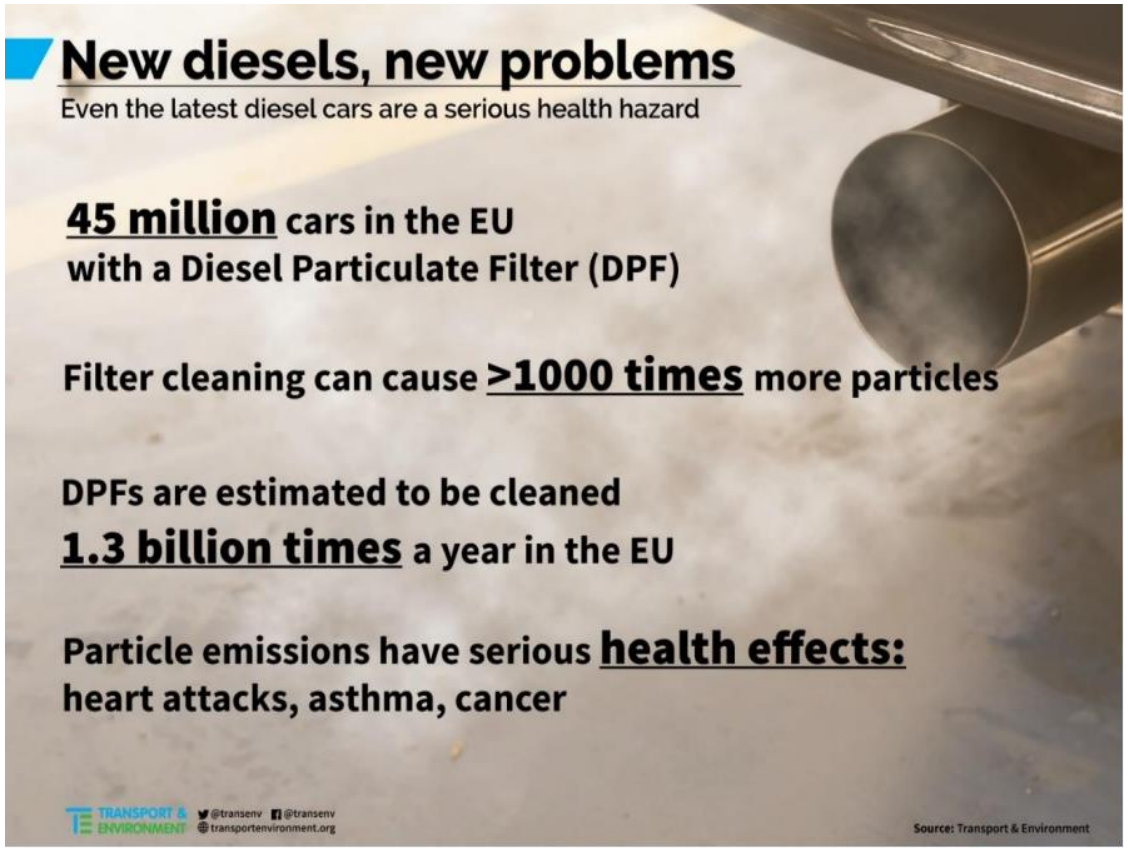
Caratterizzazione e tossicità in vitro di particelle emesse allo scarico di autoveicoli diesel Euro 3 ed Euro 6

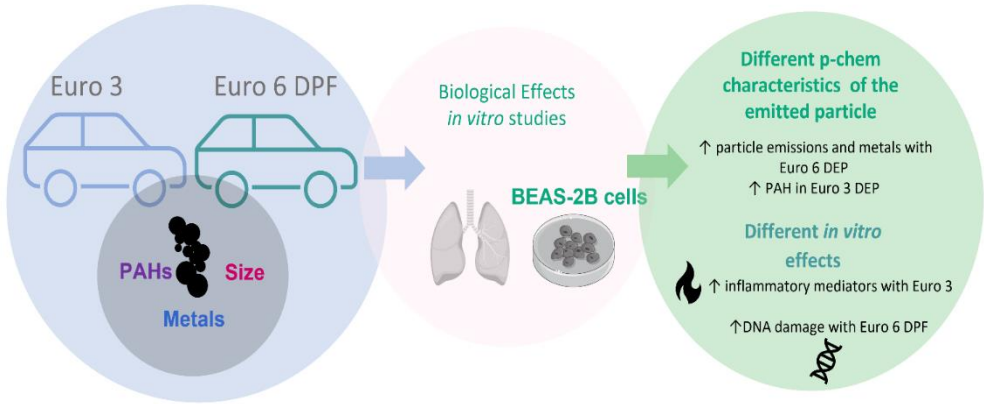
*A. Zerboni, **Tommaso Rossi**, R. Bengalli, T. Catelani, C. Rizzi, M. Priola, S. Casadei, P. Mantecca.*

