



Università  
Ca' Foscari  
Venezia

**Dottorato di ricerca  
in Scienze Ambientali  
Scuola di dottorato in Scienze Ambientali  
Ciclo XXIV  
(A.A. 2011 - 2012)**

***Studio dell'ecotossicità di ENP ed ENM per organismi  
acquatici marini***

**SETTORE SCIENTIFICO DISCIPLINARE DI AFFERENZA: BIO/07  
Tesi di dottorato di Diego Minetto, matricola 955568**

**Direttore della Scuola di dottorato**

**Prof. Bruno Pavoni  
Ghirardini**

**Tutore del dottorando**

**Prof. Annamaria Volpi**

## ACRONIMI E GLOSSARIO

**AFSSET** (Agence Francaise de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail) = istituzione pubblica francese con scopi di tutela dell'ambiente e della salute dei lavoratori. L'attuale denominazione risale all'anno 2005.

**AFM** (Atomic Force Microscopy) = microscopio ad altissima risoluzione col quale è possibile osservare ordini di grandezza pari alle frazioni del nanometro.

**APHA** (American Public Health Association) = associazione americana che tutela la salute pubblica dei cittadini, attiva dal 1872.

**ASTM** (American Society for Testing and Materials) = associazione americana per lo sviluppo di standard internazionali, fondata nel 1898 da chimici ed ingegneri.

**AWWA** (American Water Works Association) = fondata nel 1881, l'associazione si occupa della salvaguardia della qualità delle acque principalmente del nord America.

**B.E.T.** (Brunauer Emmett Teller) = la teoria prende il nome dai tre scienziati che la pubblicarono nel 1938. Questa spiega l'assorbimento delle molecole di un gas su una superficie solida, gettando le basi dell'importante tecnica analitica, tutt'oggi impiegata, per la misura della porosità di un elemento.

**BAM** = Butil-Acrlammide.

**BAuA** (Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin) = istituto federale per la tutela della salute dei lavoratori e della salute pubblica.

**Biomarker** = indicatore dello stato biologico.

**CAT** (Catalase) = enzima catalasi coinvolto nella detossificazione della cellula da specie reattive dell'ossigeno.

**CEN** (Comitato Europeo di Normazione) = fondato nel 1961 il CEN è un ente normativo che ha lo scopo di armonizzare e produrre norme tecniche in Europa in collaborazione con enti normativi nazionali e sovranazionali.

**CFU** (Colony Forming Unit) = misura del numero di funghi o batteri vivi presenti all'interno di una colonia, espressa in CFU mL<sup>-1</sup> o CFU g<sup>-1</sup>.

**CNT** (Carbon Nano Tube) = genericamente, nanotubi al C.

**CS** (Core Shield) = riferito alle molecole composte aventi un nucleo costituito da un certo elemento (core), rivestito da una sostanza differente (shield).

**DG** = Digestive Gland

**DLS** (Dynamic Light Scattering) = strumento che misura la dimensione e la distribuzione granulometrica di un materiale sospeso in un mezzo, in funzione del tempo, basandosi sulla diffusione di un raggio laser che attraversa tale mezzo.

**DWCNT** (Double Walled Carbon Nano Tube) = nanotubi al C composti da una doppia parete concentrica.

**EC50** = concentrazione di una sostanza in grado di produrre effetto sul 50% della popolazione ad essa esposta.

**ECHA** (European Chemicals Agency) = promuove l'attuazione della legislazione dell'UE sulle sostanze chimiche allo scopo di tutelare la salute umana e l'ambiente.

**ECM** (Extra Cellular Material) = materiale extracellulare composto prevalentemente da proteine, come ad esempio collagene.

**ECSIN** (European Center for the Sustainable Impact of Nanotechnology) = l'ente, istituito nel 2010, ha come obiettivo quello di effettuare indagini e studi per valutare le eventuali ripercussioni sulla salute umana e sull'ambiente causate dall'esposizione a nanoparticelle e/o nanomateriali. Gli impatti sono considerati anche da un punto di vista sociale, in termini di comprensione ed accettabilità delle nanotecnologie da parte della collettività.

**Endpoint** = obiettivo, scopo del test

**ENM** (Engineered Nano Materials) = sono i NM prodotti con le differenti ENP.

**ENP** (Engineered Nano Particles) = nel complesso, il termine si riferisce a tutte le NP antropiche prodotte per uno specifico scopo e non accidentalmente.

**EPA** (Environmental Protection Agency) = agenzia americana che ha l'obiettivo della tutela dell'ambiente e della salute delle persone.

**FAK** (Focal Adhesion Kinase) = proteina preposta all'adesione reciproca delle cellule.

**FAP** (Filtro Anti Particolato) = un dispositivo presente nelle moderne macchine alimentate a gasolio, in grado di abbattere le emissioni inquinanti causate dalle polveri sottili.

**FFF** (Field Flow Fractionation) = strumento in grado di identificare le nanoparticelle misurando la luce che queste diffondono quando sono colpite da un laser polarizzato.

**FNP** (Fluorescent Nano Particle) = NP dotate di fluorescenza utilizzate prevalentemente in campo medico, per fini diagnostici.

**FOP** (Federal Office of Public Health) = ufficio federale svizzero che si propone di preservare la salute pubblica dei cittadini.

**FS** (Fluorescent Silica) = NP di Si dotate di fluorescenza utilizzate, ad esempio, in campo medico, per fini diagnostici.

**GI** = Gastro Intestinale

**GPX** (Glutathione Peroxidase) = enzima glutatione perossidasi coinvolto nella detossificazione della cellula da specie reattive dell'ossigeno.

**GSH** (Glutathione) = forte antiossidante coinvolto nella detossificazione della cellula da specie reattive dell'ossigeno.

**GSR** (Glutathione S-Reductase) = anche noto come glutatione disolfuro reductasi, è alla base della formazione del GSH.

**GST** (Glutathione S-Transferase) = enzima antiossidante facente parte del sistema glutatione.

**HBSS** (Hanks Balanced Salt Solution) = soluzione fisiologica realizzata a pH e salinità bilanciati a seconda dell'organismo a cui è destinata.

**HeLa** (Henrietta Lacks) = 1920-1951 morta a causa di un tumore al collo uterino. Con la biopsia le furono prelevate alcune cellule tumorali uterine, successivamente commercializzate con il nome HeLa. Tali cellule ad oggi una delle più importanti e diffuse scoperte nell'ambito della ricerca medica.

**HPLC** (High Performance Liquid Chromatography) = tecnica analitica di cromatografia utilizzata per separare una miscela di sostanze chimiche in funzione della differente affinità che queste mostrano nei confronti delle varie fasi.

**HR** = High Resolution

**HT** = Hatching Time

**ICP** (Inductively Coupled Plasma) = strumento con il quale è possibile dissociare la materia in ioni, mediante somministrazione di una grande quantità di energia.

**in vitro** = riferito all'esposizione non di un intero organismo ma solamente di una sua parte, ad esempio organi, tessuti o linee cellulari.

**in vivo** = riferito all'esposizione di un intero organismo

**IRSST** (Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail) = istituto di ricerca fondato nel 1980 in Canada con l'obiettivo di tutelare i cittadini ed i lavoratori dall'esposizione di sostanze nocive.

**ISO** (International Organization for Standardization) = fondato nel 1947, è oggi il più vasto produttore di standard internazionali volontari.

**LC50** = concentrazione di una sostanza letale per il 50% della popolazione ad essa esposta.

**LMS** (Lysosomal Membrane Stability) = il principio di valutazione di questo biomarker si basa sulla colorazione enzimatica dei lisosomi che avviene quando la membrana lisosomiale si destabilizza sotto l'effetto di una soluzione a pH acido. Il tempo necessario alla colorazione è inversamente proporzionale allo stress cellulare.

**LOEC** (Low Observed Effect Concentrations) = concentrazione minima in grado di produrre effetti su un organismo o parte di esso.

**LPO** (Lipid Peroxidation) = processo per cui i lipidi, contenenti acidi grassi insaturi e loro esteri, sono direttamente ossidati dall'ossigeno molecolare.

**MBC** (Minimal Bactericidal Concentration) = è la più bassa concentrazione di una sostanza (antibiotico) richiesta per uccidere un particolare batterio.

**MIC** (Minimal Inhibitory Concentration) = è la più bassa concentrazione di una sostanza richiesta per inibire visibilmente la crescita di microorganismi.

**MINChar** (Minimum Information on Nanoparticle Characterization) = istituita nel 2008, l'iniziativa mira ad accrescere la qualità delle informazioni di carattere tossicologico sulle nanoparticelle, supportandole con l'appropriata caratterizzazione dei materiali.

**MS** (Mass Spectrometry) = tecnica analitica basata sulla possibilità di separare una miscela di ioni in funzione del loro rapporto massa/carica, generalmente tramite campi magnetici statici o oscillanti.

**MT** (MetalloTioneine) = costituiscono una famiglia di proteine a basso peso molecolare, localizzate nell'apparato del Golgi, caratterizzate da un'alta affinità per i metalli pesanti.

**MTLP** (MetalloTioneine Like Protein) = proteine simili alle metallotioneine.

**MWCNT** (Multi Walled Carbon Nano Tube) = nanotubi al C composti da diverse pareti concentriche.

**NET** (Neutrophil Extracellular Trap) = sono delle reti di fibre extracellulari, composte principalmente di DNA da neutrofili, in grado di legarsi agli organismi patogeni.

**NGM** = Nematode Growth Medium.

**NIOSH** (National Institute for Occupational Safety and Health) = agenzia federale per la conduzione di ricerche e per la prevenzione di ferite o malattie connesse all'occupazione.

**NIPAM** = N-IsoPropilAcilammide.

**NM** = Nano Material.

**NOEC** (No Observed Effect Concentration) = concentrazione per cui non sono osservabili effetti su un organismo o parte di esso.

**NOM** = Natural Organic Matter.

**NP** = Nano Particle.

**NRRT** (Neutral Red Retention Time) = test per la misura della stabilità della membrana lisosomiale. Il tempo di rilascio del colorante rosso è inversamente proporzionale allo stress subito dalle cellule.

**OECD** (Organisation for Economic Co-operation and Development) = organizzazione per la promozione di politiche atte a migliorare il benessere socio economico delle persone in tutto il mondo.

**OEL** = Occupational Exposure Limits.

**OLED** (Organic Light Emitting Diode) = tecnologia che permette di realizzare schermi a colori con la capacità di emettere luce propria, senza sorgenti esterne.

**PBS** = Phosphate Buffered Saline.

**PDMS** = PoliDiMetilSilossano.

**PEC** (Predicted Environmental Concentration) = la concentrazione di una certa sostanza che, indicativamente, ci si aspetta di trovare nell'ambiente.

**PMMA** = PoliMetilMetAcrilato.

**PNEC** (Predicted No Effect Concentration) = concentrazione di una sostanza al di sotto della quale ci si aspetta che essa non possa causare effetti avversi.

**QA** = Quality Assurance.

**Q-Ds** (Quantum DOTS) = nanocristalli semiconduttori fluorescenti.

**REACH** (Registration Evaluation and Authorization of Chemicals) = regolamento della CE, entrato in vigore il 1° luglio 2007, avente come obiettivo l'utilizzo in sicurezza delle sostanze chimiche.

**ROS** (Reactive Oxygen Species) = sono i radicali liberi a maggior diffusione. I più importanti ROS sono l'anione superossido  $O^{2-}$ , il perossido d'idrogeno  $H_2O_2$  e il radicale ossidrilico  $\bullet OH$ .

**S.C.p.A.** = Società Consortile per Azioni.

**SAED** (Selected Area Electron Diffraction) = tecnica sperimentale cristallografica realizzabile con un TEM. Si può ottenere un'immagine composta da cerchi concentrici, che costituisce lo spettro della sostanza analizzata.

**SD** (Standard Deviation) = indice di dispersione delle misure sperimentali, ovvero stima della variabilità di una popolazione di dati.

**SEM** (Scanning Electron Microscope) = microscopio elettronico il cui fascio di elettroni non è continuo ma scandito, una riga alla volta, per tutta l'area da analizzare.

**SIN** (Società Italiana di Nanotossicologia) = propone la valutazione dell'impatto delle nanotecnologie sull'ambiente e sulla salute, dal punto di vista della ricerca, dell'innovazione industriale e della legislazione.

**SM** (Standard Methods) = società che, dal 1905, ha pubblicato centinaia di tecniche analitiche per la determinazione della qualità delle acque.

**SOD** (Super Oxide Dismutasi) = enzima antiossidante.

**STM** (Scanning Tunneling Microscope) = microscopio elettronico per l'acquisizione di immagini superficiali a livello atomico.

**SVL** (Snout Vent Length) = endpoint che prevede la misura standard della lunghezza del corpo , dalla punta del naso fino all'ano.

**SWCNT** (Single Walled Carbon Nano Tube) = nanotubi al C composti da un'unica parete

**TBARS** (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) = sostanze che rappresentano il sottoprodotto delle reazioni di perossidazione lipidica. Possono essere individuate mediante l'utilizzo di acido tiobarbiturico e la loro quantificazione costituisce una misura indiretta delle ROS, altrimenti difficili da misurare direttamente.

**TBL** = Total Body Length.

**TBT** (TriButyl-Tin) = composti dello stagno considerati fortemente tossici per gli organismi e, per questo, banditi dall'Organizzazione Marittima Internazionale.

**TEM** (Transmission Electron Microscopy) = microscopio elettronico con cui si possono visualizzare anche le strutture dell'interno di un campione, regolando opportunamente l'energia del fascio di elettroni.

**TSCA** (Toxic Substances Control Act) = l'obiettivo dell'Atto è quello di permettere ad EPA la regolamentazione sia dei nuovi prodotti chimici prima dell'immissione nel mercato, sia delle sostanze chimiche esistenti, quando queste costituiscano un irragionevole rischio per la salute o per l'ambiente, regolandone la distribuzione e l'uso.

**TSK** (Trimmed Spearman Karber) = metodo statistic non parametrico utilizzato in ecotossicologia per il calcolo di EC50 ed LC50.

**UV-Vis** = Ultra Violet-Visible.

**WPCF** = Water Pollution Control Facility.

**XOC** = Xenobiotic Organic Compound.



# 1. SCOPO DELLA RICERCA

## 1.1 Introduzione

Quello dei nanomateriali (NM) e delle nanotecnologie è un fiorente settore industriale che, già da alcuni anni, alimenta un mercato altrettanto florido e destinato, fra l'altro, ad aumentare, per via della quantità crescente di investimenti che è in grado di attirare (Joner et al, 2008).

I NM, infatti, o meglio, gli ENM (Engineered Nano Materials), si trovano non soltanto nei manufatti moderni e nelle tecnologie d'avanguardia ma anche in prodotti comuni, di largo utilizzo ed accessibili a tutti. Nella fattispecie, il nano biossido di titanio ( $n\text{TiO}_2$ ), la cui produzione annua è stimata aggirarsi attorno le 5000 tonnellate (Müller, 2007) e che, per questo, rappresenta la ENP in assoluto più sintetizzata, è impiegato, in misura del 70%, per la realizzazione di cosmetici e filtri solari (Nowack, 2009). Il nAg, pur non eguagliando in quantità la produzione annua del  $n\text{TiO}_2$ , è comunque presente in un numero di prodotti diversi di gran lunga superiore, molti dei quali appartenenti anche al settore alimentare. Inoltre, molti altri metalli o loro ossidi sono oramai comunemente utilizzati in settori industriali quali ad esempio: cosmesi, edilizia, energia, tessile, sanitario, farmaceutico ed alimentare. A questa categoria di ENM inorganici vanno poi aggiunti tutti i nanomateriali organici, come i fullereni, i nanotubi al carbonio (CNT) ed il Carbon Black (CB), l'impiego dei quali è in costante aumento sia nel settore delle materie plastiche tradizionali, a cui si stanno via via sostituendo, sia nel settore farmaceutico (carriers per farmaci e strumenti di diagnosi) (si vedano i capitoli 2 e 3).

Questi dati inducono a pensare che tali ENM possano causare degli impatti ambientali, generati dalla loro inevitabile dispersione nei vari comparti, e sono inoltre sufficienti a sollevare delle perplessità inerenti gli effetti delle ENP sulla salute umana e degli altri esseri viventi (Oberdörster et al, 2006). In particolar modo, si ipotizza che questa categoria di inquinanti possa penetrare nel comparto acquatico e, più nello specifico, si prevede che l'ambiente marino rappresenti il recettore finale delle ENP (Canesi et al, 2009), come avviene anche per molti degli inquinanti tradizionali.

Da quanto visto fin qui, si intuisce perché, negli ultimi cinque anni, ci sia stato un aumento continuo della produzione di studi di carattere ecotossicologico che vertono sugli effetti delle ENP nei confronti di organismi acquatici (cfr. par. 5.2).

La messa a punto di saggi di tossicità con specie acquatiche per la valutazione degli effetti delle ENP è una cosa alquanto complessa. I test in oggetto, infatti, dovrebbero poter coniugare:

- i requisiti di **riproducibilità**, che attualmente sono posseduti soltanto dai test standard, previsti dai vari protocolli riconosciuti a livello internazionale, per le sostanze chimiche tradizionali;
- le emergenti **esigenze sperimentali** richieste da materiali completamente nuovi e dal loro comportamento ancora in gran parte sconosciuto.

Quest'ultimo punto incorpora tutte le operazioni, le misure e le modalità operative nuove ed aggiuntive che sono necessarie all'esecuzione dei test con materiali quali le ENP ma che costituiscono, al tempo stesso, delle variazioni rispetto alle linee guida originarie e pertanto, come prevedibile, sono attualmente oggetto di dibattito scientifica per via della loro mancanza di omologazione, fenomeno che porta alla conseguente perdita della ripetibilità e della riproducibilità sperimentale. Inoltre, va aggiunto che, qualora si verificano, durante i test, degli effetti avversi nei confronti delle varie specie, non sempre sono chiari i meccanismi biochimici che portano alla manifestazione della tossicità di tali sostanze e, cosa altrettanto importante, dato il comportamento nei mezzi acquosi delle ENP, è spesso difficile associare uno specifico effetto ad un effettivo scenario espositivo, vanificando così le finalità dei test ecotossicologici. La trattazione di questi aspetti è stata effettuata più approfonditamente nei capitoli 5 e 6. Per il momento, qui si vuol solo aggiungere che questo tipo di attività sperimentale subisce un'ulteriore complicazione nel momento in cui si voglia condurre tali saggi di tossicità con delle **specie marine**. Gli ioni dei sali disciolti nell'acqua, infatti, sembrano destabilizzare ulteriormente le ENP disperse in essa, cambiando l'effettivo scenario espositivo e costituendo, quindi, un fattore di confusione aggiuntivo (Brant et al., 2005; French et al., 2009). Questo è uno dei motivi per cui la produzione scientifica di studi e relativi articoli inerenti i test di tossicità delle ENP, con le specie di acqua marina, rimane ancora **esigua**.

La crescente domanda di ENP per il mercato, l'ingente produzione industriale di queste ed il loro sempre più diffuso utilizzo, quindi, stanno aumentando ad una velocità che non è confrontabile con la velocità della messa a punto di saggi di tossicità efficaci, riproducibili e standardizzati per la valutazione degli effetti di queste. L'esistenza di questo profondo **divario** ha delle importanti ripercussioni anche sugli **aspetti normativi** del problema. Attualmente, infatti, c'è un ritardo nella produzione di risultati sperimentali specifici quali curve di concentrazione-risposta, valori di EC50, valori soglia e tale ritardo è causa della mancanza di strumenti pratici che, se impugnati dal Legislatore, potrebbero portare alla produzione di norme e decreti efficaci per la regolamentazione degli impatti ambientali dovuti alle ENP. A titolo di esempio, basti sapere che,

attualmente, non esiste ancora una semplice ordinanza che imponga ai produttori di dichiarare che il loro prodotto contenga una fonte di ENP. Chi lo notifica spontaneamente, lo fa soltanto per scopi pubblicitari, vantando i materiali all'avanguardia presenti all'interno della propria merce.

## 1.2 Obiettivi generali

Il presente lavoro ha come obiettivo principale quello di valutare la tossicità delle nanoparticelle di  $\text{TiO}_2$ , nei confronti di specie acquatiche marine.

La prima fase affrontata del percorso di ricerca (fig. 1.1) è stata quella **bibliografica**, consistente nella raccolta di informazioni in merito alle ENP ed agli studi inerenti la tossicità di queste nei confronti delle specie acquatiche (cfr. cap. 6). Questa fase si è estesa per tutta la durata della ricerca e l'acquisizione delle informazioni, nei tre anni di dottorato, è potuta aumentare progressivamente, parallelamente alla produzione degli studi correlati.

Tra le varie ENP, la scelta è ricaduta sul **nTiO<sub>2</sub>** proprio a causa della sua diffusione ubiquitaria in numerosi prodotti di consumo (cfr. cap. 3). Su questo sono state effettuate delle analisi di caratterizzazione chimica, sia della sostanza tal quale (caratterizzazione primaria), sia del comportamento di questa in acqua marina ricostruita (caratterizzazione secondaria).

La scelta di impiegare **organismi marini**, invece, è attribuibile alla scarsa produzione bibliografica inerente, di cui prima si faceva menzione e di cui si tornerà a parlare più avanti (cfr. par. 5.2).

Nello specifico, le specie componenti la batteria di organismi per lo sviluppo dei test, sono state:

- il batterio *Vibrio fischeri*;
- l'alga unicellulare *Phaeodactylum tricorutum*;
- due molluschi, l'ostrica *Crassostrea gigas* e il mitilo *Mytilus galloprovincialis*;
- il crostaceo *Artemia franciscana*.

Tali specie sono state selezionate per poter impiegare un gruppo di organismi diversificati sia secondo un punto di vista evolutivo, sia ecologico (detritivori, produttori primari, filtratori e consumatori). Inoltre, queste sono tutte specie per le quali esistono collaudate procedure standard, per l'esecuzione dei test di tossicità con sostanze chimiche tradizionali, riconosciute a livello internazionale (cfr. cap. 8) e, quindi, dei solidi punti di partenza per questo lavoro di tesi.

In ogni caso, il disegno sperimentale di questa tesi, pur avendo rispettato la rigorosità imposta dai suddetti protocolli, è stato concepito fin dagli inizi come **flessibile** all'introduzione di modifiche, in funzione sia dei risultati che si sarebbero ottenuti di volta in volta con una sostanza dal comportamento nuovo ed ignoto come il nTiO<sub>2</sub> (cfr. capp. 9 e 10), sia delle nuove informazioni bibliografiche che, progressivamente, si sarebbero acquisite. Da questo punto di vista, il concepimento del disegno sperimentale si è dimostrato un aspetto impegnativo poichè si

avvertiva l'esigenza di provare ad essere innovativi mantenendosi, allo stesso tempo, conservatori.

Riassumendo, per ognuna delle diverse specie, i saggi di tossicità hanno seguito le seguenti fasi, visibili anche nel diagramma di flusso in figura 1.1:

- una fase di **allestimento**, in cui la preparazione ed il mantenimento degli organismi si atteneva alle linee guida;
- una fase preliminare di **taratura**, il cui scopo era quello di individuare l'intervallo di concentrazioni più idoneo, all'interno del quale ottimizzare il lavoro sperimentale;
- una successiva fase di **ricalibrazione** in cui si introducevano anche le eventuali modifiche al protocollo, necessarie per realizzare degli esperimenti specifici con lo scopo di verificare le evidenze che sembravano emergere dai precedenti risultati ottenuti.

Si è provato, inoltre, ad allestire un test per verificare e quantificare l'eventuale bioaccumulo lungo la catena alimentare, per la realizzazione del quale, si sono utilizzate le alghe *P. tricornutum* e *Dunaliella tertiolecta* ed il crostaceo *A. franciscana*. Il test è stato utilizzato anche per provare ad effettuare un bilancio di massa del Ti totale. Gli approfondimenti di questa parte sperimentale nonché degli strumenti e delle tecniche analitiche adoperati appositamente, si trovano nei paragrafi 9.4 e 10.6.

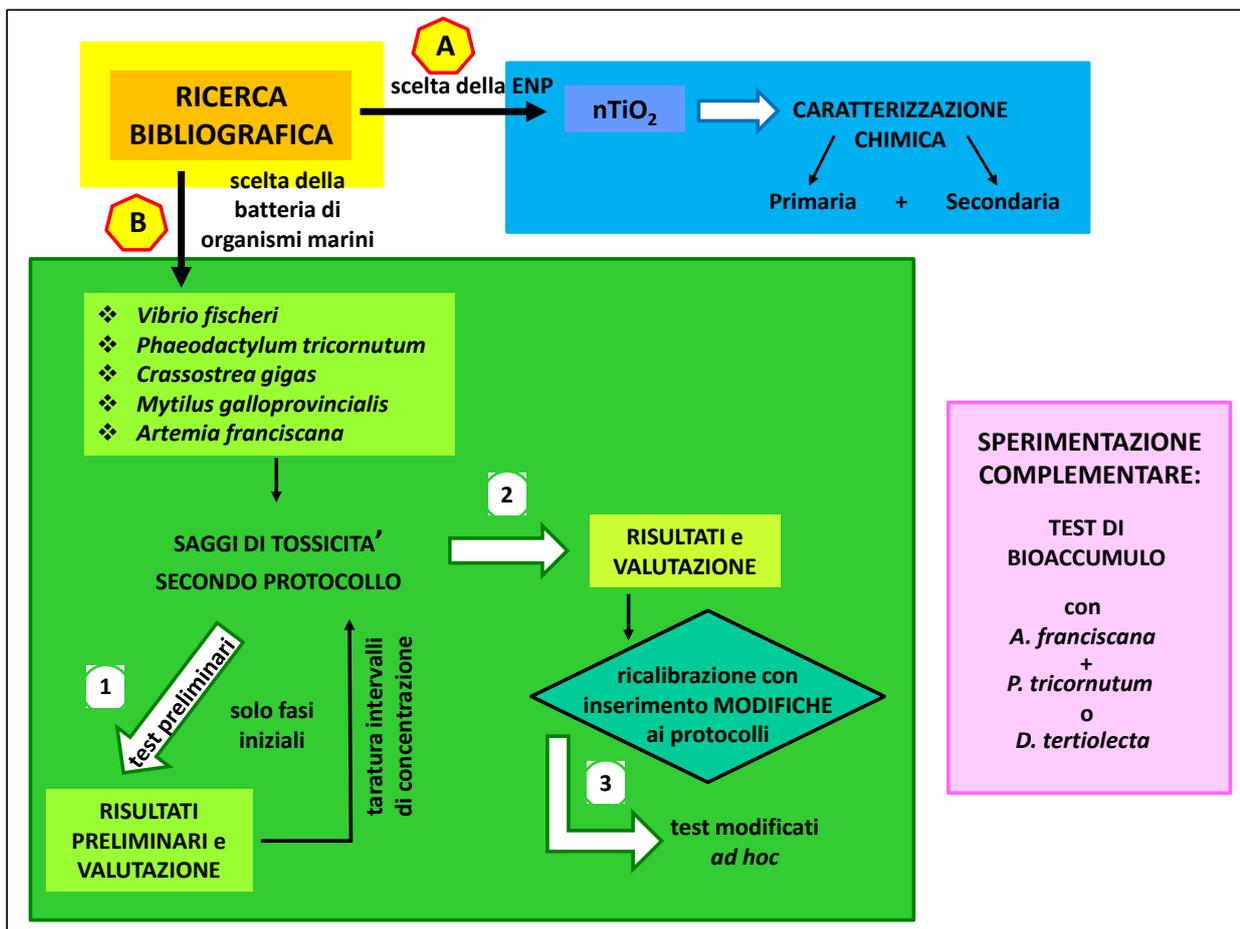


Figura 1.1 – Diagramma di flusso che riassume l’attività di ricerca svolta per questa tesi di dottorato.

L’esperienza maturata e le evidenze scientifiche ricavate da questo lavoro di tesi, sono state impiegate in diverse attività, quali seminari di approfondimento sulla tematica, pubblicazioni su riviste nazionali ed internazionali, poster e/o presentazioni orali per la partecipazione ai convegni scientifici. Tali attività si possono visualizzare più dettagliatamente al paragrafo 11.2.

## **2. NANOPARTICELLE E NANOTECNOLOGIE**

Questo capitolo fornisce le definizioni di nanoparticelle e di nanotecnologia, classificando e descrivendo i vari nanomateriali in base alla loro origine ed alle loro proprietà chimico-fisiche. Nel capitolo sono inoltre elencate le tecniche e la strumentazione necessarie per ricavare le informazioni inerenti le caratteristiche dei suddetti materiali tal quali (caratterizzazione primaria) e del loro comportamento una volta dispersi in una matrice acquosa (caratterizzazione secondaria). In funzione di tali caratteristiche sono quindi descritti gli usi e le applicazioni dei nanomateriali, ovvero il loro mercato e, infine, sono elencati brevemente i principali riferimenti normativi per la regolamentazione della produzione e dell'utilizzo delle nanoparticelle.

## 2. NANOPARTICELLE E NANOTECNOLOGIE

### 2.1 Definizione di nanoparticelle

Nel 2004, The Royal Society & The Royal Academy of Engineering ha fornito la seguente definizione di **nanoparticelle** (NP, Nano Particles), ancora oggi accettata e condivisa dalla maggior parte della comunità scientifica e che, fra l'altro, viene adottata anche in questo lavoro: “con il termine nanoparticelle viene indicata una sottoclassificazione delle particelle ultrafini in cui rientrano le particelle aventi **due o tre dimensioni non superiori ai 100 nm**” (Royal Society & Royal Academy of Engineering, 2004).

In realtà, sebbene per tutti il nanometro equivalga a  $10^{-9}$  metri, ovvero un millesimo di micron non c'è ancora un perfetto accordo sulla definizione precisa di NP.



Figura 2.1 – Il rapporto tra il diametro di una moneta da 1 eurocent ed il diametro terrestre è di  $10^{-9}$ .

Alcuni autori, ad esempio, continuano ad utilizzare una definizione meno restrittiva, che comprende “tutte le particelle con **almeno una** delle tre dimensioni inferiore ai 100 nm” (Farrè et al, 2009; Savolainen 2010; Wiesenthal et al, 2011; Som et al, 2011). Tale dicitura, però, sembra essere poco precisa poiché non considera le tre dimensioni. Possono quindi nascere perplessità di fronte alla classificazione di una fibra avente diametro inferiore ai 100 nm ma lunghezza di alcuni micron.

Secondo Ju-Nam and Lead (2008), invece, per parlare di NP **tutte e tre** le dimensioni devono essere comprese tra 1 e 100 nm.

Per gli scienziati giapponesi si considerano NP le particelle al di sotto dei **50 nm** e ci si riferisce a quelle di dimensioni maggiori come a particelle “ultrafini” (da: [www.azonano.com](http://www.azonano.com)).

La Commissione Europea, in maniera ancora non ufficiale, ha stilato una bozza di raccomandazioni per l'accordo sulla definizione di nanoparticelle. Tale documento si intitola "Commission Recommendation on the definition of nanomaterial" (<http://osha.europa.eu/en/news/eu-european-commission-recommendation-on-the-definition-of-nanomaterial>). Nei vari punti di cui si compone, la bozza propone anche che, per poter parlare di materiale nanostrutturato, il 50% delle particelle che lo compongono debbano avere delle dimensioni comprese tra 1 e 100 nm. Si raccomanda inoltre che, entro il **2014**, venga redatta una review con delle proposte per uniformare definitivamente la definizione di nanomateriale.

Da questi presupposti, resta quindi assodato che non esiste ancora un accordo ufficiale sulla vera e propria definizione di nanoparticella, anche se, come già ribadito, buona parte del mondo scientifico condivide quella della Royal Society & Royal Academy of Engineering.

## 2.2 Definizione di nanotecnologia

Il termine **nanotecnologia** è un'espressione che designa la capacità di operare con materiali alla scala dei nanometri. Il termine fu utilizzato per la prima volta nel 1974 da Norio Taniguchi, un ricercatore dell'università di Tokyo. Inizialmente, la forza motrice della miniaturizzazione è pervenuta dall'industria elettronica, che mirava alla creazione di periferiche elettroniche sempre più piccole e precise. Da qualche anno invece, questa moderna branca scientifica detta nanotecnologia si sta sviluppando rapidamente ed in molti settori, complici le proprietà assolutamente innovative che questi materiali mostrano di avere rispetto a quelli tradizionali, detti **bulk**.

Poichè la ricerca e lo sviluppo di nuove NP stanno crescendo molto rapidamente, quest'area attira molti investimenti. Sembra infatti che questi siano cresciuti dai **13 miliardi** di \$ del **2004** ai **50 miliardi** di \$ nel **2006**. E non solo; Joner et al prevedono che possano raggiungere i **2600 miliardi** di \$ entro il **2014** (Joner et al, 2008), mentre secondo la National Science Foundation, nella prossima decade l'industria delle nano sarà un affare da **un trilione** di \$ (Wiesenthal et al, 2011).

I settori delle nanotecnologie interessano un ampio spettro di ambiti operativi: l'energia (produzione, catalisi, accumulo), i prodotti di consumo (lubrificanti, abrasivi, vernici, gomme, abbigliamento sportivo), i componenti elettronici (chips, schermi), il risanamento (assorbimento di inquinanti, filtraggio delle acque, disinfezione), la medicina (diagnostica, somministrazione di farmaci), la cosmesi (creme e filtri solari), il tessile e persino gli alimenti (additivi, confezioni).

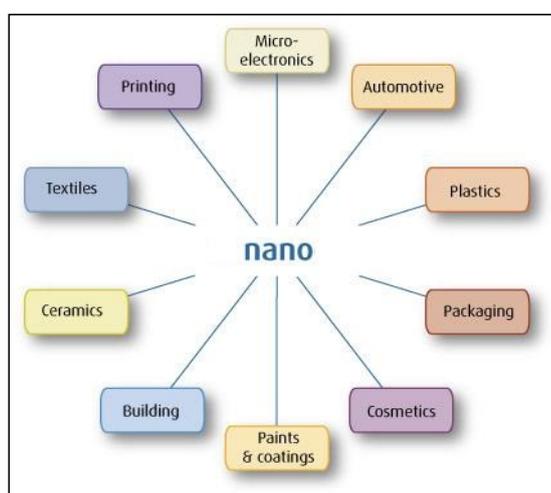


Figura 2.2 – Principali settori di sviluppo delle nanotecnologie.

Naturalmente, come conseguenza di tale diffusione, si presume che un elevato quantitativo di prodotti e materiali sia destinato a venire a contatto con le matrici ambientali, durante le fasi di preparazione, trasporto, utilizzo e, infine, come rifiuto.

## 2.3 Origine delle nanoparticelle

A seconda delle fonti, le NP possono rientrare in una delle tre seguenti tipologie:

- naturali;
- antropogeniche non intenzionali;
- antropogeniche intenzionali, create e/o modificate per lo scopo (ENP, Engineered Nano Particles).

(Nowack and Bucheli, 2007)

### 2.3.1 NP naturali

A questa categoria appartengono:

- ❖ NP **biogeniche**, come ad esempio gli acidi fulvici e umici o i virus;
- ❖ NP **geogeniche** ovvero provenienti dalla geosfera come particelle metalliche o di carbone;
- ❖ NP **pirogeniche** cioè prodotte durante una combustione, il cui esempio tipico è costituito dall'emissione di fumi vulcanici.

### 2.3.2 NP antropogeniche non intenzionali

Sono tutte quelle NP non naturali, la cui origine è attribuibile alle attività antropiche pur non essendoci la precisa intenzione di produrle.

Un esempio di ciò sono le NP che si originano durante le combustioni nei motori a scoppio o quelle che fuoriescono dai camini delle centrali elettriche alimentate da combustibili fossili; altre NP possono essere rilasciate in atmosfera involontariamente dall'attività estrattiva delle miniere. Anche i sistemi di macinazione dei cereali sembrano essere una fonte importante di NP non intenzionali. Costruiti in metalli quali Fe, Ni e Cr, essi col tempo si usurano e possono rilasciare NP metalliche nelle farine alimentari (da: [www.mednat.org](http://www.mednat.org)).

### 2.3.3 NP antropogeniche intenzionali (ENP)

Le nanoparticelle ingegnerizzate rappresentano l'ultima frontiera dell'industria. I nanomateriali (ENM, Engineered Nano Materials) così prodotti possono essere costituiti da un unico tipo di ENP o dalla combinazione di alcune di queste. Le dimensioni estremamente ridotte delle ENP conferiscono agli ENM proprietà innovative, fondamentalmente riconducibili a questi due aspetti:

- un'elevata **area superficiale** (Oberdörster et al, 2005);
- un **effetto quantico** dovuto alla discretizzazione della carica.

Il primo dei due aspetti equivale alla possibilità, per questi materiali, di offrire un'ampia superficie di scambio per le reazioni (figg. 2.3 e 2.4), visto che il 40 - 50% dei loro atomi si trova sulla superficie (Farrè et al, 2009). Il secondo aspetto implica che l'energia degli elettroni, essendo la carica molto localizzata, possa assumere solo determinati valori (Urbini, 2007).

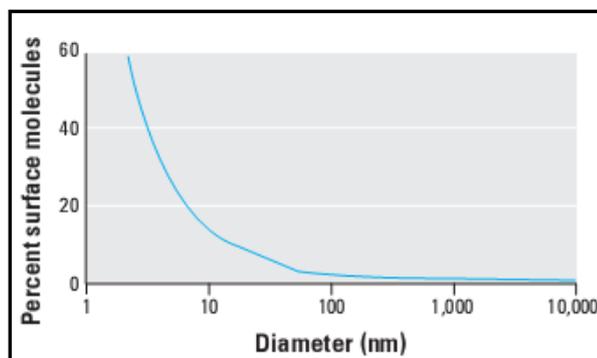


Figura 2.3 – Aumento della percentuale delle molecole superficiali con la diminuzione delle dimensioni delle particelle (Oberdörster et al, 2005).

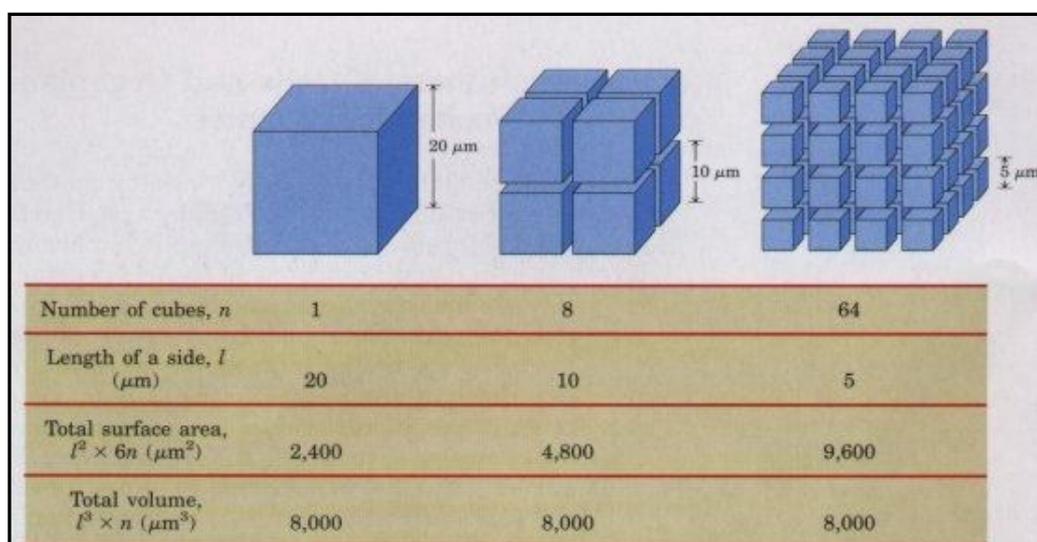


Figura 2.4 – Aumento dell'area superficiale al diminuire delle dimensioni (www.bioinfo.org.cn).

Rispetto alla forma bulk ne derivano quindi:

- una **maggiore reattività**;
- proprietà **chimico-fisiche** diverse;
- proprietà **elettromagnetiche** differenti.

Alcuni esempi di quanto appena visto saranno illustrati nel successivo paragrafo 2.6.

## 2.4 Classificazione delle nanoparticelle

Frequentemente, le ENP vengono classificate sulla base della loro composizione **chimica** e, tuttavia, col supporto di informazioni di carattere **morfometrico**. Una prima suddivisione separa le ENP a **base di carbonio** (carbon-based), quindi organiche, da quelle **minerali** (Joner et al, 2008).

Una classificazione più fine le suddivide in:

- fullereni (fullereni di Buckminster, endofullereni), nanotubi al carbonio, carbon black ecc.);
- quantum dots;
- ENP metalliche (Au, Ag, Fe ecc.) e loro ossidi (ZnO, TiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, ecc.);
- altro (composti di metalli, particelle di Fe zero-valente, nanoargille ecc.).

La sintesi dei materiali nanostrutturati può seguire due tipi di processi, tra loro opposti (Nicolau et al, 2000; Ju-Nam and Lead, 2008):

- l'approccio **top down**, con cui, partendo dal materiale bulk, si ottengono le NP per successivo ridimensionamento meccanico;
- l'approccio **bottom up**, che permette la sintesi delle NP partendo dalla materia a scala atomica, mediante l'ausilio di sali metallici.

Quanto detto è schematizzato nella figura 2.5.

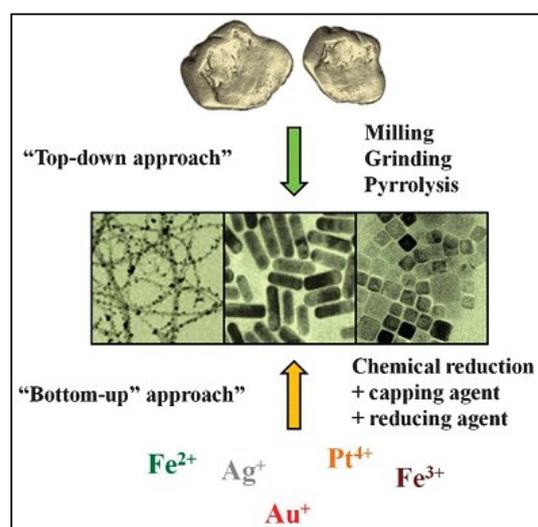


Figura 2.5 – Schematizzazione dei due differenti approcci per la sintesi delle ENP (Teow et al, 2011).

A seguire, una classificazione sommaria delle varie ENP. Per ulteriori approfondimenti, si consiglia la consultazione di siti internet quali [www.nanotechproject.org/inventories/consumer/](http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/), oppure [www.nanowerk.com](http://www.nanowerk.com), dove si possono esplorare inventari in aggiornamento costante.

### 2.4.1 Fullereni

I fullereni, scoperti nel 1985 da Richard Buckminster Fuller, sono costituiti da C puro e ne rappresentano una forma allotropica. Il più semplice è costituito da **60 atomi di C** (C<sub>60</sub>), disposti

a formare una sfera. Dato il loro aspetto, i fullereni sono detti anche noti come “bucky balls” (Joner et al, 2008). Queste sfere possiedono un diametro di circa 40 nm. Per rendersi conto delle dimensioni estremamente ridotte, basti pensare che un globulo rosso, con i suoi 7000 nm di diametro, è ben 2 ordini di grandezza superiore. Il fullerene successivo più stabile è il  $C_{70}$ , dalla forma leggermente allungata.

I fullereni possono contenere all'interno della sfera degli atomi o anche ioni. In tal caso assumono la denominazione di **endofullereni**. Essi si indicano con la denominazione  $M@C_{nn}$ , dove “M” è il metallo inglobato nella struttura di “nn” atomi di C.

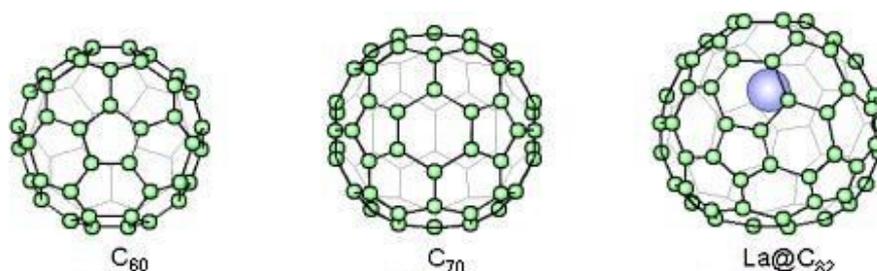


Figura 2.6 - Tre esempi di fullereni; da sinistra:  $C_{60}$  (bucky ball),  $C_{70}$  ed endofullerene contenente lantanio (www.photon.t.u-tokyo.ac.jp).

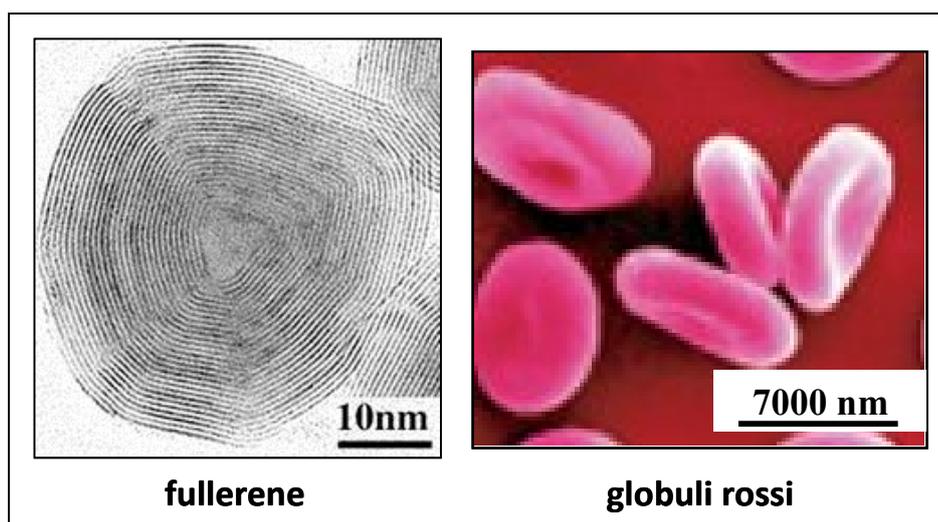


Figura 2.7 - Immagine al TEM di un fullerene (advantage.bobrosenbaum.com); confronto dimensionale con un globulo rosso.

#### 2.4.2 Nanotubi al C

Se fatti evaporare, i fullereni si organizzano in forma di tubi, i cosiddetti **nanotubi al C** (CNTs, Carbon Nano Tubes) (fig. 2.8) (Maser et al, 2002).

A seconda del numero delle pareti che li rivestono i CNTs possono essere Single Walled Carbon Nanotubes (SWCNTs), Double Walled (DWCNTs) o Multi Walled (MWCNTs) (fig. 2.9).

Un capello umano, con il suo diametro di circa 80'000 nm, è ben 3 ordini di grandezza più grande di un CNT (fig. 2.8).

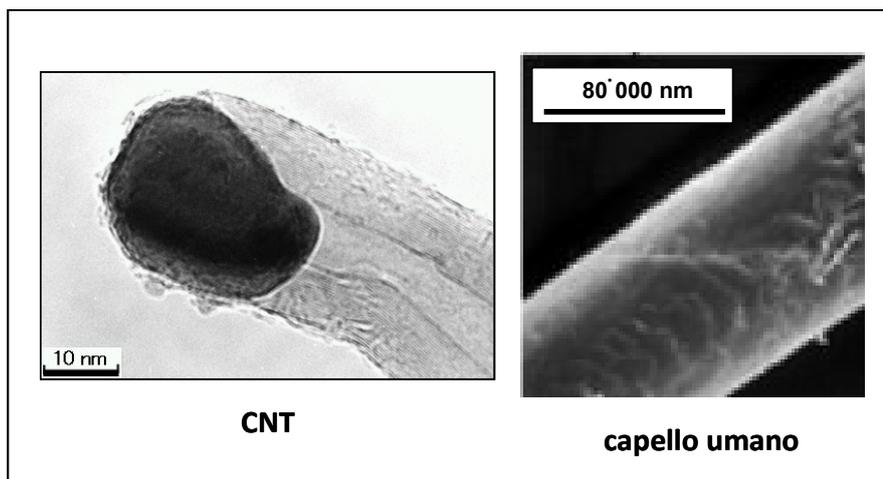


Figura 2.8 - Immagini al TEM di un CNT ([www.endomoribu.shinshu-u.ac.jp](http://www.endomoribu.shinshu-u.ac.jp)); confronto dimensionale con un capello umano.

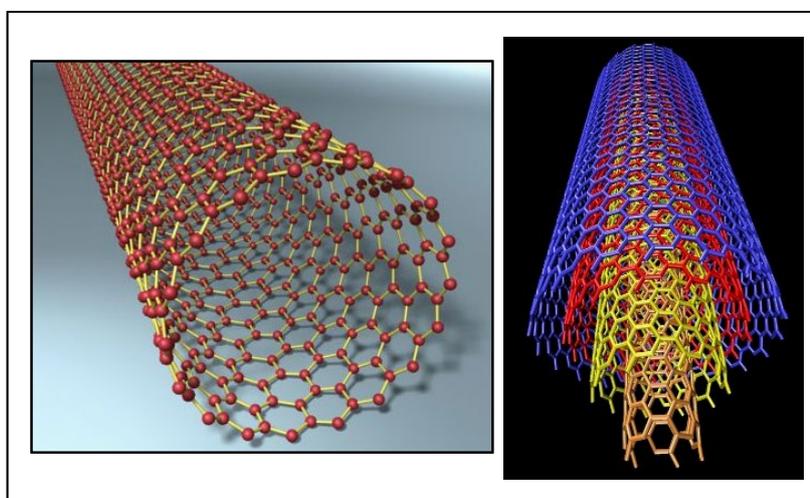


Figura 2.9 - Confronto tra Single (a sx) e Multi Walled (a dx) CNTs ([www.legalplanet.wordpress.com](http://www.legalplanet.wordpress.com); [www.lanl.gov](http://www.lanl.gov); [neurophilosophy.files.wordpress.com](http://neurophilosophy.files.wordpress.com)).

### 2.4.3 Carbon black

Il **carbon black** (CB) è costituito da frammenti di grafene molto stabili e difficili da degradare, per cui, una volta disperso, tende ad accumularsi nell'ambiente (Forbes et al, 2006). Sebbene esso sia un prodotto della moderna nanotecnologia, in realtà le sue origini sono di molto antecedenti. Il CB, infatti, è emesso in maniera non intenzionale dalle combustioni, come sottoprodotto e, in maniera naturale, può sprigionarsi ad esempio durante gli incendi o le eruzioni vulcaniche.

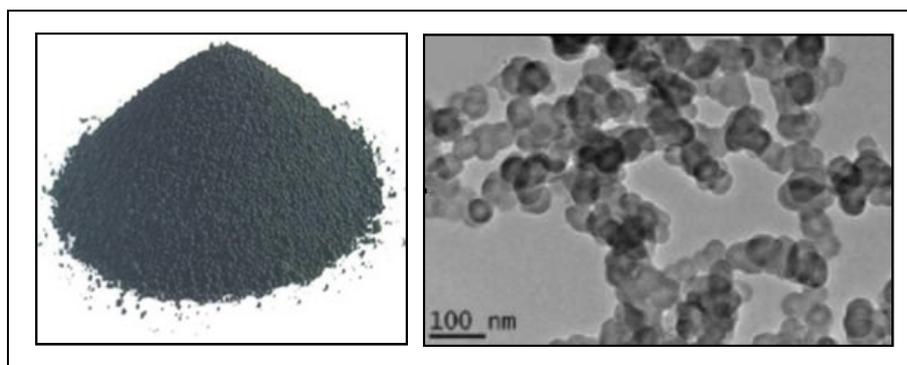


Figura 2.10 - Carbon Black ([www.particleandfibretoxicology.com](http://www.particleandfibretoxicology.com)).

#### 2.4.4 ENP basate sul C organico

Le ENP basate sul **C organico**, solitamente, si utilizzano in campo medico come carrier per farmaci. Il vantaggio offerto da queste ENP è quello di essere molto specifiche per un certo bersaglio, per cui, possono raggiungerlo in maniera più rapida e con dosaggi minori del principio attivo. Il risultato è un minor impatto per l'organismo ma anche per l'ambiente, in quanto, dopo aver assolto al trasporto dei farmaci, le parti organiche riescono a degradare senza lasciare traccia (Joner et al, 2008).

#### 2.4.5 Quantum dots

I **quantum dots** (Q-dots) sono nanocristalli semiconduttori fluorescenti con un nucleo di 2-6 nm di composti binari (CdS, CdSe, PbSe, CdHg o altri metalli) o complessi, legati da un polimero organico (Jamieson et al, 2007; Joner et al, 2008). Solitamente vengono considerati una categoria a parte, per via della loro composizione e del loro utilizzo. I Q-dots sono quelli, tra le ENP, che, più di altri, mostrano proprietà elettroniche e/o ottiche dipendenti dalle loro stesse dimensioni. Infatti, essi emettono luce ad una sola specifica lunghezza d'onda che è funzione non solo del materiale di cui sono costituiti ma anche delle dimensioni di tali materiali. La seguente figura (2.11) è in grado di chiarire quanto appena visto.

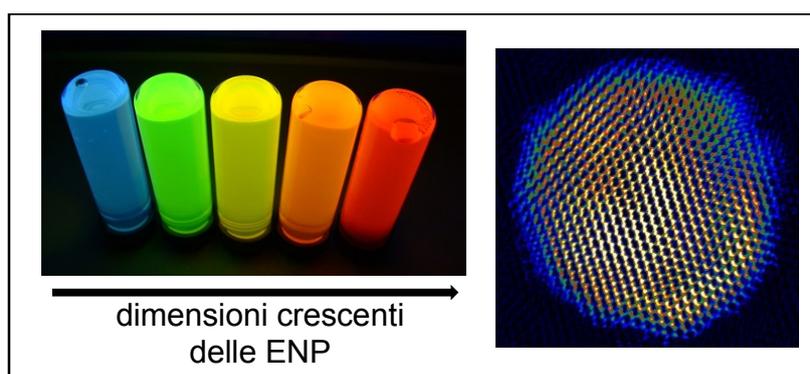


Figura 2.11 - A sx QD di CdS costituiti da NP di diversa dimensione ([www.ruf.rice.edu](http://www.ruf.rice.edu)); a dx immagine ricostruita di un QD di 9 nm di CdS ([www.sciencedaily.com](http://www.sciencedaily.com)).

#### 2.4.6 ENP metalliche e loro ossidi

Le nanoparticelle metalliche o minerali, poiché derivanti dalle attività estrattive comprendono i metalli e i semimetalli e possono essere costituite da singoli elementi (Ag, Si, Au, Cu, Pt, Fe, Al, Ni, B, Co, etc.) o dai loro composti (SiC, Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, WC, etc.). Senza dubbio la sottocategoria più importante di questa classe comprende gli **ossidi metallici** (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, TiO<sub>2</sub>, ZnO, CeO<sub>2</sub>, CuO, SnO<sub>2</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, MnO, ZrO<sub>2</sub>, etc.) che, alla data attuale, sono prodotti in ingenti quantitativi poiché rientrano in numerosissimi prodotti di uso quotidiano (cfr. cap. 2.5). In pratica la loro lista è lunghissima ed il loro criterio di classificazione molto articolato, poiché prevede una distinzione in base, ad esempio, ai differenti metodi di preparazione, alle dimensioni, al grado di purezza ecc. Nel paragrafo 2.6 sono riportati alcuni accenni a quelli più comunemente utilizzati, fatta eccezione per il nano TiO<sub>2</sub>, al quale è stato dedicato l'intero capitolo 3.

#### 2.4.7 Altre ENP

In questa categoria rientrano le ENP meno utilizzate e meno diffuse.

In letteratura ad esempio sono citate le cosiddette **particelle di ferro zero valente (nZVI o Fe<sub>0</sub>)**. Queste particelle metalliche non si trovano propriamente in forma dispersa ma piuttosto come aggregati di Fe o ossidi di Fe. Sono utilizzate nelle tecniche di risanamento e bonifica di suoli ed acque contaminate (Ponder S.M. et al, 2000; Kanel S.R. et al, 2005).

Tra le ENP minori si annoverano anche le **nanoargille**, minerali argillosi chimicamente e meccanicamente dispersi, utilizzate, spesso in forma di fogli sottili, per via della loro elevata impermeabilità (Joner et al, 2008).

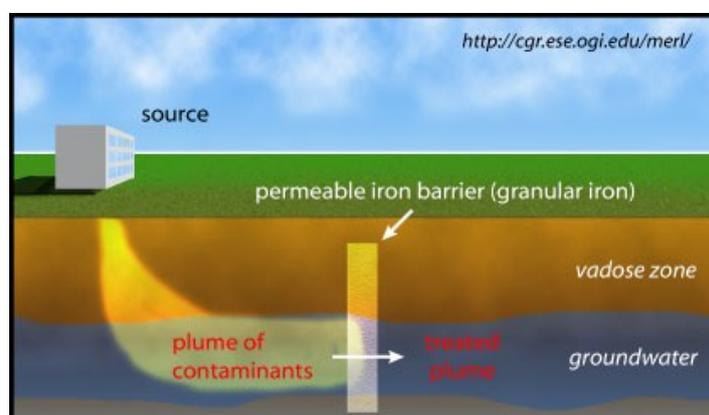


Figura 2.12 – Rappresentazione schematica del processo di decontaminazione di una falda acquifera mediante l'utilizzo di ENP di Fe<sub>0</sub>. Il plume di inquinanti, che si immette nella falda acquifera, è filtrato dalla barriera di ENP ([www.cgr.ese.ogi.edu/merl/](http://www.cgr.ese.ogi.edu/merl/)).

## 2.5 Caratterizzazione delle nanoparticelle

La caratterizzazione completa delle NP prevede due fasi complementari.

Nella prima fase, detta comunemente caratterizzazione **primaria** (pristine characterization), si analizzano le caratteristiche chimico-fisiche intrinseche delle ENP, come prodotti **tal quali**.

Nella fase successiva, detta **secondaria**, si provvede alla caratterizzazione delle ENP **nel mezzo disperso**, per osservarne il comportamento.

Le due fasi quindi sono entrambe necessarie poiché permettono non solo di conoscere le proprietà degli ENM, capendone i principi chimico-fisici, ma anche di prevederne il comportamento e la tendenza a ripartirsi nei vari comparti una volta che questi siano rilasciati in ambiente.

La caratterizzazione delle ENP richiede tecniche e strumentazioni molto sofisticate. La seguente tabella 2.13 riassume quelle che, ad oggi, in letteratura compaiono come le più comunemente utilizzate. Per l'approfondimento sulla strumentazione e sui metodi di misura di tali proprietà si rimanda, invece, al capitolo 9 "Materiali e metodi".

PROPRIETA'	STRUMENTAZIONE
<b>CARATTERIZZAZIONE PRIMARIA</b>	
Composizione - purezza	ICP-MS, HPLC-MS
Carica superficiale	Misura della Mobilità Elettroforetica o del Potenziale Zeta (ZP)
Area superficiale e porosità	BET surface area (adsorbimento molecole di N <sub>2</sub> )
Morfologia (dimensioni, struttura cristallina, coatings...)	SEM e HR-SEM (fino a 20-30 nm), TEM e HR-TEM (fino a 1 nm); AFM e STM (liv. atomico)
<b>CARATTERIZZAZIONE SECONDARIA</b>	
Distribuzione dimensionale	DLS, FFF
Aggregazione	DLS
Sedimentazione	Turbidimetro, Nefelometro, UV-Vis

Figura 2.13 – Proprietà delle NP e relative tecniche e strumentazioni per la loro misura; abbreviazioni: ICP = Inductively Coupled Plasma; HPLC = High Performance Liquid Chromatography; MS = Mass Spectrometry; BET = Brunauer Emmett Teller; (HR)SEM = (High Resolution) Scanning Electron Microscope; (HR)TEM = (High Resolution) Transmission Electron Microscopy; AFM = Atomic Force Microscopy; STM = Scanning Tunneling Microscope; DLS = Dynamic Light Scattering; FFF = Field Flow Fractionation; UV-Vis = Ultra Violet Visible.

Tutte le informazioni ricavabili analiticamente sulle ENP sono di fondamentale importanza in tossicologia ed in ecotossicologia. Senza queste infatti, risulterebbe impossibile sia correlare la presenza delle ENP agli eventuali effetti osservati sugli organismi, sia avanzare delle ipotesi sui

meccanismi di tossicità. La cosa è a tal punto rilevante che, da circa due anni, la tendenza delle più autorevoli riviste scientifiche di tossicologia ed ecotossicologia è quella di non accettare la sottomissione di alcun lavoro qualora in esso non sia presente una sezione specifica dedicata alla caratterizzazione degli ENM utilizzati nei test. Un forte sostegno alla sensibilizzazione di tali aspetti è stato promosso, ad esempio, da iniziative quali la “MINChar (Minimum Information for Nanomaterial Characterization) initiative”, un forum scientifico istituito verso la fine del 2008, nel quale è possibile sia discutere le idee inerenti la caratterizzazione, sia condividere ed interpretare i risultati ottenuti (<http://characterizationmatters.org/>).

Il confronto bibliografico ha fatto emergere quelle che, alla data attuale, costituiscono le proprietà maggiormente indagate durante le fasi di caratterizzazione e che sono: composizione e purezza, morfologia, superficie specifica, carica superficiale, tendenza all’aggregazione e alla sedimentazione (stabilità) e distribuzione dimensionale degli aggregati.

La conoscenza delle caratteristiche di **composizione** e di **purezza** dei vari ENM rappresenta un’informazione basilare per la realizzazione e la lavorazione di tali materiali, nonché un punto di riferimento per la determinazione e la comprensione di tutte le altre proprietà chimico-fisiche.

La **morfologia** delle singole ENP sembra essere rilevante in quanto condizionerebbe la solubilità di tali particelle in un mezzo acquoso e, quindi, l’effettiva disponibilità per gli organismi ad esse esposti. Peng et al (2011) hanno studiato il legame presente tra la solubilità delle ENP di ZnO in acqua marina e 4 diverse varietà morfologiche di tali particelle: sferiche fini, sferiche più grossolane, nanorods (a bastoncino) e nanoneedles (aghiiformi). Ne è emerso che la solubilità è stata minima per le ENP sferiche fini e massima per quelle aghiiformi.

In generale, la **superficie specifica** ( $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$ ) di una sostanza è di per sé importante poiché è positivamente correlata alla reattività di questa. In aggiunta, nel caso più particolare delle ENP, la superficie specifica, essendo legata alla proprietà dell’**area superficiale** ( $\text{cm}^2$ ), contribuisce fortemente a determinare il reale scenario espositivo di tali NP nei confronti degli organismi, con una rappresentatività maggiore del tradizionale concetto di quantità (Savolainen et al, 2010) (cfr. par. 5.1.2). Come termine di confronto, si pensi che il nTiO<sub>2</sub>, impiegato in questa tesi, a fronte di una dimensione pari a 60 nm, offre una superficie specifica pari a c.a  $60 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ . I Carbon Nano Tubes, invece, di dimensioni pari a 20 nm possono mostrare una superficie specifica di c.a  $100 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ , valore che può spingersi oltre gli  $800 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  se il diametro delle ENP si riduce a 2 nm (Peigney et al, 2001).

La **carica superficiale** si determina mediante la misura del **potenziale Zeta** ( $\zeta$ ) (mV). Questo equivale alla differenza di potenziale esistente all’interno del doppio strato elettrico che si viene a formare sulla superficie delle particelle, il cui spessore, a parità di altre condizioni, dipende dai

valori di pH del mezzo in cui la sostanza è dispersa. La misura della carica superficiale è molto importante poiché è un indice della stabilità di una ENP in un mezzo acquoso. Per valori minori di circa -30 mV e maggiori di circa +30 mV il sistema è elettricamente stabile, perché le particelle hanno un potenziale, rispettivamente, fortemente negativo o positivo quindi si respingono tra di loro e rimangono disperse. Viceversa, tanto più  $\zeta$  si avvicina allo 0, tanto più esse tendono ad avvicinarsi ed a formare agglomerati di particelle più grosse. Al limite, se  $\zeta = 0$ , allora il sistema ha il massimo dell'instabilità (Scown et al, 2010).

La tendenza alla **sedimentazione** e la **distribuzione** in classi granulometriche degli agglomerati formati sono, come sembra logico, di fondamentale importanza per la determinazione dell'effettiva disponibilità di una ENP nel mezzo e, quindi, del reale scenario di esposizione per un organismo.

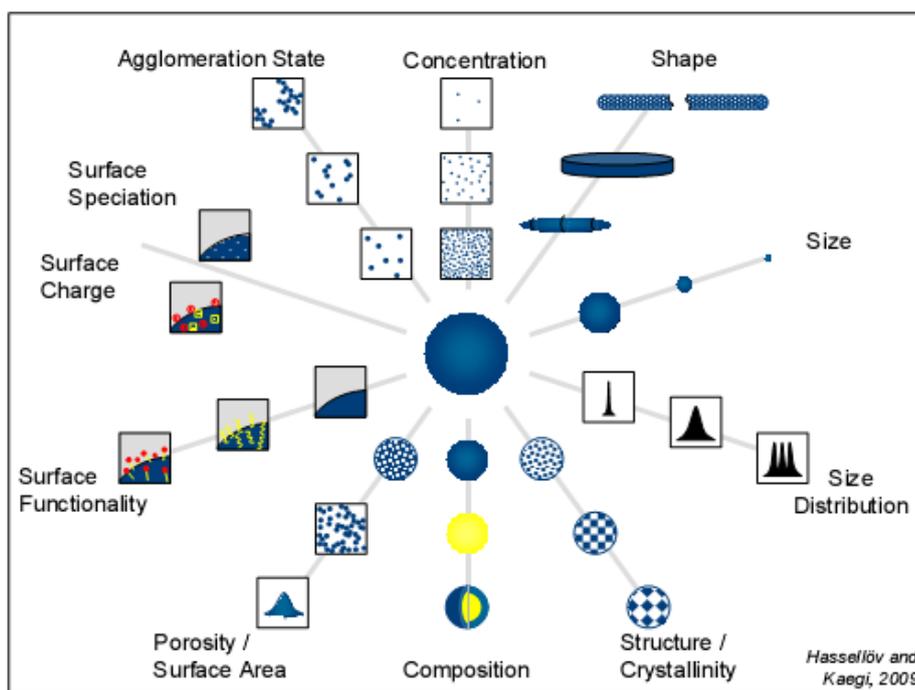


Figura 2.14 – Informazioni necessarie per la completa caratterizzazione delle ENP (Hasselöv, 2009).

## 2.6 Proprietà ed applicazioni: il mercato delle nanoparticelle

Attualmente, i prodotti sul mercato contenenti ENP sono già più di 1000 ma è previsto che diventino 10'000 entro i prossimi dieci anni (George et al, 2011). Secondo il Project on Emerging Nanotechnologies, nel quinquennio 2006 - 2011, il numero dei prodotti è aumentato del **521%**, passando da 212 a 1317 (Woodrow Wilson International Center for Scholars and the Pew Charitable Trusts - <http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/>).

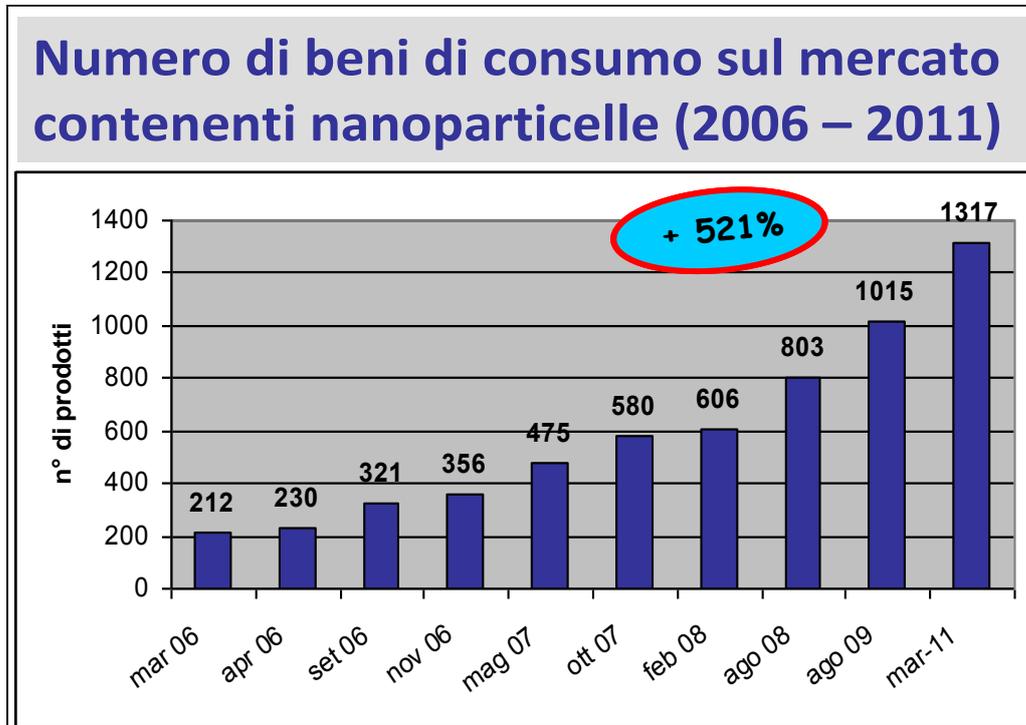


Figura 2.15 – Incremento dei beni di consumo contenenti ENP nel quinquennio 2006-2011 - (Project on Emerging Nanotechnologies, Woodrow Wilson International Center for Scholars and the Pew Charitable Trusts - <http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/>).

Nella sua tesi di Dottorato, Müller propone una stima della produzione annua delle principali ENP, ovvero, secondo il Woodrow Wilson Institute, di nTiO<sub>2</sub>, nAg e CNTs (Müller, 2007). Dal suo lavoro emerge come il nTiO<sub>2</sub> sia la NP in assoluto più prodotta, ben 5000 tonnellate all'anno, seguita dal nAg con 1230 tonnellate annue ed infine dai CNTs con 350 tonnellate annue.

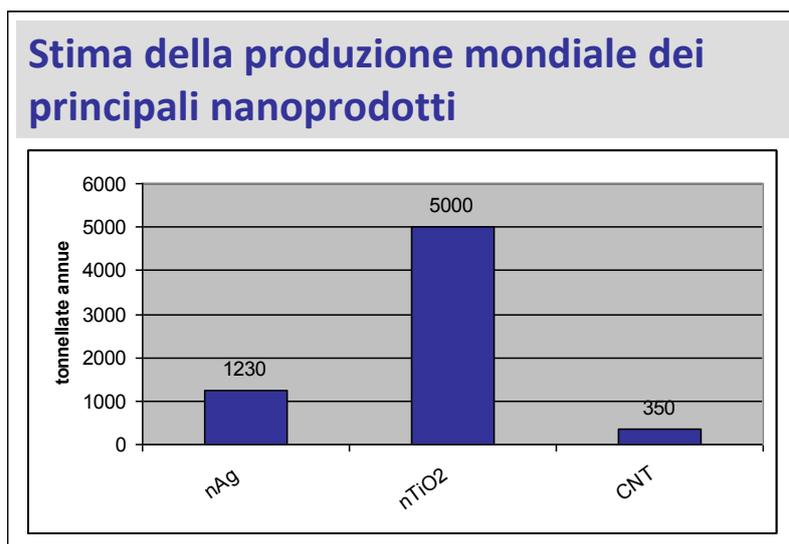


Figura 2.16 – Stima della produzione mondiale delle principali ENP (Müller, 2007).

Se però, al posto della quantità annua assoluta, si considera quello che è il numero dei diversi prodotti contenenti una data ENP, allora la situazione appare diversa. In questo caso, il primato spetta al nAg, presente in **313** prodotti, di cui 33 per alimenti. Il secondo della lista è il nC, con **91** prodotti, seguito dal nTi con **59** (Woodrow Wilson International Center for Scholars and the Pew Charitable Trusts - <http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/>).

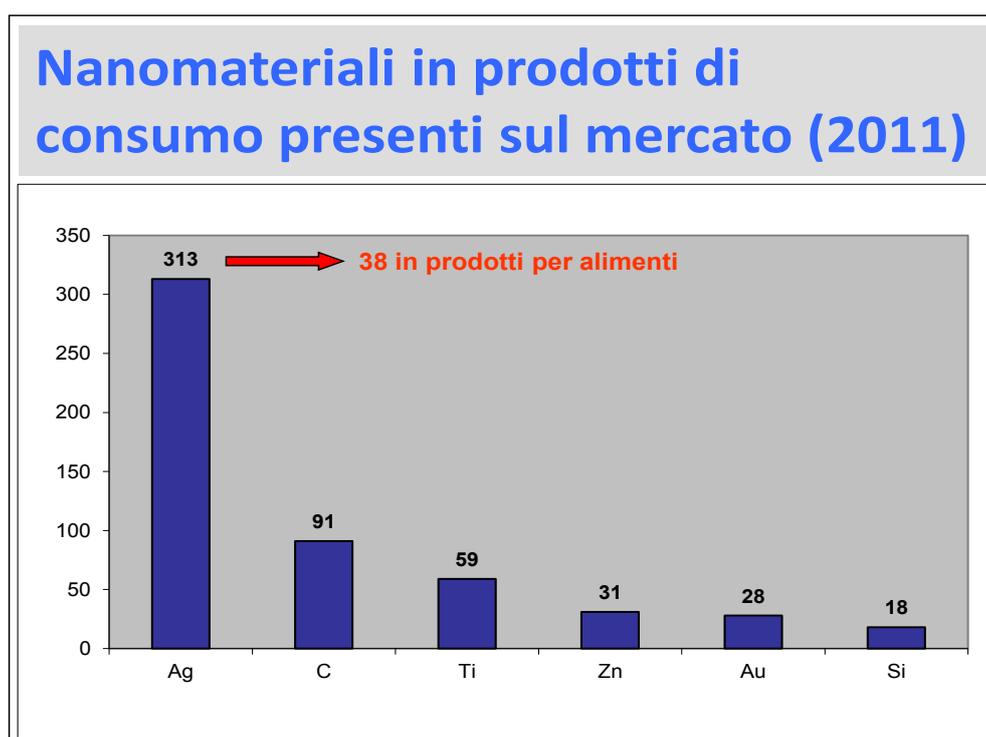


Figura 2.17 – Numero dei prodotti di consumo contenenti ENP, presenti sul mercato – (Project on Emerging Nanotechnologies, Woodrow Wilson International Center for Scholars and the Pew Charitable Trusts - <http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/>).

E' necessaria, a questo punto, una precisazione: con la denominazione "prodotti per alimenti" si intendono quei prodotti destinati al contatto con cibi e bevande, come ad esempio, contenitori, bottiglie o pellicole. Vi sono poi i prodotti per uso alimentare, contenenti ENP, che, pur non essendo dei veri e propri alimenti, vengono comunque ingeriti, quali ad esempio integratori di minerali e gomme da masticare. Attualmente la Purest Colloid Inc. fornisce integratori minerali, in forma di sospensioni di ENP colloidali, di Ag, Au, Pt, Cu, Si, Zn, Pd, e Ir (<http://www.purestcolloids.com/>).

A seguire, una breve rassegna delle principali applicazioni delle ENP più utilizzate, ovvero nAg, ENP organiche, Q-dots ed alcuni ossidi metallici (nZnO, nSiO<sub>2</sub>, CeO<sub>2</sub>). Al nTiO<sub>2</sub> sarà invece dedicato interamente il successivo capitolo 3.

### 2.6.1 Usi ed applicazioni del nAg

A livello industriale il nAg è apprezzato particolarmente per le sue proprietà **antibatteriche**. In molti prodotti tale effetto è garantito in misura del **99,9%**, al punto che tale ENM è considerato la "penicillina del 21° secolo" ([www.nanolawreport.com](http://www.nanolawreport.com)). Queste ENP, infatti, sono in grado di emettere ioni Ag<sup>+</sup> in quantità superiore, rispetto al metallo in forma bulk.

Il nAg si utilizza ad esempio in prodotti dove il **contatto fisico** è intenso e frequente, come le maniglie, i telefoni cellulari o i mouse del computer, che diventano così superfici autoigienizzanti; in **prodotti igienici** e per la pulizia, come salviettine, cerotti, calzature, saponi, dentifrici e spazzolini, nei contenitori **per alimenti**, per la conservazione dei cibi e negli **elettrodomestici** come aspirapolvere, deumidificatori, frigoriferi e lavatrici ([www.nanosilver.it](http://www.nanosilver.it)). Samsung ha prodotto una lavatrice in grado di sterilizzare il bucato rilasciando all'incirca 2,75 mg di nAg in 55 L di acqua, corrispondenti a circa 400 miliardi di ioni Ag<sup>+</sup> ([www.samsung.com](http://www.samsung.com)). Sembra che l'effetto antibatterico, efficace su oltre 650 batteri diversi, permanga anche dopo 30 giorni dal lavaggio. Anche il settore **biomedico** si avvale del nAg, non solo ai fini della sterilizzazione ma anche per le sue **proprietà ottiche**, grazie alle quali trova utilizzo nella diagnostica e nell'imaging (Lee e El-Sayed, 2006; Chen e Schluesener, 2007). Som et al (2011) affermano che le ENP di Ag sono utilizzate anche per la **copertura** delle facciate degli edifici (Som et al, 2011).

