (manuel) blanding af organo-ler og polymer, compoundering i en "twin-screw extruder" og sprøjtestøbning. Desuden blev der målt for flygtige og mindre flygtige organiske stoffer (VOC, SVOC og carbonyl-forbindelser). Målingerne blev foretaget på et pilotanlæg på Teknologisk Institut. Resultaterne af dette arbejde vil blive skrevet sammen i en videnskabelig artikel. Resultaterne af eksponeringen under blanding af polymer og organo-ler og compounderingen præsenteres i det følgende.

Endelig blev der foretaget en modellering af eksponeringsfaren under håndtering af de enkelte pulvere i forskellige arbejds-scenarier. Modelleringen blev foretaget vha. den nyligt reviderede eksponeringsalgoritme i NanoSafer (<http://nanosafer.i-bar.dk/>), som netop er indsendt til review som en videnskabelig artikel (Jensen et al., 2012b). Nøgleparametrene i eksponerings-

beregningerne er støvningsindekset og de kontekstuelle forhold, som bla. omfatter total mængde håndteret, doseringsrate, ventilationsrate, rumstørrelse m.m.

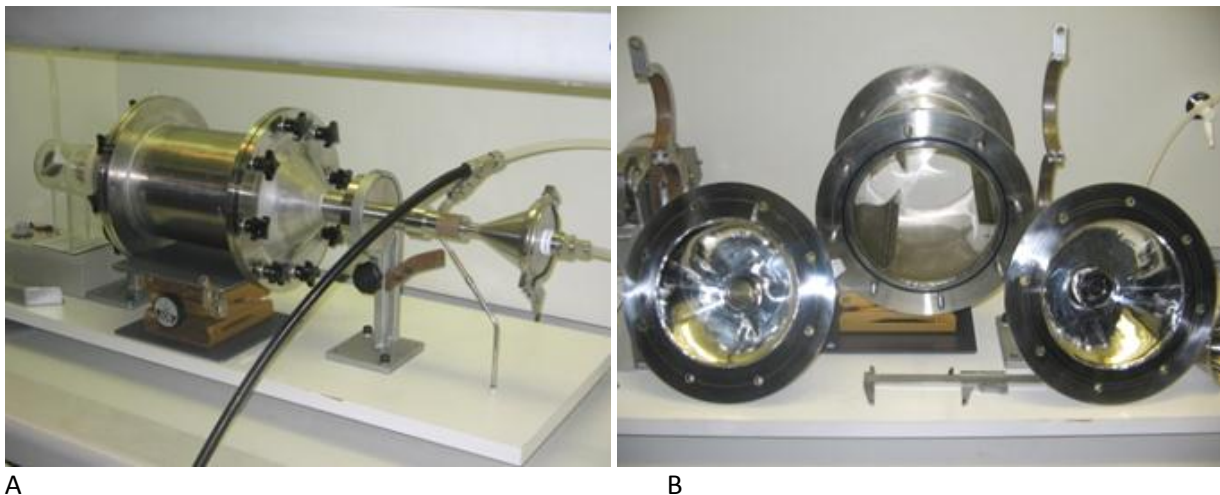
Støvningstest af organo-ler og Bentonit

Forsøgsopstilling

Støvningstest er foretaget med en roterende støvtromle iht. den europæiske standard EN15051, hvor tromlen dog er nedskaleret til test af nanopartikulære pulvere (Schneider and Jensen, 2008). Figur 9A viser tromlen monteret med filter-sampler og dens indre opbygning med tre flancher (Figur 9B).

I korte træk udføres testen ved at lægge ca. 6 g pulver på kanten af en af tre indre flancher i tromlen. Herefter lukkes tromlens ender og prøven ækvilibreres med test-atmosfæren på 50%RH i 1 minut. Herefter udføres først et drop ved at rotere tromlen en halv omgang og tromlen stoppes i 3 minutter. Herefter roteres tromlen i 1 minut efterfulgt af 3 minutters fortsat filteropsamling af inhalérbart støv og on-line måling af partikler med en Fast Mobility Particle Sizer (FMPS) Model 3091 og en Aerodynamic Particle Sizer (APS) Model 3321, som hhv. måler partikler i størrelsesintervallet 6,3 – 523 nm og 523 nm til 18,43 µm; alle er kanal midtpunkter. Filtrene (Cellulose-esther; med 0.8 µm porestørrelse) blev indvejet og udvejet ved 50%RH efter mindst 24 timers ækvilibrering i et klimakontrolleret vejerum. Vejetal blev korrigeret vha. blindfiltre.

Massen af det opsamlede støv anvendes til beregning af støvningsindekset (mg/kg pulver), som korrigeres for andelen (9/11 l/min) af det totale flow, der anvendes til filteropsamlingen. Hhv. 1 l/min blev opsamlet af APS'en og FMPS'en og fortyndet med hhv. 1:5 og 1:9.

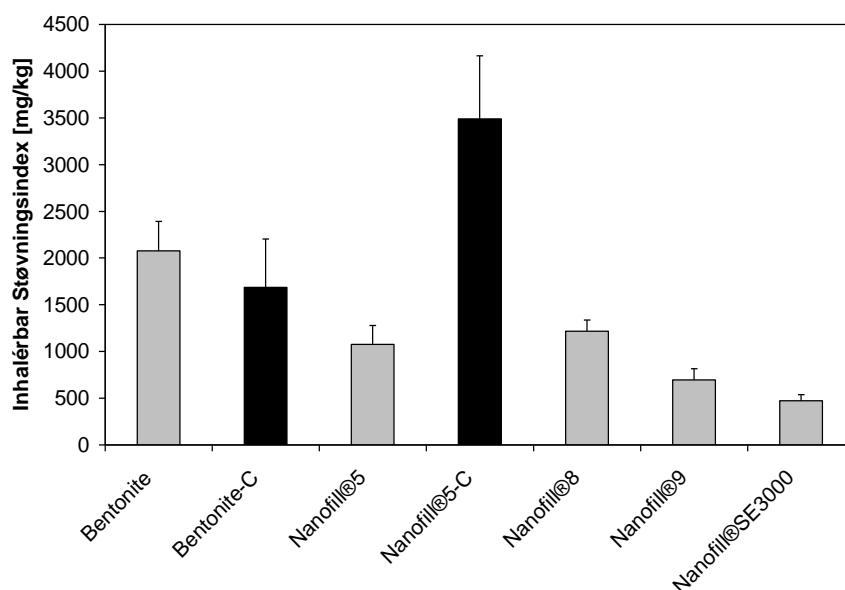


Figur 9. Den roterende støvtromle. a) Monteret i oprindelig opstilling. b) tværsnitsbillede af den cylindriske centrale del af tromlen i centrum og de koniske endestykker på hver side.

En særlig undersøgelse blev udført for at undersøge den mulige effekt af kortvarig uniaxial kompaktion ved 3.5 kg/cm² (Jensen et al., 2009).

Resultater

Resultaterne fra støvningstestene er vist i Figur 10. Det ses at støvningspotentialer for organo-ler-produkterne er lavere end for Bentonit og at støvningsniveauet varierer fra lavt (100 – 1000 mg/kg) til moderat (1000 – 5000 mg/kg) iht. kategorierne in EN15051. Nanofil®SE3000 og Nanofil®8 er hhv. det mindst og mest støvende af organo-ler-produkterne. Det er bemærkelsesværdigt at støvningsindekset i rotationstesten for organo-ler (eksemplificeret ved Nanofil®5) øges (ca. 225%) efter kortvarig kompaktering, mens niveauet falder svagt (ca. 20%) ved kompaktering af Bentonite (Jensen et al., 2009). Denne forskel formodes at skyldes at organo-ler-produkterne består af granulerede partikler (se SEM billederne på figur 5), som brydes op ved kompaktering.



Figur 10. Det inhalerbare støvningsindeks for Bentonit og de fire organo-ler materialer, kaldet Nanofil®#. Søjlerne med sort farve materiale markeret med "C", er støvningsindekset for prøver udsat for 5 min kompaktion ved 3,5 kg/cm².

Støvet generet ved støvningstest har en multimodel partikelstørrelsesfordeling og hovedandelen af støvpartiklerne findes i området ca. 80 til 500 nm. Maksimumkoncentrationen findes ved ca. 400 nm (organo-ler) sammenlignet med 300 nm for Bentonit. Større støvpartikler har en maksimumkoncentration ved ca. 1 og 2,5 µm (Jensen et al., 2009).

Konklusion

Det inhalerbare støvningsindeks for de fire testede organo-ler produkter Nanofil®5, 8, 9, og SE3000 er lavt til moderat og i frisk upåvirket pulver mindre end den er for det konventionelle lerprodukt, Bentonit. Partikelantal-størrelsesfordelingen i støvet er domineret af partikler i området 80 til 500 nm med toppe omkring 300 til 400 nm. Kompaktion af det granulerede organo-ler kan forøge støvningsindekset markant til mere end det dobbelte, mens det reduceres for konventionelt Bentonit. Dette viser, at de specifikke arbejdsmetoder og håndteringen af pulvere kan betyde meget i forhold til den potentielle eksponering ved et givent produkt.

Dosering af polymer-granulat og nano-ler under compounding i udviklingslaboratorium

Aktivitet

Der udføres blanding af polyethylen-granulat og organo-ler i spand med låg, herefter hældes blandingen i vibrationsføder (doseringsapparat) som doserer blandingen henover sliske og ned i tragt til en "twin-screw extruder". Der anvendes fire typer organo-ler (Nanofil®5, -8, -9 og -SE3000), som alle er funktionaliseret montmorillonit-ler (Bentonit), hvor alkali-ioner er udbyttet med forskellige koncentrationer og sammensætninger af langkædede organiske molekyler, såsom benzalkonium QAC.

Lokalet og ventilationsforhold

Laboratoriet var ca. 14 langt, 7 m bredt og ca. 4 m højt. Lokalet indeholder en mindre laboratorie-skala "twin-screw extruder" til polyethylen produkter samt vandbad og cutter, strømstyringsanlæg, en høj-temperatur ovn samt et par skabe langs den ene væg (Figur 11). Rummet havde flere lokal-udsug, hvor det ene var et emfang, der hang over "skorstenen" på twin-screw ekstruderen. Der var vinduer i den ene ende af lokalet og adgang til et nabo-laboratorium gennem en skillevæg. Indgangen til laboratoriet sker gennem en ståldør.