Grant agreement: 720851

Motivazioni e Dottorato congiunto di A. Zerboni

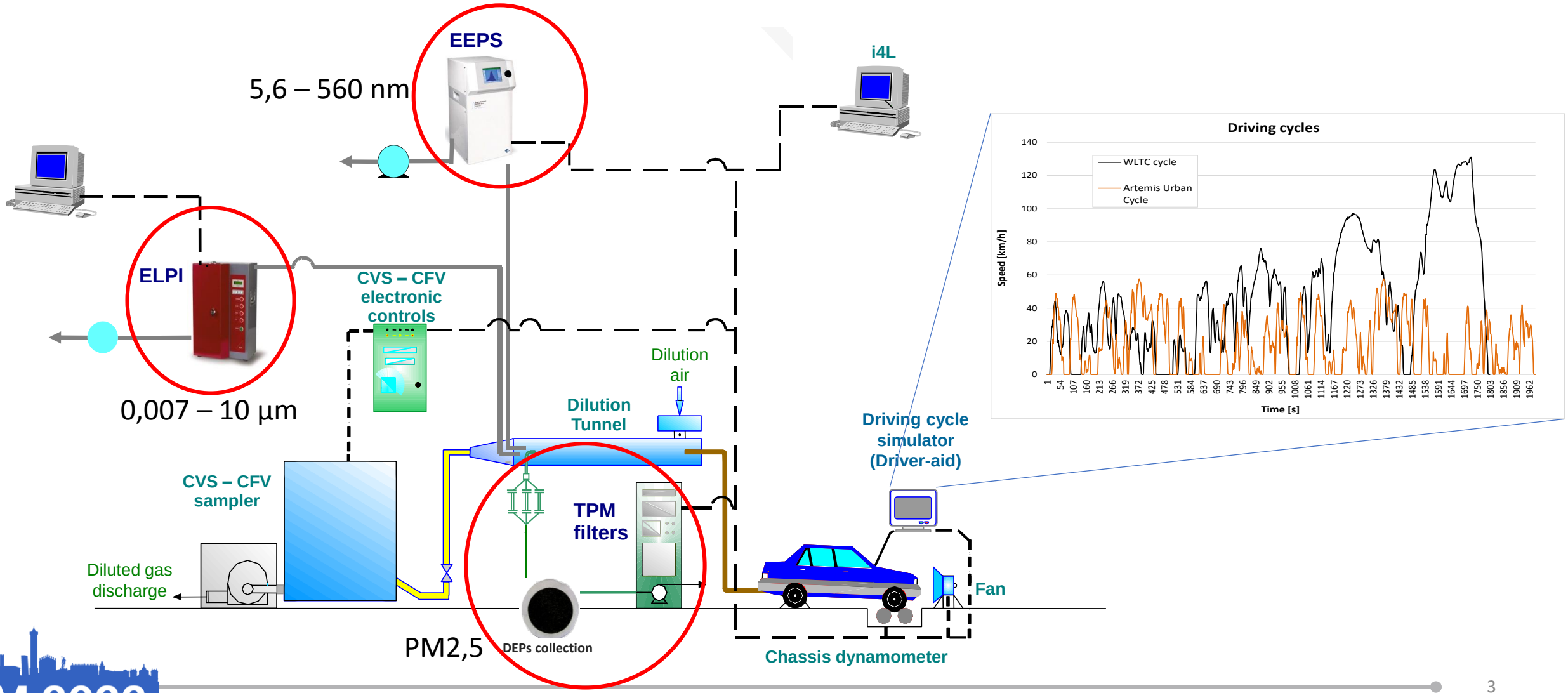


STUDY ON THE BIO-INTERACTION AND TOXIC EFFECTS OF PARTICLES EMITTED FROM DIFFERENT SOURCES: CONTRIBUTION TO RISK MANAGMENT.
(collaborazione tra Innovhub SSI s.r.l. e Centro di Ricerca POLARIS, DISAT, Università di Milano-Bicocca)



Scopo dello studio: confronto delle DEP emesse da veicoli diesel Euro 3 e Euro 6 durante la rigenerazione del DPF con lo scopo di caratterizzarne le proprietà chimico-fisiche e il rischio biologico tramite l'interazione con cellule bronchiali umane

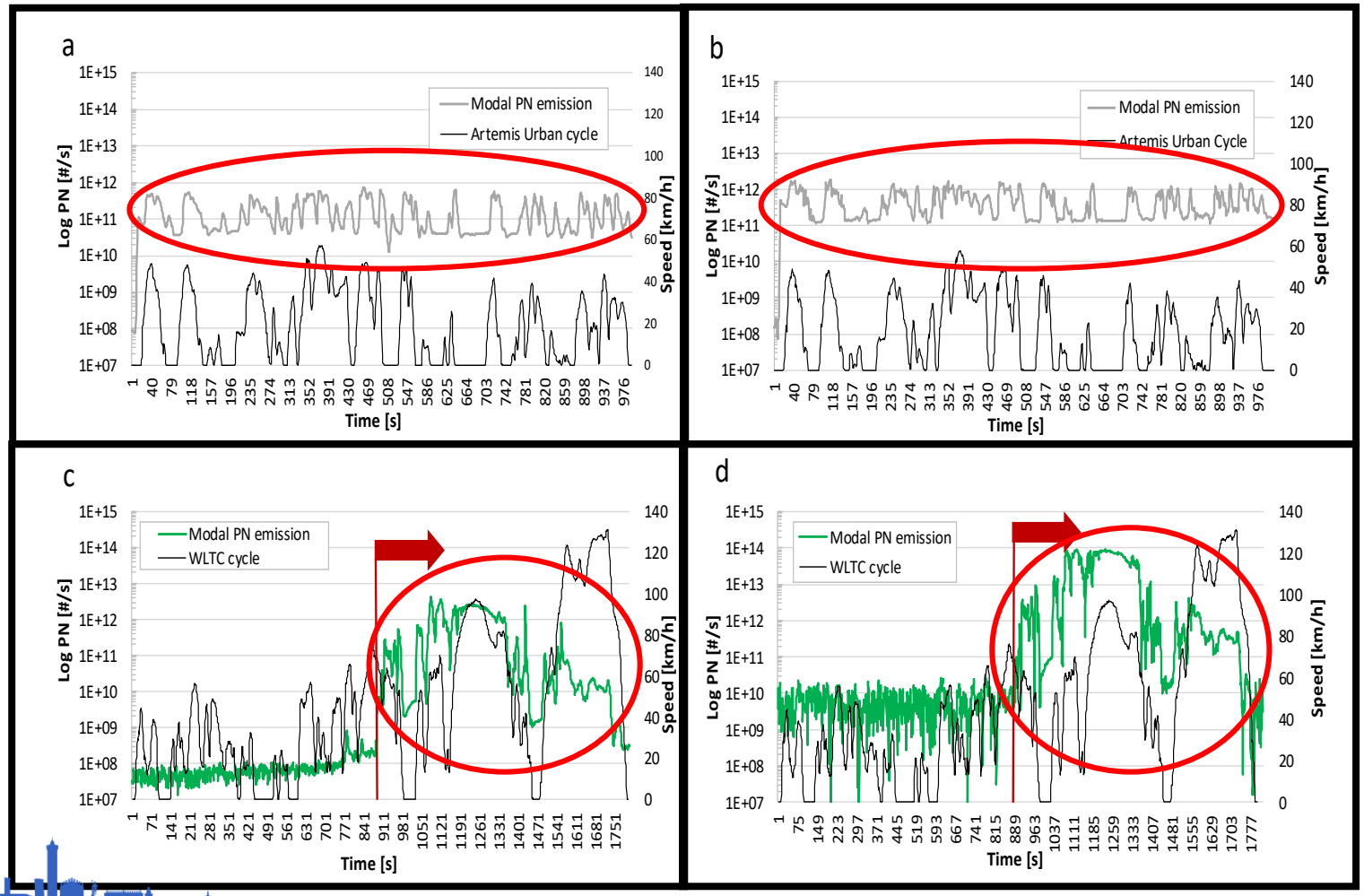
Campionamento: il Laboratorio Emissioni Autoveicolari