E' soprattutto il settore **tessile**, però, ad assorbire la maggior parte della produzione di nAg con percentuali che vanno dal 12% al 50% (Som et al, 2011). Considerando quanto visto in precedenza, a proposito della produzione annua (Project on Emerging Nanotechnologies - <http://www.nanotechproject.org/>), ciò significa che, ogni anno, il settore tessile utilizza dalle 147 alle 615 tonnellate di nAg. Il dato non stupisce se si pensa che il tessile è un settore **ubiquitario**

che interessa non solo l'industria dei vestiti ma anche delle automobili, della medicina, e di tanti altri prodotti di uso domestico.

Infine, si vuol ricordare che, attualmente, in Cina è in corso la sperimentazione di una coltura di riso che utilizza la tecnologia del nAg come **pesticida** ed antiparassitario (Sabbioni, 2010).



Figure 2.18 a) e b) – Alcuni esempi di prodotti contenenti nAg – [www.nanosilver.it](http://www.nanosilver.it).

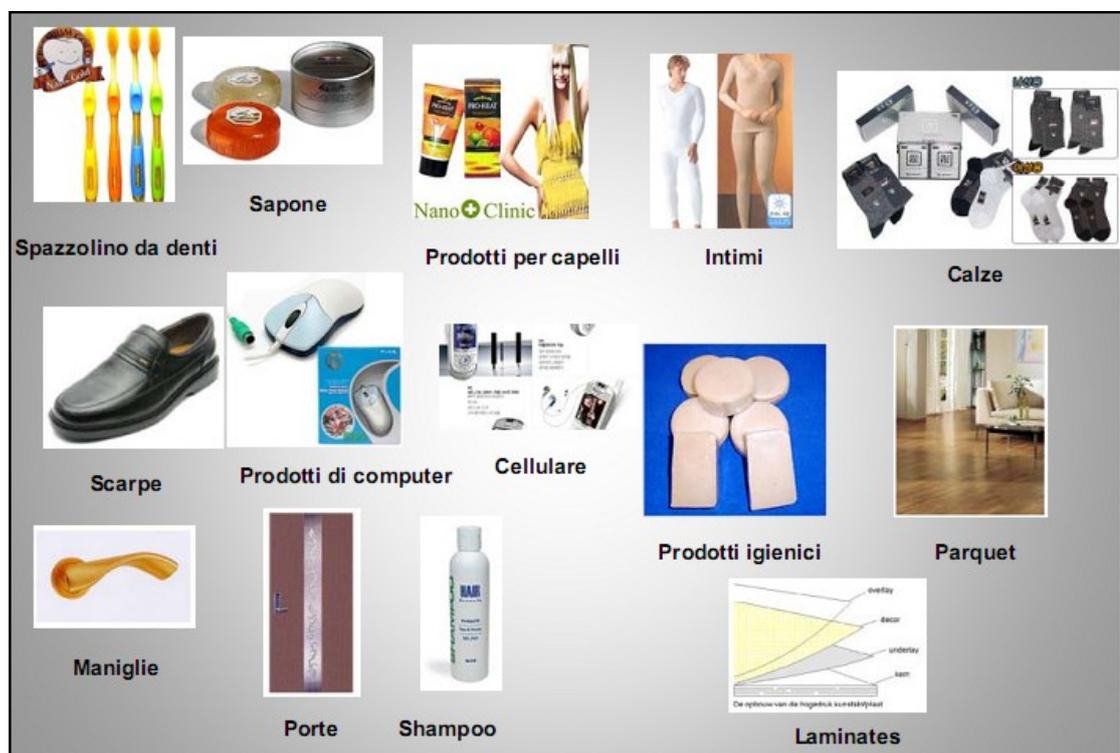




Figura 2.19 – Coltivazione di riso con tecnologia Nano Silver (Sabbioni, 2010).

### 2.6.2 Usi ed applicazioni del nAu

Il nAu in forma colloidale è utilizzato da anni in campo medico, come vettore per le terapie antitumorali (Klaine et al, 2008) ma le sue applicazioni più recenti riguardano il campo della **plasmonica**. In fisica il plasmon è un'oscillazione collettiva del plasma contenuto in un sistema (Lee et al, 2006). In materiali nuovi e rivoluzionari come il nAu (ma anche molte altre ENP) le eccitazioni plasmoniche hanno una significativa probabilità di essere suscitate e di durare sufficientemente a lungo da consentire delle applicazioni tecnologiche (Diaconescu et al, 2007). Ad esempio, si possono realizzare:

- ❖ celle solari di nuova generazione con un'efficienza energetica molto superiore a quelle tradizionali;
- ❖ materiali dalle straordinarie proprietà ottiche, come le lenti perfette, che possono rendere un oggetto invisibile, poiché riescono a deviare la luce attorno a sé senza distorsioni;
- ❖ circuiti optoelettronici estremamente miniaturizzati ed efficienti.

### 2.6.3 Usi ed applicazioni delle ENP organiche

I materiali a base di nC come i fullereni e i CNT stanno rivoluzionando il settore delle **materie plastiche**. Tali prodotti infatti possiedono delle caratteristiche superiori in fatto di leggerezza, resistenza, assorbimento degli urti ed elasticità. L'**industria sportiva** ad esempio, investe parecchio nella ricerca di materiali innovativi e performanti aventi le caratteristiche appena descritte. I vantaggi di utilizzare i CNT ad esempio nel telaio e nelle corde di una racchetta da tennis sono la riduzione del peso (quindi meno affaticamento), maggior robustezza, una durata superiore ed un assorbimento controllato dell'urto, che diminuisce il trauma del polso al momento dell'urto con la pallina. Oggi, in commercio, è possibile trovare non solo racchette da tennis ma anche moltissimi altri articoli sportivi, come mazze da golf, palle, telai per biciclette, ecc...



Figura 2.20 – Alcuni esempi di applicazioni di CNT.

Le NP organiche trovano un ampio utilizzo anche nel campo **biomedico**. Come accennato nel paragrafo 2.4.4, somministrare ad un paziente dei farmaci con un carrier al nC (fig. 2.21) significa poter ridurre l'impatto sull'organismo, in quanto il principio attivo viene trasportato ed agisce solo dove serve, con l'ulteriore vantaggio che, dopo aver assolto il suo compito, il carrier degrada. Ciò è possibile modificando tali sostanze con l'aggiunta di specifici gruppi funzionali (Soppimath et al, 2001; Hans e Lowman, 2002).

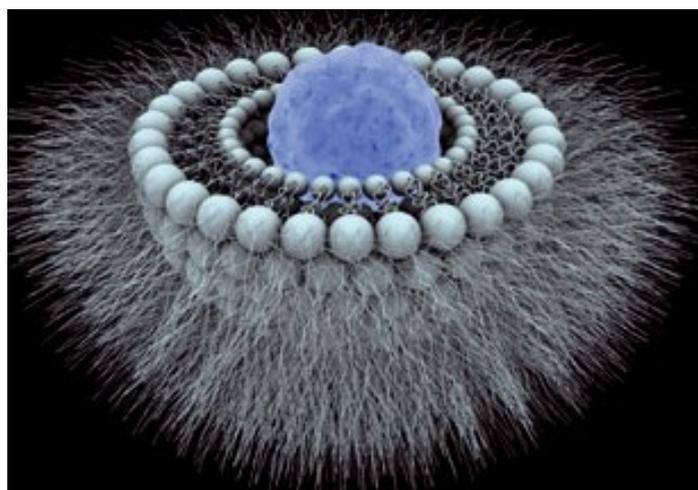


Figura 2.21 - Elaborazione grafica di un carrier organico ([www.cnrs.fr](http://www.cnrs.fr)).

#### 2.6.4 Usi ed applicazioni dei Q-Ds

I Q-Ds sono particolarmente apprezzati in campo **biomedico** per la loro proprietà di emettere luce fluorescente. Se opportunamente modificati, infatti, questi riescono a legarsi alle strutture cellulari divenendo importanti strumenti per la diagnosi (ad esempio per le patologie tumorali).

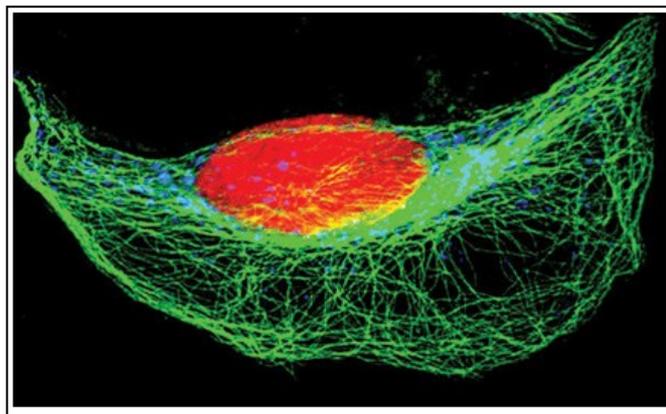


Figura 2.22 – Fotografia di cellula di HeLa (tumore uterino) in 3 differenti colorazioni, dovute a 3 diversi tipi di Q-Ds ad essa legati - [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com).

La proprietà di produrre luce è sfruttata anche in **elettronica**, dove i Q-Ds sono sempre più impiegati nell'assemblaggio di display per apparecchiature elettroniche (Smalley e Weisman, 2003). Si pensa che, ben presto, essi sostituiranno gli schermi con tecnologia OLED (Organic Light Emitting Diode).

#### 2.6.5 Usi ed applicazioni del nSiO<sub>2</sub>

La nSiO<sub>2</sub> è impiegata in prodotti di uso ben più comune come **dentifrici** e **gomme da masticare**, dove è richiesta un'azione abrasiva per la pulizia dentale (Gaikwad e Sokolov, 2008). Inoltre, le NP di SiO<sub>2</sub>, rivestite da NP di Au, sono utilizzate in **medicina** poiché danno fluorescenza e quindi, come già visto nel caso del nAg e dei Q-dots, sono impiegate per fini diagnostici.

Per quanto riguarda il settore alimentare, da qualche tempo un'azienda texana nota come Rbc Life Sciences ha prodotto un **frullato dietetico** alla cioccolata contenente nSiO<sub>2</sub>. I ricercatori sostengono che i miliardi di NP in esso contenuti siano in grado di stimolare le papille gustative al pari di un qualunque altro frullato ma apportando quantità di grassi e zuccheri ridottissime (<http://www.europass.parma.it/page.asp?IDCategoria=553&IDSezione=0&ID=371508>).



Figura 2.23 - Alcuni prodotti di consumo contenenti  $n\text{SiO}_2$ .

### 2.6.6 Usi ed applicazioni del $n\text{ZnO}$

Il  $n\text{ZnO}$  si utilizza nell'industria della **cosmesi**, molto spesso assieme al  $n\text{TiO}_2$  (cfr. cap. 3). Queste due ENP infatti, oltre ad essere dei filtri per i raggi UV-A e UV-B (Ju-Nam and Lead, 2008), contribuiscono a migliorare la stabilità degli altri ingredienti contenuti nei prodotti e a migliorare l'effetto visivo di questi ultimi (Mu e Sprando, 2011). Per tali ragioni il  $n\text{ZnO}$  si trova nelle creme e nei filtri solari (non lascia gli aloni biancastri), nei trucchi in polvere e nei rossetti. Dall'analisi di 1200 creme presenti sul mercato è risultato che ben 228 contengono il  $n\text{ZnO}$ , mentre 73 contengono sia  $n\text{ZnO}$  che  $n\text{TiO}_2$ , quest'ultimo presente da solo in altri 363 campioni (Tomilina et al, 2011).

Grazie alle sue proprietà fotocatalitiche (cfr. cap. 3) il  $n\text{ZnO}$  trova un utilizzo anche nella realizzazione di **celle solari**, nonché di apparecchiature elettriche ed optoelettriche (Ju-Nam and Lead, 2008).

### 2.6.7 Usi ed applicazioni del $n\text{CeO}_2$

Il  $n\text{CeO}_2$  è utilizzato principalmente come additivo nei carburanti per motori diesel (Ju-nam and Lead, 2008) perché aiuta i filtri FAP (Filtro Anti Particolato) a catturare il  $\text{PM}_{10}$  che si forma dalla combustione del gasolio ed inoltre abbassa la temperatura necessaria alla demolizione del particolato stesso. I risultati sono minori emissioni inquinanti, una maggior resa del motore e minori consumi di carburante.

## 2.7 Normativa delle nanoparticelle

Come anticipato al capitolo 1, attualmente, la definizione di un sistema di regolamentazione della produzione e dell'utilizzo di ENM è resa difficile dalla mancanza di informazioni specifiche inerenti il loro comportamento ed i loro impatti.

Ad oggi, uno dei supporti giuridici più adeguati, in materia di ENM, è la normativa europea REACH (Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals), in vigore dal 1° giugno 2007. Nel marzo 2008, inoltre, l'European Chemicals Agency (ECHA) ha costituito un gruppo di lavoro specifico per il miglioramento dell'applicazione del REACH agli ENM. Negli Stati Uniti il settore degli ENM è regolato da uno dei più efficaci strumenti legislativi dell'EPA (Environmental Protection Agency) ovvero il TSCA (Toxic Substances Control Act). Questo è considerato uno strumento analogo al REACH europeo ma tra i due esiste una differenza sostanziale: difatti, in Europa, spetta al **produttore** dimostrare che un prodotto è sicuro, prima della sua immissione nel mercato, negli U.S.A., invece, la responsabilità è del **regolamentatore**. Nella normativa europea sono state inserite delle modifiche relative alla regolamentazione di prodotti **cosmetici** ed **alimentari** contenenti ENM, le quali richiedono una definizione di ENM e delle specifiche sulle procedure di valutazione del rischio per i prodotti che li contengono. Per quanto riguarda, più specificatamente, la **sicurezza in ambito lavorativo**, a livello mondiale, si possono annoverare delle istituzioni che hanno pubblicato rilevanti contributi su questo tema, tra cui:

- NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health), Stati Uniti;
- BAuA (Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin = Istituto federale per la sicurezza e la salute), Germania;
- FOPH (Federal Office of Public Health), Svizzera;
- IRSST (Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail = istituto di ricerca robert-sauvé sulla salute e sulla sicurezza del lavoro), Francia;
- AFFSET (Agence Française de sécurité de l'Environnement et du travail = Agenzia francese di sicurezza dell'ambiente e del lavoro), Francia.

L'attuale difficoltà nel determinare gli effettivi livelli di esposizione e nel definire eventuali livelli di soglia quali NOEL (No Observed Effects Levels) e OEL (Occupational Exposure Limits), ostacola la produzione di normativa specifica. Inoltre, i livelli di soglia sono attualmente espressi in termini di **massa** la quale, come è stato approfondito al capitolo 5, non costituisce il parametro in grado di rappresentare significativamente l'eventuale scenario espositivo ed i conseguenti impatti per questi ENM. A questo, va aggiunto che la normativa attuale prevede una descrizione delle sostanze, contenute in un determinato prodotto, tale da non permettere la

**distinzione del materiale** in forma bulk da quello nanostrutturato e, di conseguenza, quest'ultimo è soggetto alla medesima regolamentazione del materiale macro-dimensionato.

In sostanza, allo stato attuale, il processo della “nanoregolamentazione” è ancora in una fase primitiva ed il suo sviluppo, a detta degli esperti del settore, richiede un approccio dinamico che tenga conto anche delle lecite preoccupazioni delle persone in merito all'argomento, ovvero, che sia aperto al dialogo tra le varie parti sociali.



### **3. IL NANO BLOSSIDO DI TITANIO**

In seguente capitolo ha come scopo la connotazione della nanoparticella studiata specificatamente in questo dottorato di ricerca, ovvero il nano biossido di titanio ( $n\text{TiO}_2$ ). Nel capitolo sono elencati i principali processi di produzione del  $n\text{TiO}_2$  e sono descritte le proprietà da questo manifestate in qualità di semiconduttore (proprietà fotocatalitiche, elevata conduzione di calore, superidrofilicità, ecc.). Sono inoltre elencati i diversi utilizzi e le svariate applicazioni per i quali tale nanoparticella risulta indicata, proprio in relazione alle sue proprietà chimico-fisiche.

## 3. IL NANO BLOSSIDO DI TITANIO

### 3.1 Introduzione

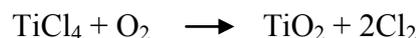
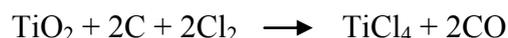
Il **nano biossido di titanio** ( $n\text{TiO}_2$ ) è un minerale ampiamente utilizzato in molti settori dell'industria perché, sotto irraggiamento UV, manifesta proprietà **fotocatalitiche** (Hochmannova and Vytrasova, 2010). Il  $n\text{TiO}_2$  è presente in tre forme polimorfiche: **anatasio**, **rutilo** e brookite. Sono soprattutto le prime due ad avere mercato, mentre la brookite è molto meno diffusa. In particolare è l'anatasio ad esibire le proprietà fotocatalitiche più elevate (Uchino et al, 2002; Choi et al, 2004), mentre il rutilo, per via del suo colore bianco latteo opaco, è più sfruttato come pigmento colorante e coprente (es: pitture, carte, paste dentifricie) (Menard et al, 2010). Spesso si utilizzano miscele di anatasio e rutilo in rapporti definiti. Il P25 della Degussa-Evonik, ad esempio, utilizzato fra l'altro in questa ricerca, è una miscela composta da anatasio e rutilo in rapporto di 3:1.

Il  $n\text{TiO}_2$  viene sintetizzato in forma di polvere bianca e si ottiene principalmente con tre metodi differenti, a seconda della struttura che si desidera ottenere, da cui dipendono a loro volta le caratteristiche superficiali e quindi le proprietà del minerale:

- a) il metodo del solfato;
- b) il trattamento del minerale, ridotto in polvere, con carbonato di potassio e acido fluoridrico acquoso;
- c) l'ossidazione in fase vapore di  $\text{TiCl}_4$ .

Poiché quest'ultimo è il processo di gran lunga più utilizzato, di seguito, se ne riporta una schematizzazione.

Il rutilo viene scaldato con cloro e carbon coke a  $900\text{ }^\circ\text{C}$ , con formazione di tetracloruro di titanio ( $\text{TiCl}_4$ ), che è volatile e può così essere separato da ogni impurezza. Il  $\text{TiCl}_4$  viene riscaldato con  $\text{O}_2$  a  $1200\text{ }^\circ\text{C}$  per dare  $\text{TiO}_2$  puro e  $\text{Cl}_2$ , che viene riutilizzato (Costanza et al, 2007).



E' bene ricordare che le tecniche per ottenere il minerale, qui elencate, sono le più diffuse ma non le uniche (Choi et al, 2004; Amezaga-Madrid et al, 2003; Isley e Penn, 2009).

Come già detto (cfr. par. 2.6) Müller ha stimato che, attualmente, la produzione di  $n\text{TiO}_2$  si attesta attorno le **5000 tonnellate annue** e prevede un raddoppio di tale quantità nel periodo compreso tra il 2011 ed il 2014 (Müller, 2007) mentre, secondo Robichaud, tale produzione

salirà a 2,5 milioni di tonnellate annue entro il 2025 (Robichaud et al, 2009).

### 3.1.1 Proprietà fotocatalitiche del nTiO<sub>2</sub>

Come già detto, il nTiO<sub>2</sub> è un **fotocatalizzatore** o fotopromotore, in grado di accelerare una reazione chimica senza però prenderne parte e quindi senza esaurirsi. In particolare sotto irraggiamento UV, esso produce particelle **radicaliche fortemente ossidanti**, i cosiddetti ROS (Reactive Oxygen Species). La spiegazione di questo, risiede nel fatto che il nTiO<sub>2</sub> è un **semiconduttore**, per cui, previo assorbimento di una certa quantità di energia, una parte degli elettroni che occupa la **banda di valenza** è promossa all'occupazione della **banda di conduzione**. Le due bande sono separate da una quantità di energia ben definita (**gap energetico**). Quindi, a ciascun **elettro**ne (e<sup>-</sup>) promosso nella banda di conduzione corrisponde una **buca** (h<sup>+</sup>) nella banda di valenza. L'elettrone e la buca possono reagire con le altre specie chimiche presenti nell'ambiente, che si comporteranno rispettivamente da **accettori** (A<sup>+</sup>•) o **donori** (D<sup>-</sup>•) di elettroni, dando origine ai ROS (Brunet et al, 2009). I ROS, a loro volta, sono in grado di ossidare le sostanze organiche ed inorganiche, trasformandole rispettivamente in CO<sub>2</sub> ed in sali ([www.mater.unimib.it/orienta/files/esperienza%20TiO2.pdf](http://www.mater.unimib.it/orienta/files/esperienza%20TiO2.pdf)). La seguente figura 3.1 schematizza quanto esposto.

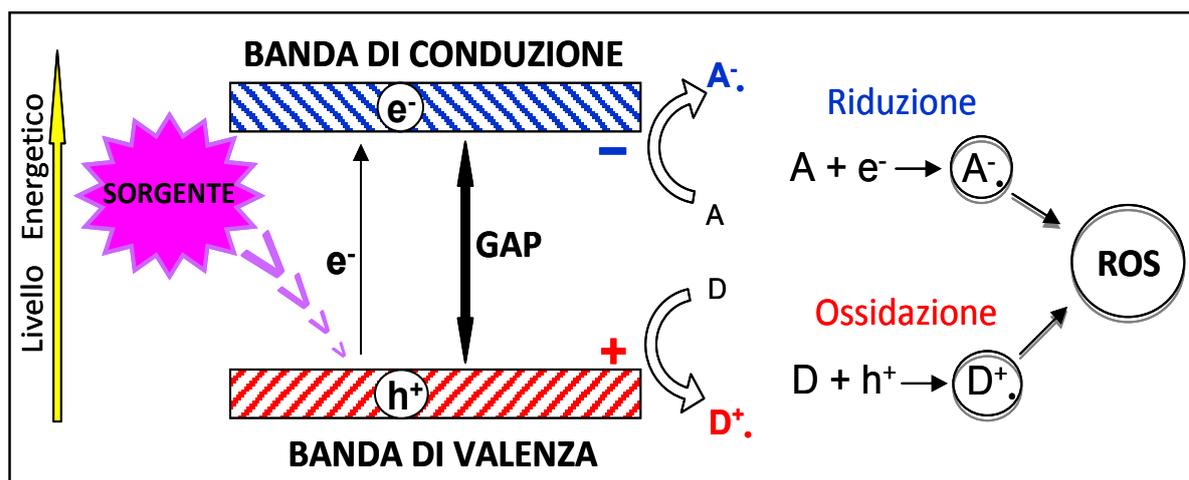


Figura 3.1 – Schema della promozione degli elettroni, con conseguente formazione di ROS, causata dall'aumento del livello energetico del sistema. Sotto l'azione di una sorgente di energia l'elettrone si sposta dalla banda di valenza a quella di conduzione, sbilanciando così le cariche elettriche; le specie chimiche che entrano in contatto con tali cariche si trasformano in ROS mediante reazioni di ossidoriduzione.

Nelle applicazioni industriali del nTiO<sub>2</sub>, l'energia necessaria al salto degli elettroni è fornita da lampade UV o dalla stessa radiazione solare.

### 3.2 Usi ed applicazioni: il mercato del nTiO<sub>2</sub>

Il **TiO<sub>2</sub> bulk** è stato definito “il cavaliere bianco dell’ambiente” per via del fatto che non è visibilmente tossico, è molto funzionale e trova numerose applicazioni nei rivestimenti (Chen et al, 2011). Allo stato bulk infatti, il minerale è inerte. In particolare, il TiO<sub>2</sub> è utilizzato come pigmento bianco nei **coloranti alimentari** o comunque destinati all’assunzione orale. Per esempio le capsule di rivestimento degli antibiotici sono di solito di due colori, uno dei quali è bianco, come è bianca anche la lettera “m”, stampata sulle ben note arachidi rivestite di cioccolato. In entrambi i casi il colorante è il biossido di titanio noto come E171. Dato il suo colore brillante, il pigmento è utilizzato abbondantemente nelle **pitture** da interno ed esterno e, inoltre, è fortemente apprezzato anche nel campo della cosmesi dove è noto con la sigla CI 77891. Infatti, come agente stabilizzante, si utilizza ampiamente nei prodotti **cosmetici** quali creme e rossetti e, ancora, nei **filtri solari** per neutralizzare gli effetti nocivi dei raggi UV.



Figura 3.2 – Alcuni dei prodotti nei quali, comunemente, si trova il TiO<sub>2</sub> bulk.

Per quanto riguarda il **nTiO<sub>2</sub>**, invece, a favorirne un largo utilizzo è stata proprio la sua elevata reattività che si esplica nella capacità di promuovere le reazioni viste nel precedente paragrafo 3.1.

A seguire, una breve rassegna dei principali utilizzi del nTiO<sub>2</sub> nelle applicazioni industriali.

### 3.2.1 Cosmetici

Come in parte già anticipato (cfr. par. 2.6.5), i principali vantaggi dell'utilizzo delle nano polveri di  $\text{TiO}_2$  nella cosmesi sono i seguenti (Mu e Sprando, 2011):

- migliorare la stabilità di ingredienti quali gli acidi grassi insaturi, vitamine ed antiossidanti;
- aumentare la capacità di penetrazione di ingredienti quali vitamine ed antiossidanti;
- aumentare l'efficacia e la tolleranza dei filtri UV sulla pelle, rendendo il prodotto migliore anche da un punto di vista estetico.

Ad esempio, le creme ed i filtri solari al  $\text{nTiO}_2$ , una volta spalmate si assorbono subito, senza lasciare gli antiestetici aloni opachi e biancastri.

In Giappone è stato brevettato uno spazzolino da denti che permette la pulizia a secco e senza l'uso di dentifricio. Sotto le testine infatti, c'è una barretta di  $\text{nTiO}_2$  che, durante lo sfregamento, attivata da una sorgente luminosa, promuove una carica di elettroni tale da disgregare la placca batterica, assicurando la completa pulizia dei denti ([www.soladey.com](http://www.soladey.com)).

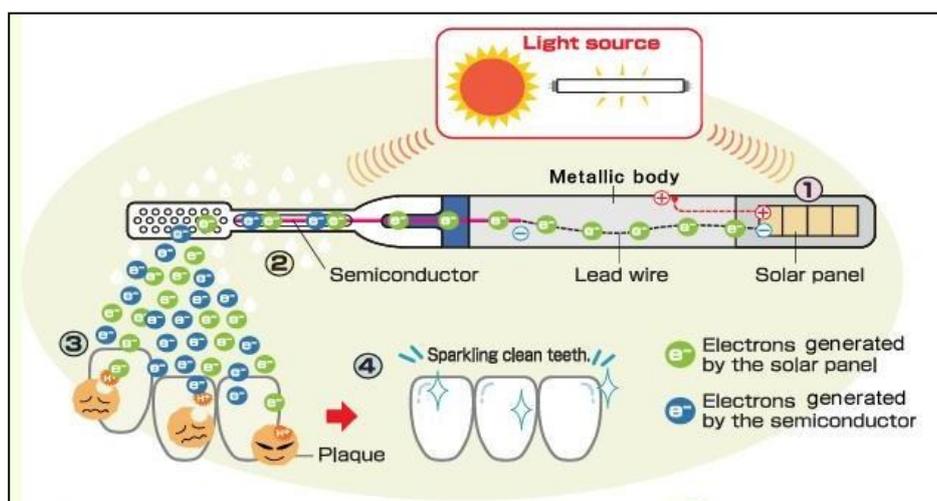


Figura 3.3 – Principio di funzionamento dello spazzolino al  $\text{nTiO}_2$ : il pannello solare attiva le ENP e, la corrente elettronica prodotta, scorre lungo un filo di Pb per giungere alla testina dello spazzolino, aiutando la rimozione della placca ([www.soladey.com](http://www.soladey.com)).

Nei trucchi in polvere, come ciprie e fondo tinta, il vantaggio è quello di ottenere un prodotto più omogeneo e soprattutto una colorazione esteticamente superiore ([www.dior.com](http://www.dior.com)). Si può capire questo concetto pensando ad un'immagine digitale. Più aumentano i pixels, più l'immagine è nitida e ben definita. Allo stesso modo, essendo le NP più fini, risulta maggiore la definizione del trucco.

Per quanto riguarda le creme, le emulsioni ed i rossetti, il  $\text{nTiO}_2$  viene aggiunto, assieme al  $\text{nZnO}$ , per i motivi sopra esposti, ovvero per stabilizzarne gli altri ingredienti.



Figura 3.4 – Alcuni dei prodotti nei quali, comunemente, si trova il nTiO<sub>2</sub>.

E' da tener presente che, la produzione di cosmetici e filtri solari richiede quasi il 70% di tutto il nTiO<sub>2</sub> prodotto (Nowack et al, 2009).

### 3.2.2 Trattamento delle superfici

Da alcuni anni si trovano in commercio delle **pitture** al nTiO<sub>2</sub>, per interni ed esterni, che sono in grado di promuovere l'ossidazione di sostanze organiche ed inorganiche, preservando così le superfici trattate dal progressivo annerimento. Ancora una volta sono le proprietà fotocatalitiche del nano anatasio alla base del successo commerciale del prodotto.

Sembra infatti che le sostanze organiche vengano ossidate fino a **completa mineralizzazione** del carbonio, ovvero fino alla formazione di **CO<sub>2</sub>**. Gli inquinanti inorganici come NO<sub>x</sub> e SO<sub>x</sub> invece, vengono trasformati in **sali** innocui quali Ca(SO<sub>4</sub>) e Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> come si vede in figura 3.5 ([www.rinnovabili.it](http://www.rinnovabili.it)).

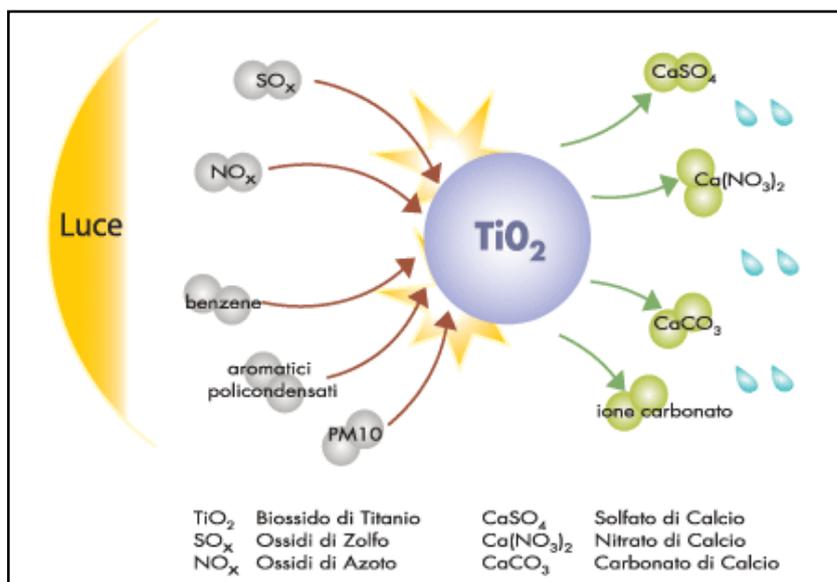


Figura 3.5 – Abbattimento degli inquinanti mediante reazioni ossidoriduttive, promosse dalle pitture al nTiO<sub>2</sub> (www.rinnovabili.it).

Il secondo vantaggio, quindi, di questi prodotti è quello di promuovere l'abbattimento degli inquinanti presenti nell'aria.

Le idropitture fotocatalitiche contenenti anatasio, mostrano proprietà anti inquinamento, anti sporco, anti batteriche, autopulenti ed anti odore (Trattamenti superfici e Materiali da costruzione ecologici. Università degli Studi di Milano – “Giornata di Studio dell'Associazione Consiglieri Regionali della Lombardia.” Bicocca 17/11/2005). Tali proprietà restano **perennemente attive** e non perdono di efficacia nel tempo. In Giappone, per esempio, migliaia di edifici sono già stati rivestiti con vernici autopulenti, le quali garantiscono tale effetto per almeno **20 anni** senza bisogno di ulteriore manutenzione (Fujishima et al, 2008).

In commercio si trovano pitture che possiedono anche proprietà protettive contro la salsedine, il calcare, le fosfatazioni, ecc. La composizione specifica di tali pitture varia a seconda dell'applicazione: pannelli fotovoltaici, vetri, pareti già verniciate, soffitti, mobili, tende, materassi, reti da letto, rivestimenti tessili, moquettes, muri esterni, rivestimenti in pietra, ambienti pubblici, ospedali, mense, cucine, bagni, palestre, hotel, piscine, industria alimentare, locali di raccolta rifiuti, filtri aria condizionata, frigoriferi, celle frigorifere, ecc...

E' stato stimato che, entro il 2015, il 15-30% delle facciate realizzate sarà ricoperto da nanomateriali (Som et al, 2011).

### 3.2.2.1 Il caso veneziano del Palazzo della Camera di Commercio

A Venezia, vicino alla parrocchia di San Moisè, a poca distanza da piazza San Marco, si trova il Palazzo della Camera di Commercio, un edificio storico in ristrutturazione. Per i lavori di

pulitura e trattamento delle sue superfici si utilizzano, assieme ai polisilossani, pitture al  $n\text{TiO}_2$ . I pannelli informativi che ne ricoprono la facciata spiegano i vantaggi dell'utilizzo di questi nanomateriali, illustrando non solo gli effetti benefici per la superficie ma anche i vantaggi dell'abbattimento degli inquinanti aerei. Infatti è indicato come, ogni giorno,  $120'000 \text{ m}^3$  di aria vengano purificati dal contatto con tale superficie (fig. 3.6).

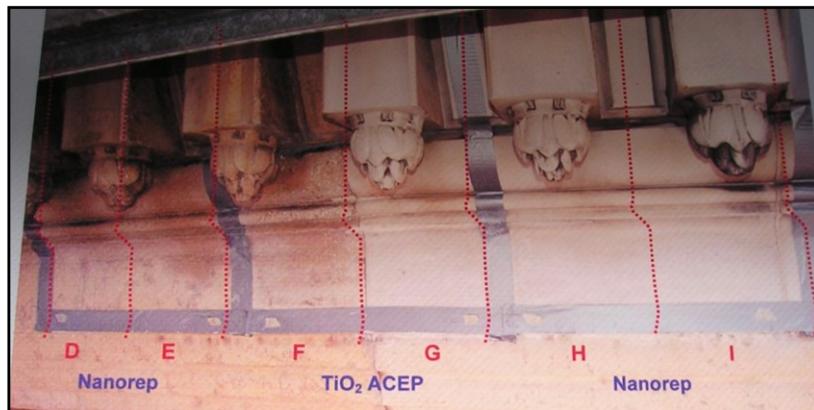


Figura 3.6 – Illustrazione dei diversi effetti dei prodotti impiegati nella pulitura della superficie del Palazzo della Camera di Commercio.



Figura 3.7 – Presunto volume d'aria (c.a.  $120'000 \text{ m}^3$ ) depurato quotidianamente dalla superficie trattata con nanomateriali.

### 3.2.3 Detergenti mineralizzanti

L'applicazione delle nanotecnologie ai detergenti ha permesso la creazione di prodotti per la **pulizia** di diverse superfici. Tali prodotti si basano sul principio di sciogliere lo sporco e le

incrostazioni, trasformandoli in sali minerali totalmente ecocompatibili. L'efficacia del procedimento di ossidoriduzione scaturita dalla detergenza sembra essere molto elevata; inoltre, un prodotto additivato di nTiO<sub>2</sub> durante l'applicazione sulle superfici, è in grado di depositarsi sui micropori di queste, di modo che, dopo svariati lavaggi, si forma un **microlayer di TiO<sub>2</sub> fotocatalitico**, in grado di rendere le superfici antibatteriche e disinfettanti. Il microlayer si attiva da solo, semplicemente con la luce ([www.atmarmorservice.it](http://www.atmarmorservice.it)).

#### 3.2.4 Depurazione delle acque reflue

Il miglioramento della qualità delle acque reflue è un'esigenza di crescente importanza. Grzechulska-Damszel et al (2007) hanno dimostrato come sia possibile rimuovere i coloranti organici dalle acque reflue utilizzando l'azione combinata di depuratori fotocatalitici al nTiO<sub>2</sub> con l'utilizzo di filtri a membrana (Grzechulska-Damszel et al, 2007). In pratica, l'acqua carica di coloranti passa attraverso una serpentina in quarzo rivestita di nTiO<sub>2</sub>, al di sopra della quale si trova una lampada che emette radiazione UV-A ( $\lambda_{\max} = 355 \text{ nm}$ ), tale da attivare la reazione fotocatalitica di degradazione. La soluzione decolorata così ottenuta passa alla seconda fase del trattamento che prevede la nanofiltrazione su membrane, i cui pori hanno un diametro di 2 nm. I tempi e l'efficacia della reazione sono schematizzati nella seguente figura 3.8.

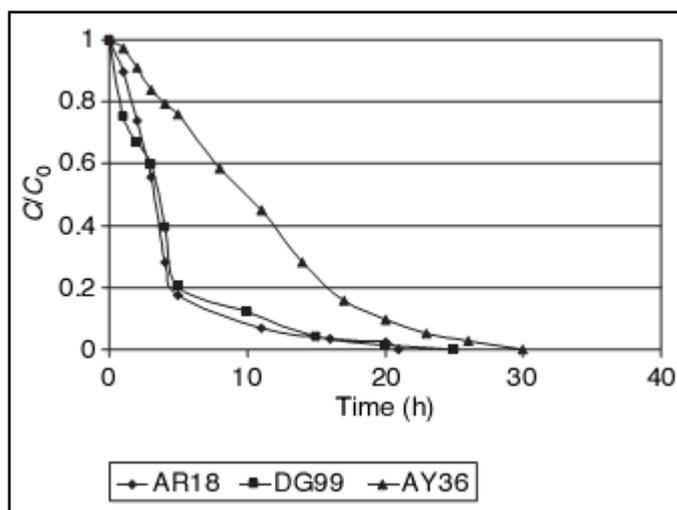


Figura 3.8 – Abbattimento, nel tempo, di coloranti presenti nell'acqua reflua. La degradazione è possibile grazie alle ENP di TiO<sub>2</sub> esposte ai raggi UV-A. AR18 = Acid Red 18; DG99 = Direct Green 99; AY36 = Acid Yellow 36 (Grzechulska-Damszel et al, 2007).

Il vantaggio di questa tecnica risiede nel fatto che, in molti casi, le reazioni fotocatalitiche permettono la totale degradazione di questi inquinanti senza l'utilizzo di sostanze chimiche e senza produzione di fanghi.

### 3.2.5 Depurazione dell'aria

I depuratori d'aria sono costituiti da un filtro fotocatalitico preposto alla depurazione ed alimentato da una lampada a raggi UV-C, uniti ad un ulteriore filtro minerale rigenerabile che garantisce la sterilizzazione dell'aria e l'assenza di odori. Il cuore del depuratore è il filtro al  $n\text{TiO}_2$  che, abbinato alla lampada ad ultravioletti ( $\lambda_{\text{max}} = 380 \text{ nm}$ ), espleta la sua **azione ossidante**, distruggendo le membrane dei batteri e coagulando le proteine dei virus: si calcola che, in pochi minuti, esso possa abbattere fino al **99%** dei batteri (Keller et al, 2005), delle spore e dei virus presenti nell'aria trattata.

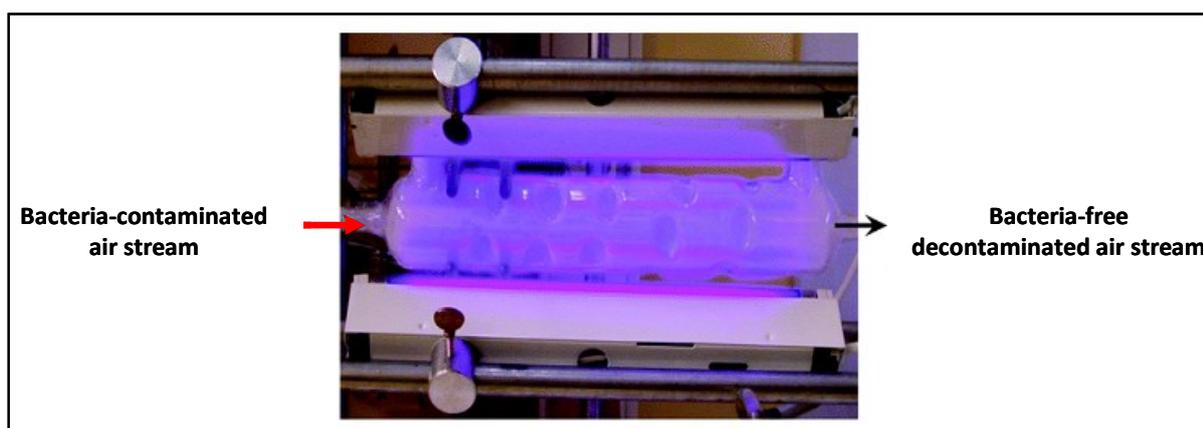


Figura 3.9 – Depuratore fotocatalitico per l'aria. Il filtro al  $n\text{TiO}_2$ , sotto irraggiamento UV, promuove l'ossidazione delle membrane dei batteri e la coagulazione delle proteine dei virus, abbattendo tali organismi (Keller et al, 2005).

Il filtro a  $n\text{TiO}_2$  può abbattere odori particolarmente intensi e sgradevoli come quelli dei composti aromatici alogenati, degli ossidi di azoto, degli idrocarburi ed anche quelli difficili da assorbire dai carboni attivi, come, per esempio, il fumo della sigaretta (Trattamenti superfici e Materiali da costruzione ecologici. Università degli Studi di Milano – “Giornata di Studio dell'Associazione Consiglieri Regionali della Lombardia.” Bicocca 17/11/2005).

### 3.2.6 Cementi e marciapiedi

Nel precedente paragrafo 3.2.2 si è avuto modo di conoscere le proprietà disinquinanti di certe pitture per interni ed esterni. Un ulteriore passo avanti nell'industria delle superfici autopulenti ha permesso la realizzazione di **cementi** al  $n\text{TiO}_2$  utilizzati per la costruzione di **edifici** (Chen e Poon, 2009). Il meccanismo della reazione fotocatalitica è sempre lo stesso e, innescato dai raggi UV, è utilizzato nell'abbattimento degli  $\text{NO}_x$ .

Con gli stessi cementi si realizzano **tunnel automobilistici** per l'abbattimento dell'inquinamento prodotto dai gas di scarico dei veicoli a motore (Chen et al, 2007) e persino **marciapiedi**

cosiddetti “mangiasmog”, la cui efficacia nella rimozione degli  $\text{NO}_x$  è evidenziata da Chen e Poon con prove di laboratorio (figg. 3.10 e 3.11) (Chen e Poon, 2009).

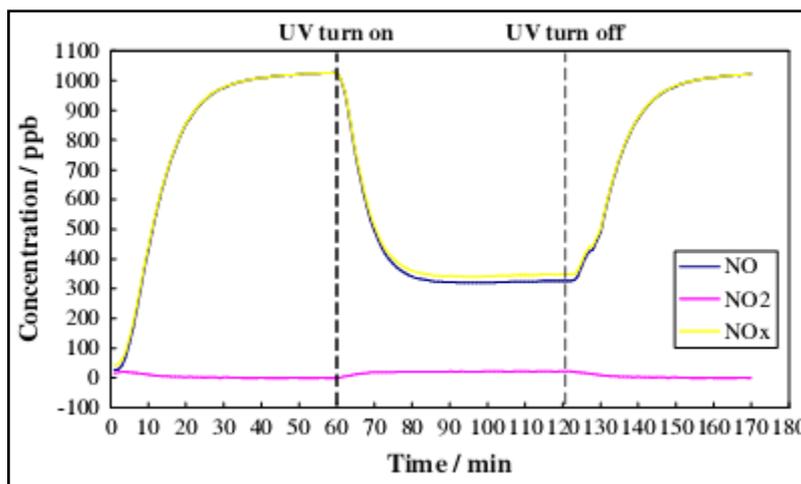


Figura 3.10 – Risultati dell’abbattimento fotocatalitico di  $\text{NO}_x$ , ottenuti in laboratorio, da parte di pavimentazioni per marciapiedi contenenti  $\text{nTiO}_2$  (Chen e Poon, 2009).



Figura 3.11 - Pavimentazione con masselli autobloccanti di  $\text{nTiO}_2$  ad azione fotocatalitica ([www.rinnovabili.it](http://www.rinnovabili.it)).

La realizzazione di pavimentazioni stradali con caratteristiche fotocatalitiche costituisce una possibilità di crescente interesse per la riduzione di inquinanti atmosferici. Le pavimentazioni stradali infatti possono intercettare le sostanze inquinanti immediatamente a ridosso della loro fonte di emissione principale, massimizzando l’effetto delle superfici fotocatalitiche per l’abbattimento di tali inquinanti (Da Rios et al, 2007). Gli esperimenti condotti in questo senso hanno visto l’utilizzo di miscele cementizie differenti, in cui variavano i rapporti tra bitume, malta e  $\text{nTiO}_2$ . In tutti i casi, comunque, i risultati dell’abbattimento, riassunti nel grafico 3.12, possono definirsi interessanti.

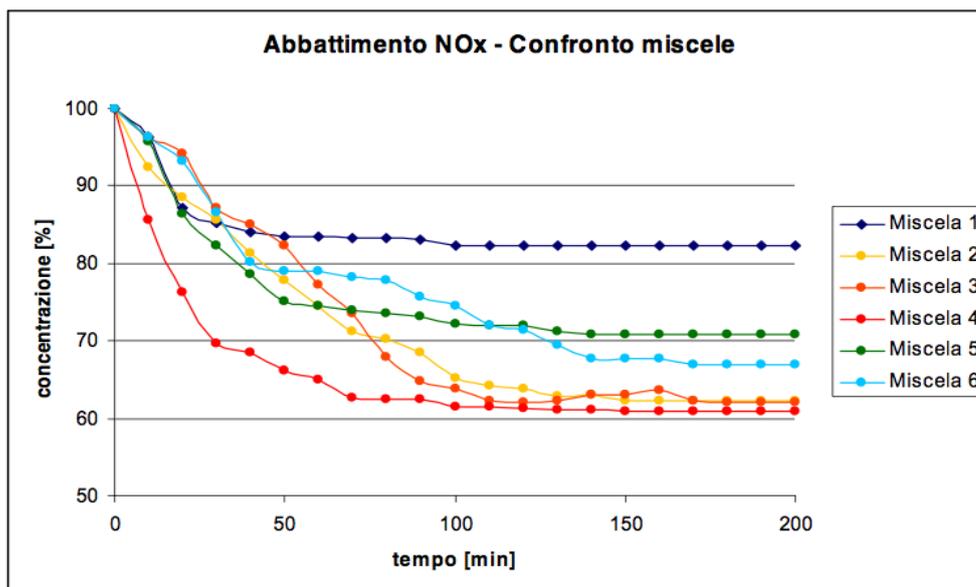


Figura 3.12 - Confronto dell'abbattimento di NO<sub>x</sub> nelle differenti miscele cementizie contenenti nTiO<sub>2</sub> (Da Rios et al., 2008).

“Tali rivestimenti sono efficaci in quanto la turbolenza dell'aria trasporta in continuazione NO<sub>x</sub> e altri composti volatili e semivolatili sulla superficie degli edifici; le molecole aderiscono alla superficie abbastanza a lungo da essere scomposte dal processo di ossidazione”.

Fonte: I materiali edili "intelligenti" sviluppati nell'UE assorbono ed eliminano l'inquinamento - Comunicato stampa della Commissione Europea (file PDF). Bruxelles, 4 marzo 2004.

### 3.2.6.1 Marciapiedi “verdi” contro lo smog: il caso di Signa (Firenze)

Nel luglio del 2007, il sindaco del comune fiorentino di Signa ha annunciato l'utilizzo di un materiale innovativo per migliorare la qualità dell'aria della cittadina. Si tratta di un marciapiede a base di nTiO<sub>2</sub>, che permette di liberare l'aria delle città dagli agenti inquinanti prodotti principalmente dalle automobili, come il benzene e gli ossidi di azoto e zolfo. Come facilmente prevedibile il **marciapiede “mangiasmog”** ha un costo più elevato di quelli convenzionali (circa il 10%) ma i benefici e il ruolo ambientale rivestito sembra che ripaghino tale investimento.

Fonte: Ecoblog.

### 3.2.7 Trasferimento di calore e dissipazione

Le superfici trattate con nTiO<sub>2</sub> assumono una proprietà chiamata **superidrofilia**. Questo fenomeno fisico è determinato dall'azione della luce sul prodotto fotocatalitico e permette all'acqua di distribuirsi perfettamente su di una superficie senza la formazione di gocce (fig. 3.13).

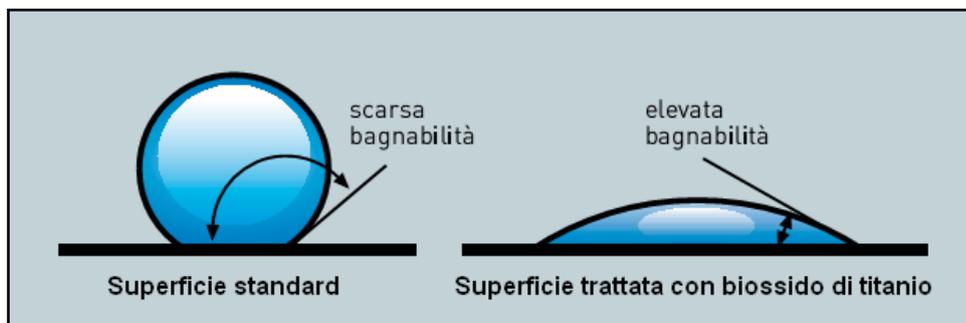


Figura 3.13 – Confronto tra la distribuzione dell’acqua su di una superficie normale ed una superidrofila.

Si osserva che, sulle superfici superidrofile, si può formare una pellicola d’acqua stabile adoperando una quantità di liquido molto ridotta rispetto a quella necessaria per superfici che non possiedono tale proprietà, utilizzando ad esempio dei nebulizzatori. Siccome il tasso di trasferimento di calore aumenta, mano a mano che tale pellicola si assottiglia, risulta che in tali superfici lo scambio termico sia molto maggiore, con l’ovvio vantaggio di un esiguo consumo di acqua. Gli esperimenti condotti (Fujishima et al, 2008) hanno evidenziato un effetto **40 volte maggiore** rispetto a quello delle superfici non trattate.

Le applicazioni pratiche di quanto visto vengono sfruttate per risolvere il problema del surriscaldamento delle isole urbane nelle grandi città, riducendo il consumo di energia elettrica per il funzionamento dei climatizzatori durante il periodo estivo (fig. 3.14). Sulle superfici trattate con  $n\text{TiO}_2$ , a causa dell’umidità atmosferica, si forma spontaneamente una pellicola d’acqua grazie alla quale lo sporco non aderisce (proprietà autopulente) e nemmeno si formano le gocce che sono causa di opacità (proprietà antifogging) sulle superfici lucide e specchianti.

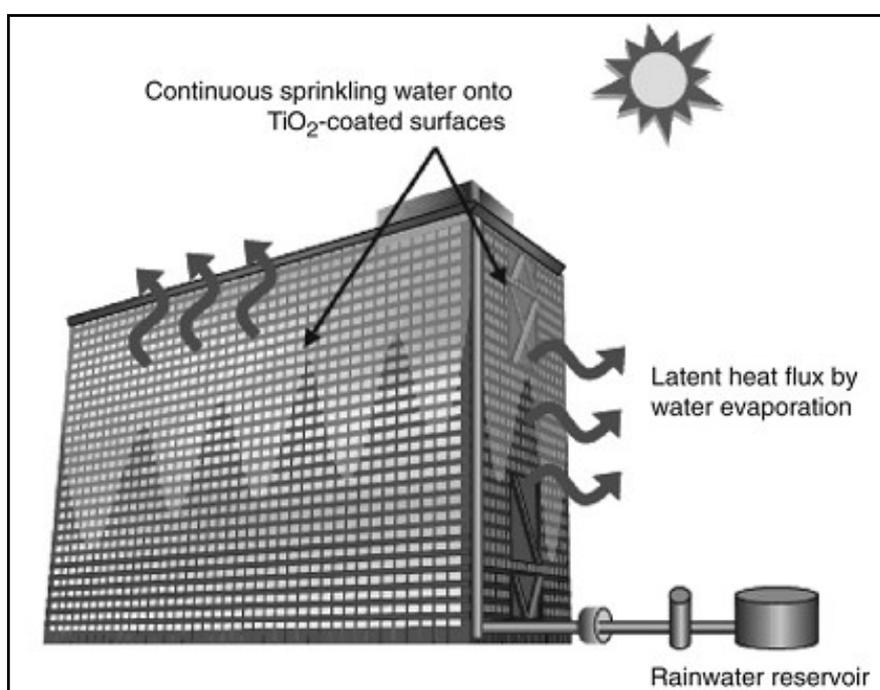


Figura 3.14 – Sistema di risparmio energetico, che utilizza l’energia solare e l’acqua piovana raccolta, per il raffreddamento degli edifici grazie alle proprietà di superidrofilia conferite dai NM (Fujishima et al., 2008).

### 3.2.8 Agenti anti-corrosione

L'utilizzo del  $n\text{TiO}_2$  come rivestimento anticorrosivo per molti metalli è una delle ultime sfide dell'industria delle nanotecnologie. In merito a ciò sono stati condotti vari esperimenti sull'acciaio inossidabile per dimostrarne l'efficacia. Sotto una radiazione UV, il  $n\text{TiO}_2$  induce sul metallo una corrente di elettroni tale da proteggerlo dalla corrosione (Fujishima et al., 2008). Inoltre, si è osservato che il  $n\text{TiO}_2$ , se accoppiato con ossido di tungsteno ( $\text{WO}_3$ ), conserva la proprietà anticorrosiva anche al buio, per un certo periodo di tempo successivo alla cessazione della radiazione UV. Il fenomeno è attribuibile alla capacità di immagazzinamento dell'energia propria del  $\text{WO}_3$ .

### 3.2.9 Alimenti

Il  $n\text{TiO}_2$ , come succede anche per  $n\text{Ag}$  e  $n\text{SiO}_2$ , è presente anche negli alimenti. Lo si trova utilizzato nelle cioccolate col fine di impedire l'affioramento della patina biancastra. Questa si forma a causa della destabilizzazione degli acidi grassi contenuti nel latte ma, va ricordato, anche se può essere antiestetica, non pregiudica affatto la qualità e la sanità di tale alimento. L'azione del  $n\text{TiO}_2$ , in questo caso, è del tutto analoga a quella che può esplicare nella cosmesi, ovvero la stabilizzazione degli ingredienti.

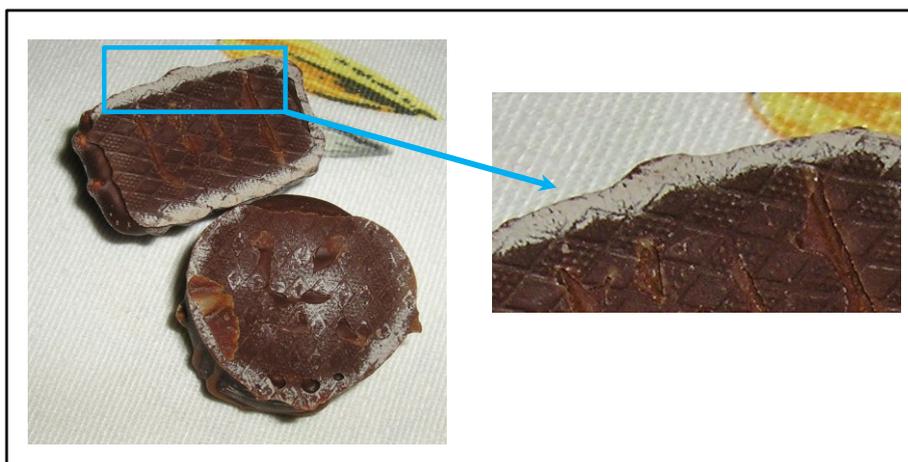


Figura 3.15 – Anche il cioccolato può essere addizionato di  $n\text{TiO}_2$  per impedire l'affioramento della patina biancastra osservabile, ad esempio, nei prodotti in figura.

## **4. SORGENTI E VIE DI INGRESSO DELLE NANOPARTICELLE NELL'AMBIENTE**

Questo capitolo raggruppa la scarsa informazione attualmente disponibile inerente la diffusione delle nanoparticelle nell'ambiente, considerando i comparti aria, acqua, suolo e sedimenti. Sono proposti i modelli predittivi elaborati da alcuni autori che permettono di stimare la concentrazione di alcune tipologie di nanoparticelle ed il loro tasso di incremento annuo in territori specifici; a questi è affiancato anche l'unico caso di studio, ad oggi esistente, basato su una misurazione reale del rilascio di nanoparticelle. Il capitolo si conclude con alcune considerazioni sulla valutazione del rischio legato alla diffusione delle nanoparticelle nell'ambiente.

## 4. SORGENTI E VIE DI INGRESSO DELLE NANOPARTICELLE NELL'AMBIENTE

### 4.1 Dispersione e comportamento delle ENP nell'ambiente

Come tutti i prodotti dell'industria anche gli ENM hanno un loro ciclo di vita, suddiviso in diverse fasi, quali produzione, realizzazione del prodotto finito, utilizzo e smaltimento. In tutte queste fasi è possibile un eventuale rilascio di ENP nell'ambiente, volontariamente o meno (Bystrzejewska-Piotrowska et al, 2009; Som et al, 2010). In particolar modo, l'eventualità diventa certezza con lo smaltimento e la fine del ciclo di vita di un ENM.

Una volta nell'ambiente, le ENP possono distribuirsi nelle varie matrici ambientali e, a seconda delle loro proprietà chimico-fisiche, trasferirsi da un compartimento ad un altro o accumularsi. Inoltre, esse possono venire a contatto con gli organismi viventi, entrando così anche nella biosfera.

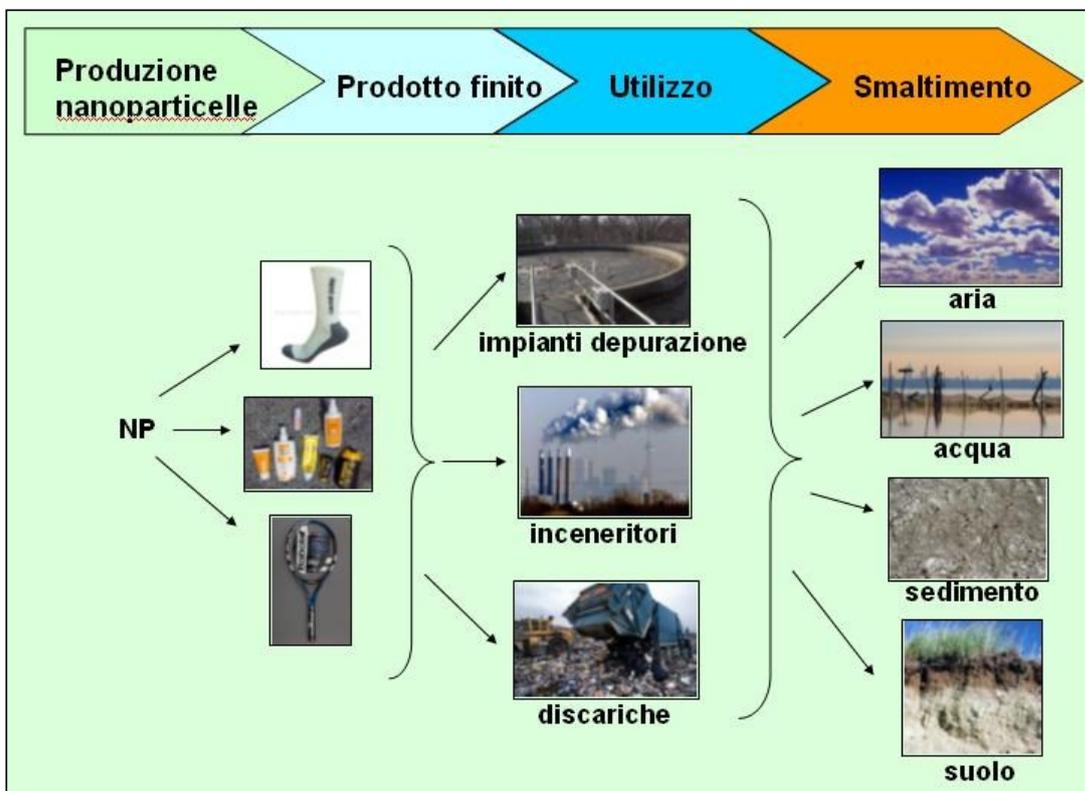


Figura 4.1 – Schematizzazione della probabile dispersione in ambiente delle ENP e del loro ingresso nei diversi comparti ambientali.

Attualmente, con un'unica eccezione (Kaegi et al, 2008), **non si dispone di dati ambientali** che siano basati su effettive misurazioni effettuate in campo (Scown et al, 2010) ma vi sono solamente modelli predittivi, di cui si farà menzione nel successivo paragrafo 4.2. Questa

carezza di informazioni è dovuta a diverse difficoltà operative che insorgono durante le operazioni di misura delle ENP, *in primis* l'impossibilità di distinguere le NP naturali da sempre presenti, da quelle artificiali (Tardif, 2007; Savolainen et al, 2010). In pratica non si riesce ad eliminare il contributo del **rumore di fondo**, rendendo vana la determinazione delle ENP. Un'altra difficoltà in cui ci si imbatte è causata dall'elevata instabilità delle ENP che, molto spesso, hanno la tendenza ad **aggregarsi** in tempi assai ridotti e a formare quindi particelle di dimensioni ben superiori a quelle classificabili come NP (1-100 nm).

Il problema reale è l'esistenza di un forte **divario** tra la crescita vertiginosa degli ENM e del loro utilizzo e le metodologie e gli strumenti per la determinazione di questi nell'ambiente. Pertanto, nell'attesa che lo sviluppo tecnologico possa fornire un valido supporto al superamento di queste ed altre problematiche inerenti la misura delle ENP nell'ambiente, appare sensato avanzare per lo meno delle previsioni che tengano conto delle caratteristiche di questi materiali e dell'ambiente in cui questi possono immettersi.

#### 4.1.1 NP nell'aria

L'aria è un compartimento che riesce a diffondere un inquinante in tempi molto rapidi ed in luoghi molto lontani rispetto alla sorgente di emissione. Tale compartimento è considerato **provvisorio** poiché il particolato atmosferico può rimanervi in sospensione fino a quando non raggiunge una certa dimensione a causa dei fenomeni di aggregazione o di condensazione, umide e secche. A quel punto, soggetto alla forza di gravità, il particolato ricade sugli altri comparti, come l'acqua ed il suolo.

Gli studi sulle concentrazioni delle ENP nell'aria sono molto pochi (Scown et al, 2010) e, come spesso accade quando si inizia la produzione di materiali nuovi e sconosciuti, sono in maggior parte rivolti alla **tutela dei lavoratori** esposti ad esse (es.: Manodori e Benedetti, 2009). Contrariamente a quanto si potrebbe pensare, negli spazi chiusi, come le mura domestiche o negli uffici, i livelli di NP sono ben più elevati che all'esterno (Joner et al, 2008). Questo non stupisce se si pensa alle dimensioni estremamente ridotte di tali elementi che quindi acquistano maggiore rilevabilità laddove possono concentrarsi, rispetto a quando sono diluiti in grandi volumi d'aria. Un esempio di quanto appena visto si ritrova in un articolo di Maynard del 2008. Seduto nella sua caffetteria preferita, egli dichiarava di inalare 4 miliardi di NP al minuto, come confermato dal suo contatore di particelle a condensazione portatile (Maynard et al, 2008). Altri autori ribadiscono quanto anticipato nel precedente paragrafo e cioè che l'assenza di tecnologie per la misurazione e l'incapacità di separare le ENP da tutte le NP di fondo rende impossibile o,

per lo meno, altamente problematico fornire i limiti per l'esposizione occupazionale (Savolainen et al, 2010).

La seguente tabella fornisce un'idea del numero di NP in ambienti differenti ma riporta delle misure complessive che non permettono la distinzione tra le ENP ed il rumore di fondo già esistente (Tardif, 2007).

	Particles mL <sup>-1</sup>	Mean sizes
<b>Outdoor, office</b>	<b>10'000</b>	> 10 nm
<b>Filtered workplaces</b>	<b>0 – 2'000</b>	> 10 nm
<b>Plasma cutting</b>	<b>500'000</b>	> 120 nm
<b>Airport field</b>	<b>700'000</b>	< 45 nm
<b>Breath after smoking</b>	<b>&gt;&gt; 100'000'000</b>	> 10 nm

Figura 4.2 – Misura delle NP totali (in 1mL) presenti in diversi scenari (Tardif, 2007).

Quest'altra tabella, elaborata da Buzea et al (2007), distingue, invece, le differenti sorgenti di NP provenienti da comuni attività domestiche, mostrandone la concentrazione per cm<sup>3</sup>. Gli autori però, non forniscono indicazioni sui tempi necessari alla loro produzione.

Nanoparticle source	Concentration (nanoparticles/cm <sup>3</sup> )
Pure wax candle	241,500
Radiator	218,400
Cigarette	213,300
Frying meat	150,900
Heater	116,800
Gas stove	79,600
Scented candles	69,600
Vacuum cleaner	38,300
Air freshener spray	29,900
Ironing a cotton sheet	7,200

Tabella 4.3 – Misura delle concentrazioni di NP (in 1 cm<sup>3</sup>) che si originano dalle comuni attività domestiche (Buzea et al, 2007).

#### 4.1.2 NP nell'acqua

Prevedere il comportamento ed il destino delle NP nell'acqua è un compito molto arduo, a causa della forte reattività di queste e delle numerose condizioni ambientali al contorno. Attualmente, non sono stati pubblicati dati sulle ENP negli ambienti acquatici (Klaine et al, 2008) ed anche gli studi sulle acque superficiali sono scarsi (Scown et al, 2010).

Le **acque dolci** correnti e quelle dei laghi possono essere estremamente ricche di **colloidi naturali** (1-200 nm) che possono adsorbire le NP più affini sulla loro superficie (Joner et al, 2008). Ad esempio, è stato dimostrato (Klaine et al, 2008) che la frazione di materia organica,

contenuta nei colloidi, è in grado di stabilizzare le ENP di Fe 0-valenti ed i CNT's. Il destino delle NP, quindi, dipenderà dalla quantità di tali colloidi, dalle loro proprietà chimico fisiche e, naturalmente, dalle caratteristiche chimico-fisiche delle NP. La stabilità dei colloidi, a sua volta, dipende dall'interazione tra le forze attrattive e repulsive (Scown et al, 2010) che, invece, sono dipendenti da parametri ambientali quali ad esempio temperatura, pH, concentrazione ionica, salinità ecc., le cui variazioni incidono quindi sulla mobilità dei colloidi stessi. Ciò che avviene nelle zone di transizione rappresenta un classico esempio di quanto appena discusso. Quando l'acqua dolce incontra l'acqua salata si assiste ad una repentina variazione della salinità e quindi della forza ionica e questo produce la flocculazione e la **sedimentazione** dei colloidi col loro carico di NP. Il fenomeno che, nel breve termine, può tramutarsi in un vantaggio per le specie che vivono nella colonna d'acqua costituisce, molto probabilmente, un problema per la componente che vive a diretto contatto col sedimento, cioè il benthos (Farrè et al, 2009).

Le **acque marine** ed oceaniche costituiscono un ambiente generalmente più alcalino, che possiede una forza ionica maggiore ed un'ampia varietà di colloidi e di materia organica naturale (NOM). Inoltre, a differenza degli ambienti di acqua dolce, mari ed oceani presentano una variabilità nei parametri chimico-fisici legata al profilo della profondità, quali ad esempio la temperatura e, ancora, la stratificazione delle correnti può originare differenze di salinità e di contenuto di NOM (Klaine et al, 2008). Tutto ciò può influenzare lo stato chimico e di aggregazione dei colloidi. Non è ancora chiaro, comunque, se le NP possano accumularsi all'interfaccia tra l'acqua più fredda e quella più calda, costituendo un rischio per la componente neotonica. Potrebbe inoltre esistere un rischio per la componente planctonica legato all'accumulo di NP nel microlayer superficiale, in cui la tensione superficiale e le forze viscosive possono intrappolare le NP. Le preoccupazioni degli ecotossicologi, attualmente, sembrano focalizzarsi sul benthos marino che è considerato come il più probabile dei ricettori finali delle ENP immesse nell'ambiente a causa della tendenza di questi materiali a precipitare, alle condizioni di salinità e forza ionica tipiche di tali ambienti (Klaine et al, 2008; Canesi et al, 2009; Zhu et al, 2011b).

#### 4.1.3 NP nei suoli e nei sedimenti

I suoli sono matrici complesse ed anche naturalmente molto ricche in NP (Theng e Yuan, 2008). Queste si originano dalle continue trasformazioni dei costituenti geogenici dei suoli, dovute ai fattori climatici ma anche all'elevata azione di bioturbazione. I sedimenti, essendo suoli in condizione di saturazione d'acqua, risultano ulteriormente complessi a causa delle interazioni tra l'acqua e la parte solida. Da sempre, i suoli sono stati considerati dei recettori finali per gli

inquinanti ma la natura particolare delle NP e l'elevata probabilità di reagire in sistemi così complessi possono dar luogo ancora una volta a delle eccezioni.

Sia i suoli che i sedimenti contengono argille, colloidali e NOM (Natural Organic Matter) (Klaine et al, 2008) i quali, per via dell'elevata superficie specifica e della presenza di cariche superficiali, possono legarsi alle NP a seconda dell'affinità reciproca. In particolar modo la NOM contiene molte regioni idrofobiche. Tra i costituenti della NOM ci sono anche le sostanze umiche che, a loro volta, in misura del 50%, si dividono in frazione solubile e non solubile (Joner et al, 2008). Date queste premesse, si intuisce quindi che, sostanze idrofobiche come i fullereni o i CNT, che da sole non si mobiliterebbero mai in acqua, potrebbero, invece, legarsi alla NOM, essendole affini e, qualora questa intercettasse dell'acqua, sarebbero comunque in grado di mobilitarsi.

Anche in questo caso, quindi, di fronte alla complessità del sistema in esame, si comprende quali possano essere le difficoltà riscontrabili nell'avanzare delle previsioni sul destino delle ENP nei suoli e nel distinguere tali ENP da tutte le NP naturalmente presenti nei suoli.

## 4.2 I modelli predittivi

In sostanza, è necessario colmare le lacune sull'informazione attualmente disponibile in materia di diffusione delle ENP nell'ambiente. Per fare questo si devono poter conoscere:

- la **mobilità** delle ENP e quindi, sia le loro proprietà chimico-fisiche, sia le caratteristiche dei diversi vettori ambientali responsabili della loro diffusione;
- le **trasformazioni** a cui sono soggette le ENP una volta disperse nell'ambiente (reazioni redox, acido-base, fotodegradazione), ovvero capire se, una volta immesse, mantengano le caratteristiche originarie o si trasformino in sostanze diverse (più o meno pericolose rispetto a quelle iniziali);
- la **degradabilità** delle ENP, per capire se c'è la possibilità di una loro eliminazione naturale o se piuttosto si accumulino.

Alcuni autori hanno sviluppato dei modelli quantitativi che forniscono una stima di alcune ENP nelle diverse matrici ambientali. Il lavoro non è affatto semplice poiché, data la complessità delle matrici ambientali e del comportamento delle ENP, la realizzazione dei modelli richiede l'utilizzo di un grande numero di variabili differenti, aventi pesi differenti ed è richiesta molta informazione che spesso non è disponibile. Questo ha come conseguenza il fatto che, variando anche solo leggermente le condizioni iniziali, i risultati delle previsioni possono discostarsi in maniera notevole.

### 4.2.1 Il modello di Gottschalk et al.

Gottschalk et al (2010), per la diffusione in ambiente del **nTiO<sub>2</sub>**, propongono una simulazione deterministica, basata sui modelli di Monte Carlo, che tiene conto di coefficienti di trasferimento e di partizionamento, fattori di emissione, livelli di produzione ed applicazione del prodotto. Ne risulta un modello predittivo che non fornisce la previsione della quantità assoluta della ENP nell'ambiente ma piuttosto il tasso di **incremento annuale** di quest'ultima. Tale modello è stato applicato ad un caso di studio specifico, inerente i flussi di nTiO<sub>2</sub> in Svizzera (fig. 4.4).

	Concentrations	95% confidence interval	
<i>Air</i>	0.00017 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	+/-	0.00001
<i>Surface Water</i>	0.55 $\mu\text{g}/\text{l}$	+/-	0.03
<i>Sediments</i>	0.78 $\mu\text{g}/\text{kg}$	+/-	0.04
<i>Soil</i>	45 $\mu\text{g}/\text{kg}$	+/-	2

Figura 4.4 – Incremento annuo previsto delle concentrazioni di nTiO<sub>2</sub> nel suolo e nei sedimenti ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), nell'aria ( $\mu\text{g m}^{-3}$ ) e nelle acque superficiali ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) della Svizzera (Gottschalk et al, 2009).

Come si può osservare, secondo il modello, l'incremento annuo maggiore di nTiO<sub>2</sub> sembrerebbe manifestarsi nel suolo, con un valore stimato di 45 ppb; seguirebbero i sedimenti, 0,78 ppb, le acque superficiali, 0,55 ppb ed infine l'aria, con 0,00017 ppt.

Questi incrementi teorici non sembrano essere in assonanza con quanto dichiarato in precedenza a proposito dell'impiego di ENP di TiO<sub>2</sub> (cfr. par. 3.2.1). Si è visto infatti come il 70% del nTiO<sub>2</sub> sintetizzato venga assorbito dalla produzione di cosmetici e filtri solari (Nowack et al, 2009). Un altro 10% c.a è impiegato per la realizzazione di detersivi per la pulizia delle superfici ed un 2% per le pitture al nTiO<sub>2</sub> (Nowack et al, 2009). Da tali premesse ci si aspetterebbe quindi un incremento di ENP ben più marcato per le acque superficiali e per i sedimenti, piuttosto che per il suolo. Naturalmente, si deve prendere in considerazione il fatto che, mentre le stime sull'impiego del nTiO<sub>2</sub> nei vari settori industriali sono generiche, il modello di Gottschalk et al (2009), invece, è specifico per il caso della Svizzera e, forse, proprio da questo scaturirebbero le discrepanze segnalate.

#### 4.2.2 I modelli di Nowack

Nowack (2009), per il **nTiO<sub>2</sub>**, **nAg**, **nZnO**, **CNT** e **fullereni**, ha fornito dei modelli predittivi che apportano due tipologie di informazione: un modello in cui è espresso il tasso di **incremento annuale** nei suoli e nei sedimenti dell'Europa ed un modello che stima la **quantità assoluta** presunta nelle acque superficiali europee (fig. 4.5 a) e fig. 4.5 b)).

Il primo modello teorizza un incremento annuo di nTiO<sub>2</sub> avente questo ordine: 358 ppb nel caso dei sedimenti, 89 ppb nel caso di suoli che ricevono i fanghi depurati ed infine 1,3 ppb per i suoli. Il modello, quindi, che è riferito al più generico caso europeo, sembra adattarsi con maggiore coerenza alle stime sull'impiego delle ENP di TiO<sub>2</sub>.

Nel secondo modello è interessante osservare la differenza esistente tra la concentrazione di nTiO<sub>2</sub> stimata per le acque superficiali (15 ppt) e quella per le acque trattate (3470 ppt). La cosa,

fra l'altro, si collega alle stime del precedente modello e supporta la teoria che i suoli riceventi i fanghi da impianti di depurazione evidenzino incrementi maggiori di ENP.

Probabilmente, l'autore ritiene che i tradizionali impianti di depurazione delle acque reflue, non essendo in grado di rimuovere le ENP, abbiano l'effetto di concentrarle.

Modeled yearly increase in soil and sediments in Europe (mode and 15 and 85% quantiles in  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

	TiO <sub>2</sub>	Ag	ZnO	CNT	fullerenes
Soil	1.3 (1.0-4.45)	0.02 (0.02-0.06)	0.09 (0.08-0.66)	0.002 (0.001-0.003)	0.00006 (0.0006-0.006)
Soil receiving sludge	89 (71-310)	1.6 (0.6-2.2)	3.2 (2.9-55)	0.07 (0.05-0.16)	0.002 (0.002-0.02)
Sediments	358 (273-1'409)	0.95 (0.97-8.6)	2.9 (2.6-51.7)	0.24 (0.21-1.3)	0.017 (0.006-0.53)

EMPA  
Matters Science & Technology

Figura 4.5 a) - Incremento annuo previsto delle concentrazioni di varie ENP nel suolo e nei sedimenti d'Europa ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) (Nowack et al, 2009).

Figura 4.5 b) - Modello delle concentrazioni di varie ENP nelle acque d'Europa ( $\text{ng L}^{-1}$ ) (Nowack, 2009).

Modeled environmental concentrations in waters of the EU (mode and 15 and 85% quantiles in  $\text{ng}/\text{L}$ )

	TiO <sub>2</sub>	Ag	ZnO	CNT	fullerenes
Surface water	15 (12-57)	0.8 (0.6-2.2)	10 (8-55)	0.004 (0.004-0.021)	0.02 (0.01-0.12)
Treated wastewater	3'470 (2'500-10'800)	43 (33-111)	432 (136-1'420)	15 (11-32)	5 (4-26)

### 4.3 Un caso di studio reale

Kaegi et al (2008) si sono interessati alle ENP provenienti dai rivestimenti delle facciate degli edifici urbani, trattati con le pitture al nTiO<sub>2</sub>. Nel corso del loro esperimento, gli autori hanno raccolto con dei contenitori l'acqua piovana che scorreva sulla superficie degli edifici. Inoltre, hanno intercettato anche l'acqua del runoff, proveniente dalle superfici, prelevandola poco prima dell'immissione nel corpo idrico ricettore. Questo per quanto riguarda le superfici da loro definite come "reali". In aggiunta, come termine di confronto, era stata dipinta appositamente una facciata "modello" (1,3 m<sup>2</sup>) con pitture al nTiO<sub>2</sub>. Anche di questa sono stati raccolti dei campioni con le medesime modalità operative. Tutti i campioni prelevati sono stati successivamente centrifugati per isolare la frazione avente dimensioni comprese tra 20 nm e 300 nm. I risultati di questa misura sono riassunti nel seguente grafico 4.6.