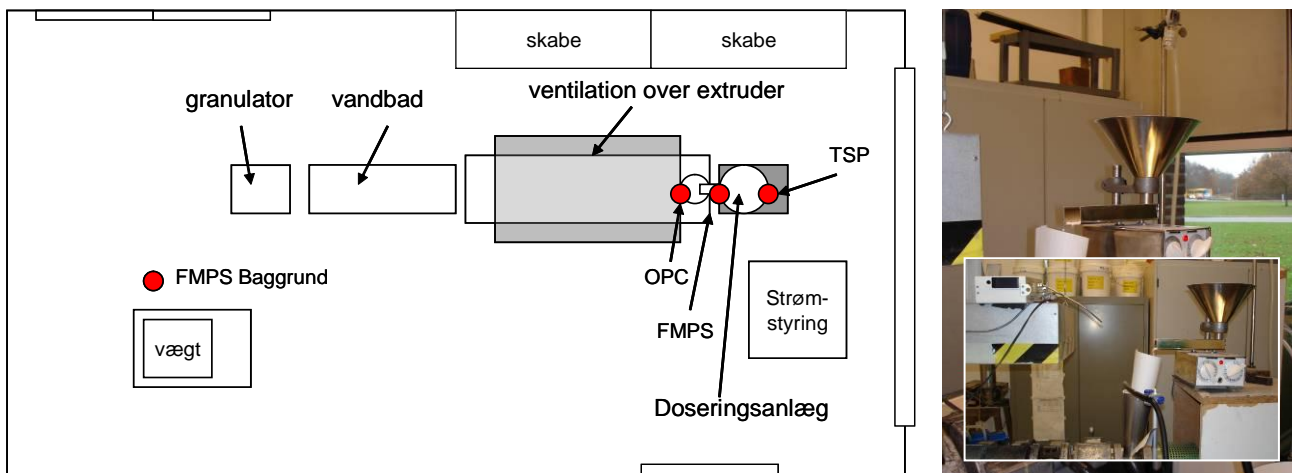
Måling

Luftkoncentrationen af VOC måles ved opsamling på Tenax og efterfølgende TD-GC-MS analyse som før beskrevet (Clausen et al., 2008). SVOC måles ved opsamling på glasfiberfilter/ adsorbent som tidligere beskrevet (Clausen and Wolkoff, 1994) med efterfølgende ASE ekstraktion og GC-MS analyse, se fx (Clausen et al., 2012b). Desuden blev der målt carbonyl-forbindelser med DNPH-rør som tidligere beskrevet (Clausen et al., 2001)

Partikler måles med to FMPS'er, én GRIMM Dustmonitor Model 1.108 og ingen CPC i denne opstilling. Desuden blev der foretaget personbåren og stationær måling af totalstøv (TSP) på Teflon filtre monteret i Millipore cassetter og luftopsamling med Vortex pumper (beskrevet i Tabel 1). Placering af aktivitetsmålingen er vist i Figur 11. Denne ene FMPS anvendes til baggrundsmåling, mens de andre instrumenter anvendes til måling af støv ved doseringsapparat, hvor udgangsmaterialer (polyethylen granulat blandet med pulver af forskellige typer organo-ler) doseres ned i en tragt til twin-screw ekstruderen. Faldhøjden fra doseringsapparatet og bunden af tragten er ca. 30 cm. Granulat og pulver guides ned til tragten gennem en papir-tragt, som er sat ind i stål tragten for at mindske støv og spild.

Arbejdsprocedure

Operatøren blandede 1 kg polyethylen granulat og 10 g organo-ler pulver i en plastikspand ved kraftig omrystning med hænderne. Blandingens kontrolleres visuelt og godkendes, når man ikke mere kunne se frit organo-ler-materiale af betydning i bunden af spanden (Figur 12A). Efter opvarmning af ekstruderen (gjort inden blandingen foregår), blev granulat-organo-ler blandingen hældt ned i en vibrations-føder og dosering blev påbegyndt. Doseringen skete automatisk ved at granulat-pulver blandingen langsomt blev rystet ud på en svagt hældende sliske som leder blandingen hen til frit fald ned i tragten til sneglene i ekstruderen. Systemet er delvist åbent. Operatøren anvender ikke værnemidler. Efter ekstrudering blev polymer-strengen kølet i vandbad og skåret til polymer-pellets (Figur 12B) som blev anvendt til produktion af plast test-emner ved sprøjtetøbning (Figur 12C), hvor målingerne ikke viste emissioner over baggrundsniveau og yderligere rapportering er ikke gjort i denne rapport.



Figur 11. Skitse af laboratoriet og målepositioner under måling af granulat-pulver dosering i twin-screw ekstruder. Til højre ses fotografier af måleposition med OPC og FMPS (sort slange) ved vibrations-føderen og TSP filteropsamler umiddelbart over tragten i vibrationsføderen.

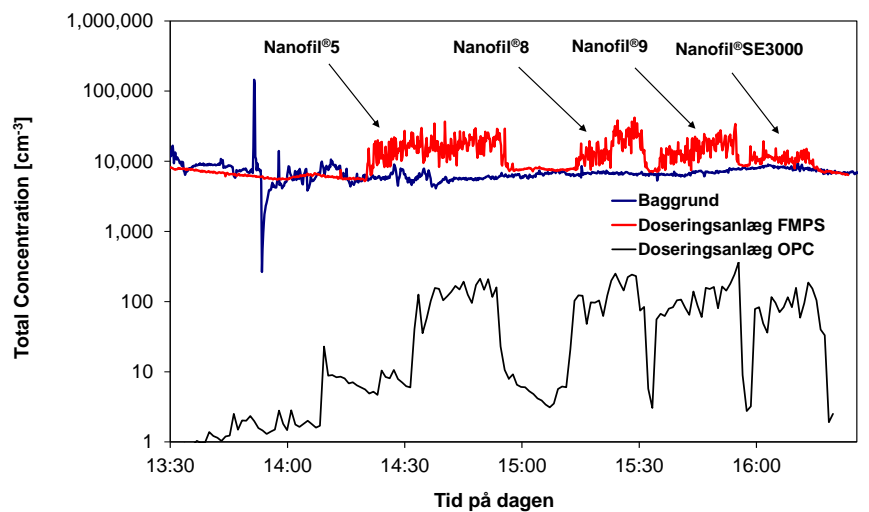


Figur 12. A) Inspektion af blandet granulat og pulver. B) Twin-screw ekstruder med emfang over systemets skorsten og kølekar til venstre i billedet. I forgrunden ses GRIMM OPC; desuden ses små blå pumper forbundet til prøvetagere til opsamling af VOC og SVOC. C) Sprøjtstøbemaskine

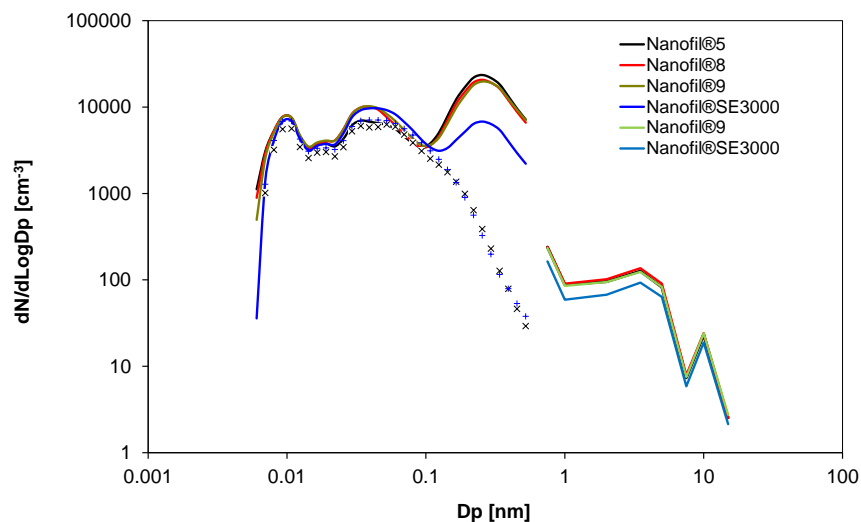
Resultat

I luften omkring ekstruderen blev der kun fundet VOC og carbonylforbindelser, der typisk dannes ved termisk nedbrydning under ekstrudering af polyethylen (Tikuisis et al., 2010; Patel and Xanthos, 2001), polystyren (Patel and Xanthos, 2001; Patel and Xanthos, 1995), og polymethylmethacrylat (Manring, 1991) og tilmed i meget lave koncentrationer. Der blev slet ikke fundet SVOC i luften. Det skal også bemærkes her at koncentrationerne af de målte stoffer ligeledes var meget lave i luften omkring sprøjtstøbemaskinen. Dette var også forventeligt da maskinen var indkapslet og at der udsug lige over den.

Undersøgelsen viste at der var synligt støv i luften da operatøren undersøgte om granulat og organo-ler blandingen var blandet tilfredsstillende. Der var ingen brugbare on-line målinger af dette. I forhold til baggrundskoncentrationen, så viste partikelmålingerne dog en tydelig forøgelse (faktor 1,6-2,4) i koncentrationen af fine partikler ved vibrationsfoderen, når den doserede organo-ler-polyethylen blanding ned i twin-screw ekstruderen (Figur 11 og Tabel 6). Partikelstørrelsesfordelingen blev også forandret med en klar forøgelse af partikler mellem ca. 100 og 500 nm samt mellem 750 nm og 15 μm (Figur 13). Partikler mindre end 100 nm er primært emissioner fra twin-screw ekstruderen og partikler i indtrængende udendørsluft. Den største kilde til partiklerne er generelt støv fra doseringen af granulat-pulver blandingen.



a)



b)

Figur 13. A) Variation i partikelstørrelsesfordelingen ved vibrationsfoder på twin-screw ekstruder under dosering af blandinger med polyethylen granulat blandet med fire forskellige organisk funktionaliserede organo-ler materialer. B) Gennemsnitlig partikelstørrelsesfordeling af fine partikler i luften ved doseringsapparat under dosering af de fire forskellige organo-ler-granulat blandinger sammenlignet med partikelfordelingen 2-5 min før og efter dosering påbegyndes.

Tabel 6 viser resultaterne fra målingerne af partikkelkoncentrationerne og totalt suspenderet støv (TSP). TSP havde relativt høje niveauer ved doseringsapparatet (1,484 mg/m³) og det personlige eksponeringsniveau var også højt (0,420 mg/m³) taget de små anvendte pulvermængder i betragtning. De relativt høje TSP niveauer er værd at notere, da målingerne af partikelstørrelsen med OPC viste at der stort set ikke er støvpartikler større en 10 µm og de fleste er under 5 µm. Resultaterne fra denne undersøgelse gav anledning til ændring af opstilling og procedurer. Herunder forsøg på at mindske eksponering under blanding af granulat og pulver ved at lade blandingen stå en vis periode før kontrol og anvendelse af personlige værnemidler.

Tabel 6. Støv- og FMPS partikel-koncentrationer ved pulverhåndtering og doseringsapparat til twin-screw ekstruder.

Sted	TSP Rumluft (mg/m ³)	TSP Personlig (mg/m ³)	Partikkelkoncentration £ (cm-3)	Max £ (cm-3)	Min £ (cm-3)
NANOFIL®5	1.484 [2,2 timer]	0,420 [2,2 timer]	1,621 e4	3,680 e4	5,440 e3
NANOFIL®8			1,608 e4	4,190 e4	7,010 e3
NANOFIL®9			1,599 e4	3,400 e4	7,450 e3
NANOFIL®SE3000			1,037 e4	1,930 e4	6,910 e3
Baggrund§	----	----	6,651 e3	9,480 e3	4,100 e3

§ Baggrunden blev bestemt som gennemsnittet målingerne fra begyndelse af dosering med Nanofil®5 til afslutning af dosering af Nanofil®SE3000.

£ Partikkelkoncentrationerne blev bestemt med FMPS (5,6 – 560 nm) og alle minimum og maksimum værdier er midlet over 20 sek.

Konklusion

Undersøgelsen indikerede at der kan være signifikant eksponering for organo-ler og andet støv under pulverblanding og dosering under plastproduktion vha. twin-screw ekstrudering i udviklingslaboratorier. Den potentielle eksponering kunne måles med både filter, partikkelkoncentration og partikelstørrelsesmålinger, selvom der kun blev anvendt 10 g af hver organo-ler-type. Støv kunne også ses visuelt under kontrol af blandinger i spand. Det anbefales at være opmærksom på arbejdsprocedurer og som minimum anvende personlige værnemidler (handsker, kittel og åndedrætsværn) ved arbejde med små pulver-mængder uden lokal ventilation. Resultaterne fra undersøgelsen gav anledning til ændring af opstilling og arbejdsprocedurer.