Caratterizzazione del PM2,5: l'emissione modale di PN

ELPI

EEPS



Euro 3

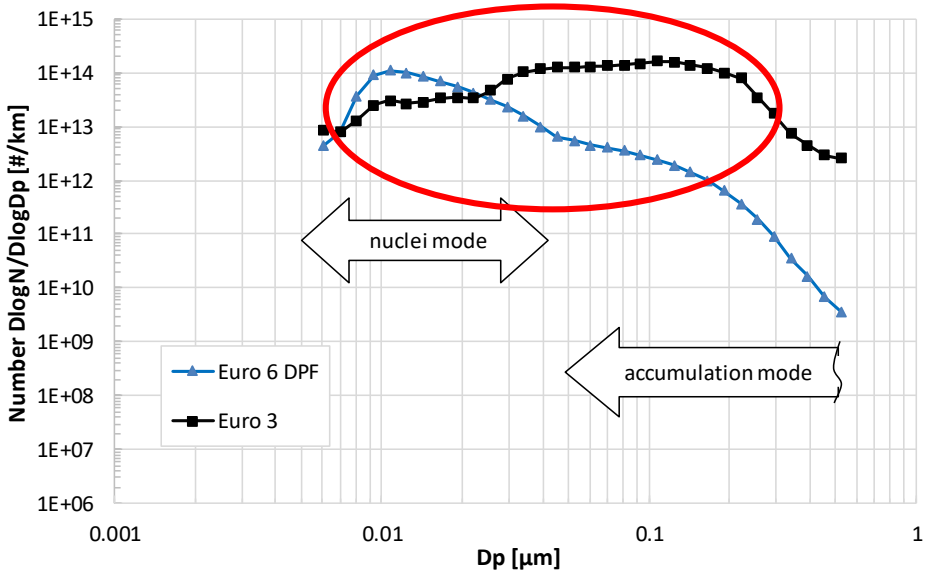
Emissione Euro 3: costante per tutta la durata del ciclo

Euro 6 DPF

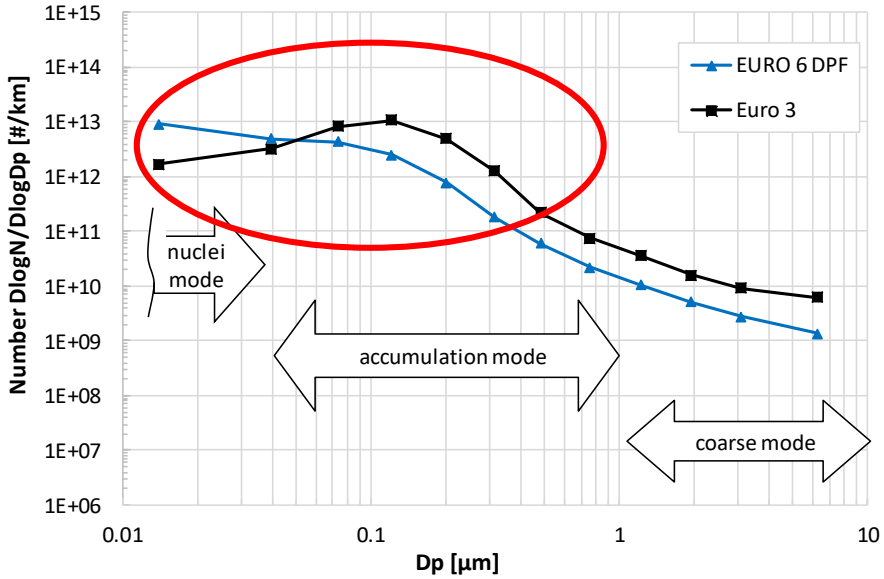
Emissione Euro 6: sostanzialmente concentrata durante il periodo di rigenerazione del DPF