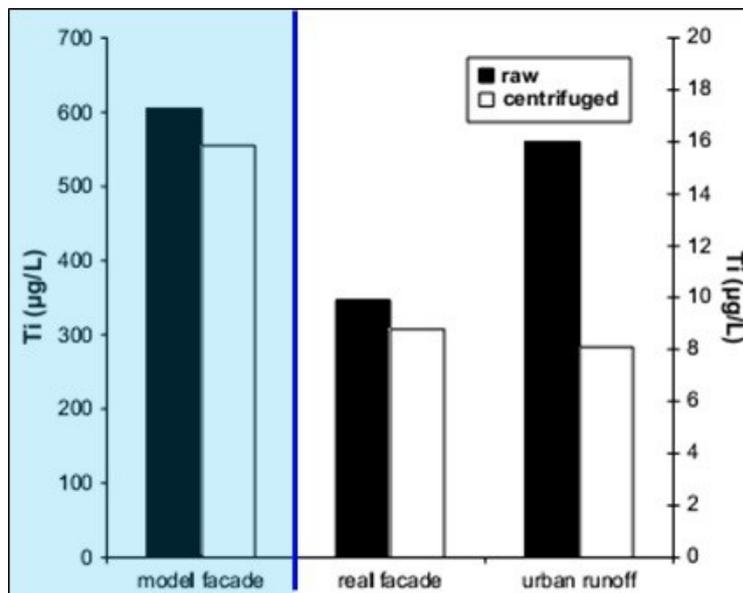


Figura 4.6 – Misura del rilascio di nTiO<sub>2</sub>, nell'acqua piovana, da facciate di edifici urbani; i risultati mostrano i valori di ENP sui campioni grezzi (colonne nere) e sui campioni centrifugati (colonne bianche). Inoltre, è possibile confrontare il rilascio da una facciata modello (area azzurra, ordinata di sx) con quello di edifici reali, pitturati almeno 2 anni prima (area incolore, ordinata dx) (Kaegi et al, 2008).

Dal confronto sembrerebbe emergere che, dalla superficie modello, ci sia stato un rilascio molto maggiore rispetto a quello delle superfici reali, addirittura da 2 a 3 ordini di grandezza superiore. Si potrebbe ipotizzare che, probabilmente, quando le pitture sono più fresche il rilascio di ENP sia più cospicuo e che ciò che inizialmente si distacca abbondantemente dalle superfici sia costituito solamente dagli strati più esterni della pittura, mentre i più interni rimangono legati in maniera più salda all'intonaco. Ovviamente un rilascio iniziale così elevato non potrebbe essere continuo. Se così non fosse, entro 3 anni, tutto il prodotto si disperderebbe con le piogge e ciò è

in contrasto con quanto riportato in letteratura, dove si parla di superfici autopulenti che non perdono di efficacia neanche dopo 20 anni (Fujishima et al, 2008).

E' bene ricordare che al momento questo è l'unico caso di studio esistente che contenga misure reali di campioni di ENP prelevati in matrici ambientali.

#### 4.4 Valutazione del rischio

La valutazione del rischio costituisce un altro tassello di informazione cruciale nel panorama complessivo dello studio delle ENP nell'ambiente. Fino ad ora si è avuto modo di conoscere le ENP, le loro proprietà ed il loro ciclo di vita legato alla produzione ed al mercato; si è inoltre ragionato sulla loro diffusione nell'ambiente. Dunque, tutti questi elementi portano spontaneamente a chiedersi: “Che rischio offrono le ENP per l'ambiente e per la salute?”

Innanzitutto è bene ribadire quale sia la definizione di rischio. Il **rischio** (risk) è la **probabilità** che possa manifestarsi un effetto avverso in certe condizioni. Il **pericolo** (hazard) è la **potenzialità** di causare un danno (Vighi and Bacci, 1998). Il rischio è legato al pericolo attraverso l'**esposizione**, secondo l'equazione:

$$\text{Rischio} = \text{Pericolo} \cdot \text{Esposizione}$$

Ciò vale a dire che, pur essendo una sostanza molto pericolosa, il rischio non sussiste se non c'è l'esposizione a questa. L'**esposizione**, a sua volta, per essere determinata necessita di informazioni inerenti:

- il **bersaglio**, ovvero l'organismo (o parte di esso) che viene a **contatto** con tale sostanza;
- le meccanismi di trasporto della sostanza e le eventuali trasformazioni che questa può subire prima di raggiungere il bersaglio;
- l'**assunzione** (uptake) della sostanza da parte del bersaglio;
- la **biodisponibilità** della sostanza, che, a sua volta è legata alle sue proprietà; nel caso delle ENP, quindi, essa dipende non soltanto dalla concentrazione iniziale di queste ma anche dallo stato di agglomerazione, dall'area superficiale, dalla carica, dall'affinità con il bersaglio.

Quindi, per offrire una valutazione del rischio attendibile è necessario disporre di tutte quelle informazioni che contribuiscono a determinare il reale scenario espositivo, essendo il rischio e l'esposizione saldamente legati. Più saranno le informazioni disponibili, maggiore diventerà l'accuratezza della previsione sul rischio.

La cosa, inoltre, assume particolare importanza se si pensa che tra gli scopi dell'analisi del rischio c'è quello di individuare il cosiddetto **rischio accettabile** ovvero il rischio che la comunità può tollerare, valutandolo attraverso un'analisi di costi-benefici in cui pesano voci non soltanto **razionali** ma anche legate alla **sfera emotiva**, come la percezione del rischio da parte della comunità, i fattori etici e socio-culturali. In sostanza si mettono sui piatti della bilancia tutti

i “pro” (sviluppo economico, creazione di posti di lavoro, realizzazione di prodotti innovativi e di tecnologia ecc...) e tutti i “contro” (rischi per la salute e per l’ambiente, fattori che possono contravvenire all’etica ed alla morale) e si opera una scelta.

Come già più volte osservato, l’informazione inerente le ENP è, per molti aspetti, ancora insufficiente e ciò, alla luce di quanto appena detto, rende alquanto spinosa la valutazione del rischio accettabile.

Per stimare il rischio legato alla diffusione di un certo inquinante, ci si avvale di un indice detto quoziente di pericolo HQ (Hazard Quotient), definito come il rapporto tra PEC e PNEC:

$$HQ = PEC/PNEC$$

(Vighi and Bacci, 1998).

PEC è l’acronimo di Predicted Environmental Concentration e quindi esprime la previsione della concentrazione di una sostanza nell’ambiente (fig. 4.7).

	Amount of nTiO <sub>2</sub> [µg]	Volume [dm <sup>3</sup> ]	PEC(nTiO <sub>2</sub> ) [µg L <sup>-1</sup> ]
<b>Air</b>	6.2 · 10 <sup>10</sup>	4.1 · 10 <sup>16</sup>	1.50 · 10 <sup>-6</sup>
<b>Water</b>	2.7 · 10 <sup>12</sup>	3.7 · 10 <sup>12</sup>	0.73
<b>Water affected by wastewater</b>	2.7 · 10 <sup>12</sup>	1.5 · 10 <sup>10</sup>	180
<b>Soil</b>	2.2 · 10 <sup>12</sup>	3.7 · 10 <sup>12</sup>	0.61

Figura 4.7 – Calcolo della PEC di nTiO<sub>2</sub> (µg L<sup>-1</sup>) per tre comparti ambientali (Müller et al, 2007).

PNEC è l’acronimo di Predicted No Effect Concentration e quindi esprime la previsione della concentrazione massima di una sostanza in corrispondenza della quale non sono rilevabili effetti avversi per la salute degli organismi viventi.

Se HQ > 1 il rischio non è accettabile, poiché questo significa che si prevede una concentrazione di inquinante, nell’ambiente, superiore a quella limite di non effetto. La successiva figura 4.8 chiarisce il concetto esposto.

**Risk evaluation: PEC/PNEC (for Europe)**

	TiO <sub>2</sub>	Ag	ZnO	CNT	fullerenes
Surface water	0.015	1.1	0.25	<0.0005	<0.0005
Cleaned wastewater	3.47	61	11	<0.0005	0.03
Sediment	na	na	na	<0.0005	na
Soil	0.004	na	na	<0.0005	<0.0005
Sludge treated soil	0.3	na	na	<0.0005	<0.0005

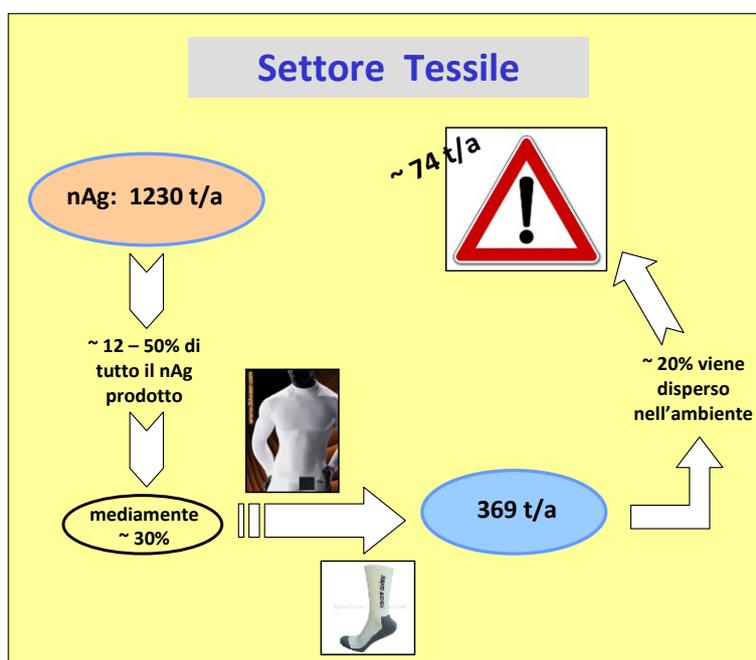
na: ecotox studies not available  
Assessment factor: 1000

**EMPA**  
Mannik Science & Technology

Figura 4.8 – Esempio di calcolo del rapporto PEC/PNEC in alcune matrici ambientali, per l’Europa (Nowack, 2009).

Si consideri ad esempio il nTiO<sub>2</sub>. Per quanto riguarda le acque superficiali, esso dimostra una valutazione del rischio accettabile (HQ < 1), cosa che non può essere affermata nel caso delle acque di scarico chiarificate (effluenti), dove la concentrazione ambientale prevista è c.a. 3,5 volte superiore a quella di non effetto. Un discorso analogo si può fare per il nZnO, la cui valutazione di rischio è accettabile per quanto riguarda le acque superficiali ma non lo è affatto per gli effluenti. Per il nAg il rischio è inaccettabile in entrambi i casi, soprattutto nel caso degli effluenti (HQ = 61). Il dato tuttavia non è sorprendente se ci si ricorda quanto visionato nel precedente capitolo 2, in cui si faceva menzione delle vastissime applicazioni dei prodotti al nAg, in particolar modo nel settore tessile e, quindi, non solo nei capi di abbigliamento ma anche nei detersivi e nelle stesse lavatrici. La dimensione di questa problematica è brevemente richiamata dal modello riportato in figura 4.9.

Figura 4.9 – Quantificazione ipotetica della dispersione nell’ambiente del nAg (t/a) proveniente dal settore tessile.



## **5. ECOTOSSICOLOGIA E NANOPARTICELLE**

Questo capitolo è suddiviso in due parti. Nella prima parte si trovano alcune considerazioni il cui scopo è quello di fornire delle chiavi di lettura, in termini ecotossicologici, differenti rispetto alle più tradizionali, per mezzo delle quali possa risultare facilitato l'approccio alla nuova disciplina costituita dalla nanoecotossicologia. La seconda parte, invece, fornisce delle informazioni di carattere statistico che riguardano i lavori già esistenti e documentati in letteratura, inerenti gli effetti delle nanoparticelle nei confronti di organismi acquatici. Tali statistiche sono organizzate in funzioni di chiavi differenti, quali ad, esempio, il gruppo tassonomico di appartenenza degli organismi, la tipologia di test, il tipo di matrice acquosa e le nanoparticelle testate.

## 5. ECOTOSSICOLOGIA E NANOPARTICELLE

### 5.1 Considerazioni generali: la nano(eco)tossicologia

Prima di passare alla visione di alcuni casi di studio in letteratura, si vogliono richiamare alcuni concetti utili per facilitare la comprensione di quanto seguirà.

#### 5.1.1 Metodologie ed approcci alla materia

Nel corso di questa ricerca più volte si è insistito sulla carenza di informazioni inerenti la dispersione ed il comportamento delle ENP nei mezzi acquosi e sulla necessità di implementare tali informazioni, soprattutto perché lo sviluppo tecnologico degli ENM procede a velocità notevolmente maggiore rispetto allo studio dei loro effetti sulla salute e sull'ambiente. Questa carenza è influente non soltanto sull'analisi del rischio ma anche per l'emanazione di **normativa** a riguardo. Fino a quando ci saranno dubbi ed incertezze, la normativa non potrà supportare lo **sviluppo sostenibile** delle nanotecnologie ed il rischio è quello che si possa bloccare l'intero settore produttivo. Infatti le Autorità competenti, applicando il **principio cautelativo** “no data, no market” (Savolainen et al, 2010), potrebbero impedire l'utilizzo e la messa in vendita di materiali di presunta pericolosità, per i quali non esistono informazioni di carattere tossicologico ed ecotossicologico.

Il contributo che la **tossicologia** e l'**ecotossicologia** possono fornire, per tutti questi motivi, è determinante. La prima, infatti, si occupa degli **esseri umani** ed ha come fine la salvaguardia del **singolo individuo**; la seconda si occupa di **organismi di diverso livello trofico** ed ha come fine la salvaguardia delle **specie** e degli **ecosistemi**. Si è dell'avviso quindi che entrambe le discipline debbano collaborare in sinergia.

L'approccio corretto inoltre deve necessariamente avvalersi di due metodologie operative cioè dei test *in vitro* e di quelli *in vivo*, idea ancora non ampiamente condivisa (Savolainen et al, 2010). Queste due metodologie sono complementari. Infatti nei test *in vitro* non si espone un essere vivente alla sostanza da testare ma solo una parte di esso (un organo, un tessuto, una linea cellulare ecc...) mentre l'esposizione dell'intero organismo è studiata nei test *in vivo*. Grazie agli esperimenti *in vitro* è possibile ricavare informazioni molto specifiche sull'azione di una certa ENP a livello cellulare o sub-cellulare (ad esempio l'azione tossica su una certa catena enzimatica) e, di conseguenza, comprenderne il meccanismo di tossicità. D'altra parte, un essere vivente nella sua interezza è qualcosa di molto più complesso delle singole parti che lo costituiscono poiché, oltre alle proprietà delle singole unità costituenti, possiede proprietà

emergenti. Quindi, necessariamente, anche i meccanismi di detossificazione ed eliminazione (clearance) osservabili sono molto più complessi.

C'è poi un ulteriore aspetto da valutare e cioè che un organismo, come risposta allo stress, potrebbe anche attuare dei cambiamenti comportamentali. Nel caso degli anellidi ad esempio, un endpoint comunemente considerato in ecotossicologia, è la compromissione della loro capacità di infossarsi nel sedimento, evento negativo da un punto di vista antipredatorio. Gli endpoint comportamentali possono essere valutati anche in organismi molto semplici. Ad esempio, lo studio di Ghafari et al (2008) ha evidenziato che l'esposizione a  $3,6 \mu\text{g L}^{-1}$  di CNT in *Tetrahymena thermophila* causa una diminuzione del suo comportamento predatorio e della sua voracità.

Perciò i test *in vivo*, con esposizione dell'intero organismo sono di fondamentale importanza se si vuole possedere il quadro completo dell'informazione ecotossicologica.

#### 5.1.2 Dal paradigma al paradosso della massa

Nel precedente paragrafo 2.5 si è fatta menzione delle proprietà delle ENP, rivolgendo particolare attenzione soprattutto alla **concentrazione** ed allo stato di **agglomerazione**.

“*Dosis sola facit venenum*” affermava Paracelso nel XVI secolo e, in effetti, la tossicologia classica ruota attorno al concetto di **dose** o a quello di concentrazione. Naturalmente il tutto va ben contestualizzato, visto che, 5 secoli fa, non si disponeva ancora di concetti fondamentali quali quello di biodisponibilità. Con opportuni *caveat*, si potrebbe assumere che, in un modello espositivo **molto** semplificato, supponendo di mantenere costanti tutte le altre condizioni al contorno, l'elemento chiave che può determinare l'esposizione è proprio la differente **quantità** di sostanza a cui si espone un organismo, quindi, la **massa** di tale sostanza. Le classiche curve dose – risposta o concentrazione – risposta, comunemente ricavate dagli studi ecotossicologici, avvalorano quanto appena discusso.

L'avvento delle nanotecnologie ha portato una rivoluzione in questo senso, poichè la sola informazione legata alla quantità somministrata di una ENP (e dunque alla sua dose o alla sua concentrazione) non è più sufficiente a determinare la **reale esposizione** di un organismo ad essa (Scown et al, 2010). C'è la necessità di integrare tale informazione con quella inerente lo stato di agglomerazione della ENP, che, non a caso, è attualmente al centro dell'interesse dei nanoecotossicologi. Se questa integrazione non avviene, il rischio è che non si possa parlare di concentrazioni **reali** di una ENP ma solo di concentrazioni **nominali** (Tiede et al, 2009). Ad esempio, si pensi di condurre un test di tossicità con un organismo marino che nuoti liberamente all'interno di una colonna d'acqua, contaminata da  $n\text{TiO}_2$  ad una data concentrazione. A causa

dell'elevata forza ionica dell'acqua marina (French et al, 2009), in breve tempo il nTiO<sub>2</sub> forma agglomerati grossolani che si depositano sul fondo (Keller et al, 2010; Zhu et al, 2011b), causando così un abbattimento delle ENP nella colonna d'acqua. Lo scenario espositivo potrebbe essere cambiato e l'organismo potrebbe essere esposto ad una concentrazione reale minore rispetto a quella iniziale (sotto-esposizione). D'altra parte l'operatore, certo della concentrazione nominale, può sovrastimare il reale scenario espositivo e, osservando gli effetti sull'organismo, può commettere inconsapevolmente un errore di valutazione (falso negativo).

C'è poi un altro aspetto interessante che merita di essere segnalato ed è connesso alla reattività delle ENP. Siccome la formazione di agglomerati dipende dalla probabilità di incontro delle ENP e questa, a sua volta, è funzione della quantità di materia disponibile, **paradossalmente** può succedere che laddove si somministrino quantità maggiori di ENP, queste sedimentino più in fretta, portando ad una riduzione dello scenario espositivo; viceversa per concentrazioni minori si potrebbero osservare effetti maggiori, legati alla maggiore permanenza delle ENP nella colonna d'acqua, evento probabilmente verificatosi anche nel corso di questo studio (cfr. par. 10.4.1).

Un'ultima considerazione. Parlando dello stato di agglomerazione, ci si riconduce al concetto di reattività e quindi, inevitabilmente, a quello di **area superficiale** (cfr. par. 2.3.3). Secondo Savolainen et al (2010), la superficie degli ENM può considerarsi la reale unità di misura da utilizzarsi per la definizione di dose. Vari autori hanno già manifestato il proprio interesse allo studio di questa proprietà, utilizzando, nei propri esperimenti, campioni dello stesso ENM a granulometrie differenti e, perciò, con aree superficiali differenti (Bernardeschi et al, 2010; Fang et al, 2010; Barillet et al, 2010; Hartmann et al, 2010). In particolare, Oberdörster et al (2005) hanno testato nei ratti gli effetti di due ENP di nTiO<sub>2</sub> a granulometria diversa, ovvero 20 nm e 250 nm. L'endpoint valutato era la percentuale di neutrofili nelle cellule polmonari, come indicatori dello stato infiammatorio causato dall'inalazione delle polveri di titanio. Gli autori hanno rappresentato graficamente i risultati ottenuti, confrontando gli effetti, prima, attraverso la massa e, poi, attraverso l'area superficiale (fig. 5.1).

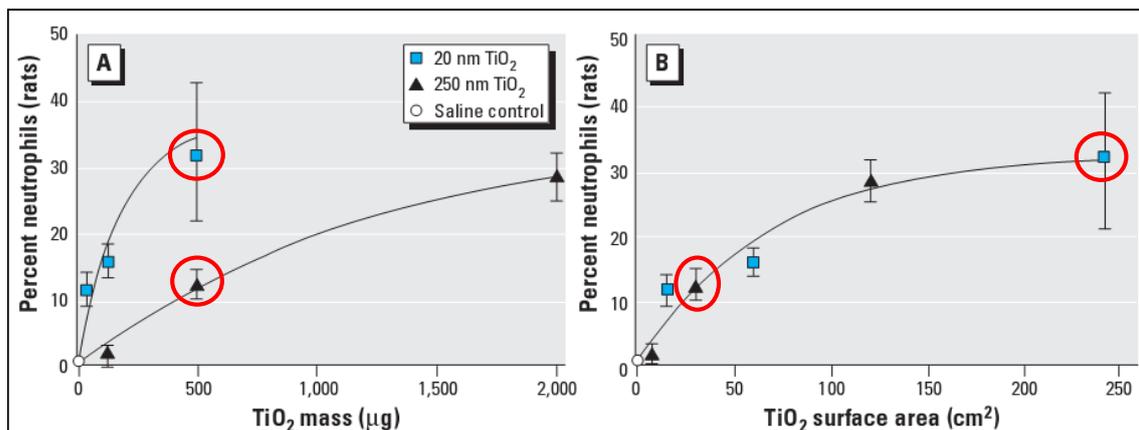


Figura 5.1 – Percentuale di neutrofili nelle cellule polmonari di ratto; confronto degli effetti rispetto alla massa ( $\mu\text{g}$ ) e rispetto all'area superficiale ( $\text{cm}^2$ ) (Oberdörster et al, 2005).

La cosa sembra avere dei risvolti molto interessanti. Infatti nel grafico A si possono osservare effetti molto simili che però corrispondono a valori di massa molto diversi, il che può destare perplessità. Se invece tali effetti sono analizzati attraverso l'area superficiale (grafico B), l'interpretazione sembra più immediata, poiché gli effetti simili corrispondono a valori di area superficiale vicini.

Per concludere, nel passare al prossimo paragrafo, si può affermare come proprio queste particolari esigenze operative stiano favorendo la nascita di una nuova branca specifica: la **nano(eco)tossicologia**.

## 5.2 La produzione bibliografica inerente le ENP

La produzione bibliografica inerente gli aspetti ecotossicologici delle ENP è in progressivo aumento, come testimoniato dal seguente grafico 5.2.

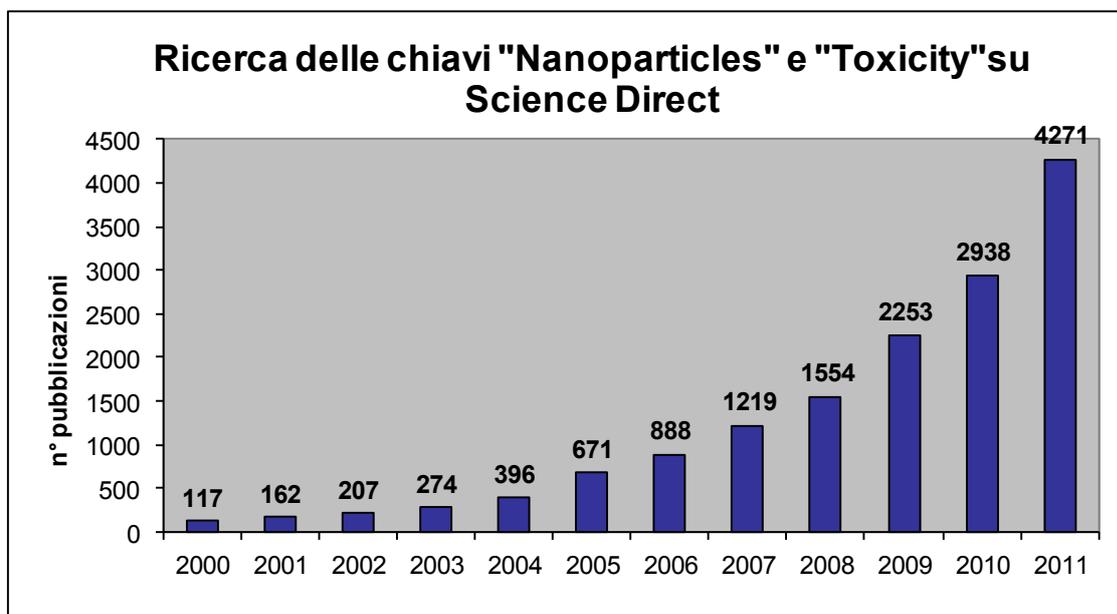


Figura 5.2 – Numero di pubblicazioni su Science Direct; ricerca effettuata inserendo le parole chiave: “Nanoparticles” e “Toxicity” – febbraio 2012.

Questi studi però non sono omogeneamente distribuiti, se si considerano le diverse matrici ambientali. Per gli aspetti puramente ecotossicologici, la preparazione di questa tesi di Dottorato ha portato alla visione di oltre **170** articoli, pubblicati all’incirca nell’arco complessivo di un decennio. Da un’analisi personale, statisticamente (fig. 5.3) risulta che, finora, la maggior parte dei test è stata condotta su organismi viventi in **acqua dolce**. Infatti (cfr. par. 4.1.2), si è già avuto modo di apprendere come il comportamento delle ENP in un mezzo acquoso, non necessariamente salato, sia notevolmente complesso, per via delle elevate reattività ed instabilità di queste. Nel passaggio alla matrice acqua marina, si aggiungono ulteriori complicazioni a quelle appena evidenziate, poiché l’elevata concentrazione dei sali (35%) incide soprattutto sulla **forza ionica** del mezzo, che arriva a raggiungere il valore di 0,7 mM (Dyrssen e Hansson, 1973). Questo fenomeno si concretizza in un aumento dell’instabilità delle ENP, aumento che promuove la formazione di agglomerati grossolani in tempi più rapidi (Brant et al, 2005; French et al, 2009). Ecco quindi che risulta difficile riuscire a collegare lo scenario espositivo agli effetti osservati (cfr. par. 5.1.2) cosa che, in molti casi, inficia la **riproducibilità** dei risultati degli esperimenti effettuati e può rappresentare un deterrente per ulteriori test di approfondimento. Questo, in sostanza, è uno dei motivi che contribuisce a spiegare la maggiore proliferazione di

studi sugli organismi di acqua dolce (Klaine et al 2008; Ward e Kach, 2009; Zhu et al, 2011b), congiuntamente al fatto, che, in generale, c'è comunque una maggiore esperienza nel settore dulciacquicolo.

Per dare maggior concretezza a quanto esposto, di seguito sono fornite alcune statistiche, suddivise per chiavi di lettura differenti (matrice, tipo di ENP, organismo). I dati ottenuti sono stati ricavati analizzando statisticamente le 140 pubblicazioni di cui sopra si è fatta menzione.

### 5.2.1 Matrici

Questo primo grafico permette di visualizzare la distribuzione del **numero di pubblicazioni** in funzione delle diverse matrici ambientali in cui vivono gli organismi utilizzati nei test. Nel seguente conteggio (fig. 5.3) si considerano entrambe le tipologie di test, sia *in vivo* che *in vitro*.

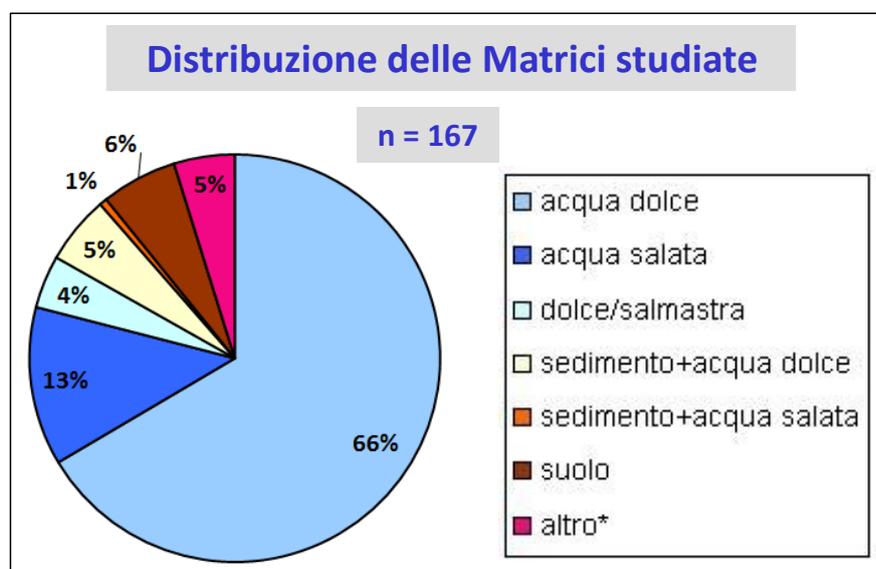


Figura 5.3 – Suddivisione degli articoli in base alle matrici studiate in letteratura (n = 140) – febbraio 2012. \*= terreni di coltura, tessuti di cotone, pitture da interni, pellet di ceramica, succo di arancia.

Come si può osservare, quasi il **70%** delle pubblicazioni ha come oggetto lo studio di organismi di **acqua dolce**. Anche presi assieme, **acqua salata ed acqua salmastra** costituiscono solo il **18%** del totale. Nella voce “altro” (4%) sono raggruppate quelle matrici utilizzate come terreni di coltura per i test su microrganismi quali batteri, funghi e lieviti.

Come termine di confronto, sono proposte le figure 5.4 a) e b) e 5.5. La prima si riferisce alle osservazioni statistiche di Kahru et al (2010) che hanno suddiviso gli studi, sia in base alle specie, sia in base al tipo di ENM utilizzati (Kahru et al, 2010). La seconda è una review di Cattaneo et al (2009), in cui si vede la percentuale degli studi nanoecotossicologici effettuati in

differenti mezzi di dispersione ed in specie differenti (Cattaneo et al, 2009). Le specie, confrontate in tale lavoro, sono tutte esclusivamente **invertebrate**.

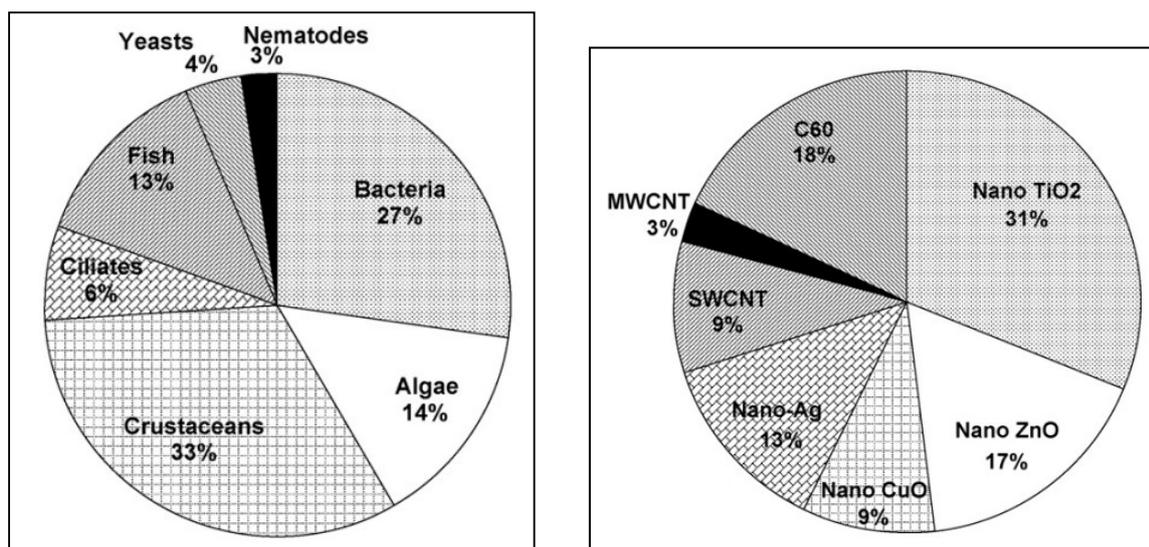


Figura 5.4 a) e b) – Suddivisione delle pubblicazioni in funzione dei gruppi tassonomici (a) e degli ENM (B) utilizzati nei test (Kahru et al, 2010).

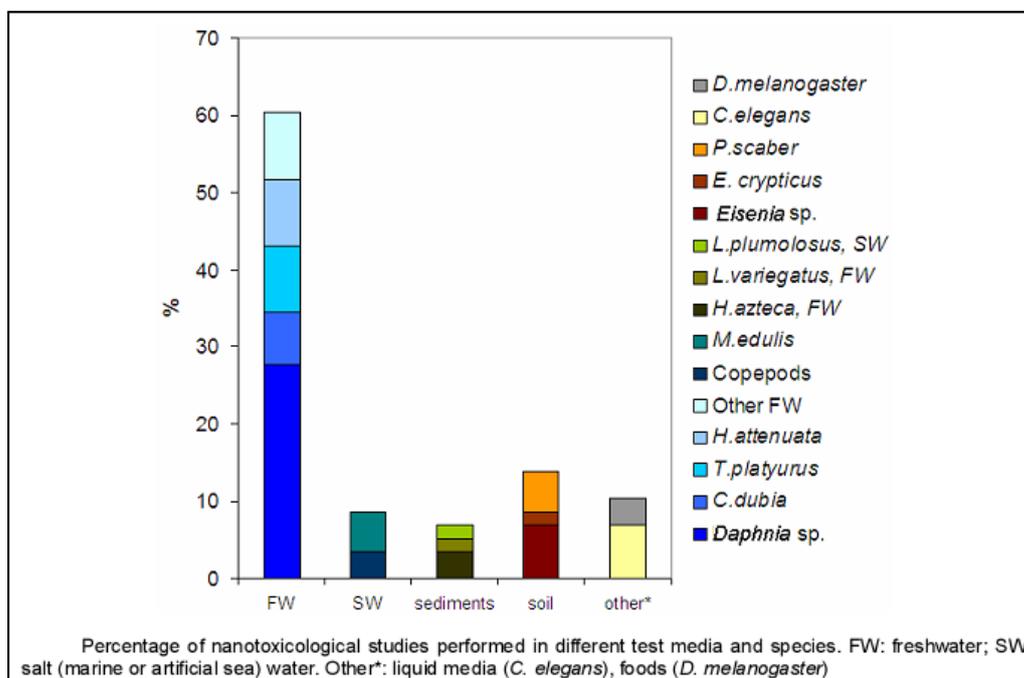


Figura 5.5 – Suddivisione dei diversi studi effettuati in diversi mezzi e con diverse specie (Cattaneo et al, 2009).

### 5.2.2 Organismi e tipologie dei test

Nel seguente paragrafo è possibile visualizzare la distribuzione del **numero di studi** presenti all'interno delle diverse pubblicazioni ovvero **del numero dei test** *in vivo* e *in vitro* effettuati sui vari gruppi di organismi.

I primi due grafici raggruppano tutti gli studi esaminati in cui compaiono genericamente specie acquatiche (figg. 5.6 e 5.7), separando i test *in vivo* da quelli *in vitro*. Gli ultimi due, invece, si riferiscono ad i soli test *in vivo* e la selezione è funzione del mezzo acqua dolce o acqua marina (figg. 5.8 e 5.9).

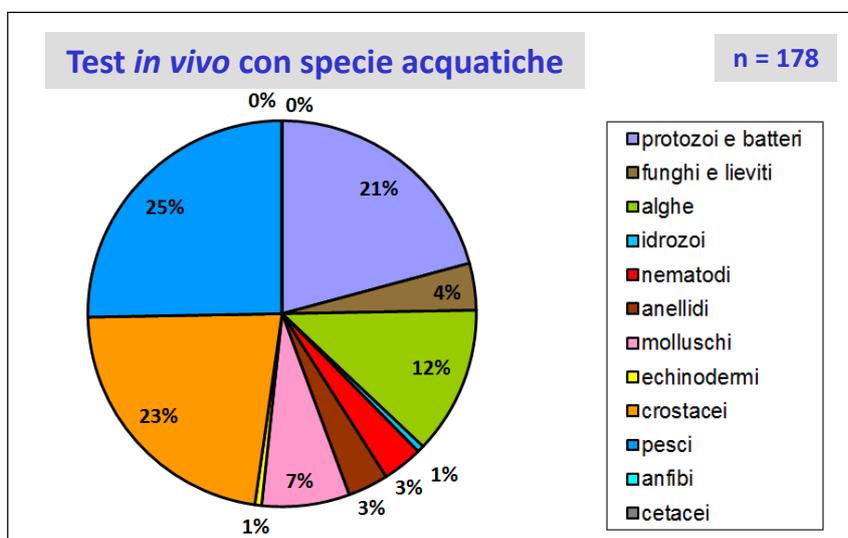


Figura 5.6 – Distribuzione degli studi *in vivo* con specie acquatiche – febbraio 2012.

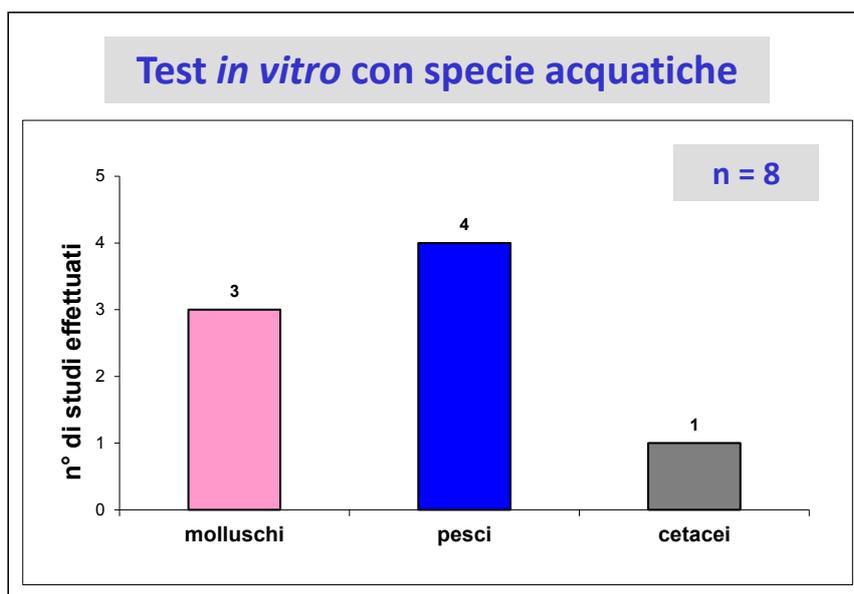


Figura 5.7 – Distribuzione degli studi *in vitro* con specie acquatiche – febbraio 2012.

E' lampante la maggior abbondanza dei test *in vivo* rispetto a quelli *in vitro*, non solo nel numero ma anche nella più ampia diversità tassonomica degli organismi utilizzati per gli studi.

Da notare che la somma degli studi riportati nei due grafici (n = 187) è superiore al numero delle pubblicazioni viste prima (n = 179). Questo perché, in una singola pubblicazione, possono

trovarsi contemporaneamente gli studi di più specie diverse, oppure, può succedere che la stessa specie sia sottoposta sia a test *in vivo* che a quelli *in vitro*.

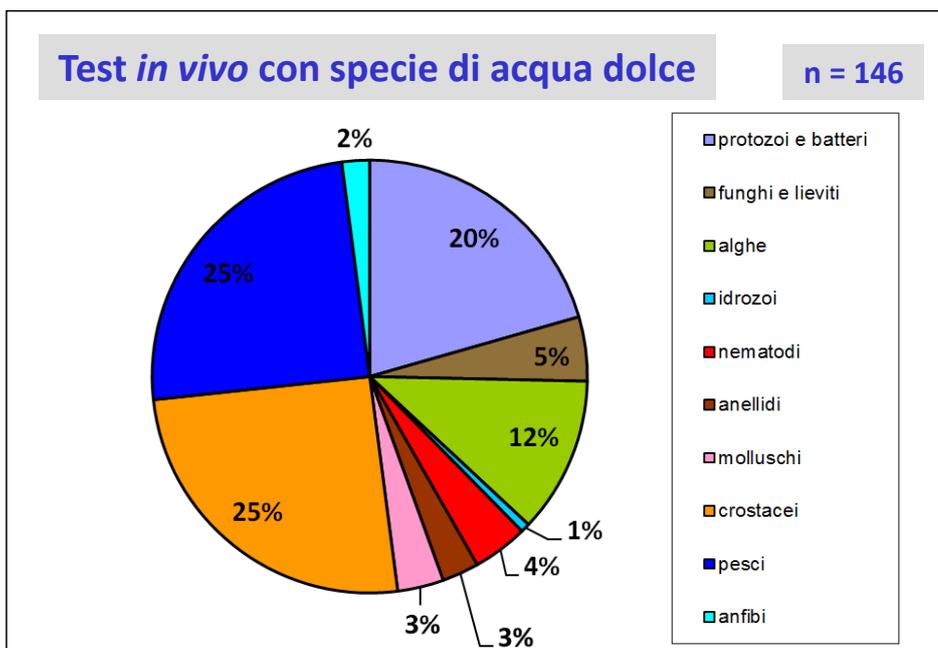


Figura 5.8 – Distribuzione degli studi *in vivo* con specie di acqua dolce – febbraio 2012.

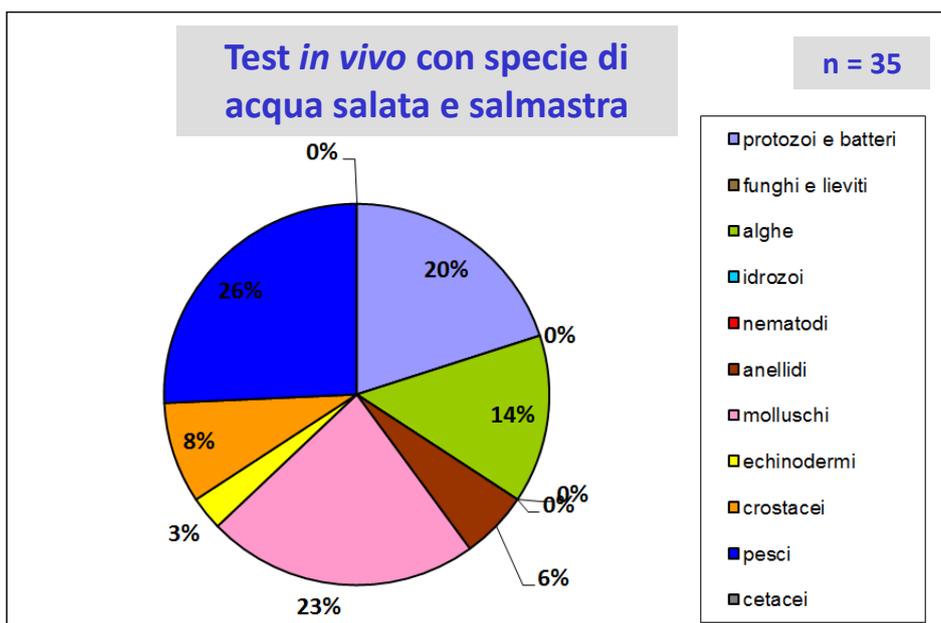


Figura 5.9 – Distribuzione degli studi *in vivo* con specie di acqua salata e salmastra – febbraio 2012.

Ancora una volta si evince lo sbilanciamento presente tra gli studi effettuati con organismi di acqua dolce e quelli effettuati con organismi di acqua salata e salmastra, sia a livello quantitativo, sia nella diversità tassonomica degli organismi utilizzati.

Per quanto riguarda invece i test *in vitro*, essendo il numero così esiguo (cfr. fig. 5.7) basti sapere che, per le specie d'acqua dolce, sono stati descritti solamente 4 studi, 1 su un mollusco e 3 sui pesci; per le specie d'acqua salata o salmastra, gli studi sono 3, 2 vertono sui molluschi e 1 su un cetaceo.

### 5.2.3 Elenco delle specie

Per completezza informativa, si riporta l'elenco di tutte le specie che compaiono nei diversi lavori visionati, suddivise per gruppi tassonomici, con indicato il numero di volte in cui sono apparsi utilizzati in test *in vivo* o *in vitro*, alla data di febbraio 2012.

Legenda: in **nero** le specie di ambienti **dulciacquicoli**, in **blu** quelle di ambienti **salmastri** e **marini**.

Protozoi e Batteri	Specie	test <i>in vivo</i>	test <i>in vitro</i>
	<i>Acinetobacter</i>	1	
	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	1	
	<i>Alcaligene eutrophus</i>	1	
	<i>Anabaena variabilis</i>	1	
	<i>Bacillus anthracis</i>	1	
	<i>Bacillus lichen formis</i>	1	
	<i>Bacillus subtilis</i>	4	
	<i>Bodo saltans</i>	1	
	<i>Colibacillus</i>	1	
	<i>Entamoeba histolytica</i>	1	
	<i>Escherichia coli</i>	16	
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1	
	<i>Micrococcus luteus</i>	1	
	<i>Nitrobacter</i>	1	
	<i>Nitrosomonas</i>	1	
	<i>Nitrosomonas europaea</i>	1	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	
	<i>Pseudomonas putida</i>	2	
	<i>Salmonella typhimurium</i>	3	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	4	
	<i>Tetrahymena pyriformis</i>	2	
	<i>Tetrahymena thermophila</i>	3	
	<i>Vibrio fischeri</i>	7	

Funghi e Lieviti	Specie	test <i>in vivo</i>	test <i>in vitro</i>
	<i>Aspergillus niger</i>	1	
	<i>Aspergillus sp.</i>	1	
	<i>Candida albicans</i>	2	
	<i>Issatchenkia orientalis</i>	1	
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	1	
	<i>Penicillium sp.</i>	1	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2	
	<i>Trichoderma sp.</i>	1	

Alghe	Specie	test <i>in vivo</i>	test <i>in vitro</i>
	<a href="#">Caulerpa taxifolia</a>	1	
	<a href="#">Chaetoceros gracilis</a>	1	
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	2	
	<i>Chlorella sp.</i>	2	
	<i>Chlorella vulgaris</i>	2	
	<i>Desmodesmus subspicatus</i>	1	
	<a href="#">Dunaliella tertiolecta</a>	2	
	<a href="#">Isochrysis galbana</a>	2	
	<a href="#">Microcystis aeruginosa</a>	1	
	<a href="#">Phaeodactylum tricornutum</a>	1	
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	11	
	<i>Scenedesmus sp.</i>	1	
	<i>Scenedesmus subspicatus</i>	1	
	<a href="#">Skeletonema costatum</a>	1	
	<a href="#">Skeletonema marinoi</a>	1	
	<a href="#">Thalassiosira pseudonana</a>	5	
	<a href="#">Thalassiosira weissflogii</a>	1	

Idrozoi	Specie	test <i>in vivo</i>	test <i>in vitro</i>
	<i>Hydra attenuata</i>	1	

Nematodi	Specie	test <i>in vivo</i>	test <i>in vitro</i>
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	7	

Anellidi	Specie	test <i>in vivo</i>	test <i>in vitro</i>
	<i>Arenicola marina</i>	1	
	<i>Eisenia fetida</i>	4	
	<i>Eisenia veneta</i>	1	
	<i>Hediste diversicolor</i>	1	
	<i>Lumbriculus variegatus</i>	1	
	<i>Lumbricus terrestris</i>	1	
	<i>Tubifex tubifex</i>	1	

Molluschi	Specie	test <i>in vivo</i>	test <i>in vitro</i>
	<a href="#">Crassostrea virginica</a>	1	
	<i>Corbicula fluminea</i>	2	
	<i>Elliptio complanata</i>	1	
	<a href="#">Haliotis diversicolor supertexta</a>	2	
	<a href="#">Ilyanassa obsoleta</a>	1	
	<i>Lymnaea stagnalis</i>	1	
	<a href="#">Mercenaria mercenaria</a>	1	
	<a href="#">Mytilus edulis</a>	1	1
	<a href="#">Mytilus galloprovincialis</a>	3	2
	<i>Potamopyrgus antipodarum</i>	1	
	<a href="#">Scrobicularia plana</a>	1	

Echinodermi	Specie	test <i>in vivo</i>	test <i>in vitro</i>
	<i>Lychitinus pictus</i>		1

Crostacei	Specie	test <i>in vivo</i>	test <i>in vitro</i>
	<i>Amphiascus tenuiremis</i>		1
<i>Ceriodaphnia affinis</i>		1	
<i>Ceriodaphnia dubia</i>		5	
<i>Chydorus sphaericus</i>		1	
<i>Daphnia magna</i>		28	
<i>Daphnia pulex</i>		2	
<i>Elasmopus rapax</i>		1	
<i>Gammarus fossarum</i>		1	
<i>Hyalella azteca</i>		3	
<i>Leptocheirus plumulosus</i>		1	
<i>Palaemonetes pugio</i>		1	
<i>Porcellio scaber</i>		4	
<i>Thamnocephalus platyurus</i>		4	
<i>Tigriopus japonicus</i>		1	

Pesci	Specie	test <i>in vivo</i>	test <i>in vitro</i>
	<i>Carassius auratus</i>		
<i>Carassius gibelio</i>		1	
<i>Cyprinodon variegatus</i>		1	
<i>Cyprinus carpio</i>		5	1
<i>Danio rerio</i>		19	
<i>Gasterosteus aculeatus</i>		1	
<i>Micropterus salmoides</i>		1	
<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>		1	
<i>Oncorhynchus mykiss</i>		4	2
<i>Oryzias latipes</i>		7	
<i>Oryzias melastigma</i>		1	
<i>Perca fluviatilis</i>		1	
<i>Pimephales promelas</i>		6	
<i>Poecilia reticulata</i>		1	

Anfibi	Specie	test <i>in vivo</i>	test <i>in vitro</i>
	<i>Ambystoma mexicanum</i>		1
<i>Xenopus laevis</i>		3	

Cetacei	Specie	test <i>in vivo</i>	test <i>in vitro</i>
	<i>Tursiops truncatus</i>		

A completamento di questa parte, inerente gli organismi e le tipologie dei test, si vogliono proporre due ultimi elenchi. Nel primo sono indicate le specie vegetali utilizzate nei test. Pur essendo tutte specie che vivono sul suolo, la *Spartina alterniflora* è indicata in blu poiché specie alofila, tipica di substrati salmastri (ad esempio, le barene). Nel secondo elenco si trovano quelle

specie utilizzate per alcuni lavori di cui si è presa visione (es.: poster SETAC) ma che non hanno ancora prodotto la relativa pubblicazione alla data di febbraio 2012.

Piante	Specie	test <i>in vivo</i>
	<i>Allium cepa</i>	1
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1
	<i>Avena sativa</i>	1
	<i>Brassica napus</i>	1
	<i>Brassica oleracea</i>	2
	<i>Cucumis sativus</i>	2
	<i>Daucus carota</i>	1
	<i>Glycine max</i>	1
	<i>Lactuca sativa</i>	1
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	1
	<i>Phaseolus radiatus</i>	1
	<i>Raphanus sativus</i>	1
	<i>Salix sp.</i>	1
	<i>Spartina alterniflora</i>	1
	<i>Triticum aestivum</i>	1
	<i>Vicia faba</i>	1
	<i>Zea mais</i>	1

Figura 5.10 – Elenco delle specie vegetali utilizzate per l'esecuzione di test *in vivo* con ENP; in blu le specie alofite – Febbraio 2012.

	Specie
Protozoi e Batteri	<i>Arthrobacter globiformis</i>
	<i>Bacillus cereus</i>
Alghe	<i>Fucus serratus</i>
	<i>Navicula pelliculosa</i>
	<i>Synechococcus leopoliensis</i>
Rotiferi	<i>Brachionus calyciflorus</i>
Anellidi	<i>Enchytraeus albidus</i>
	<i>Enchytraeus crypticus</i>

Figura 5.11 – Elenco delle specie utilizzate per l'esecuzione di test con ENP, che non hanno ancora prodotto le relative pubblicazioni – Febbraio 2012.

#### 5.2.4 ENP e organismi

Quest'ultimo paragrafo completa l'informazione statistica, permettendo di visualizzare il numero di studi inerenti gli effetti delle differenti ENP nei confronti dei diversi organismi ovvero **quante volte** è stata testata quella data ENP con quel particolare organismo. Nel conteggio non si tiene conto né del tipo di test (*in vivo* o *in vitro*), né del tipo di matrice (dolce o salata).

	Au	Ag	Cu	Pt	Fe	Se	B	Ni	Co	Al
cetacei										
anfibi										
pesci	1	7	2		1	2		1	1	1
crostacei	1	2	1				1	1	1	1
echinodermi										
molluschi	2									
anellidi		1	1					1		
nematodi			1	1						
idrozoï										
alghe	1	3	1					1	1	1
funghi e lieviti		5								
protozoi e batteri	1	10			2		1			

Figura 5.12 – Numero di studi inerenti gli effetti delle differenti ENP elementari nei confronti di diversi organismi – Febbraio 2012.

	TiO2	ZnO	Al2O3	SiO2	CuO	CeO2	Fe2O3	ZrO2	NiO	SnO2	MnO
cetacei	1										
anfibi	1	1									
pesci	20	5				1				1	
crostacei	31	8	3	1	4	5	1				
echinodermi	1	1				1					
molluschi	4		1	2	3		2				
anellidi	5	2	2	1	1			1			
nematodi	3	1	1			2					
idrozoï	1										
alghe	10	7	2	1	1	2		1	1		
funghi e lieviti	2	2			1		1				
protozoi e batteri	18	14	2	1	5	3	1	1			1

Figura 5.13 – Numero di studi inerenti gli effetti delle differenti ENP di ossidi metallici nei confronti di diversi organismi – Febbraio 2012.

	C60	CNT	CB	QDs
cetacei				
anfibi		1		
pesci	7	1		2
crostacei	9	8	1	1
echinodermi				
molluschi	2		3	1
anellidi	1	2		
nematodi				
idrozoï	1			
alghe	1	1		2
funghi e lieviti				
protozoi e batteri	5	3		

Figura 5.14 – Numero di studi inerenti gli effetti di differenti ENP organiche e Q-Ds nei confronti di diversi organismi – Febbraio 2012.

	altre ENP
cetacei	
anfibi	
pesci	4
crostacei	5
echinodermi	1
molluschi	1
anellidi	
nematodi	
idrozoi	1
alghe	4
funghi e lieviti	
protozoi e batteri	3

Figura 5.15 – Tabella cumulativa del numero di studi inerenti gli effetti di altre ENP\* nei confronti di diversi organismi – Febbraio 2012.

\* =  $C_{70}$ ,  $C_{60}OH_{24}$ ,  $CuZnFe_2$ ,  $NiZnFe_2$ ,  $Fe_5O_{12}Y$ ,  $SrFe_{12}O$ ,  $InO_2$ ,  $O_3Sm_2$ ,  $Er_2O_3$ ,  $Ho_2O_3$ , Cd-Se, FS (Fluorescent Silica), FNP (Fluorescent Nano Particle), NIPAM/BAM (N-IsopropilAcrilammide/ButilAcrilammide), PMMA (PoliMetilMetAcrilato), ALEX (ossido di alluminio 100 nm), L-ALEX (ossido di alluminio 1-10  $\mu m$ ), CS-CuO (Core Shell-CuO), SA-PVA-ZnO= Sodium Alginate Poly Vinyl Alcohol-ZnO.

## **6. ECOTOSSICOLOGIA DELLE NANOPARTICELLE**

In questo capitolo sono presentate le principali evidenze sperimentali derivanti dalla conduzione di studi in vivo inerenti gli effetti delle ENP nei confronti di differenti classi di organismi. Si è scelto di dividere questi risultati in due blocchi. Nel primo blocco, suddiviso in funzione delle diverse tipologie di organismi bersaglio, è possibile consultare i risultati della sperimentazione del solo nTiO<sub>2</sub>; nel secondo, invece, sono riportati gli studi sulle ENP in generale, raggruppati in base alle diverse nanoparticelle testate.

## 6. ECOTOSSICOLOGIA DELLE NANOPARTICELLE

### 6.1 Introduzione

In ecotossicologia, per l'esecuzione di test di tossicità con gli organismi animali e vegetali, esistono dei **protocolli standard** che sono da tempo riconosciuti da organizzazioni internazionali (ISO, OECD, CEN) e nazionali ed ampiamente utilizzati in vari ambiti applicativi. Come si è già avuto modo di apprendere (cfr. par. 1.1), però, di fronte a dei materiali nuovi e dal comportamento poco conosciuto come le ENP, l'utilizzo di tali protocolli non basta a garantire l'uniformità operativa e, di conseguenza, la riproducibilità e la confrontabilità dei risultati. Vi sono infatti diversi aspetti, inerenti la caratterizzazione chimica delle ENP ed il metodo di preparazione delle loro dispersioni, sui quali **non esiste** ancora una **standardizzazione** metodologica. Allo stato attuale, quindi, se si osservano gli articoli scientifici pubblicati, inerenti i test di tossicità con le ENP, si scopre che quasi nessun autore lavora conoscendo la **reale** concentrazione delle dispersioni utilizzate, per averla effettivamente misurata. Nella stragrande maggioranza delle ricerche, pur presentando la caratterizzazione del prodotto impiegato, si adoperano comunque dispersioni a concentrazioni **nominali** di ENP che non garantiscono la reale esposizione alla concentrazione prevista dal disegno sperimentale, a causa della tendenza delle particelle ad agglomerarsi e precipitare (cfr. par. 5.1.2).

Le difformità si estendono anche al **tipo** di ENP. Ad esempio, per quanto riguarda più strettamente il nTiO<sub>2</sub>, per il quale questo argomento è stato oggetto di ulteriori approfondimenti, si segnala che esiste una certa variabilità nella composizione delle ENP utilizzate. Queste infatti, possono essere costituite da miscele di anatasio e rutilo, in rapporti differenti, oppure possono comporsi di una sola di queste due fasi mineralogiche.

Anche le tecniche e le metodologie per la **dispersione** delle ENP nei mezzi acquosi sono molto variabili: alcuni autori utilizzano lo stirring con ancorotta magnetica, altri il bagno ad ultrasuoni, altri ancora la sonicazione tramite sonda ad ultrasuoni. C'è chi ricorre, invece, all'uso di solventi. A volte, si adopera perfino la combinazione di più metodiche (es.: sonicazione + stirring). Anche volendo considerare la sola tecnica di sonicazione tramite sonda ad ultrasuoni, ci si accorge che autori diversi compiono tale operazione impostando lo strumento con tempi e potenze di esercizio differenti, aggiungendo in questo modo un ulteriore fonte di variabilità.

Come ultimo aspetto, non di certo per importanza, si vuole segnalare la variabilità presente tra gli **endpoint** considerati dai diversi autori nei rispettivi test di tossicità. Non si deve dimenticare, infatti, che i risultati di uno studio possono essere anche una conseguenza delle scelte effettuate.

Per alcuni autori, quindi, una certa ENP può risultare non tossica poiché questi considerano come endpoint il suo effetto letale sugli organismi, che magari non si manifesta alle concentrazioni da loro impiegate, mentre altri, invece, valutandone gli effetti cronici subletali, potrebbero esprimersi a favore della sua pericolosità nei confronti degli organismi.

Da questi esempi si intuisce quali siano le cause che, attualmente, impediscono la produzione di risultati solidi e soprattutto confrontabili. Il monito è quello di valutare attentamente le condizioni sperimentali utilizzate nei diversi lavori, a beneficio di una corretta lettura critica ed interpretazione del risultati, fino a quando non si definiranno delle linee guida standard, tali da uniformare o per lo meno limitare la variabilità delle suddette condizioni.

Per agevolare il confronto, al termine di ogni paragrafo, si propone una tabella riassuntiva delle varie condizioni sperimentali utilizzate dai diversi autori per la realizzazione dei rispettivi casi di studio, in cui è anche possibile osservare quali, tra questi lavori, riportino le concentrazioni reali delle ENP utilizzate.

Alcune delle evidenze sperimentali inerenti batteri, alghe, molluschi e crostacei, saranno riprese nella discussione dei risultati al capitolo 10.

## 6.2 Evidenze ecotossicologiche del nTiO<sub>2</sub>

### 6.2.1 Test coi batteri

#### Acqua dolce

Nello studio effettuato da Cherchi and Gu (2010), sugli effetti del nTiO<sub>2</sub> ( $\emptyset = 10$  nm) nei confronti di *Anabaena variabilis*, sono stati considerati due diversi endpoint: l'inibizione % della crescita e la riduzione della capacità di fissare l'N, misurata indirettamente, attraverso la valutazione dell'accumulo di CGPs (cyanophycin grana proteins). L'esposizione è durata da 24 h a 6 gg., alle concentrazioni tra 0,5 e 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ . L'inibizione della crescita ha fornito i seguenti valori di EC50: 13,98  $\text{mg L}^{-1}$  a 24 h, 0,62  $\text{mg L}^{-1}$  a 96 h e 0,15  $\text{mg L}^{-1}$  a 6 gg. L'inibizione della fissazione dell'N è stata del 50% a 10  $\text{mg L}^{-1}$  per 24 h, del 100% a 75  $\text{mg L}^{-1}$  per 24 h e del 100% anche a 1  $\text{mg L}^{-1}$  per 6 gg. Gli autori hanno inoltre rilevato che, con l'esposizione, aumentano sia il numero che le dimensioni dei CGPs, come risposta allo stress.

Prasad et al (2008) hanno utilizzato *Bacillus anthracis* in un test di tossicità, concludendo che tali organismi possono essere inattivati se, nell'acqua, viene disperso del nTiO<sub>2</sub> (solo rutile;  $\emptyset = 70$  nm) ed il tutto subisce un trattamento ai **raggi UV-A**. Il 52% dei batteri sembra inattivarsi entro i primi 50 minuti.

Con lo stesso organismo hanno lavorato anche Adams et al (2006) che hanno utilizzato *B. anthracis* in un test di tossicità in cui i batteri sono stati esposti a differenti concentrazioni di ENP ( $\emptyset = 66$  nm) per valutarne le rispettive % di inibizione. Gli autori non sono ricorsi, però, all'ausilio dei raggi UV. Ne è risultato: 0% a 50 ppm, 0% a 100 ppm; 0% a 500 ppm, 75% a 1000 ppm e 99% a 2000 ppm.

*Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* sono stati oggetto di studio da parte di Warheit et al (2007), i quali hanno valutato gli effetti delle ENP, considerando come endpoint l'induzione di **mutazioni genetiche** (Bacterial Reverse Mutation Test). L'aggiunta di nTiO<sub>2</sub> ( $\emptyset = 140$  nm) fino a 5000  $\mu\text{g}$  per ogni piastra di coltura non ha fatto evidenziare alcun effetto di mutagenesi.

Anche Ivask et al (2010) hanno utilizzato delle colture di *E. coli* per allestire dei test ecotossicologici, affiancando a colture naturali (wild type WT) delle colture geneticamente modificate, mancanti dell'enzima superossido dismutasi (SOD). Lo scopo era quello di testare la **capacità di generare ROS** da parte del TiO<sub>2</sub> e il test, infatti, si proponeva di valutare la differenza di tossicità tra nTiO<sub>2</sub> (50 – 70 nm; area superficiale = 24,8  $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ ) e TiO<sub>2</sub> bulk (area superficiale = 8,5  $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ ), attraverso la riduzione della bioluminescenza degli organismi. I risultati, espressi come EC50 a 30 min e a 2 h, hanno evidenziato che non sono insorti effetti

negativi per i batteri, sia per quelli geneticamente modificati, sia per i WT (EC50 a 30 min e a 2 h sempre  $> 20000 \text{ mg L}^{-1}$ ). Questo sia per le ENP che per il  $\text{TiO}_2$  bulk.

Kumar et al (2011a) hanno allestito un test di **assunzione** delle ENP (50 nm) con *E. coli* e *Salmonella typhimurium*, esponendoli a concentrazioni di 0,008, 0,08, 0,8 e  $8 \text{ mg L}^{-1}$  per 1 h, sia in presenza che in assenza di estratto di fegato di ratto S9. Ne è emerso un aumento dose-dipendente della **granularità interna** degli individui, associata all'assunzione delle ENP, che è leggermente maggiore in presenza di S9 ma, comunque, senza nessuna conseguenza citotossica (figg. 6.1 a) e b)).

Fang et al (2010) hanno testato la sensibilità di *Nitrosomonas europaea* utilizzando due ENP di anatasio a **granulometria diversa** ovvero 25 nm e 200 nm. Dopo 4 h di esposizione alle concentrazioni di 20 e 200 ppm, si è notato che i batteri manifestavano una forma distorta ed irregolare ed anche la formazione di cavità interne al corpo cellulare (figg. 6.2 a) e b)). Tendenzialmente, la granulometria più fine ha fatto registrare dei danni maggiori alla membrana cellulare rispetto alla forma a 200 nm, convalidando l'idea generale che i materiali **più fini** siano **più pericolosi** di quelli grossolani.

L'efficacia antibatterica di pellicole al  $\text{nTiO}_2$  è stata testata da Amezaga-Madrid et al (2009) grazie al batterio *Pseudomonas aeruginosa*. Come nel caso di Prasad et al (2008), gli autori hanno adoperato i **raggi UV** (365 nm) per attivare le ENP. I risultati mostravano le percentuali di inibizione della crescita cellulare correlate al tempo di irradiazione delle pellicole: 60 - 72%; 38 - 49%; 32% e 59 - 69% rispettivamente per 40, 80, 120 e 240 min.

Un test analogo è stato condotto anche da Feschet-Cassot et al (2011) che, avvalendosi di *Tetrahymena pyriformis*, hanno valutato il potenziale antibatterico di **foglietti** e di **nanotubi** di  $\text{nTiO}_2$ , con e senza esposizione ai raggi UV (350 – 400 nm), mediante test di inibizione della crescita cellulare e di riduzione dell'attività enzimatica. I risultati hanno evidenziato che, nel caso dei nanotubi, non c'era inibizione della crescita cellulare per i batteri, mentre sui foglietti, indipendentemente dal trattamento con UV, si sono visti solamente dei leggeri effetti. L'attività enzimatica, invece, nei foglietti risultava ridotta del 60% e del 50%, rispettivamente, con e senza UV mentre nei nanotubi le riduzioni erano pari a circa 30 % e 35%, rispettivamente, con e senza UV. In questo caso, quindi, la tossicità rilevata non sembra legata alla presenza di radiazione UV.

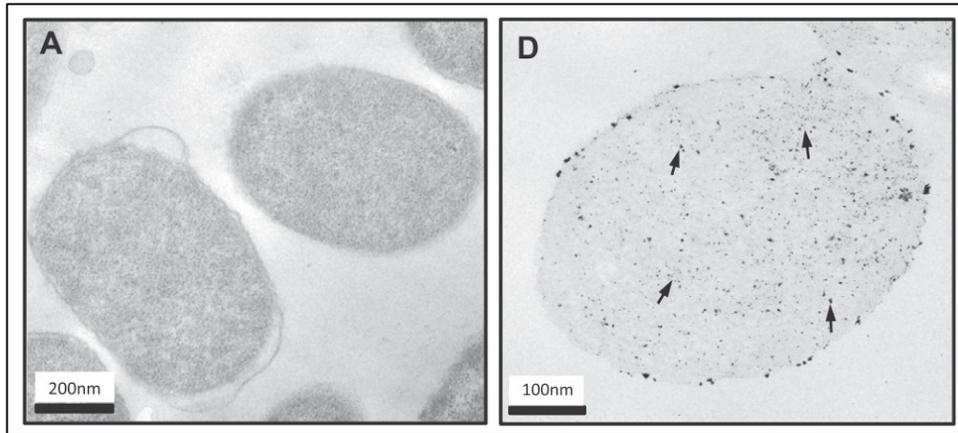


Figura 6.1 a) e b) – Cellule di *S. typhimurium*: confronto tra il controllo negativo (A) e l'esposizione al nTiO<sub>2</sub> per 1 h (D). In evidenza le ENP internalizzate dalla cellula (freccie nere) (Kumar et al, 2011).

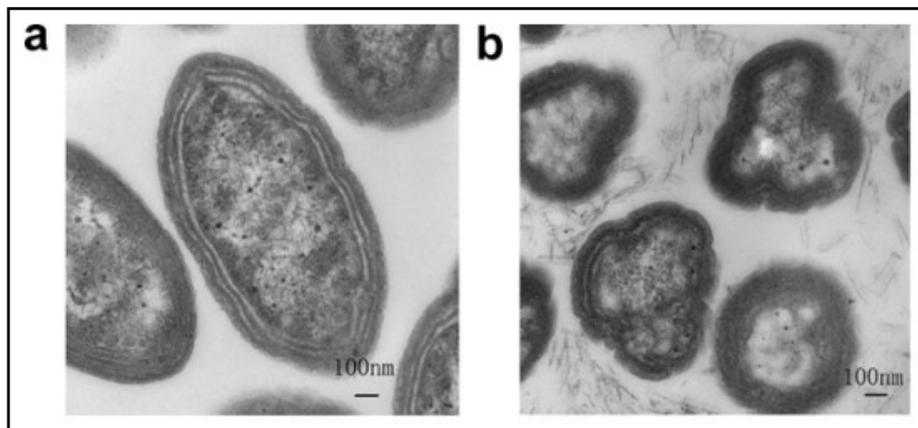


Figura 6.2 a) e b) – Confronto tra cellule di *N. europaea* del controllo negativo (a) e quelle esposte per 4 h a 20 ppm di anatase 25 nm (b). In evidenza la forma distorta ed irregolare di queste ultime (Fang et al, 2010).

### Acqua salata

Praticamente, l'unico batterio di acqua salata ad oggi utilizzato per i test di tossicità con il nTiO<sub>2</sub> risulta essere *Vibrio fischeri*.

Heinlaan et al (2007) hanno testato gli effetti tossici del nTiO<sub>2</sub> (25 - 70 nm) verso *V. fischeri* fino ad una concentrazione massima di 20 g L<sup>-1</sup>. Nonostante l'ingente quantità impiegata, il batterio non ha manifestato effetti avversi (EC50 a 30 min > 20000 mg L<sup>-1</sup>).

Anche Blaise et al (2008) e Velzeboer et al (2008) concordano sulla non tossicità del nTiO<sub>2</sub> (<100 nm e <40 nm, rispettivamente), avendo ricavato, dai rispettivi esperimenti, un valore di EC50 > 100 mg L<sup>-1</sup>.

Alle stesse conclusioni sono giunti pure Strigul et al (2009), che sullo stesso batterio hanno testato il nTiO<sub>2</sub> (6 nm) tra 0 e 120 mg L<sup>-1</sup>, senza ottenere alcun risultato.

Le evidenze sopra esposte sono discordanti, invece, da quelle proposte da Lee et al (2008), i quali hanno allestito un test Microtox® (cfr. par. 8.1) che ha mostrato un'inibizione della

bioluminescenza di 5,84% e 72,3% rispettivamente per 62,5 e 1000 mg L<sup>-1</sup> ed una EC50 di 739 mg L<sup>-1</sup>. In questo test, però, il nTiO<sub>2</sub> derivava dal TiCl<sub>4</sub> che viene utilizzato come **flocculante** nelle acque di scarico degli impianti di depurazione e, forse, proprio la differente tipologia del materiale potrebbe essere all'origine delle diversità sperimentali osservate.

## PROTOZOI E BATTERI

Specie	Matrice	Produttore TiO <sub>2</sub> ; Fasi cristallochimiche; Percentuale	Diametro dichiarato	Diametro Misurato	Tecnica Analitica	Tecnica Dispersione	Conc Nominale	Conc Reale	Tecnica Analitica	Rif. bibliografico
<i>Anabaena variabilis</i>	acqua dolce	NanoStructured & Amorphous Materials, Houston TX; A	10 nm	192 nm (aggl.)	DLS	Sonicazione per 20 min a 90 W nel mezzo di crescita	X			Cherchi et al, 2010
<i>Bacillus anthracis</i>	acqua dolce	Sigma-Aldrich, USA; A+R, solo R	70 nm; 40 nm			n.d.	X			Prasad et al, 2008
<i>Bacillus subtilis</i> ; <i>Escherichia coli</i>	acqua dolce	Sigma-Aldrich, USA; A+R	66 nm, 950 nm (aggl.)	175-810 nm (aggl.), 240-460 (aggl.), 1000 (aggl.)	DLS, microscopia elettronica	Agitazione in acqua ultrapura	X			Adams et al, 2006
<i>Colibacillus</i>	acqua dolce	n.d.	7-8 nm, 25-50 nm			impasto con pellet di ceramica	X			Yao et al, 2009
<i>Escherichia coli</i>	acqua dolce	Degussa; A(80%) + R(20%) (P25)		79 nm	DLS	Ultrasuoni in acqua ultrapura	X			Brunet et al, 2009
<i>Escherichia coli</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i>	acqua dolce	TiO <sub>2</sub> al 7% in vol nella pittura					X			Hochmannova and Vytrasova, 2010
<i>Escherichia coli</i> ; <i>Salmonella typhimurium</i>	acqua dolce	Degussa; R100%; A(80%) + R(20%) (P25)		136 nm (aggl.); 140 nm (aggl.)	DLS	Agitazione in acqua ultrapura	X			Warheit et al, 2007
<i>Escherichia coli</i>	acqua dolce	Sigma-Aldrich	50-70 nm			Bagno ad ultrasuoni per 30 min in MilliQ	X			Ivask et al, 2010
<i>Nitrosomonas europaea</i>	acqua dolce	Sigma-Aldrich	25nm, 200 nm (aggl.)	25nm, 200 nm (aggl.)	TEM		X			Fang et al, 2010

Specie	Matrice	Produttore TiO <sub>2</sub> ; Fasi cristallochimiche; Percentuale	Diametro dichiarato	Diametro Misurato	Tecnica Analitica	Tecnica Dispersione	Conc Nominale	Conc Reale	Tecnica Analitica	Rif. bibliografico
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	acqua dolce	Film di TiO <sub>2</sub> preparato a partire da TiCl <sub>4</sub>		spessore strato 98 nm e 192 nm	TEM					Amezaga-Madrid et al, 2003
<i>Salmonella typhimurium</i> ; <i>Escherichia coli</i>	acqua dolce	Sigma-Chemical, A(97%)		124 nm (aggl.); 50 nm	DLS; TEM	Sonicazione per 10 min a 30 W in MilliQ	X			Kumar et al, 2011a
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	acqua dolce	Good Fellow, fogli di TiO <sub>2</sub> 99,6%								Feschet-Chassot et al, 2011
<i>Vibrio fischeri</i>	acqua salata	Sigma-Aldrich	25-70 nm			Sonicazione per 30 min in MilliQ	X			Heinlaan et al, 2007
<i>Vibrio fischeri</i>	acqua salata	Aggiunto TiCl <sub>4</sub> come flocculante a fanghi di scarico					X			Lee et al, 2008
<i>Vibrio fischeri</i>	acqua salata	Sigma-Aldrich, 99,9%	<100 nm			75 mg diluiti in 150 mL di ASTM, poi filtrati a 0,22 µm; nel filtraggio si è perso il 54% delle ENP	X			Blaise et al, 2008
<i>Vibrio fischeri</i>	acqua salata	Preparato da idrolisi di solfato di Ti	6 nm			Sonicazione per 30 min in D.I. (Microtox)	X			Strigul et al, 2009
<i>Vibrio fischeri</i>	acqua salata	Sigma-Aldrich	<40 nm	0,5-70 µm (aggl.)	AFM, raggi X			X	ICP-MS, Spettrofotometro UV, Citometro a flusso	Velzeboer et al, 2008

Tabella 6.3 – Riassunto delle condizioni sperimentali utilizzate dai diversi autori nei rispettivi lavori con il nTiO<sub>2</sub> ed i batteri. A = anatasio; R = rutilo; aggl. = agglomerati; D.I. = Deionized.

### 6.2.2 Test con funghi e lieviti

Sono pochi gli studi effettuati su questi organismi esposti al nTiO<sub>2</sub>. Kasemets et al (2009) hanno esposto una coltura di *Saccharomyces cerevisiae* ad un intervallo di ENP compreso tra 625 e 20000 mg L<sup>-1</sup> (granulometria 25 - 70 nm). Misurando l'inibizione della crescita cellulare si è rilevato come il nTiO<sub>2</sub> non sia tossico per i lieviti, ottenendo una EC50 sia a 8 h che a 24 h > 20000 mg L<sup>-1</sup>. L'ipotesi degli autori è che, sia i lieviti che i batteri, siano immuni agli effetti delle ENP grazie alla presenza della rigida **parete cellulare**, diversamente da quanto accade per i protisti ed i metazoi, i quali hanno sviluppato dei buoni sistemi di **internalizzazione** di particelle alla micro e nano scala (cfr. par 10.2.2).

Diverso è lo studio di Hochmannova and Vytrasova (2010), i quali, con *Aspergillus niger* e *Penicillium chrysogenum*, hanno verificato il potere fungicida di una **pittura** contenente nTiO<sub>2</sub> (20 - 30 nm) fino al 5% in volume. I risultati erano abbastanza lampanti: l'inibizione della crescita cellulare, per 1,25% di ENP in volume, è superiore al 70% ed all'80% rispettivamente per *A. niger* e *P. chrysogenum*, e si porta al 100%, per entrambe le specie, se la pittura contiene il 5% di ENP in volume (fig. 6.4).