Udportionering af MWCNT i højventileret arbejdstelt

Aktivitet

Udportionering af ca. 0,5 kg Cheap Tubes (NT6) og 2 kg Mitsui XNRI-7 (NT5) flervæggede kulstofnanorør i glas-beholdere af blue-cap typen. Arbejdet blev udført på en forskningsinstitution (NFA) af et professionelt asbestsaneringsfirma. Hovedresultater fra denne undersøgelse er

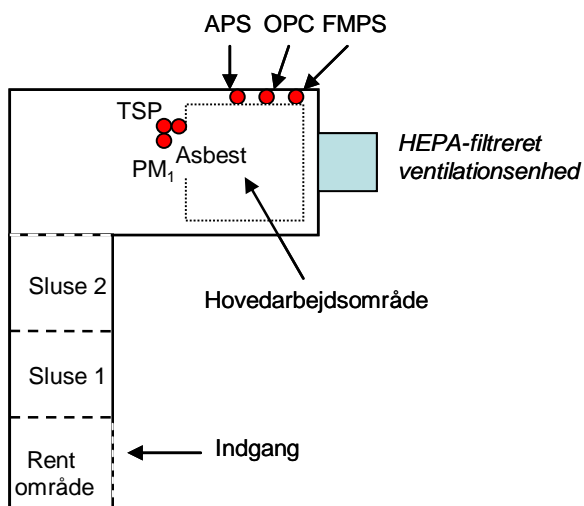
publiceret i en offentlig tilgængelig rapport af Kristensen et al. (2010) og en videnskabelig artikel er under udarbejdelse.

Lokalet og ventilationsforhold

Der blev opbygget et 2-zones arbejdstelt i et hjørne af en parkeringskælder (Fig. 14). Teltet var baseret på et træskelet, som blev beklædt med kraftig klar plastik hele vejen rundt, så både loft og gulv var beklædt. De to zoner var forbundet med et plastikforhæng og den første zone (1,8 m lang, 0,6 m bred og 1,8 m høj) fungerede som indgang og to sluseovergange adskilt med plastikforhæng. Den anden zone (2,1 m lang, 0,9 m bred og 1,9 m høj) var selve arbejdsrummet, hvor udportioneringen foregik. En stor vakuumpumpe med Grovpartikel- og HEPA-filtre (Pullman Ermator A600 HEPA) var monteret i teltet for enden af arbejdszonen, således at rumluften udenfor teltet kunne føres igennem teltet med et kraftigt sug (550 eller 60 m³/time) med retning fra indgangspartiet til den lukkede ende af arbejdszonen. Afkastet fra pumpen blev ført ud af parkeringskælderen via en slange, hvilket er standard procedure ved asbestsanering. Der blev også etableret et vindue i dobbelt-lag transparent plast for enden af arbejdszonen, som gjorde det muligt at se og signalere med operatøren under arbejdet.

Måling

Der blev målt med tre direkte visende måleinstrumenter (FMPS, APS og OPC). Desuden blev der opsamlet totalstøv (TSP), PM₁, og støv på asbest-opsamlingsfiltre. De direkte visende måleinstrumenter opsamlede luften i arbejdsteltet via sonder monteret gennem siden af i teltet, ved siden af operatørens arbejdsområde (Fig. 14). Alle stationære instrumenter målte i 150 cm højde. Observationer af operatøren viste, at han ofte arbejdede i lavere højde end opsamlingen foregik. De stationære filtersamlere var placeret på et stativ i samme ende af teltet som prøvetagnings-sonderne til det direkte visende udstyr (Fig. 14). Der blev ikke foretaget baggrundsmålinger i arbejdsområdet grundet instrument-fejl.



Figur 14. Til venstre ses skitse af "arbejdsteltet" til udportionering af kulstofnanorør og med indikation af målingernes placering. Til højre ses fotografiet af operatør er taget gennem plastvindue. Operatøren er iført værnemidler og i gang med at overføre CNT til blue-cap flasker gennem en tragt.

Arbejdsprocedure

Materiale-tønder og flasker til udportionering af produkterne blev ført ind i arbejdsteltet. Pga. pladsforholdene blev materiale-tønderne taget ind og tømte en ad gangen. Tønderne indeholdt alle MWCNT i en stor plasticpose som forsigtig blev åbnet og materialet blev udportioneret i flaskerne ved anvendelse af forskellige størrelser stål-ske, glas-tragt (senere plast-tragt, da glas-tragten gik i stykker), og glas-spatel til at skubbe det statiske pulver gennem tragten. Operatøren arbejdede som hovedregel med tønden med pulvermaterialet imellem sig og ventilationsudstyret, så han var mindst muligt eksponeret. Rengøring af beholdere, operatør mv. blev foretaget med en asbest-støvsuger før passage til første del af slusen. Beholderne blev efter støvsugning aftørret to gange med spritvædede engangsservietter og en gang med tør serviet.

Ved udgang kunne operatøren efter støvsugning tage dragt og værnemidler af, inden han gik ud til indgangspartiet. Operatøren var udstyret med heldragt i Tyvek®, engangsåndedrætsværn, øjenværn, engangshandsker og arbejdssko. Inde i forløbet blev det valgt at tape overgange mellem handsker og heldragt for at forhindre kontaminering op langs armene. Engangsværnemidlerne blev lagt i plastposer, som blev lukket, og derefter lagt ud i sluse 2 og smidt ud sammen med teltet som special-affald. Dette er også standardprocedure ved asbestsanering. Det høje sikkerhedsniveau blev valgt idet toksikologiske studier de seneste år har vist at der er risiko for at visse MWCNT kan være alvorligt sundhedsskadelige (Takagi et al., 2008; Poland et al., 2008; Sakamoto et al., 2009).

Resultat

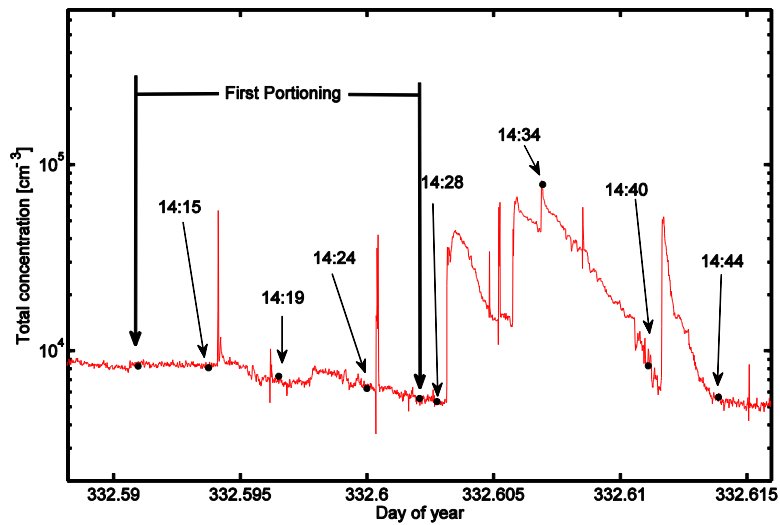
Det viste sig at være vanskeligt at håndtere og kontrollere støvudviklingen fra de to typer MWCNT. NT6 var et løst pulver som overvejende bestod af kornede partikler af CNT, mens NT5 var et meget løst fnugget materiale. Den løse pulverkarakter gjorde at ventilationsraten til tider måtte ændres til det lave niveau, idet pulveret i visse tilfælde nærmest blev suget op af pulver-beholderne og måleskeen ved det maksimale udsug, som normalt anvendes ved asbestsanering. Det viste sig også at være vanskeligt at få MWCNT til at glide ned i prøveflaskerne pga. den lave partikel densitet og pakning i pulvertragten. Derfor skulle pulverne normalt hjælpes gennem tragten med spatlen.

Partikelkoncentrationen var relativ lav (typisk $< 10.000 \text{ cm}^{-3}$) under udportioneringen (Tabel 7). Der var dog kortvarige høje koncentrationer (typisk $< 50.000 \text{ cm}^{-3}$), som kan kobles til operatørens aktiviteter. Disse forhøjede partikelkoncentrationer skyldtes partikler i området 100-300 nm, men også af partikler mellem ca. 10 og 100 nm (Fig. 15).

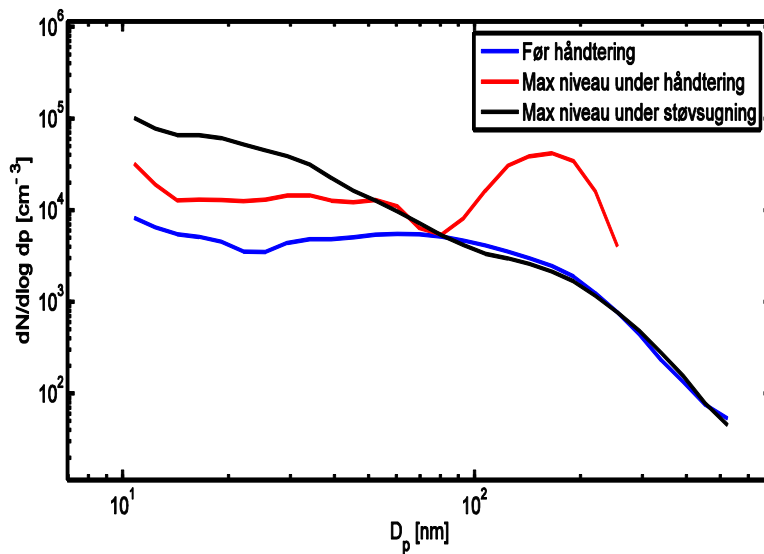
Rengøring af flasker og operatør med brug af industri-støvsugeren medførte en generel højere partikelkoncentration i måleområdet (typisk $1-10 \text{ e}4 \text{ cm}^{-3}$) end CNT håndteringen og var domineret af ca. 10 nm store partikler (spænd: 5-80 nm). Det er velkendt at støvsugermotorer udsender partikler i dette størrelsesområde.

De generelt lave målte partikel-antalskoncentrationer indikerer, at der kun var moderate koncentrationer MWCNT's ved de stationære målepositioner. Vi noterede at operatøren i lange perioder arbejdede i lavere højde end den vi målte i. Dette betyder, at der mest sandsynligt har

været en væsentlig forskel på den målte partikelkoncentration med stationære prøvetagere/partikelmålere og den aktuelle eksponering.



A



B

Figur 15. A) Kurven viser variationer i partikelkoncentrationen under udportionering af NT6 og efterfølgende rengøring med flere episoder af støvsugning (de høje koncentrationer). B) Kurverne viser partikelstørrelsesfordelingen i udsugningsteltet før udportioneringen går i gang, under udportionering af MWCNT-1 og under støvsugning i den efterfølgende rengøring.

For filtermålingerne diskuterer vi resultaterne for PM_{10} og TSP. Alle PM_{10} målingerne var alle under detektionsgrænsen og data er ikke anført. Der var synligt MWCNT støv på alle TSP filtrene, mens der i enkelte tilfælde slet ikke var synligt støv på PM_{10} filtrene. De personbårne TSP koncentrationer viste en eksponering omkring $0,2 \text{ mg/m}^3$ under udportionering af begge typer CNT (Tabel 7). Der var dog problemer med at noget af materialet hoppede af filtrene og satte sig på filter-underlaget ved udvejning af netop disse to filtre pga. MWCNT's meget stærke statiske elektricitet. Flere

prøver viste at CNT også satte sig på siderne af filterkassetterne, som antyder at de reelle koncentrationer er højere end de målte.