Caratterizzazione del PM2,5: le dimensioni delle particelle

EEPS
Distribuzione dimensionale
5,6 - 560 nm



ELPI
Distribuzione dimensionale
0,007- 10 µm

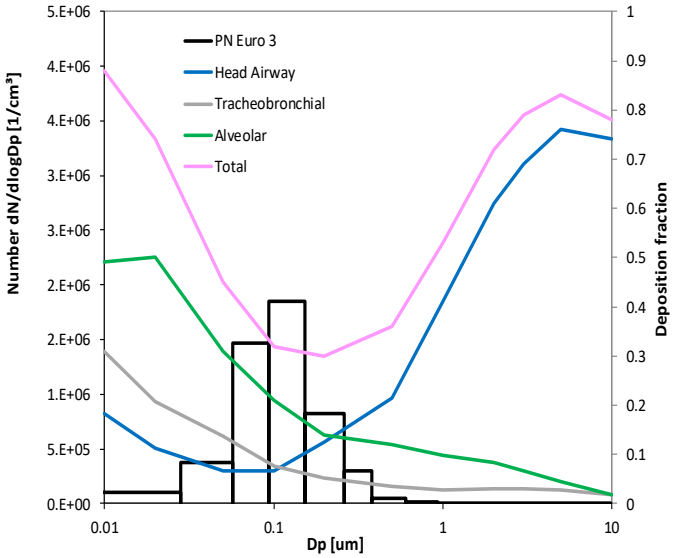


L'Euro 6 emette particelle all'interno della moda di nucleazione, soprattutto concentrate nella fase di rigenerazione del DPF

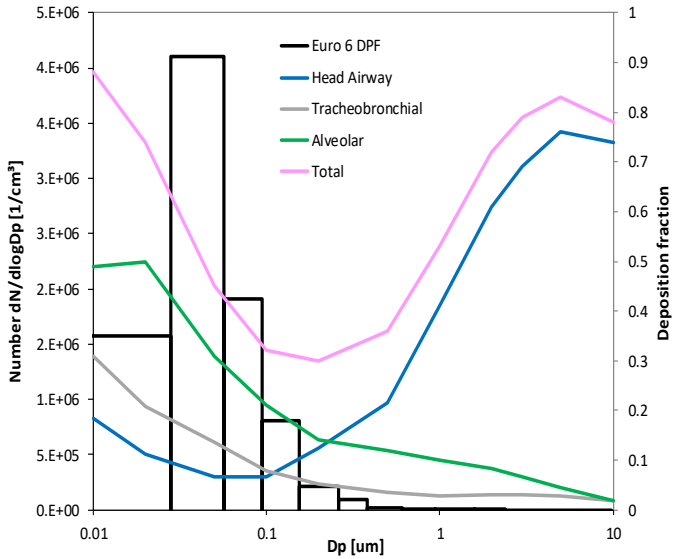
L'Euro 3 emette particelle all'interno della moda di accumulazione

Deposizione di PM10 lungo il tratto respiratorio tramite il modello ICRP

Euro 3

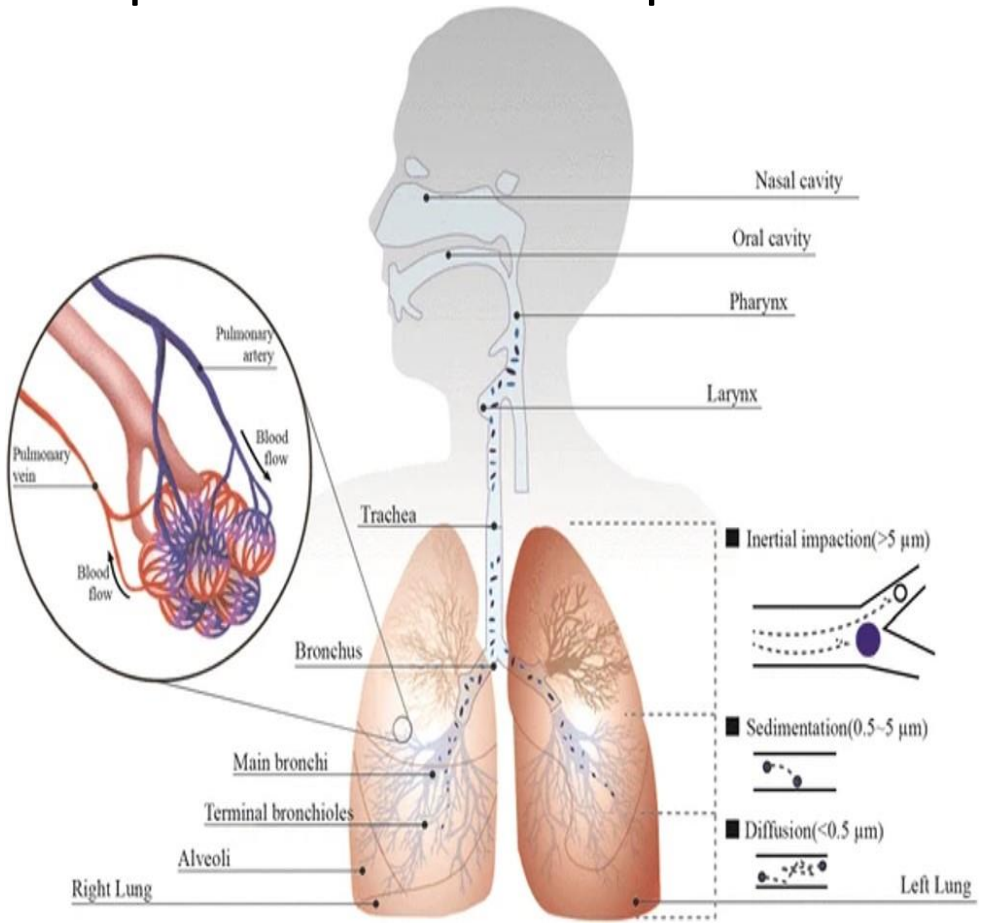


Euro 6 DPF



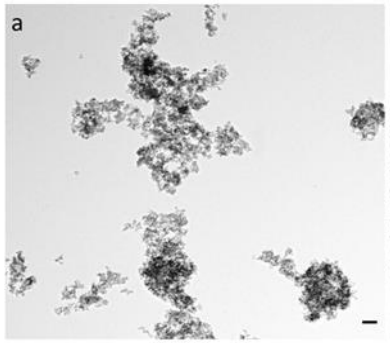
Le particelle emesse dall'Euro 6 durante la rigenerazione del DPF, con un Dp < 0.1µm, tendono ad accumularsi più in profondità nel sistema respiratorio