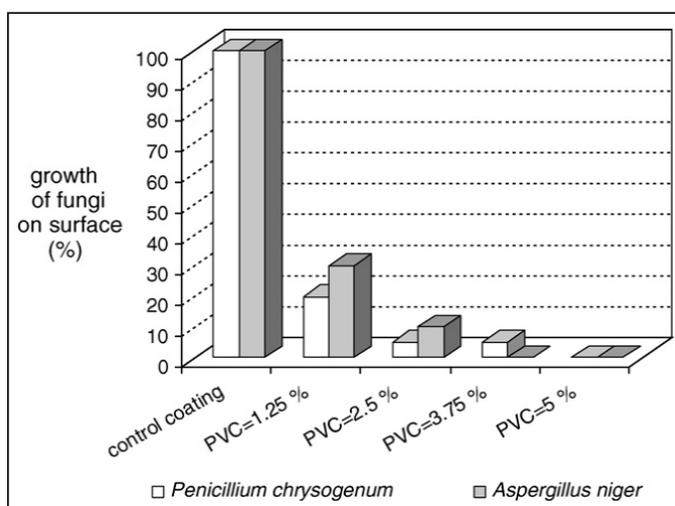


Figura 6.4 - Effetto antimicrobico delle pitture al nTiO<sub>2</sub> su *P. chrysogenum* e *A. niger*. PVC = Pigment Volume Concentration (Hochmannova and Vytrasova, 2010).

## FUNGHI E LIEVITI

Specie	Matrice	Produttore TiO <sub>2</sub> ; Fasi cristallochimiche; e Percentuale	Diametro dichiarato	Diametro Misurato	Tecnica Analitica	Tecnica Dispersione	Conc Nominale	Conc Reale	Tecnica Analitica	Rif. bibliografico
<i>Aspergillus niger</i> ; <i>Penicillium chrysogenum</i>	acqua dolce	TiO <sub>2</sub> al 7% in volume nella pittura					X			Hochmannova and Vytrasova, 2010
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	acqua dolce	Sigma-Aldrich	25-70 nm			Sonicazione per 30 min in MilliQ	X			Kasemets et al, 2009

Tabella 6.5 – Riassunto delle condizioni sperimentali utilizzate dai diversi autori nei rispettivi lavori con il nTiO<sub>2</sub> su funghi e lieviti.

### 6.2.3 Test con le alghe

#### Acqua dolce

*Chlamydomonas reinhardtii* è l'alga unicellulare utilizzata da Wang J. et al (2008) per analizzare gli effetti dovuti all'esposizione al nTiO<sub>2</sub> (21 nm) in un intervallo compreso tra 0,01 e 100 mg L<sup>-1</sup>. Il test di inibizione della crescita cellulare ha fornito risultati apprezzabili a partire dal 2° giorno, per una concentrazione di 10 mg L<sup>-1</sup> mentre, il 3° giorno, la crescita cellulare è risultata completamente inibita (fig. 6.6). L'EC50 calcolata a 72 h era di 10 mg L<sup>-1</sup>. Inoltre si è manifestata la perossidazione lipidica della membrana cellulare e l'incremento della trascrizione di geni tipici delle condizioni di stress.

Ji et al (2011), invece, hanno lavorato con *Chlorella sp.*, testando l'esposizione alle ENP (5 - 10 nm; 50 nm) per 6 giorni, fino ad una concentrazione massima di 1000 mg L<sup>-1</sup>. I risultati mostrano praticamente la non tossicità nei confronti degli organismi, visto che, la sopravvivenza, al 6° giorno ed alla massima concentrazione, era del 70,5%.

Lo stesso genere è stato utilizzato anche da Sadiq et al (2011), per un test di inibizione della crescita algale. Le concentrazioni di ENP (< 25 nm) impiegate erano comprese tra 3 e 192 mg L<sup>-1</sup>. I risultati si discostavano da quanto osservato da Ji et al, poiché ne è risultato una EC50, calcolata a 72 h di esposizione, pari a 16,12 mg L<sup>-1</sup> ed una NOEC, a 72 h, pari a 0,89 mg L<sup>-1</sup>. Sadiq et al (2011) hanno inoltre allestito un test, nelle medesime condizioni di esposizione, anche con il genere *Scenedesmus sp.*, ricavandone una EC50 ed una NOEC a 72 h rispettivamente pari a 21,2 mg L<sup>-1</sup> e 1,2 mg L<sup>-1</sup>.

Hunde-Rinke and Simon (2008) hanno testato la tossicità del nTiO<sub>2</sub> su *Desmodesmus subspicatus*, con un test di inibizione della crescita cellulare a 72 h, a sua volta misurata attraverso la rilevazione della fluorescenza. Le concentrazioni utilizzate erano di 12,5, 25 e 50 mg L<sup>-1</sup> ed i prodotti utilizzati erano di due diametri differenti, ovvero, 25 e 100 nm. Inoltre le ENP di TiO<sub>2</sub> sono state somministrate sia **tal quali**, sia **ripulite** mediante trattamento in acqua deionizzata e successiva disidratazione. I risultati indicano una **tossicità maggiore** per il nTiO<sub>2</sub> con **diametro minore** (25 nm), per il quale sono stati calcolati una EC50 di 44 (30 – 94) mg L<sup>-1</sup> e di 32 (20 – 82) mg L<sup>-1</sup>, rispettivamente, per le ENP tal quali e per quelle ripulite. Diversamente, le ENP più grossolane (100 nm) quasi non mostrano tossicità e non è stato possibile calcolare l'EC50 (fig. 6.7).

Velzeboer et al (2008) hanno testato il nTiO<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, Ø < 100 nm) sull'alga unicellulare *Pseudokirchneriella subcapitata* valutando, come endpoint, la misura dell'**efficienza** della **clorofilla a**, attraverso misure fluorimetriche, con l'ausilio della tecnica

PAM (Pulse Amplitude Modulation). Ne è risultato che un'esposizione dell'alga per 4 – 5 h alle ENP non ha praticamente effetto sulla capacità fotosintetica ( $LC_{50} > 100 \text{ mg L}^{-1}$ ).

Aruoja et al (2009), invece, dal loro test di inibizione della crescita cellulare a 72 h ( $nTiO_2$  Sigma-Aldrich, 25 - 70 nm) con *P. subcapitata*, hanno ricavato un valore di  $EC_{50}$  pari a 5,83 (3,75 - 7,58)  $\text{mg L}^{-1}$  ed una  $NOEC = 0,984$  (0,263 - 1,74)  $\text{mg L}^{-1}$ .

Infine, si vuol citare lo studio di Warheit et al (2007) che, sempre con *P. subcapitata*, hanno utilizzato due diversi tipi di NP di Ti: P25 della Degussa Corporation (80% anatasio, 20% rutilo e  $\varnothing$  medio di 129,4 nm) e  $nTiO_2$  della DuPont Company (100% rutilo e  $\varnothing$  medio di 380 nm). L' $EC_{50}$ , calcolata a 72 h, è risultato essere, rispettivamente, 21 (16 - 26)  $\text{mg L}^{-1}$  e 16 (12 - 22)  $\text{mg L}^{-1}$ .

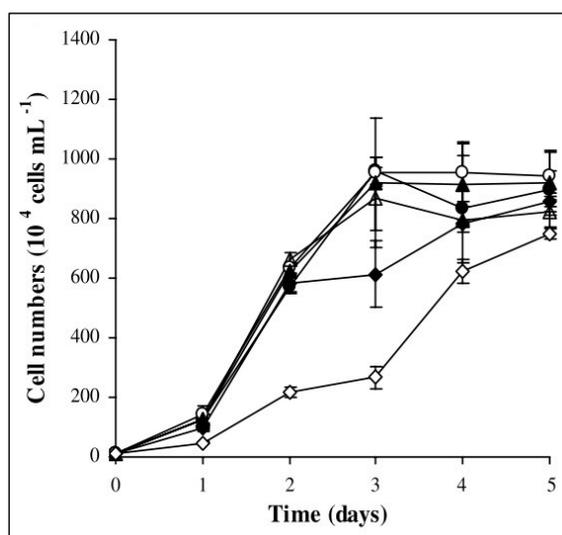


Figura 6.6 – Effetti nel tempo del  $nTiO_2$  sulla crescita cellulare di *P. subcapitata*. ● = controllo; ○ = 0,01  $\text{mg L}^{-1}$ ; ▲ = 0,1  $\text{mg L}^{-1}$ ; Δ = 1  $\text{mg L}^{-1}$ ; ◆ = 10  $\text{mg L}^{-1}$ ; ◇ = 100  $\text{mg L}^{-1}$  (Wang J. et al, 2008).

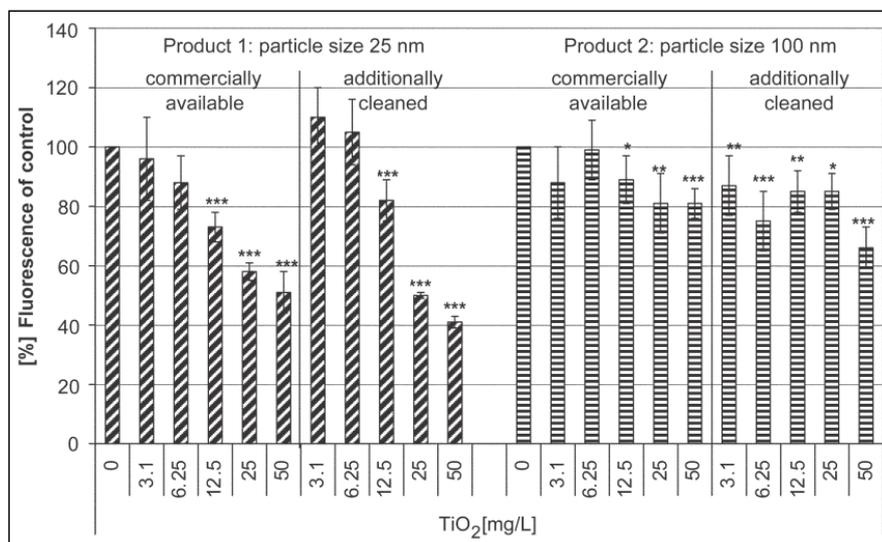


Figura 6.7 – Effetti sulla fluorescenza dell'alga *D. subspicatus* di 2 tipi di  $nTiO_2$  (25 e 100 nm), utilizzate sia tal quali che ripulite. \*  $0.05 \geq p > 0.01$ ; \*\*  $0.01 \geq p > 0.001$ ; \*\*\*  $p \geq 0.001$  (Hund-Rinke and Simon, 2008).

### Acqua salata

Ad oggi, vi è un solo articolo pubblicato che parli di effetti del nTiO<sub>2</sub> sulle alghe marine ed è quello di Miller et al (2010). Gli autori hanno testato le ENP (15 – 20 nm) alla concentrazione di 0, 10, 100, 500 e 1000 µg L<sup>-1</sup>, impiegando colture di *Dunaliella tertiolecta*, *Isochrysis galbana*, *Skeletonema marinoi* e *Thalassiosira pseudonana*. Il test di inibizione della crescita cellulare è durato 96 h e prevedeva controlli ogni 24 h. Nessun effetto tossico è emerso dai test e, stando a quanto ipotizzato dagli autori, ciò è dovuto al fatto che le ENP di TiO<sub>2</sub> sono **insolubili** in acqua.

## ALGHE

Specie	Matrice	Produttore TiO <sub>2</sub> ; Fasi cristallochimiche; Percentuale	Diametro dichiarato	Diametro Misurato	Tecnica Analitica	Tecnica Dispersione	Conc Nominale	Conc Reale	Tecnica Analitica	Rif. bibliografico
<i>Chlorella sp.</i>	acqua dolce	Zhejiang Hongsheng Material Technology Co., China; A(100%); R(100%)	5-10 nm; 50 nm	600 nm (aggl.)	DLS	Sonicazione per 30 min a 100 W in acqua deionizzata	X			Ji et al, 2010
<i>Chlorella sp.</i> ; <i>Scenedesmus sp.</i>	acqua dolce	Sigma-Aldrich; A(100%)	< 25 nm	10-20 nm	TEM	Sonicazione per 30 min a 750 W in medium algale	X			Sadiq et al, 2011
<i>Desmodesmus suspiciatus</i>	acqua dolce	A(80%); A(100%)	25 nm; 10 nm			Ultrasuoni in medium algale; stirring in acqua deionizzata	X			Hund-Rinke & Simon, 2006
<i>Dunaliella tertiolecta</i> ; <i>Isochrysis galbana</i> ; <i>Skeletonema marinoi</i> ; <i>Thalassiosira pseudonana</i>	acqua salata	Degussa Evonik; A(81%) + R(19%)	15-20 nm			Sonicazione per 60 sec in acqua marina naturale	X			Miller et al, 2010
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	acqua dolce	Sigma-Aldrich, 99,9%	<100 nm			75 mg diluiti in 150 mL di ASTM, poi filtrati a 0,22 µm; nel filtraggio si è perso il 54% delle ENP	X			Blaise et al, 2008

Specie	Matrice	Produttore TiO <sub>2</sub> ; Fasi cristallochimiche; Percentuale	Diametro dichiarato	Diametro Misurato	Tecnica Analitica	Tecnica Dispersione	Conc Nominale	Conc Reale	Tecnica Analitica	Rif. bibliografico
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	acqua dolce	Sigma-Aldrich	25-70 nm			Ultrasuoni per 30 min nel medium algale	X			Aruoja et al, 2009
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	acqua dolce	Degussa; R100%; A(80%) + R(20%) (P25)		136 nm; 139 nm; 140 nm (aggl.)	DLS	Agitazione in acqua ultrapura	X			Warheit et al, 2007
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	acqua dolce	Degussa; A(80%) + R(20%) (P25)	30 nm	20,5 nm	SEM	Stirring per 48 h in hard water	X			Griffit et al, 2008
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	acqua dolce	Sigma-Aldrich	<40 nm	0,5-70 µm	AFM, raggi X			X	ICP-MS, Spettrofotometro UV, Citometro a flusso	Velzeboer et al, 2008

Tabella 6.8 – Riassunto delle condizioni sperimentali utilizzate dai diversi autori nei rispettivi lavori con il nTiO<sub>2</sub> e le alghe. A = anatasio; R = rutilo; aggl. = agglomerati.

#### 6.2.4 Test coi nematodi

##### Acqua dolce

Wang H. et al (2008) hanno analizzato gli effetti delle ENP di TiO<sub>2</sub> (50 nm) su esemplari di *Caenorhabditis elegans*. I nematodi sono stati esposti per 5 giorni ad un intervallo di concentrazione compreso tra 24 e 167,8 mg L<sup>-1</sup>, valutando come endpoint la lunghezza delle uova, il loro numero ed il numero di schiuse. Ne è risultato che, al crescere della concentrazione della ENP utilizzata, la lunghezza delle uova si è ridotta da 1126 µm a 740 µm, il numero delle uova è diminuito da 11 a 0 e il numero di schiuse è passato da 28 a 0. Per quanto riguarda l'endpoint di mortalità, il valore di LC50 a 24 h è risultato pari a 79,9 mg L<sup>-1</sup>.

La stessa specie è stata oggetto di studio anche da parte di Roh et al (2010), che hanno valutato gli effetti del nTiO<sub>2</sub> (7 e 20 nm) alla concentrazione costante di 1 mg L<sup>-1</sup> basandosi sugli endpoint di crescita, fertilità e sopravvivenza, nonché sull'espressione genica di *cyp35a2*, un gene di risposta allo stress. Dopo un'esposizione di 24 h è risultato evidente l'aumento dell'espressione del gene indagato e, secondo gli autori, collegata a questo, c'è stata la manifestazione delle altre risposte: la crescita ha subito una riduzione del 9%, la fertilità del 21% e la sopravvivenza si è ridotta del 20% e 30%.

## NEMATODI

Specie	Matrice	Produttore TiO <sub>2</sub> ; Fasi cristallochimiche; Percentuale	Diametro dichiarato	Diametro Misurato	Tecnica Analitica	Tecnica Dispersione	Conc Nominale	Conc Reale	Tecnica Analitica	Rif. bibliografico
<i>Caenorhabditis elegans</i>	sedimento (acqua dolce)	Hongchen Material, A(100%)		50 nm	TEM	Sonicazione per 30 min a 100 W in acqua ultrapura	X			Wang et al, 2008
<i>Caenorhabditis elegans</i>	sedimento (acqua dolce)	Sigma-Aldrich		7-10 nm	TEM	Sonicazione per 20 min nel medium	X			Roh et al, 2010

Tabella 6.9 – Riassunto delle condizioni sperimentali utilizzate dai diversi autori nei rispettivi lavori con il nTiO<sub>2</sub> ed i nematodi. A = anatasio.

### 6.2.5 Test con gli anellidi

#### Suolo e sedimento di acqua dolce

*Eisenia fetida* è stata utilizzata da Heckmann et al (2011) per la determinazione degli effetti di tossicità del nTiO<sub>2</sub> (21,4 nm), somministrato nel suolo in cui viveva l'animale, in ragione di 1000 mg kg<sup>-1</sup>. A 28 giorni dall'inizio del test, non sono stati rilevati effetti sulla sopravvivenza ma sono risultati ridotti, rispetto al controllo, la produzione di sacche ovigere (80,4%), il tasso di schiusa (74,6%) e la produzione di iuvenili (50,7%).

Con la stessa specie Hu et al (2010) hanno testato gli effetti delle ENP di nTiO<sub>2</sub> (10 - 20 nm) con un test di tossicità protrattosi 7 giorni. L'esposizione, attraverso il suolo contaminato, è stata di 0,1, 0,5, 1 e 5 mg kg<sup>-1</sup>. Gli individui esposti alla massima concentrazione hanno mostrato un accumulo di ENP al loro interno pari a 8 volte la concentrazione presente nel suolo. Inoltre, si sono osservati danni significativi al DNA, crescenti all'aumentare della concentrazione di ENP da 1 a 5 mg kg<sup>-1</sup> e manifestazione di danni ai mitocondri.

Cañas et al (2011) hanno esposto esemplari adulti di *E. fetida* al nTiO<sub>2</sub> (32 nm) per 14 gg, sia su carta da filtro che nella sabbia. Le concentrazioni utilizzate erano di 0,1, 1, 10 100, 1000, 5000 e 10000 mg kg<sup>-1</sup>. La mortalità su carta da filtro è stata contenuta (max = 40%), mentre nella sabbia ci sono stati due picchi (100%) a 100 e 1000 mg kg<sup>-1</sup>; in entrambi i casi, comunque, tale mortalità non era significativamente correlata con l'aumento delle concentrazioni di ENP. La produzione di sacche ovigere, valutata solo nella sabbia, ha subito una riduzione proporzionale alla concentrazione di ENP impiegata. Non si sono rilevati cambiamenti nel peso degli individui dopo l'esposizione alle ENP.

Più articolato è stato lo studio di Lapied et al (2011) su *Lumbriculus terrestris*. Il disegno sperimentale ha previsto **3 differenti scenari espositivi**:

- a) esposizione in acqua per 7 gg a 1, 10 e 100 mg L<sup>-1</sup> di ENP
- b) esposizione tramite cibo a concentrazioni di ENP pari a 10 e 100 mg·kg cibo secco<sup>-1</sup>; gli animali sono stati alimentati solo inizialmente, dopodichè l'alimentazione è stata interrotta e i lombrichi sono stati analizzati dopo 4 e 8 settimane;
- c) esposizione per 4 settimane tramite cibo a concentrazioni di ENP pari a 10 e 100 mg·kg cibo secco<sup>-1</sup>, in un suolo contenente 15 mg kg<sup>-1</sup> di ENP.

La particella utilizzata consisteva in un nucleo di TiO<sub>2</sub> (c.a 50%) rivestito di strati di Al(OH)<sub>3</sub> (c.a 3,5%) e PoliDiMetilSilossano (PDMS). Le dimensioni variavano in un intervallo compreso tra 100 e 300 nm. L'endpoint considerato è stato l'apoptosi di cellule in 5 tessuti: cuticolare, muscolare circolare, muscolare longitudinale, cuticola intestinale e matrice cloragoga. Il principio del metodo Apostain consiste nel colorare la cromatina condensata delle cellule

apoptiche, permettendone la rilevazione (fig. 6.10). I risultati hanno evidenziato che non ci sono stati effetti di mortalità e l'apoptosi si è verificata solamente per l'esposizione in acqua a 100 mg L<sup>-1</sup> di ENP. Gli autori convengono che l'esposizione attraverso il suolo sia, in generale, meno diretta e che anche l'esposizione attraverso il cibo possa risultare meno indicativa poiché inficiata dal gusto probabilmente meno appetibile delle ENP.

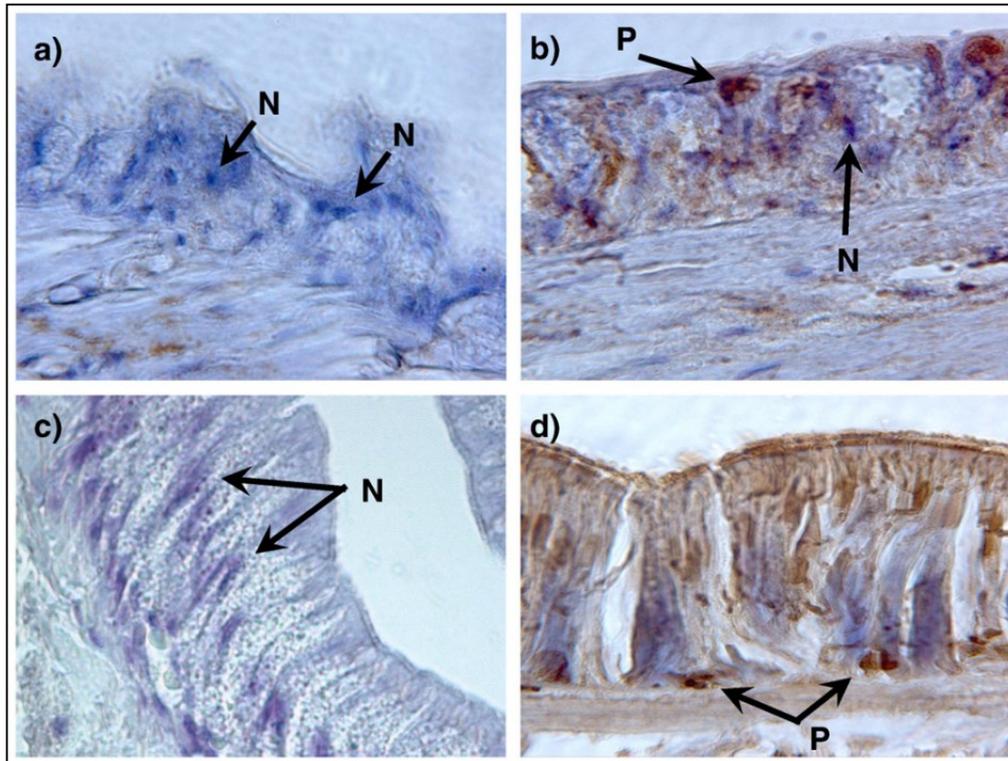


Figura 6.10 – Immagini al microscopio elettronico di *L. terrestris* esposto a 0 (a e c) e 100 (b e d) mg L<sup>-1</sup> di nTiO<sub>2</sub>, in acqua per 7 gg. In evidenza la cuticola (a e b) e l'epitelio intestinale (c e d). Le frecce indicano il responso apoptico negativo (N) e positivo (P).

#### Acqua salata (sedimento)

Ad oggi esiste un unico studio sugli effetti del nTiO<sub>2</sub> su anellidi di acqua salata e verte sull'*Arenicola marina* (Galloway et al., 2010). Le ENP (23 nm) sono state somministrate al polichete marino attraverso il sedimento (1000 – 3000 mg kg<sup>-1</sup>) e l'esposizione è avvenuta per 10 giorni. Non si sono osservati effetti sulla capacità di infossamento ma nei celomociti è stata verificata una significativa riduzione della stabilità della membrana lisosomiale. Inoltre, si è notata la formazione di **aggregati > 200 nm** intorno ai **villi intestinali** degli individui esposti (fig. 6.11).

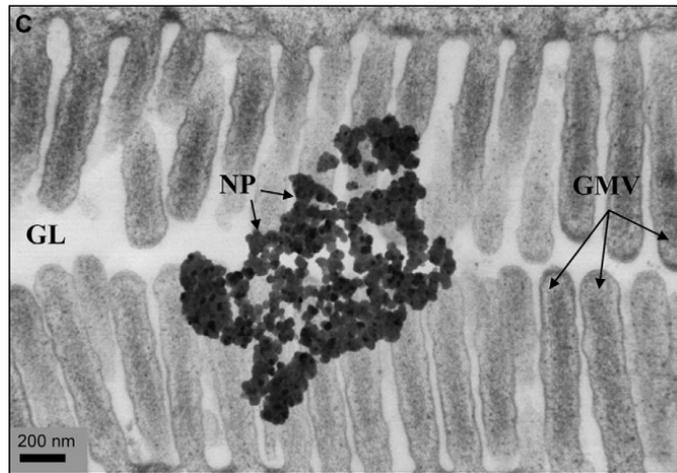


Figura 6.11 – Formazione di aggregati di NP > 200 nm tra i microvilli (GMV) ed il lume intestinale (GL) in individui di *A. marina* (Galloway et al, 2010).

## ANELLIDI

Specie	Matrice	Produttore TiO <sub>2</sub> ; Fasi cristallografiche; Percentuale	Diametro dichiarato	Diametro Misurato	Tecnica Analitica	Tecnica Dispersione	Conc Nominale	Conc Reale	Tecnica Analitica	Rif. bibliografico
<i>Arenicola marina</i>	sedimento (acqua salata)	Sigma-Aldrich		32,4 nm	TEM	Bagno ad ultrasuoni per 30 min in 200 mL di MilliQ	X			Galloway et al, 2010
<i>Eisenia fetida</i>	suolo	Aipurui Co. Ltd. Nanjing, China; R(100%)		10-20 nm	TEM	Spargimento sul suolo	X			Hu et al, 2010
<i>Eisenia fetida</i>	suolo	A(73%) + R(27%)	21 nm	30 nm, 282 nm	TEM, DLS	Sonicazione per 20 min in acqua deionizzata	X			Heckmann et al, 2011
<i>Eisenia fetida</i>	suolo	Alfa-Aesar	32 nm		SEM	Sonicazione 5 sec e 1,5 min	X			Cañas et al, 2011
<i>Lumbricus terrestris</i>	suolo	Basf, Germany; Tlite	100-300 nm (aggl.)				X			Lapied et al, 2011

Tabella 6.12 – Riassunto delle condizioni sperimentali utilizzate dai diversi autori nei rispettivi lavori con il nTiO<sub>2</sub> e gli anellidi. A = anatasio; R = rutilo.

## 6.2.6 Test con i molluschi

### Acqua salata

Contrariamente a quanto si verifica per gli altri gruppi, nel caso dei molluschi, gli studi esistenti, limitatamente agli effetti del nTiO<sub>2</sub>, vertono esclusivamente sulle specie marine.

*Mytilus galloprovincialis* è la specie impiegata da Canesi et al (2009) per la valutazione *in vitro* di effetti avversi delle ENP di nTiO<sub>2</sub> (22 nm). Gli autori hanno esposto l'emolinfa dei molluschi a 1, 5 e 10 mg L<sup>-1</sup> per un tempo compreso tra 30 min e 4 h, valutando, successivamente, la stabilità della membrana lisosomiale (LMS) negli emociti, il rilascio di enzimi lisosomiali, la produzione di ossiradicali extracellulari e la produzione di nitriti. I risultati evidenziano che non c'è stata la diminuzione della LMS ma un aumento concentrazione-dipendente dell'attività extracellulare di lisozima a partire da 30 min di esposizione, così come è aumentata la produzione di ROS extracellulare, divenuta 3 volte maggiore rispetto al controllo per 5 mg L<sup>-1</sup>. Alla massima concentrazione (10 mg L<sup>-1</sup>), dopo 2 h di esposizione, è stato registrato, inoltre, un forte aumento dell'accumulo di nitriti, che sono cresciuti da 0,4 a 14,6 nmol·mg proteine<sup>-1</sup>. Infine, alla concentrazione di 10 mg L<sup>-1</sup> è stato registrato un forte aumento della fosforilazione del *p-38 MAPK*, una proteina che si attiva in caso di stress. L'aumento è stato molto rapido (dopo 5 min di esposizione) ed era concentrazione-dipendente.

Gli stessi autori hanno impiegato *M. galloprovincialis* anche in un test *in vivo* (Canesi et al, 2010). In questo caso, per la valutazione degli effetti avversi delle ENP di nTiO<sub>2</sub> (22 nm), i molluschi sono stati esposti per 24 h alle concentrazioni di 0,05, 0,2, 1 e 5 mg L<sup>-1</sup>. Negli emociti si è notata una riduzione significativa della LMS, pari al 74% ed al 53% rispettivamente per 1 e 5 mg L<sup>-1</sup>. Nella ghiandola digestiva il decremento della LMS, per 1 e 0,2 mg L<sup>-1</sup>, era pari al 66% e al 54%, rispettivamente. In tale ghiandola, inoltre, rispetto al controllo, l'accumulo di lipofuscina si è rivelato essere di 7 volte e 4 volte maggiore, rispettivamente per concentrazioni di 1 e 5 mg L<sup>-1</sup> e, infine, la risposta enzimatica ha mostrato un aumento dei valori della catalasi del 157% e del 200% rispettivamente per 1 e 5 mg L<sup>-1</sup>. Nel caso delle branchie, invece, non si sono registrati aumenti dell'attività enzimatica.

Zhu et al (2011a) hanno utilizzato il gasteropode *Haliotis diversicolor supertexta*, per effettuare un test acuto di tossicità a 96 h con 0,1, 1 e 10 mg L<sup>-1</sup> di nTiO<sub>2</sub> (< 10 nm). Nell'intervallo esaminato non sono sopraggiunti effetti di mortalità, però alla concentrazione di 1 mg L<sup>-1</sup> si è registrato un aumento dei valori dell'enzima antiossidante SOD (Super Ossido Dismutasi), una diminuzione del valore di GSH (Glutazione) ed un aumento del livello della perossidazione lipidica (LPO); sono aumentati inoltre i valori di ossido di azoto per 1 e 10 mg L<sup>-1</sup>.

Zhu et al (2011b), inoltre, hanno presentato i risultati dell'unico test effettuato su **embrioni** di molluschi. La ENP e la specie erano le stesse del precedente lavoro ma cambiavano le finalità dello studio, in quanto gli autori volevano osservare se la presenza delle ENP ( $2 \text{ mg L}^{-1}$ ) fosse in grado di **aumentare l'assorbimento** del tributilstagno (TBT) e quali fossero gli eventuali conseguenti effetti avversi. Ne è emerso che, in presenza di ENP, dopo un'esposizione di 8 h successiva alla fecondazione, i valori di EC50, relativi al mancato sviluppo delle uova ed alle malformazioni, diminuivano da 46,5 e  $13,4 \text{ ng L}^{-1}$ , rispettivamente, a 2,11 e  $1,87 \text{ ng L}^{-1}$  (diminuivano cioè di 20 e 7 volte); inoltre, l'attività di SOD e GSH diminuiva in presenza del complesso NP-TBT. Nello studio, inoltre, erano state prelevate delle aliquote di embrioni per quantificare l'assunzione di TBT in presenza ed in assenza di ENP. I risultati sono visibili in figura 6.13.

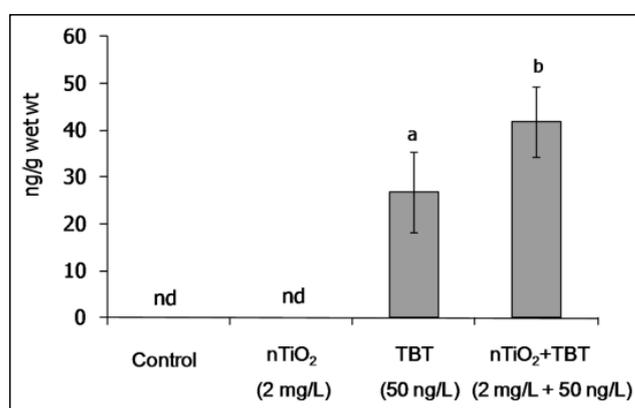


Figura 6.13 – Assunzione di TBT in presenza e assenza di nTiO<sub>2</sub> in embrioni di abalone, misurata 8 h dopo la fertilizzazione. N.d. = not detected (Zhu et al, 2011b).

## MOLLUSCHI

Specie	Matrice	Produttore TiO <sub>2</sub> ; Fasi cristallochimiche; Percentuale	Diametro dichiarato	Diametro Misurato	Tecnica Analitica	Tecnica Dispersione	Conc Nominale	Conc Reale	Tecnica Analitica	Rif. bibliografico
<i>Haliotis diversicolor supertexta</i>	acqua salata	Nanjing High Technology Nano Material Co., Ltd. (China); A(99,5%)	< 10 nm			Sonicazione per 10 min a 50 W in MilliQ	X			Zhu et al, 2011a
<i>Haliotis diversicolor supertexta</i>	acqua salata	Nanjing High Technology Nano Material Co., Ltd. (China); A(99,5%)	< 10 nm			Sonicazione per 10 min a 50 W in MilliQ	X			Zhu et al, 2011b
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	acqua salata	Degussa-Evonik; A(80%) + R(20%) (P25)		22nm (secco); 150-1600 nm (in acqua)	TEM; DLS	Sonicazione in ASW	X			Canesi et al, 2009
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	acqua salata	Degussa-Evonik; A(80%) + R(20%) (P25)		22nm (secco); 150-1600 nm (in acqua)	TEM; DLS	Sonicazione per 15 min a 100 W in ASW	X			Canesi et al, 2010

Tabella 6.14 – Riassunto delle condizioni sperimentali utilizzate dai diversi autori nei rispettivi lavori con il nTiO<sub>2</sub> ed i molluschi. A = anatasio; R = rutilo.

## 6.2.7 Test con gli echinodermi

### Acqua salata

Attualmente c'è solo un lavoro che verte sugli echinodermi ed il nTiO<sub>2</sub> ed è quello di Fairbairn et al (2011) in cui si testano gli effetti delle ENP (27 nm) sugli embrioni del riccio di mare *Lytechinus pictus*. Questi sono stati esposti a 0,5, 1, 5 e 10 mg L<sup>-1</sup> di ENP per un periodo di 96 h successivo alla fecondazione. Gli endpoint valutati erano quelli della mortalità e dell'anormalità nello sviluppo embrionale. Dai risultati è emerso che le ENP impiegate non hanno causato alcun effetto avverso agli organismi.

Produttore TiO <sub>2</sub> Fasi cristallografiche; Percentuale	Diametro dichiarato	Diametro Misurato	Tecnica Analitica	Tecnica Dispersione	Conc Nominale	Conc Reale
Degussa Evonik		27 nm; 194 nm (in acqua)	TEM; DLS	Bagno ad ultrasuoni per 30 min a 100 W in acqua deionizzata	X	

Tabella 6.15 – Riassunto delle condizioni sperimentali utilizzate nel lavoro con gli echinodermi di Fairbairn et al (2011).

## 6.2.8 Test coi crostacei

### Acqua dolce

Griffit et al (2008) hanno impiegato il crostaceo cladocero *Ceriodaphnia dubia* in un test a 48 h in cui si valutava la tossicità del nTiO<sub>2</sub> (30 nm) attraverso l'endpoint della mortalità. Le concentrazioni impiegate erano di 0,36, 0,6, 1,67 e 2,78 volte il valore di LC50, ricavato in precedenti esperienze (non meglio precisato). Sono stati testati sia individui adulti, sia neonati di 24 h. Ne sono risultati valori di LC50, a 48 h, >10 mg L<sup>-1</sup>, in entrambi i casi.

Giovani esemplari della specie *C. dubia* sono stati utilizzati anche da Li et al (2011), in un test che impiegava ENP di c.a 34 nm. I neonati sono stati esposti alle ENP ad una concentrazione compresa tra 10 e 200 mg L<sup>-1</sup> per 48 h, per valutarne gli effetti sulla **crescita**. Altri esemplari di età inferiore a 24 h sono stati esposti ad una concentrazione compresa tra 5 e 100 mg L<sup>-1</sup> per 48 h, per studiarne gli effetti sulla **riproduzione**. I risultati mostrano che le ENP causano un ritardo della crescita, rispetto al controllo (EC50 = 42 mg L<sup>-1</sup>). Per una concentrazione di 50 mg L<sup>-1</sup> la riduzione media della crescita è del 4,2%, mentre la capacità riproduttiva è soppressa del 50%. Inoltre, al microscopio confocale, si è visto che le ENP si attaccavano al carapace ed alle articolazioni, si trovavano nel tratto digestivo, nella camera incubatrice e nell'intestino anche se non riuscivano a superare la parete intestinale (fig. 6.16).

Lee et al (2009) hanno eseguito il test Comet assay per verificare la capacità mutagenica delle ENP (7 – 20 nm) su *Daphnia magna*. A questo scopo hanno esposto le larve del crostaceo a 1 mg L<sup>-1</sup>, non rilevando alcun effetto genotossico.

*Chydorus sphaericus* è un piccolo cladocero bentonico impiegato da Velzeboer et al (2008) in un test di sopravvivenza a 48 h, per testare le ENP di nTiO<sub>2</sub> (< 40 nm). Il valore di LC50, a 48 h, è risultato > 100 mg L<sup>-1</sup>.

*Daphnia magna* ad oggi è senza dubbio il crostaceo più utilizzato per i test col nTiO<sub>2</sub>. Heinlaan et al (2008), lo hanno impiegato in un test di immobilizzazione a 48 h, dal quale non è emerso alcun effetto negativo delle ENP utilizzate (25 – 70 nm), con una EC50 rilevata > 20000 mg L<sup>-1</sup>. I medesimi risultati, nello stesso studio, sono stati ricavati anche con il crostaceo *Thamnocephalus platyurus*, in un test di mortalità a 24 h.

Lovern and Klaper (2006), con *D. magna*, hanno eseguito un test di tossicità acuta a 24 h con ENP, differenziando lo scenario espositivo in questo modo: I) esposizione a 0,2, 1, 2, 5, 6, 8, e 10 ppm di ENP **filtrate** (0,22 µm); II) 50, 200, 250, 300, 400, e 500 ppm **non filtrate**. Nel primo caso (Ø = 30 nm) si è assistito ad una mortalità crescente tra 0,2 e 10 ppm (da 6% a 100%), con una LC50 = 5,5 ppm, una LOEC = 2ppm ed una NOEC = 1 ppm; nel secondo caso (Ø compreso tra 100 e 500 nm), la tossicità è stata più contenuta, con una mortalità massima rilevata = 9%, una LC50, una LOEC ed una NOEC non rilevabili. Questo sembrerebbe costituire una prova ulteriore del fatto che le particelle più **fini** (filtrate) sono anche le più **pericolose**.

Nel loro test di tossicità con *D. magna*, Wiench et al (2009) hanno testato una ENP di TiO<sub>2</sub> (30 nm) e 3 **ENP coated** (T-lite™): SF, SF-S e MAX. Queste ultime 3 particelle hanno una lunghezza ed una larghezza rispettivamente di 10 e 50 nm e differiscono per i materiali ad esse coesi. Inoltre, si è affiancato a queste anche il TiO<sub>2</sub> bulk. Nel complesso, con tutte le ENP sono stati eseguiti 25 test, in cui l'esposizione è avvenuta a concentrazioni comprese tra 0,01 e 10 mg L<sup>-1</sup>, per 48 h. In 19 di questi l'EC50 per tutte le ENP e per il bulk è risultato > 100 mg L<sup>-1</sup>, mentre negli altri 6 si è potuta rilevare una leggera tossicità con un EC10 compreso tra 0,5 e 91,2 mg L<sup>-1</sup>. Sono stati inoltre eseguiti dei test cronici a 21 gg con effetti sulla riproduzione e sul tasso di schiuse. Solo nel caso di SF-S T-lite™, sono stati osservati degli effetti avversi: NOEC = 30 mg L<sup>-1</sup>, EC10=5 mg L<sup>-1</sup> e EC50 = 26,6 mg L<sup>-1</sup>. Nessun effetto di mortalità è stato rilevato.

Anche Warheit et al (2007) hanno tentato la sperimentazione di particelle differenti con *D. magna*: una **ENP fine** (F), i cui agglomerati in acqua assumono dimensioni medie di 300 nm ed una **ultra fine** (UF) di 129 nm di diametro. Il test acuto a 48 h prevedeva l'esposizione dei crostacei a 0,1, 1, 10 e 100 mg L<sup>-1</sup>. I risultati hanno evidenziato solo una modesta mortalità (10%) a 10 e 100 mg L<sup>-1</sup>, per entrambe le particelle ed un EC50 > 100 mg L<sup>-1</sup>.

Un altro caso analogo di sperimentazione è stato quello di Dabrunz et al (2011). Gli autori, hanno allestito dei test di tossicità, con *D. magna*, valutando gli endpoint di immobilizzazione e del successo nella muta, a 72 h e 96 h, con esposizione a ENP aventi 2 diametri differenti: 100 nm e 200 nm. La concentrazione era di 0,5, 1, 2, 4 e 8 mg L<sup>-1</sup>. Nel caso delle particelle a 100 nm l'effetto si è rivelato decisamente maggiore 66% e 100% a 72 h e 96 h, rispettivamente; per 200 nm, invece, i risultati erano pari a 3% e 57% a 72 h e 96 h. Inoltre, per il diametro pari a 100 nm, si è osservato un effetto non sulla I ma sulla II muta, in corrispondenza ad un'esposizione a 2 mg L<sup>-1</sup>.

Come nel loro precedente studio, Lovern et al (2007) hanno utilizzato ENP di diametro = 30 nm per il test di tossicità acuta a 48 h di *D. magna*. Gli endpoint valutati erano sia fisiologici che **comportamentali**: cambiamento della frequenza dei salti, della frequenza cardiaca e della frequenza dei movimenti. In particolar modo quest'ultima caratteristica sembra essere molto importante perché i movimenti irregolari abbassano il successo della predazione e, al tempo stesso, aumentano la probabilità di essere predati, visto che sono più facilmente individuabili. L'esposizione a 2 ppm di ENP non sembra aver avuto effetti su tali endpoint.

Come si è già avuto modo di osservare nei molluschi (cfr. par. 6.2.7), le ENP possono esercitare indirettamente degli effetti negativi, anche aumentando la tossicità di altre sostanze. E' quanto dichiarato da Fan et al (2011) nel loro lavoro con *D. magna* sugli effetti del nTiO<sub>2</sub> nei confronti del Cu<sup>2+</sup>. I crostacei sono stati esposti per 3 gg al Cu<sup>2+</sup> (10, 20, 30, 40, 50, 70 e 100 µg L<sup>-1</sup>) in presenza e in assenza delle ENP (5 – 40 nm) ad una concentrazione di 2 mg L<sup>-1</sup>. In presenza di ENP è risultato un visibile incremento degli effetti tossici del Cu<sup>2+</sup> (LC50 da 111 a 42 µg L<sup>-1</sup>) e questo sembra collegarsi al fatto che le ENP possano **legarsi alle metallotioneine**, impedendo i processi di detossificazione degli organismi. Le metallotioneine, infatti, erano diminuite da 135 a 99 µg L<sup>-1</sup>.

Kim et al (2010) hanno eseguito un test acuto con *D. magna* a 48 h ed un test cronico a 21 giorni con ENP di 40 nm, esponendo gli organismi a 0, 1, 2, 5 e 10 mg L<sup>-1</sup>. Ne è emerso che, nel test cronico, la mortalità aumentava per concentrazioni crescenti tra 5 e 10 mg L<sup>-1</sup>, mentre la capacità riproduttiva non sembrava essere compromessa. Dopo aver separato, mediante filtrazione, il campione di ENP in diverse classi dimensionali, gli autori hanno valutato gli effetti sulla risposta enzimatica per un'esposizione a 5 mg L<sup>-1</sup> di durata pari a 48 h. L'attività di GPX (Glutazione Perossidasi) e GST (Glutazione S-Transferasi) è risultata crescere con l'aumentare delle dimensioni degli aggregati di ENP, da 200 a 800 nm. Sembra inoltre che le ENP si attacchino al corpo dei crostacei e possano anche accumularsi nell'intestino (fig. 6.17).

La possibilità di accumulo di ENP all'interno di *D. magna* era stata già osservata da Strigul et al (2009). Con un test a 48 h, esponendo gli animali ad un intervallo di concentrazione compreso tra 2,5 e 250 mg L<sup>-1</sup> (6 nm), gli autori hanno rilevato una quasi inesistente mortalità (35% solo per la massima concentrazione) e la presenza, nel tratto digestivo dei giovani esemplari, di significative quantità di agglomerati di ENP. Gli animali esposti alle più alte concentrazioni, inoltre, apparivano più lenti nei movimenti rispetto agli altri.

Zhu et al (2010) con *D. magna* hanno eseguito un test acuto a 24, 48 e 72 h ed un test cronico a 21 giorni. Gli individui sono stati esposti alle concentrazioni di 0,1, 0,5, 1 e 5 mg L<sup>-1</sup> (21 nm). Dopo 48 h di esposizione, le concentrazioni di 50 e 100 mg L<sup>-1</sup> hanno fatto rilevare una mortalità del 10% e 20%, rispettivamente con una EC50 ed una LC50 > 100 mg L<sup>-1</sup> ed una NOEC < 50 mg L<sup>-1</sup>. Se però, il tempo di esposizione si protraeva fino a 72 h, allora la NOEC si abbassava ad un valore < 0,1 mg L<sup>-1</sup>, mentre l'EC50 e l'LC50 si attestavano rispettivamente a 1,62 mg L<sup>-1</sup> e 2,02 mg L<sup>-1</sup>. L'effetto dell'allungamento del tempo di esposizione è misurabile nel test cronico a 21 giorni in cui è stato possibile osservare: la diminuzione delle schiuse, per una concentrazione di 0,1 mg L<sup>-1</sup>, la riduzione della crescita e della riproduzione, per 0,5 mg L<sup>-1</sup> e la totale inibizione della riproduzione a 5 mg L<sup>-1</sup>. Considerando il numero complessivo di neonati vivi, a 21 giorni l'EC50 calcolata era di 0,46 mg L<sup>-1</sup> mentre l'LC50 corrispondeva a 2,6 mg L<sup>-1</sup>.

La tossicità del nTiO<sub>2</sub> è stata testata anche su *Daphnia pulex* da Klaper et al (2008). Le ENP erano state sintetizzate direttamente in laboratorio e possedevano una dimensione media di 100 nm. Il test acuto a 24 h prevedeva l'esposizione a 0,5, 1, 5, 20, 100 e 500 ppm. Alla massima concentrazione la mortalità è risultata pari al 45% ed inoltre si sono visti effetti sull'aumento della produzione di GST, per 500 ppm, ed una diminuzione di CAT, per 7,5 ppm, comprovanti lo stress ossidativo sopportato dagli organismi.

Nello stesso lavoro, già visto a proposito dell'alga *D. subspicatus* (cfr. par. 6.2.3), Hund-Rinke and Simon (2008) hanno utilizzato anche *D. magna* per verificare la tossicità del nTiO<sub>2</sub>. Le condizioni sperimentali erano le medesime. Anche in questo caso, gli effetti (immobilizzazione a 48 h) si sono resi evidenti solamente per la particella a 100 nm e non per quella a 200 nm.

L'isopode *Porcellio scaber* è stato oggetto di studio da parte di Drobne et al (2009). Gli autori hanno testato delle ENP di dimensione compresa tra 25 e 75 nm, differenziando le sospensioni: alcune infatti erano state disperse mediante **sonda ad ultrasuoni**, altre invece no. Nonostante questa variazione, i risultati non hanno mostrato differenze. L'esposizione a 10, 100 e 1000 mg L<sup>-1</sup> è stata favorita somministrando le ENP attraverso il cibo (foglie di *Corylus avellana*) per 3 o 14 gg. Nessun effetto di mortalità, né di perdita di peso per gli organismi è stato osservato. Le attività di GST e CAT non hanno subito modifiche.

Un esperimento analogo con *P. scaber* era stato messo a punto da Jemec et al (2008). Le ENP (15 nm) erano state somministrate attraverso la dieta per 14 gg., alle dosi di 0,1, 0,5, 1, 100, 1000, 2000 e 3000  $\mu\text{g g}$  di foglia<sup>-1</sup>. Anche in questo caso si è differenziato tra sospensioni sonicate e non sonicate. Non si sono osservati cambiamenti sulla frequenza di nutrimento, sul tasso di defecazione e sull'efficienza di assimilazione del cibo, né sul peso corporeo. Non si è verificata mortalità. In corrispondenza di 2000 e 3000  $\mu\text{g}\cdot\text{g}$  di foglia<sup>-1</sup>, però, si è visto un decremento dell'attività di CAT e GST, maggiore per le sospensioni che erano state sonicate.

Valant et al (2009) hanno utilizzato *P. scaber* per un esperimento che ricorda i due appena visti. Gli isopodi sono stati esposti, mediante delle applicazioni orali, ad una soluzione di ENP di concentrazione finale c.a pari a 250  $\text{g L}^{-1}$ . Alcune delle sospensioni erano state sonicate, altre no. L'endpoint misurato, cioè la destabilizzazione della membrana cellulare, è stato osservato solo in corrispondenza delle applicazioni orali che erano state preventivamente sonicate.

Bundschuh et al (2011) hanno lavorato con l'anfipode *Gammarus fossarium*, testando gli effetti del nTiO<sub>2</sub> (97 nm) derivanti dall'assunzione attraverso il cibo. Agli anfipodi sono stati somministrati dei dischi di foglie contenenti 0,2, 2 e 20  $\text{mg L}^{-1}$  di ENP. Il disegno sperimentale prevedeva che una parte di questi dischi e dei crostacei fosse tenuta al buio, l'altra, invece, irradiata con UV per 12 h al giorno. I risultati hanno evidenziato una riduzione del tasso di nutrimento del 40% per gli organismi rimasti nell'oscurità. Nel caso dell'irradiazione UV, gli effetti sono stati più consistenti. Nei controlli negativi, però, in assenza di ENP ma in presenza di UV, gli effetti sono stati del 50%, perché comunque, va fatto presente che la radiazione UV, specialmente UV-B è di per sé tossica per gli anfipodi (Bundschuh et al, 2011).

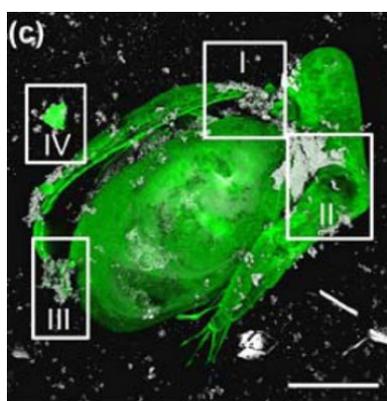


Figura 6.16 – Immagine al microscopio confocale; ENP sul corpo di un giovane esemplare di *C. dubia*. In evidenza: I) ENP sul carapace; II) ENP sulle giunture; III) ENP sulle appendici addominali; IV) ENP in sospensione (Li et al, 2011).

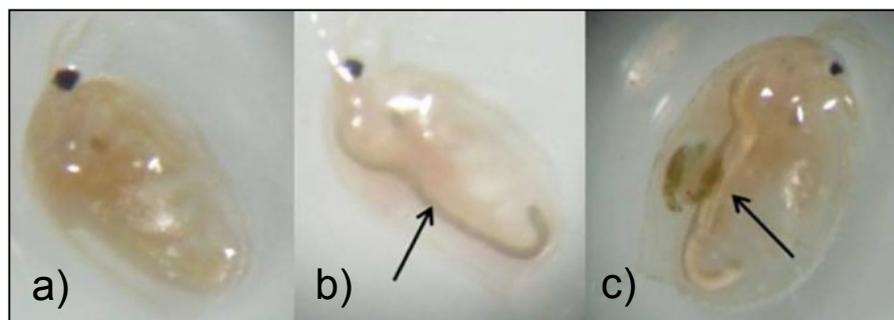


Figura 6.17 – Larve di *Daphnia magna* (a) nel controllo, (b) esposte agli agglomerati di nTiO<sub>2</sub> di 800 nm e (c) esposte ad agglomerati di tutte le misure; in evidenza (freccie nere) l'accumulo di ENP nel tratto intestinale (Kim et al, 2010).

## CROSTACEI

Specie	Matrice	Produttore TiO <sub>2</sub> ; Fasi cristallochimiche; Percentuale	Diametro dichiarato	Diametro Misurato	Tecnica Analitica	Tecnica Dispersione	Conc Nominale	Conc Reale	Tecnica Analitica	Rif. bibliografico
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	acqua dolce	Degussa; A(80%) + R(20%) (P25)	30 nm	20,5 nm	SEM	Stirring per 48 h in hard water	X			Griffit et al, 2008
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	acqua dolce	Degussa Evonik; A(70%) + R(30%)		34 nm	TEM, DLS	Ultrasuoni per 30 min in acqua deionizzata	X			Li et al, 2011
<i>Daphnia magna</i>	acqua dolce	Sigma		7-20 nm	TEM	Sonicazione per 15 min nel mezzo di coltura	X			Lee et al, 2009
<i>Chydorus sphaericus</i>	acqua dolce	Sigma-Aldrich	<40 nm	0,5-70 um	AFM, raggi X			X	ICP-MS, Spettrofotometro UV, Citometro a flusso	Velzeboer et al, 2008
<i>Daphnia magna</i>	acqua dolce	Sigma-Aldrich	25-70 nm			Sonicazione per 30 min in MilliQ	X			Heinlaan et al, 2008
<i>Daphnia magna</i>	acqua dolce	Aggiunto TiCl <sub>4</sub> come flocculante a fanghi di scarico					X			Lee et al, 2008
<i>Daphnia magna</i>	acqua dolce			30 nm; 100-300 nm (sonicato)	TEM	I) Bagno ad ultrasuoni per 30 min in acqua deionizzata; II) aggiunta di THF		X	Spettroscopia UV	Lovern & Klaper, 2006
<i>Daphnia magna</i>	acqua dolce	Sigma-Chemical; A(70%) + R(30%)		200-400 nm (7%), 400-800 nm (34%), >800 nm (29%)	Sub-micron particle analyzer; DLS	Disperse in Medium Hard Water	X			Kim et al, 2010

Specie	Matrice	Produttore TiO <sub>2</sub> ; Fasi cristallochimiche; Percentuale	Diametro dichiarato	Diametro Misurato	Tecnica Analitica	Tecnica Dispersione	Conc Nominale	Conc Reale	Tecnica Analitica	Rif. bibliografico
<i>Daphnia magna</i>	acqua dolce	Degussa P25, A(80%)+R(20%)	21 nm	580,5 nm	SEM, DLS	Sonicazione per 10 min a 50 W in MilliQ		X	Essiccazione e digestione con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> e NHSO <sub>4</sub> , poi ICP-OES	Zhu et al, 2010
<i>Daphnia magna</i>	acqua dolce	Basf; Tlite SF, Tlite SF-S, Tlite Max; Tutti R(100%)	50 nm			Stirring per 24 h	X			Wiench et al, 2009
<i>Daphnia magna</i>	acqua dolce	Preparato da idrolisi di solfato di Ti	6 nm			Sonicazione per 30 min in D.I. (Microtox)	X			Strigul et al, 2009
<i>Daphnia magna</i>	acqua dolce	Degussa; R100%; A(80%) + R(20%) (P25)		136 nm; 139 nm; 140 nm	DLS	Agitazione in acqua ultrapura	X			Warheit et al, 2007
<i>Daphnia magna</i>	acqua dolce		30 nm				X			Lovern et al, 2007
<i>Daphnia magna</i>	acqua dolce	Nanjing High Technology Material, A(100%)		5 e 40 nm	TEM	Bagno ad ultrasuoni per 30 min in acqua deionizzata	X			Fan et al, 2011
<i>Daphnia magna</i>	acqua dolce									Dabrunz et al, 2011
<i>Daphnia pulex</i>	acqua dolce	Preparate in lab		100 nm	TEM	Stirring per 24 h poi sonicazione	X			Klaper et al, 2008
<i>Desmodesmus suspicatus</i>	acqua dolce	A(80%); A(100%)	25 nm; 10 nm			Ultrasuoni in medium algale; stirring in acqua deionizzata	X			Hund-Rinke & Simon, 2006
<i>Gammarus fossarum</i>	acqua dolce	Degussa; A(80%); A(100%)		97 nm (in sospensione)	DLS	Stirring + 10 min sonicazione	X			Bundschuh et al, 2011

Specie	Matrice	Produttore TiO <sub>2</sub> ; Fasi cristallochimiche; Percentuale	Diametro dichiarato	Diametro Misurato	Tecnica Analitica	Tecnica Dispersione	Conc Nominale	Conc Reale	Tecnica Analitica	Rif. bibliografico
<i>Porcellio scaber</i>	suolo	Sigma-Aldrich, A(100%)	<25 nm		TEM, DLS	I) bagno ad ultrasuoni per 30 min; II) nessun trattamento	X			Valant et al, 2009
<i>Porcellio scaber</i>	suolo	Sigma-Aldrich, A(100%)	15 nm	15 nm; 350-500 nm (sonicato); 780-970 nm (non sonicato)	TEM, DLS	I) sonicazione per 30 min in MilliQ; II) non sonicati	X			Jemec et al, 2008
<i>Thamnocephalus platyurus</i>	acqua dolce	Sigma-Aldrich	25-70 nm			Sonicazione per 30 min in MilliQ	X			Heinlaan et al, 2007
<i>Thamnocephalus platyurus</i>	acqua dolce	Sigma-Aldrich, 99,9%	<100 nm			75 mg diluiti in 150 mL di ASTM, poi filtrati a 0,22 µm; nel filtraggio si è perso il 54% delle ENP	X			Blaise et al, 2008

Tabella 6.18 – Riassunto delle condizioni sperimentali utilizzate dai diversi autori nei rispettivi lavori con il nTiO<sub>2</sub> ed i crostacei. A = anatasio; R = rutilo.

## 6.2.9 Test con i pesci

### Acqua dolce

Reeves et al (2009) hanno testato il potere ossidativo del nTiO<sub>2</sub>, misurandone la citotossicità e la genotossicità con un test *in vitro* su una coltura di cellule epiteliali di *Carassius auratus*. Le cellule sono state esposte ad una concentrazione di ENP (5 nm) compresa tra 0,1 e 1000 mg L<sup>-1</sup>, per 24 h senza UVA o per 2 h in presenza di UVA. In presenza di UVA, i risultati mostravano un decremento dose-dipendente della vitalità cellulare. In assenza di UVA, invece, concentrazioni di ENP pari a 1, 10 e 100 mg L<sup>-1</sup> producevano, come effetto, l'aumento dell'ossidazione della base purinica del DNA. Il Comet assay evidenziava inoltre un aumento del danno genetico in presenza di UVA.

Sun et al (2007) si proponevano, invece, di verificare gli effetti del nTiO<sub>2</sub> sull'**accumulo di As** da parte delle carpe *Cyprinus carpio*. A questo scopo, esemplari adulti di carpe sono stati esposti alle ENP (21 nm) per 25 gg ad una concentrazione pari a 10 mg L<sup>-1</sup> e ad una concentrazione di As pari a 200 µg L<sup>-1</sup>. Si è visto che le ENP assorbivano l'As rapidamente, abbassando la sua concentrazione nell'acqua da 200 a 150 µg L<sup>-1</sup> in 30 min. In presenza di ENP, mediamente, questo si accumulava nei pesci in maniera più massiccia (8,34 µg L<sup>-1</sup> al posto di 3,40 µg L<sup>-1</sup>) ed inoltre tale accumulo si verificava nel seguente ordine: intestino > stomaco > branchie > fegato > epitelio > muscoli.

Gli effetti indiretti del nTiO<sub>2</sub> sono stati accertati anche da Zhang et al (2007) che hanno studiato l'**accumulo di Cd** in presenza di ENP (21 nm) su esemplari di *C. carpio* per 25 gg. Anche in questo caso si è visto che le ENP assorbono il tossico rapidamente (60% in 60 min) e l'accumulo nei pesci, in presenza di ENP, si è verificato in modo più consistente (22,3 µg L<sup>-1</sup> invece che 9,07 µg L<sup>-1</sup>). L'ordine di assorbimento richiama quanto riportato anche da Sun et al (2007): viscere > branchie >> epitelio > muscoli.

Hao et al (2009) hanno utilizzato *C. carpio* per il loro studio ma, questa volta, gli esemplari erano iuvenili. Gli effetti avversi dell'esposizione al nTiO<sub>2</sub> (50 nm), alle concentrazioni di 10, 50, 100 e 200 mg L<sup>-1</sup>, sono stati valutati, per 8 e 20 gg, considerando endpoint di tipo cellulare fisiologico e comportamentale. Ne è emerso che la mortalità era nulla però, dopo un'esposizione di 1 h, si è notificato il cambiamento della frequenza respiratoria e del modo di ondeggiare in funzione della concentrazione di ENP. Per concentrazioni superiori a 50 mg L<sup>-1</sup>, il nuoto dei pesci risultava scoordinato e molti di questi nuotavano descrivendo piccoli cerchi in superficie. Sono stati riscontrati anche alcuni problemi nella capacità di galleggiamento e la secrezione abbondante di muco. Ad una concentrazione di 10 mg L<sup>-1</sup> il SOD nelle branchie e nel cervello aumentava fino al 2° e 4° giorno, dopodiché decresceva. L'attività del SOD risultava 5 - 10 volte

maggiore nel fegato rispetto alle branchie; dopo 8 gg., l'LPO non sembra aumentare a 10 e 50 mg L<sup>-1</sup> ma lo fa a 100 e 200 mg L<sup>-1</sup>.

*Danio rerio* è la specie in assoluto più utilizzata tra i pesci di acqua dolce per lo studio degli effetti del nTiO<sub>2</sub>. Johnston et al (2010), infatti, hanno valutato la loro capacità di assunzione delle ENP sia dalla colonna d'acqua, tra 24 h e 14 gg., sia attraverso l'alimentazione, per 21 gg., a 50, 500 e 5000 µg L<sup>-1</sup>. In entrambi i casi, questa si è rivelata non significativa.

Embrioni di *D. rerio* sono stati oggetto di studio da parte di Yeo et al (2009), che li hanno esposti ad una ENP di TiO<sub>2</sub> (30 - 50 nm) complessata con Cu (1, 10, 15 e 25%), a concentrazioni di 10 e 20 ppt. Gli effetti negativi rilevati sono stati molteplici: sviluppo anormale della notocorda, occhi non sviluppati, testa troppo piccola, sviluppo cardiaco anormale, a volte assenza di coda, diminuzione del tasso di schiuse, aumento di GSR (Glutazione Reduttasi), GSH e GST. Sembra inoltre che le ENP riescano a penetrare nelle cellule.

Griffit et al (2008) hanno esposto esemplari di *D. rerio*, sia adulti che iuvenili, al nTiO<sub>2</sub> (20 nm) a 0,36, 0,6, 1,67 e 2,78 volte il valore di LC50 rilevato in precedenti esperienze; il test statico a 48 h ha fornito valori di LC50 > 10mg L<sup>-1</sup> sia per gli adulti che per gli iuvenili.

Zhu et al (2010) hanno cercato di misurare il bioaccumulo di ENP (21 nm) attraverso la catena alimentare in esemplari di *D. rerio*. Per 14 gg. i pesci sono stati nutriti con crostacei (*D. magna*) a loro volta esposti, per 24 h, alle ENP (0,1 e 1 mg L<sup>-1</sup>). La concentrazione di ENP nei crostacei risultava pari a 4,52 e 61,09 mg·g peso secco<sup>-1</sup>. Al termine dei 14 gg., i pesci sono stati sottoposti ad un periodo di depurazione di 7 gg. Le analisi sugli organismi hanno messo in luce che il bioaccumulo avviene e, in 5 gg., si raggiunge lo stato stazionario, con concentrazioni di ENP pari a 106,57 e 522,02 mg·kg peso secco<sup>-1</sup>, rispettivamente per i crostacei esposti a 0,1 e 1 mg L<sup>-1</sup>. Ad ogni modo, dopo l'interruzione del trattamento, le ENP sono rilasciate alquanto rapidamente (fig. 6.19).

Xiong et al (2011) hanno utilizzato individui adulti di *D. rerio* per un test di tossicità a 96 h. Le ENP (20 - 70 nm) avevano una concentrazione compresa tra 10 e 300 mg L<sup>-1</sup>. Si è visto che, fino a 100 mg L<sup>-1</sup> non c'era mortalità mentre a 300 mg L<sup>-1</sup> questa era del 100% con un valore di LC50 = 124,5 mg L<sup>-1</sup>. Considerando invece la risposta dei biomarkers si rilevava che a 50 mg L<sup>-1</sup> i valori di SOD, rispetto al controllo, restavano costanti nelle branchie ma diminuivano nel fegato (70,2%) ed aumentavano, invece, nell'intestino (149,6%); si osservava inoltre la diminuzione di CAT nelle branchie, nel fegato e nell'intestino; lo stesso andamento si riscontrava anche per l'attività del GSH. A 50 mg L<sup>-1</sup> si manifestavano, inoltre, danni alle membrane cellulari del tessuto branchiale.

Sulla medesima specie il test di tossicità larvale, condotto da Chen T. et al (2011), non sembrava sortire alcun effetto per un'esposizione di a 0,1, 0,5, 1, 5 e 10 mg L<sup>-1</sup> al nTiO<sub>2</sub> (< 10 nm). Il tempo di schiusa non sembrava cambiare e non si vedevano né mortalità, né malformazioni; sembrava esserci solamente una minor attività degli individui per le concentrazioni più alte. A 24 h dalla fertilizzazione, sulla superficie degli embrioni si osservava la formazione di strati di nTiO<sub>2</sub> via via più spessi, in funzione della crescente concentrazione di ENP (fig. 6.20).

Chen J. et al (2011) hanno messo a punto con *D. rerio* un test a lungo termine (6 mesi) in cui i pesci erano esposti a 1, 2, 4, 5 e 7 mg L<sup>-1</sup> di nTiO<sub>2</sub> (25 – 70 nm). Gli endpoint sono stati l'osservazione dei cambiamenti a 2, 4 e 6 mesi nelle branchie, nel fegato, nel cuore e nel cervello. Ne è emerso che, a partire dal 4° mese, si è osservava una diminuzione del peso corporeo per tutte le concentrazioni testate, mentre la mortalità registrata era del 6,3%, 4,2% e 16,7%, rispettivamente per concentrazioni pari a 4, 5 e 7 mg L<sup>-1</sup>. Con la concentrazione aumentava il rapporto presente tra il peso delle branchie e quello corporeo e tra il peso del fegato e quello corporeo. Nel complesso, nelle branchie si è notata l'iperplasia del tessuto e si sono visti anche danni alle lamelle e fenomeni di edema. Nel cuore e nel cervello, invece, si è vista la presenza di ENP ma non il loro accumulo.

Federici et al (2007) hanno esposto iuvenili della trota *Onchoryncus mykiss* al nTiO<sub>2</sub> (21 nm), per 14 gg., a concentrazioni di 0,1, 0,5 e 1 mg L<sup>-1</sup>. I risultati ricavati non hanno evidenziato mortalità ma la presenza di alcune secrezioni mucose alle branchie e dei problemi nel galleggiamento degli esemplari. L'esame istologico delle branchie ha rilevato qualche edema alle lamelle secondarie, cambiamenti nei mucociti ed iperplasia alle lamelle primarie, analogamente a quanto osservato da Chen J. et al (2011); almeno metà dei pesci mostrava questi sintomi a tutte le concentrazioni testate, soprattutto a 0,5 mg L<sup>-1</sup>. Al 7° giorno, nelle branchie, i livelli tissutali di Cu e Zn sono diminuiti per esposizione alle concentrazioni di 0,1 e 1 mg L<sup>-1</sup>; lo Zn, inoltre, è diminuito anche nei muscoli e nel cervello. E' diminuita l'attività di Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPasi e del TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances); il glutatione invece, aumentava nelle branchie e diminuiva nel fegato. In generale, si è registrato qualche danno agli intestini ed al fegato mentre il cervello non sembra aver risentito delle ENP, altra analogia con lo studio di Chen J. et al (2011).

ENP di nTiO<sub>2</sub> aventi un diametro in acqua di circa 140 nm sono state testate su *O. mykiss* da Warheit et al (2007), in un test acuto statico a 48 h, con esposizione a 0,1, 1, 10 e 100 mg L<sup>-1</sup>. Gli effetti sono stati pressochè nulli, con un'immobilità registrata sempre pari allo 0%, fatta eccezione per la concentrazione di 10 mg L<sup>-1</sup>, per la quale il valore era del 10%; l'EC50 è risultata > 100 mg L<sup>-1</sup>.

Ramsden et al (2009) hanno effettuato uno studio su *O. mykiss* il cui disegno sperimentale prevedeva l'esposizione di iuvenili al nTiO<sub>2</sub> (21 nm) attraverso l'alimentazione. I pesci sono stati nutriti per 8 settimane con cibo contenente 10 e 100 mg·kg<sup>-1</sup> di ENP, dopodichè si sono lasciate trascorrere 2 settimane per la loro depurazione. I risultati hanno mostrato una mortalità non rilevante; al termine delle 8 settimane era evidente l'accumulo di ENP in tutti gli organi bersaglio valutati (branchie, intestino, fegato, cervello e milza) ma, trascorso il periodo di depurazione, per intestino, fegato e milza era osservabile la diminuzione delle ENP accumulate; da segnalare, inoltre, che sembrava esserci più accumulo alla concentrazione di 10 piuttosto che di 100 mg·kg<sup>-1</sup>. Nonostante il peso degli individui fosse regolare, la concentrazione di ENP risultava massima nella milza ma si abbassava in breve tempo durante le 2 settimane di recupero. I valori di ENP nel sangue erano normali, ad eccezione di un aumento nei globuli bianchi dopo 2 settimane di esposizione. I valori di K<sup>+</sup> sono generalmente aumentati mentre si è vista una diminuzione del Cu nell'intestino, nel cervello e nella milza. Lo Zn risultava raddoppiato nella milza e un aumento dei suoi valori è stato riscontrato anche nel cervello, dove si è assistito all'inibizione dell'attività della Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPasi del 50%. Un decremento di TBARS è stato registrato sia nell'intestino che nelle branchie, dove diminuivano anche i valori di GSH.

Johnston et al (2010) hanno esposto esemplari adulti di *O. mykiss* al nTiO<sub>2</sub> (< 100 nm) sia direttamente, attraverso la colonna d'acqua (da 24 h a 14 gg), sia attraverso il cibo (21 gg a concentrazioni di 50, 500 e 5000 µg L<sup>-1</sup>), con l'obiettivo di misurare l'assunzione e la distribuzione delle ENP. Gli autori hanno osservato che l'assunzione e l'accumulo sono stati significativi solamente dove c'era stata somministrazione attraverso il cibo. In questo caso si era verificato un accumulo nell'intestino. In generale, si è potuto osservare, inoltre, un effetto di deposizione di ENP sulla superficie delle lamelle branchiali, dopo un'esposizione compresa tra 24 e 96 h.

Jovanovic et al (2010) hanno lavorato con embrioni di *Pimephales promelas* (24 h dopo la fecondazione), esponendoli per 7 gg al nTiO<sub>2</sub> (< 25 nm) a concentrazioni pari a 0,01, 0,1, 1, 10, 100 e 1000 mg L<sup>-1</sup>. Gli autori hanno ricavato che il tasso di mortalità non variava rispetto al controllo (< 10%) né, inoltre, si manifestavano effetti avversi sullo sviluppo degli embrioni. Gli endpoint cellulari, invece, hanno mostrato un decremento della respirazione cellulare del 21%, unitamente all'aumento del NET (Neutrophil Extracellular Trap) dell'11%. Si è notata anche l'espressione di 3 geni legati alla risposta immunitaria cellulare, rispettivamente di 11, 2,5 e 2 volte superiore.

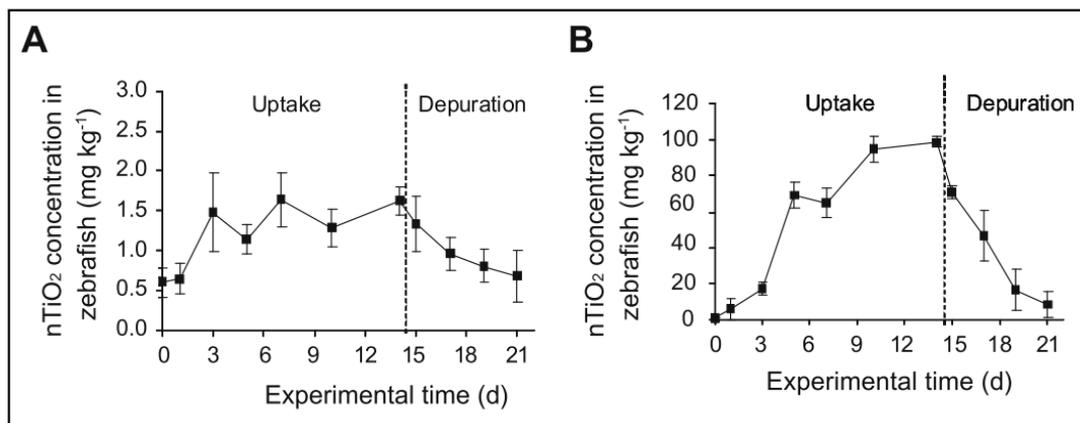


Figura 6.19 – Profili di accumulo e di depurazione, nel tempo, delle ENP in *D. rerio*: valori medi delle concentrazioni nei pesci esposti a 0,1 mg L<sup>-1</sup> (A) ed in quelli esposti a 1 mg L<sup>-1</sup> (B) (Zhu et al, 2010).

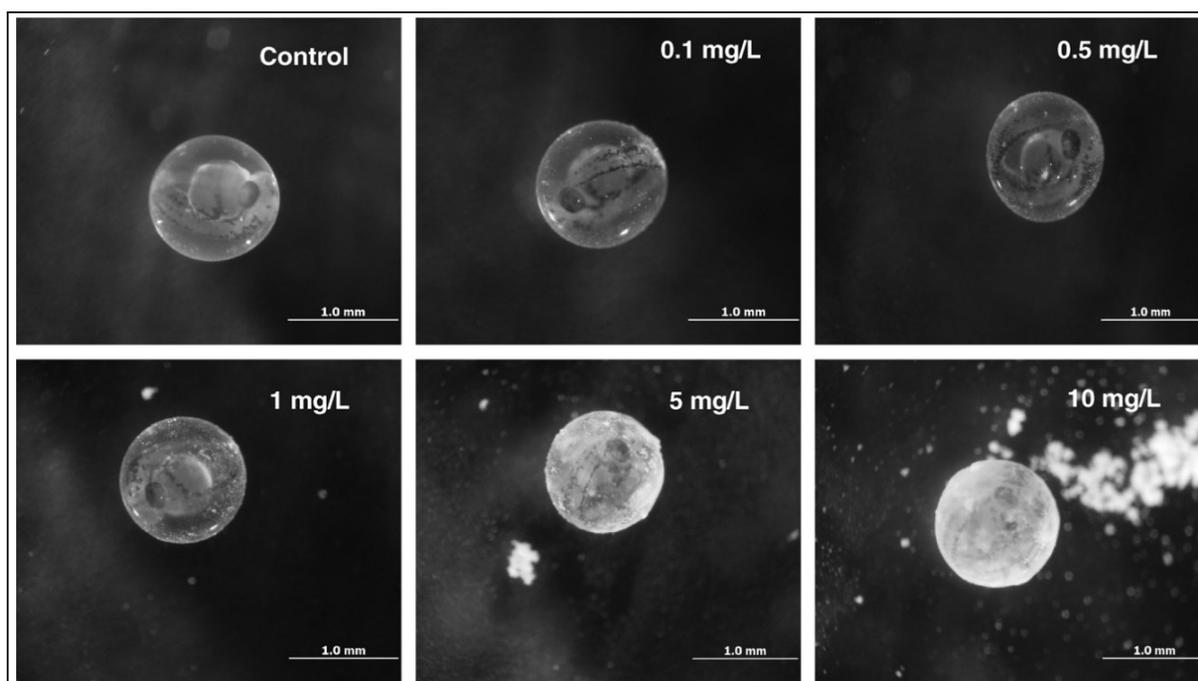


Figura 6.20 – Fotografie di embrioni di *D. rerio* in sospensione con concentrazioni differenti di ENP, scattate a 24 h dopo la fertilizzazione (Chen T. et al, 2010).

### Acqua salata

Vi è solo un caso di studio con il nTiO<sub>2</sub> ed i pesci ed è quello eseguito su *Oryzias latipes*, una specie non propriamente marina ma di acque salmastre (Paterson et al, 2011). Il test ha previsto l'esposizione degli embrioni alle ENP (21 nm) ad un intervallo di concentrazione compreso tra 0,03 e 14 mg L<sup>-1</sup> per 17 giorni. Una volta schiuse le uova, gli organismi venivano esposti per altri 5 giorni, durante i quali essi venivano nutriti. Sembra che l'esposizione al tossico abbia accelerato la schiusa delle uova con il risultato, però, che molte larve precoci non hanno potuto completare lo sviluppo; inoltre esse mostravano un'attività natatoria anormale causata da un'anormale vescica natatoria e dalla mancanza di elementi radiali sulle pinne caudali e pettorali.