Tabel 7. TSP og partikelkoncentrationer målt under udportionering af to typer MWCNT

Sted	TSP Rumluft (mg/m ³)	TSP Personlig (mg/m ³)	Partikelkoncentration (cm ⁻³)	Max (cm ⁻³)	Min (cm ⁻³)
Aktivitet MWCNT-1	0,205 [0,50 timer]	> 0,212 [0,73 timer]	7.605	5,636 e4	3.540
Baggrund	----	----	----	----	----
Aktivitet MWCNT-2	< LOD [1,25 timer]	> 0,178 [1,42 timer]	1,684 e4	2,871 e4	4.209
Baggrund	----	----	----	----	----

Konklusion

Det er en udfordring at håndtere store mængder MWCNT og samtidigt opretholde et minimalt eksponeringsniveau uden anvendelse af personlige værnemidler. Pulveret støver let (er luftigt) og er statisk. Der ses klare indikationer på eksponeringsfare, men niveauerne er usikre idet der endnu ikke findes validerede on-line målemetoder for CNT og resultater fra filteropsamling kan være delvist misvisende pga. tab af partikler under filterflytning og deponering på væggene i opsamlingskassetterne. Det anbefales at arbejde med at opretholde et højt sikkerhedsniveau, når man arbejder med CNT og udvikle arbejdsprocesserne ift. ventilation og praktisk opstilling. Specielt skal man være opmærksom på åbninger i beklædning og efterfølgende vask for at forhindre kontaminering af arme og ansigt. I den specifikke opgave kunne selve udportioneringen gøres lettere ved bla. at anvende beholdere og trage med større åbninger og anvende antistatiske materialer.

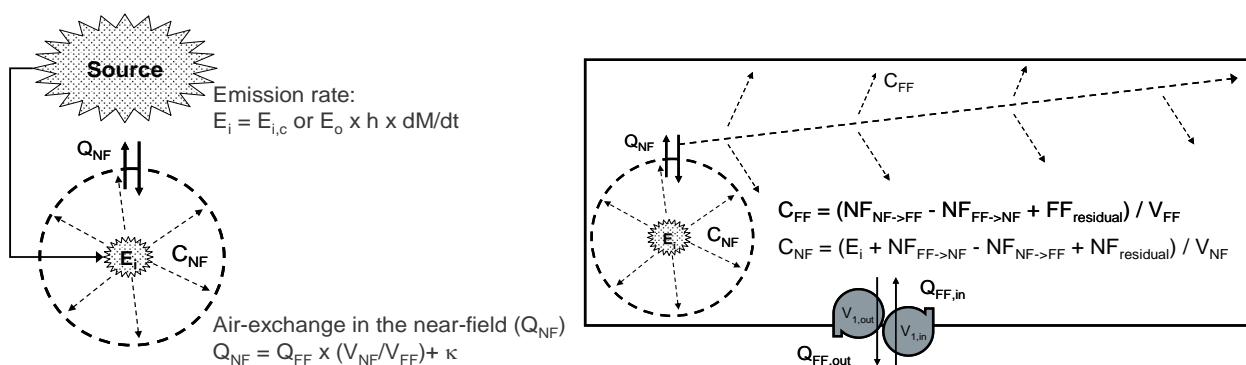
Teoretisk modellering af eksponeringsniveauer

Idet de to arbejdspladsmålinger kun repræsenterer to specifikke arbejdsituationer anvendte vi eksponeringsalgoritmen i NanoSafer (<http://nanosafer.i-bar.dk/>) til at beregne den potentielle eksponering i tre forskellige industri-skala arbejdsituationer. Den detaljerede model vil blive publiceret i en videnskabelig artikel. Modellen beregner kun det potentielle eksponeringsniveau uden anvendelse af værnemidler udover generel ventilation. Derfor betragtes disse værdier som "worst case".

Metode

Figur 16 giver et simplificeret indblik i modellen og dens metoder for beregning af eksponeringen i nær-området (near-field; NF) og arbejdslokalet generelt (far-field; FF). I korte træk, så er modellen en "two-zones NF" og FF beregningsmodel med antagelse af øjeblikkelig opblanding af støv i de to zoner. NF-zonen har en diameter på 205 cm og et totalt FF rumvolumen. Aktiviteten foregår

altid i centrum af NF. Emissionsraten (E_i) er givet ved enten konstant emission ($E_{i,c}$) eller støvningsindekset (E_o) multipliceret med en aktivitets energi-indeks (h_i) og masse-flowet (dM/dt), hvor tidsopløsningen er sat til 1 minut. Aktivitets energi-indeks'ene (Tabel 8) er inspireret fra det Hollandske Stoffenmanager (Tielemans et al., 2008). E_i fortyndes øjeblikkeligt voluminet af NF (V_{NF}). Luftkoncentrationerne modelleres herefter ved gentagen transport af lufttpakker mellem NF og FF for hvert minut. Udrensning af partikler sikres med ventilation med udendørsluft ($Q_{FF,out}$). Øvrige aerosoldynamiske processer er negligeret. Derfor antages de beregnede NF og FF støvkoncentrationer (C_{NF} and C_{FF}) at være "worst case".



Figur 16. Schematisk illustration af eksponeringsmodellen i NanoSafer. A) Illustration af definitionen på emissionsraten (E_i), emissionens fortynding i "near-field" (NF) og luftskiftet (Q_{NF}) mellem NF og "far-field" (FF), hvor κ er en thermal diffusionskonstant. B) Schematisk illustration af lufttransporten mellem NF og FF og ventilation med partikelfri udeluft (Q_{FF}). Beregningerne foretages normalt med en tidsopløsning på 1 minut og er baseret på E_i og støvtransport med luftskiftefunktioner for NF til FF ($NF_{NF \rightarrow FF}$); FF til NF ($NF_{FF \rightarrow NF}$); Q_{FF} , og residualt i hhv. NF ($NF_{residual}$) og FF ($FF_{residual}$) normaliseret i forhold til voluminet af NF (V_{NF}) og FF (V_{FF}). Transport og henfaldsfunktioner er baseret på funktionerne i Schneider et al. (2004).

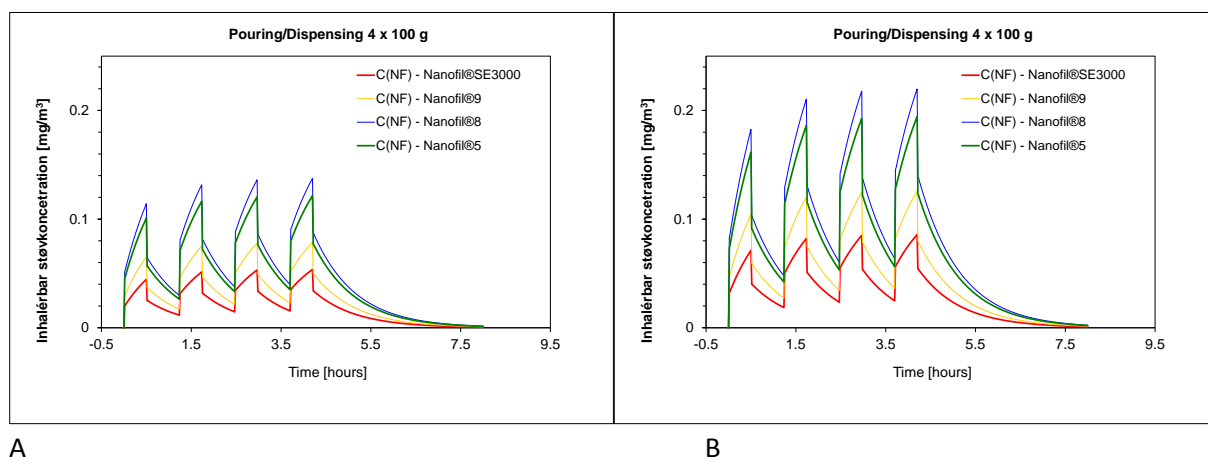
Tabel 8. Aktivitets-energi-faktorer til modifikation af støvningstest og beregning af emissioner.

Aktivitets-energi faktorer	Relative energi-skala	Eksempel på energi-niveau
h0	0.0	"Nul-energi" F.eks. transport af rene tromler, containere, sække mv.
h1	0.1	"Meget lav energi" F.eks. afvejning af nanomaterial med lille laboratorie-ske
h2	0.25	"Lav energi" Faldhøjde < 5 cm; håndtering af utætte eller kontaminerede sække mv.
h3	0.50	"Moderat energi" Faldhøjde 5 – 30 cm; vådblanding af pulver mv.
h4	0.80	"Høj energi" Faldhøjde 30 – 100 cm; ihældning, afsækning, tømme big-bags mv.
h5	1.00	"Meget høj energi" Faldhøjde >100 cm; tørblending, fejning, rengøring med trykluft

De teoretiske beregninger blev foretaget på to arbejdsituationer for hvert stof, hvor der anvendes 400 g pulver doseret over tid og tilføjet øjeblikkeligt med en faldhøjde på 30 cm i et 70 m³ laboratorium. Processen blev modelleret med en energi-faktor på 0.5 og 0.8 for hver proces for at undersøge den reelle forskel i dette grænseområde.

Resultater

Figur 17 og 18 viser resultaterne fra de to modelleringsforsøg og de estimerede akutte og 8-timers middelkoncentrationer er anført under figurerne. Resultatet viser at den store forskel i disse to arbejdsituationer findes i den akutte NF eksponering, hvor den største akutte eksponering ses i situationen med hurtig anvendelse af 400 g pulver sammenlignet med 4 gange 30 minutters langsom dosering. Forskellen er i størrelsesordenen 6.2. De absolutte modellerede akutte koncentrationsniveauer er op til 0,4 – 1,1 mg/m³ for ophældning af 400 g pulver på 1 minut sammenlignet med 0,07 – 0,18 mg/m³ for 4 ganges dosering af 400 g. Disse resultater viser vigtigheden af de kontekstuelle forhold i estimeringen af den potentielle eksponeringsfare (-niveau).



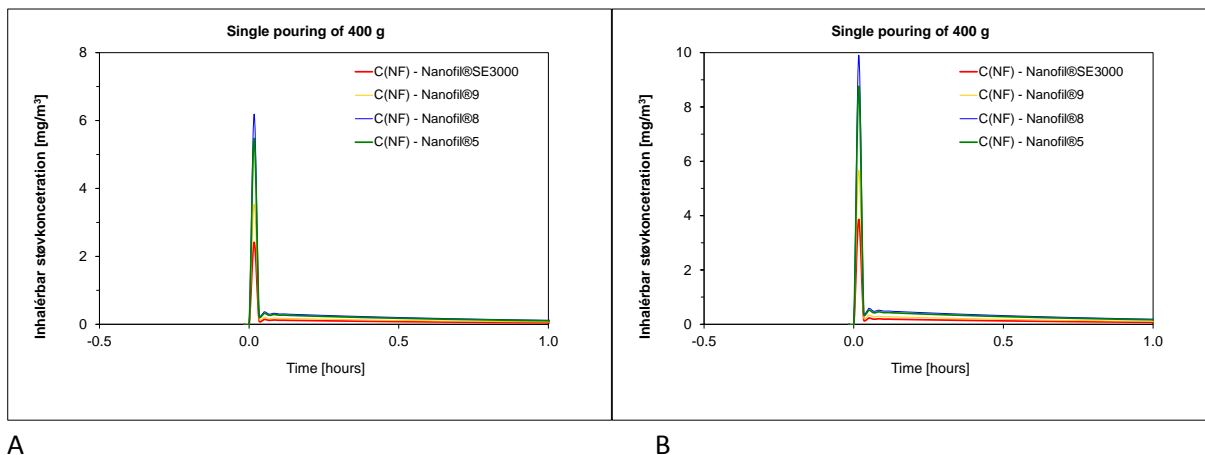
Figur 17. Modellering af koncentrationen af inhalérbar støv efter 4 gange 30 minutters dosering af pulver fra føder til twin screw ekstruder med luftskifte = 3 h⁻¹; volumen af arbejdslokale = 70 m³.