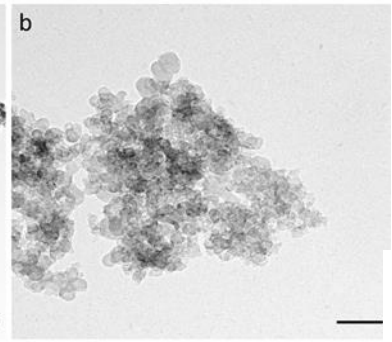
Esposizione del sistema respiratorio umano al particolato



Caratterizzazione del PM2,5 tramite TEM-EDX e ICP-MS; IPA

innovazione e ricerca

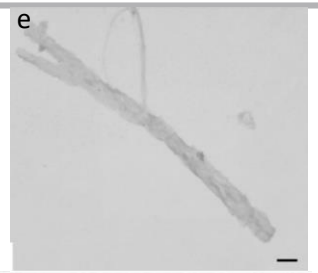


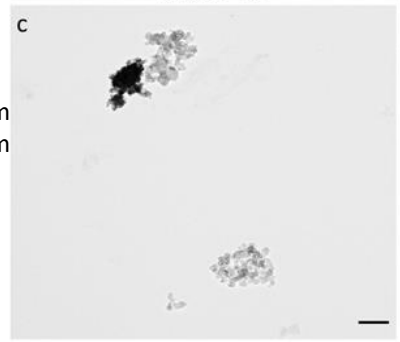


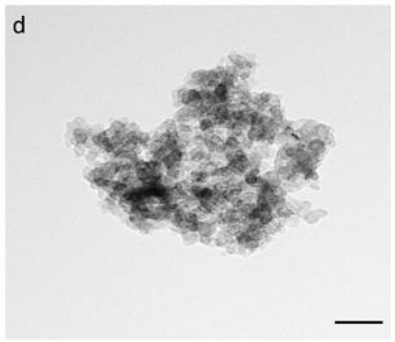
Euro 3

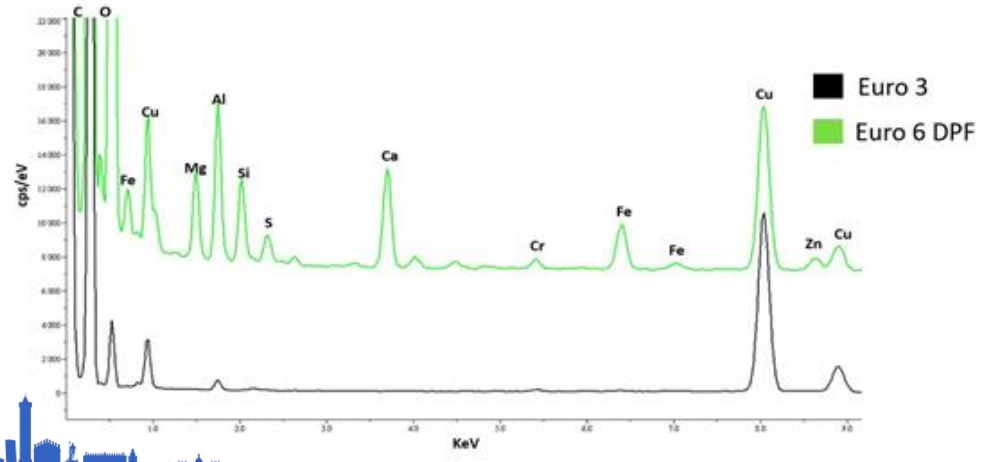
a, c scale bars = 100nm
b, d, e scale bars = 200nm

Euro 6 DPF









L'Euro 6, durante la rigenerazione del DPF, emette particelle caratterizzate da un'elevata presenza di alcuni ioni (Al, Fe, Ca, Mg, Si, S e Zn) rispetto all'Euro 3

Quantificazione degli elementi in traccia (ppm)

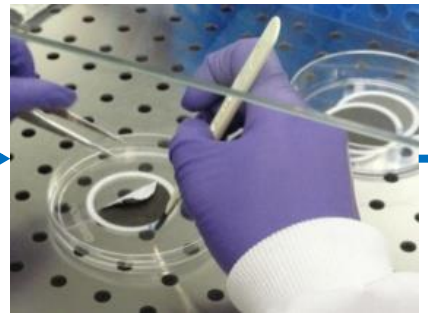
Metals	EURO 3	EURO 6 DPF
V	*3,9*	*nd*
Cr	*37,2*	*nd*
Mn	*283,3*	*nd*
Co	*12,4*	*nd*
Ni	*580,5*	*nd*
Cu	*nd*	*8058,9*
Zn	*85,9*	*nd*
Cd	*nd*	*nd*
Pb	*14,7*	*nd*
P	*1676,5*	*nd*
Ti	*390,1*	*nd*
Al	*2611,5*	*181998,3*
K	*nd*	*52113,6*
Ca	*1592,9*	*nd*
Fe	*4017,0*	*nd*