**PESCI**

Specie	Matrice	Produttore TiO <sub>2</sub> ; Fasi cristallochimiche; Percentuale	Diametro dichiarato	Diametro Misurato	Tecnica Analitica	Tecnica Dispersione	Conc Nominale	Conc Reale	Tecnica Analitica	Rif. bibliografico
<i>Carassius auratus</i>	acqua dolce	Sigma	5 nm			Disperso in PBS	X			Reeves et al, 2009
<i>Cyprinus carpio</i>	acqua dolce	Hongsheng Material Sci. & Tech. Co., Ltd., China; R(100%)	50 nm			Bagno ad ultrasuoni per 30 min a 100 W in acqua	X			Hao et al, 2009
<i>Cyprinus carpio</i>	acqua dolce	Degussa, P25	21 nm				X			Sun et al, 2007
<i>Cyprinus carpio</i>	acqua dolce	Degussa, P25	21 nm	21 nm	Particle Size Analyzer			X	Essiccazione e digestione con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> e NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub> , poi ICP-OES	Zhang et al, 2007
<i>Danio rerio</i>	acqua dolce	Sigma-Aldrich	<100 nm	34,2 nm	TEM, DLS	Sonicazione per 30 min in acqua ultrapura		X	ICP-MS	Johnston et al, 2010
<i>Danio rerio</i>	acqua dolce			30-50 nm	HR-TEM, SEM	Disperse in cityl water; lasciato essiccare per evaporazione Cl	X			Yeo e Kang, 2009
<i>Danio rerio</i>	acqua dolce	Degussa; A(80%) + R(20%) (P25)	30 nm	20,5 nm	SEM	Stirring per 48 h in hard water	X			Griffit et al, 2008
<i>Danio rerio</i>	acqua dolce	Degussa P25, A(80%)+R(20%)	21 nm	580,5 nm	SEM, DLS	Sonicazione per 10 min a 50 W in MilliQ		X	Essiccazione e digestione con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> e NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub> , poi ICP-OES	Zhu et al, 2010
<i>Danio rerio</i>	acqua dolce	Nano Applied Research Center of Nanjing University of Technology		200-500 nm	DLS	Bagno sonicatore per 20 min a 100 W in acqua distillata	X			Xiong et al, 2011

Specie	Matrice	Produttore TiO <sub>2</sub> ; Fasi cristallochimiche; Percentuale	Diametro dichiarato	Diametro Misurato	Tecnica Analitica	Tecnica Dispersione	Conc Nominale	Conc Reale	Tecnica Analitica	Rif. bibliografico
<i>Danio rerio</i>	acqua dolce			<10 nm	HR-TEM	Dispersione in acqua decolorata e sonicazione per 20- 30 min	X			Chen et al, 2011
<i>Danio rerio</i>	acqua dolce	Sigma-Aldrich, A(100%)	<25 nm	86 nm	DLS	Disperse in HBSS	X			Jovanovic et al, 2011
<i>Danio rerio</i>	acqua dolce	Degussa P25, A(80%)+R(20%)	25-70 nm	27,74	TEM	Bagno sonicatore per 30 min in Instant Ocean	X			Chen et al, 2011
<i>Danio rerio</i>	acqua dolce	Sigma-Aldrich, A(100%)	<25 nm	foglietti di 45 x 14 nm	HR-TEM	Bagno ad ultrasuoni per 15 min in MilliQ	X			Palaniappan and Pramod, 2011
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	acqua dolce	Sigma-Aldrich	<100 nm	34,2 nm	TEM, DLS	Sonicazione per 30 min in acqua ultrapura		X	ICP-MS	Johnston et al, 2010
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	acqua dolce	Degussa P25, A(75%)+R(25%)	21 nm	24 nm; 160 nm (aggregati)	TEM; SEM	Sonicazione per 6 h in acqua ultrapura		X	Spettrofotometro	Federici et al, 2007
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	acqua dolce	Degussa P25, A(75%)+R(25%)	21 nm	24 nm; 160 nm (aggregati)	TEM; SEM	Sonicazione per 6 h in acqua ultrapura		X	ICP-OES	Ramsden et al, 2009
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	acqua dolce	Sigma, A(75%)+R(25%)	21 nm	11-38 nm	TEM	Bagno sonicatore per 12 h in PBS o acqua	X			Vevers and Jha, 2008
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	acqua dolce	Degussa; R100%; A(80%) + R(20%) (P25)		136 nm; 139 nm; 140 nm	DLS	Agitazione in acqua ultrapura	X			Werheit et al, 2007
<i>Oryzias latipes</i>	acqua dolce e salmastra	Degussa P25, A(75%)+R(25%)	21 nm	87 nm	DLS, SEM	Sonicazione per 1,5 min a 375 W in acqua ultrapura		X	Spettrofotometro UV	Paterson et al, 2011

Specie	Matrice	Produttore TiO <sub>2</sub> ; Fasi cristallochimiche; Percentuale	Diametro dichiarato	Diametro Misurato	Tecnica Analitica	Tecnica Dispersione	Conc Nominale	Conc Reale	Tecnica Analitica	Rif. bibliografico
<i>Pimephales promelas</i>	acqua dolce	Sigma-Aldrich, A(100%)	<25 nm	86 nm	DLS	Disperse in HBSS	X			Jovanovic et al, 2010

Tabella 6.21 – Riassunto delle condizioni sperimentali utilizzate dai diversi autori nei rispettivi lavori con il nTiO<sub>2</sub> ed i pesci. A = anatasio; R = rutilo.

### 6.2.10 Test con gli anfibi

L'unico studio sull'esposizione di anfibi al nTiO<sub>2</sub> è stato presentato da Zhang et al (2012) e riguarda l'esposizione di girini di *Xenopus laevis* ad ENP di 3 granulometrie differenti: 5, 10 e 32 nm. Gli endpoint considerati erano la mortalità, la lunghezza totale del corpo (TBL = Total Body Length) e la lunghezza distanza naso-ano (SVL = Snout Vent Length). L'esposizione è avvenuta per 14 gg. alle concentrazioni di 0,31, 1, 3,1, 10, 31, 100, 310 e 1000 mg L<sup>-1</sup>, in presenza ed in assenza di luce UV. I risultati hanno evidenziato, innanzitutto, che la mortalità è sopraggiunta sempre dopo la fase di alimentazione, fenomeno che induce a pensare che questa sia causata dall'ingestione delle ENP. Inoltre, gli effetti sembrano confermare un aumento di intensità in presenza di luce UV. Per sintetizzare quanto visto dagli autori si propone la tabella 6.22.

ENP ( $\phi$ )	ENDPOINT			
	Mortalità - NOEC a 14 gg * = in presenza di UV	Mortalità - LC50 a 14 gg * = in presenza di UV	TBL - NOEC a 14 gg * = in presenza di UV	SVL NOEC a 14 gg * = in presenza di UV
5 nm	*9,5 mg L <sup>-1</sup> ; 90,2 mg L <sup>-1</sup>	*57,9 mg L <sup>-1</sup> ; 210 mg L <sup>-1</sup>	*9,5 mg L <sup>-1</sup> ; 30,9 mg L <sup>-1</sup>	*77,7 mg L <sup>-1</sup> ; 30,9 mg L <sup>-1</sup>
10 nm	*30,9 mg L <sup>-1</sup> ; 281,9 mg L <sup>-1</sup>	*69,9 mg L <sup>-1</sup> ; n.d.	*30,9 mg L <sup>-1</sup> ; 30,9 mg L <sup>-1</sup>	*9,5 mg L <sup>-1</sup> ; 9,5 mg L <sup>-1</sup>
32 nm	*77,7 mg L <sup>-1</sup> ; 77,7 mg L <sup>-1</sup>	*267 mg L <sup>-1</sup> ; 295 mg L <sup>-1</sup>	*77,7 mg L <sup>-1</sup> ; 77,7 mg L <sup>-1</sup>	*30,9 mg L <sup>-1</sup> ; 0,01 mg L <sup>-1</sup>

Tabella 6.22 – Tabella riassuntiva dei risultati della sperimentazione, su *X. laevis*, di 3 ENP di TiO<sub>2</sub> a granulometria differente (Zhang et al, 2012). La sperimentazione è stata condotta sia in presenza (\*) che in assenza di radiazione UV.

Produttore TiO <sub>2</sub> ; Fasi cristallochimiche; Percentuale	Diametro dichiarato	Diametro Misurato	Tecnica Analitica	Tecnica Dispersione	Conc Nominale	Conc Reale	Tecnica Analitica
Alfa-Aesar	5 nm; 10 nm; 32 nm	100 - 250 nm	raggi X; DLS			X	ICP-AES; ICP-MS

Tabella 6.23 – Riassunto delle condizioni sperimentali utilizzate nel lavoro con gli anfibi di Zhang et al (2012).

### 6.2.11 Test con i cetacei

Attualmente, c'è soltanto un lavoro sui cetacei e le ENP di TiO<sub>2</sub>, quello di Bernardeschi et al (2010). Gli autori hanno effettuato uno studio *in vitro*, esponendo i leucociti del cetaceo *Tursiops truncatus* alle ENP (25 nm) ad una concentrazione di 20, 50 e 100 mg L<sup>-1</sup> per 4, 24 e 48 h. I risultati hanno messo in evidenza l'induzione della frammentazione delle basi del DNA ed un aumento della migrazione del DNA per 50 e 100 mg L<sup>-1</sup>, sia a 24 che a 48 h. Nessun danno, invece, è stato riscontrato nei leucociti di 2 dei 5 campioni.

<b>Produttore TiO<sub>2</sub>; Fasi cristallochimiche; Percentuale</b>	<b>Diametro dichiarato</b>	<b>Diametro Misurato</b>	<b>Tecnica Analitica</b>	<b>Tecnica Dispersione</b>	<b>Conc Nominale</b>	<b>Conc Reale</b>
Sigma-Aldrich, A(100%); R(100%)	<25 nm; <5000 nm	<100 nm	Transmission Electron Micrographs	Sonicazione per 30 min in RPMI 1640	X	

Tabella 6.24 – Riassunto delle condizioni sperimentali utilizzate nel lavoro con i cetacei di Bernardeschi et al (2010). RPMI = Roswell Park Memorial Institute medium.

### 6.2.12 Riepilogo

Dalle evidenze pubblicate dai diversi autori emerge quanto anticipato, sia al paragrafo 6.1 che in altre parti di questa tesi di dottorato, cioè il problema della confrontabilità dei risultati, conseguenza di una mancanza di uniformità sperimentale. Questo, ovviamente, non vuol costituire una critica dell'operato altrui ma semplicemente la constatazione dell'esigenza di protocolli sperimentali e operativi con cui pianificare ed ottimizzare gli sforzi futuri.

Nonostante la complessità offerta da questa panoramica, si è cercato di riassumere l'informazione disponibile sul nTiO<sub>2</sub>, in modo sintetico ed immediato, con l'ausilio della seguente tabella 6.25, che, offrendo una sintesi di tutti i dati a disposizione, non può tener conto delle differenti condizioni espositive. Nella tabella, in corrispondenza di ciascun gruppo tassonomico, se disponibili, sono presenti il valore medio di EC50, LC50 e NOEC (mg L<sup>-1</sup>), sia gli altri effetti registrati dai diversi autori.

GRUPPO TASSONOMICO (n LAVORI)	MATRICE	E(I)C50, LC50, NOEC (valore medio in mg L <sup>-1</sup> , min-max), Endpoint, tempo di esposizione	EFFETTI REGISTRATI COMPLESSIVAMENTE
Protozoi e Batteri (5)	acqua dolce	IC50 = 13,98 a 24 h IC50 = 0,62 a 96 h IC50 = 0,15 a 6 gg	<ul style="list-style-type: none"> <li>- inibizione della fissazione di N in batteri nitrificanti;</li> <li>- inattivazione degli organismi in presenza di UV-A;</li> <li>- aumento della granularità interna;</li> <li>- forma distorta ed irregolare delle cellule;</li> <li>- danni alla membrana cellulare;</li> <li>- riduzione dell'attività enzimatica</li> </ul>
	acqua salata	EC50 > 20000 - Riduzione della bioluminescenza a 30 min	
Funghi e Lieviti (2)	acqua dolce	IC50 > 20000 a 8 h ed a 24 h	<ul style="list-style-type: none"> <li>- inibizione % della crescita cellulare</li> </ul>
Alge (6)	acqua dolce	IC50 = 21 (6-44) a 72 h NOEC = 1 (0,9-1,2) - Inibizione della crescita algale a 72 h	<ul style="list-style-type: none"> <li>- perossidazione lipidica della membrana cellulare</li> </ul>
Nematodi (2)	acqua dolce	LC50 = 80 a 24 h	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ridotte dimensioni delle uova;</li> <li>- minor numero di uova;</li> <li>- ridotto tasso di schiuse;</li> <li>- riduzione della fertilità;</li> <li>- minore crescita degli organismi;</li> <li>- minore sopravvivenza</li> </ul>
Anellidi (4)	suolo - sedimenti (acqua dolce)		<ul style="list-style-type: none"> <li>- ridotta produzione di sacche ovigere;</li> <li>- ridotto tasso di schiuse;</li> <li>- ridotta produzione di iuvenili;</li> <li>- accumulo di ENP presenti nel suolo;</li> <li>- danni al DNA;</li> <li>- danni ai mitocondri;</li> <li>- apoptosi (quando c'è assunzione dall'acqua)</li> </ul>
	suolo - sedimenti (acqua salata)		<ul style="list-style-type: none"> <li>- riduzione della stabilità della membrana lisosomiale;</li> <li>- formazione di aggregati &gt; 200 nm attorno ai villi intestinali</li> </ul>

GRUPPO TASSONOMICO (n LAVORI)	MATRICE	E(I)C50, LC50, NOEC (valore medio in mg L <sup>-1</sup> , min-max) - Endpoint, tempo di esposizione	EFFETTI REGISTRATI COMPLESSIVAMENTE
Molluschi (4)	acqua salata		<ul style="list-style-type: none"> <li>- produzione di ROS;</li> <li>- accumulo di nitriti;</li> <li>- aumento della fosforilazione;</li> <li>- diminuzione della stabilità della membrana lisosomiale</li> <li>- alterazione della produzione enzimatica di CAT, SOD, GSH e LPO</li> </ul>
Crostacei (9)	acqua dolce	EC50 = 42 - Ritardo della crescita a 24 h; EC50 = 1,6 - Mortalità a 72 h; EC50 = 0,5 - Mortalità dei neonati a 21 gg.; LC50 = 27 a 24 h; NOEC < 50 - Mortalità a 24 h; NOEC < 0,1 - Mortalità a 48 h	<ul style="list-style-type: none"> <li>- riduzione della capacità riproduttiva;</li> <li>- totale inibizione della riproduzione;</li> <li>- riduzione delle schiuse;</li> <li>- riduzione della crescita degli organismi;</li> <li>- aumento degli effetti tossici del Cu<sup>2+</sup>;</li> <li>- alterazione della produzione enzimatica di GST e CAT;</li> <li>- diminuzione delle metalotioneine;</li> <li>- presenza di ENP sulle articolazioni, sul carapace, nel tratto digestivo e nell'intestino</li> </ul>
Pesci (8)	acqua dolce	LC50 = 124 a 96 h	<ul style="list-style-type: none"> <li>- cambiamento della frequenza respiratoria;</li> <li>- problemi alla capacità di galleggiamento;</li> <li>- abbondante secrezione di muco;</li> <li>- diminuzione del peso corporeo;</li> <li>- aumento del rapporto del peso branchie/corpo e fegato/corpo;</li> <li>- iperplasia del tessuto branchiale;</li> <li>- secrezioni mucose dalle branchie;</li> <li>- edema alle lamelle branchiali;</li> <li>- cambiamenti nei mucociti;</li> <li>- diminuzione della vitalità cellulare;</li> <li>- alterazione dell'attività enzimatica di SOD, LPO, CAT e GSH;</li> <li>- aumento dell'accumulo di As e Cd;</li> <li>- diminuzione dei livelli di Cu e Zn nei tessuti;</li> <li>- diminuzione dei livelli di Zn nei muscoli e nel cervello;</li> <li>- decremento della respirazione cellulare;</li> <li>- presenza di ENP nel cuore e nel cervello</li> </ul>
	acqua salata		<ul style="list-style-type: none"> <li>- diminuzione del tempo di schiusa delle uova che causa la nascita di larve incomplete;</li> <li>- attività natatoria anormale causata da una vescica natatoria anormale o assente e dalla mancanza di elementi radiali sulle pinne caudali e pettorali</li> </ul>

GRUPPO TASSONOMICO (n LAVORI)	MATRICE	E(I)C50, LC50, NOEC (valore medio in mg L <sup>-1</sup> , min-max) - Endpoint, tempo di esposizione	EFFETTI REGISTRATI COMPLESSIVAMENTE
Anfibi (1)	acqua dolce	LC 50 = 252; LC50 = 132 (58-267); NOEC = 90 (78-282) - Mortalità a 14 gg.; NOEC = 39 (9-78) - Mortalità a 14 gg., in presenza di UV	- riduzione della lunghezza totale del corpo; - riduzione della distanza naso-ano
Cetacei (1)	acqua salata		- frammentazione delle basi del DNA

Tabella 6.25 – Riassunto dei diversi lavori effettuati con il nTiO<sub>2</sub>. L'informazione è organizzata per gruppi tassonomici e per tipologia di matrice e mostra i diversi endpoint misurati e le differenti evidenze di effetto ricavate.

## 6.3 Evidenze ecotossicologiche delle altre ENP

### 6.3.1 ENP organiche

#### 6.3.1.1 C<sub>60</sub> e Carbon Black

Lyon et al (2005) hanno testato gli effetti del C<sub>60</sub> sui batteri *E. coli* (Gram-) e *Bacillus subtilis* (Gram+) con esperimenti respirometrici, valutando, cioè, la produzione di CO<sub>2</sub> degli organismi. Come endpoint sono stati valutati il MIC (Minimal Inhibitory Concentration), il MBC (Minimal Bactericidal Concentration) ed il CFU (Colony Forming Unit) per mL. Il risultato evidenziava che, dopo un'esposizione a 4,8 mg L<sup>-1</sup>, sia per *B. subtilis* che per *E. coli*, la produzione di CO<sub>2</sub> declinava; inoltre, i valori di MIC e MBC, per entrambe le specie microbiche, diminuiva sia in funzione della crescente concentrazione, sia all'aumentare del tempo di esposizione. Per entrambe le specie i valori di CFU mL<sup>-1</sup> si riducono sensibilmente dopo l'esposizione per 1 h a concentrazioni di 1,5 e 7,5 mg L<sup>-1</sup> di C<sub>60</sub> e, dopo c.a. 3 h di esposizione, si abbassano di 1 e 3 ordini di grandezza rispettivamente per concentrazioni di 1,5 e 7,5 mg L<sup>-1</sup>. Un aspetto importante di questa ricerca è costituito dallo studio preliminare dei vari mezzi di coltura cellulare. L'autore infatti ha analizzato il comportamento delle ENP in diversi mezzi, constatando come, al crescere della **salinità** di questi, si riscontrava una diminuzione nell'effetto tossico, dovuta all'aumento delle dimensioni degli aggregati formatisi.

Baun et al (2008) hanno allestito un test di inibizione della crescita cellulare a 48 h con l'alga unicellulare *P. subcapitata* ed hanno valutato la capacità delle ENP di C<sub>60</sub> di diventare dei possibili carrier per i composti xenobiotici organici (XOC), misurandone l'assunzione. A tale scopo atrazina, metilparathion, fenantrene e pentaclorofenolo sono stati marcati con il C<sub>14</sub> e utilizzati sia singolarmente che unitamente alle ENP (6 – 10 mg L<sup>-1</sup>). Ne è emerso che le ENP sembrano non influenzare la tossicità dell'atrazina e del metilparathion, mentre invece aumenta del 60% la tossicità del fenantrene. L'effetto sul pentaclorofenolo è positivo, in quanto la sua tossicità, in presenza di C<sub>60</sub>, sembra diminuire di 1,9 volte.

Scott-Fordsmand et al (2008) hanno utilizzato invece esemplari di *Eisenia veneta* per un test di tossicità a 28 gg che utilizzava ENP di C<sub>60</sub> alla concentrazione di 1000 mg·kg di cibo secco<sup>-1</sup>. I risultati evidenziavano nessuna mortalità significativa ma una riduzione della crescita del 20% e della produzione di uova del 78%.

Il CB è stato testato sul mollusco gasteropode *Lymnaea stagnalis* da Harley et al (2009). In un test cronico a 21 gg, le ENP sono state testate alle concentrazioni di 1, 10 e 100 mg L<sup>-1</sup>, valutando gli endpoint della mortalità e della riproduzione. Inoltre è stato allestito il test NRRT (Neutral Red Retention Time) per la misura della fragilità lisosomiale negli emociti. I risultati

evidenziavano che, in corrispondenza di una concentrazione pari a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  c'era la riduzione della crescita degli individui e, per  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , anche una riduzione del tasso di riproduzione. Il massimo effetto sulla membrana lisosomiale si manifestava a  $10 \text{ mg L}^{-1}$ .

Canesi et al (2010) hanno impiegato individui di *M. galloprovincialis* per un test *in vivo* con le ENP di  $C_{60}$ . I molluschi sono stati esposti per 24 h alle concentrazioni di 0,05, 0,2, 1 e  $5 \text{ mg L}^{-1}$ . Negli emociti si è notata una riduzione significativa della stabilità della membrana lisosomiale (LMS) pari al 74%, in corrispondenza di una concentrazione di  $5 \text{ mg L}^{-1}$ . Nella ghiandola digestiva il decremento della LMS, per 1 e  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ , era pari al 66% e al 54%, rispettivamente. In tale ghiandola, inoltre, rispetto al controllo, l'accumulo di lipofuscina, che testimonia l'ossidazione di componenti cellulari, si è rivelato essere di 4 volte maggiore per  $5 \text{ mg L}^{-1}$  e, infine, la risposta enzimatica ha mostrato un aumento dei valori della catalasi del 200% per  $1 \text{ mg L}^{-1}$  di  $C_{60}$ . Nel caso delle branchie, invece, non si sono registrati aumenti dell'attività enzimatica. Le ENP di CB hanno la capacità in *D. magna* di aumentare l'**accumulo di altre sostanze** tossiche, quali tri- e di- butilstannici. E' quanto rilevato da Fang et al (2011) che, in un test di immobilizzazione a 48 h, hanno esposto i crostacei a  $12 - 16 \text{ mg L}^{-1}$  di CB ai quali sono stati aggiunti da 1 a  $12 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  di TBT-Sn e da 60 a  $1500 \text{ mg L}^{-1}$  di DBT-Sn. Gli autori hanno inoltre osservato la dipendenza dell'assunzione dai valori di **pH**. Ne è emerso che le sole ENP di CB non davano effetto fino alla concentrazione di  $50 \text{ mg L}^{-1}$ . L'aggiunta degli organostannici provocava degli effetti avversi legati alla diminuzione di pH. A pH 8, infatti, l'EC<sub>50</sub> a 48 h era di  $3,4$  e  $484 \text{ mg L}^{-1}$ , rispettivamente per TBT e DBT; a pH 6, invece, l'EC<sub>50</sub> era pari a  $2,7$  e  $331 \text{ mg L}^{-1}$ , rispettivamente per TBT e DBT. Lovern et al (2007) hanno invece analizzato i cambiamenti indotti in *D. magna* dal  $C_{60}$ , notando che, per un'esposizione di 60 min a 260 ppb, si manifestava l'aumento della frequenza dei salti (113 salti in più al minuto) ed un aumento della frequenza cardiaca di 43 battiti al minuto.

Si è visto come il  $C_{60}$  tenda ad accumularsi prevalentemente nel cervello di iuvenili di *Micropterus salmoides* dove può causare un aumento della perossidazione lipidica 17 volte superiore rispetto al controllo (Oberdörster et al, 2004). Ritardo nello sviluppo, malformazioni della pinna caudale, edema pericardico ed alla vescica natatoria sono alcuni degli effetti riscontrati da Usenko et al (2007) in embrioni di *D. rerio*, a seguito dell'esposizione a 100 ppb di  $C_{60}$  per 96 h. Gli autori hanno anche osservato casi di morte cellulare attorno alla testa e lungo la notocorda fino alla pinna caudale. Oberdörster et al (2006) hanno testato le medesime ENP anche su *O. latipes*,  $0,5 \text{ ppm}$  per 48 h e  $1 \text{ ppm}$  per 96 h, senza rilevare alcun effetto tossico.

### 6.3.1.2 Nanotubi al C

E' stato notificato che i CNT's, nei confronti dei macrofagi delle cellule polmonari di ratto, presentano una tossicità del tutto simile all'asbesto crisotilo (Wise and Brasuel, 2011).

Ghafari et al (2008) hanno constatato che il batterio *Tetrahymena termofila* è sensibile agli effetti dei CNT's. Infatti, per concentrazioni pari a 1,6, 3,6 e 6,8  $\mu\text{g L}^{-1}$ , gli autori hanno potuto osservare una riduzione, rispettivamente, della mobilità, della voracità e della vitalità cellulare. Inoltre, si è assistito ad una progressiva incapacità di ingerire le prede. Nessun effetto, invece, è stato registrato per i SWCNT's nei confronti di *V. fischeri*, nemmeno alla massima concentrazione di 100  $\text{mg L}^{-1}$  (Velzeboer et al, 2009).

Gli effetti di tossicità dei CNT's si sono manifestati anche sulle alghe unicellulari *Chlorella vulgaris* e *P. subcapitata*. Schwab et al (2011) hanno evidenziato come 5,5  $\text{mg L}^{-1}$  di CNT's causassero l'inibizione della crescita cellulare a 96 h, con valori di EC50, rispettivamente di 24  $\text{mg L}^{-1}$  e 40  $\text{mg L}^{-1}$ . Se però le ENP erano ben disperse, allora i rispettivi valori di EC50 scendevano a 1,8 e 2,5  $\text{mg L}^{-1}$ .

I SWCNT's sono stati testati sull'anellide *Arenicola marina* (Galloway et al, 2010), in un test di tossicità che prevedeva un'esposizione a concentrazioni comprese tra 3 e 300  $\text{mg}\cdot\text{kg}$  di sedimento<sup>-1</sup> per 10 gg, nel quale non è emerso alcun effetto nocivo. Si è visto, inoltre, che i DWCNT's, mescolati al cibo, per un'esposizione complessiva di 28 gg a concentrazioni differenti fino a 495  $\text{mg}\cdot\text{kg}$  cibo secco<sup>-1</sup>, in *E. veneta* non provocavano alcun effetto di mortalità ma, alla massima concentrazione, erano responsabili di una riduzione della crescita (del 20%) e della produzione di uova (del 65%) (Scott-Fordsmand et al, 2008). Le EC50 calcolate per il tasso di riproduzione e per le schiuse risultavano, rispettivamente, > 176  $\text{mg}\cdot\text{kg}$  cibo secco<sup>-1</sup> e > 500  $\text{mg}\cdot\text{kg}$  cibo secco<sup>-1</sup>.

Templeton et al (2006) hanno esposto il crostaceo *Amphiascus tenuiremis* ai SWCNT's per 35 gg, constatando una mortalità del 12%, 19%, 21% e 36%, rispettivamente, alle concentrazioni di 0,58, 0,97, 1,6 e 10  $\text{mg L}^{-1}$ . Per quanto riguarda le fasi dello sviluppo larvale, alla concentrazione di 10  $\text{mg L}^{-1}$ , gli autori hanno osservato una riduzione dello sviluppo da naupli a copepoditi del 51%, da copepoditi ad adulti del 89% e degli organismi adulti del 34%. Il rapporto maschi/femmine ed il numero di uova schiuse non erano inficiati.

*D. magna*, in un test di bioaccumulo dei CNT, è stata esposta da Petersen et al (2009) a concentrazioni di ENM pari a 0,04, 0,1 e 0,4  $\text{mg L}^{-1}$  fino a 48 h. Si è verificato un accumulo dose-dipendente che ha raggiunto i valori massimi del 10%, 45% e 68%, rispettivamente, per le suddette concentrazioni. Tale picco si è verificato tra le 24 e le 48 h, oltre le quali c'è stata una diminuzione.

La trota *O. mykiss* è stata oggetto di studi da parte di Smith et al (2007), i quali l'hanno utilizzata per testare i SWCNT's. Gli iuvenili sono stati esposti a 0,1, 0,25 e 0,5 mg L<sup>-1</sup> di ENM per 10 gg, trascorsi i quali si sono riscontrati abbondanti secrezioni branchiali di muco. L'esame istologico delle branchie rivelava qualche edema alle lamelle secondarie, cambiamenti nei mucociti e iperplasia nelle lamelle primarie. Inoltre, si è riscontrato un aumento dell'aggressività, la perdita del gruppo sociale, scontri e mortalità. Alle concentrazioni più alte, dopo 10 gg, si abbassavano l'ematocrito e l'emoglobina; si abbassavano inoltre i valori di Cu e Zn nei tessuti branchiali ma non di Ca<sup>2+</sup>; aumentava, invece, lo Zn nel cervello; nessun danno particolare si è manifestato nel fegato e nel cervello ma c'è stato l'accumulo di ENM nell'intestino.

Mouchet et al (2008) hanno esposto i girini di *X. laevis* ai DWCNT's, per 12 gg, a concentrazioni pari a 1, 10, 100 e 500 mg L<sup>-1</sup>. Sono stati allestiti 2 diversi test, il primo, condotto in condizioni statiche, il secondo, in presenza di un aeratore. La mortalità si è manifestata in corrispondenza di 500 mg L<sup>-1</sup>, rispettivamente, 85% e 5% per il primo ed il secondo esperimento. A 10 e 100 mg L<sup>-1</sup> non c'è stata mortalità nel primo test, mentre nel secondo si sono registrati valori pari a 15% e 5%. Nessun effetto tossico si è visto negli eritrociti. Le larve, esposte a 10 mg L<sup>-1</sup>, manifestavano la presenza di masse nere nelle branchie, nel tratto digestivo e nell'intestino.

### 6.3.2 ENP inorganiche

#### 6.3.2.1 Q-Dots

Wang J. et al (2008) hanno evidenziato la tossicità dei QDs (CdTe) nei confronti dell'alga verde unicellulare *C. reinhardtii*. Per 5 gg le alghe sono state esposte ad una concentrazione di 0,1 mg L<sup>-1</sup>, 1 mg L<sup>-1</sup> e 10 mg L<sup>-1</sup>. L'inibizione cellulare era visibile già a partire da 1 mg L<sup>-1</sup> di ENM ed il valore di EC50 a 72 h risultava pari a 5 mg L<sup>-1</sup>. Inoltre, dopo 3 h di trattamento alla concentrazione di 0,1 mg L<sup>-1</sup>, risultava accresciuto il livello dell'mRNA legato alla trascrizione di geni che sono tipici di condizioni di stress. La tossicità dei QDs (CdSe) è stata testata anche nei confronti dell'alga *P. subcapitata* (Bouldin et al, 2008) con risultati completamente diversi. Il test acuto a 96 h infatti, con esposizione a 11 e 55 ppb, ha fatto registrare una EC50 pari a 37,1 ppb ovvero 0,037 mg L<sup>-1</sup> (2 ordini di grandezza più piccolo rispetto all'esperimento di Wang J. et al).

Nel mollusco *Elliptio complanata* i QDs (di CdTe) sembrano accumularsi prevalentemente nella ghiandola digestiva piuttosto che nelle branchie (Gagnè et al, 2008). L'esposizione a 1,6, 4 e 8 mg L<sup>-1</sup> per 24 h non sembrava dare alcun effetto mortale, né di debolezza nella chiusura delle

valve. Appariva inibita la fagocitosi (massimo effetto a 4 mg L<sup>-1</sup>); non cambiava la densità degli emociti ma si riduceva la loro vitalità di 1,4 volte.

*C. dubia* è stata oggetto degli studi di Bouldin et al (2007) che hanno verificato la tossicità di QDs di CdSe per un'esposizione di 48 h fino a 110 ppb, ricavando un valore di EC50 > 110 ppb.

### 6.3.2.2 ENP metalliche e loro ossidi

#### Ag

Nei confronti di *E. coli* e *B. subtilis* è stata testata la tossicità di una nanopolvere commerciale di Ag (Lee et al, 2009). Come termine di confronto inoltre, è stata testata la tossicità dello ione Ag<sup>+</sup> ricavato dai sali di AgNO<sub>3</sub>. Ne è risultato che il nAg sortiva un effetto antibatterico pari al 99,90% su *E. coli*, per un'esposizione di 1 h alla concentrazione di 0,168 ppm. Meno pronunciato invece, è stato l'effetto su *B. subtilis* il cui numero di colonie, espresso come Log(CFU), era mediamente più alto. Per spiegare questo fenomeno, gli autori ipotizzano che vi sia differenza tra l'interazione delle NP ed i meccanismi di difesa cellulare dei batteri Gram- e Gram+. Gli effetti dello ione Ag<sup>+</sup> **non parevano differire** da quelli del nAg, infatti l'effetto antimicrobico in *E. coli* era del 97% per concentrazioni di 0,159 ppm e del 100% per concentrazioni superiori. L'efficace effetto antibatterico del nAg è stato confermato anche dagli esperimenti di Esteban et al (2009) sul batterio Gram+ *Micrococcus luteus*. In questo esperimento si sono utilizzate sia argilla (sepiolite) che fibre di vetro dopate con nAg (0,036% in peso). Nel caso delle argille, a 24 h e 48 h il valore di CFU ml<sup>-1</sup> si riduceva rispettivamente di 5 e 8 ordini di grandezza rispetto al controllo mentre, nel caso delle fibre di vetro, a 24 h era solamente 6 ordini di grandezza più piccolo rispetto al controllo, mentre a 48 h si manifestava un effetto battericida del 100%.

Nel sopra citato articolo di Lee et al (2009) la tossicità del nAg in polvere era testata anche sui lieviti *Saccharomyces cerevisiae*. A differenza del test sui procarioti, l'esposizione a 0,168 ppm non ha fatto apprezzare effetti significativi sulla riduzione del numero di colonie. L'autore ipotizza che la differenza sia dovuta al fatto che *S. cerevisiae* è un organismo **eucariote**, nel cui genoma è presente una proteina delegata all'omeostasi degli ioni metallici. Il nAg è risultato tossico anche nei confronti dei funghi *Trichoderma* spp., *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. (Petica et al, 2008). L'effetto antimicrobico si è manifestato nei funghi esposti per 14 gg a concentrazioni di ENP fino a 35 ppm.

L'effetto antimicrobico del nAg è confermato anche dagli esperimenti di Myung-Hwan et al (2009) sull'alga verde unicellulare *Microcystis aeruginosa*. Da questi è emerso come, per un'esposizione complessiva di 2 settimane a concentrazioni di 0,001, 0,01, 0,1 e 1 mg L<sup>-1</sup>,

l'effetto algicida fosse rispettivamente pari a 2,5%, 14%, 39% e 87%. Miao et al (2009) hanno allestito un test di tossicità con l'alga marina *Thalassiosira weissflogii*, esponendola a diverse concentrazioni di nAg (da  $2 \cdot 10^{-9}$  a  $1 \cdot 10^{-7}$ ) per 48 h. Gli autori ne hanno ricavato una diminuzione nelle dimensioni delle cellule e la repressione dell'attività fotosintetica e della produzione di clorofilla.

In *E. fetida* le ENP di Ag ( $1000 \text{ mg} \cdot \text{kg suolo}^{-1}$ ) dopo 28 gg di esposizione inibiscono la riproduzione degli anellidi del 100% (Heckmann et al, 2011).

Griffit et al (2008) hanno misurato gli effetti del nAg esponendo esemplari di *C. dubia* e *D. pulex* per 48 h a concentrazioni pari a 0,6, 0,36, 1,67 e 2,78 volte il valore di LC50, precedentemente osservato. Gli autori hanno così ricavato, per le due specie, un valore di LC50 rispettivamente pari a 0,067 e 0,040  $\text{mg L}^{-1}$ . Gaiser et al (2009), invece, hanno esposto *D. magna* per 96 h a concentrazioni di nAg comprese tra 1 e 10  $\text{mg L}^{-1}$ , osservando una mortalità del 60% in corrispondenza di 0,1  $\text{mg L}^{-1}$ .

Asharani et al (2008) hanno utilizzato gli embrioni di *D. rerio* per testare la tossicità del nAg. L'esposizione, a concentrazioni pari a 5, 10, 25, 50 e 100  $\text{mg L}^{-1}$ , è durata 72 h. A 5  $\text{mg L}^{-1}$  gli autori osservavano come il fluido del corion presentasse torbidità; l'LC50 variava tra 25 e 50  $\text{mg L}^{-1}$  in funzione dello stadio di sviluppo. A 24 h si è osservato edema pericardico che diveniva cronico dopo 72 h di esposizione. Sopra i 50  $\text{mg L}^{-1}$  il 60 - 90% di embrioni sopravvissuti presentava malformazioni: sacca natatoria distorta ed edema pericardico, notocorda piegata e diminuzione della frequenza cardiaca a 39 battiti al minuto. Si è osservato inoltre un ritardo nelle schiuse. Le ENP sembravano accumularsi preferibilmente nel nucleo delle uova e, negli embrioni, penetravano nella pelle, nel cuore e nel cervello. Gli embrioni della stessa specie sono stati utilizzati anche da Yeo and Kang (2008), i quali li hanno esposti a 10 e 20 ppt di nAg fino a 72 h, notando come effetti: sviluppo anormale della notocorda, occhi non sviluppati, testa troppo piccola, battito cardiaco debole ed edema. Inoltre, si è verificato l'abbassamento del tasso delle schiuse ed un aumento complessivo della catalasi. Effetti molto consistenti del nAg sono stati osservati anche da Laban et al (2010) nei confronti degli embrioni di *Pimephales promelas*. Questi sono stati esposti a 0,625, 1,25, 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20 e 25  $\text{mg L}^{-1}$  di ENP per 96 h. A seconda che le ENP fossero state disperse con la **sonicazione** o mediante **stirring**, LC50 rilevato è stato pari, rispettivamente, a 9,4 e 1,25  $\text{mg L}^{-1}$ . Gli effetti rilevati erano: assenza di vescica natatoria, sviluppo di edema pericardico e alla sacca ovigera, emorragia alla testa e lordosi; le ENP ricoprivano la superficie delle uova ma potevano essere rinvenute anche in blocchi all'interno degli embrioni.

## Au

Wang C. et al (2011) hanno testato il nAu su colture batteriche di *Agrobacterium tumefaciens*, *B. subtilis* e *E. coli*. Per tutte e tre le specie, l'esposizione di 10 h, attraverso il mezzo di coltura, a concentrazioni di 1 e 5 mg L<sup>-1</sup> non ha prodotto alcun effetto avverso.

Renault et al (2008) hanno eseguito un test di bioaccumulo del nAu attraverso la catena alimentare, avvalendosi dell'alga *S. suspicatus* e del mollusco bivalve *Corbicula fluminea*. Le alghe sono state esposte per 24 h a 4 differenti concentrazioni di ENP comprese tra 1,6·10<sup>2</sup>, 1,6·10<sup>3</sup>, 1,6·10<sup>4</sup> e 1,6·10<sup>5</sup> NP di Au·cell<sup>-1</sup>; ne è emersa una mortalità compresa tra 20% e 26% alle prime 3 concentrazioni e del 40% alla concentrazione più alta. Il valore di LD50 a 24h era pari a 1,6·10<sup>5</sup> NP di Au·cell<sup>-1</sup>. Per quanto riguarda i bivalvi, nutriti con le alghe contaminate, nell'epitelio digestivo si è osservata la presenza di ENP sia dentro le cellule che nei nuclei cellulari; nelle branchie, invece, le ENP erano presenti solo nelle vescicole. Gli endpoint dello stress ossidativo hanno evidenziato repressione della superossido dismutasi, del glutatione S-transferasi e del citocromo C-ossidasi nelle branchie; nelle viscere, invece, c'è stata induzione della catalasi.

Ferry et al (2008) hanno effettuato uno studio sul trasferimento delle ENP di Au dalla colonna d'acqua alla rete trofica. In pratica, all'interno di vasche piene di terra ed acqua marina, gli autori hanno allestito dei **mesocosmi** costituiti da vegetazione (*Spartina alterniflora*), biofilm microbici, molluschi bivalvi (*Mercenaria mercenaria*) e gasteropodi (*Ilyanassa obsoleta*), crostacei (*Palaemonetes pugio*) e pesci (*Cyprinodon variegatus*). Le ENP sono state aggiunte una sola volta in 12 gg, in quantità tale da ottenere, dopo 24 h, una concentrazione finale pari a 0,4 µg · kg<sup>-1</sup> di sedimento. I risultati mettevano in luce che l'assorbimento totale in massa era pari a 84,4%. Di questo, il 60% sembrava essere stato assorbito dai biofilm microbici che, secondo gli autori, sono dotati di cariche negative superficiali. La spartina ne aveva assorbito lo 0,5%, valore atipico, a detta degli autori, trattandosi di piante vascolari. I bivalvi, essendo filtratori, ne avevano assorbito il 5%, mentre le lumache solo lo 0,05%, poco per essere organismi che si nutrono di biofilm microbici. Gamberetti e pesci, infine, avevano assorbito lo 0,03% e lo 0,5%, rispettivamente, ma con una diversa distribuzione: nei gamberetti, infatti, il nAu era presente in tutto l'organismo, indistintamente, nei pesci, invece, si poteva osservare solamente nell'intestino.

## nZnO

Adams et al (2006) hanno testato il nZnO su colture di *B. subtilis*, osservando un'importante inibizione della crescita batterica (90%) a partire da una concentrazione di 10 ppm e che raggiunge il 98% in corrispondenza di 50, 100 e 500 ppm. Gli stessi autori hanno eseguito il medesimo test con *E. coli*, ricavando delle evidenze di tossicità inferiori. L'inibizione della crescita, infatti, era minima (14%) a 10 ppm e non superava il 48% a 1000 ppm. Liu et al (2011) hanno misurato l'azione tossica del nZnO sui batteri del ceppo *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*, confermando gli effetti sulla capacità denitrificante di tali batteri sui fanghi attivi. Mortimer et al (2009), invece, hanno lavorato con il batterio marino *V. fischeri* ed il test di bioluminescenza a 30 min, eseguito in cuvette ed in microplates, ha fornito i valori di EC50 pari a 4,8 mg L<sup>-1</sup> e 3,8 mg L<sup>-1</sup>.

La tossicità del nZnO nei confronti di *S. cerevisiae* è stata testata da Kasemets et al (2009). Lo studio ha messo in risalto il confronto tra gli effetti delle sostanze nanostrutturate e quelli dei rispettivi bulk. I risultati sono stati messi in relazione alla curva di crescita. Ad 8 h dall'inoculo si sono misurati valori di EC50 pari a 121 mg L<sup>-1</sup> e 134 mg L<sup>-1</sup>, rispettivamente per il **nano** ed il **bulk**, evidenziando, quindi, un'azione tossica **molto simile**.

Gli effetti del nZnO nei confronti di *P. subcapitata* sono stati studiati da Aruoja et al (2006). Il test di inibizione della crescita cellulare ha messo in luce un valore di EC50 pari a 0,042 mg L<sup>-1</sup>, un EC20 = 0,023 mg L<sup>-1</sup> ed una NOEC = 0,017 mg L<sup>-1</sup>.

Wong et al (2009) hanno impiegato le alghe marine *T. pseudonana* e *S. costatum* in un test di inibizione della crescita cellulare, ricavando a 96 h un valore di IC50, rispettivamente, pari a 4,56 mg L<sup>-1</sup> e 2,36 mg L<sup>-1</sup>.

Wang H. et al (2008) hanno misurato la tossicità delle ENP di ZnO avvalendosi dei nematodi *C. elegans*. L'esposizione, durata 24 h, a 0,4, 0,8, 1,6, 4,1, 6,1 e 8,1 mg L<sup>-1</sup> ha evidenziato come, all'aumentare della concentrazione, aumentasse la letalità; invece la lunghezza dei vermi, il numero delle uova e la percentuale delle schiuse diminuivano in risposta all'aumento degli effetti tossici.

Embrioni dell'echinoderma *Lytechinus pictus* sono stati utilizzati da Fairbairn et al (2011) per testare il nZnO. L'esposizione è avvenuta a 0,1, 1 e 10 mg L<sup>-1</sup> per 96 hpf. Gli effetti, registrati a 0,1, 0,15 e 0,20 mg L<sup>-1</sup> erano, rispettivamente, pari a 38%, 95% e 100% e l'EC50 = 0,098 mg L<sup>-1</sup>.

Nel loro test di tossicità con *D. magna* ed il nZnO, Heinlaan et al (2007) hanno rilevato, a 24 h, un valore di LC50 pari a 3,2 mg L<sup>-1</sup>, un LC20 di 2,45 mg L<sup>-1</sup> ed una NOEC = 0,5 mg L<sup>-1</sup>. Questi risultati sono allineati con quanto rilevato, invece, da Blinova et al (2010) che con la stessa

specie, a 48 h, hanno misurato dei valori di EC50 compresi in un intervallo che si estendeva tra 1,7 e 9 mg L<sup>-1</sup>. Il crostaceo *T. platyurus* è stato impiegato nei test di tossicità sia da Heinlaan et al (2007) che da Blinova et al (2010). I primi hanno rilevato, a 48 h, una LC50 = 0,18 mg L<sup>-1</sup>, un LC20 = 0,12 mg L<sup>-1</sup> ed una NOEC = 0,03 mg L<sup>-1</sup>; i secondi, invece, a 24 h, hanno potuto registrare una EC50 compreso tra 0,14 e 6 mg L<sup>-1</sup>. Wong et al (2009) ha impiegato due crostacei di acqua salata, ovvero *Elasmus rapax* e *Tigriopus japonicus*. Nonostante la differenza delle specie, i valori di LC50, rilevati a 96 h, erano confrontabili, poiché rispettivamente pari a 1,19 e 0,85 mg L<sup>-1</sup>.

Bai et al (2009) hanno esposto al nZnO embrioni di *D. rerio*, a concentrazioni di 1,5, 10, 25, 50 e 100 mg L<sup>-1</sup> fino a 96 h. La mortalità ricavata a 50 e 100 mg L<sup>-1</sup> era rispettivamente pari a 28,3% e 65%; inoltre, gli autori hanno potuto osservare che, se aumentava la concentrazione, diminuiva il tasso di schiuse, mentre si allungavano i tempi necessari per queste. L'HT50 (Hatching Time) era compreso tra 1 e 25 mg L<sup>-1</sup>. A 96 h si sono potute notare malformazioni alla coda degli embrioni. La stessa specie è stata utilizzata anche da Xiong et al (2010) per misurare la letalità e lo stress ossidativo del nZnO indotti in esemplari di 120 gg esposti per 96 h a concentrazioni pari a 2,5, 10, 30 e 50 mg L<sup>-1</sup>. A 30 mg L<sup>-1</sup> la mortalità osservata era del 100%, con una EC50 = 4,92 mg L<sup>-1</sup>. A 5 mg L<sup>-1</sup> si è resa evidente una riduzione di SOD nel fegato ed un suo aumento nell'intestino; inoltre, c'è stata una riduzione di CAT nel fegato, nell'intestino e nelle branchie, nonché, un decremento di GHS nel fegato. Sempre in corrispondenza di 5 mg L<sup>-1</sup> si rilevavano danni alle cellule branchiali, come la perdita di citoplasma e una forma anormale dei nuclei.

Johnston et al (2011) hanno effettuato un esperimento di bioaccumulo di ENP dalla colonna d'acqua e dall'alimentazione con la trota *O. mykiss*. L'esposizione attraverso la colonna d'acqua era compresa tra 24 h e 14 gg, quella attraverso il cibo si protraeva, invece, fino a 21 gg. Le concentrazioni impiegate erano di 50, 500 e 5000 µg L<sup>-1</sup>. L'assunzione, in entrambi i casi, è risultata non significativa rispetto al controllo.

Nations et al (2011) hanno esposto degli embrioni di *X. laevis* al nZnO, alle concentrazioni di 0,125, 0,25, 0,50, 1 e 2 mg L<sup>-1</sup>. L'esposizione era stata fatta iniziare già *in ovo* e si è protratta fino al raggiungimento del 66° livello di sviluppo. Gli autori hanno ricavato che i livelli delle ENP nei tessuti aumentavano con la concentrazione, iniziando da 0,305 mg L<sup>-1</sup>. Alle concentrazioni di 0,067, 0,159 e 0,305 mg L<sup>-1</sup> la mortalità rilevata era ≤ 10%; una mortalità = 40% si è vista a 0,80 mg L<sup>-1</sup>, mentre il 97% delle mortalità si verificava dopo il 4° giorno. A partire dal 10° giorno erano evidenti delle differenze nei tempi dello sviluppo e, per quanto riguarda le percentuali di completamento della metamorfosi al 35° giorno, sono emerse le

seguenti evidenze: controllo = 10%; 0,067 mg L<sup>-1</sup> = 25%; 0,159 mg L<sup>-1</sup> = 4%; a 0,513 mg L<sup>-1</sup> solo il 58% terminava lo sviluppo. Nessun embrione si è potuto sviluppare a 0,80 mg L<sup>-1</sup>.

### *nCuO*

Il nCuO è stato testato da Mortimer et al (2008) con il batterio *V. fischeri*. Il test di bioluminescenza a 30 min, eseguito in cuvette ed in microplates, ha fornito i valori di EC50 pari a 68,1 mg L<sup>-1</sup> e 204 mg L<sup>-1</sup>, una tossicità, quindi, molto inferiore rispetto a quella che gli stessi autori hanno riscontrato utilizzando il nZnO. Mortimer et al (2010) hanno allestito un test con *T. termophila* per misurare la tossicità del nCuO e ne è emerso un valore di EC50 a 4 h pari a 127 mg L<sup>-1</sup> e a 24 h pari a 97,9 mg L<sup>-1</sup>. I valori di EC50, a 4 h e a 24 h, ricavati testando il **bulk** erano, rispettivamente, di **10 e 20 volte superiori**.

Kasemets et al (2009) hanno misurato gli effetti del nCuO su *S. cerevisiae*, ricavandone valori di EC50 pari a 20,7 mg L<sup>-1</sup> e 1297 mg L<sup>-1</sup>, rispettivamente per le ENP ed il bulk, evidenziando un'azione tossica nettamente superiore delle ENP, a differenza di quanto visto per il nZnO.

L'alga unicellulare *P. subcapitata* è stata oggetto di studio da parte di Aruoja et al (2006), che hanno potuto testare gli effetti del nCuO. Il test di inibizione della crescita cellulare ha messo in luce un valore di EC50 pari a 0,71 mg L<sup>-1</sup>, un EC20 = 0,50 mg L<sup>-1</sup> ed una NOEC = 0,42 mg L<sup>-1</sup>.

Adulti di *M. galloprovincialis* esposti a 10 µg L<sup>-1</sup> di CuO per 15 gg non hanno fatto registrare effetti di mortalità ma, dall'esame delle branchie, è emerso un accumulo di ENP compreso tra 9,8 e 12,5 µg g<sup>-1</sup> (Gomes et al, 2011). Si è visto inoltre: un aumento di SOD in modo lineare, e di CAT, dopo 3 gg; il GPX è rimasto costante; le MT aumentavano linearmente ed è stato registrato un decremento dose-dipendente dell'enzima acetilcolinesterasi. *Scrobicularia planaria* è stata adoperata da Buffet et al (2011) per un test che ha valutato non solo degli endpoint cellulari ma anche comportamentali. L'esposizione a 10 µg L<sup>-1</sup> di CuO per 16 gg, ha fatto registrare l'aumento di ENP negli organismi, l'aumento di CAT, di GST, di SOD e di MTLP (MetalloTioneine Like Protein). Inoltre si è vista una diminuzione del comportamento dell'infossamento e del tasso di nutrizione.

Heinlaan et al (2007) hanno testato il nCuO con *D. magna*, osservando, a 24 h, un valore di LC50 pari a 3,2 mg L<sup>-1</sup>, un LC20 di 1,2 mg L<sup>-1</sup> ed una NOEC = 0,5 mg L<sup>-1</sup>. Le evidenze sperimentali ricavate da Blinova et al (2010), con la stessa specie, non sono confrontabili poiché hanno mostrato, a 48 h, dei valori di EC50 compresi in un intervallo che si estendeva tra 2,6 e 200 mg L<sup>-1</sup>. Heinlaan et al (2007) nel lavoro già citato hanno impiegato anche il crostaceo *T. platyurus*, esponendolo per a 48 h alle ENP di nCuO e ricavandone un valore di LC50 = 2,1 mg L<sup>-1</sup>, un LC20 = 1,65 mg L<sup>-1</sup> ed una NOEC = 1,5 mg L<sup>-1</sup>.

Embrioni di *D. rerio* sono stati esposti al nZnO a concentrazioni pari a 1,5, 10, 25, 50 e 100 mg L<sup>-1</sup> per 8, 24, 32, 48 e 96 h (Bai et al, 2009). Gli autori hanno osservato che, a 96 h, la mortalità era a 50 e 100 mg L<sup>-1</sup>, rispettivamente, per 28,3% e 65% mg L<sup>-1</sup>; inoltre, all'aumentare della concentrazione di esposizione, diminuiva il tasso di schiuse e si allungavano i tempi necessari alla schiusa. L'HT50 (tempo di schiusa mediano), che nel controllo era risultato pari a c.a. 52 h, a 5 mg L<sup>-1</sup> era di 72 h c.a. Infine, sono state osservate malformazioni alla coda a degli embrioni a 96 h, per una concentrazione > 10 mg L<sup>-1</sup>. Embrioni della medesima specie sono stati impiegati da Xiong et al (2011) per un test di tossicità a 96 h. La concentrazione di esposizione più alta era di 50 mg L<sup>-1</sup>. In corrispondenza di 30 mg L<sup>-1</sup> gli autori hanno potuto registrare una mortalità pari al 100% ed un valore di LC50 = 4,92 mg L<sup>-1</sup>; a 5 mg L<sup>-1</sup>, inoltre, si è potuto apprezzare, rispetto al controllo, un aumento di SOD nel fegato (70,2%) e nell'intestino (149,6%), mentre nelle branchie i valori rimanevano costanti. È stata apprezzata, inoltre, una diminuzione di CAT nel fegato, nell'intestino ma non nelle branchie; l'attività di GSH seguiva quella di CAT. A 5 mg L<sup>-1</sup> nelle branchie non si è visto alcun danno alle membrane cellulari ma sono state rilevate la fuoriuscita e la perdita di materiale cellulare. Johnston et al (2010) hanno esposto esemplari adulti di *O. mykiss* al nZnO sia attraverso la colonna d'acqua, tra 24 h e 14 gg, sia attraverso l'alimentazione per 21 gg a 50, 500 e 5000 µg L<sup>-1</sup> allo scopo di misurare la biodisponibilità delle ENP. I risultati hanno evidenziato un'assunzione non significativa in entrambi i casi, leggermente superiore per l'assunzione attraverso il mezzo acquoso.

## **7. TOSSICOLOGIA DELLE ENP**

In questo capitolo sono fornite alcune informazioni inerenti la tossicologia umana delle nanoparticelle, quali le possibili vie di ingresso negli organismi, i processi di penetrazione all'interno delle cellule ed i meccanismi di innesco degli effetti di tossicità. Sono inoltre elencate alcune delle patologie osservate, riconducibili all'esposizione a tali nanomateriali.

## 7. TOSSICOLOGIA DELLE ENP

### 7.1 Tossicocinetica delle ENP

#### 7.1.1 Barriere fisiologiche

Ancora una volta, le problematiche che si riscontrano nell'affrontare questa materia sorgono dal divario esistente tra la velocità della diffusione e dell'utilizzo degli ENM e le difficoltà della valutazione dell'esposizione nei soggetti esposti, che, attualmente, rimane molto complessa. E' assodato che, durante l'esposizione, le ENP possono penetrare nell'organismo attraverso le principali barriere fisiologiche, costituite da: **sistema respiratorio, cute e sistema digerente** (Simkò et al, 2010). Superate tali barriere, le ENP possono immettersi nella **circolazione sanguigna** e, in questo caso, sono in grado, potenzialmente, di raggiungere tutti gli altri organi e tessuti, in maniera più o meno diretta (fig. 7.1).

#### *Inalazione*

Attualmente, l'assunzione delle ENP attraverso l'**inalazione** è considerata la via di esposizione più critica, in particolar modo per coloro i quali lavorano nei vari settori di produzione (Wang et al, 2011). I polmoni offrono quasi 2300 Km di vie aeree e si compongono di circa 300 milioni di alveoli. Le barriere respiratorie possono filtrare al massimo particelle aventi 0,5 µm di diametro, grazie ai filtri più fini costituiti dagli alveoli bronchiali. Tuttavia si intuisce come essi siano insufficienti a fermare le ENP propriamente dette (1 - 100 nm). Attraverso la respirazione, quindi, queste possono diffondersi nei polmoni e, da qui, nella circolazione sanguigna. Inoltre, esiste una via d'accesso più breve, diretta al sistema nervoso, che passa per i bulbi olfattivi (fig. 7.2). Sembra che l'interazione tra le ENP ed il parenchima polmonare possa variare in funzione della forma, sferica o allungata, di tali materiali. Le ENP sferiche sembrano potersi depositare sui polmoni più facilmente, riuscendo, poi, a penetrare nella circolazione sistemica (Oberdörster et al, 2005).

#### *Contatto cutaneo*

Se la **cute** è sana, il suo strato superficiale, denominato epiderma, risulta sostanzialmente impermeabile alle ENP ma il livello sottostante, ovvero il derma, è abbondantemente irrorato di sangue e quindi è potenzialmente in grado di trasportare le ENP, convogliandole nel sistema linfatico (Oberdörster et al, 2005).

## Ingestione

Il tratto gastro-intestinale è un complesso sistema di barriere di scambio e costituisce la principale via attraverso cui le macromolecole possono entrare nel corpo. I villi ed i microvilli intestinali, la cui superficie totale è all'incirca pari a 200 m<sup>2</sup>, sono responsabili della maggior parte dell'assorbimento. Da qui, le ENP possono trasferirsi nel sistema linfatico e, successivamente, nella circolazione sanguigna (Skocaj et al, 2011).

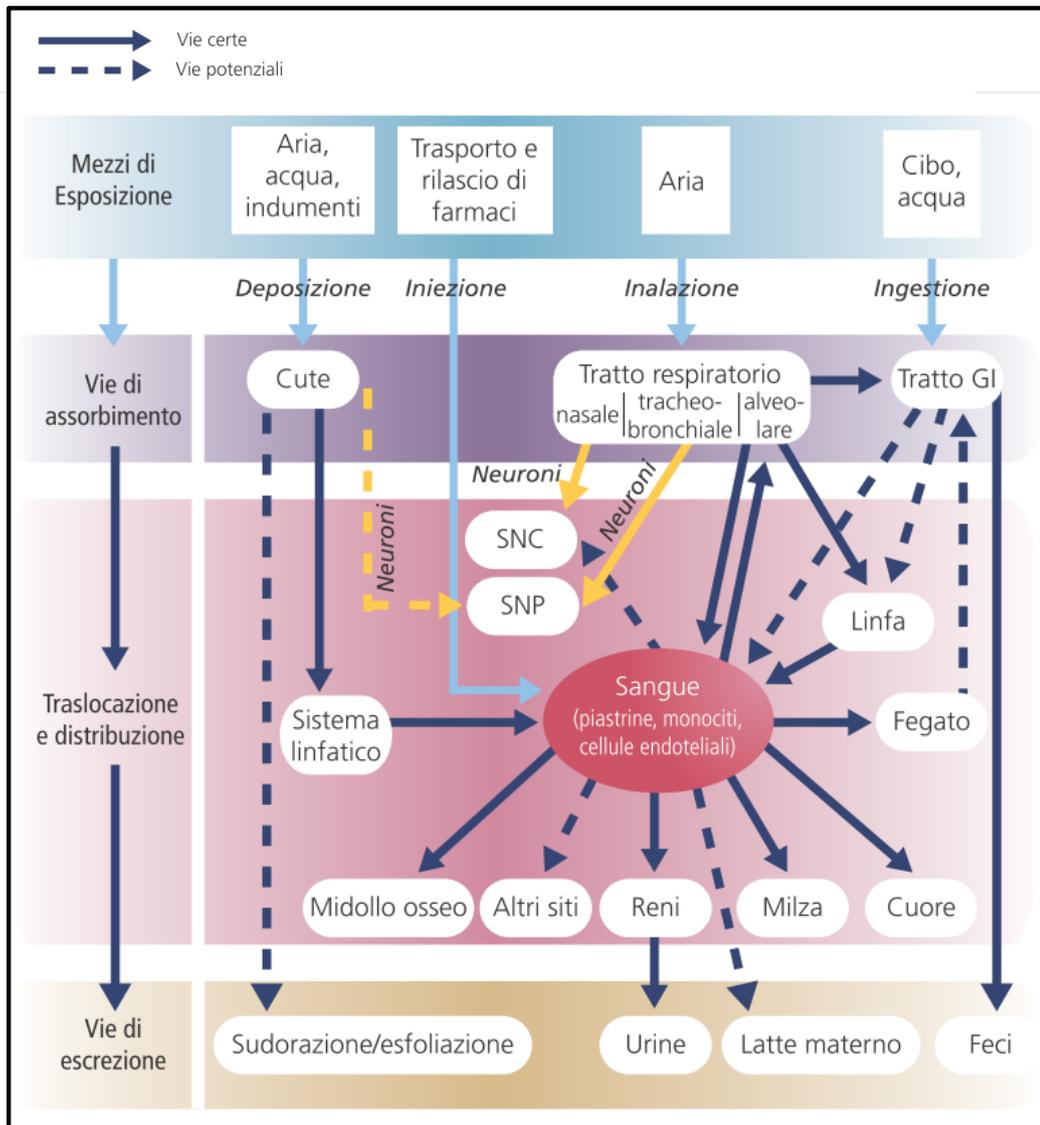


Figura 7.1 – Vie di ingresso certe (linee piene) e potenziali (tratteggio) per le ENP all'interno del corpo umano. GI = Gastro Intestinale; SNC = Sistema Nervoso Centrale; SNP = Sistema Nervoso Periferico (Libro Bianco – Effetti sulla salute dei nanomateriali ingegnerizzati, Autori Vari, 2010).

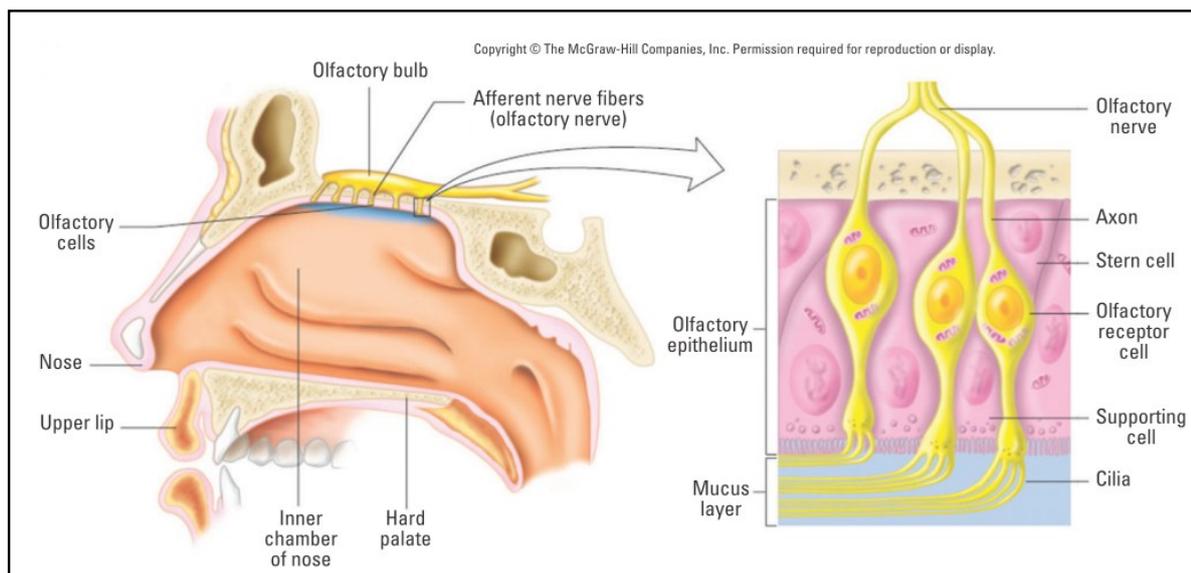


Figura 7.2 – Vie d'accesso al sistema nervoso, attraverso i bulbi olfattivi (Oberdörster et al, 2005).

### 7.1.2 Ingresso nelle cellule

Sembra che le ENP possano penetrare all'interno delle cellule preferibilmente attraverso i processi di endocitosi (Skocaj et al, 2011). In particolar modo, la via di assunzione preferenziale delle ENP aventi dimensioni comprese tra 50 e 200 nm sembra essere l'endocitosi mediata da **clatrina**, una proteina che accentua l'invaginazione della membrana cellulare, coadiuvando la formazione di una vescicola (Barillet et al, 2010). Particelle comprese tra 200 e 1000 nm, invece, entrerebbero soprattutto attraverso la **macropinocitosi** o l'endocitosi mediata da **caveolae**, una sorta di fossette della superficie cellulare che si introflettono nella cellula (Barillet et al, 2010) (fig. 7.3). Altri autori (Oberdörster et al, 2005) ipotizzano il meccanismo di **transcitosi**, una forma di pinocitosi in cui il materiale viene trasportato in una certa regione della membrana cellulare, in maniera non libera ma vincolata. Secondo Skocaj et al (2011), infine, le ENP possono penetrare nelle cellule anche per semplice **diffusione passiva**. Naturalmente l'assunzione delle ENP da parte delle cellule dipende dalle già citate proprietà quali dimensioni, forma, carica superficiale, solubilità e dalla presenza di gruppi funzionali che le possono rendere idrofile o lipofile.

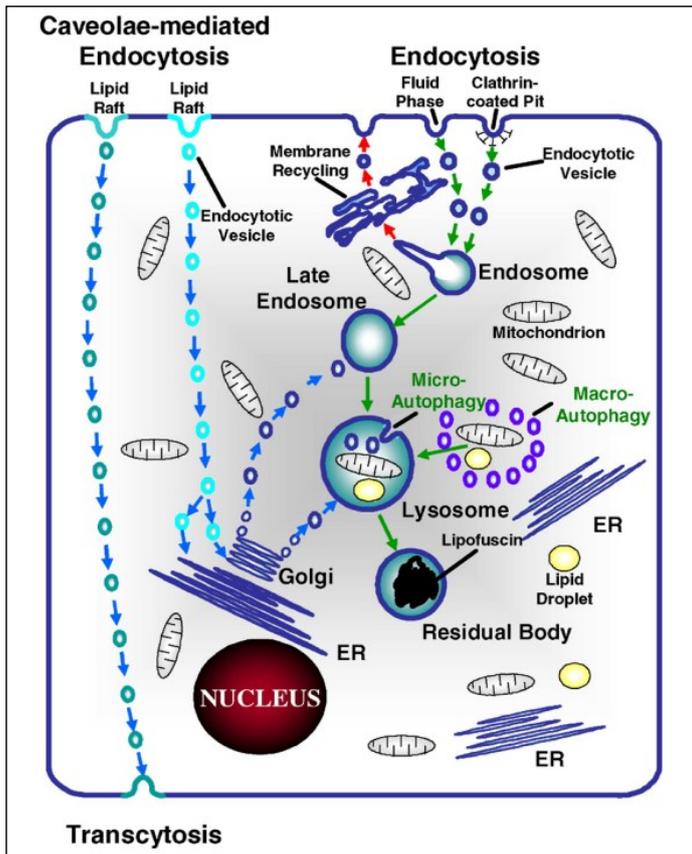


Figura 7.3 – Vie di accesso preferenziali per l'ingresso delle ENP nelle cellule: endocitosi, macropinocitosi mediata da caveole e transitosi (Moore et al, 2006).

## 7.2 Tossicodinamica delle ENP

E' da premettere che l'informazione di cui oggi si dispone è stata ricavata da esperimenti *in vivo* effettuati principalmente su piccoli roditori oppure da test *in vitro* su linee cellulari sia animali che umane.

### 7.2.1 Principali meccanismi di tossicità

Una volta superate le barriere cellulari, le ENP possono dare inizio all'azione tossica. Gli effetti di tossicità possono essere molti e differenti, a seconda del tipo di ENP, del bersaglio da queste raggiunto e del tipo di risposta immunitaria innescata ma l'insieme di processi che portano alla manifestazione degli effetti patologici si possono raggruppare in poche categorie.

Uno dei meccanismi di tossicità più comunemente indotto dalle ENP è quello della **produzione di ROS**. Quasi tutte le ENP organiche e metalliche, una volta all'interno delle cellule, riescono a favorire la produzione di sostanze altamente reattive in grado di causare stress ossidativo. Questo, a sua volta, è responsabile di danni cellulari quali distruzione dei mitocondri, danni alla struttura del DNA e delle proteine, degenerazione dello strato fosfolipidico della membrana cellulare e apoptosi. (AA.VV., Libro Bianco, 2010).

Un altro meccanismo di tossicità, comune alle sole ENP metalliche, è legato al **rilascio di ioni** che possono interferire con i processi cellulari. Ad esempio, nel caso specifico del nAg, tale fenomeno è responsabile dell'interferenza con i processi di riproduzione cellulare (Quadros and Marr, 2010).

Infine, si vuole menzionare un meccanismo di tossicità, ad oggi osservato solamente nei SWCNTs, che consiste in un **danno strutturale** della cellula. Lo studio di Tian et al (2007) sui fibroblasti umani esposti ai SWCNT's metteva in luce come questi ENM interferissero con le proteine del citoscheletro cellulare, impedendo alla cellula di aderire alla matrice extracellulare. In questo modo la struttura funzionale della cellula risultava inesorabilmente compromessa (figg. 7.4 a) e b), 7.5 e 7.6).

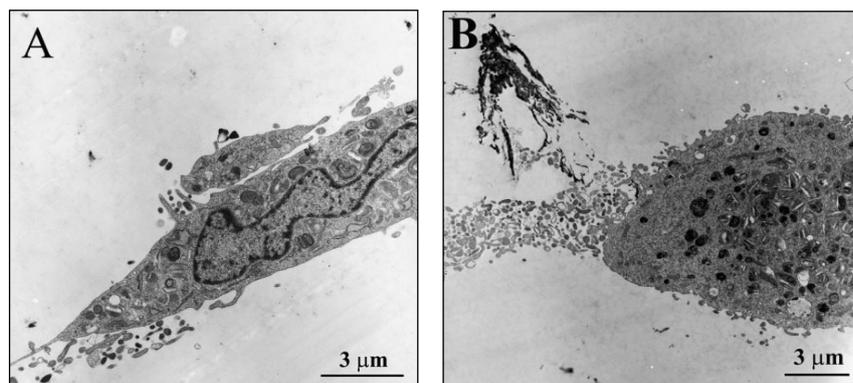


Figura 7.4 a) e b) – Morfologia di fibroblasti umani: cellula tipicamente normale (a) ed esposta a SWCNT's (b) (Tian et al 2007).

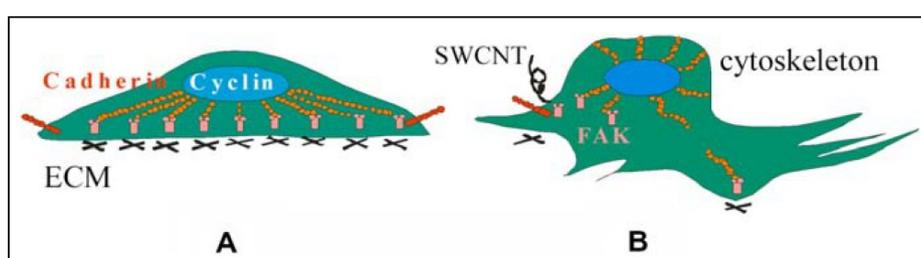


Figura 7.5 – Rappresentazione grafica del meccanismo di interferenza dei SWCNT's con le proteine strutturali della cellula, responsabili della sua adesione alla matrice extracellulare (ECM); FAK = Focal Adhesion Kinase (Tian et al, 2007).

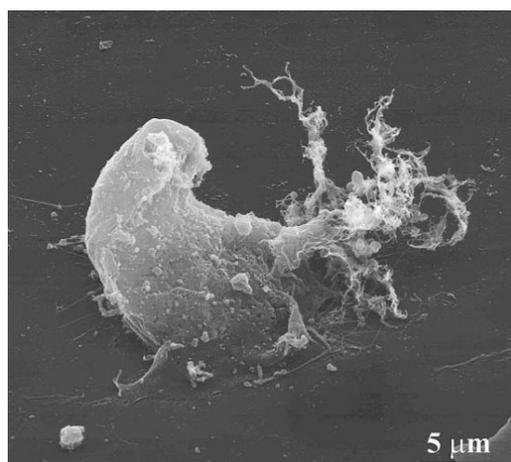


Figura 7.6 – Cambiamenti morfologici nell'estensione di una cellula di fibroblasti umani, esposta a SWCNT's (Tian et al, 2007).

## 7.2.2 Effetti di tossicità

### 7.2.2.1 Effetti sulle vie aeree

Le ENP più fini sembrano essere associate a numerosi effetti avversi per le vie respiratorie, quali infiammazioni, accumulo di particelle e proliferazione di cellule epiteliali, seguita da fibrosi, enfisema ed insorgenza di tumori (Borm et al, 2004; Oberdörster et al, 1994). In generale, recenti ricerche hanno dimostrato come l'inalazione delle ENP possa ledere l'abilità del sistema immunitario di combattere le infezioni (Lucarelli et al, 2004). Ad esempio, queste sono in grado

di modificare l'intrinseca funzione difensiva dei macrofagi, modificando la loro attività nei confronti delle infezioni (Buzea et al, 2007).

Più in particolare si vuol segnalare come i CNT's, nei macrofagi polmonari di topo, abbiano mostrato un effetto citotossico simile a quello dell'asbesto crisotilo, sostanza in grado di indurre il mesotelioma polmonare (Ju-Nam & Lead, 2008; Wise and Brasuel, 2011). L'inalazione di nAg negli esseri umani, invece, può condurre ad infiammazioni nel sistema respiratorio e cardiovascolare, nonché asma, bronchite cronica ed infezioni alle vie respiratorie (Quadros and Marr, 2010). L'azione del nAg è particolare e sfrutta l'effetto denominato "cavallo di Troia". La cellula, infatti, possiede dei meccanismi di difesa contro gli effetti negativi degli ioni  $Ag^+$  ed è in grado di riconoscerli ed impedirne l'accesso. Tale difesa, però, è inefficace di fronte alle ENP, che riescono ad oltrepassare la membrana cellulare e, una volta all'interno, liberano gli ioni  $Ag^+$ , con conseguenze deleterie per la cellula. Nell'esempio riportato da Quadros and Marr (2010), si può vedere come questi interferiscano con i tioli degli enzimi deputati alla riproduzione cellulare, bloccando, così, tale processo (fig. 7.7).

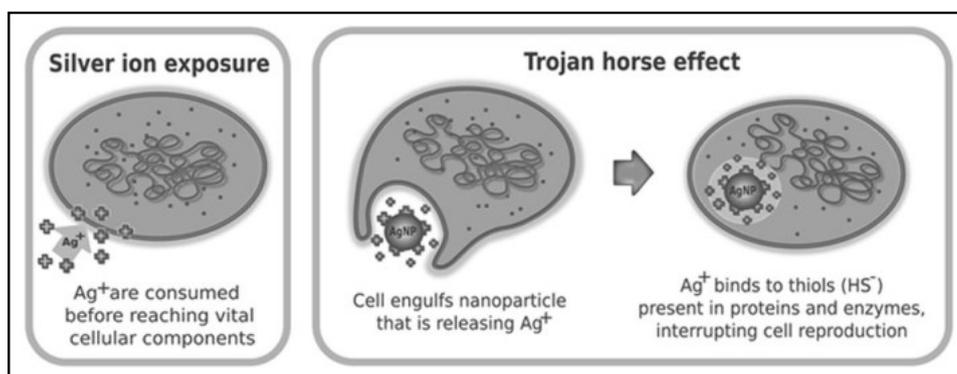


Figura 7.7 – Effetto “cavallo di Troia”: ENP di Ag oltrepassano la membrana cellulare e, una volta all'interno, rilasciano ioni  $Ag^+$ . Questi interagiscono con gli enzimi, interrompendo il processo di riproduzione cellulare (Quadros and Marr, 2010).

#### 7.2.2.2 Effetti neurologici

Le evidenze sperimentali hanno suggerito che malattie degenerative del sistema nervoso, quali il morbo di Alzheimer e quello di Parkinson, sono correlate allo stress ossidativo causato da un elevato accumulo di metalli (Cu, Zn, Al, e soprattutto Fe) in alcune zone del cervello, fenomeno che porta alla perdita di funzionalità e al danno cellulare (Liu et al, 2006). Il Fe è necessario per molte funzioni cellulari ed il cervello lo accumula in continuazione. Per prevenirne gli effetti tossici, dovuti all'accumulo progressivo con l'età, l'organismo ha sviluppato un sistema in grado di stoccarlo in una proteina, detta ferritina. Questa, però, quando l'accumulo supera una certa

soglia, non funziona in modo adeguato e la sua disfunzione provoca stress ossidativo e danni ai neuroni (Quintana et al, 2006).