A) h₃ = 0,5; Akut NF koncentration: Nanofil®5 = 97,8 µg/m³; Nanofil®8 = 110,6 µg/m³; Nanofil®9 = 63,3 µg/m³; Nanofil®SE3000 = 43,1 µg/m³; 8-timers middelkoncentration i NF: Nanofil®5 = 45,2 µg/m³; Nanofil®8 = 51,2 µg/m³; Nanofil®9 = 29,3 µg/m³; Nanofil®SE3000 = 20,0 µg/m³.

B) h₄ = 0,8. Akut NF koncentration: Nanofil®5 = 156,5 µg/m³; Nanofil®8 = 176,9 µg/m³; Nanofil®9 = 101,2 µg/m³; Nanofil®SE3000 = 69,0 µg/m³; 8-timers middelkoncentration i NF: Nanofil®5 = 72,4 µg/m³; Nanofil®8 = 81,9 µg/m³; Nanofil®9 = 46,8 µg/m³; Nanofil®SE3000 = 31,9 µg/m³.

Beregnet uden anvendelse af værnemidler, så vil anvendelse af 3.6 kg af det mest støvende stof, i disse scenarier, medføre overskridelse af de eksisterende grænseværdier på 10 mg/m³ for

akutpåvirkning. For det mindst støvende stof er den kritiske grænse 9.3 kg i det mest støvende scenarie.



Figur 18. Modellering af koncentrationen af inhalérbar støv efter 1 hurtig ihældning af 400 g pulver over 1 minut med luftskifte = 3 h⁻¹; volumen af arbejdslokale = 70 m³.

A) h₃ = 0,5; Akut NF koncentration: Nanofil®5 = 605,8 µg/m³; Nanofil®8 = 685,1 µg/m³; Nanofil®9 = 392,0 µg/m³; Nanofil®SE3000 = 267,2 µg/m³; 8-timers middeldkoncentration i NF: Nanofil®5 = 45,4 µg/m³; Nanofil®8 = 51,3 µg/m³; Nanofil®9 = 29,4 µg/m³; Nanofil®SE3000 = 20,0 µg/m³.

B) h₄ = 0,8. Akut NF koncentration: Nanofil®5 = 969,2 µg/m³; Nanofil®8 = 1096 µg/m³; Nanofil®9 = 627,3 µg/m³; Nanofil®SE3000 = 427,5 µg/m³; 8-timers middeldkoncentration i NF: Nanofil®5 = 72,6 µg/m³; Nanofil®8 = 82,1 µg/m³; Nanofil®9 = 47,0 µg/m³; Nanofil®SE3000 = 32,0 µg/m³.

Konklusion

Modelleringsresultaterne viser, at der er størst risiko for høj akut eksponering i arbejdszonen. Fortyndingen i baggrundsluften er generelt meget effektiv til at håndtere de relativt lave anvendelses- og emissions-rater anvendt her. De kritiske anvendelses-niveauer er i størrelseordenen 3,6 - 9,3 kg for de mest og mindst støvende nano-materialer i det mest støvende scenarie.

ERFARINGER OG KONKLUSIONER

NANOPLAST-projektet har vist at hvert eneste nano-materiale er en unik kemisk forbindelse med unikke fysiske, kemiske og toksikologiske egenskaber og at det kræver nøje analyse af disse egenskaber for at kunne lave en reel risikovurdering af givne eksponeringssituationer.

Vi har vist at organo-lers toksiske egenskaber ved inhalation sandsynligvis kun har korttidseffekt, men at en høj dosis vil være uheldig. Nogle af de lange og stive kulstofnanorør (CNT) ser derimod ud til ved inhalation at kunne forårsage langvarig inflammation og celledskader ved en mekanisme, der minder om den, som asbest virker ved, og som derfor på sigt måske kan medføre kræft. Vi har også observeret stor forskel på hvor toksisk den enkelte organo-ler og CNT er og kan sammenholde det med deres fysiske og kemiske egenskaber. Denne viden kan bruges til at udvælge de nano-materialer med de mindst toksiske egenskaber og optimale materiale egenskaber til den fremtidige industrielle anvendelse.

NANOPLAST-projektet har også vist at der under produktion af polymer nanokompositter (PNC) af termoplast i *worst case*-scenarier kan opstå situationer med en uønsket høj luftbåren eksponering. Disse situationer er i forbindelse med håndteringen af de rene nano-materialer og hverken i forbindelse med compoundingprocessen eller sprøjttestøbningen. Vi har også vist at støvningsegenskaberne af beslægtede nano-materialer kan være meget forskellig og dermed den potentielle eksponering i en håndteringssituation. Denne viden skal sammen med den toksikologiske viden også bruges til at udvælge de nano-materialer med mindst risiko til fremtidig industriel anvendelse.

REFERENCER

- Adams K., Bankston J., Barlow A., Holdren M.W., Meyer J. and Marchesani V.J. (1999) Development of Emission Factors for Polypropylene Processing. *Journal of the Air & Waste Management Association* **49**, 49-56.
- Avella M., De Vlieger J.J., Errico M.E., Fischer S., Vacca P. and Volpe M.G. (2005) Biodegradable starch/clay nanocomposite films for food packaging applications. *Food Chemistry* **93**, 467-474.
- Bakshi S.R., Lahiri D. and Agarwal A. (2010) Carbon nanotube reinforced metal matrix composites - a review. *International Materials Reviews* **55**, 41-64.
- Becker S., Soukup J.M. and Gallagher J.E. (2002) Differential particulate air pollution induced oxidant stress in human granulocytes, monocytes and alveolar macrophages. *Toxicology in Vitro* **16**, 209-218.
- Bello D., Wardle B.L., Yamamoto N., Guzman de Villoria R. and Hallock M. (2009) Exposures to nanoscale particles and fibers during handling, processing, and machining of nanocomposites and nanoengineered composites reinforced with aligned carbon nanotubes. In: 17th International conference on composite materials (ICCM) proceedings, Edinburgh, Scotland,
- Bello D., Wardle B.L., Zhang J., Yamamoto N., Santeufemio C., Hallock M. and Virji M.A. (2010) Characterization of exposures to nanoscale particles and fibers during solid core drilling of hybrid carbon nanotube advanced composites. *International Journal of Occupational and Environmental Health* **16**, 434-450.
- Bello D., Wardle B., Yamamoto N., Guzman de Villoria R., Garcia E., Hart A., Ahn K., Ellenbecker M. and Hallock M. (2009) Exposure to nanoscale particles and fibers during machining of hybrid advanced composites containing carbon nanotubes. *Journal of Nanoparticle Research* **11**, 231-249.
- Bornholdt J., Klenø J.G., Dybdahl M., Vogel U., Wolkoff P. and Wallin H. (2002) DNA strand breaks and inflammation in BALB/c mice after short exposure to ozone and ozone/limonene. Stuttgart, pp. 327-337.
- Bourdon J., Saber A., Jacobsen N., Jensen K., Madsen A., Lamson J., Wallin H., Møller P., Loft S., Yauk C. and Vogel U. (2012a) Carbon black nanoparticle instillation induces sustained inflammation and genotoxicity in mouse lung and liver. *Particle and Fibre Toxicology* **9**, 5
- Bourdon J.A., Halappanavar S., Saber A.T., Jacobsen N.R., Williams A., Wallin H., Vogel U. and Yauk C.L. (2012b) Hepatic and Pulmonary Toxicogenomic Profiles in Mice Intratracheally Instilled With Carbon Black Nanoparticles Reveal Pulmonary Inflammation, Acute Phase Response, and Alterations in Lipid Homeostasis. *Toxicological Sciences* **127**, 474-484.
- Bouwmeester H., Lynch I., marvin H.J.P., Dawson K.A., Berges M., Braguer D., Byrne H.J., Casey A., Chambers G., Clift M.J.D., Elia G., Fernandes T.F., Fjellsbø L.B., Hatto P., Juillerat L., Klein C., Kreyling W.G., Nickel C., Riediker M. and Stone V. (2011) Minimal analytical characterization of engineered nanomaterials needed for hazard assessment in biological matrices. *Nanotoxicology* **5**, 1-11.
- Breuer O. and Sundararaj U. (2004) Big Returns From Small Fibers: A Review of Polymer/Carbon Nanotube Composites. *Polymer Composites* **25**, 630-645.
- Brunauer S., Emmett P.H. and Teller E. (1938) Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *Journal of the American Chemical Society* **60**, 309-319.

- BSI (British Standards Institute) (2007) Nanotechnologies - Part 2: Guide to safe handling and disposal of manufactured nanomaterials. Report No. PD 6699-2:2007, British Standards Institute, London, 1-26.
- Cena L.G. and Peters T.M. (2011) Characterization and Control of Airborne Particles Emitted During Production of Epoxy/Carbon Nanotube Nanocomposites. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene* **8**, 86-92.
- Clausen P.A., Knudsen H.N., Larsen K., Kofoed-Sørensen V., Wolkoff P. and Wilkins C.K. (2008) Use of thermal desorption gas chromatography-olfactometry/mass spectrometry for the comparison of identified and unidentified odor active compounds emitted from building products containing linseed oil. *Journal of Chromatography A* **1210**, 203-211.
- Clausen P.A., Wilkins C.K., Wolkoff P. and Nielsen G.D. (2001) Chemical and biological evaluation of a reaction mixture of R-(+)-limonene/ozone: Formation of strong airway irritants. *Environment International* **26**, 511-522.
- Clausen P.A. and Wolkoff P. (1994) Preliminary evaluation of automatic thermal desorption-capillary gas chromatography for determination of semivolatile organic compounds in indoor air. In: Sixteenth International Symposium on Capillary Chromatography, vol. I, Heidelberg, pp. 352-363.
- Clausen P.A., Jacobsen N.R., Vibenholt A., Kofoed-Sørensen V. and Jensen K.A. (2012a) Physical and chemical properties of organoclays for toxicological evaluation. *Particle and Fibre Toxicology (in preparation)*,
- Clausen P.A., Liu Z., Kofoed-Sørensen V., Little J.C. and Wolkoff P. (2012b) The influence of temperature on the emission of di (2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) from PVC flooring in the emission cell FLEC. *Environmental Science & Technology* **46**, 909-915.
- Coleman J.N., Khan U., Blau W.J. and Gun'ko Y.K. (2006) Small but strong: A review of the mechanical properties of carbon nanotube-polymer composites. *Carbon* **44**, 1624-1652.
- Concalves D.M., de Liz R. and Girard D. (2011) Activation of Neutrophils by Nanoparticles. *The Scientific World JOURNAL* **11**, 1877-1885.
- Deutschle T., Porkert U., Reiter R., Keck T. and Riechelmann H. (2006) In vitro genotoxicity and cytotoxicity of benzalkonium chloride. *Toxicology in Vitro* **20**, 1472-1477.
- Donaldson K., Aitken R., Tran L., Stone V., Duffin R., Forrest G. and Alexander A. (2006) Carbon Nanotubes: A Review of Their Properties in Relation to Pulmonary Toxicology and Workplace Safety. *Toxicological Sciences* **92**, 5-22.
- Donaldson K., Beswick P.H. and Gilmour P.S. (1996) Free radical activity associated with the surface of particles: a unifying factor in determining biological activity? *Toxicology Letters* **88**, 293-298.
- Dresselhaus M.S., Dresselhaus G., Saito R. and Jorio A. (2005) Raman spectroscopy of carbon nanotubes. *Physics Reports* **409**, 47-99.
- Dresselhaus M.S., Jorio A., Hofmann M., Dresselhaus G. and Saito R. (2010) Perspectives on Carbon Nanotubes and Graphene Raman Spectroscopy. *Nano Letters* **10**, 751-758.
- Dybdahl M., Risom L., Bornholdt J., Autrup H., Loft S. and Wallin H. (2004) Inflammatory and genotoxic effects of diesel particles in vitro and in vivo. *Mutat Res* **562**, 119-131.
- Dyke C.A. and Tour J.M. (2004) Covalent Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes for Materials Applications. *The Journal of Physical Chemistry A* **108**, 11151-11159.