Polycyclic aromatic hydrocarbons (ng/mg) IPA

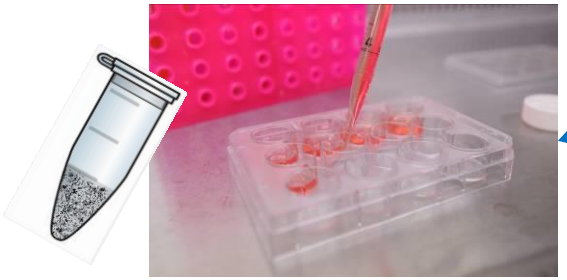
	EURO 3	EURO 6 DPF
Fluorene	10	9
Phenanthrene	135	106
Anthracene	22	6
Fluoranthene	70	25
Pyrene	81	33
Benzo[a]anthracene	26	36
Chrysene	10	11
Benzo[b]fluoranthene	16	11
Benzo[k]fluoranthene	10	16
Benzo[a]pyrene	14	9
Dibenzo[a,h]anthracene	/	/
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	/	/
Benzo[g.h.i]perylene	/	/
Total	**394**	**261**

Estrazione UFP e test *in vitro*

Estrazione UFP in acqua ultrapura sterile tramite sonicazione

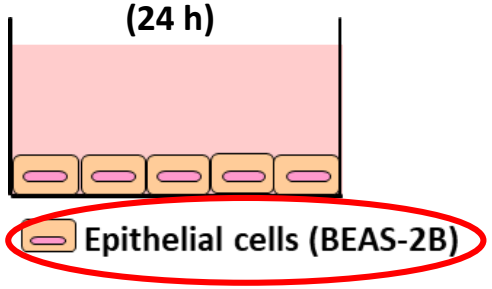


Test *in vitro*



DEP = 50 µg/ml

(24 h)



- ✓ Potenziale ossidativo
- ✓ Vitalità cellulare
- ✓ ROS intracellulari
- ✓ Risposta infiammatoria
- ✓ Potenziale genotossico
- ✓ Morfologia cellulare

- ✓ DLS (dynamic light scattering)

Effetti biologici su cellule bronchiali

1. DLS
(Dynamic light scattering)

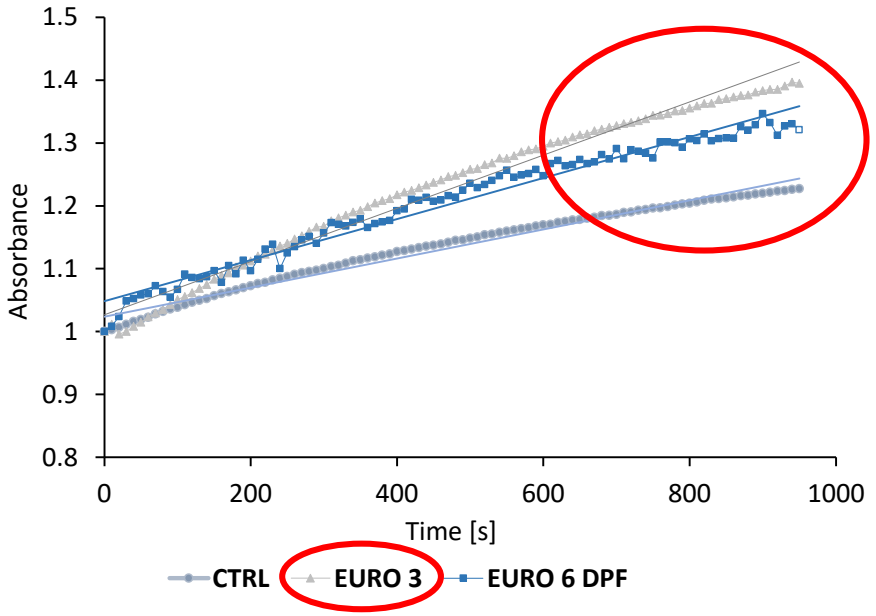
- Euro 3: **328.87** ± 4.7 nm
- Euro 6 DPF: **317.47** ± 1.9 nm

Aerodynamic sizes

2. Potenziale ossidativo

Saggio Citocromo C

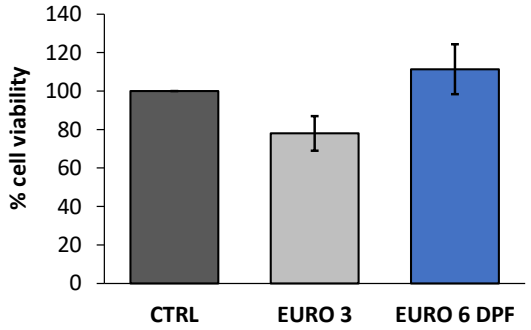
	ΔA/min ± SD	Fold change ± SD
Blank	0.012 ± 0	1 ± 0
Euro 3	0.022 ± 0.0035	1.83 ± 0.29
Euro 6 DPF regeneration	0.018 ± 0	1.5 ± 0