#### 7.2.2.3 Effetti sulla circolazione sanguigna

##### *Trombosi*

La traslocazione di ENP nel sistema circolatorio sembra essere collegata all'insorgenza di trombi, ovvero coaguli di sangue (Nemmar et al, 2002). L'insorgenza degli effetti, tra l'altro, è molto rapida e la trombosi si manifesta durante la prima ora successiva all'esposizione. Se inalate, le ENP possono essere rinvenute nei globuli rossi dei capillari polmonari e questo porta a pensare che si manifestino effetti come l'anemia, dovuta alla ridotta capacità di trasporto dell'ossigeno da parte di tali cellule.

##### *Disfunzioni cardiovascolari*

E' pacifico che l'inalazione delle ENP possa causare anche malattie cardiovascolari (Buzea et al, 2007), nonostante la relazione tra tali patologie e la presenza di ENP nei polmoni, non sia ancora stata chiarita. Gli autori ipotizzano che l'infiammazione polmonare possa essere in grado di innescare un rilascio sistematico di citochine che può portare a degli effetti cardiovascolari avversi.

#### 7.2.2.4 Effetti su fegato e reni

Ad oggi, le conoscenze degli effetti delle ENP su fegato, reni e milza sono ancora molto poche ma comunque è ipotizzabile che l'accumulo di ENP in tali organi dia origine a fenomeni di citotossicità, da cui, in un secondo momento, possono scaturire diverse patologie (Buzea et al, 2007). Ad esempio, il detrito micro e nano strutturato proveniente dalle protesi dentarie, una volta assorbito dall'intestino, può condurre un soggetto ad un peggioramento delle sue condizioni fisiche. Febbre, milza e fegato ingrossati, soppressione del flusso biliare e blocco acuto renale sono sintomi comparsi in alcuni soggetti dopo circa un anno dall'applicazione di ponti dentari in porcellana. Tali sintomi sono scomparsi dopo la rimozione delle protesi (Ballestri et al, 2001).

#### 7.2.2.5 Effetti sul tratto gastrointestinale

Sembra che la tossicità delle ENP nel tratto gastrointestinale sia ridotta, a causa del complesso miscuglio di cibo, enzimi e batteri ma, soprattutto, dell'alto contenuto di proteine. Le ENP sembrano causare patologie quali il morbo di Crohn, coliti ulcerose e cancro. Nei soggetti affetti da tali disturbi, infatti, sono state rinvenute, nei tessuti del colon, ENP di C, fillosilicati ceramici,

gesso, S, Ca, SiO<sub>2</sub>, acciaio, Ag e Zr, risultati completamente assenti, invece, nei soggetti sani (Gatti, 2004). Le dimensioni variavano tra 50 e 100 µm e si trovavano proprio all'interfaccia tra la parte sana e la formazione cancerosa. Recentemente è stato osservato come il morbo di Crohn sia associato ad un'assunzione di alti livelli di ENP (100 nm – 1µm) dalla dieta (Lomer et al, 2002). Attualmente la questione non è ancora chiara poiché sembrerebbe che non sia l'eccesso di ENP a causare tale patologia ma piuttosto una reazione anormale dell'organismo quando viene esposto ad esse (Lomer et al, 2004).

#### 7.2.2.6 Effetti sulla cute

Molti processi produttivi dell'industria moderna costituiscono, per i lavoratori, causa di esposizione alle ENP e a piccole fibre. Inoltre, esistono molte perplessità per quelli che possono essere i rischi dei consumatori derivanti dall'utilizzo di prodotti cosmetici a base di nTiO<sub>2</sub> e di ZnO. A questo proposito si vuol segnalare l'importante contributo fornito dal "Nanoderm European Project", dal quale, dopo cinque anni (2002 – 2007) di ricerche, sembra emergere che il nTiO<sub>2</sub> non sia in grado di penetrare la cute, se questa è sana. Per il nZnO, invece, questo risultato non sembra essere valido, come dichiarato da Gulson et al (2010), i quali hanno potuto dimostrare come il nZnO riesca a penetrare, attraverso la pelle, nella circolazione sanguigna.

Il potere antibatterico del nAg è ormai noto, come è nota la sua capacità di ridurre l'infiammazione e favorire la cicatrizzazione (Poon and Burd, 2004; Dunn et al, 2004). Purtroppo le stesse proprietà che lo rendono un buon antibatterico possono renderlo pericoloso per la salute delle cellule umane. Sembra infatti che, a concentrazioni tali da essere letale per i batteri, questo sia letale anche per i cheratinociti e i fibroblasti umani (Poon and Burd, 2004).

Di seguito, per favorire la sintesi delle informazioni sin qui trasmesse, sono state inserite due figure inerenti gli effetti avversi, per gli esseri umani, connessi all'esposizione di ENP. La prima (fig. 7.8) (Buzea et al, 2007) raggruppa le differenti patologie in funzione dei diversi organi bersaglio, mentre la seconda (fig. 7.9) (AA.VV., Libro Bianco, 2010) evidenzia gli effetti avversi ed i meccanismi di tossicità, suddividendoli in base al tipo di ENM da cui possono originarsi.

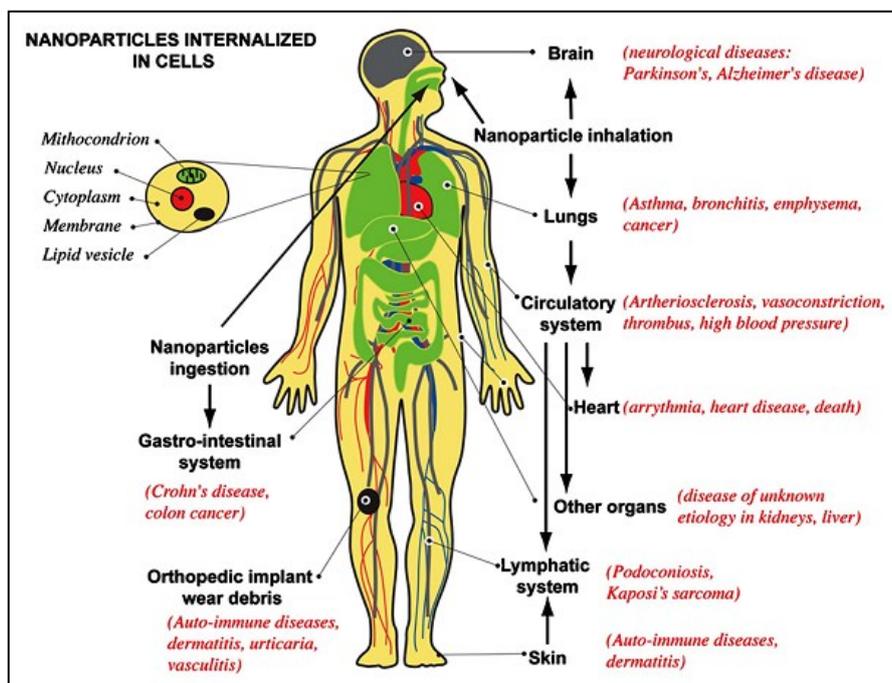


Figura 7.8 – Vie di ingresso, organi bersaglio e patologie connesse alle NP (Buzea et al, 2007).

Tabella 5.1 Meccanismi d'azione dei NM		
Nanomateriali	Meccanismi d'azione	
Nanotubi di carbonio	<i>SWCNT</i>	Diminuzione della capacità di adesione cellulare, riduzione della proliferazione cellulare, induzione di apoptosi. Stress ossidativo e danno al DNA
	<i>MWCNT</i>	Penetrazione nella cellula e riduzione della vitalità cellulare e rilascio di IL-8. Generazione di ROS. Infiammazione, fibrosi e granuloma del polmone e sviluppo di mesotelioma.
Fullereni	Considerati meno tossici dei CNT. Produzione di ROS, induzione di danno al DNA, mutagenicità e induzione di aberrazioni cromosomiche e micronuclei.	
Nanoparticelle di metalli e ossidi di metalli	<i>TiO<sub>2</sub>, ZnO, SiO<sub>2</sub> e Fe<sub>x</sub>O<sub>x</sub></i>	Induzione di danno al DNA tramite produzione di ROS e risposta infiammatoria.
	<i>Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub></i>	Produzione di ROS Risposta pro-infiammatoria
	<i>TiO<sub>2</sub></i>	Induzione produzione di ROS, SCE, aumento della frequenza dei micronuclei e carcinoma polmonare. Deplezione di glutatione e stress ossidativo come risultato della foto attività e proprietà redox. Distruzione della membrana.
	<i>ZnO</i>	Produzione di ROS. Dissoluzione e rilascio di cationi tossici. Danno lisosomiale. Infiammazione.
	<i>Ag</i>	Dissoluzione e rilascio di Ag <sup>+</sup> , inibizione enzimi respiratori e produzione di ATP. Produzione di ROS. Distruzione dell'integrità di membrana e dei processi di trasporto.
	<i>Ag e Co</i>	Aumentata espressione e fosforilazione di p53, rotture della catena di DNA e aberrazioni cromosomiche.
	<i>CdSe</i>	Dissoluzione e rilascio di ioni Cd e Se tossici.
	<i>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub></i>	liberazione Fe <sup>2+</sup> . Interferenza con il trasporto degli ioni della membrana cellulare.
	<i>CuO</i>	Induzione di danno al DNA e stress ossidativo
Quantum dot	Penetrazione nel nucleo della cellula attraverso la membrana e induzione di rotture della catena del DNA, attivazione di p53 e condensazione cromatinica. La presenza di ZnS riduce la cito-genotossicità.	

Figura 7.9 – Meccanismi d'azione dei NM – tratta da: “Libro Bianco – Esposizione a nanomateriali ingegnerizzati ed effetti sulla salute e sicurezza nei luoghi di lavoro” AA. VV., (2010).

## **8. LA BATTERIA DI ORGANISMI UTILIZZATA NEI TEST DI TOSSICITA'**

In questo capitolo sono descritte le singole specie utilizzate nell'attività sperimentale di questa tesi di dottorato. Per ognuna di esse sono riportate informazioni su classificazione, morfologia, fisiologia ed ecologia. Sono inoltre elencati i principi su cui si basa il relativo test ecotossicologico e, infine, sono spiegate le modalità di acquisizione dei dati e della loro rielaborazione ed interpretazione.

## 8. LA BATTERIA DI ORGANISMI UTILIZZATA NEI TEST DI TOSSICITA'

### 8.1 Introduzione

La scelta degli organismi su cui testare gli effetti del nTiO<sub>2</sub> è ricaduta su specie marine ed è motivata dalla scarsa produzione di studi (Keller et al, 2010; Zhu et al, 2011b), a sua volta riconducibile alle maggiori difficoltà legate alla matrice salata (Brant et al, 2005; French et al, 2009), come già altre volte segnalato nel corso di questo lavoro (cfr. parr. 4.1.2 e 5.2).

La batteria di organismi marini, utilizzata per l'allestimento dei test ecotossicologici, si è quindi composta delle seguenti specie:

- il batterio *Vibrio fischeri*;
- l'alga unicellulare *Phaeodactylum tricorutum*;
- due molluschi, l'ostrica *Crassostrea gigas* e il mitilo *Mytilus galloprovincialis*;
- il crostaceo *Artemia franciscana*.

Tali organismi, inoltre, sono stati selezionati per questi motivi:

- appartengono a **livelli filogenetici** diversi e sono quindi di diverso grado evolutivo;
- hanno una diversa **rappresentatività ecologica** (produttori, consumatori, decompositori);
- hanno una diversa **modalità di assunzione** delle ENP dal mezzo acquoso;
- sono tutte specie per cui esistono **solidi protocolli**, riconosciuti a livello internazionale, per la conduzione di test di tossicità con sostanze chimiche tradizionali, i quali offrono un importante punto di riferimento;
- permettono l'esecuzione di test ecotossicologici con **endpoint** differenti (acuti, cronici, cronici a breve termine).

## 8.2 Il batterio *Vibrio fischeri*

### 8.2.1 Classificazione e morfologia

*Vibrio fischeri* è un batterio Gram negativo della famiglia delle Vibrionaceae, una numerosa famiglia della classe  $\gamma$ -proteobacteria, che comprende molte specie caratterizzate da interazioni di tipo cooperativo o patogeno (Ruby and McFall-Ngai, 1999). Questa famiglia è strettamente imparentata con la famiglia delle Enterobacteriaceae; insieme costituiscono il gruppo enterico (Fiorin, 1993). La classificazione completa è riassunta in tabella 8.1.

Regno	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Classe	$\gamma$ -proteobacteria
Famiglia	Vibrionaceae
Genere	<i>Vibrio</i>
Specie	<i>Vibrio fischeri</i>

Tabella 8.1 - Classificazione di *Vibrio fischeri* ai diversi livelli tassonomici (Bergey's Manual, 1984).

*V. fischeri* possiede una membrana citoplasmatica rivestita esternamente da una parete cellulare, il cui strato esteriore è composto da peptidoglicani. Questa conferisce ai batteri una forma a bastoncino allungato o ricurvo, con un diametro di 0,5 - 0,8  $\mu\text{m}$  e lunghezza di 1,4 - 2,6  $\mu\text{m}$ . È dotato di una propria motilità in quanto possiede dei flagelli in numero variabile da 3 a 12, polari e rivestiti di guaina continua con la membrana esterna; la loro lunghezza è di circa 3,6  $\mu\text{m}$  (Bergey's Manual, 1984).

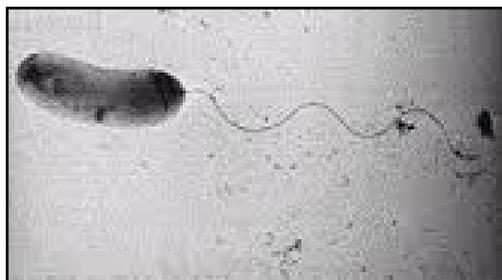


Figura 8.2 – Cellula di *V. fischeri* (www.classroom.sdmesa.net).

### 8.2.2 Fisiologia

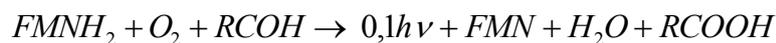
#### 8.2.2.1 Metabolismo

*V. fischeri* è un batterio anaerobio facoltativo, capace quindi di vivere sia in presenza sia in assenza di ossigeno. I batteri enterici catabolizzano il glucosio secondo la glicolisi,

completandola poi con la fermentazione acido mista. *V. fischeri*, insieme ad altre specie non bioluminescenti, possiede anche il sistema enzimatico della formico idrogenoliasi, che scinde l'acido formico in CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>. (Bergey's Manual, 1984; Fiorin, 1983).

#### 8.2.2.2 Bioluminescenza

La proprietà di *V. fischeri*, utilizzata per il test ecotossicologico, è la bioluminescenza, cioè la sua capacità di emettere una radiazione luminosa in seguito ad attività biologica. Il fenomeno della bioluminescenza è legato ai processi energetici vitali della cellula. La reazione è catalizzata dall'enzima luciferasi e porta alla produzione di una luce blu-verde (di  $\lambda$  pari a circa 490 nm). Il processo che porta all'emissione luminosa può essere riassunto come segue:



dove FMNH<sub>2</sub> è il flavinmononucleotide ridotto, RCOH una catena aldeidica, FMN il flavinmononucleotide ossidato e RCOOH l'acido carbossilico (Hastings *et al*, 1985).

Se è stata fatta chiarezza sui processi biochimici che portano alla produzione di bioluminescenza, non altrettanto si può dire sul suo significato, che si ipotizza possa essere legato al consumo di ossigeno nella cellula. Secondo alcuni autori la bioluminescenza si sarebbe sviluppata come meccanismo di adattamento ad ambienti ossidanti di forme di vita sensibili all'ossigeno. Essa potrebbe rappresentare il mezzo per sottrarre l'ossigeno in eccesso presente nella cellula mantenendolo a livello di  $\mu$ M (Hastings *et al*, 1985; McFall-Ngai and Ruby, 2000).



Figura 8.3 – Bioluminescenza naturale del batterio *V. fischeri* (www.flickr.com).

#### 8.2.3 Ecologia

*V. fischeri* è un batterio marino con diverse nicchie ecologiche: può vivere libero, simbiote aspecifico nell'intestino o sulla superficie di organismi marini o specifico in organi luminosi,

parassita od ospite di parassiti. È un **saprofita**. *V. fischeri*, come altre specie del genere *Vibrio*, è mesofila, ovvero ha temperature ottimali di crescita comprese mediamente tra 25 e 40 °C. La specie, inoltre, è ossidasi positiva (cioè possiede il citocromo c) (Bergey's Manual, 1984; Fiorin, 1993). Si può trovare in mare come componente dell'epiplancton (Orndorff and Colwell, 1980; Ruby and Lee, 1998) in grado di colonizzare e mineralizzare il particolato organico. La sua affinità per il substrato solido è abbastanza elevata perciò tende a legarsi alle superfici solide, soprattutto se ricche di sostanza organica. Questa associazione con le particelle sospese avrebbe lo scopo di permettere a *V. fischeri* di accedere a microambienti con una maggiore disponibilità di nutrienti (Makemson et al, 1992). I batteri bioluminescenti, infatti, rendendo luminoso il particolato al quale aderiscono, ne favoriscono l'ingestione; essi possono in seguito essere introdotti negli intestini degli animali marini e colonizzarli.

Per Lee and Ruby (1995) *V. fischeri* può presentarsi in due diverse forme planctoniche: una forma attiva, facilmente isolabile e identificabile in laboratorio, e una forma "dormiente" che rappresenta una forma di resistenza ovvero uno stato in cui il batterio entra, al presentarsi di condizioni ambientali sfavorevoli alla sopravvivenza (Lee and Ruby, 1995).

I fattori, che si suppone controllino il passaggio da una forma all'altra in ambiente naturale, sono le variazioni di temperatura, la disponibilità di nutrienti, la radiazione solare; probabilmente intervengono anche fattori genetici (Lee and Ruby, 1995).

*V. fischeri* dà spesso luogo a simbiosi con altri organismi superiori; le più conosciute sono con pesci e molluschi cefalopodi, molti dei quali sono capaci di ospitarli in specifici organi luminosi. E' molto diffuso anche come simbionte aspecifico o come ecto o endoparassita. Ad esempio Miguez and Combarro (2003) hanno identificato *V. fischeri* tra i microrganismi che parassitano le uova di *Sardina pilchardus* nei mari nel Nord-Ovest della Spagna, mentre Ramesh and Venugopalan (1988) hanno isolato *V. fischeri* tra i batteri simbiotici dell'intestino di *Mugil cephalus* e *Tachysurus arius*.

## 8.2.4 Il test Microtox®

### 8.2.4.1 Principi

Il test Microtox® è un test di tossicità acuta basato sulla inibizione della luminescenza naturale del batterio marino *V. fischeri*. Quando si trovano nelle condizioni ottimali di crescita alcuni ceppi convertono circa il 10% della loro energia metabolica chimica in energia luminosa, attraverso una reazione di trasferimento di elettroni alternativa ma strettamente legata alla respirazione (Bolognani, 1990; Polsinelli et al, 1993). Alterazioni del metabolismo e della struttura cellulare modificano il bilancio respiratorio cellulare e di conseguenza l'emissione

luminosa. La presenza di un tossico o di una sostanza biologicamente attiva che modifica o inibisce alcuni aspetti della fisiologia cellulare avrà come effetto una alterazione nel sistema di trasporto degli elettroni che potrà essere quantificata misurando il cambiamento dell'output luminoso della sospensione batterica. In pratica, il principio su cui si basa il test è che la **quantità di luce** emessa, opportunamente corretta rispetto all'emissione che si verifica fisiologicamente in assenza di tossico, è **proporzionale al danno cellulare** (Pantani et al, 1994). Si ottiene in questo modo una curva concentrazione-risposta dalla quale è possibile estrapolare, tramite opportuna linearizzazione e regressione lineare, il valore di EC50, ossia la diluizione del campione (o valore di concentrazione per una sostanza chimica pura) che determina una diminuzione del 50% della luce emessa, nonché i limiti fiduciali al 95%, l'equazione della retta di regressione e il suo coefficiente di correlazione.

#### 8.2.4.2 Elaborazione dei dati

Dopo aver esposto i batteri alla sostanza da testare, la percentuale di inibizione viene calcolata dalla formula:

$$\% \text{ inibizione} = \frac{I_{tc} - I_t}{I_{tc}}$$

dove  $I_{tc}$  è l'intensità luminosa del controllo al tempo  $t$  e  $I_t$  quella del campione al tempo  $t$ .

Plottando i dati ottenuti in un diagramma concentrazione-inibizione si ottiene una curva dose-risposta dalla quale è possibile estrapolare il valore di EC50.

Per la determinazione dei parametri tossicologici non viene utilizzata la % d'inibizione ma una funzione chiamata Gamma, ricavata per via cinetica e collegata alla concentrazione del tossico. La funzione matematica che esprime gamma è:

$$\Gamma = k \cdot C^p$$

dove  $C$  è la concentrazione del tossico,  $p$  è il numero di molecole di tossico per organo bersaglio e  $k$  è un fattore composito che lega energia libera e cambiamenti di volume durante la reazione (Microbics Corporation, 1992). La forma logaritmica di tale equazione permette di ottenere una relazione lineare di  $C$  in funzione di  $\Gamma$ :

$$\text{Log}C = b \cdot \text{Log}\Gamma + \text{Log}a$$

Questa è l'equazione di una retta in cui  $\text{Log} C$  è la variabile dipendente ed è legata alla variabile indipendente  $\text{Log} \Gamma$  attraverso un coefficiente di proporzionalità  $b$  (pendenza) e una costante  $\text{Log} a$  (intercetta). Il valore sperimentale di Gamma viene calcolato a partire dai dati di bioluminescenza. La definizione di Gamma è diversa a seconda del protocollo utilizzato nei test.

Nel caso la sostanza o il campione mostrino effetto tossico, la funzione Gamma assumerà valori positivi proporzionalmente all'intensità di tale effetto (valori negativi indicano invece un effetto biostimolatorio).

È quindi possibile calcolare la concentrazione alla quale si vuole avere un certo effetto nominale (esempio: EC50, EC30, ecc...) attraverso un'analisi statistica di regressione lineare di Log C (variabile indipendente) in funzione di Log  $\Gamma$  (variabile dipendente). Il valore di EC50 rappresenta un valore di  $\Gamma$  pari a 1; esso quindi è facilmente calcolabile in quanto potenza dell'intercetta Log a.

Azur Environmental fornisce un software che, una volta collegato il fotometro ad un PC, è in grado di registrare automaticamente l'intensità del segnale luminoso ed elaborare i dati ottenuti, fornendo così uno strumento per il calcolo rapido dell'EC50.

#### 8.2.4.3 Caratteristiche

Dal punto di vista evolutivo, i batteri sono distanti da organismi superiori quali invertebrati e pesci e, quindi, i risultati potrebbero non essere adeguati per fornire i criteri di protezione di questi ultimi. Nonostante ciò, alcuni autori hanno però evidenziato che i batteri possiedono percorsi biochimici conservati anche negli organismi superiori e mostrano un certo grado di complessità delle membrane cellulari (Isenberg, 1993; Ross, 1993), caratteristiche per le quali essi possono essere utilizzati al posto di organismi più evoluti.

I vantaggi dell'utilizzo dell'impiego del test Microtox®, sono riassunti nei seguenti punti:

- 1) **esigie quantità di campione** necessarie: permette di condurre test su matrici disponibili in quantità limitate;
- 2) **basso rapporto costi-benefici**: disponibilità continua di organismi test, possibilità di effettuare test frequentemente ed in spazi ridotti, basse spese di esercizio (numero di operatori e i consumi ridotti) e costo (relativamente) basso dello strumento, rendono Microtox® assai adatto per programmi di screening o monitoraggio che richiedano tempi brevi e un numero di campioni statisticamente adeguato agli obiettivi;
- 3) **rilevanza ecologica** negli ecosistemi acquatici: il livello trofico dei detritivori ricopre un ruolo molto importante nel ciclo dei nutrienti (Ramaiah and Chandramohan, 1992; Ross, 1993). A questo livello appartengono anche i batteri; un'alterazione della loro attività avrebbe sicuramente effetti sugli altri livelli trofici. Batterie complete di test in grado di coprire il maggior numero di livelli possibile dovrebbero quindi comprendere test con batteri;

- 4) **riproducibilità**: è stata oggetto di diversi studi (Dutka and Kwan, 1981; Vasseur et al, 1984) che riportano risultati con un CV ( $CV = [SD / media] \cdot 100$ ) che va dal 3 al 20%, con riferimento alla matrice e al tempo di esposizione. I dati ottenuti sono assai inferiori a quelli trovati per i più comuni test su pesci, che sono pari a circa il 35 - 38% (Vasseur et al, 1984; Ross, 1993). L'elevata riproducibilità è dovuta alla standardizzazione della preparazione del materiale e delle condizioni operative (De Zwart and Slooff, 1983);
- 5) **sensibilità**: *V. fischeri* non è sensibile a tutte le sostanze e, anche quando lo è, la reazione è di intensità diversa secondo la natura e la modalità d'azione di queste. Esso mostra una diversa sensibilità tra composti organici e metalli (Vasseur et al. 1984), legata soprattutto ai meccanismi e alla cinetica di reazione. Diversi fattori possono influenzare la risposta dell'organismo test: temperatura, pH, salinità e tempo di esposizione. Nonostante tutto la sensibilità del Microtox® Test per gran parte delle sostanze pure testate è dello stesso ordine di grandezza rispetto ad altri organismi acquatici superiori (Vasseur et al, 1984);
- 6) **standardizzazione**: esistono diversi protocolli standard, nazionali e internazionali, caratterizzati da poche e semplici operazioni;
- 7) **semplicità** di esecuzione: i protocolli presenti nei manuali e nelle linee guida standard sono riportati in dettaglio e sono di facile comprensione. Questo facilita l'addestramento del personale e rende il test meno soggetto all'errore sperimentale;
- 8) **rapidità**: Il test Microtox® è uno dei più rapidi se confrontato con i tradizionali test che impiegano crostacei e pesci (*Daphnia magna* 48 h EC50; *Salmo trutta* 24 h LC50; *Carassius auratus* 96 h LC50; *Oncorhynchus mykiss* 96 h LC50); la preparazione delle diluizioni, l'esecuzione del test e l'elaborazione dei dati possono richiedere anche meno di un'ora (Vasseur et al. 1984; Ross, 1993). La maggiore rapidità di esecuzione del test consente sia di aumentare il numero di campioni saggiati sia di ottenere dei dati di tossicità in tempo reale.

Tutte queste caratteristiche fanno del test Microtox® un test accettato a livello mondiale, soprattutto per test di monitoraggio o screening (Vasseur et al, 1984; Ross, 1993; Pantani et al, 1994) .

## 8.3 L'alga unicellulare *Phaeodactylum tricornutum*

### 8.3.1 Classificazione e morfologia

*Phaeodactylum tricornutum* è un'alga marina unicellulare e bentonica ampiamente diffusa nelle zone costiere. Appartiene al gruppo delle diatomee che, generalmente, possiedono una parete cellulare ben silicizzata (Francius et al, 2008). Le diatomee sono alghe brune appartenenti alla divisione delle Heterokonta che, si pensa, possano aver avuto origine da un'endosimbiosi secondaria instauratasi tra un'alga rossa (Rhodophyta) ed un flagellato eterotrofico (appartenente agli Oomycetes) circa 300 milioni di anni fa (Scala et al, 2002). *P. tricornutum* venne isolato per la prima volta negli U.S.A. da Allen e Nelson (1910), che lo denominarono "*Nitzschia closterium* forma minutissima" (Lewin et al, 1958). La classificazione completa è riassunta in tabella 8.4.

Regno	Plantae
Phylum	Heterokontophyta
Classe	Bacillariophyceae
Famiglia	Phaeodactylaceae
Genere	<i>Phaeodactylum</i>
Specie	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>

Tabella 8.4 - Classificazione di *Phaeodactylum tricornutum* ai diversi livelli tassonomici.

Esso possiede **tre morfotipi**: a) **fusiforme**, b) **triradiale** (forma atipica della varietà fusiforme) e c) **ovale** (figg. 8.5 a, b, c). Il morfotipo fusiforme è lungo 20 - 30  $\mu\text{m}$  ed ha un diametro di 1 - 3  $\mu\text{m}$ ; il morfotipo triradiale ha tre bracci di circa 15 - 20  $\mu\text{m}$  di lunghezza che partono da un nucleo centrale; il morfotipo ovale è il più contenuto, con dimensioni comprese tra 10  $\mu\text{m}$  e 12  $\mu\text{m}$ . Le cause dell'alternanza delle tre forme non sono ben chiare ma sembrano essere imputabili a fattori ambientali quali la luce e la disponibilità dei nutrienti. Studi precedenti, ad esempio, hanno rilevato che le cellule fusiformi tendono a trasformarsi in ovoidali se trasferite in un medium solido; viceversa, le ovoidali acquisiscono sembianze fusiformi se trasferite in un medium liquido (Barker, 1935; Wilson e Lucas, 1942; Lewin et al, 1938). A differenza delle altre diatomee, che possiedono uno scheletro in silice, *P. tricornutum* **non ha bisogno di silicio** per crescere e presenta una parete cellulare composta essenzialmente da composti organici (Tesson et al., 2009). L'estensione della silicizzazione della parete cellulare dipende dal morfotipo. La forma ovale è l'unica che può sintetizzare vere teche in silice. Al contrario i morfotipi fusiformi e triradiati presentano superfici lisce, non strutturate e sono caratterizzate da

pareti cellulari che possiedono quasi esclusivamente componenti organiche, principalmente polisaccaridi, proteine e una piccola quantità di lipidi (Tesson et al., 2009). La parete cellulare della forma ovale silicizzata è circa cinque volte più rigida delle due forme non silicizzate, che risultano essere dunque notevolmente più morbide (Francius et al., 2008).

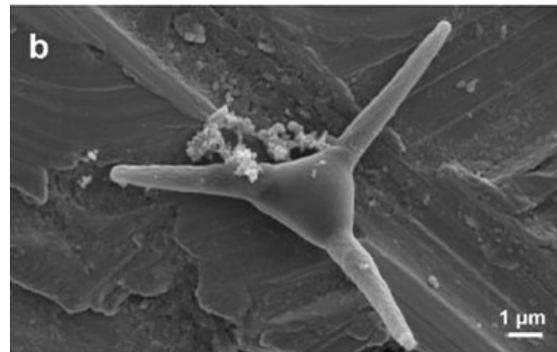
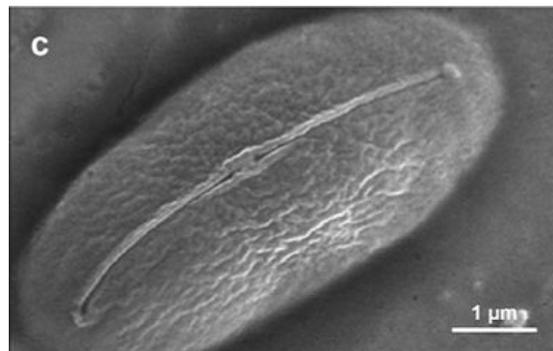


Figure 8.5 a-c): *P. tricornutum*, morfotipo fusiforme (a), triradiale (b) e ovale (c) (Francius et al, 2008).



### 8.3.2 Ecologia

*P. tricornutum* è una specie largamente diffusa poiché può crescere in un ampio intervallo di luce e temperatura (Lewin et al, 1958). Essa infatti può essere ritrovata in ambienti marino-costieri, così come in acque interne (Francius et al, 2008). Come le altre diatomee, questa specie è una delle componenti del **fitoplancton** e si trova alla base della catena alimentare marina. Essa infatti è in grado di sintetizzare biomassa assorbendo i nutrienti dall'acqua e sfruttando la luce come fonte di energia, grazie alla presenza di pigmenti quali la clorofilla a, il  $\beta$ -carotene e la diadinoxantina (Ragni and D'Alcalà, 2007), che, tra le altre cose, conferiscono alle cellule una colorazione giallastro-marroncina.

Recentemente (Allen et al, 2011), proprio a partire dagli studi sul genoma di *P. tricornutum*, si è scoperto che le diatomee marine hanno un ciclo dell'urea simile a quello degli animali e che questo ciclo consente alle diatomee di utilizzare efficacemente il carbonio e l'azoto presenti

nell'ambiente circostante. Inoltre, questo spiegherebbe la capacità di ripresa di tali organismi dopo un periodo di scarsità dei nutrienti disponibili (Allen et al, 2011), evento visibile soprattutto dopo i fenomeni di upwelling. In risposta alla risalita delle correnti dalle acque profonde dell'oceano, le diatomee sono in grado di riprendersi velocemente da prolungati periodi di privazione di nutrienti e di proliferare rapidamente. La cosa è evidente anche in laboratorio, quando, dopo il rinnovo delle soluzioni di nutrienti, si assiste rapidamente alla comparsa della fase di crescita esponenziale. La presenza di questo ciclo potrebbe essere una delle spiegazioni che giustifica il dominio delle diatomee negli ambienti marini. Lo studio suggerisce che le diatomee possano aver seguito un percorso evolutivo fundamentalmente diverso dalle piante, dalle alghe verdi e dagli altri produttori di ossigeno e che, prima dell'acquisizione evolutiva dei meccanismi fotosintetici, gli antenati delle diatomee erano forse più strettamente legate agli antenati degli animali che a quelli delle piante (Allen et al, 2011).

### 8.3.3 Il test di tossicità

#### 8.3.3.1 Principi

Il test di inibizione della crescita cellulare è un test di tossicità cronica a breve termine, basato sulla riduzione del tasso di crescita specifico di una coltura cellulare esposta per 72 h ad un tossico, rispetto ad una coltura cellulare di controllo negativo, mantenuta alle stesse condizioni della precedente. In condizioni ottimali, infatti, è previsto che la coltura cellulare, dopo 72 h, abbia raggiunto l'apice della fase esponenziale di crescita. Il test ha inizio proprio quando gli organismi si trovano in questa fase. Prima del test si effettuano dei conteggi nel controllo negativo per stabilire la sua densità, conteggi che saranno ripetuti dopo 72 h per ricavare il tasso di crescita specifico del controllo. Il confronto di questo dato col tasso specifico di crescita del test fornisce le percentuali di inibizione della crescita per le cellule esposte al tossico. Le **percentuali di inibizione** della crescita cellulare sono quindi proporzionali agli **effetti** espletati dal tossico nei confronti degli organismi.

#### 8.3.3.2 Elaborazione dei dati

Trascorse 72 h dall'inizio del test si può calcolare il tasso di crescita specifico per il controllo negativo dalla seguente relazione:

$$\mu = \frac{\ln(N_L) - \ln(N_0)}{t_L - t_0}$$

dove  $\mu$  è il tasso di crescita specifico,  $t_0$  rappresenta il periodo di inizio del test,  $t_L$  il periodo in cui termina il test e  $N_L$  ed  $N_0$  sono, rispettivamente, i valori delle densità cellulari rilevati a  $t_L$  a  $t_0$ .

Dal tasso di crescita specifico così calcolato o, meglio, dal dato medio delle differenti repliche ( $\mu_C$ ), è possibile ricavare la percentuale di inibizione cellulare per il test  $i$ -esimo con la seguente relazione:

$$I_{\mu_i} = \left( \frac{\mu_C - \mu_i}{\mu_C} \right) \cdot 100$$

dove  $I_{\mu_i}$  è la percentuale di inibizione della crescita cellulare del test  $i$ -esimo,  $\mu_i$  il tasso di crescita specifico del test  $i$ -esimo e  $\mu_C$  rappresenta la media del tasso di crescita del controllo.

Effettuando la regressione lineare sui valori delle percentuali di inibizione ricavate rispetto alle concentrazioni a cui tali effetti sono stati misurati, si ottengono i valori dell'intercetta  $q$  e del coefficiente angolare  $m$  di una retta nella generica forma:

$$Y = mX + q$$

Da quest'ultima si ricava agevolmente l'IC50, visto che questo corrisponde alla percentuale di inibizione pari al 50%, per cui, basta eguagliare l'equazione a 50 per ottenere  $X$ , cioè la concentrazione in corrispondenza della quale si verifica un effetto di inibizione pari al 50%.

### 8.3.3.3 Caratteristiche

Ad oggi è possibile trovare in letteratura numerosi articoli in cui si fa riferimento a varie metodologie di saggio con *P. tricornutum*. Il saggio più diffuso è quello di Inibizione Algale (ISO 10253) ma a questo si aggiungono, in anni più recenti, test di tossicità più complessi (Gentile, 2010). Ad esempio, per misurare la tossicità di alcuni composti chimici, Lundy et al (1984) hanno impiegato le due specie *P. tricornutum* e *Cyclotella cryptica*, misurando l'alterazione del rapporto tra le due e la biomassa totale. Altri autori, inoltre, hanno realizzato dei test ecotossicologici con *P. tricornutum*, considerando come endpoint la concentrazione di clorofilla-*a*, la divisione cellulare e l'attività enzimatica (Gentile, 2010).

In generale, i vantaggi offerti dal test sono riassunti nei seguenti punti:

- 1) gli organismi sono di **facile coltura** e di **rapida disponibilità**: per il mantenimento della coltura, infatti, è sufficiente inoculare 8 mL di una precedente coltura in una beuta contenente 100 mL di mezzo di crescita rinnovato; se è stata pianificata l'esecuzione di test ecotossicologici, è sufficiente effettuare questa operazione 72 h prima dell'inizio dei test per garantire che la coltura si trovi nella fase di crescita esponenziale;

- 2) **basso rapporto costi-benefici**: disponibilità continua di organismi test, possibilità di effettuare il test frequentemente, in spazi ridotti e utilizzando volumi ridotti, basse spese di esercizio (numero di operatori e i consumi ridotti) e di mantenimento della coltura;
- 3) **rilevanza ecologica** negli ecosistemi acquatici: le alghe rivestono il ruolo molto importante di produttori primari e sono quindi alla base della catena alimentare. L'alterazione di questi organismi potrebbe causare, a cascata, un forte disequilibrio nell'intero ecosistema interessato; una batteria di test completa non dovrebbe dunque escludere i test con le alghe;
- 4) **riproducibilità**: il protocollo (UNI EN ISO, 2006), in merito al tossico di riferimento ( $K_2Cr_2O_7$ ), riporta un valore di IC50 pari a  $20 \text{ mg L}^{-1}$  ( $n = 10$ ) con un CV ( $CV = [SD / \text{media}] \cdot 100 = 26\%$ );
- 5) **standardizzazione**: esistono diversi protocolli standard, nazionali e internazionali, che descrivono le varie fasi del test in maniera sistematica e puntuale.

## 8.4 I bivalvi *Crassostrea gigas* e *Mytilus galloprovincialis*

### 8.4.1. Classificazione e morfologia

I bivalvi marini del genere *Crassostrea* e *Mytilus* sono organismi filtratori comunemente utilizzati come bioindicatori della qualità dell'ambiente costiero. Questi organismi, infatti, sono in grado di bioaccumulare sia inquinanti organici sia metalli pesanti, e rispondono alle alterazioni indotte con caratteristici meccanismi fisiologici e genetici (Varotto, 2007). Più in particolare, la specie *Mytilus galloprovincialis* è presente a latitudini temperate in entrambi gli emisferi, anche se le sue zone di distribuzione possono comprendere acque più calde come quelle del mar Mediterraneo. L'ostrica *Crassostrea gigas*, invece, originariamente era una specie esotica, proveniente dal Giappone ed introdotta nelle zone costiere estuarine dell'America occidentale. Oggi questa specie si può ritrovare in Giappone, Corea, Siberia, Australia, Stati Uniti e Canada. In Europa è presente dalle isole inglesi fino al Portogallo ed anche nel mar Mediterraneo e nell'Adriatico (fonte: [www.fao.org](http://www.fao.org)). La classificazione completa di entrambe le specie è riassunta nelle tabelle 8.6 e 8.7.

Regno	Animalia
Phylum	Mollusca
Classe	Bivalvia
Famiglia	Mytilidae
Genere	<i>Mytilus</i>
Specie	<i>Mytilus galloprovincialis</i>

Tabella 8.6 - Classificazione di *Mytilus galloprovincialis* ai diversi livelli tassonomici.

Regno	Animalia
Phylum	Mollusca
Classe	Bivalvia
Famiglia	Ostreidae
Genere	<i>Crassostrea</i>
Specie	<i>Crassostrea gigas</i>

Tabella 8.7 - Classificazione di *Crassostrea gigas* ai diversi livelli tassonomici.

I molluschi bivalvi *C. gigas* e *M. galloprovincialis* possiedono le caratteristiche per essere dei buoni indicatori di qualità ambientale.



Figura 8.8 (a) e (b) – Esemplici di mitili *M. galloprovincialis* (a sx) e di ostrica *C. gigas* (a dx).

Il mitilo *M. galloprovincialis* possiede una conchiglia piuttosto liscia con due valve unite da del tessuto connettivo detto legamento della cerniera. Inoltre possiede dei muscoli ad esso antagonisti detti muscoli adduttori, responsabili della chiusura delle valve. Un'appendice muscolosa, chiamata piede, è invece utilizzata dai mitili per sondare il substrato e, eventualmente, effettuare brevi spostamenti. Una volta raggiunto il substrato più idoneo i mitili producono dei filamenti proteici (bisso) che permettono loro di aderirvi efficacemente. Le gonadi sono costituite da tessuto ghiandolare che si insinua tra gli organi digestivi ed il mantello, una sorta di lamina che racchiude la massa viscerale. Gli adulti possono raggiungere le dimensioni di 10 cm anche se, mediamente, misurano c.a. 4 – 5 cm e sono, generalmente, di sessi separati. La maturità sessuale è raggiunta in circa 5 - 8 mesi. Le femmine possono emettere dai 5 ai 12 milioni di gameti (Varotto, 2007).

L'ostrica *C. gigas* ha una conchiglia estremamente ruvida, molto scanalata e laminata. La valva inferiore ha una forma ricurva accentuata mentre quella superiore è piana. Come per i mitili, l'apertura è regolata da appositi muscoli adduttori. Da adulte possono raggiungere i 25 cm di lunghezza anche se, di solito, le dimensioni medie sono di 10 – 15 cm. Gli adulti sono ermafroditi proterandri ovvero nascono di sesso maschile. Circa la metà di questi resterà di sesso maschile, gli altri, invece, muteranno il sesso. La maturità sessuale è raggiunta durante il primo anno di vita. Le ostriche sono molto prolifiche e ciascuna femmina può rilasciare fino a 50 – 100 milioni di uova in una singola emissione (U.S. Department of Interior and U.S. Army Corps of Engineers, 1988 - Biological Report 82(11.85), TR EL-82-4).

#### 8.4.2 Ecologia e riproduzione

I bivalvi sono organismi rappresentativi degli ambienti marini e di transizione grazie alla loro ampia distribuzione. Inoltre, giocano un ruolo ecologicamente importante nell'ambiente sia come “filter feeders”, essendo comuni negli habitat marini di scogliera dove filtrano nella colonna d'acqua fitoplancton, microalghe bentiche risospese, protozoi e detrito organico, sia come “deposit feeders”, trovandosi soprattutto nei sedimenti fangosi dove rimuovono particellato organico, in competizione per il cibo con la comunità microbica del sedimento (Losso, 2003). Sia i mitili che le ostriche riescono a trattenere particelle inferiori ai 2 – 3  $\mu\text{m}$ , con un'efficienza del 80 – 100%. Il periodo riproduttivo varia, nelle due specie.

Quando per i bivalvi le condizioni ambientali sono favorevoli essi iniziano a riprodursi. A fecondazione avvenuta, gli embrioni cominciano a svilupparsi fino a raggiungere lo stadio di larve natanti dette veliger o D-shape, per la loro caratteristica forma a “D”. Questo processo prevede tempistiche differenti, a seconda della specie. Questa fase, infatti, si estende per 48 h nel caso dei mitili e per 24 h nel caso delle ostriche.

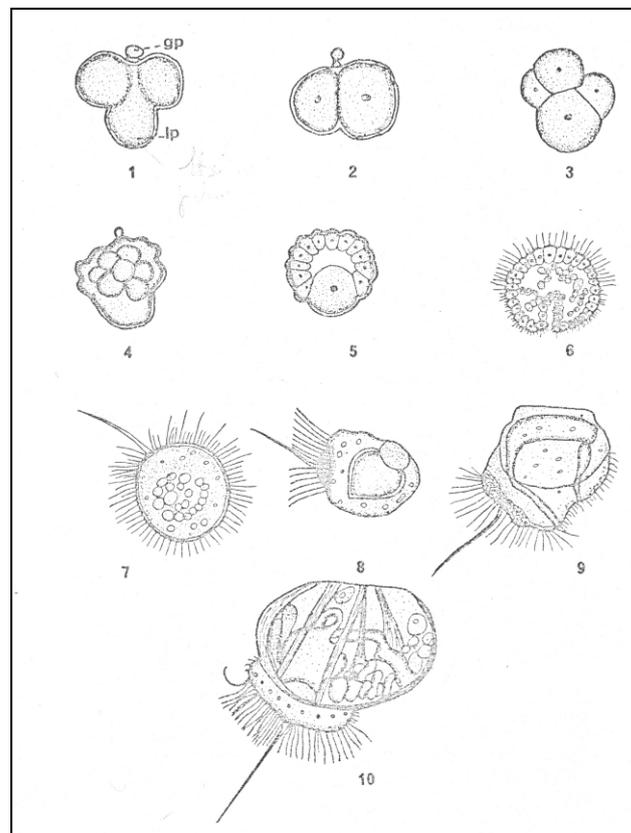


Figura 8.9 - Embriologia del *M. edulis*. 1 – 4 = segmentazione (gp = globo polare; lp = lobo polare); 5 = blastula; 6 = gastrula; 7 = gastrula ciliata; 8 – 9 = trocofora; 10 = veliger (Losso, 2003).

In questo stadio, le larve misurano circa 75 – 100  $\mu\text{m}$ .

La temperature ideali di crescita per i mitili sono comprese tra i 5 ed i 20 °C (Varotto, 2007), mentre per le ostriche queste devono essere di 20 °C o superiori, per almeno 3 settimane consecutive, successive al raggiungimento dello stadio di veliger (U.S. Department of Interior and U.S. Army Corps of Engineers, 1988 - Biological Report 82(11.85), TR EL-82-4).

#### 8.4.3 I test di tossicità

##### 8.4.3.1 Principi

I test di ecotossicologici che prevedono l'uso di bivalvi possono essere distinti in test a breve termine, caratterizzati da un breve periodo di esposizione degli embrioni (ore o al massimo giorni) a concentrazioni elevate di sostanza tossica, e test a lungo termine, con esposizioni che possono durare per diverse settimane a concentrazioni sub-letali d'inquinante. Il test a breve termine fornisce una risposta immediata, è sensibile e di facile esecuzione; il test a lungo termine è molto sensibile, ma richiede strumentazioni aggiuntive per la coltura del fitoplancton con cui nutrire le larve. Ad ogni stadio vitale dei bivalvi corrisponde un determinato tipo di test (Losso et al, 2003):

- la **fertilizzazione** prevede l'esposizione al tossico dello sperma con cui vengono fecondate le uova non contaminate: questa tipologia di test (test di spermotossicità) è poco usata con i bivalvi, perché notoriamente meno sensibile rispetto all'embriotossicità;
- lo **sviluppo embrionale**, dall'uovo fecondato alla larva D-shape, è il responso maggiormente usato nei test a breve termine con bivalvi (test di embriotossicità). Il periodo d'incubazione delle uova per raggiungere questo stadio larvale varia da specie a specie (24 h per *Crassostrea* sp., 48 h per *Mytilus* sp.);
- lo **sviluppo larvale**, dal veliger (larva D-shape) al pediveliger (circa 20 giorni) è utilizzato nei test a lungo termine, che considerano come endpoint sia la mortalità che alcuni parametri morfometrici relativi allo sviluppo della larva (lunghezza, larghezza).

Il principale limite dei test con i bivalvi è legato alla difficoltà di avere sempre a disposizione esemplari sessualmente maturi per l'emissione di gameti. Per ovviare a questo limite, il periodo riproduttivo di alcune specie può essere "dilatato" ricorrendo al condizionamento degli organismi. Con questa tecnica, usata soprattutto con le ostriche, la maturazione delle gonadi è ottenuta in laboratorio tramite l'aumento graduale della temperatura dell'acqua fino a 24 - 25 °C e il mantenimento degli organismi in condizioni stabili per un periodo che va da una a otto settimane (Losso, 2003).

Nella fattispecie, per questo lavoro di Tesi, coi bivalvi sono stati effettuati test di embriotossicità.

Questo tipo di test è un test di tossicità sub-cronico basato sull'osservazione delle eventuali anomalie che possono insorgere, a causa dell'esposizione ad un tossico, durante la delicata fase dello sviluppo larvale (fig. 8.9). L'esposizione, quindi, deve essere mantenuta per tutto il tempo dello sviluppo larvale che, come si è visto (cfr. par. 8.4.2), ha una durata di 48 h nel caso dei mitili e di 24 h nel caso delle ostriche. La **percentuale di anomalie** rilevata (somma delle larve malformate e degli embrioni non sviluppati) rispetto alle larve sane è dunque **proporzionale agli effetti embriotossici** della sostanza testata. Da queste percentuali è possibile, inoltre, ricavare il valore di EC50 per la sostanza risultata embriotossica.

#### 8.4.3.2 Elaborazione dei dati

Trascorso il necessario tempo di esposizione (24 o 48 h), il test viene fissato con formalina. Si passa quindi al conteggio delle anomalie, per ricavare la misura della tossicità, osservando 100 embrioni e annotando se questi sono: a) normoformati, b) malformati, oppure c) non sviluppati (rimasti allo stadio di trocofora). La somma di b) + c) è pari alla percentuale di effetto. Il dato deve essere normalizzato, rispetto al controllo negativo, mediante l'algoritmo di Abbott, ovvero:

$$\left( \frac{\%Eff_i - \%Eff_c}{100 - \%Eff_c} \right) \cdot 100$$

dove %Eff<sub>i</sub> è la % di effetto dell'osservazione i-esima e %Eff<sub>c</sub> la % di effetto nel controllo negativo.

Una volta in possesso dei dati di effetto normalizzati, è possibile ricavare il valore di EC50 mediante l'utilizzo di un programma basato sul metodo non parametrico "Trimmed Spearman-Kärber". Il metodo è in grado di aggiustare opportunamente (trim) la poligonale ricavata dai punti sperimentali, eliminando una parte di dati al disotto e al di sopra di un certo valore, in modo da ottenere la retta che meglio rappresenta l'insieme delle osservazioni sperimentali. Dall'equazione lineare così calcolata, il programma fornisce il valore di EC50 per la sostanza testata.

#### 8.4.3.3 Caratteristiche

Come già detto, uova, embrioni e larve dei molluschi bivalvi sono da tempo utilizzati nei test di tossicità. I vantaggi nell'uso dei primi stadi vitali sono:

- 1) l'**alta sensibilità**: gli organismi nella cruciale fase di sviluppo embrionale sono estremamente vulnerabili;

- 2) la **brevità di esecuzione**: questa si estende per 48 h nel caso di mitili, solamente per 24 h nel caso delle ostriche;
- 3) l'impiego di invertebrati che occupano una **posizione avanzata** nella scala evolutiva e che sono comuni in tutto il mondo;
- 4) la **rilevanza ecologica** rappresentata dai filtratori negli ambienti acquatici;
- 5) la **semplice** determinazione degli effetti che si basa sul conteggio diretto delle malformazioni osservate;
- 6) l'alta **significatività statistica** delle risposte: queste sono valutabili su un largo numero di uova e spermatozoi ottenuti da ogni singolo individuo.

## 8.5 Il crostaceo *Artemia franciscana*

### 8.5.1 Classificazione e morfologia

*Artemia franciscana* è un piccolo crostaceo anostraco di acqua salata che si trova negli stagni e nei laghi salini in tutto il mondo. Il protocollo APAT & IRSA CNR (2003) prevede l'impiego di organismi del genere *Artemia* nella valutazione della tossicità di campioni acquosi o di estratti provenienti da o afferenti a corpi idrici, sia marini che salmastri, utilizzando come risposta l'immobilizzazione del crostaceo.

La classificazione completa di questo organismo è riassunta nella tabella 8.10.

Regno	Animalia
Phylum	Arthropoda
Subphylum	Mandibulata
Superclasse	Crustacea
Classe	Branchiopoda
Famiglia	Artemiidae
Genere	<i>Artemia</i>
Specie	<i>Artemia franciscana</i>

Tabella 8.10 - Classificazione di *Artemia franciscana* ai diversi livelli tassonomici.

Come tutti gli anostraci, gli esemplari adulti di *A. franciscana* possiedono un corpo privo di carapace, di forma cilindrica allungata. Il corpo è suddiviso in 3 regioni: capo, torace e addome (fig. 8.11). Nel capo si possono osservare 2 occhi complessi e, tra questi, un occhio naupliare. Al di sopra degli occhi si trovano due coppie di antenne sensoriali, mentre, al di sotto di questi ci sono la bocca, la mandibola e la mascella. Nel torace si contano 11 paia di toracopodi, provvisti di setole e distinti in 3 tipologie a seconda della loro funzione: i telopoditi a funzione locomotoria, gli endopoditi a funzione alimentare e gli esopoditi membranosi a funzione respiratoria (fig. 8.11). All'interno di questa regione si trova anche il tratto digestivo lineare. Nell'addome si trovano gli organi riproduttivi. Sono i primi due segmenti che, fusi assieme, ospitano tali organi. Le *Artemie sp.* presentano dimorfismo sessuale e, nel caso dei maschi, l'apparato riproduttivo è formato da 2 peni, mentre nelle femmine è presente il sacco ovigero. La regione addominale, priva di appendici, è costituita da 4 - 9 segmenti e termina con una furca costituita da due cercopodi mobili, forniti di lunghe setole. Gli esemplari adulti di *A. franciscana* misurano al massimo fino a 1 – 2 cm.

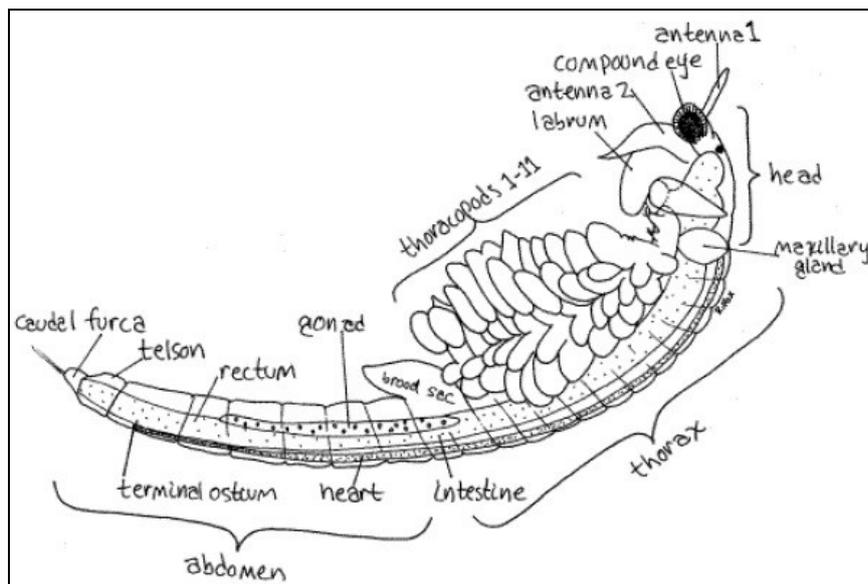


Figura 8.11 – Morfologia di un esemplare adulto di *A. franciscana* (© Richard Fox, 2006).



Figura 8.12 - Esemplari maturi di sesso femminile del crostaceo *A. franciscana*; in evidenza le sacche ovigere (www.hlasek.com).

### 8.5.2 Ecologia e riproduzione

*A. franciscana* è un filter-feeder e può nutrirsi di particelle aventi dimensioni fino a 50  $\mu\text{m}$ . Gli habitat in cui si può ritrovare sono caratterizzati dall'assenza di predatori e, invece, dall'abbondanza di batteri, protozoi ed alghe i quali costituiscono la dieta delle *Artemie* (Nunes et al, 2006). Sono organismi molto resistenti e devono il loro successo al fatto che si sono adattati a vivere in ambienti in cui le condizioni possono variare ampiamente. Ad esempio, sono in grado di tollerare grandi variazioni di salinità ( $5 - 250 \text{ g L}^{-1}$ ), di temperatura ( $6 - 35 \text{ }^\circ\text{C}$ ) ed anche di ossigeno (Nunes et al, 2005).

Quando le condizioni ambientali diventano critiche, le femmine possono riprodursi partenogeneticamente, producendo cisti che sono, per l'appunto, forme di resistenza. In questo caso, le femmine sviluppano la condizione di oviparità. In casi normali, la riproduzione è sessuata e le femmine sono allora ovovivipare (Nunes et al, 2005) (fig. 8.13). I nauplii di *A. franciscana* diventano adulti in 3 o 4 settimane, dopo aver attraversato ben 15 mute (dette Instar).

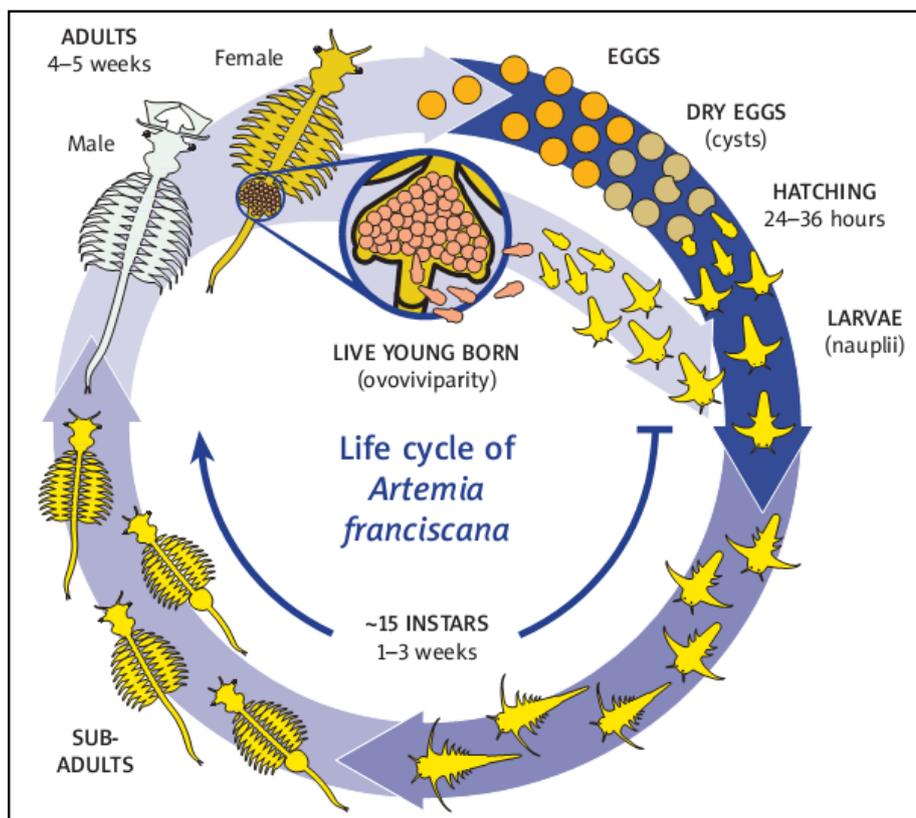


Figura 8.13 – Ciclo di vita di *A. franciscana* (© Dean Madden, 2009).

### 8.5.3 I test di tossicità

#### 8.5.3.1 Principi

Con *A. franciscana* si possono testare campioni particolarmente tossici con il test acuto a 24 h oppure campioni poco tossici con il test acuto a 96 h. In entrambi i casi l'endpoint considerato è quello dell'immobilizzazione degli organismi. Se i campioni sono scarsamente tossici si possono inoltre effettuare test sub-letali di immobilizzazione sia a 7 gg. che a 14 gg., oppure, test sub-cronici a 7 gg. e a 14. gg che considerino come endpoint l'accrescimento degli organismi.

Nella fattispecie, per questo lavoro di Tesi, con *A. franciscana* sono stati effettuati test acuti di immobilizzazione a 24 h e a 96 h, in cui si confrontava la risposta degli organismi esposti al tossico, rispetto al controllo negativo. Il principio su cui si basano tali test ecotossicologici

consiste nel fatto che l'effetto di **immobilizzazione** osservato è **proporzionale** alla **tossicità** della sostanza testata.

#### 8.5.3.2 Elaborazione dei dati

Al termine del test, facilmente si calcolano le percentuali di immobilizzazione come rapporto percentuale degli organismi immobili su quelli totali e, successivamente, si elaborano i dati mediante il modello parametrico Probit, in grado di effettuare su di essi una regressione lineare, fornendo, infine, il valore di EC50, i relativi intervalli fiduciali ed i risultati del test  $\chi^2$  che comprovano la bontà del modello statistico applicato.

In alternativa, qualora i risultati del modello Probit non siano soddisfacenti, si può ricorrere al modello non parametrico Trimmed Spearman-Kärber, già visto nel precedente paragrafo 8.4.3.2.

#### 8.5.3.3 Caratteristiche del test

L'utilizzo di questo crostaceo nei test di tossicità è dovuto a diversi motivi, riassunti nei punti seguenti:

- 1) gli organismi sono **rapidamente disponibili**: le cisti, infatti, schiudono in 24 h;
- 2) sono organismi **eurieci**: tollerano ampie variazioni nelle condizioni ambientali, in particolar modo quelle di salinità e temperatura;
- 3) si possono scegliere **diversi endpoint**: mortalità, tasso di schiusa e crescita;
- 4) gli organismi hanno un'**elevata fecondità**: il test acquisisce una **buona rilevanza statistica**;
- 5) il **ciclo di vita è breve**: questo permette l'esecuzione di test cronici estesi all'intera durata della vita dei crostacei;
- 6) **basso rapporto costi-benefici**: le dimensioni delle larve e dei crostacei sono molto ridotte e sono sufficienti piccoli volumi e poca spesa per l'esecuzione del test;
- 7) la strategia riproduttiva **partenogenetica** annulla la variabilità genetica fra gli organismi, condizione molto apprezzata nei test ecotossicologici;
- 8) **standardizzazione**: le varie fasi del test sono state codificate nel protocollo in maniera sistematica e puntuale.

Ad oggi, tuttavia, l'utilizzo del genere *Artemia* nei test ecotossicologici è ancora oggetto di dibattito, poiché esso, si è dimostrato relativamente meno sensibile nei confronti di alcuni inquinanti ed esiste quindi la probabilità di sottostimare la tossicità di questi.



## **9. MATERIALI E METODI**

A seguire sono elencati i materiali e le metodologie impiegati in questo lavoro di tesi allo scopo di ricavare i risultati sperimentali, sia quindi quelli necessari per le indagini chimiche di caratterizzazione, sia quelli utilizzati per i test ecotossicologici. Il capitolo si conclude con la descrizione dei controlli di qualità (Quality Control) eseguiti, necessari ai fini della sicurezza sulla bontà dei risultati ricavati (Quality Assurance) e sulla loro riproducibilità.

## 9. MATERIALI E METODI

### 9.1 Caratterizzazione chimico-fisica del nTiO<sub>2</sub>

Come anticipato al paragrafo 2.5, la caratterizzazione completa delle ENP prevede due fasi complementari:

- nella prima fase, detta comunemente caratterizzazione **primaria** (pristine characterisation), si sono analizzate le caratteristiche chimico-fisiche intrinseche delle ENP, come la composizione, la purezza, la morfologia, le dimensioni e l'area superficiale;
- la caratterizzazione **secondaria**, invece, è consistita nell'osservazione del comportamento chimico-fisico di tali ENP in acqua marina ricostruita, ovvero **nel mezzo acquoso disperso**.

Si intuisce come questi due tipi di informazione, data la loro complementarità, siano entrambi necessari per conoscere le ENP e per comprendere le loro modalità di diffusione nell'ambiente.

Entrambe le caratterizzazioni, primaria e secondaria, sono state condotte nell'ambito del dottorato di ricerca della Dr.ssa Sarah Callegaro, Università Cà Foscari, Dipartimento di Scienze Ambientali, Statistiche ed Informatiche (tutor Prof. Antonio Marcomini), che si è sviluppato in stretta collaborazione con il presente.

Si sono rese necessarie, inoltre, ulteriori analisi specifiche, legate alle peculiarità sperimentali di questa tesi di dottorato. Queste sono state condotte sia presso i laboratori del Prof. Giancarlo Rampazzo del Dipartimento di Scienze Ambientali, Statistiche ed Informatiche (sezione Geomineralogica), sia presso i laboratori di ECSIN (European Center for the Sustainable Impact of Nanotechnology) – Veneto Nanotech S.C.p.A. (sede di Rovigo). In entrambi i casi, le diverse metodiche di preparazione dei campioni sono state condotte personalmente dal sottoscritto. ECSIN, fra l'altro, ha acquisito delle immagini al TEM di un campione di nTiO<sub>2</sub> utilizzato per i gli esperimenti di questo lavoro.

Sia le analisi effettuate, sia le tecniche e gli strumenti necessari per la loro esecuzione, sono descritte dettagliatamente nei paragrafi 9.1.1 – 9.1.3. Di seguito, invece, se ne riporta una sintesi con la tabella 9.1.

	Analisi	Strumento/Tecnica	Sede/Collaborazione	Operatore
CARATTERIZZAZIONE PRIMARIA	Composizione	ICP-MS	lab. di chimica – Università Cà Foscari, Venezia	Callegaro S.
	Dimensioni e forma	TEM	lab. ECSIN – Veneto Nanotech S.C.p.A.	Micetic I.
	Fasi cristallografiche	TEM – SAED	lab. di chimica – Università Cà Foscari, Venezia	Callegaro S.
	Superficie specifica e porosità	B.E.T.	lab. di chimica – Università Cà Foscari, Venezia	Callegaro S.
CARATTERIZZAZIONE SECONDARIA	Potenziale Z	Mobilità elettroforetica	lab. di chimica – Università Cà Foscari, Venezia	Callegaro S.
	Variazione pH	pH-metro	lab. di chimica – Università Cà Foscari, Venezia	Callegaro S.
	Dimensioni e distribuzione del materiale sospeso	DLS	lab. di chimica – Università Cà Foscari, Venezia	Callegaro S.
	Stabilità	Analizzatore di stabilità	lab. di chimica – Università Cà Foscari, Venezia	Callegaro S.
ULTERIORI ANALISI	Analisi quantitative sul bioaccumulo di Ti in <i>A. franciscana</i>	ICP-OES	lab. sez. geomineralogica – Università Cà Foscari, Venezia	Minetto D.
	Analisi qualitative sul bioaccumulo di ENP in <i>P. tricornutum</i>	TEM	lab. di ecotossicologia (Celestia) – Università Cà Foscari, Venezia* lab. ECSIN – Veneto Nanotech S.C.p.A.	Micetic I. Minetto D.*

Figura 9.1 – Tabella riassuntiva delle analisi del nTiO<sub>2</sub>, effettuate a supporto alla parte ecotossicologica.

\* = solamente per la metodica di preparazione dei campioni.

### 9.1.1 Caratterizzazione primaria del nTiO<sub>2</sub>

Questo primo gruppo di analisi ha permesso di acquisire delle informazioni sulla natura chimico-fisica del nTiO<sub>2</sub> tal quale, grazie all'utilizzo di differenti tecniche e strumentazioni, di seguito descritte. Per le indicazioni sull'importanza delle singole proprietà e, di conseguenza, sui motivi per cui queste necessitano di accurate misure e descrizioni, si rimanda a quanto già trattato al paragrafo 2.5.

#### 9.1.1.1 Composizione

La composizione chimica delle ENP di TiO<sub>2</sub> è stata analizzata mediante un ICP-MS (Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometer). Il principio su cui si basa lo strumento è la possibilità di dissociare la materia in ioni, mediante somministrazione di una grande quantità di energia. La ionizzazione avviene grazie ad una torcia a plasma, in cui la temperatura del campione e del flusso di argon che lo trasporta raggiunge i 6000 – 8000 °C. L'ICP-MS può separare la miscela di ioni in funzione del loro **rapporto massa/carica** (m/z), applicando ad essa dei campi magnetici statici o oscillanti.

#### 9.1.1.2 Dimensioni e forma

Le **dimensioni** e la **forma** delle ENP sono state analizzate, come anticipato, avvalendosi di un TEM (Jeol JEM-3010, Oxford Instruments, Tokyo, Japan), operando in condizioni di alto vuoto. Il TEM (Transmission Electron Microscopy), come tutti i microscopi elettronici, sfrutta come sorgente luminosa un fascio di elettroni. A differenza però di altri apparecchi, col TEM si possono visualizzare anche le strutture dell'interno di un campione. Infatti, regolando opportunamente l'energia del fascio di elettroni (kV), si riesce ad avere un'istantanea di un piano perpendicolare al fascio, ad una certa profondità dalla superficie. Per l'analisi, che hanno richiesto una potenza operativa dello strumento di 120 kV, le nanoparticelle sono state risospese in acqua ultrapura ad una concentrazione nominale di  $1440 \text{ mg L}^{-1}$ , depositate su griglia in rame (10  $\mu\text{L}$ ) rivestita da una pellicola di carbonio. L'osservazione è stata eseguita solamente dopo totale evaporazione del mezzo disperdente a temperatura ambiente.

#### 9.1.1.3 Fasi cristallografiche

Grazie alla diffrazione elettronica di un'area del campione (SAED = Selected Area Electron Dispersion), con il TEM (Jeol JEM-3010, Oxford Instruments, Tokyo, Japan) è stato possibile analizzare anche la **fase cristallografica** delle ENP. In pratica, si può ottenere un'immagine composta da cerchi concentrici, che costituisce lo spettro della sostanza analizzata. La distanza tra i vari cerchi fornisce un'informazione **qualitativa**, permettendo di individuare la fase cristallografica che compone il reticolo cristallino, mentre l'intensità dei cerchi, proporzionale al numero di atomi, fornisce un'informazione **quantitativa** e permette di ricavare le percentuali relative delle diverse fasi.

#### 9.1.1.4 Superficie specifica e porosità

Le misure dei parametri **superficie specifica** e **porosità** delle ENP sono state ricavate con la tecnica B.E.T. (Brunauer Emmett Teller) che deve il suo nome ai tre scienziati che per primi la misero a punto (Brunauer et al, 1938). Il principio di funzionamento si basa sull'adsorbimento di una quantità di  $\text{N}_2$  liquido da parte dell'analita. In pratica, il campione viene a contatto con una corrente di  $\text{N}_2$  liquido alla temperatura di  $-196 \text{ }^\circ\text{C}$  (77 K) che viene in parte adsorbito dalla sua superficie. Conoscendo la quantità di  $\text{N}_2$  somministrata per l'analisi, si ricava per differenza l'entità di quanto adsorbito. Tale adsorbimento è funzione proprio della superficie specifica e della porosità della sostanza analizzata, per cui, attraverso delle opportune equazioni possono essere ricavate entrambe le misure. Lo strumento utilizzato era un Micrometrics ASAP 2000.

### 9.1.2 Comportamento chimico del nTiO<sub>2</sub> in ASW (caratterizzazione secondaria)

Le misure effettuate sul comportamento del nTiO<sub>2</sub> in acqua marina comprendevano: il potenziale Z, il pH, la tendenza delle ENP a formare agglomerati e la distribuzione granulometrica di tali agglomerati.

#### 9.1.2.1 Potenziale Zeta

Il **potenziale Zeta** ( $\zeta$ ), che fornisce informazioni sulla stabilità di una sospensione colloidale (cfr. par. 2.5), è stato misurato con il processo dell'elettroforesi. In pratica, le ENP vengono disperse in un fluido, al quale si applica un campo elettrico. A quel punto esse si spostano verso il polo di carica opposta e pertanto, la direzione dello spostamento indica chiaramente il segno della carica sulla superficie. La velocità con cui si muovono le particelle invece, è proporzionale alla grandezza della carica. Misurando quindi, sia la velocità sia la direzione dello spostamento, in un campo elettrico noto, è possibile calcolare la **mobilità elettroforetica** e da qui, attraverso l'equazione di Henry, il potenziale Zeta del sistema (mV).

Il potenziale  $\zeta$  è stato misurato sia in ASW (1 e 2), sia in acqua ultrapura, a cui si è aggiunta una quantità di NaOH (Romil) tale da modificare il valore del pH e renderlo simile a quello delle ASW. Lo strumento utilizzato era un Nicomp DLS PSS 370.

#### 9.1.2.2 Variazione del pH

Il nTiO<sub>2</sub> ha un carattere anfotero (Reutergårdh e Iangphasuk, 1997) per cui, a seconda del mezzo disperdente in cui è introdotto, può comportarsi da acido o da base. Per misurare la **variazione del pH** di ASW1 e ASW2, legata alla presenza delle ENP nel mezzo acquoso, si sono analizzate dispersioni a concentrazione 0,1, 1, 10 e 100 mg L<sup>-1</sup> con un pHmeter HI 9025 Microcomputer di HANNA Instrument®. Per ciascun campione, le misure sono state condotte in triplicato.

#### 9.1.2.3 Dimensioni e distribuzione del materiale sospeso (salinità costante)

La **dimensione** e la **distribuzione** del materiale sospeso, in funzione del tempo, è stata misurata a 22 °C ± 1 °C con l'ausilio di un'apparecchiatura DLS (Dynamic Light Scattering) modello Nicomp DLS PSS 370. L'apparecchio utilizza un laser a diverse lunghezze d'onda che, attraversando il materiale sospeso nel mezzo, viene diffuso in varie direzioni. Un detector, posto a 90° rispetto alla sorgente luminosa, capta la luce in uscita. Per le analisi è stata impostata una lunghezza d'onda pari a 362,8 nm e ogni misura si è protratta per un tempo di 6 minuti. Le misure sono state effettuate a 0, 24, e 48 h. I dati ricavati sono stati processati in base all'algoritmo dello strumento, in grado di scegliere automaticamente la distribuzione che meglio

si sovrappone al set di dati. I risultati sono stati espressi in funzione del parametro diametro idrodinamico (Hydrodynamic Diameter,  $d_H$ ). Questo rappresenta il diametro effettivo delle NP in un mezzo acquoso, poiché esse sono assimilabili a sfere. La deviazione standard dei risultati rappresenta l'ampiezza della popolazione degli agglomerati.

#### 9.1.2.4 Dimensioni e distribuzione del materiale sospeso in funzione della salinità

Sono state effettuate delle ulteriori misure sulla dimensione e sulla distribuzione del materiale sospeso, in funzione della diversa salinità del mezzo acquoso, per quantificare l'influenza di tale parametro nel processo di agglomerazione. La prova è stata effettuata diluendo un campione di ASW1 (35‰), portandolo ad una salinità di 5‰ e 0,5‰ ed aggiungendo poi le ENP, nelle diverse quantità. Il tempo trascorso dalla sonicazione delle dispersioni è solamente quello necessario al completamento delle misure nelle 3 repliche, con il DLS (c.a 20 min).

#### 9.1.2.5 Stabilità

La **stabilità** a lungo termine delle dispersioni di  $n\text{TiO}_2$  è stata valutata mediante l'utilizzo di un analizzatore di stabilità (LUMifuge® 116, L.U.M. GmbH, Qi srl) (Krause et al, 2009; Kuentz and Rothlisberger, 2003). Questo consiste di una centrifuga analitica abbinata ad un sensore optoelettronico che rileva le variazioni nella radiazioni infrarossa trasmessa, causate dalla sedimentazione del materiale sospeso. Il principio è quello di aumentare la forza di gravità imprimendo al campione un'ingente forza centrifuga. In questo modo, ciò che in condizioni naturali sedimenterebbe in un lungo arco di tempo, può invece depositarsi molto velocemente. Lo strumento misura i valori di radiazione vicina all'infrarosso trasmessi in uscita ed espressi come percentuale di intensità  $I\% = (I / I_0) \cdot 100$ , dove  $I$  = radiazione uscente e  $I_0$  = radiazione incidente. Più diminuiscono le particelle in sospensione, minore è la componente della radiazione rifratta da queste ( $I$ ) e, di conseguenza, il valore  $I\%$  diminuisce. Gli esperimenti sono stati eseguiti in duplicato alla velocità rotazionale di 1800 rpm per 50 min e a temperatura ambiente. Successivamente, si è cercato di ricavare le leggi matematiche alla base delle evidenze sperimentali osservate, in modo tale da poter disporre di ulteriori informazioni con cui interpretare al meglio i risultati dei test.

### 9.1.3 Analisi specifiche con ICP-OES e TEM

#### 9.1.3.1 Analisi con ICP-OES per il test di bioaccumulo con *A. franciscana*

Come anticipato al paragrafo 9.1, presso i laboratori della sezione di Geomineralogia del Prof. Giancarlo Rampazzo sono state condotte delle analisi per la quantificazione della concentrazione

di Ti con l'ICP-OES. Queste analisi si sono rese necessarie in occasione del test di bioaccumulo con *A. franciscana*.

A questo scopo, durante l'esecuzione di tale test, sono state prelevate:

- aliquote **tal quali** delle dispersioni, a concentrazione 1, 10 e 50 mg L<sup>-1</sup>, prelevate dai flaconi, non appena terminata la sonicazione;
- aliquote del **mezzo acquoso**, prelevate **a 96 h** dagli stessi pozzetti in cui è stato condotto il test, a concentrazione 1, 10 e 50 mg L<sup>-1</sup>;
- tutti i **crostacei** utilizzati per l'esperimento di bioaccumulo.