- Filippi S., Marazzato C., Magagnini P., Minkova L., Dintcheva T. and La Manita F.P. (2006) Organoclay Nanocomposites from Ethylene-Acrylic Acid Copolymers. *Macromol.Mater.Eng.* **291**, 1208-1225.
- Folkmann J.K., Risom L., Jacobsen N.R., Wallin H., Loft S. and Møller P. (2009) Oxidatively Damaged DNA in Rats Exposed by Oral Gavage to C₆₀ Fullerenes and Single-Walled Carbon Nanotubes. *Environmental Health Perspectives* **117**, 703-708.
- Forrest M.J., Jolly A.M., Holding S.R. and Richards S.J. (1995) Emissions from processing thermoplastics. *The Annals of Occupational Hygiene* **39**, 35-53.
- Gilbert P. and Moore L.E. (2005) Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *Journal of Applied Microbiology* **99**, 703-715.
- Göhler D., Stintz M., Hillemann L. and Vorbau M. (2010) Characterization of Nanoparticle Release from Surface Coatings by the Simulation of a Sanding Process. *Annals of Occupational Hygiene* **54**, 615-624.
- Han J.H., Lee E.J., Lee J.H., So K.P., Lee Y.H., Bae G.N., Lee S.B., Ji J.H., Cho M.H. and Yu I.J. (2008) Monitoring Multiwalled Carbon Nanotube Exposure in Carbon Nanotube Research Facility. *Inhalation Toxicology* **20**, 741-749.
- Hassellöv M., Readman J., Ranville J. and Tiede K. (2008) Nanoparticle analysis and characterization methodologies in environmental risk assessment of engineered nanoparticles. *Ecotoxicology* **17**, 344-361.
- Haurie L., Fernández A.I., Velasco J.I., Chimenos J.M., Lopez Cuesta J.-M. and Espiell F. (2007) Thermal stability and flame retardancy of LDPE/EVA blends filled with synthetic hydromagnesite/aluminium hydroxide/montmorillonite and magnesium hydroxide/aluminium hydroxide/montmorillonite mixtures. *Polymer Degradation and Stability* **92**, 1082-1087.
- Helland A., Wick P., Koehler A., Schmid K. and Som C. (2007) Reviewing the Environmental and Human Health Knowledge Base of Carbon Nanotubes. *Environmental Health Perspectives* **115**, 1125-1131.
- Höck J., Hofmann H., Krug H., Lorenz C., Limbach L., Nowack B., Riediker M., Schirmer K., Som C., Stark W., von Götz N., Wengert S. and Wick P. (2008) Guidelines on the Precautionary Matrix for Synthetic Nanomaterials. Federal Office for Public Health and Federal Office for the Environment. Federal Office for Public Health (FOPH), Bern, 1-26.
- Hussain F., Hojjati M., Okamoto M. and Gorga R.E. (2006) Review article: Polymer-matrix Nanocomposites, Processing, Manufacturing, and Application: An Overview. *Journal of Composite Materials* **40**, 1511-1575.
- Iqbal Z. and Goyal A. (2005). Carbon Nanotubes/Nanofibers and Carbon Fibers, in: Xanthos, M. (Ed.), *Functional Fillers for Plastics*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, pp. 175-193.
- Itkis M.E., Perea D.E., Jung R., Niyogi S. and Haddon R.C. (2005) Comparison of Analytical Techniques for Purity Evaluation of Single-Walled Carbon Nanotubes. *Journal of the American Chemical Society* **127**, 3439-3448.
- Jacobsen N.R., Pojana G., White P., Møller P., Cohn C., Korsholm K.S., Vogel U., Marcomini A., Loft S. and Wallin H. (2008a) Genotoxicity, cytotoxicity and reactive oxygen species induced by single-walled carbon nanotubes and C₆₀ fullerenes in the FE1-Muta™ Mouse lung epithelial cells. *Environ Mol Mutagen* **49**, 476-487.
- Jacobsen N.R., Saber A.T., White P., Moller P., Pojana G., Vogel U., Loft S., Gingerich J., Soper L., Douglas G.R. and Wallin H. (2007) Increased mutant frequency by carbon black, but not quartz,

- in the lacZ and cII transgenes of muta(trade mark)mouse lung epithelial cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **48**, 451-461.
- Jacobsen N.R., White P., Gingerich J., Møller P., Saber A.T., Vogel U. and Wallin H. (2011) Mutation spectrum in FE1-MutaTMMouse lung epithelial cells exposed to nanoparticulate carbon black. *Environmental and Molecular Mutagenesis* (*in press*),
- Jacobsen N., Moller P., Jensen K., Vogel U., Ladefoged O., Loft S. and Wallin H. (2009) Lung inflammation and genotoxicity following pulmonary exposure to nanoparticles in ApoE^{-/-} mice. *Particle and Fibre Toxicology* **6**, 2
- Jacobsen N.R., Clausen P.A., Vibenholt A., Bøgelund J., Birkedal R., Roursgaard M., Sharma A.K. and Wallin H. (2012a) Cytotoxicity of nanoclays (organo-modified montmorillonite) in the FE1-MML relies on the number and the length of long chain alkyl substituents and post treatment of the nanoclays. *Particle and Fibre Toxicology* (*in preparation*),
- Jacobsen N.R., Pojana G., White P., Møller P., Cohn C.A., Smith Korsholm K., Vogel U., Marcomini A., Loft S. and Wallin H. (2008b) Genotoxicity, cytotoxicity, and reactive oxygen species induced by single-walled carbon nanotubes and C₆₀ fullerenes in the FE1-MutaTMMouse lung epithelial cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **49**, 476-487.
- Jacobsen N.R., Saber A.T., Vogel U., Clausen P.A. and Wallin H. (2012b) *In vivo* pulmonary toxicity of organo-modified clays and carbon nanotubes. *Nanotoxicology* (*in preparation*),
- Jensen K.A. (2010) Nye metoder til vurdering af eksponeringsfaren for tekniske nanopartikler. *Miljø og Sundhed* **16**, 4-12.
- Jensen K.A., Koponen I.K. and Clausen P.A. (2012a) Exposure to multi-walled carbon nanotubes at dispensing in asbestos tent (*publication in preparation*).
- Jensen K.A., Koponen I.K., Clausen P.A. and Schneider T. (2009) Dustiness behavior of loose and compacted bentonite and organoclay powders: What is the difference in exposure risk? *Journal of Nanoparticle Research* **11**, 133-146.
- Jensen K.A., Koponen I.K. and Kristensen F. (2012b) Nanosafer. *submitted*
- Johnson D.R., Methner M.M., Kennedy A.J. and Steevens J.A. (2010) Potential for Occupational Exposure to Engineered Carbon-Based Nanomaterials in Environmental Laboratory Studies. *Environmental Health Perspectives* **118**,
- Kaegi R., Ulrich A., Sinnet B., Vonbank R., Wichser A., Zuleeg S., Simmler H., Brunner S., Vonmont H., Burkhardt M. and Boller M. (2008) Synthetic TiO₂ nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment. *Environmental Pollution* **156**, 233-239.
- Kaegi R., Sinnet B., Zuleeg S., Hagedorfer H., Mueller E., Vonbank R., Boller M. and Burkhardt M. (2010) Release of silver nanoparticles from outdoor facades. *Environmental Pollution* **158**, 2900-2905.
- Kamena K. (2005). Nanoclays and Their Emerging Markets, in: Xanthos, M. (Ed.), *Functional Fillers for Plastics*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, pp. 163-174.
- Kayat J., Gajbhiye V., Tekade R.K. and Jain N.K. (2010) Pulmonary toxicity by carbon nanotubes: A systematic report. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* (*in press*),
- Kobayakawa T., Ogura I., Gamo M., Kishimoto A. and Nakanishi J. (2009) Risk Assessment of manufactured Nanomaterials -Carbon Nanotubes (CNTs): Executive summary. NEDO project "Research and development of nanoparticle characterization methods (P06041),
- Koponen I.K., Jensen K.A. and Schneider T. (2009) Sanding dust from nanoparticle-containing paints: Physical characterisation. *Journal of Physics: Conference Series* **151**, 012048

- Koponen I.K., Jensen K.A. and Schneider T. (2011) Comparison of dust released from sanding conventional and nanoparticle-doped wall and wood coatings. *J Expos Sci Environ Epidemiol* **21**, 408-418.
- Kristensen H.V., Hansen S.B., Holm G.R., Jensen K.A., Koponen I.K., Saber A.T., Nielsen S.H. and Wallin H. (2010) Nanopartikler i arbejdsmiljøet - Viden og inspiration om håndtering af nanomaterialer. Industriens Branchearbejdsmiljøråd, <http://www.indelig.ashx>, 1-126.
- Lam C.w., James J.T., McCluskey R., Arepalli S. and Hunter R.L. (2006) A Review of Carbon Nanotube Toxicity and Assessment of Potential Occupational and Environmental Health Risks. *Critical Reviews in Toxicology* **36**, 189-217.
- Lee J.H., Lee S.B., Bae G.N., Jeon K.S., Yoon J.U., Ji J.H., Sung J.H., Lee B.G., Lee J.H., Yang J.S., Kim H.Y., Kang C.S. and Yu I.J. (2010) Exposure assessment of carbon nanotube manufacturing workplaces. *Inhalation Toxicology* **22**, 369-381.
- Liu J., Boo W.-J., Clearfield A. and Sue H.-J. (2006) Intercalation and Exfoliation: A Review on Morphology of Polymer Nanocomposites Reinforced by Inorganic Layer Structures. *Materials and Manufacturing Processes* **21**, 143-151.
- Liu J., Katahara J., Li G., Coe-Sullivan S. and Hurt R.H. (2012) Degradation Products from Consumer Nanocomposites: A Case Study on Quantum Dot Lighting. *Environmental Science & Technology* **46**, 3220-3227.
- Lu X. and Chen Z. (2005) Curved Pi-Conjugation, Aromaticity, and the Related Chemistry of Small Fullerenes (<C60) and Single-Walled Carbon Nanotubes. *Chemical Reviews* **105**, 3643-3696.
- Manring L.E. (1991) Thermal degradation of poly(methyl methacrylate). 4. Random side-group scission. *Macromolecules* **24**, 3304-3309.
- Maynard A.D., Baron P.A., Foley M., Shvedova A.A., Kisin E.R. and Castronova V. (2004) Exposure to carbon nanotube material: aerosol release during the handling of unrefined singlewalled carbon nanotube material. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* **67**, 87-107.
- Maynard A.D. and Kuempel E.D. (2005) Airborne nanostructured particles and occupational health. *Journal of Nanoparticle Research* **7**, 587-614.
- Mikkelsen L., Sheykhzade M., Jensen K., Saber A., Jacobsen N., Vogel U., Wallin H., Loft S. and Moller P. (2011) Modest effect on plaque progression and vasodilatory function in atherosclerosis-prone mice exposed to nanosized TiO2. *Particle and Fibre Toxicology* **8**, 32
- Moller P. (2005) Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* **96 Suppl 1**, 1-42.
- Møller P., Wallin H., Grunnet N., Risom L. and Knudsen L.E. (1998) DNA damage in isolated rat hepatocytes exposed to C.I. pigment orange 5 and C.I. pigment yellow 12 by the alkaline comet assay. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* **18**, 9-16.
- Moniruzzaman M. and Winey K.I. (2006) Polymer Nanocomposites Containing Carbon Nanotubes. *Macromolecules* **39**, 5194-5205.
- Morgan A.B. (2007) Polymer-Clay Nanocomposites: Design and Application of Multi-Functional Materials. *Material Matters* **2**, 20-23.
- Morimoto Y., Kobayashi N., Shinohara N., Myojo T., Tanaka I. and Nakanishi J. (2010) Hazard assessment of manufactured nanomaterials. *Journal of Occupational Health* **52**, 325-334.