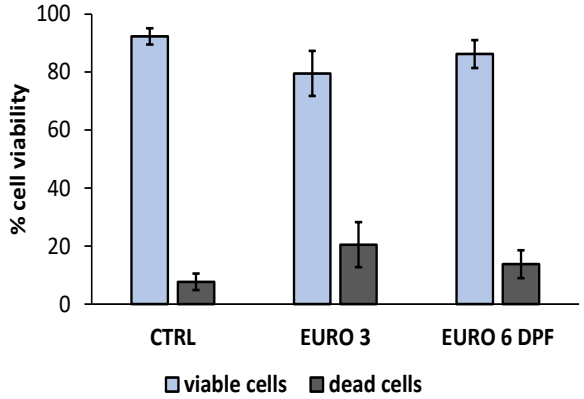
Effetti biologici su cellule bronchiali

3. Vitalità cellulare

Saggio MTT



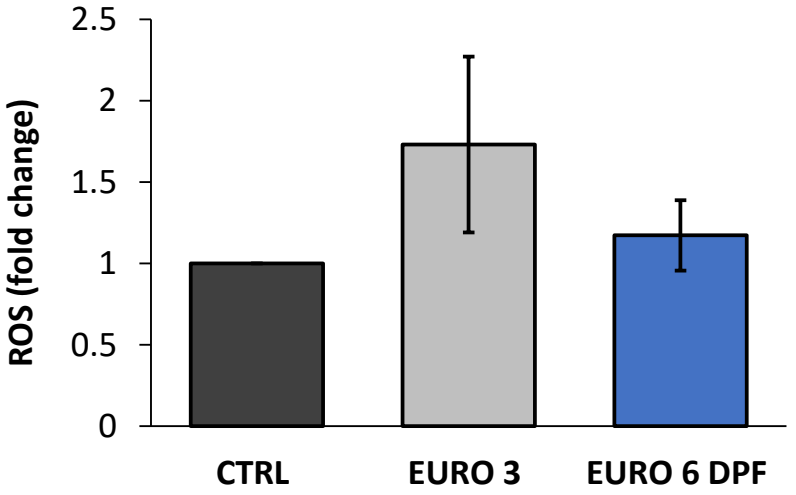
Saggio Trypan Blue



Lieve aumento della mortalità cellulare con DEP Euro 3

4. ROS intracellulari

Saggio DCFDA

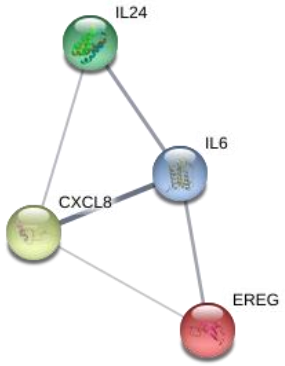


DEP Euro 3 induce lieve aumento di ROS, correlato ad un maggiore potenziale ossidativo

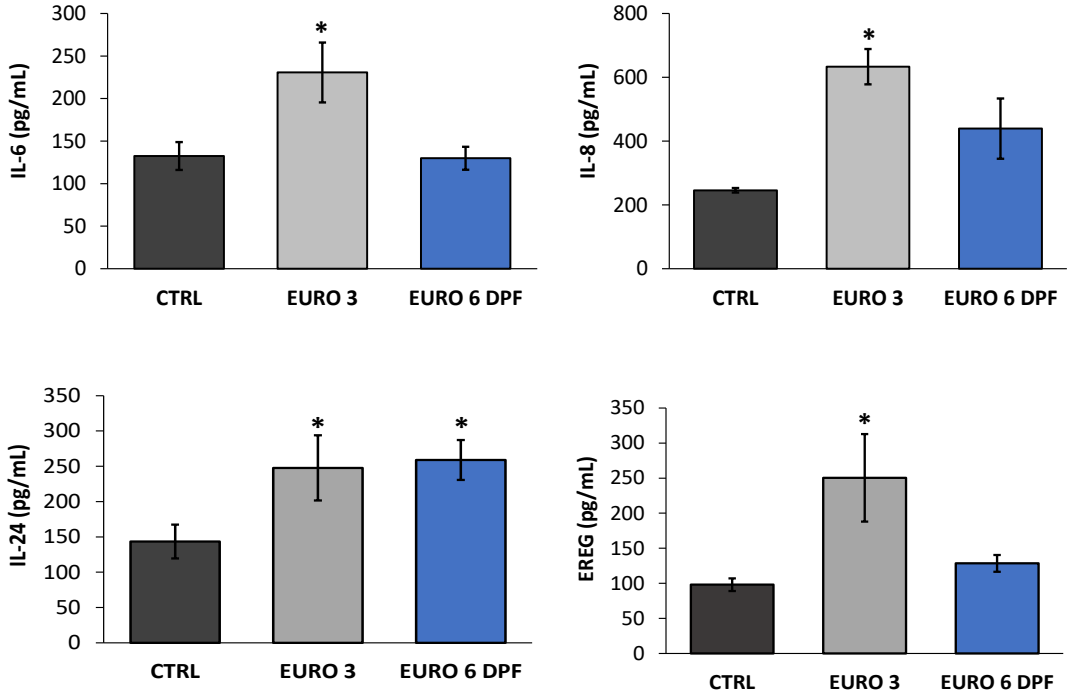
Risultati non statisticamente significativi rispetto al controllo (p<0,05; t-test)

Effetti biologici su cellule bronchiali

5. Risposta infiammatoria



Saggio ELISA



*** statisticamente significativo rispetto al controllo (p<0,05; t-test)**

Aumento del rilascio IL-6 e IL-8 con DEP Euro 3

IL-6 e IL-8: Citochine pro-infiammatorie

Aumento del rilascio IL-24 con Euro3 e 6 e di EREG con Euro 3

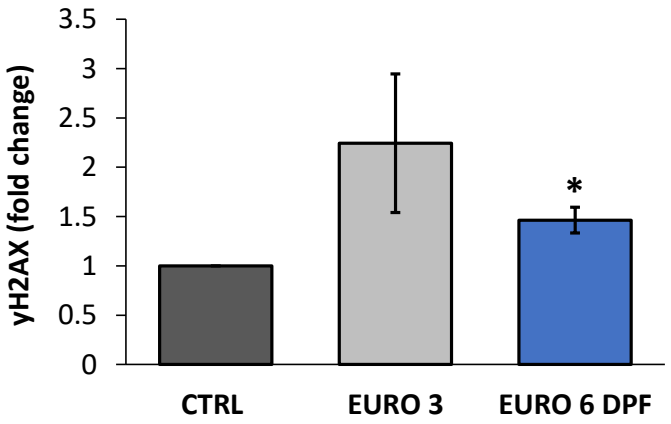
IL-24: induzione di apoptosi, ruolo nel differenziamento e crescita cellulare