La descrizione dettagliata della conduzione del test e della metodica di preparazione dei campioni, per le analisi con l'ICP-OES, è affidata al paragrafo 9.4.

#### 9.1.3.2 Acquisizione di immagini al TEM inerenti l'eventuale presenza di nTiO<sub>2</sub> nell'alga *P. tricornutum*

Per quanto riguarda, invece, l'acquisizione delle immagini al TEM dei campioni di alghe esposti alle ENP, la preparazione dei campioni ha seguito le linee guida suggerite da Peng et al (2011). Presso i laboratori di ecotossicologia della sede della Celestia, sono state allestite delle colture algali in varie provette di vetro, contenenti:

- 0,5 mL di sospensione algale;
- 0,5 mL di soluzione di crescita;
- 9 mL di dispersione di nTiO<sub>2</sub> a diversa concentrazione (0,1; 1; 10 e 50 mg L<sup>-1</sup>) (9 mL di ASW per il bianco).

Le provette sono state chiuse con cotone idrofilo e carta stagnola e termostatate per 72 h a 20 °C ± 1°C, con fotoperiodo di 14 h, in modo da portare la coltura nella fase di crescita logaritmica. Successivamente, la biomassa algale è stata centrifugata a 1600 rpm per 4 minuti (Centrifuge 4235, Alc International) e, eliminato il surnatante, sono stati introdotti 8 mL di una soluzione composta da paraformaldeide al 2% e da glutaraldeide al 2,5%, diluite in acqua marina ricostruita. Il tutto è rimasto in posa per 2 h, fatta eccezione per una blanda agitazione con frequenza di 30 min. Trascorse le 2 h, è stata effettuata un'altra centrifugazione alle stesse condizioni della precedente e, eliminato il surnatante, sono stati introdotti 8 mL di soluzione di PBS (Phosphate Buffer Solution). Il tutto è stato conservato a 4 °C ± 1 °C. Dopo la fissazione, i campioni sono stati immersi in una soluzione di osmio tetrossido al 2%, con tampone fosfato e, successivamente, disidratati mediante una serie di soluzioni di alcol etilico a gradazione alcolica incrementale. Infine, si è posizionato il tutto su resina EPON, un supporto organico che permette

la conservazione del campione disidratato, facilitando le operazioni di taglio necessarie all'acquisizione di immagini in profondità.

## 9.2 nTiO<sub>2</sub>: preparazione delle dispersioni

E' improprio affermare che una ENP si discioglie in un mezzo acquoso. Essa semmai può rimanervi in sospensione. Per questo motivo ha più senso parlare di **sospensioni** di ENP. Per rendere omogenea la concentrazione di una sospensione di ENP è necessario trattarla mediante sonda ad ultrasuoni che disperde uniformemente le ENP nel volume considerato. Ecco perché, dopo la sonicazione, si preferisce parlare di **dispersioni** di ENP. Le dispersioni sono effimere poiché le ENP permangono solo temporaneamente nella matrice acquosa e, se imperturbate, in tempi relativamente brevi, sedimentano in agglomerati più o meno grossolani in funzione, soprattutto, della concentrazione iniziale e del mezzo in cui si trovano (Keller et al, 2010).

### 9.2.1 Le acque marine ricostruite

Prima di tutto è stato necessario preparare le acque marine ricostruite (ASW = Artificial Sea Water), per avere la garanzia di lavorare con un mezzo incontaminato e con caratteristiche conosciute. L'ASW, utilizzata come mezzo nella conduzione dei test ecotossicologici, ha una formulazione lievemente differente a seconda delle esigenze degli organismi utilizzati nella sperimentazione. Maggiori dettagli sono riportati nei relativi protocolli per i test ecotossicologici. Per praticità, le acque marine saranno indicate come ASW1 (usata per i batteri, i bivalvi ed i crostacei) ed ASW2 (usata per le alghe).

In ogni caso, tutte le acque marine utilizzate in questo lavoro sono state ricostruite aggiungendo i rispettivi sali certificati (cfr. par. 9.5.1) all'acqua ultrapura (resistività 18,2 M $\Omega$ ·cm) prodotta da un'apparecchiatura Millipore F&K5430. I sali sono stati disciolti con l'ausilio di un agitatore magnetico e, successivamente, le acque sono state areate per una notte mediante il gorgogliamento di aria compressa. In seguito sono state filtrate con filtri in nitrato di cellulosa 0,45  $\mu$ m (Whatman International Ltd) e conservate al buio a 4 °C  $\pm$  1° C. La salinità media è risultata pari a 34‰  $\pm$  1‰ ( $n = 9$ ) e 32‰  $\pm$  1‰ ( $n = 9$ ) rispettivamente per ASW1 ed ASW2 ed il valore di pH compreso tra 8,27 e 8,31 per ASW1 e 8,25 e 8,28 per ASW2. La misura della salinità è stata effettuata con un rifrattometro (Atago, Japan), mentre il pH è stato misurato con lo strumento pHmeter HI 9025 Microcomputer di HANNA Instrument®. In genere, le diverse acque erano preparate appositamente per i vari test. In ogni caso, queste erano sempre sostituite da acque fresche dopo circa un mese.

### 9.2.2 Dispersioni di nTiO<sub>2</sub>

La polvere di nTiO<sub>2</sub> conosciuta col nome commerciale di Aeroxide® P25 Titanium Dioxide, è stata fornita dalla Degussa-Evonik Corporation. Il materiale, secondo quanto dichiarato dal

produttore, consiste di una miscela composta approssimativamente dal 75% di anatasio e dal 25% di rutilo ed ha un diametro dichiarato di 20 nm (cfr. tabella 9.2 b).

Innanzitutto è stata preparata una sospensione stock a concentrazione nota, portando a volume con ASW un'opportuna aliquota di P25 precedentemente pesata con una bilancia analitica elettronica a 4 cifre decimali (Sartorius Basic). La sospensione così ottenuta è stata dispersa omogeneamente mediante l'utilizzo di un **sonicatore ad ultrasuoni** (modello UP-100H, Hielscher Ultrasound Technology, Teltow - Germany) (fig. 9.3). Il trattamento è stato eseguito alla potenza di 100 W per un tempo di 20 min, in bagno di ghiaccio. La potenza di esercizio e la durata della sonicazione sono state decise in base ai risultati delle prove preliminari effettuate dalla Dr.ssa Sarah Callegaro sull'efficacia del suddetto trattamento. La sonicazione mediante ultrasuoni può disperdere omogeneamente una ENP nel mezzo acquoso e, assieme al bagno ad ultrasuoni, è la tecnica di preparazione delle dispersioni attualmente più utilizzata, secondo quanto riportato nella letteratura più recente. Al termine dei 20 min, dalla sospensione stock, sono state prelevate le diverse aliquote da diluire con opportuni volumi di ASW, ottenendo così le diverse dispersioni alle concentrazioni nominali volute. Queste sono state preparate sempre un giorno prima del test e conservate in flaconi di vetro ambrato, rivestiti di carta stagnola, a 4 °C. Prima del loro utilizzo, in ogni caso, sono sempre state risospese mediante sonicazione alla potenza di 100 W per un tempo di 20 min, in bagno di ghiaccio.



Nome Prodotto	Aeroxide P25 (Degussa-Evonik)
Composizione	75% anatasio; 25% rutilo
Diametro	20 nm
Superficie specifica	60 m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup>
Purezza in peso	> 99,5%

Figura 9.2 a) e b) – Campione di nTiO<sub>2</sub> P25 Degussa – Evonik (a); tabella riassuntiva delle caratteristiche del ENM dichiarate dal produttore (b).



Figura 9.3 – Sonda per sonicazione e dispersione delle ENP in un mezzo acquoso.

#### 9.2.2.1 Prove con l'alginato

La necessità di lavorare con delle ENP omogeneamente disperse nel mezzo, ha portato a prendere in considerazione l'introduzione, nell'acqua marina, di un mezzo disperdente quale l'alginato. Con queste acque, si sono effettuati alcuni test, sia con l'alga, sia con i crostacei. Le acque marine ricostruite, quindi, sono state addizionate di alginato attraverso la seguente preparazione, suggerita dalla Dr.ssa Sarah Callegaro:

- 1 g di alginato in polvere (Fluka Code 71240, Fluka - Milano) è stato disperso in 1 L di ASW;
- la soluzione è stata agitata vigorosamente per 60 s e poi lasciata per due giorni in frigo a  $4 \pm 1$  °C;
- l'alginato che, dopo i 2 gg., non si era ancora dissolto, è stato rimosso con una serie di filtrazioni in sequenza, effettuate con filtri in fibra di vetro, rispettivamente, da 1  $\mu\text{m}$ , 0,45  $\mu\text{m}$ , e 0,22  $\mu\text{m}$  (Whatman International Ltd, Kent, UK);
- dopo il filtraggio, con tali acque si sono preparate le dispersioni di nTiO<sub>2</sub>.

### 9.3 I test di tossicità

Tutti i test di tossicità condotti hanno seguito le linee guida di riferimento internazionali per l'esecuzione dei test ecotossicologici con sostanze chimiche tradizionali. A questi protocolli sono state apportate delle modifiche, in funzione delle diverse esigenze operative. Nei paragrafi successivi saranno illustrati sia i protocolli originari che le relative modifiche. Di seguito, il quadro riassuntivo dei diversi test condotti.

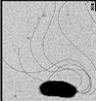
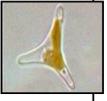
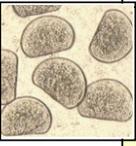
	SPECIE TEST	ENDPOINT	PROTOCOLLO	PAG
	<i>Vibrio fischeri</i>	Test acuto di riduzione bioluminescenza a 30 min	ISO EN ISO 11348-3 (2006)	194
	<i>Phaeodactylum tricoratum</i>	Test cronico a breve termine di inibizione della crescita cellulare a 72 h	UNI EN ISO 10253:2006	197
	<i>Crassostrea gigas</i>	Test sub-cronico di embriotossicità a 24 h	His et al, 1997 e ASTM (1998, 2004)	201
	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Test sub-cronico di embriotossicità a 48 h	His et al, 1997 e ASTM (1998, 2004)	201
	<i>Artemia franciscana</i>	Test acuto di immobilizzazione a 24 h	APAT & IRSA CNR (2003)	205
	<i>Artemia franciscana</i>	Test acuto di immobilizzazione a 96 h	APAT & IRSA CNR (2003)	205

Tabella 9.4 – Elenco dei differenti test ecotossicologici eseguiti in questa ricerca.

#### Elementi comuni ai vari esperimenti

In tutti i test condotti (ad eccezione del test con *V. fischeri*), per l'esposizione degli organismi alle ENP sono state utilizzate delle **piastre monouso** multi-pozzetto con coperchio da 24 pozzetti cadauna, con una capacità volumetrica pari a 3 mL (Iwaki, Japan). In alcuni casi, quando, dopo il test, si rendeva necessario il recupero di volumi maggiori, sono state utilizzate delle piastre monouso multi-pozzetto con coperchio da 6 pozzetti cadauna, con una capacità volumetrica pari a 10 mL (Iwaki, Japan).

Le letture dei test con *P. tricoratum*, *C. gigas* e *M. galloprovincialis*, sono state effettuate mediante osservazione microscopica con l'ausilio di una **camera di Bürker** (figg. 9.5 e 9.6), il

cui reticolo è costituito da 9 quadrati grandi, ognuno della superficie di  $1 \text{ mm}^2$ . Ognuno di questi quadrati è a sua volta suddiviso in 16 quadrati con superficie unitaria di  $0,04 \text{ mm}^2$  (fig. 9.6) (Gentile, 2010).



Figura 9.5 - Camera di Bürker.

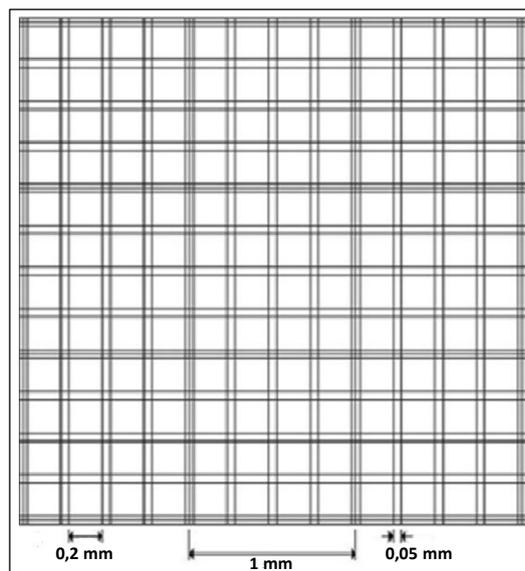


Figura 9.6 - Dettaglio della camera di Bürker (Gentile, 2010).

### 9.3.1 Test di tossicità con *Vibrio fischeri*

Il batterio gram- *V. fischeri* è stato impiegato per condurre il test acuto di **inibizione della bioluminescenza** (Microtox®) in accordo con il protocollo ISO EN ISO 11348-3 (2006) e Azur Environmental (1998, Protocollo Basic). La tossicità è misurata come funzione della riduzione della bioluminescenza dei microrganismi (circa  $10^6$  unità per ogni singolo evento espositivo) in seguito all'esposizione alla matrice liquida di interesse, rispetto ad opportune condizioni operative al contorno. La composizione dell'ASW utilizzata è la seguente:

SALE	FORMULA	g L <sup>-1</sup>
Stronzio cloruro esaidrato	SrCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,020
Acido borico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,030
Potassio bromuro	KBr	0,100
Potassio cloruro	KCl	0,700
Calcio cloruro diidrato	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1,470
Sodio solfato anidro	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4,000
Magnesio cloruro esaidrato	MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	10,780
Sodio cloruro	NaCl	23,500
Sodio metasilicato nonaidrato	Na <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Si · 9H <sub>2</sub> O	0,020
Sodio bicarbonato	NaHCO <sub>3</sub>	0,200

Tabella 9.7 – Composizione dell'ASW per il *V. fischeri*.

#### Preparazione

- Le fiale contenenti i batteri liofilizzati sono state acquistate dalla Ecotox (PD, Italia).
- Il batterio, conservato a -20 °C, è stato riattivato e reidratato a 4 °C mediante una soluzione salina certificata a base di NaCl. La riattivazione ha avuto una durata di c.a 40 minuti.

#### Esposizione

- Le dispersioni di ENP a diversa concentrazione sono state sonicate per 20 min a 100 W in bagno di ghiaccio. Per ogni concentrazione, non appena terminata la sonicazione, 5 mL di dispersione sono stati introdotti nella fiala porta-campione e, a questi, sono stati aggiunti 10 µL di sospensione batterica. Il tutto è stato riposto nei diversi alloggiamenti dell'apparecchiatura (Azur Environmental), dove la temperatura di esposizione era mantenuta dal sistema a 15 °C.

#### Lettura

- Le letture dei valori di bioluminescenza sono state effettuate dopo 5, 15 e 30 minuti di contatto.

- L'apparecchiatura trasferisce i valori rilevati direttamente ad un computer che è in grado di calcolare e visualizzare graficamente l'intensità dell'inibizione (fig. 9.8).



Figura 9.8 – Apparecchiatura per l'esecuzione del test Microtox® della Azur Environmental.

Complessivamente, si sono testate concentrazioni di ENP comprese tra  $10^{-9}$  mg L<sup>-1</sup> e 10 mg L<sup>-1</sup>.

#### Analisi statistica

Azur Environmental fornisce un software che, una volta collegato il fotometro ad un PC, è in grado di registrare automaticamente l'intensità del segnale luminoso ed elaborare i dati ottenuti, fornendo così uno strumento per il calcolo rapido dell'EC50. Inoltre, sui dati ricavati è stato eseguito il test ANOVA mediante l'utilizzo di apposite macro di Excel, al fine di confrontare la variabilità dei diversi gruppi di risultati.

<b>Condizioni sperimentali per l'esecuzione del test con <i>V. fischeri</i></b>	
Tipo di test	statico
Endpoint	riduzione bioluminescenza
Numero repliche per campione	3
Temperatura	15 ° C
Salinità	30-35‰
Luminosità / Fotoperiodo	luce naturale
pH	7,8 – 8,0
Durata del test (esposizione)	30 min
Controllo positivo	ZnSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O

Tabella 9.9 – Tabella riassuntiva delle condizioni sperimentali per *V. fischeri*.

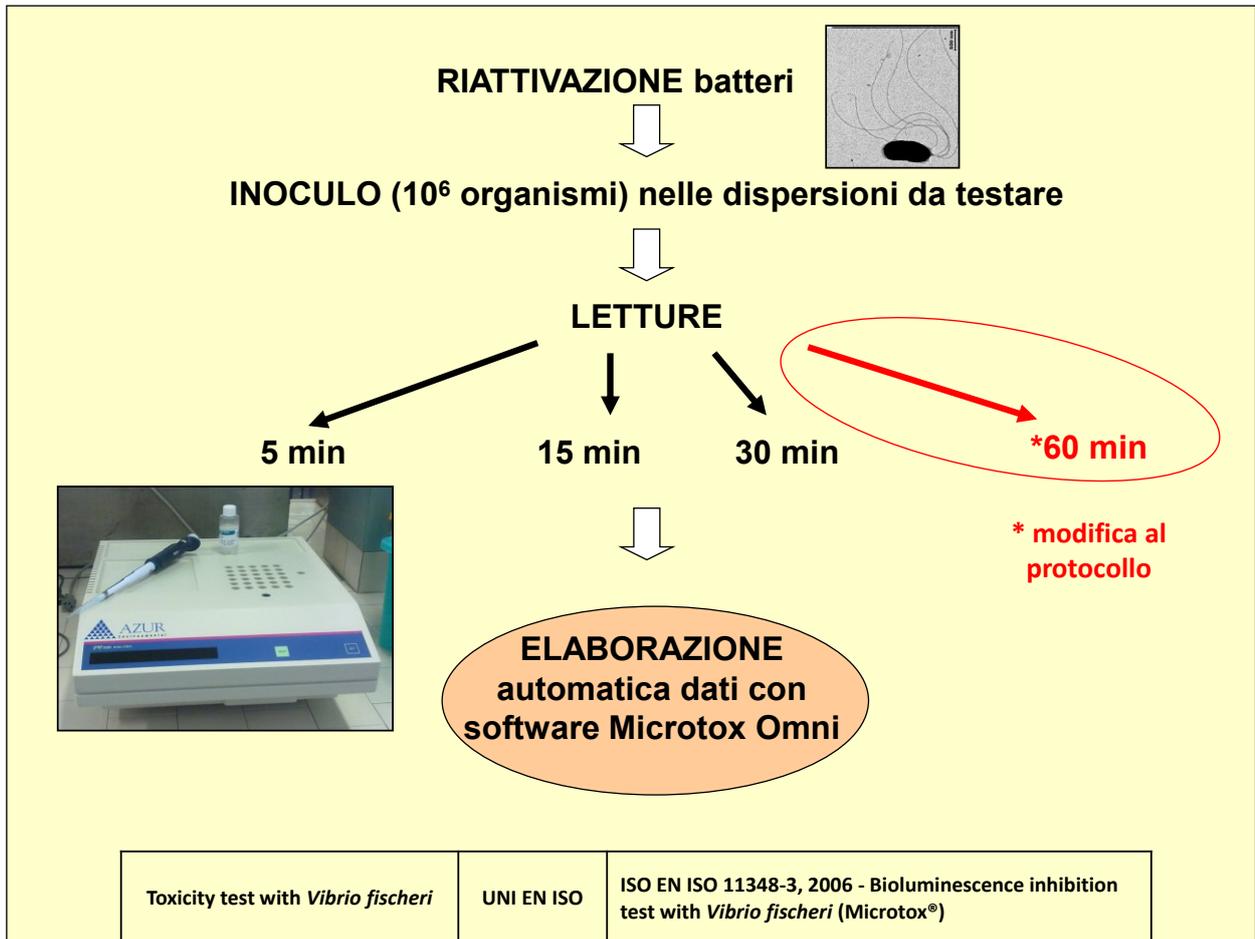


Figura 9.10 – Principali fasi del test di inibizione della bioluminescenza con *V. fischeri*.

### 9.3.2 Test di tossicità con *Phaeodactylum tricornutum*

Il test cronico a breve termine di **inibizione della crescita cellulare** con *P. tricornutum* è stato condotto in accordo con il protocollo UNI EN ISO (10253:2006). La tossicità è misurata come funzione dell'inibizione della crescita algale; l'inibizione della crescita algale, a sua volta, è misurata come riduzione del tasso di crescita specifico rispetto a colture di controllo negativo mantenute nelle stesse condizioni di nutrimento, luce e temperatura. La composizione dell'ASW utilizzata è la seguente:

SALE	FORMULA	g L <sup>-1</sup>
Sodio cloruro	NaCl	22
Magnesio cloruro esaidrato	MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	9,7
Sodio solfato anidro	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3,7
Calcio cloruro anidro	CaCl <sub>2</sub>	1
Potassio cloruro	KCl	0,65
Sodio bicarbonato	NaHCO <sub>3</sub>	0,20
Acido borico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,023

Tabella 9.11 – Composizione dell'ASW per *P. tricornutum*.

#### Preparazione

- 3 gg. prima del test si è proceduto ad effettuare una pre-coltura. Questa è stata preparata facendo un prelievo di 8 mL da una sospensione algale precedente ed inoculandolo in c.a 100 mL di **soluzione di crescita**. Questa è composta da 3 soluzioni di nutrienti (stock) che vengono aggiunti ad 1 L di ASW nelle seguenti quantità: 15 mL di stock 1 (sali minerali), 0,5 mL di stock 2 (vitamine) e 1 mL di stock 3 (P, N e SiO<sub>2</sub>). La composizione delle 3 soluzioni nutrienti è la seguente:

SALE	FORMULA	mg L <sup>-1</sup>
<b>Stock 1</b>		
Ferro cloruro esaidrato	FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	48
Manganese cloruro tetraidrato	MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	144
Zinco solfato eptaidrato	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	45
Solfato di rame pentaidrato	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,157
Cobalto cloruro esaidrato	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,404
Acido borico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1140
Acido etilendiamintetraacetato	Na <sub>2</sub> EDTA	1000
<b>Stock 2</b>		
Tiamina idrocloruro (vitamina B)		50
Biotina (vitamina B7)		0,01
Cianocobalamina (vitamina B12)		0,10
<b>Stock 3</b>		
Potassio fosfato	K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	3
Sodio nitrato	NaNO <sub>3</sub>	50
Sodio metasilicato pentaidrato	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> · 5H <sub>2</sub> O	14,9

Tabella 9.12 – Composizione degli stock di nutrienti per *P. tricornutum*.

- La coltura così ottenuta è stata conservata a condizioni controllate per 72 h a 20 °C, rispettando un fotoperiodo di 14 h e di intensità luminosa pari a 6000 lumen. La luminosità è stata misurata con un luxmetro Luxmeter HD 8366 (Delta OHM, Italia).

- Trascorse le 72 h la coltura algale si trova in fase di crescita esponenziale per cui, si è effettuato il conteggio delle cellule con la camera di Bürker (2 conteggi per 3 repliche) e, in base alla densità della popolazione di partenza, si è prelevato un opportuno volume di coltura, da diluirsi con ASW, per ottenere una sospensione finale con una densità di c.a 10<sup>4</sup> cellule mL<sup>-1</sup>.

### Esposizione

- Le dispersioni di ENP a diversa concentrazione sono state sonicate per 20 min a 100 W in bagno di ghiaccio. Successivamente, da ciascuna dispersione sono stati prelevati 9 mL a cui si sono aggiunti 0,5 mL di coltura algale e 0,5 mL di soluzione di nutrienti, a sostegno della crescita per la durata del test. Da segnalare che, così operando, inevitabilmente il tossico subisce una diluizione del 10%.

- In seguito, si è proceduto al trasferimento di 3 aliquote da 3 mL nei pozzetti (cfr. pag. 192), questo per ciascuna dispersione di nTiO<sub>2</sub> di diversa concentrazione, lasciando poi le alghe così esposte per 72 h alle stesse condizioni controllate di cui sopra (fig. 9.13).

### Lecture

- Trascorso questo termine, il test è stato fissato con una soluzione di formalina tamponata al 4% e la determinazione della numerosità algale è stata effettuata mediante conteggio con camera di Bürker (cfr. pag. 192).

- Il test è ritenuto nullo se, nel controllo negativo, la mortalità è superiore al 20%.

- Sui dati rilevati è stata condotta l'interpolazione dei dati mediante regressione lineare per la determinazione del valore di concentrazione efficace avente un effetto sul 20% e sul 50% della popolazione considerata, ricavando i rispettivi indici di tossicità IC<sub>20</sub> ed IC<sub>50</sub>.

Complessivamente, si sono testate concentrazioni di ENP comprese tra 0,1 mg L<sup>-1</sup> e 100 mg L<sup>-1</sup>.



Figura 9.13 – Esposizione delle alghe al tossico in condizioni controllate di luce, temperatura e nutrienti.

### Analisi statistica

Effettuando la regressione lineare sui valori delle percentuali di inibizione ricavate rispetto alle concentrazioni a cui tali effetti sono stati misurati, si ottengono i valori dell'intercetta  $q$  e del coefficiente angolare  $m$  di una retta nella generica forma  $Y = mX + q$ .

Da quest'ultima si ricava agevolmente l'IC<sub>50</sub>, visto che questo corrisponde alla percentuale di inibizione pari al 50%, per cui, basta eguagliare l'equazione a 50 per ottenere  $X$ , cioè la concentrazione in corrispondenza della quale si verifica un effetto di inibizione pari al 50%.

Sui dati ricavati sperimentalmente è stato inoltre eseguito il test ANOVA mediante l'utilizzo di apposite macro di Excel, al fine di confrontare la variabilità dei diversi gruppi di risultati.

<b>Condizioni sperimentali per l'esecuzione del test con <i>P. tricornutum</i></b>	
Tipo di test	statico
Endpoint	inibizione crescita cellulare
Numero repliche per campione	3
Temperatura	20 °C
Salinità	30-35‰
Luminosità / Fotoperiodo	6000 – 10000 lux / 14 h
pH	7,8 – 8,0
Durata del test (esposizione)	72 h
Controllo positivo	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>

Figura 9.14 – Tabella riassuntiva delle condizioni sperimentali per *P. tricornutum*.

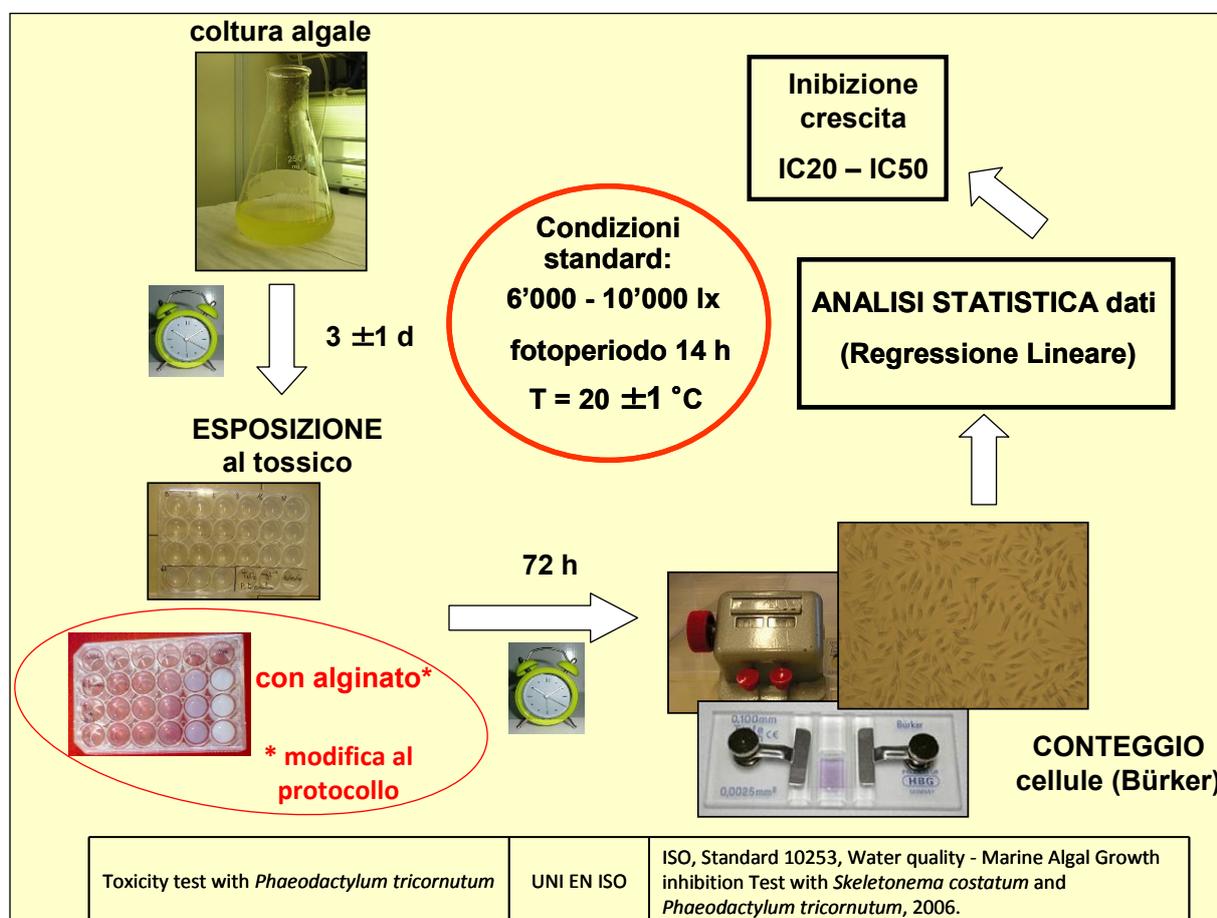


Figura 9.15 – Principali fasi del test di inibizione della crescita cellulare con *P. tricornutum*.

### 9.3.3 Test di tossicità con *Crassostrea gigas* e *Mytilus galloprovincialis*

Il test sub-cronico di **embriotossicità** con l'ostrica *C. gigas* ed il mitilo *M. galloprovincialis* ha seguito le procedure operative riportate da His et al (1997) e ASTM (1998, 2004). La tossicità delle ENP sugli embrioni di bivalvi è misurata in funzione alla frequenza del numero di larve **anomale** e di stadi **pre-larvali** rispetto a quella di larve **normo-formate**. La composizione dell'ASW utilizzata è la seguente:

SALE	FORMULA	g L <sup>-1</sup>
Stronzio cloruro esaidrato	SrCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,020
Acido borico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,030
Potassio bromuro	KBr	0,100
Potassio cloruro	KCl	0,700
Calcio cloruro diidrato	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1,470
Sodio solfato anidro	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4,000
Magnesio cloruro esaidrato	MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	10,780
Sodio cloruro	NaCl	23,500
Sodio metasilicato	Na <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Si · 9H <sub>2</sub> O	0,020
Sodio bicarbonato	NaHCO <sub>3</sub>	0,200

Tabella 9.16 – Composizione dell'ASW per *C. gigas* e *M. galloprovincialis*.

#### Preparazione

- Gli esemplari adulti, sono stati puliti dalle incrostazioni della conchiglia prima dell'emissione.
- Per indurre l'emissione dei gameti, gli animali sono stati stimolati tramite shock termico, con cicli alternati, della durata di 30 min ciascuno, alla temperatura di 18 °C ± 1 °C e 28 °C ± 1 °C. Gli adulti sono posti insieme nel bagno termostato e nella loro acqua sono aggiunti dei gameti precedentemente uccisi tramite congelamento poiché questi contengono ferormoni utili a stimolare l'emissione.
- Gli animali che iniziano l'emissione sono trasferiti individualmente in contenitori puliti con acqua marina artificiale alla temperatura di 24 °C ± 1 °C per le ostriche e di 18 °C ± 1 °C per i mitili.
- I gameti sono stati controllati al microscopio: per gli spermatozoi è necessaria una buona mobilità, per le uova sono importanti dimensioni, forma e omogeneità.
- Dopo 30 minuti dall'inizio dell'emissione, la sospensione spermatica è stata filtrata con un setaccio sterile da 32 - 40 µm, mentre la sospensione di uova con una rete da 75 - 100 µm.
- Il pool di uova è stato diluito in un cilindro graduato da 500 mL, mentre il pool di spermatozoi è stato mantenuto in una sospensione concentrata (50 mL).

- Per eseguire la fecondazione, 10 - 15 mL di spermatozoi sono stati inoculati nella sospensione di uova, mantenuta in agitazione continua tramite apposito agitatore.
- Il conteggio delle uova è stato eseguito prelevando 10 mL di sospensione omogenea di uova e portandoli a volume con l'acqua di diluizione in un cilindro da 250 mL. Agitando la nuova sospensione diluita, si sono prelevati 4 sub-campioni da 100  $\mu$ L, contandone le uova presenti. Durante il conteggio al microscopio si è controllato anche il successo della fecondazione (formazione del globulo polare).
- Sulla base del conteggio, si è determinata la quantità di sospensione di uova fecondate da inoculare in ciascun pozzetto (densità finale 200 - 300 uova in 3 mL).



Figura 9.17 (sopra) – Emissione di spermatozoi da parte di un maschio di *C. gigas*.

Figura 9.18 (sotto) – Emissione di uova da parte di una femmina di *M. galloprovincialis*.



### Esposizione

- Contemporaneamente alle fasi precedentemente descritte, si è proceduto alla dispersione delle soluzioni a diversa concentrazione di nTiO<sub>2</sub>, per 20 min a 100 W in bagno di ghiaccio. Quindi, per ciascuna dispersione sono state trasferite nei pozzetti 3 aliquote da 3 mL ciascuna e, in seguito, si è aggiunta la giusta quantità di uova fecondate.
- Una volta inoculate le uova fecondate, l'esposizione degli zigoti è avvenuta, al buio, a 24 °C e per un tempo di 24 h nel caso delle ostriche e a 18 °C per un tempo di 48 h nel caso dei mitili.

## Lecture

- Trascorso il tempo necessario (24 o 48 h) il test è stato fissato con una soluzione di formalina tamponata al 4%.
- Il conteggio delle anomalie è stato eseguito con l'ausilio di una camera di Bürker, contando sempre 100 larve e distinguendo tra: larve normo-formate (D-shape), larve malformate, larve non sviluppatasi (trocofore). Dalle lecture si ricava, quindi, l'embriotossicità espressa in percentuale.
- Il test è considerato accettabile se, nel controllo negativo, il numero di larve normali è > 70%.

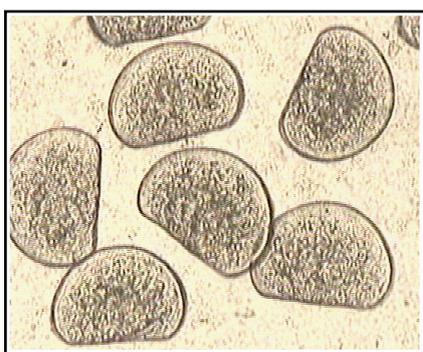


Figura 9.19 (a) – Larve normo-formate (D shape) di *M. galloprovincialis*.

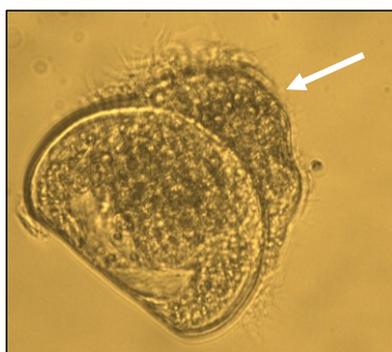


Figura 9.19 (b) – Larva malformata di *M. galloprovincialis*: in evidenza la protrusione del mantello.

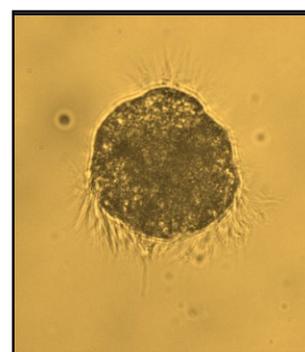


Figura 9.19 (c) – Larva di *M. galloprovincialis* non sviluppatasi, allo stadio di trocofora.

Complessivamente, sono state testate concentrazioni comprese tra 0,001 mg L<sup>-1</sup> e 100 mg L<sup>-1</sup>.

## Analisi statistica

Dai test effettuati con *C. gigas* e *M. galloprovincialis* è stato possibile ricavare i valori di EC50, mediante l'utilizzo di un programma basato sul metodo non parametrico "Trimmed Spearman-Kärber".

Inoltre, tutti i dati sperimentali sono stati trattati statisticamente con il test ANOVA mediante l'utilizzo di apposite macro di Excel, al fine di confrontare la variabilità dei diversi gruppi di risultati.

Condizioni sperimentali per l'esecuzione del test con	<i>Crassostrea gigas</i>	<i>Mytilus galloprovincialis</i>
Tipo di test	Statico	Statico
Endpoint	Embriotossicità	Embriotossicità
Numero repliche per campione	3	3
Temperatura	24 °C	18 °C
Salinità	30-35‰	30-35‰
Luminosità / Fotoperiodo	Assente	Assente
pH	7,8 – 8,0	7,8 – 8,0
Durata del test (esposizione)	24 h	48 h
Controllo positivo	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O

Figura 9.20 – Tabella riassuntiva delle condizioni sperimentali per *C. gigas* e *M. galloprovincialis*.

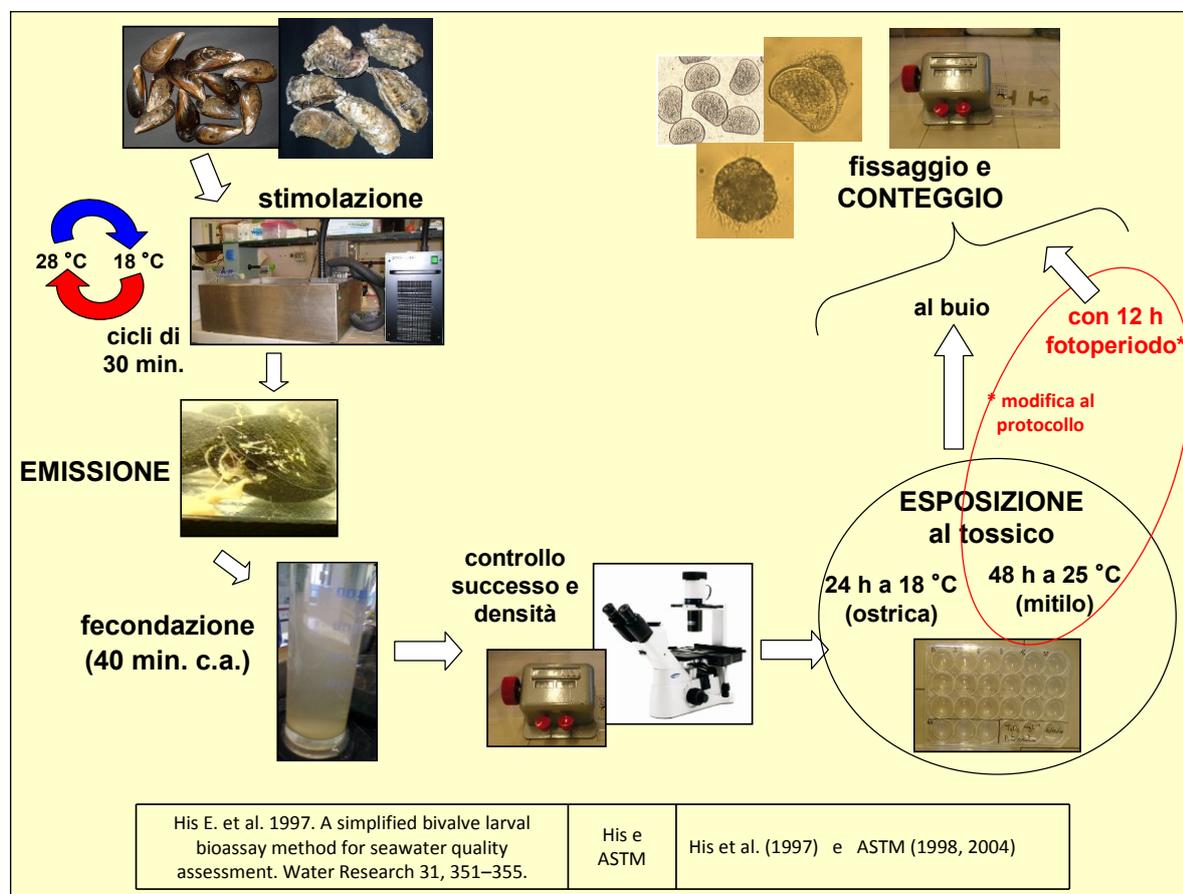


Figura 9.21 – Principali fasi del test di embriotossicità con *C. gigas* e *M. galloprovincialis*.

### 9.3.4 Test di tossicità con *Artemia franciscana*

Il crostaceo anostraco *A. franciscana* è stato impiegato per condurre i test di **immobilizzazione** acuto a 24 h e a 96 h in accordo con il protocollo APAT & IRSA CNR (2003). La tossicità è misurata come funzione dell'immobilizzazione degli organismi. La composizione dell'ASW utilizzata varia a seconda del ciclo di vita. Per le prime 48 h, nella fase pre-test, si è utilizzata la miscela di sali già pronta Instant Ocean®, per ottenere un'acqua con salinità del 35‰, di seguente composizione:

Tabella 9.22 – Concentrazioni in ppm dei principali ioni contenuti nei sali Instant Ocean®.

Ion	Instant Ocean
Sodium (Na <sup>+</sup> )	10.780
Potassium (K <sup>+</sup> )	0.420
Magnesium (Mg <sup>++</sup> )	1.320
Calcium (Ca <sup>++</sup> )	.400
Strontium (Sr <sup>++</sup> )	.0088
Chloride (Cl <sup>-</sup> )	19.290
Sulfate (SO <sub>4</sub> <sup>-</sup> )	2.660
Bicarbonate (HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	.200
Bromide (Br <sup>-</sup> )	.056
Boric Acid (B(OH) <sub>3</sub> )	–
Fluoride (F <sup>-</sup> )	.001

Per l'esposizione degli organismi al tossico, per un tempo di 24 h o di 96 h, si è utilizzata invece la seguente composizione:

SALE	FORMULA	g L <sup>-1</sup>
Stronzio cloruro esaidrato	SrCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,020
Acido borico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,030
Potassio bromuro	KBr	0,100
Potassio cloruro	KCl	0,700
Calcio cloruro diidrato	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1,470
Sodio solfato anidro	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4,000
Magnesio cloruro esaidrato	MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	10,780
Sodio cloruro	NaCl	23,500
Sodio metasilicato	Na <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Si · 9H <sub>2</sub> O	0,020
Sodio bicarbonato	NaHCO <sub>3</sub>	0,200

Tabella 9.23 - Composizione dell'ASW per il test con *A. franciscana*.

#### Preparazione

- Le cisti certificate di *A. franciscana* sono state acquistate presso Ecotox (PD, Italia). 0,100 g di cisti sono state introdotte in una capsula Petri contenente 12 mL di ASW Instant Ocean®.

Questa è stata poi riposta in cella termostata alla temperatura di  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , per 1 h alla luce, poi per 23 h al buio.

- Trascorse le 24 h, le larve Instar 1 (fig. 9.24) sono state separate dalle cisti ancora non schiuse e sono state collocate in un'altra capsula Petri contenente 12 mL di ASW Instant Ocean®. Sono state quindi riposte nuovamente in cella termostata alla temperatura di  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , per 24 h al buio. Va precisato che, in questo stadio, i nauplii di *Artemia* ancora non si nutrono autonomamente.

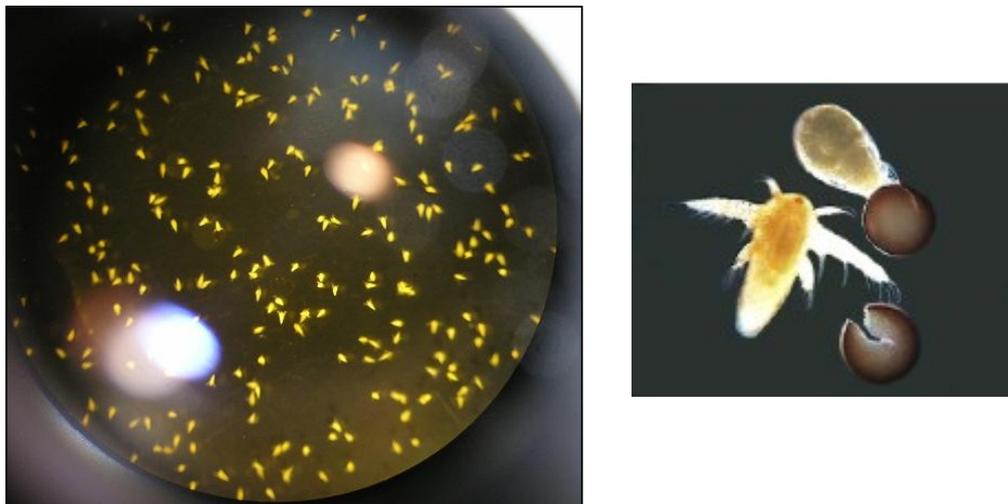


Figura 9.24 (a) e (b) – Nauplii di *A. franciscana* di 24 h (www.ebpi.ca – solo per 9.24 b).

### Esposizione

- Le dispersioni di ENP a diversa concentrazione sono state sonicate per 20 min a 100 W in bagno di ghiaccio. Per ogni concentrazione, non appena terminata la sonicazione, 3 aliquote da 2 mL di dispersione sono state introdotte nei diversi pozzetti e, subito, sono stati aggiunti 10 organismi (ormai allo stadio di Instar 2) per ogni pozzetto. L'esposizione è avvenuta alle condizioni controllate già viste sopra, per 24 h o per 96 h, a seconda.



Figura 9.25 (a) e (b) – Nauplii di *A. franciscana* > 48 h (www.solostocks.com).

- Il test a 96 h prevede inoltre che sia rispettato un fotoperiodo di 14 h e che le larve siano nutrite dopo 48 h di esposizione con qualche goccia di coltura algale di *P. tricornutum*. Nello stadio di Instar 2, infatti, le larve possono nutrirsi autonomamente. Di volta in volta, prima di somministrare la sospensione algale ai crostacei, si è verificata la densità della coltura, in modo da fornire sempre la stessa quantità di nutrimento agli organismi di test diversi (c.a  $6 \cdot 10^5$  unità).

### Lettura

- Trascorso il tempo previsto di esposizione al tossico, con l'ausilio di uno stereoscopio, è stato effettuato il conteggio degli organismi immobili rispetto al totale. Questo ha permesso di ricavare la percentuale di immobilizzazione.

- Il test è considerato accettabile se, nel controllo negativo, il numero di organismi immobili è < 10%.

Complessivamente, sono state testate concentrazioni comprese tra  $0,001 \text{ mg L}^{-1}$  e  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ .

### Analisi statistica

Sui dati ricavati dalla sperimentazione si è calcolato il valore dell'EC50 mediante il modello parametrico Probit, in grado di effettuare su di essi una regressione lineare, fornendo, infine, il valore di EC50, i relativi intervalli fiduciali ed i risultati del test  $\chi^2$  che comprovano la bontà del modello statistico applicato.

Inoltre, è stato effettuato il trattamento statistico dei dati con il test ANOVA, al fine di confrontare la variabilità dei diversi gruppi di risultati.

<b>Condizioni sperimentali per l'esecuzione del test con <i>A. franciscana</i></b>	
Tipo di test	Statico
Endpoint	Immobilizzazione organismi
Numero repliche per campione	3
Temperatura	25 °C
Salinità	30-35‰
Luminosità / Fotoperiodo	6000 – 10000 lux / 14 h
pH	7,8 – 8,0
Durata del test (esposizione)	24 h - 96 h
Controllo positivo	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Tabella 9.26 – Tabella riassuntiva delle condizioni sperimentali per *A. franciscana*.

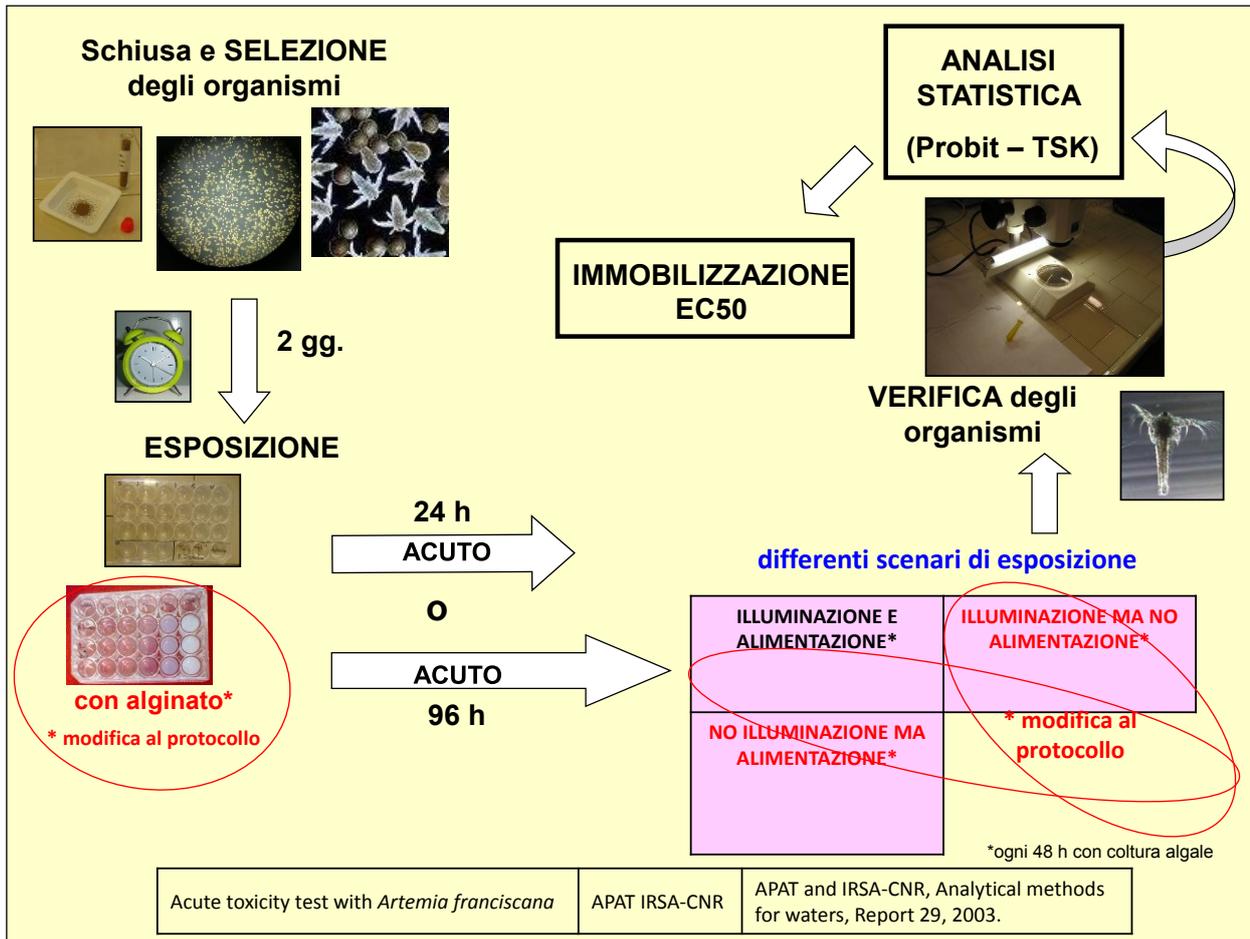


Figura 9.27 – Principali fasi del test di immobilizzazione con *A. franciscana*.

## 9.4 Test di bioaccumulo

Il test di bioaccumulo è stato condotto utilizzando il crostaceo *A. franciscana* e le alghe unicellulari *P. tricorutum* e *D. tertiolecta* per verificare e quantificare l'eventuale accumulo di Ti totale, da parte dei crostacei, dovuto alla nutrizione, effettuando, inoltre, il bilancio di massa. La scelta di voler utilizzare le due specie algali è legata al loro differente comportamento. *P. tricorutum*, infatti, è una specie bentonica, contrariamente a *D. tertiolecta* che è in grado di nuotare liberamente all'interno della colonna d'acqua e, pertanto, si presume che il diverso alimento possa portare ad una diversa assunzione delle ENP. Il disegno sperimentale, dunque, ha seguito le linee guida di un classico test di tossicità con *Artemia*, ed è stato condotto in duplicato proprio perché, dopo 48 h dall'inizio dell'esposizione, i nauplii del crostaceo sono stati nutriti con sospensione algali differenti (repliche A e B, rispettivamente).

Sono state preparate, inoltre, due repliche aggiuntive (C e D) per eseguire, al termine delle 96 h, l'analisi del contenuto di ammoniaca nei pozzetti. Si è ritenuto, infatti, di quantificare tale catabolita per valutarne gli eventuali impatti in termini di degradazione della qualità del mezzo acquoso, tenendo conto che l'esperimento è condotto alimentando gli organismi.

### 9.4.1 Conduzione del test

#### Preparazione

##### Giorno 01

Le cisti certificate di *A. franciscana* sono state acquistate presso Ecotox (PD, Italia). 0,100 g di cisti sono state introdotte in una capsula Petri contenente 12 mL di ASW Instant Ocean®. Questa è stata poi riposta in cella termostata alla temperatura di  $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ , per 1 h alla luce, poi per 23 h al buio.

##### Giorno 02

Trascorse le 24 h, le larve Instar 1 sono state separate dalle cisti ancora non schiuse e sono state collocate in un'altra capsula Petri contenente 12 mL di ASW Instant Ocean®. Sono state quindi riposte nuovamente in cella termostata alla temperatura di  $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ , per 24 h al buio.

Durante la stessa mattina sono stati effettuati anche i rinnovi degli inoculi algali di *P. tricorutum* e *D. tertiolecta*, introducendo ciascuna aliquota di sospensione algale in una beuta contenente 100 mL di soluzione di crescita (cfr. par. 9.3.2). Entrambe le beute sono state conservate per 72 h alle condizioni controllate di temperatura ( $20\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ ) e luce (6000 lumen), rispettando un fotoperiodo di 14 h.

## Esposizione

### Giorno 03

Le dispersioni di ENP di concentrazioni nominali pari a 1, 10 e 50 mg L<sup>-1</sup> sono state sonicate per 20 min a 100 W in bagno di ghiaccio. Per ogni concentrazione, non appena terminata la sonicazione, è stata prelevata 1 aliquota da 20 mL, successivamente trasferita in fiala di vetro per le programmate analisi con l'ICP-OES.

Delle suddette dispersioni a concentrazione 1, 10 e 50 mg L<sup>-1</sup>, 3 aliquote da 10 mL sono state introdotte nei diversi pozzetti e, subito, sono stati aggiunti 50 organismi (ormai allo stadio di Instar 2) per ogni pozzetto. L'intero test è stato condotto in 4 repliche: 2 di queste (A e B) per verificare il bioaccumulo, le altre 2 (C e D) per l'analisi dell'ammoniaca. Per tutte, sono stati allestiti, inoltre, i rispettivi controlli positivi (CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O). L'esposizione degli organismi è avvenuta per 96 h alle condizioni controllate già viste sopra, rispettando un fotoperiodo di 14 h. L'osservazione degli organismi immobili è stata effettuata ogni 24 h con l'ausilio di uno stereoscopio.

### Giorno 05

Trascorse 48 h dall'inizio dell'esposizione, i nauplii di tutte e 4 le repliche sono stati alimentati con della sospensione algale. Una replica ed il relativo controllo positivo, sono state alimentate, come già accennato, con *P. tricorutum*; l'altra replica, con il relativo controllo positivo, è stata alimentata con la sospensione algale di *D. tertiolecta*. Poiché si voleva uniformare la quantità di biomassa somministrata in ogni pozzetto, preliminarmente, sono stati eseguiti dei conteggi per verificare la densità delle 2 differenti colture.

## Prelievo delle aliquote

### Giorno 07

Trascorso il tempo previsto di esposizione al tossico, dopo aver effettuato l'ultima lettura degli organismi, per documentarne l'eventuale immobilità, sono state prelevate per le analisi:

- aliquote del **mezzo acquoso**, prelevate **a 96 h** dagli stessi pozzetti in cui è stato condotto il test, a concentrazione 1, 10 e 50 mg L<sup>-1</sup> di ENP;
- tutti i crostacei, separati dal mezzo acquoso come documentato di seguito.

Per le analisi del contenuto di ammoniaca, invece, il contenuto dei pozzetti è stato prelevato tal quale, separando i nauplii mediante filtrazione con filtri in nitrato di cellulosa 0,22 µm (Whatman International Ltd).

La seguente figura 9.28 riassume il disegno sperimentale utilizzato per il test di bioaccumulo.

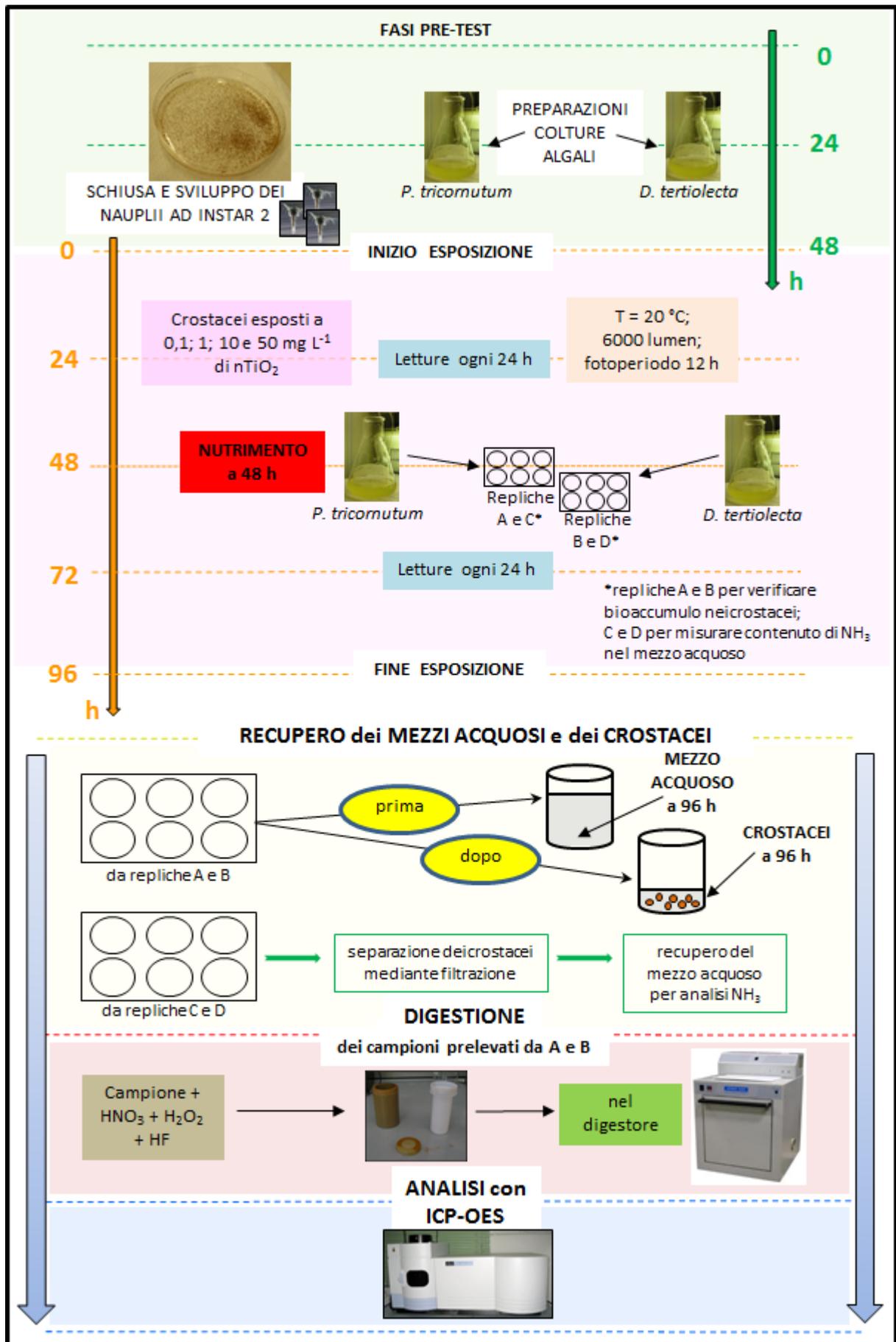


Figura 9.28 – Test di bioaccumulo con *A. franciscana*. Schema del disegno sperimentale.

### Separazione dei crostacei e dei mezzi

Terminato il test, tutti i crostacei sono stati separati dalle acque per essere analizzati con l'ICP-OES. Poiché si volevano recuperare anche le acque in cui era stato effettuato il test, senza perdere il contenuto originario di ENP, la separazione si è svolta mediante una **doppia filtrazione**:

- nel primo passaggio si sono utilizzati dei filtri a maglia a 44  $\mu\text{m}$  per filtrare le 3 repliche di ciascuna differente dispersione. Con tali filtri è stato possibile trattenere i nauplii, lasciando passare gli eventuali agglomerati di  $\text{nTiO}_2$ ;
- successivamente, i nauplii sono stati trasferiti su filtri in nitrato di cellulosa 0,22  $\mu\text{m}$  (Whatman International Ltd), precedentemente essiccati (24 h in stufa a 105 °C) e pesati, per conoscere il peso della tara. Per ogni filtro, contenente i crostacei, sono stati effettuati lavaggi con 50 mL totali di acqua milliQ, al fine di allontanare dai nauplii eventuali residui di  $\text{nTiO}_2$  adesi ma non assunti dagli organismi.

Con tali operazioni, per ogni dispersione di  $\text{nTiO}_2$  a diversa concentrazione, si è potuto recuperare:

- un volume finale di 80 mL (30 mL di dispersione + 50 mL di milliQ);
- i nauplii esposti alle ENP per 96 h (150 esemplari c.a).

### Digestione ed analisi con ICP-OES

Successivamente, i filtri con i crostacei sono stati riessiccati (24 h a 105 °C) e ripesati per ricavare il peso della biomassa e, dopo questo, è iniziata la procedura per la **digestione** a microonde. Questa operazione, che consiste in un attacco con acidi a caldo, è necessaria per ottenere un campione liquido da analizzare con l'ICP-OES. Per questa operazione si è utilizzato un **digestore** Milestone, modello **Ethos 1600** (Bg – Italia). Ciascun campione è stato introdotto nelle “bombe” in teflon (fig. 9.30) assieme a 6 mL di  $\text{HNO}_3$  (Romil, Cambridge, UK), 2 mL di  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Fluka Analytical, 16911) ed 1 mL di HF (Romil, Cambridge, UK). Il ciclo di digestione si è composto delle seguenti fasi:

- 1 minuto a 250 W;
- 1 minuto a 0 W;
- 5 minuti a 250 W;
- 3 minuti a 400 W;
- 3 minuti a 600 W.

Dopo il raffreddamento, all'interno di ciascuna delle bombe in teflon è stato aggiunto un volume di soluzione sovrasatura di  $\text{H}_3\text{BO}_3$  pari a 2 mL. Tale procedura si è resa necessaria per

neutralizzare gli eventuali residui di HF che avrebbero potuto dare origine a delle interferenze durante le misurazioni. Infine, i campioni sono stati portati ad un volume finale di 20 mL con acqua milliQ.

Anche i campioni delle dispersioni di  $n\text{TiO}_2$ , separati con la modalità precedentemente descritta, sono stati sottoposti a digestione, con una procedura analoga alla precedente. La digestione di ciascuna dispersione è stata eseguita in duplicato, impiegando due diversi volumi, ovvero 2 e 5 mL. I reagenti utilizzati sono stati 2 mL di  $\text{H}_2\text{O}_2$  + 3 mL di  $\text{HNO}_3$  a cui si è aggiunto un volume di HF (Romil, Cambridge, UK) pari a quello della sospensione di  $n\text{TiO}_2$  da trattare, ovvero 2 o 5 mL. Il ciclo di digestione prevedeva un'unica fase di riscaldamento della durata di 5 min, ad una potenza di 250 W. Anche in questo caso, dopo il raffreddamento, all'interno di ciascuna delle bombe in teflon è stato aggiunto un volume di soluzione sovrasatura di  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , per i motivi già visti in precedenza. Il volume era pari a 2 o 3 mL, rispettivamente, a seconda che fossero stati trattati 2 o 5 mL di dispersione. Infine, i campioni sono stati portati ad un volume finale di 20 mL con acqua milliQ.



Figura 9.29 – ICP-OES modello Optima 5300 DV, Perkin Elmer – Monza, IT.



Figura 9.30 – Bomba in teflon per disgregazioni al microonde.

### Analisi del contenuto di ammoniaca

Come anticipato, si presume che i nauplii di *Artemia*, dopo essersi alimentati, possano rilasciare dei cataboliti ammoniacali, in grado di degradare la qualità del mezzo acquoso. Questo fenomeno può avere delle ripercussioni sulla salute degli organismi stessi, visto che l'esperimento è condotto senza il rinnovo del mezzo di esposizione (condizioni statiche). Per quantificare tale emissione, sono state allestite due repliche del test (C e D).

Al termine delle 96 h, con l'ausilio di filtri in nitrato di cellulosa 0,22  $\mu\text{m}$  (Whatman International Ltd), si sono separati i crostacei dal mezzo acquoso, recuperando così, un volume di circa 20 mL per ogni diversa concentrazione di  $\text{nTiO}_2$  impiegata nel test. Per ognuno dei suddetti volumi, è stata prelevata un'aliquota pari a 10 mL sulla quale è stata effettuata l'analisi del contenuto di ammoniaca mediante il metodo colorimetrico del salicilato, n. 8155 (Hach).

Il principio su cui si basa la misura è la diversa colorazione, che assume il campione in esame, dopo aver reagito con il salicilato di ammonio ed il cianurato di ammonio. Lo strumento utilizzato è stato uno spettrofotometro Hach DR2800 (Hach, Loveland, Colorado – U.S.A.), grazie al quale sono state effettuate le letture, impiegando una lunghezza d'onda pari a 655 nm. I reagenti chimici sono stati forniti dallo stesso produttore dell'apparecchio, in quantità già dosate per l'utilizzo.

Innanzitutto è stata effettuata la calibrazione dello strumento, eseguendo la lettura di un campione di milliQ contenente i soli reagenti. Poi, ai vari campioni è stato aggiunto dapprima il salicilato di ammonio, e, successivamente, dopo un tempo di reazione di 3 min, è stato aggiunto anche il cianurato di ammonio. Trascorso il tempo necessario alla seconda reazione (15 min), i campioni sono stati trasferiti in una cella di quarzo per effettuare le letture.

## 9.5 Controllo di qualità

Il controllo di qualità (Quality Control, QC) accorpa tutti gli accorgimenti e le operazioni adottati al fine di garantire un'elevata qualità e riproducibilità dei risultati (Quality Assurance, QA). Alcune di queste operazioni sono specifiche di un particolare test, altre, invece, sono comuni all'attività sperimentale in generale.

### 9.5.1 Acque marine ricostruite e mezzi di crescita

Le acque marine ricostruite ed i mezzi di crescita impiegati nelle varie fasi dei test, per il mantenimento e l'esposizione degli organismi, sono stati preparati aggiungendo all'acqua MilliQ sali e vitamine certificati (cfr. par 9.2.1); la loro conservazione è avvenuta al buio a 4 °C.

SALE	FORMULA	PRODUTTORE
Acido borico	$H_3BO_3$	Fluka
Acido etilendiamminotetraacetico	$Na_2EDTA$	J.T. Baker
Calcio cloruro di-idrato	$CaCl_2 \cdot H_2O$	Riedel de Haën
Cobalto cloruro esaidrato	$CoCl_2 \cdot 6 H_2O$	Baker
Ferro cloruro esaidrato	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	J.T. Baker
Magnesio cloruro esaidrato	$MgCl \cdot 6 H_2O$	Carlo Erba
Magnesio solfato eptaidrato	$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	J.T. Baker
Manganese cloruro tetraidrato	$MnCl_2 \cdot 4 H_2O$	J.T. Baker
Potassio bromuro	KBr	Fluka
Potassio cloruro	KCl	Riedel de Haën
Potassio fosfato tribasico	$K_3PO_4$	Sigma
Rame solfato pentaidrato	$CuSO_4 \cdot 5 H_2O$	J.T. Baker
Sodio bicarbonato	$NaHCO_3$	Fluka
Sodio cloruro	NaCl	Carlo Erba
Sodio metasilicato nonaidrato	$Na_2O_3Si \cdot 9 H_2O$	Sigma
Sodio metasilicato pentaidrato	$Na_2O_3Si \cdot 5 H_2O$	Sigma
Sodio nitrato	$NaNO_3$	Fluka
Sodio solfato anidro	$Na_2SO_4$	Carlo Erba
Sodio solfato anidro	$Na_2NO_3$	Carlo Erba
Stronzio cloruro esaidrato	$SrCl_2 \cdot 6 H_2O$	Fluka
Zinco solfato eptaidrato	$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	J.T. Baker
VITAMINA	PRODUTTORE	
Biotina (B7)	Fluka	
Cianocobalamina (B12)	Sigma	
Tiamina cloridrato (B)	Sigma	

Figura 9.31 – Tabella dei sali e delle vitamine certificati utilizzati per la preparazione delle ASW e degli stock di nutrienti.

### 9.5.2 Mantenimento della coltura algale

Le soluzioni componenti il mezzo di crescita della coltura algale (cfr. par. 9.3.2) sono state preparate con sali e vitamine certificati, utilizzando acqua MilliQ. La loro conservazione è avvenuta al buio a 4 °C. A causa della naturale degradazione delle vitamine, gli stock dei nutrienti sono stati rinnovati periodicamente con frequenza bimensile.

Il mantenimento della coltura algale è stato effettuato assicurando un rinnovo della stessa mediante un inoculo di coltura algale precedente (8 mL) in 100 mL di soluzione di mantenimento rinnovata, con una frequenza almeno settimanale. Le operazioni di rinnovo sono state registrate in un apposito registro dove, oltre la data e l'operatore, possono essere indicate eventuali osservazioni emerse dal controllo della coltura precedente.

Prima di ogni test e, comunque, almeno una volta al mese, sono stati effettuati dei conteggi della coltura algale per misurare la densità della popolazione.

### 9.5.3 Taratura della strumentazione

#### 9.5.3.1 pHmetro

Il pHmetro è stato tarato mediante la lettura di 3 soluzioni standard certificate (Hach, Canada), aventi un pH rispettivamente di  $4,01 \pm 0,02$ ,  $7,00 \pm 0,02$  e  $10,01 \pm 0,02$ .

#### 9.5.3.2 Salinometro

La calibrazione del salinometro è stata effettuata impostando sullo strumento, come valore 0, il valore rilevato dalla lettura di una goccia di acqua MilliQ.

#### 9.5.3.3 ICP-OES

La calibrazione dell'ICP-OES, per le analisi del nTiO<sub>2</sub>, è stata eseguita mediante la lettura di 6 standard certificati (Merck) alle concentrazioni di 50, 100, 200, 500, 1000 e 3000 ppb, in triplicato.

### 9.5.4 Vetreria

Per evitare ogni eventuale interferenza, la vetreria è stata oggetto di un'accurata procedura di lavaggio, riassunta come segue:

- 1 lavaggio con acqua e detersivo;
- risciacquo con acqua;
- 1 lavaggio in soluzione acida al 10% (HCl)\*;
- 3 lavaggi con acqua MilliRo;

- 3 lavaggi con acqua MilliQ

\* è prevista una distinzione tra **3** vasche di lavaggio differenti: nella **prima** è stata lavata la vetreria venuta a contatto solamente con gli **organismi** (ad es. le beute per le colture algali); nella **seconda** è stata lavata la vetreria venuta a contatto con sostanze **chimiche tradizionali** (es.  $K_2Cr_2O_7$ ); nella **terza** è stata lavata la vetreria venuta a contatto con il **nTiO<sub>2</sub>**.

In aggiunta a questo ciclo di lavaggio:

- le beute destinate al mantenimento delle colture algali hanno subito una procedura di sterilizzazione ad umido mediante autoclave con un ciclo della durata di 1 h e 20 min a 120° C;
- la vetreria ed i setacci utilizzati nei test con i bivalvi sono stati sterilizzati in stufa a secco ad una temperatura di 150 °C, per una notte.

#### 9.5.5 Pulizia delle bombe in teflon per la digestione

Le bombe in teflon, utilizzate per la digestione dei campioni prelevati in occasione del test di bioaccumulo (cfr. par. 9.4), sono state pulite mediante l'apposito ciclo di pulizia. In pratica, dopo aver introdotto nelle bombe gli stessi reagenti utilizzati per la digestione (6 mL di  $HNO_3$  + 1 mL di  $H_2O_2$ ), è stato eseguito il seguente programma:

- 1 minuto a 250 W;
- 1 minuto a 0 W;
- 5 minuti a 250 W;
- 3 minuti a 400 W;
- 3 minuti a 600 W.

Dopo il raffreddamento, le bombe sono state risciacquate 3 volte con acqua milliRo più altre 3 con acqua milliQ. In aggiunta, quando si digerivano i campioni dei crostacei, prima dei suddetti lavaggi con acqua, le bombe venivano pulite con acetone, per rimuovere i residui organici.

#### 9.5.6 Test di tossicità

Tutti gli organismi utilizzati per i test di tossicità sono stati oggetto di un controllo di qualità svolto in tutte le fasi sperimentali, come già descritto nei rispettivi paragrafi (cfr. parr. 9.3.1 – 9.3.4). Le condizioni sperimentali hanno seguito la standardizzazione imposta dalle linee guida indicate nei corrispondenti protocolli di esecuzione dei test ecotossicologici (cfr. parr. 9.3.1 – 9.3.4). Per ogni test sono stati effettuati:

- controlli negativi, con i bianchi sperimentali, per verificare l'assenza di interferenze esterne;
- controlli positivi, con i tossici di riferimento previsti dalle linee guida, per confermare la validità dei test rispetto ad uno standard comune, verificandone la riproducibilità;
- confronto dei valori di EC50, ottenuti dai controlli positivi, con le carte di controllo del laboratorio\* e i relativi dati di letteratura, per verificare la validità del test e confrontarne la riproducibilità con lo storico delle esperienze pregresse.

\* nel caso del batterio *V. fischeri*, per il controllo di qualità si è fatto riferimento al certificato di analisi rilasciato dallo stesso fornitore della coltura batterica (Ecotox, Italia).

## **10. RISULTATI E DISCUSSIONE**

In questo capitolo sono riportate le evidenze sperimentali ricavate nei tre anni di ricerca, supportate da un'approfondita discussione. La discussione, che prevedeva anche il confronto dei risultati ottenuti con quelli prodotti da altri autori, in molti casi, ha prodotto dei criticismi che, se visti sotto un'ottica costruttiva, potrebbero costituire dei punti di partenza per il futuro ampliamento di questo studio.

## 10. RISULTATI E DISCUSSIONE

### 10.1 Caratterizzazione chimico-fisica del nTiO<sub>2</sub>

#### 10.1.1 Caratterizzazione primaria del nTiO<sub>2</sub>

La caratterizzazione al TEM ha evidenziato che le ENP tal quali hanno una **forma** irregolare con **dimensioni** che si estendono tra i 15 ed i 60 nm (fig. 10.2). Le analisi all'ICP-MS hanno confermato la **composizione** del minerale (Ti e O), mentre invece la tecnica SAED ha permesso di riconoscere la presenza delle due **fasi cristallografiche** anatasio e rutilo. Le analisi B.E.T. hanno stimato un' **area superficiale** specifica pari a c.a 60 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup> e due classi di **porosità**, tra 2 e 4 nm e tra 10 e 90 nm, rispettivamente. Il riepilogo di questa caratterizzazione primaria si trova in tabella 10.1.

CARATTERISTICA	VALORI		TECNICA / STRUMENTAZIONE
	DATI DICHIARATI DAL PRODUTTORE	MISURE RILEVATE	
Composizione chimica	Ti; O	Ti; O	ICP-MS
Purezza	> 99,5%	–	–
Dimensione media	21 nm	15 – 60 nm	TEM
Forma	–	Particelle semi sferiche irregolari	TEM
Fasi cristallografiche	Anatasio; Rutilo	Anatasio; Rutilo	SAED
Superficie specifica	50 ± 15 m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup>	61 ± 10 m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup>	BET
Porosità	–	2-4 nm; 10-90 nm (mesopori)	BET

Tabella 10.1 – Caratterizzazione primaria del nTiO<sub>2</sub>.

Nella seguente figura 10.2 sono riportate le immagini ottenute al TEM. L'acquisizione è stata condotta dal Dr. Ivan Micetic presso i laboratori di ECSIN (European Center for the Sustainable Impact of Nanotechnology) – Veneto Nanotech S.C.p.A. (sede di Rovigo).