- Nguyen T., Pellegrin B., Bernard C., Gu X., Gorham J.M., Stutzman P., Stanley D., Shapiro A., Byrd E., Hettenhouser R. and Chin J. (2011) Fate of nanoparticles during life cycle of polymer nanocomposites. *Journal of Physics: Conference Series* **304**, 012060
- NIOSH (2009) Approaches to Safe Nanotechnology - Managing the Health and Safety Concerns Associated with Engineered Nanomaterials. DHHS (NIOSH) Publication No. 2009-125, Department of Human Health and Safety (DHHS), National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH), 1-86.
- NIOSH (2010) Occupational Exposure to Carbon Nanotubes and Nanofibers. NIOSH, 1-147.
- Oberdorster G., Maynard A., Donaldson K., Castranova V., Fitzpatrick J., Ausman K., Carter J., Karn B., Kreyling W., Lai D., Olin S., Monteiro-Riviere N., Warheit D. and Yang H. (2005a) Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Part Fibre Toxicol* **2**, 1-35.
- Oberdorster G., Oberdorster E. and Oberdorster J. (2005b) Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives* **113**, 823-839.
- Opalko R.J. (2008) Evaluation of the effects of nanofil® nanoclays in the blending of polypropylene and polystyrene. The University of Akron, 1-137.
- Paik S.Y., Zalk D.M. and Swuste P. (2008) Application of a Pilot Control Banding Tool for Risk Level Assessment and Control of Nanoparticle Exposures. *Annals of Occupational Hygiene* **52**, 419-428.
- Palomäki J., Välimäki E., Sund J., Vippola M., Clausen P.A., Jensen K.A., Savolainen K., Matikainen S. and Alenius H. (2011) Long, Needle-like Carbon Nanotubes and Asbestos Activate the NLRP3 Inflammasome through a Similar Mechanism. *ACS Nano* **5**, 6861-6870.
- Pang L.S.K., Saxby J.D. and Chatfield S.P. (1993) Thermogravimetric analysis of carbon nanotubes and nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry* **97**, 6941-6942.
- Patel H.A., Somani R.S., Bajaj H.C. and Jasra R.V. (2006) Nanoclays for polymer nanocomposites, paints, inks, greases and cosmetics formulations, drug delivery vehicle and waste water treatment. *Bulletin of Material Science* **29**, 133-145.
- Patel S.H. and Xanthos M. (1995) Volatile emissions during thermoplastics processing - A review. *Advances in Polymer Technology* **14**, 67-77.
- Patel S.H. and Xanthos M. (2001) Environmental Issues in Polymer Processing: A Review on Volatile Emissions and Material/Energy Recovery Options. *Advances in Polymer Technology* **20**, 22-41.
- Pauluhn J. (2010) Multi-walled Carbon Nanotubes (Baytubes®): Approach for Derivation of Occupational Exposure Limit. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **57**, 78-89.
- Pavlidou S. and Papaspyrides C.D. (2008) A review on polymer-layered silicate nanocomposites. *Progress in Polymer Science* **33**, 1119-1198.
- Petersen E.J., Zhang L., Mattison N.T., Oğuzoğlu-Carroll D.M., Whelton A.J., Uddin N., Nguyen T., Huang Q., Henry T.B., Holbrook R.D. and Chen K.L. (2011) Potential Release Pathways, Environmental Fate, And Ecological Risks of Carbon Nanotubes. *Environmental Science & Technology* **45**, 9837-9856.
- Poland C.A., Duffin R., Kinloch I., Maynard A., Wallace W.A.H., Seaton A., Stone V., Brown S., MacNee W. and Donaldson K. (2008) Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestoslike pathogenicity in a pilot study. *Nature nanotechnology Letters* (**Adv. online pub.**), 1-6.

- Purohit A., Kopferschmitt-Kubler C., Moreau C., Popin E., Blaumeiser M. and Pauli G. (2000) Quaternary ammonium compounds and occupational asthma. *International Archives of Occupational and Environmental Health* **V73**, 423-427.
- Qian H., Greenhalgh E.S., Shaffer M.S.P. and Bismarck A. (2010) Carbon nanotube-based hierarchical composites: a review. *Journal of Materials Chemistry* **20**, 4751-4762.
- Rahn O. and Vaneseltine W.P. (1947) Quaternary Ammonium Compounds. *Annual Review of Microbiology* **1**, 173-192.
- Ray S.S. and Okamoto M. (2003) Polymer/layered silicate nanocomposites: a review from preparation to processing. *Progress in Polymer Science* **28**, 1539-1641.
- Ryman-Rasmussen J.P., Cesta M.F., Brody A.R., Shipley-Phillips J.K., Everitt J.I., Tewksbury E.W., Moss O.R., Wong B.A., Dodd D.E., Andersen M.E. and Bonner J.C. (2009a) Inhaled carbon nanotubes reach the subpleural tissue in mice. *Nature Nanotechnology* **4**, 747-751.
- Ryman-Rasmussen J.P., Tewksbury E.W., Moss O.R., Cesta M.F., Wong B.A. and Bonner J.C. (2009b) Inhaled multiwalled carbon nanotubes potentiate airway fibrosis in murine allergic asthma. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* **40**, 349-358.
- Saber A.T., Bornholdt J., Dybdahl M., Sharma A.K., Loft S., Vogel U. and Wallin H. (2005) Tumor necrosis factor is not required for particle-induced genotoxicity and pulmonary inflammation. *Arch Toxicol* **79**, 177-182.
- Saber A.T., Jensen K.A., Jacobsen N.R., Birkedal R., Mikkelsen L., Møller P., Loft S., Wallin H. and Vogel U. (2011a) Inflammatory and genotoxic effects of nanoparticles designed for inclusion in paints and lacquers. *Nanotoxicology* 1-19.
- Saber A.T., Koponen I.K., Jensen K.A., Jacobsen N.R., Mikkelsen L., Møller P., Loft S., Vogel U. and Wallin H. (2011b) Inflammatory and genotoxic effects of sanding dust generated from nanoparticle-containing paints and lacquers. *Nanotoxicology* 1-13.
- Sakamoto Y., Nakae D., Fukumori N., Tayama K., Maekawa A., Imai K., Hirose A., Nishimura T., Ohashi N. and Ogata A. (2009) Induction of mesothelioma by a single intrascrotal administration of multi-wall carbon nanotube in intact male Fischer 344 rats. *The Journal of Toxicological Sciences* **34**, 65-76.
- Samal S.S. and Bal S. (2008) Carbon Nanotube Reinforced Ceramic Matrix Composites- A Review. *Journal of Minerals & Materials Characterization & Engineering* **7**, 355-370.
- SCENIHR (2006) 10 March 2006, EU Health & Consumer Protection Directorate-General, 1-79.
- Schneider T., Jensen K.A., Clausen P.A., Afshari A., Gunnarsen L., Wählin P., Glasius M., Palmgren F., Nielsen O.J. and Fogh C.L. (2004) Prediction of indoor concentration of 0.5-4 μm particles of outdoor origin in an uninhabited apartment. *Atmospheric Environment* **38**, 6349-6359.
- Schneider T. and Jensen K.A. (2008) Combined Single-Drop and Rotating Drum Dustiness Test of Fine to Nanosize Powders Using a Small Drum. *Annals of Occupational Hygiene* **52**, 23-34.
- Seeling R. (2009) Nanoclay.
- Sharma A.K., Schmidt B., Frandsen H., Jacobsen N.R., Larsen E.H. and Binderup M.L. (2010) Genotoxicity of unmodified and organo-modified montmorillonite. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **700**, 18-25.
- Shvedova A.A., Kisin E.R., Porter D., Schulte P., Kagan V.E., Fadeel B. and Castranova V. (2009) Mechanisms of pulmonary toxicity and medical applications of carbon nanotubes: Two faces of Janus? *Pharmacology & Therapeutics* **121**, 192-204.

- Singh P., Campidelli S., Giordani S., Bonifazi D., Bianco A. and Prato M. (2010a) Organic functionalisation and characterisation of single-walled carbon nanotubes. *Chemical Society Reviews* **38**, 2214-2230.
- Singh P., Da Ros T., Kostarelos K., Prato M. and Bianco A. (2010b). Carbon-Based Nanomaterial Applications in Biomedicine, in: Guldi, D.M. and Martín, M. (Eds.), *Carbon Nanotubes and Related Structures: Synthesis, Characterization, Functionalization, and Applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, pp. 199-232.
- Singla P., Mehta R. and Upadhyay S.N. (2012) Clay modification by the use of organic cations. *Green and Sustainable Chemistry* **2**, 21-25.
- Smith C.R. (1934) Base Exchange Reactions of Bentonite and Salts of Organic Bases. *Journal of the American Chemical Society* **56**, 1561-1563.
- Stone V., Nowack B., Baun A., van den Brink N., von der Kammer F., Dusinska M., Handy R., Hankin S., Hassellöv M., Joner E. and Fernandes T.F. (2010) Nanomaterials for environmental studies: Classification, reference material issues, and strategies for physico-chemical characterisation. *Science of The Total Environment* **408**, 1745-1754.
- Takagi A., Hirose A., Nishimura T., Fukumori N., Ogata A., Ohashi N., Kitajima S. and Kanno J. (2008) Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. *Journal of Toxicological Sciences* **33**, 105-116.
- Tasis D., Tagmatarchis N., Bianco A. and Prato M. (2006) Chemistry of carbon nanotubes. *Chemical Reviews* **106**, 1105-1136.
- Thostenson E.T., Ren Z. and Chou T.-W. (2001) Advances in the science and technology of carbon nanotubes and their composites: a review. *Composites Science and Technology* **61**, 1899-1912.
- Tielemans E., Noy D., Schinkel J., Heussen H., Van Der Schaaf D., West J. and Fransman W. (2008) Stoffenmanager Exposure Model: Development of a Quantitative Algorithm. *Annals of Occupational Hygiene* **52**, 443-454.
- Tikuisis T., Taylor G., Sonnenberg K. and Cavanagh J. (2010) Quantification of Emission Compounds Generated During Commercial-Scale Processing of Advanced Sclairtech™ Polyethylene. *Journal of Plastic Film and Sheeting* **26**, 167-191.
- Tikuisis T., Phibbs M.R. and Sonnenberg K.L. (1995) Quantitation of Employee Exposure to Emission Products Generated by Commercial-Scale Processing of Polyethylene. *American Industrial Hygiene Association Journal* **56**, 809-814.
- Tsai S.J., Ashter A., Ada E., Mead J.L., Barry C.F. and Ellenbecker M.J. (2008) Airborne nanoparticle release associated with the compounding of nanocomposites using nanoalumina as fillers. *Aerosol and Air Quality Research* **8**, 160-177.
- Wohlleben W., Brill S., Meier M.W., Mertler M., Cox G., Hirth S., von Vacano B., Strauss V., Treumann S., Wiench K., Ma-Hock L. and Landsiedel R. (2011) On the Lifecycle of Nanocomposites: Comparing Released Fragments and their In-Vivo Hazards from Three Release Mechanisms and Four Nanocomposites. *small* **7**, 2384-2395.
- Zheng M., Jagota A., Strano M.S., Santos A.P., Barone P., Chou G., Diner B.A., Dresselhaus M.S., Mclean R.S., Onoa G.B., Samsonidze G.G., Semke E.D., Usrey M. and Walls D.J. (2003) Structure-Based Carbon Nanotube Sorting by Sequence-Dependent DNA Assembly. *Science* **302**, 1545-1548.