EREG (epiregulina): ruolo nello sviluppo dei tumori

Effetti biologici su cellule bronchiali

6. Potenziale genotossico

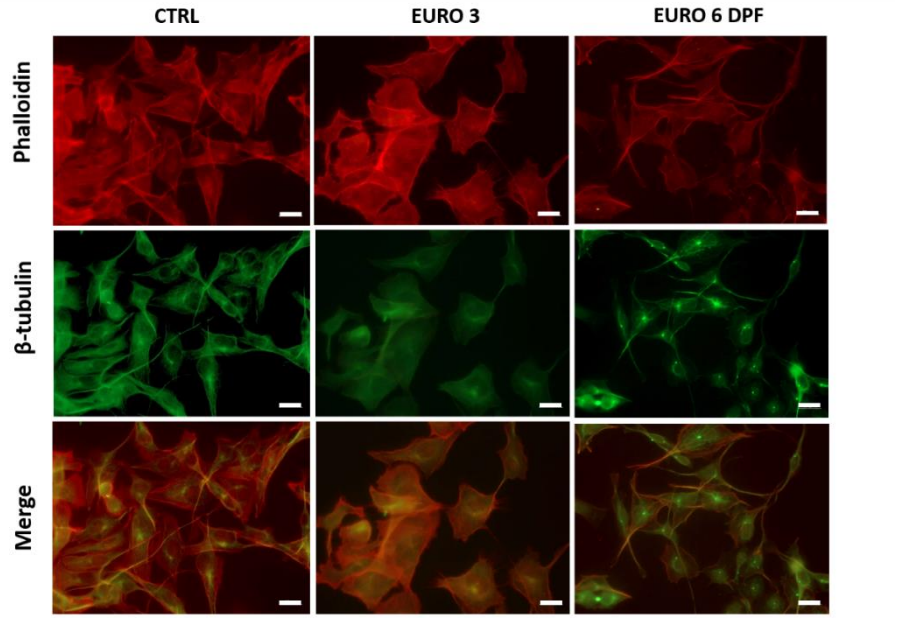
espressione γH2AX



↑ espressione del marcatore γH2AX con DEP Euro6

*** statisticamente significativo rispetto al controllo (p<0,05; t-test)**

7. Morfologia cellulare



DEP EURO 6 -> cambiamento dell'organizzazione citoscheletrica, associato in letteratura ad un possibile arresto del ciclo cellulare nella fase G2/M

Conclusioni

- Limitazioni e difficoltà nel campionamento e in parte nelle misurazioni delle DEP emesse durante la rigenerazione del DPF (una rigenerazione ogni 400 km circa, tempismo nel campionamento, ecc).
- L'emissione dell'Euro 6 durante la rigenerazione del filtro è caratterizzata da un più elevato numero di particelle ultrafini (Dp < 100 nm), da una diversa composizione elementale (più Al, **Fe**, Ca, Mg, Si, S e Zn) rispetto all'Euro 3. L'Euro 3 invece emette particelle caratterizzate da un maggiore contenuto di IPA.
- Sebbene i nuovi veicoli diesel Euro 6, durante la rigenerazione del DPF, emettano più particelle volatili, solide e semivolatili rispetto all'Euro 3, tale emissione è concentrata in una breve fase di guida del veicolo, per di più tendenzialmente ad alte velocità (~ 10 min ogni 400 km) -> differente esposizione della popolazione.
- I marker di infiammazione considerati nei test biologici *in vitro* dimostrano che le DEP emesse dall'Euro 3 hanno indotto una risposta biologica più accentuata rispetto a quella indotta dalle DEP emesse dall'Euro 6 durante la rigenerazione del DPF.
- Le DEP Emesse dall'Euro 6 durante la rigenerazione del DPF sembrano comunque possedere un potenziale genotossico.

Prospettive di sviluppo

- Ricerca applicata ai fenomeni di 'DPF failure' e 'DPF tampering', potenziali anche sui nuovi veicoli Euro 6, per i quali i DPF, non lavorando correttamente, determinano un aumento del rischio di esposizione della popolazione al particolato emesso da tali veicoli.

- Ampliamento della flotta veicolare testata, includendo anche veicoli ad accensione comandata (GDI) e alimentazione ibrida, migliorando l'efficienza del campionamento e di misura. -> Normativa Euro 7 verso la misura delle nanoparticelle Dp≥10nm e probabile focus su rigenerazione del DPF.

- Applicazione di test biologici avanzati con modelli *in vitro* tramite esposizione diretta alle emissioni di DEP.

- La valutazione dell'impatto delle DEP sulla salute umana dovrebbe essere estesa, in un'ottica LCA, fino a considerare tutte le fasi di vita di un veicolo (es. tutte le rigenerazioni del DPF del veicolo).

Grazie per l'attenzione!

INNOVHUB
STAZIONI SPERIMENTALI
PER L'INDUSTRIA

innovazione e ricerca

protect

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO BICOCCA

CENTRO DI RICERCA Università degli Studi di Milano-Bicocca
POLARIS
PARTICULATE MATTER AND HEALTH RISK

Grant agreement: 720851