Oversigt over publikationer og produkter fra projektet

Videnskabelig formidling (peer reviewed artikler)

- Jensen K.A., Koponen I.K., Clausen P.A. and Schneider T. (2009) Dustiness behavior of loose and compacted Bentonite and organoclay powders: What is the difference in exposure risk? *Journal of Nanoparticle Research* **11**, 133-146.
- Palomäki J., Välimäki E., Sund J., Vippola M., Clausen P.A., Jensen K.A., Savolainen K., Matikainen S. and Alenius H. (2011) Long, Needle-like Carbon Nanotubes and Asbestos Activate the NLRP3 Inflammasome through a Similar Mechanism. *ACS Nano* **5**, 6861-6870.
- Bourdon J., Saber A., Jacobsen N., Jensen K., Madsen A., Lamson J., Wallin H., Moller P., Loft S., Yauk C. and Vogel U. (2012a) Carbon black nanoparticle instillation induces sustained inflammation and genotoxicity in mouse lung and liver. *Particle and Fibre Toxicology* **9**, 5.
- Bourdon J.A., Halappanavar S., Saber A.T., Jacobsen N.R., Williams A., Wallin H., Vogel U. and Yauk C.L. (2012b) Hepatic and Pulmonary Toxicogenomic Profiles in Mice Intratracheally Instilled With Carbon Black Nanoparticles Reveal Pulmonary Inflammation, Acute Phase Response, and Alterations in Lipid Homeostasis. *Toxicological Sciences* **127**, 474-484.
- Clausen P.A., Jacobsen N.R., Vibenholt A., Kofoed-Sørensen V. and Jensen K.A. (2012) Physical and chemical properties of organoclays for toxicological evaluation. *Particle and Fibre Toxicology (in preparation)*
- Jacobsen N.R., Clausen P.A., Vibenholt A., Bøgelund J., Birkedal R., Roursgaard M., Sharma A.K. and Wallin H. (2012) Cytotoxicity of nanoclays (organo-modified montmorillonite) in the FE1-MML relies on the number and the length of long chain alkyl substituents and post treatment of the nanoclays. *Particle and Fibre Toxicology (in preparation)*
- Jacobsen, N. R., Saber, A. T., Vogel, U., Clausen, P. A., & Wallin, H. (2012). *In vivo* pulmonary toxicity of organo-modified clays and carbon nanotubes. *Nanotoxicology (in preparation)*.
- Jensen K.A., Koponen I.K., Jacobsen N.R. and Clausen P.A. (2012) Risk evaluation of organoclays used in the production of polymer nanocomposites of thermoplastic. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology (in preparation)*
- Jensen K.A., Koponen I.K. and Clausen P.A. (2012) Exposure to multi-walled carbon nanotubes at dispensing in asbestos tent (*publication in preparation*)

Konferencebidrag (foredrag, posters og abstracts)

- Clausen P.A., Vogel U., Høg Lejre A.-L., Bøgelund J., Jensen K.A., Nørgaard A.W., Schneider T., Cohn C., Saber A.T., Møller P., Loft S., Wallin H. and Wolkoff P. (2007) NANOPLAST: Nanotechnological materials and products in the plastics industry: exposure assessment and toxicological properties. In: Euro NanOSH 2007. European NanOSH Conference - Nanotechnologies: A Critical Area in Occupational Safety and Health; 2007 Dec 3-5; Helsinki, Finland, p. 81.
- Jacobsen, N. R. (2008). NANOPLAST; Cytotoxicity of nanoclays and carbon nanotubes used in composite materials, Eigtveds Pakhus, ISMF (Indenrigs- og Sundhedsministeriets Miljømedicinske Forskningscenter).
- Clausen P.A., Vibenholt A., Kofoed-Sørensen V., Jacobsen N.R. and Jensen K.A. (2009) Investigation of release of QACs from nanoclays using in vitro extraction and LC-MS/MS. In: 18th International Mass Spectrometry Conference. August 29th - September 4th, 2009, Bremen, Germany, PWA - 024.
- Jacobsen N.R., Vibenholt A., Pojana G., Clausen P.A., Jensen K.A., Saber A.T., White P. and Wallin H. (2009) In vitro toxicity of carbon nanotubes and nanoclays (organoclays) used in plastic composite materials. Part of the NANOPLAST project. In: 4th International Conference on Nanotechnology - Occupational and Environmental Health, August 26th - 29th, 2009, Helsinki Congress Paasitorni, Helsinki, Finland, p. 96.
- Jensen K.A. and Vibenholt A. (2009) A multiparameter-controlled stirred batch-reactor biodegradability tester with on-line DLS-measurement. In: 4th International Conference on Nanotechnology - Occupational and Environmental Health, August 26th - 29th, 2009, Helsinki Congress Paasitorni, Helsinki, Finland, p. 79.
- Kofoed-Sørensen V. (2009) Nano-technological materials and products in the plastics industry: Exposure assessment and toxicological properties. Risø DTU, Denmark.
- Vibenholt A., Kofoed-Sørensen V., Nørgaard A.W. and Clausen P.A. (2009) Surface analysis of nanoclays using NALDI-TOF and TM-DESI-QTOF. In: 18th International Mass Spectrometry Conference. August 29th - September 4th, 2009. Bremen, Germany, p. PMM - 328.
- Clausen P.A., Jensen K.A., Jacobsen N.R., Vibenholt A., Bøgelund J., Birkedal R.K., Koponen I.K., Høg Lejre A.-L. and Wallin H. (2010) Preliminary risk evaluation of nano-(organo)-clay powders in the production of polymer nanocomposites. Part of NANOPLAST. In: Nanotoxicology 2010, June 2nd - 4th 2010, Edinburgh, Scotland, p. 57.
- Clausen P.A., Jensen K.A., Jacobsen N.R., Vibenholt A., Bøgelund J., Birkedal R.K., Koponen I.K., Høg Lejre A.-L. and Wallin H. (2010) Foreløbig risikovurdering af nano-(organo)-clay pulvere i

produktionen af polymer-nanokompositter. Del af NANOPLAST. In: Arbejdsmiljøforskningsfondens årskonference 2010, Radisson Hotel, Amager Boulevard, København.

Clausen P.A., Jensen K.A., Jacobsen N.R., Vibenholt A., Bøgelund J., Birkedal R.K., Koponen I.K., Høg Lejre A.-L. and Wallin H. (2010) Preliminary risk evaluation of nano-(organo)-clay powders in the production of polymer nanocomposites. Part of NANOPLAST. In: Envirosymp 2010, June 10th - 11th, 2010, Faculty of Life Sciences, University of Copenhagen.

Jacobsen N.R., Vibenholt A., Bøgelund J., Clausen P.A., Jensen K.A., Saber A.T. and Wallin H. (2010) *In vitro* toxicity of nanoclays rely on the surface modification - Role of number and length of long chain alkyl substituents. In: Nanotoxicology 2010, June 2nd - 4th 2010, Edinburgh, Scotland, p. 79.

Clausen P.A., Jacobsen N.R., Jensen K.A., Høg Lejre A.-L., Bøgelund J., Nørgaard A.W., Vibenholt A., Koponen I.K., Birkedal R.K., Møller P., Loft S., Wallin H. and Vogel U. (2010) NANOPLAST: Nano-technological materials and products in the plastics industry: Exposure assessment and toxicological properties. *Modern Polymeric Materials for Environmental Applications* 4, 53-60.

Jacobsen, N. R. & Clausen, P. A. (2011). Toxicity of organoclays and carbon nanotubes and risk of exposure during production of polymer nanocomposites, Technical University of Denmark, NANOTHOUGH.

Bourdon J.A., Saber A.T., Jacobsen N.R., Jensen K.A., Wallin H., Møller P., Loft S., Yauk C.L. and Vogel U. (2011) Carbon Black Nanoparticle Instillation Induces Persistent Pulmonary DNA Damage, Inflammation and Oxidative Stress and Hepatic Genotoxicity in Mice. Health Canada, Canada.

Bourdon, J., Saber, A., Jacobsen, N. R., Jensen, K. A., Wallin, H., Loft, S., Yauk, C., & Vogel, U. (2011). Carbon Black Nanoparticle Instillation Induces Sustained Inflammation and Oxidative Stress-Related Genotoxicity in Mouse Lung and Liver , Montreal, Canada.

Populærvidenskabelig formidling

Clausen P.A. and Rydahl K. (2007) Sikker brug af nanoteknologi i plastindustrien. Nyhed på NFA's hjemmeside: <http://www.arbejdsmiljoforskning.dk/da/nyheder/arkiv/2007/sikker-brug-af-nanoteknologi-i-plastindustrien>

Clausen P.A. and Jacobsen N.R. (2008) Små rør med store muligheder. *Magasinet Arbejdsmiljø* 2008, 48-50.

Clausen P.A. (2009) Håndtering af kulstofnanorør (CNT). DTU Fødevareinstituttet, Mørkhøj, Denmark.

Clausen P.A. and Jacobsen N.R. (2009) Små rør med store muligheder. *Plast Panorama* **58**, 14-15.

Clausen P.A. and Rydahl K. (2009) Rummanden på Palles parkeringsplads. *IN FACT* **1**, 26-27.

Clausen P.A. (2011) NANOPLAST Risikovurdering af eksponering for organo-ler under production af polymer nanokompositter. Tirsdagsseminar 17. maj 2011,,NFA, København.

Clausen P.A. and Rydahl K. (2012) NANOPLAST - Nanoteknologiske materialer og produkter i plastindustrien. NFA hjemmeside:
<http://www.arbejdsmiljoforskning.dk/da/projekter/nanoteknologiske%20materialer%20og%20produkter%20i%20plastindustrien%20%20%20nanoplast>

Undervisning

Resultaterne fra NANOPLAST er benyttet ved undervisning af Arbejdsmiljøfolk i Forsvarets Materiel Tjeneste, Lautrupbjerg 1, Ballerup, 2009. Kursets titel: Nanotoksikologi

Resultaterne fra NANOPLAST er benyttet ved undervisning ved Elite Kandidatuddannelsen i Miljøkemi og Sundhed, Københavns Universitet, 2009, 2010, 2011.

Projektet er støttet af Arbejds miljø forskningsfonden
Projekt nummer: 2007-0014937 Nanoplast