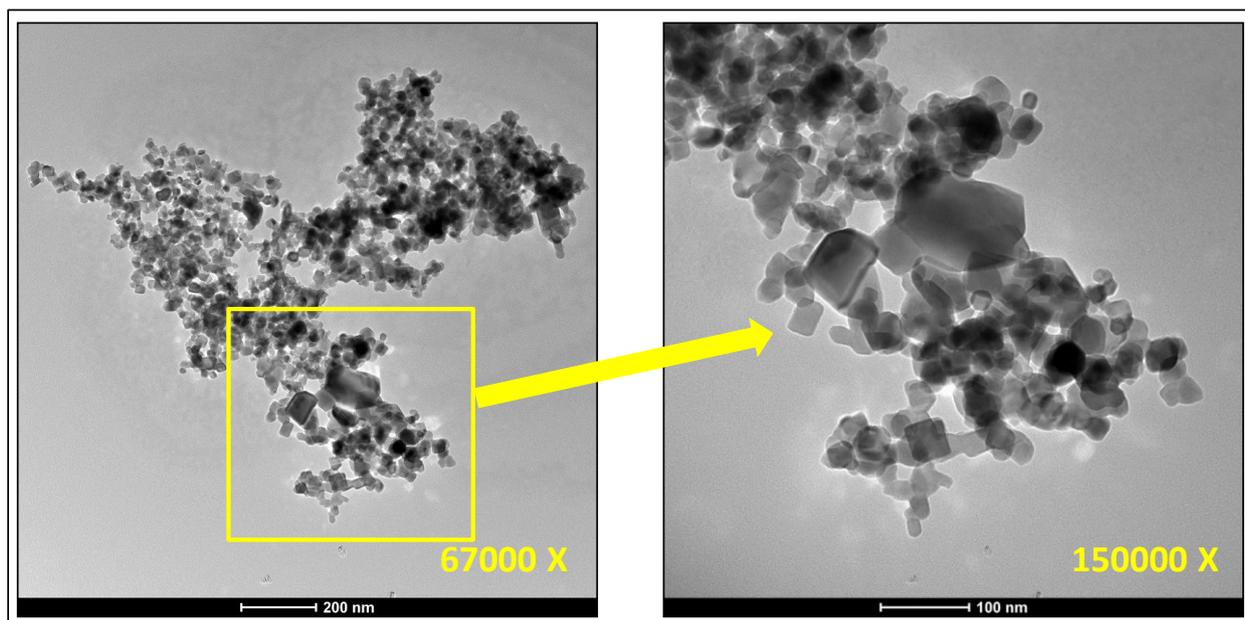


Figura 10.2 – Immagini al TEM di sospensione di nTiO<sub>2</sub> alla concentrazione di 1440 mg L<sup>-1</sup>. I due ingrandimenti equivalgono a 67000x and 150000x.

## 10.1.2 Comportamento chimico del nTiO<sub>2</sub> in ASW (caratterizzazione secondaria)

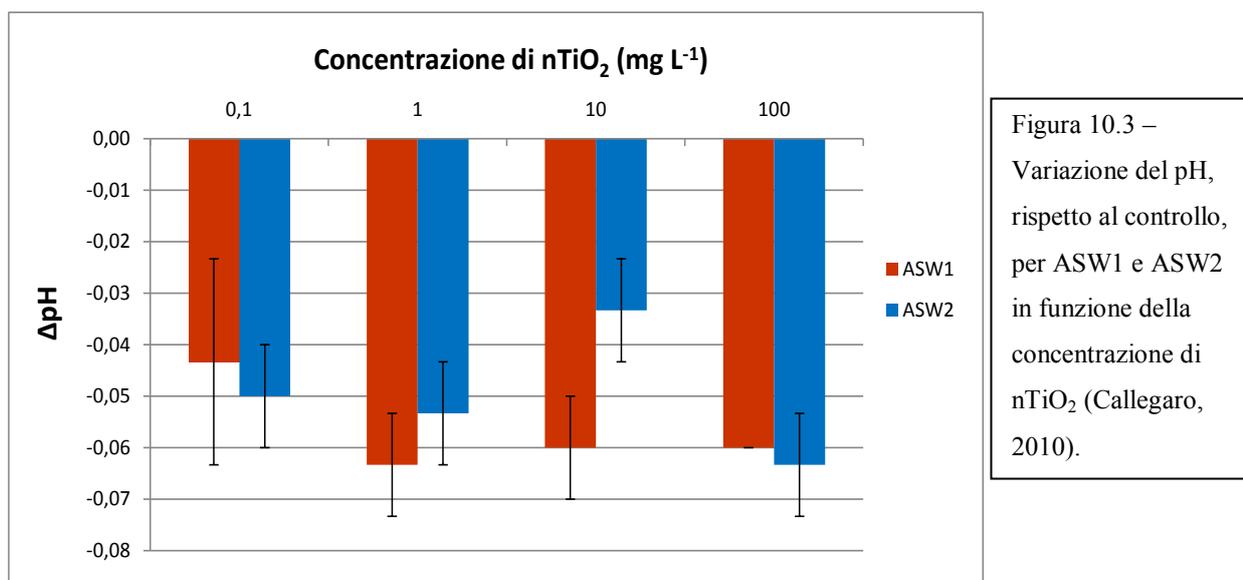
### 10.1.2.1 Potenziale Zeta

Il **potenziale Zeta** ( $\zeta$ ) determinato in ASW1 ed ASW2 era di  $+0,28 \pm 0,04$  mV, mentre in acqua ultrapura (a pH 8) corrispondeva a  $-10,5 \pm 0,05$  mV. Si ricorda che l'intervallo di stabilità elettrostatica è definito per  $\zeta < -30$  mV;  $\zeta > +30$  mV. In conseguenza di ciò risulta che le dispersioni di nTiO<sub>2</sub> in acqua salata possiedono un'elevata instabilità, responsabile di una rapida coagulazione o flocculazione, come previsto per valori di potenziale  $\zeta$  compresi tra 0 e  $\pm 5$  mV. In acqua ultrapura, invece, queste manifestavano un'instabilità incipiente, definita per valori di potenziale  $\zeta$  compresi tra  $\pm 10$  e  $\pm 30$  mV.

### 10.1.2.2 Variazione del pH

E' stato quindi misurato il **pH** delle dispersioni di nTiO<sub>2</sub> per le concentrazioni di 0,1, 1, 10 e 100 mg L<sup>-1</sup>, per verificare se l'aggiunta delle ENP all'ASW1 (34 ‰) e all'ASW2 (32 ‰) potesse modificare i valori di questo parametro, al punto da divenire un fattore di disturbo nell'esecuzione dei test ecotossicologici. Le analisi sono state fatte in triplicato e i risultati sono stati presentati come variazione del valore di pH in relazione ai controlli ( $8,31 \pm 1$  e  $8,28 \pm 1$  rispettivamente per ASW1 e ASW2). Dal grafico in fig. 10.3 emerge come, anche alla massima concentrazione di ENP (100 mg L<sup>-1</sup>), la variazione del pH sia contenuta (c.a 0,06 punti). Probabilmente l'effetto dei carbonati (0,20 g L<sup>-1</sup>) riesce a tamponare la variazione di pH

conseguente all'aggiunta delle ENP, mantenendone i valori idonei all'esecuzione dei test ecotossicologici.



Confrontando l'andamento dei valori di pH per ASW1 e ASW2 si può notare come, a meno delle barre d'errore, questi siano essenzialmente confrontabili. Del resto i due mezzi sono molto simili per quanto riguarda la composizione chimica (cfr. tabelle 9.7 e 9.11). L'unica eccezione è costituita dalla concentrazione pari a 10 mg L<sup>-1</sup>, in corrispondenza della quale, la variazione per l'ASW2 risulta minore rispetto all'ASW1. Il test ANOVA, eseguito sulla singola serie di dati ASW1, ha evidenziato che, tra questi, non c'è una differenza statisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), fenomeno verificato anche per la serie di dati ASW2, con l'eccezione, in questo caso, della concentrazione pari a 100 mg L<sup>-1</sup>. Dal confronto tra le due serie, invece, si è manifestata una differenza statisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), con l'unica eccezione rappresentata dalla concentrazione pari a 10 mg L<sup>-1</sup> della serie ASW2, la quale risulta confrontabile con i dati della serie ASW1 (fig. 10.4).

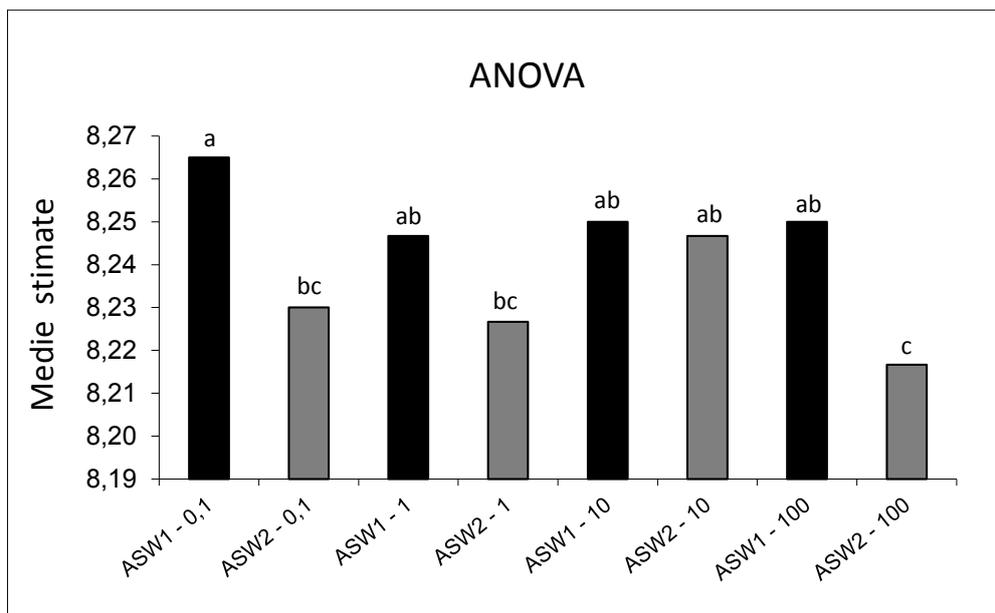


Figura 10.4 – Confronto delle varianze medie dei dati delle due serie ASW1 ed ASW2 mediante il test ANOVA.

### 10.1.2.3 Dimensioni e distribuzione del materiale sospeso (salinità costante)

Le prime analisi al DLS sulle acque ASW1 e ASW2 (salinità  $34\text{‰} \pm 1\text{‰}$  e  $32\text{‰} \pm 1\text{‰}$ , rispettivamente) hanno evidenziato che, mediamente, è minima la differenza nelle dimensioni del materiale che si deposita, anche perché la salinità è praticamente la stessa ed i mezzi, si ribadisce, sono molto simili. Invece, come previsto, le dimensioni sono funzione della concentrazione di ENP iniziale. Questo accade perché statisticamente aumentano le probabilità di incontro delle ENP che sono più numerose e, di conseguenza, in minor tempo possono formarsi degli agglomerati più pesanti. Il fenomeno sembrerebbe essere positivamente correlato all'aumento della concentrazione di NP. Statisticamente c'è una differenza significativa ( $p < 0,05$ ) nella variazione dei dati di ciascuna delle due serie, come evidenziato dal test ANOVA, mentre tale differenza non sussiste se si confrontano le stesse concentrazioni delle due serie differenti.

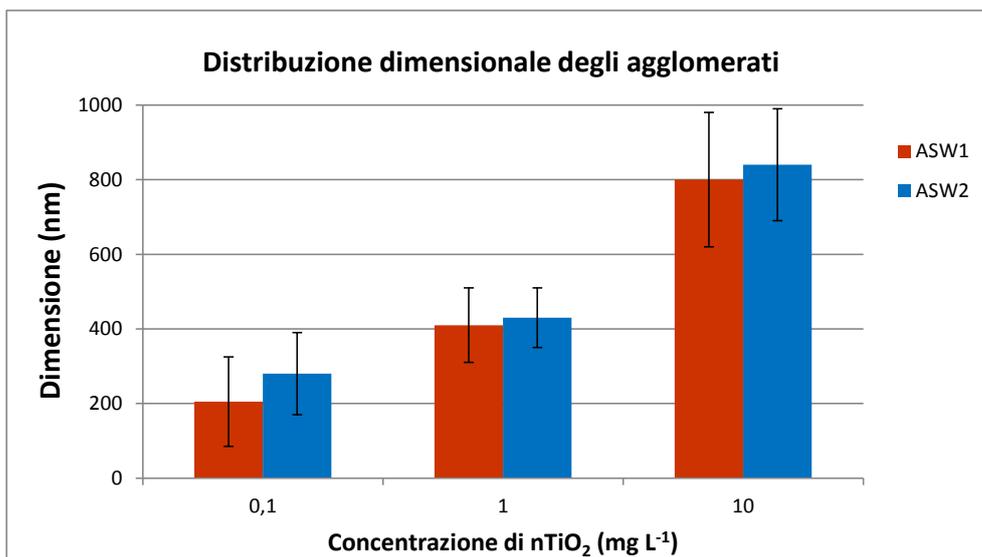


Figura 10.5 - Distribuzione dimensionale degli agglomerati di nTiO<sub>2</sub>, misurata immediatamente dopo la sonicazione, in due mezzi diversi (ASW1 e ASW2), a concentrazioni differenti (Callegaro 2010).

Un secondo gruppo di analisi al DLS mostra, invece, quale sia l'andamento della formazione degli aggregati in funzione non solo della concentrazione ma anche del **tempo** trascorso dalla sonicazione.

	0 h	24 h	48 h
<b>ASW1</b>			
0,1 mg/L	207 ± 42 4327 ± 735	529 ± 95 7838 ± 16	234 ± 36 1734 ± 298
1 mg/L	322 ± 171	460 ± 9 2401 ± 410	3583 ± 642
10 mg/L	372 ± 202	754 ± 115 8713 ± 13	1242 ± 194 8696 ± 1161
100 mg/L	2285 ± 1739	2690 ± 1736	2084 ± 1462
<b>ASW2</b>			
0,1 mg/L	180 ± 16 970 ± 20	288 ± 44 2141 ± 420	304 ± 38 3972 ± 109
1 mg/L	119 ± 17 610 ± 134	1315 ± 273	738 ± 124 8715 ± 1155
10 mg/L	430 ± 210	531 ± 91 3545 ± 603	1773 ± 298
100 mg/L	1430 ± 794	2266 ± 1304	2727 ± 1964

Figura 10.6 - Distribuzione dimensionale degli agglomerati di nTiO<sub>2</sub> in due mezzi diversi (ASW1 e ASW2), a concentrazioni diverse, per tempi diversi; alcune dispersioni mostrano un andamento di deposizione bimodale (Callegaro, 2010).

Le dimensioni degli agglomerati che si formano, in funzione del tempo e della concentrazione iniziale di ENP, è rappresentato graficamente dai seguenti istogrammi.

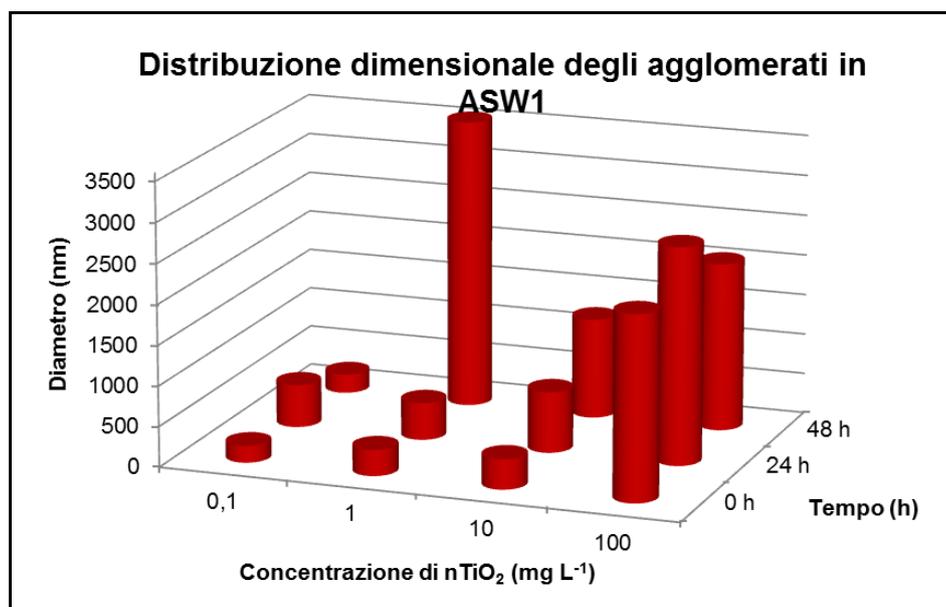


Figura 10.7 a) – Dimensioni degli agglomerati, formatisi in ASW1 a 0 h, 24 h e 48 h dalla sonicazione, in funzione della concentrazione iniziale di ENP (Callegaro, 2010).

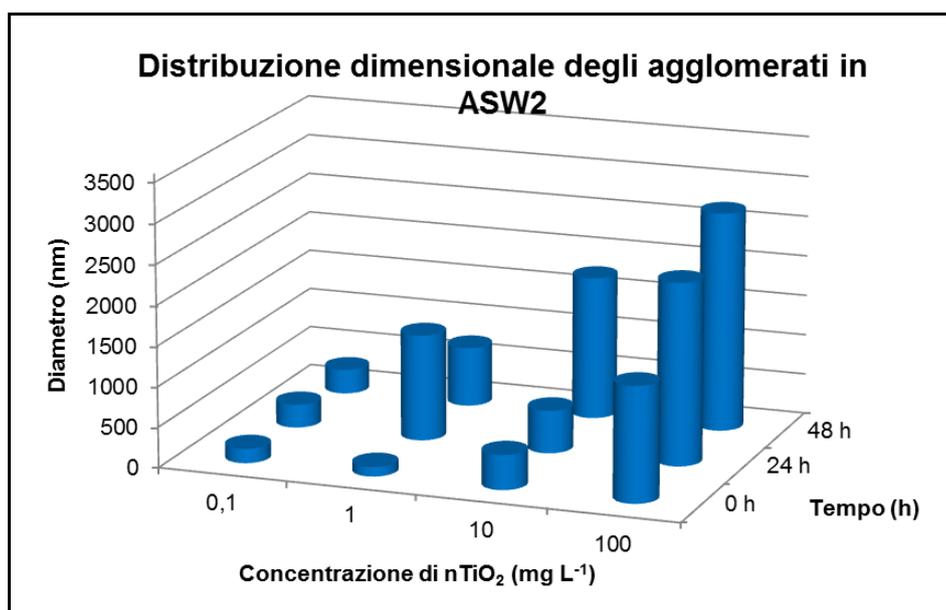


Figura 10.7 b) – Dimensioni degli agglomerati, formatisi in ASW2 a 0 h, 24 h e 48 h dalla sonicazione, in funzione della concentrazione iniziale di ENP (Callegaro, 2010).

I tempi, a cui si fa riferimento, sono calcolati a partire dal termine dell'operazione di sonicazione. Il tempo 0 h è all'incirca pari a 20 min (3 misure da 6 min + i tempi tecnici).

Rispetto al primo gruppo di analisi, i valori rilevati sembrano essere tendenzialmente più elevati, il che fa pensare che, nell'effettuare questo tipo di misure possano insorgere problemi di riproducibilità del dato legati all'elevata instabilità tipica del NM in questione.

In ogni caso, l'ANOVA ( $p < 0,05$ ) ha messo in risalto che, per l'ASW1, l'ipotesi  $H_0$  ( $p < 0,05$ ) è verificata sia osservando concentrazioni differenti di ENP, allo stesso tempo, sia osservando una stessa concentrazione di ENP, a tempi differenti. Per l'ASW2, invece, l'ipotesi  $H_0$  ( $p < 0,05$ ) è verificata solamente se si osservano concentrazioni differenti di ENP allo stesso tempo, mentre invece, esiste una differenza statisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) se si considera la stessa concentrazione di ENP, a tempi differenti.

#### 10.1.2.4 Dimensioni e distribuzione del materiale sospeso in funzione della salinità

Anche la variazione della **salinità** del mezzo sembra influire sulle dimensioni degli agglomerati, che risultano tanto maggiori quanto più elevata è la concentrazione iniziale, come si può osservare nel seguente grafico 10.8.

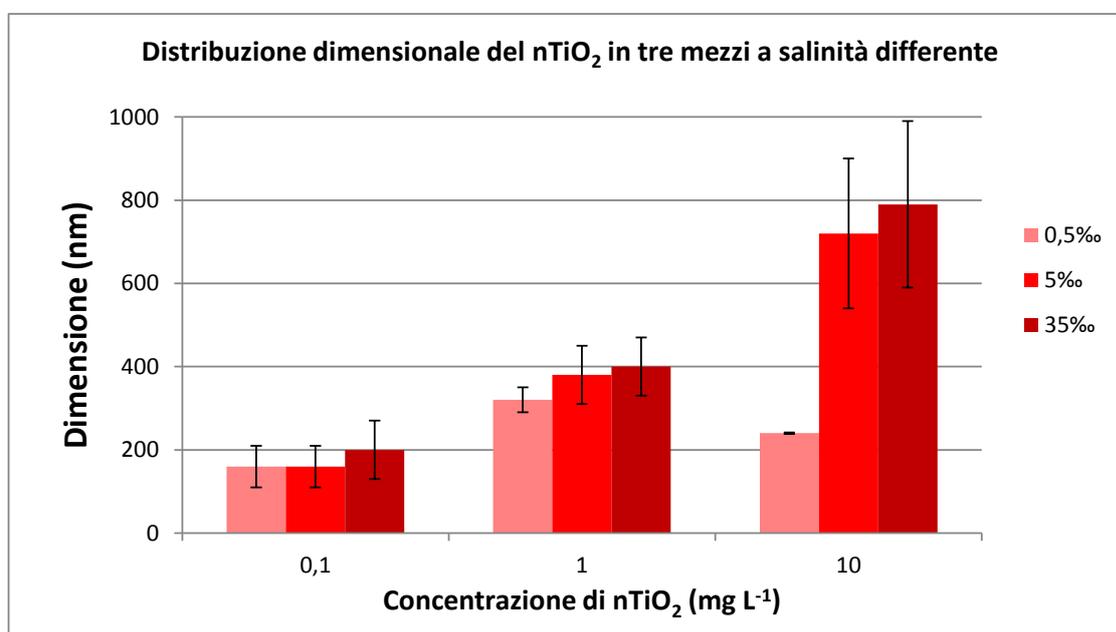


Figura 10.8 – Dipendenza delle dimensioni degli agglomerati di nTiO<sub>2</sub> dalla salinità e dalla concentrazione di ENP iniziale (Callegaro, 2010).

Questi risultati si potrebbero giustificare tenendo presente che, tanto più aumenta la salinità, tanto più cresce la **forza ionica** e, quindi, l'instabilità delle particelle che tendono ad agglomerarsi più velocemente (Klaine et al, 2008; Scown et al, 2010). La forza ionica dell'acqua di mare, così come quella dell'ASW 1 e 2, è pari a c.a 0,7 mol L<sup>-1</sup>, ed è generata principalmente dal contributo di ioni quali Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup> ed SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (Prenesti et al, 2007).

L'ANOVA non ha rilevato una variazione statisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), sia nel caso di una stessa concentrazione di ENP in acque a diversa salinità, sia nel caso di concentrazioni di ENP differenti in un'acqua della medesima salinità.

#### 10.1.2.5 Stabilità

Le prove di **stabilità** a lungo termine hanno confermato come la maggiore velocità di deposizione delle ENP sia funzione, allo stesso tempo, della concentrazione iniziale di materiale e della salinità. Le analisi sono state effettuate sui mezzi ASW1 (pH = 8,31; 34‰) e ASW2 (pH = 8,28; 32‰). I risultati sono stati espressi come percentuale di intensità  $I\% = (I/I_0) \cdot 100$ , dove  $I$  = radiazione uscente e  $I_0$  = radiazione incidente. Come si può notare dai grafici in figura 10.9 a) e b), non si notano differenze sostanziali negli andamenti di deposizione per ASW1 e ASW2.

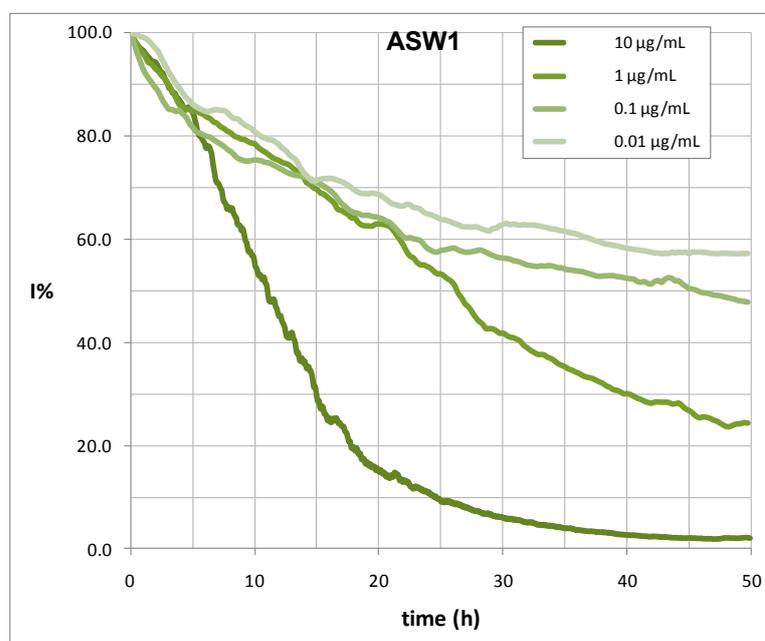


Figure 10.9 a) – Grafici di deposizione delle ENP di nTiO<sub>2</sub> in funzione del tempo e della concentrazione iniziale; il risultato è espresso come percentuale di intensità  $I\% = (I/I_0) \cdot 100$ , dove  $I$  = radiazione uscente e  $I_0$  = radiazione incidente. (Callegaro, 2010).

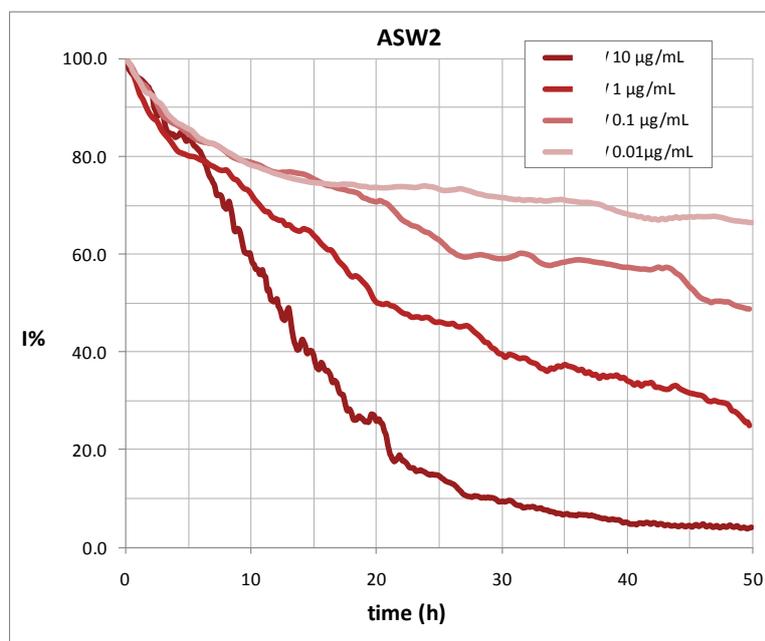


Figure 10.9 b) – Grafici di deposizione delle ENP di nTiO<sub>2</sub> in funzione del tempo e della concentrazione iniziale; il risultato è espresso come percentuale di intensità  $I\% = (I/I_0) \cdot 100$ , dove  $I$  = radiazione uscente e  $I_0$  = radiazione incidente. (Callegaro, 2010).

I risultati di questi esperimenti sulla deposizione delle ENP sono stati confrontati con un altro caso di studio, nel quale gli autori osservavano la stabilità e l'aggregazione delle ENP di ossidi metallici in acqua di mare (Keller et al, 2010). Le medie ( $n = 10$ ) dei valori di pH erano di 7,95, quelle della forza ionica =  $6,37 \text{ eq mol}^{-1}$ . I risultati di questo lavoro non sembrano essere completamente allineati con ciò che emerge dalle curve in fig. 10.9 a) e b).

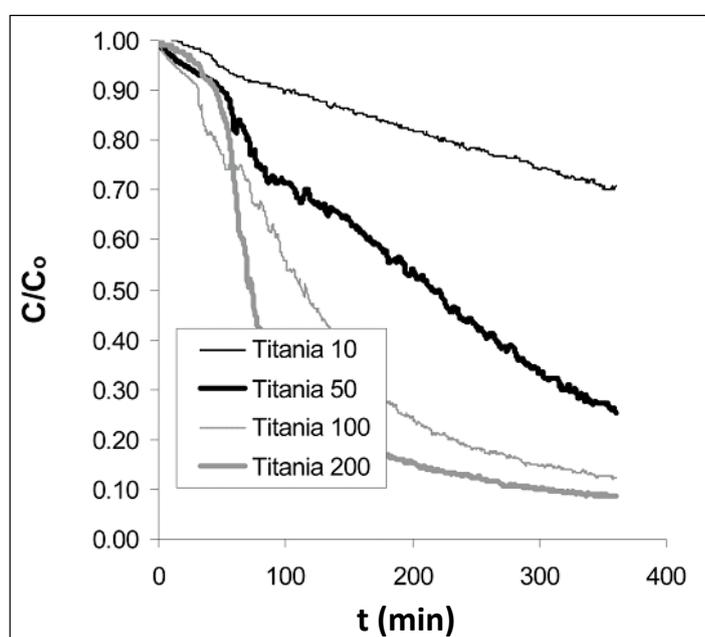


Figura 10.10 - Grafico della deposizione del nTiO<sub>2</sub>, in acqua di mare, in funzione del tempo e della concentrazione nominale iniziale; i risultati in ordinata sono rappresentati come rapporto tra  $C$  = concentrazione rilevata e  $C_0$  = concentrazione iniziale (Keller et al, 2010).

Nel grafico di Keller et al (2010) (fig. 10.10), sono visualizzate le curve solamente fino ad un tempo massimo di 400 min (6 h e 40 min), in corrispondenza del quale si può vedere come, per una concentrazione iniziale di  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , il 30% del materiale risulti già depositato. Assumendo che il tasso di deposizione si mantenga costante, ciò significherebbe che, in circa 22 h, tutto il materiale dovrebbe giacere sul fondo. Se si confrontano ora i grafici in figura 10.9 a) e b), si può notare come la pendenza della curva di concentrazione  $10 \text{ mg L}^{-1}$  sia meno accentuata rispetto alle rilevazioni di Keller et al (2010), visto che, effettivamente, dopo quasi 5 h il 20% (non il 30%) del materiale risulta depositato e che la deposizione completa delle ENP parrebbe avvenire oltre le 50 h. Ancora una volta, quindi, emerge il problema della riproducibilità del dato. In questo caso, poiché il materiale utilizzato è dello stesso produttore (Aeroxide P25, Degussa Evonik), le differenze nei risultati potrebbero essere attribuite a piccole variazioni nelle caratteristiche dei mezzi acquosi, alle diverse modalità di conservazione del prodotto, oppure alla diversa modalità di dispersione delle ENP. La seguente tabella 10.11 fornisce un confronto più immediato dei risultati.

% di ENP già depositatesi	ASW1	ASW2	ASW (Keller et al, 2010)
30%	~ 8 h	~ 8 h	~ 6,5 h
50%	~ 12 h	~ 12 h	~ 11 h *
70%	~ 15 h	~ 18 h	~ 15,5 h *
99%	> 50 h	> 50 h	~ 22 h *

Tabella 10.11 – Confronto dei tempi di deposizione delle ENP in mezzi differenti. La concentrazione iniziale era di  $10 \text{ mg L}^{-1}$ ; \* = i valori sono stati ricavati graficamente.

Per completezza si vuol richiamare uno studio di Dabrunz et al (2011) che riporta le curve di deposizione del  $n\text{TiO}_2$  nel tempo, per un mezzo di crescita non salato ovvero il medium per lo sviluppo di *Daphnia magna* (ISO 10706, 2000). Considerando la curva corrispondente alla concentrazione di  $8 \text{ mg L}^{-1}$  (per permettere il confronto con quanto visto prima), il grafico riportato in fig. 10.12 mostra un andamento della deposizione indubbiamente molto più rapido rispetto a quanto riscontrato per l'acqua marina. In 3, 6 e 12 h sembra esserci, rispettivamente, la deposizione del 30%, 50% e 70% di tutte le ENP introdotte.

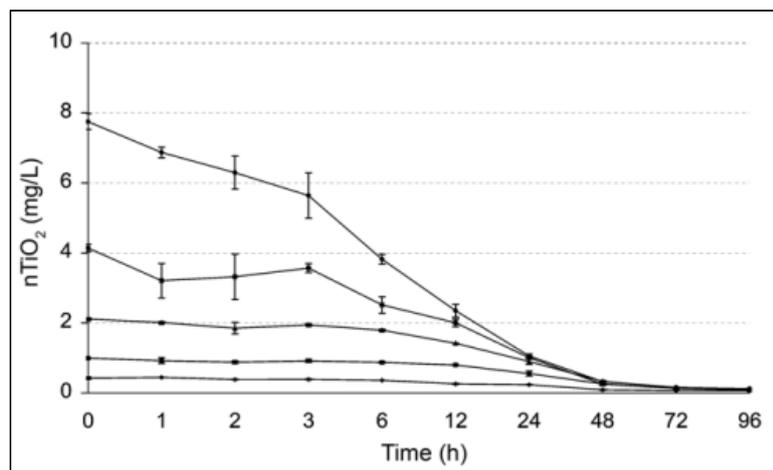


Figura 10.12 – Deposizione delle ENP di nTiO<sub>2</sub> nel mezzo di coltura ISO 10760 (2000), in funzione del tempo (Dabrunz et al, 2011).

Ancora una volta ci si trova di fronte ad un dato contraddittorio, considerato quanto emerge dalla letteratura. Alcuni autori hanno infatti ribadito come lavorare con dei mezzi salati sia più complesso per via dell'interferenza causata dagli ioni dei sali e dei problemi che essi causano alla stabilità delle NP, accelerandone la sedimentazione (French et al, 2009). Lo studio di Dabrunz et al (2011) evidenzia una deposizione di ENP molto più rapida di quella osservata nei mezzi a maggior salinità. Si deduce, quindi, che potrebbero esserci altre cause, oltre la salinità, responsabili di tale abbattimento.

Ad ogni modo, dai risultati ottenuti, sono state ricavate le equazioni matematiche che meglio interpolassero le curve di deposizione. Queste leggi del decadimento, dipendenti dalla concentrazione iniziale delle ENP, sono riassunte nella seguente tabella 10.13.

Sample: <b>0,01 mg L<sup>-1</sup></b> Function: (1) Values of parameters: $y_0 = 54,89$ $A_1 = 45,61$ $t_1 = 16,35$ Goodness of fitting $R^2 = 0,99161$ ; $\chi^2 = 1,29598$	$y = y_0 + A_1 \cdot e^{(-x/t_1)}$
Sample: <b>0,1 mg L<sup>-1</sup></b> Function: (2) Values of parameters: $y_0 = 42,88$ $A_1 = 8,41$ $t_1 = 0,86$ $A_2 = 48,73$ $t_2 = 23,61$ Goodness of fitting $R^2 = 0,99218$ ; $\chi^2 = 1,42578$	$y = y_0 + A_1 \cdot e^{(-x/t_1)} + A_2 \cdot e^{(-x/t_2)}$
Sample: <b>1 mg L<sup>-1</sup></b> Function: (2) Values of parameters: $y_0 = -20,56$ $A_1 = 133,52$ $t_1 = 56,79$ $A_2 = -14,25$ $t_2 = 9,76$ Goodness of fitting $R^2 = 0,99125$ ; $\chi^2 = 5,10958$	$y = y_0 + A_1 \cdot e^{(-x/t_1)} + A_2 \cdot e^{(-x/t_2)}$
Sample: <b>10 mg L<sup>-1</sup></b> Function: (3) Values of parameters: $A_1 = 117,79$ $A_2 = 2,66$ $x_0 = 9,16$ $dx = 5,27$ Goodness of fitting $R^2 = 0,99842$ ; $\chi^2 = 1,67729$	$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(x-x_0)/dx}} + A_2$

Tabella 10.13 – Relazioni matematiche della deposizione delle ENP di nTiO<sub>2</sub> in funzione del tempo e della concentrazione iniziale (Callegaro, 2010).

Come termine di confronto, si vuol richiamare il lavoro di Velzeboer et al (2008). In questo studio gli autori dichiarano che le particelle colloidali in sospensione possiedono un moto, in senso verticale, che è la somma di una componente gravitazionale e di una termica. Questo produce uno stato stazionario in cui la concentrazione dei colloidali diminuisce esponenzialmente **dal fondo alla superficie**, secondo la nota equazione di Boltzmann:

$$C_h = C_0 e^{-(mgh/kT)}$$

in cui  $C_h$  e  $C_0$  (Kg m<sup>-3</sup>) rappresentano la concentrazione di nTiO<sub>2</sub>, rispettivamente, ad una certa altezza  $h$  (m) (rispetto al fondo) e sul fondo;  $m$  (Kg) è la massa delle particelle di nTiO<sub>2</sub>;  $g = 9,8$  m s<sup>-2</sup>;  $k$  è la costante di Boltzmann ( $1,38 \cdot 10^{-23}$  J K<sup>-1</sup>) e  $T$  è la temperatura espressa in °K (Velzeboer et al, 2008). E' interessante notare come, secondo questa interpretazione, la concentrazione delle ENP sia considerata funzione della profondità piuttosto che del tempo. L'equazione esponenziale negativa, tra l'altro, è simile, nella struttura, alla relazione ricavata in questo lavoro per la concentrazione di 0,01 mg L<sup>-1</sup> (cfr. tab. 10.13).

### Riepilogo del comportamento del nTiO<sub>2</sub> in acqua salata

Il nTiO<sub>2</sub> della Degussa Evonik (Aeroxide P25), originariamente, possiede un diametro compreso tra i 15 ed i 60 nm. Una volta introdotte in acqua marina ricostruita, le ENP hanno la tendenza ad agglomerarsi, precipitando sul fondo. Questo processo porta, in tempi relativamente brevi, alla formazione di agglomerati di dimensioni che possono raggiungere l'ordine di grandezza dei µm. Oltre che dal tempo, la deposizione dipende anche da altri fattori, tra cui la concentrazione iniziale, il pH, la salinità e la forza ionica (gli ultimi 3 reciprocamente legati).

Più specificatamente:

- a parità di altre condizioni, più è elevata la concentrazione iniziale di ENP, più rapido risulta il processo di deposizione, a causa del maggior numero di particelle disponibili;
- la deposizione è correlata positivamente all'aumento del pH (French et al, 2009);
- la deposizione è correlata positivamente all'aumento della salinità;
- l'aumento della forza ionica, legato sia alla salinità del mezzo, sia alla valenza degli ioni in esso dispersi, è causa dell'accelerazione del processo di deposizione (French et al, 2009).

Allo stato attuale, il fenomeno della deposizione delle ENP in un mezzo acquoso necessita sicuramente di ulteriori approfondimenti, poiché come emerge da questo studio e dal suo confronto con i dati presenti in bibliografia, non vi è ancora una completa comprensione dei meccanismi che lo determinano.

## 10.2 Test con il batterio *Vibrio fischeri*

### 10.2.1 Certificato di analisi

Il **certificato di analisi**, allegato ai batteri acquistati, garantisce che gli organismi forniti abbiano superato il controllo di qualità previsto e che possano essere impiegati per l'esecuzione di test di ecotossicologici attendibili. Il controllo positivo effettuato per il test di tossicità ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), a 5 e 15 min, ha fornito, rispettivamente, i valori di EC50 pari a 8,18 (6,83 – 9,81)  $\text{mg L}^{-1}$  e 3,41 (2,88 – 4,05)  $\text{mg L}^{-1}$ . Questi valori, quindi, sono in linea con quanto riportato nel suddetto certificato, proposto nelle figure 10.14 a) e b).

Description	Microtox Acute Reagent
Part Number	AZF686018A
Lot Number	09J1023A
Expiration Date	September 2011
Storage Condition	Frozen, -20 °C

Test	Results	Specification	Pass/Fail
Phenol	EC50 (5min) = 20,8 $\text{mg L}^{-1}$	13,0 – 26,0 $\text{mg L}^{-1}$	Pass
Zinc Sulfate	EC50 (15min) = 3,8 $\text{mg L}^{-1}$	3,0 – 10,0 $\text{mg L}^{-1}$	Pass
Zinc ++ (ion)	EC50 (15min) = 0,8 $\text{mg L}^{-1}$	0,6 – 2,2 $\text{mg L}^{-1}$	Pass
DeltaTox Adjusted Light Reading	83	≥ 30	Pass

Figure 10.14 a) (sopra) e b) (sotto) – Tabelle riassuntive del certificato di analisi eseguito sui batteri *V. fischeri*.

### 10.2.2 Evidenze sperimentali

Complessivamente, nell'intervallo di concentrazioni testate ( $10^{-9}$  –  $10$   $\text{mg L}^{-1}$ ), il  $\text{nTiO}_2$  sembra indurre solo un lieve effetto di inibizione della bioluminescenza, nei confronti del batterio *V. fischeri*. Come si può vedere nei grafici 10.15 a), b) e c), per un tempo di esposizione di 5 min, si manifesta un effetto massimo pari al 2% per una concentrazione di  $10^{-9}$   $\text{mg L}^{-1}$ . L'effetto di inibizione diminuisce costantemente all'aumentare della concentrazione, fino a raggiungere un minimo (0,30%) in corrispondenza di  $10^{-6}$   $\text{mg L}^{-1}$ . A  $10^{-5}$   $\text{mg L}^{-1}$  si assiste ad un'inversione di tendenza ed inizia la biostimolazione. Questa si protrae fino alla concentrazione di  $1$   $\text{mg L}^{-1}$  (c.a. -6%), raggiungendo un picco in corrispondenza di  $10^{-3}$   $\text{mg L}^{-1}$  (c.a. -9%). Alla concentrazione di  $10$   $\text{mg L}^{-1}$ , è osservabile nuovamente un leggero effetto di inibizione della bioluminescenza

(1%). Invece, per tempi di esposizione maggiori, di 15 e 30 min, si è osservato solamente un effetto di biostimolazione, a tutte le concentrazioni di ENP.

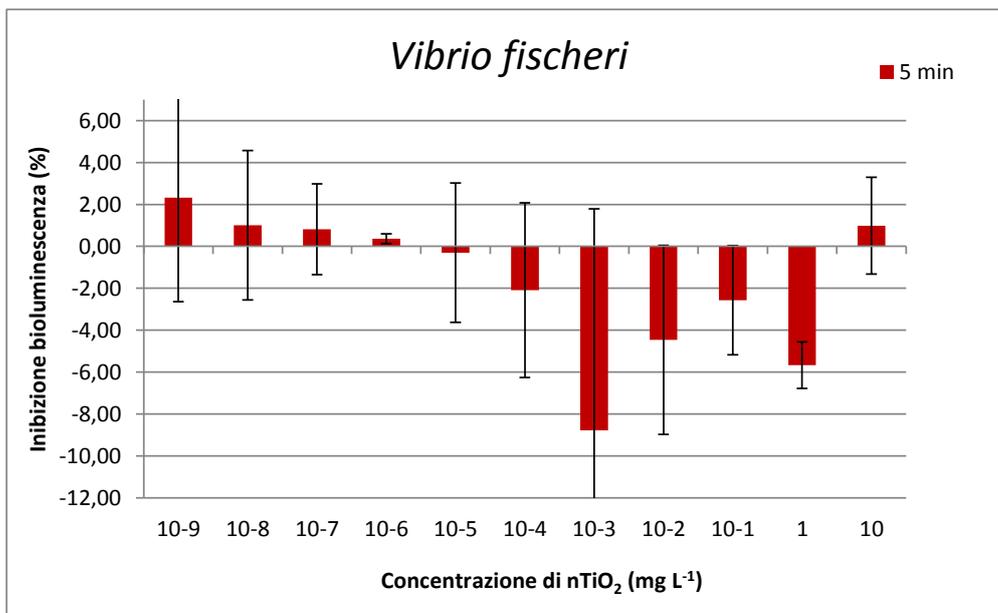


Figura 10.15 a) – Risultati del test di inibizione della bioluminescenza con il nTiO<sub>2</sub> nei confronti di *V. fischeri*, per un tempo di esposizione pari a 5 min.

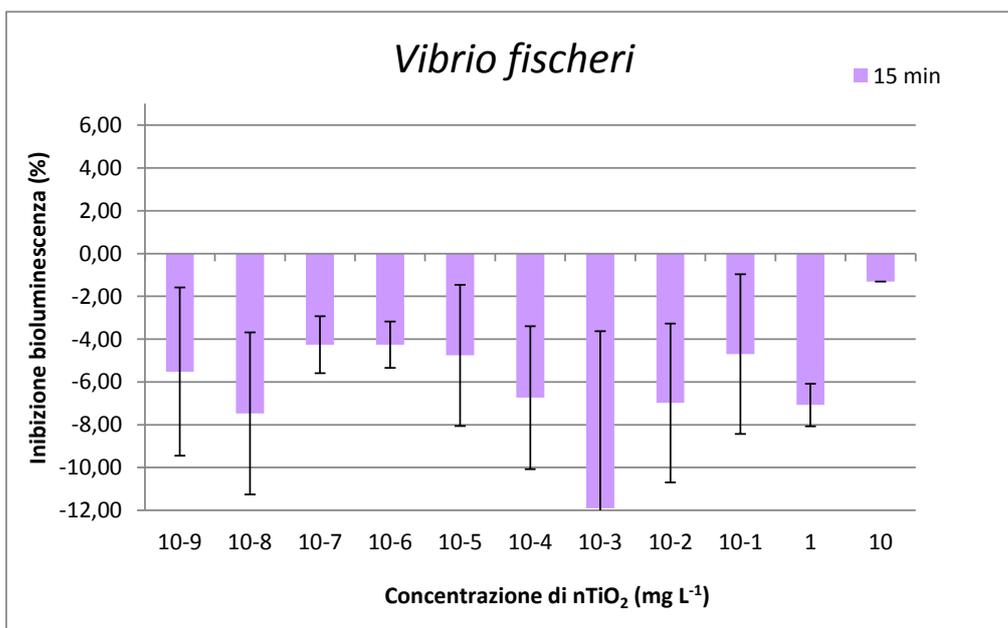


Figura 10.15 b) – Risultati del test di inibizione della bioluminescenza con il nTiO<sub>2</sub> nei confronti di *V. fischeri*, per un tempo di esposizione pari a 15 min.

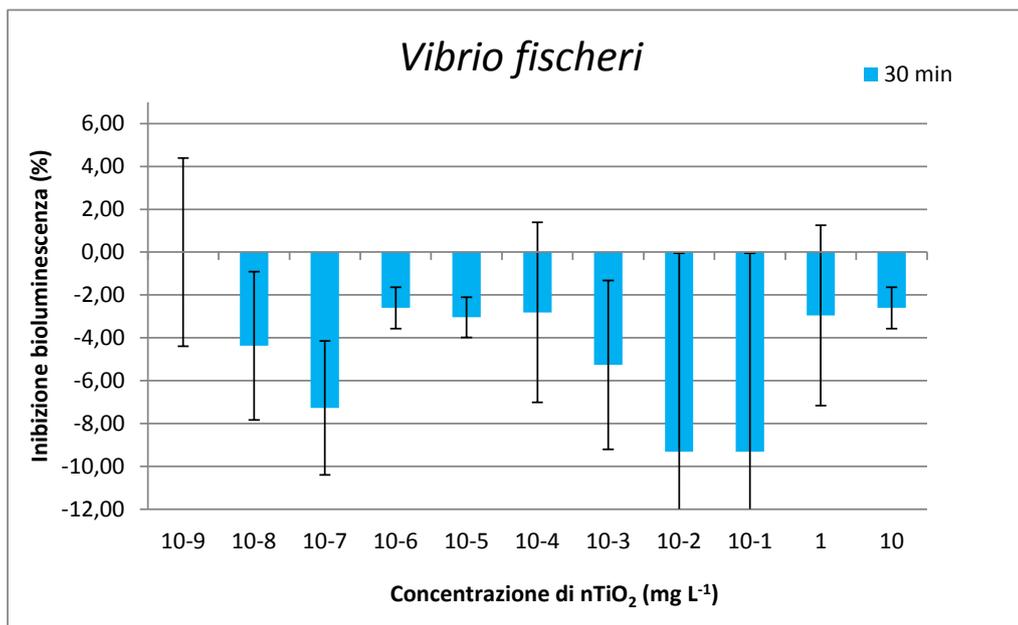


Figura 10.15 c) – Risultati del test di inibizione della bioluminescenza con il nTiO<sub>2</sub> nei confronti di *V. fischeri*, per un tempo di esposizione pari a 30 min.

Si può notare come i valori massimi di biostimolazione, per entrambe le esposizioni di 5 e 15 min (-9% e -12%, rispettivamente), si registrino in corrispondenza della stessa concentrazione, pari a 10<sup>-3</sup> mg L<sup>-1</sup>. In realtà, si potrebbe affermare la stessa cosa anche per l'esposizione di 30 min, tenendo conto dell'errore di cui è affetta la misura.

L'analisi statistica (ANOVA), eseguita singolarmente su ciascuna concentrazione, ha evidenziato che, per la varianza, non c'è una variazione statisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), rispetto ai diversi tempi di esposizione (5, 15 e 30 min), fatta eccezione per le concentrazioni pari a 10<sup>-6</sup> mg L<sup>-1</sup> e 10 mg L<sup>-1</sup>. (figg. 10.16 e 10.17). Complessivamente, invece, il confronto reciproco di tutte le differenti concentrazioni, rispetto ai diversi tempi di esposizione, ha rivelato l'assenza di una differenza statisticamente significativa della varianza dei dati.

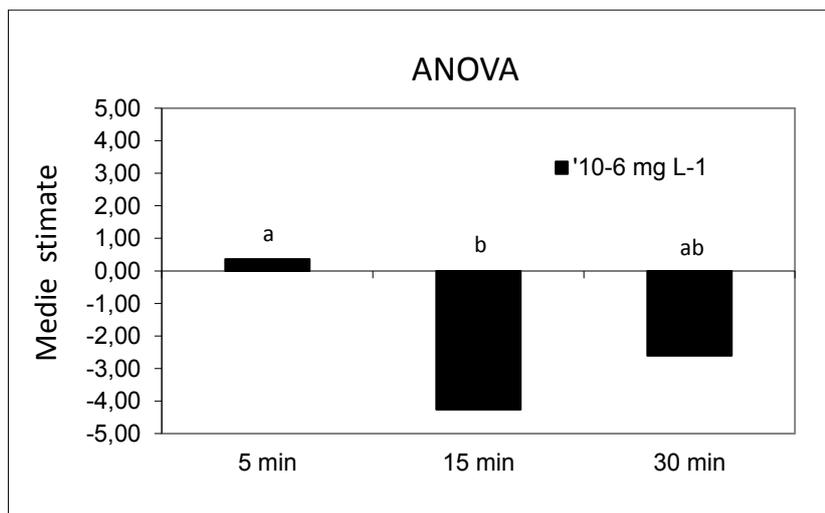


Figura 10.16 – Risultati del test ANOVA per le osservazioni delle concentrazioni pari a  $10^{-6}$  mg L<sup>-1</sup>, rispetto ai 3 momenti differenti (5, 15 e 30 min).

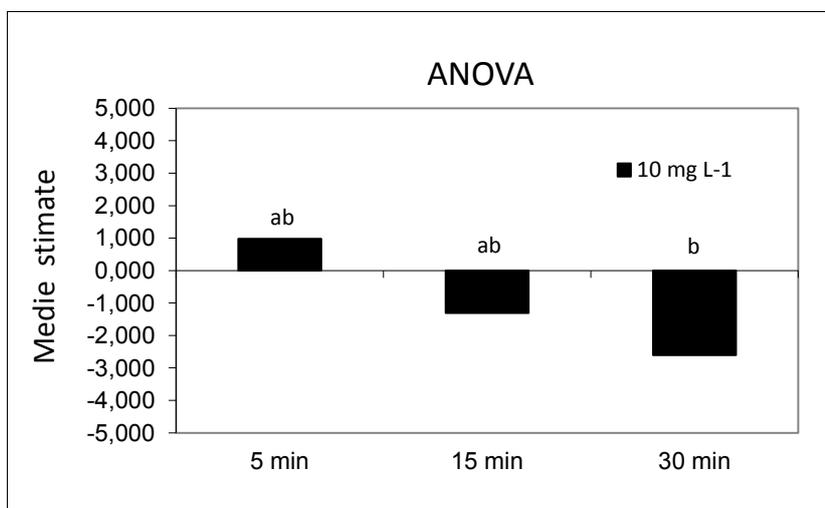


Figura 10.17 – Risultati del test ANOVA per le osservazioni delle concentrazioni pari a 10 mg L<sup>-1</sup>, rispetto ai 3 momenti differenti (5, 15 e 30 min).

Tornando alle evidenze di non tossicità prima esposte, si può notare che queste sono in linea con quanto riscontrato da altri autori. Per fare un confronto con la letteratura, come già visto al capitolo 6.1.1, Heinlaan et al (2008) hanno testato la medesima sostanza con il *V. fischeri*, ottenendo valori di EC20 ed EC50 superiori a 20 g L<sup>-1</sup>. Strigul et al (2009) hanno allestito un test Microtox® esponendo i batteri ad un intervallo di concentrazione compreso tra 0,4395 mg L<sup>-1</sup> e 112,5 mg L<sup>-1</sup> e non ne è emerso alcun effetto tossico; lo stesso dicasi per Velzeboer et al (2008) che hanno valutato gli effetti del nTiO<sub>2</sub> per 1, 10 e 100 mg L<sup>-1</sup>.

Verrebbe da supporre quanto ipotizzato da alcuni autori e cioè che i batteri, non internalizzando le NP, siano a priori più resistenti alla loro azione tossica rispetto ai protisti ed ai metazoi che invece hanno sistemi di internalizzazione delle NP molto ben sviluppati (Kasemets et al, 2009;

Kahru and Dubourguier, 2010). In realtà questo potrebbe non essere necessariamente vero, visto che l'azione tossica delle ENP si potrebbe spiegare anche esternamente, nel mezzo acquoso. Basti pensare, ad esempio, alla già citata capacità di produrre ROS, nel caso del nTiO<sub>2</sub> (Teow et al, 2011) o alla capacità di rilasciare ioni metallici, nel caso di nAg, nZn e nCu.

#### 10.2.2.1 Variazioni al protocollo

Per valutare l'esistenza di possibili effetti derivanti da una più lunga esposizione, la durata del **tempo di contatto** tra i batteri e la sospensione di nTiO<sub>2</sub> è stata prolungata fino a **60 min**.

I risultati sono consultabili nel seguente grafico 10.18.

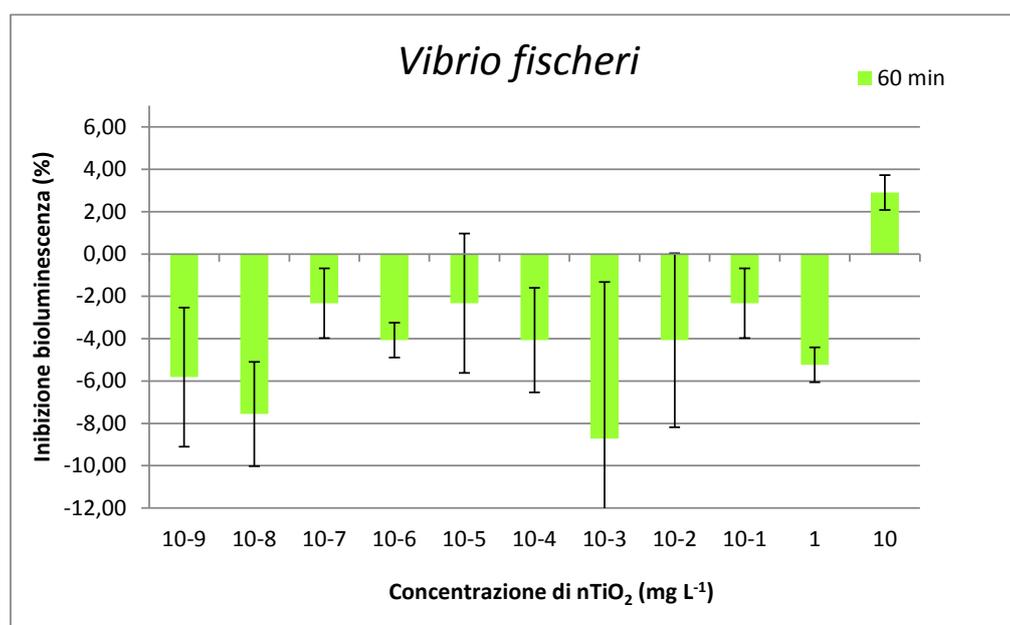


Figura 10.18 – Risultati del test di inibizione della bioluminescenza con il nTiO<sub>2</sub> nei confronti di *V. fischeri*, per un tempo di esposizione pari a 60 min.

Anche in questo caso, sembra che l'effetto di inibizione della bioluminescenza sia molto lieve (circa il 3% alla massima concentrazione di ENP (10 mg L<sup>-1</sup>), pur essendo l'effetto massimo osservato in assoluto in questo test di tossicità. Invece, risulta più accentuato l'effetto di biostimolazione. Ancora una volta il picco di questo fenomeno compare in corrispondenza della concentrazione di 10<sup>-3</sup> mg L<sup>-1</sup>. L'ANOVA ha mostrato che non c'è una differenza statisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) tra le varianze delle singole concentrazioni, all'interno della serie di dati a 60 min, mentre il confronto rispetto ai tempi differenti ha messo in luce delle differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ ) nella variazione delle varianze tra 30 e 60 min, alla concentrazione di 10 mg L<sup>-1</sup> e tra 5 e 60 min, alla concentrazione di 10<sup>-6</sup> mg L<sup>-1</sup>.

In generale, ciò che risulta evidente, osservando le evidenze sperimentali di questa ricerca, è che l'esposizione dei batteri alle ENP di  $\text{TiO}_2$  sembra di fatto avvenire, dal momento che si manifestano degli effetti visibili per gli organismi. Infatti, la biostimolazione potrebbe comunque essere la risposta che testimonia l'avvenuta esposizione ad un agente stressante. C'è inoltre la possibilità di trovarsi di fronte ad un caso di **ormesi**. L'ormesi è una risposta temporanea ad un inquinante poco tossico, che si manifesta con un effetto bifasico (Calabrese and Baldwin, 2002; Stebbing, 1982) e, quindi, può essere scambiata per una biostimolazione. Il temporaneo effetto di biostimolazione è destinato a cessare in breve tempo, oltre il quale si manifestano allora degli effetti negativi. Osservando il grafico 10.19, riassuntivo di tutte 4 le serie, l'ipotesi potrebbe sembrare plausibile.

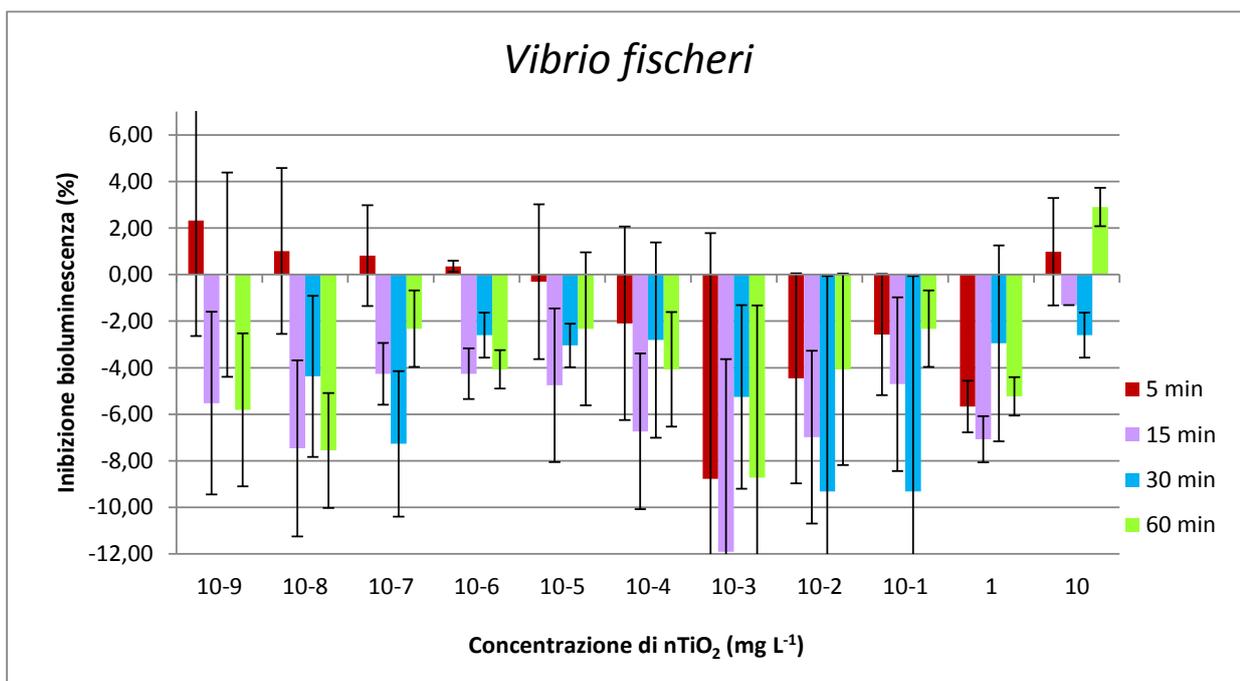


Figura 10.19 – Risultati complessivi del test di inibizione della bioluminescenza con il nTiO<sub>2</sub> nei confronti di *V. fischeri*, per un tempo di esposizione pari a 5, 15, 30 e 60 min.

Si potrebbero distinguere:

- un'esposizione minima, dovuta alle basse concentrazioni impiegate congiuntamente ad un ridotto tempo di contatto con le ENP (5min); in questo caso il *V. fischeri* mostrerebbe dapprima un lieve effetto di inibizione della bioluminescenza che si affievolirebbe all'aumentare della concentrazione;
- un'esposizione più intensa, dovuta sia all'aumento delle concentrazioni di ENP, sia all'aumento dei tempi di contatto; i batteri potrebbero mostrare una risposta scambiata per biostimolazione;

- un'esposizione massima, in cui le alte concentrazioni e i tempi di contatto superiori causerebbero il cambiamento della tendenza della risposta degli organismi; la temporanea biostimolazione si affievolirebbe fino a cessare, dopodiché si manifesterebbe nuovamente l'inibizione della bioluminescenza.

E' bene precisare che, nel caso specifico del *V. fischeri*, l'interpretazione dei risultati di effetto attraverso le curve di deposizione (cfr. par. 10.1.2) non è stata volutamente presa in considerazione, dato il breve tempo di contatto delle ENP con i batteri e date le basse concentrazioni di ENP impiegate. Si vuol ricordare, infatti, che l'agglomerazione delle ENP, in materiale a granulometria crescente, è un fenomeno positivamente correlato al tempo ma la sua cinetica dipende anche dalla concentrazione iniziale di ENP disperse nel mezzo. Dalle relazioni matematiche risulta che, dopo un tempo massimo di 60 min, la frazione di materiale depositatasi alla più alta concentrazione impiegata ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) risulta essere circa il 2% del totale. Per questi motivi è plausibile supporre che l'effettivo scenario espositivo non subisca particolari cambiamenti.

#### 10.2.3 Riepilogo dei risultati conseguiti con *V. fischeri*

Nel caso del batterio non si sono evidenziati degli effetti tossici rilevanti e tali evidenze sono in linea con quanto osservato anche da altri autori (Heinlaan et al, 2008; Velzeboer et al, 2008; Strigul et al, 2009). I valori di EC50 ricavati da questi ultimi, infatti, corrispondono a concentrazioni non realistiche ( $> 20000 \text{ mg L}^{-1}$ ). In base alla dinamica degli effetti osservati, inoltre, è plausibile ipotizzare che si sia verificato un caso di ormesi.

Da questi risultati, quindi, nell'ottica di una futura attività sperimentale, l'impiego di *V. fischeri* per l'esecuzione di test ecotossicologici con il nTiO<sub>2</sub> appare non indicato, vista la bassa sensibilità dimostrata, nei confronti di questo ENM, da parte di tale organismo.

## 10.3 Test con l'alga unicellulare *Phaeodactylum tricornerutum*

### 10.3.1 Carta di controllo

Al fine di garantire un livello accettabile di qualità dei dati ecotossicologici prodotti, ciascun test di controllo, effettuato con il tossico di riferimento, è stato confrontato con la **carta di controllo** del Gruppo di Ricerca del laboratorio di Ecotossicologia (fig. 10.20). Questa raccoglie l'informazione complessiva di tutti i test di controllo eseguiti nell'ambito del laboratorio nel corso degli anni e pertanto attesta la riproducibilità del test. I valori di IC50 sono stati ricavati dalla regressione lineare eseguita sui risultati di effetto.

Come si può constatare la media del valore di IC50 rispetto al  $K_2Cr_2O_7$  è risultata pari a 21,14 (15,33 – 26,80)  $mg L^{-1}$ , con un coefficiente di variazione ( $[SD / media] \cdot 100$ )  $CV = 26\%$ , per  $n = 32$ . I limiti di validità inferiore e superiore ( $EC_{50} \text{ medio} \pm 2 \cdot SD$ ) sono, rispettivamente, pari a 10,23 e 32,05  $mg L^{-1}$ . Si segnala che il protocollo (UNI EN ISO, 2006) riporta in merito un valore di IC50 pari a 20  $mg L^{-1}$  ( $n = 10$ ,  $CV = 26\%$ ), che sta ad indicare come i dati prodotti nell'ambito di questo lavoro di tesi siano accettabili.

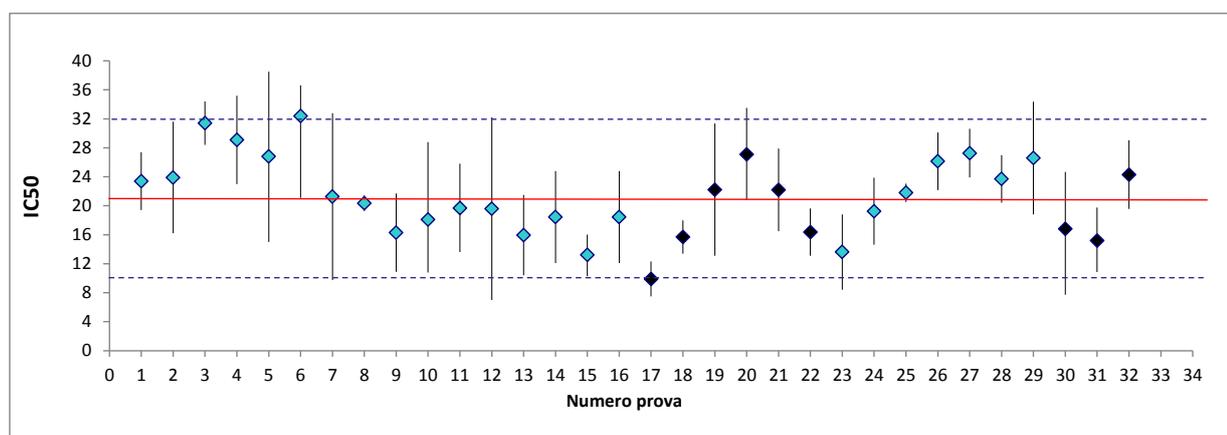


Figura 10.20 – Carta di controllo per il test di inibizione della crescita cellulare con *P. tricornerutum*. In nero i test effettuati come controllo positivo per questo lavoro di tesi.

### 10.3.2 Evidenze sperimentali

Complessivamente per questo lavoro di tesi sono stati eseguiti 9 test con i campioni di NM (e relativo tossico di riferimento,  $K_2Cr_2O_7$ ), i cui dettagli sono stati riassunti in tabella 10.21. Globalmente, le concentrazioni nominali di  $nTiO_2$  utilizzate erano comprese nell'intervallo 0,1 – 100  $mg L^{-1}$ , quelle effettive, invece, erano comprese nell'intervallo 0,09 – 90  $mg L^{-1}$ , per effetto della diluizione operata dalla necessaria aggiunta del mezzo di crescita (10%).

Test n.	Concentrazioni nominali di nTiO <sub>2</sub> utilizzate (mg L <sup>-1</sup> )	n. repliche per concentrazione	n. repliche per test	Modifiche al protocollo
01	0; 0,09; 0,9; 9; 90	3	2	
02	0; 0,09; 0,45; 0,9; 4,5; 9; 45; 90	3	1	
03	0; 0,9; 2,25; 4,5; 6,75; 9	3	1	
04	0; 9; 18; 27; 36; 45	3	1	
05	0; 1,8; 3,6; 7,2; 14,4; 28,8; 57,6	3	1	
06	0; 1,8; 3,6; 7,2; 14,4; 28,8; 57,6	3	1	
07	0; 0,9; 9; 45	3	1	Presenza/assenza di alginato
08	0; 0,9; 9; 45	3	1	Presenza/assenza di alginato
09	0; 18; 36; 54; 72; 90	3	3	

Tabella 10.21 – Sintesi dei test ecotossicologici effettuati con *P. tricornutum*.

Il disegno sperimentale ha previsto una fase preliminare nella quale testare gli effetti del nTiO<sub>2</sub> in un intervallo di concentrazioni piuttosto ampio, tra 0,09 e 90 mg L<sup>-1</sup>. Lo scopo era quello di individuare un intervallo più ristretto di effetto, attorno al quale si potesse delimitare il campo delle indagini.

All'interno dell'intervallo individuato sono stati successivamente allestiti 2 test. Il primo test di inibizione della crescita cellulare (01) è stato condotto testando gli effetti del nTiO<sub>2</sub> alle concentrazioni pari a 0; 0,09; 0,9; 9 e 90 mg L<sup>-1</sup>. Il test è stato eseguito in duplicato (replica A e B) e le prime evidenze sperimentali hanno indicato un valore di IC50 pari a 31 (15 - 50) mg L<sup>-1</sup> e 12 (0 - 30) mg L<sup>-1</sup>, rispettivamente, per le due repliche. Il valore medio dell'IC50, quindi, è risultato pari a 22 (8 - 40) mg L<sup>-1</sup> (fig. 10.21). Il secondo test preliminare è stato condotto con una diversa scansione delle concentrazioni, ovvero 0; 0,09; 0,45; 0,9; 4,5; 9; 45 e 90 mg L<sup>-1</sup>. In questo caso si è potuto osservare una IC50 pari a 30 (8 - 52) mg L<sup>-1</sup> (fig. 10.22). La media complessiva (test 01 e 02) del valore di IC50 è divenuta pari a 24 (8 - 44) mg L<sup>-1</sup>. Questo valore risulta peraltro confrontabile con quanto ricavato da alcuni autori che hanno utilizzato specie d'acqua dolce. Sadiq et al (2011), infatti, con *Scenedesmus sp.* hanno ottenuto una EC50 = 21 mg L<sup>-1</sup>, mentre Warheit et al (2007) con *Pseudokirchneriella subcapitata* hanno trovato una EC50 = 16 mg L<sup>-1</sup> (cfr. par. 6.2.3).

Dal confronto reciproco delle diverse concentrazioni del test n. 01, nelle due repliche A e B, il test ANOVA ha verificato l'esistenza di una variazione statisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) delle varianze, divise in 6 gruppi differenti (fig. 10.23). Per il test n. 02, si conferma la presenza di una variazione statisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) della varianza in 4 differenti gruppi (fig.

10.24). Per la scelta del nuovo intervallo di concentrazioni, col quale continuare l'attività sperimentale, si è dunque tenuto conto:

- del suddetto valore medio di IC50 ed del suo intervallo fiduciale;
- della rappresentatività ambientale delle concentrazioni utilizzate (cfr. par. 4.2.2);
- dei problemi di natura sperimentale, legati alla difficoltà del conteggio delle cellule quando le dispersioni sono molto concentrate ( $> 50 \text{ mg L}^{-1}$ ) ed assumono quindi una colorazione lattescente (fig. 10.30).

Dunque, l'intervallo di concentrazioni è stato limitato tra  $0,9$  e  $57,6 \text{ mg L}^{-1}$  e, al suo interno, sono state testate, complessivamente, le concentrazioni di  $\text{nTiO}_2$  pari a 1,8; 2,25; 3,6; 4,5; 6,75; 7,2; 9; 14,4; 18; 27; 28,8; 36; 45 e  $54 \text{ mg L}^{-1}$ , con un'unica eccezione rappresentata dal test 09.

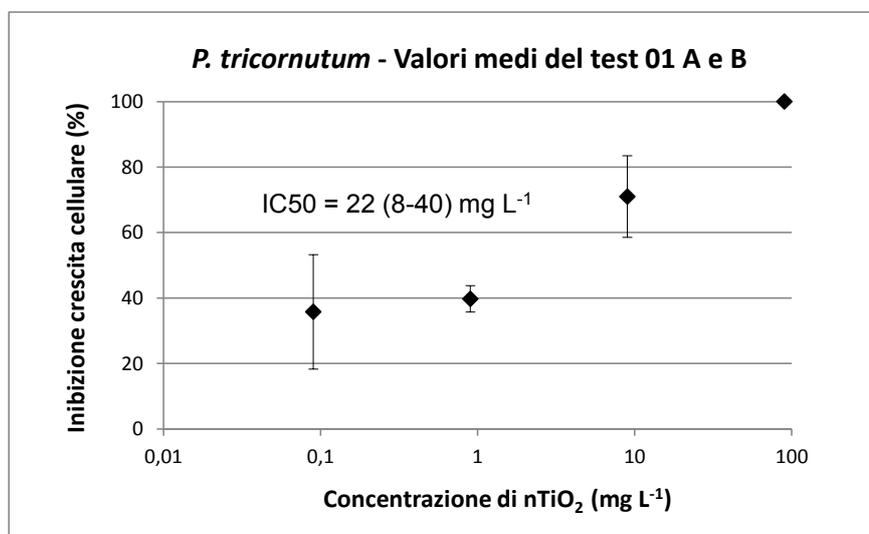


Figura 10.21 - Risultati degli effetti di inibizione della crescita cellulare del  $\text{nTiO}_2$  nei confronti di *P. tricornutum*. Il grafico riporta i valori medi di effetto ricavati dalle due repliche (A e B) del test preliminare n. 01.

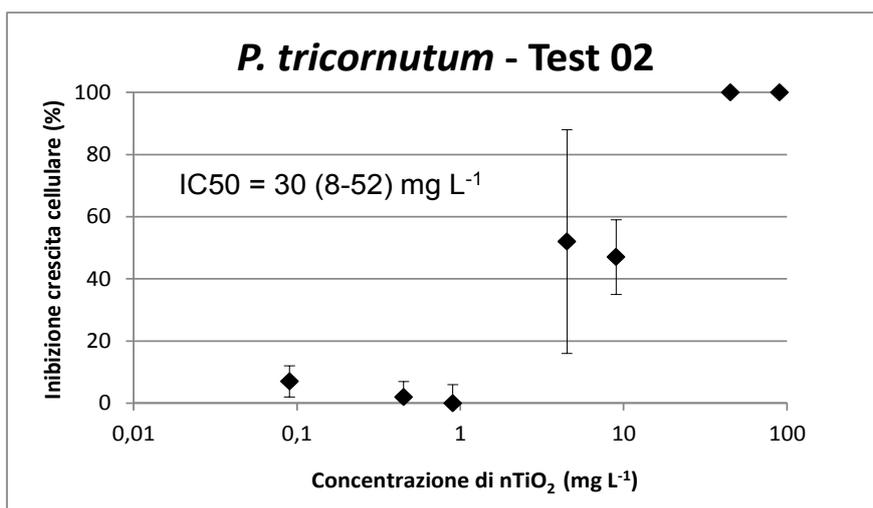


Figura 10.22 - Risultati degli effetti di inibizione della crescita cellulare del  $\text{nTiO}_2$  nei confronti di *P. tricornutum*. Test n. 02.

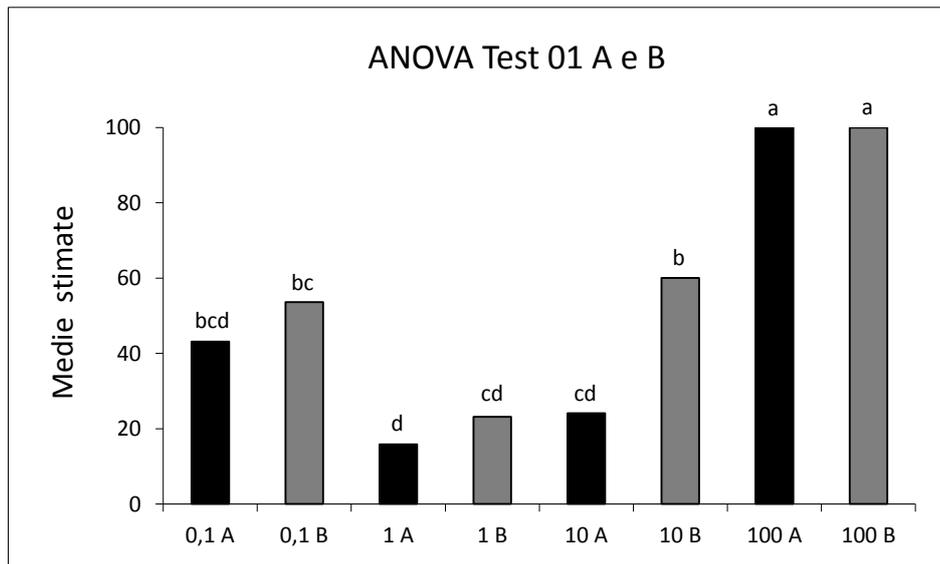


Figura 10.23 – Risultati del test ANOVA per il test di tossicità n. 01, repliche A e B.

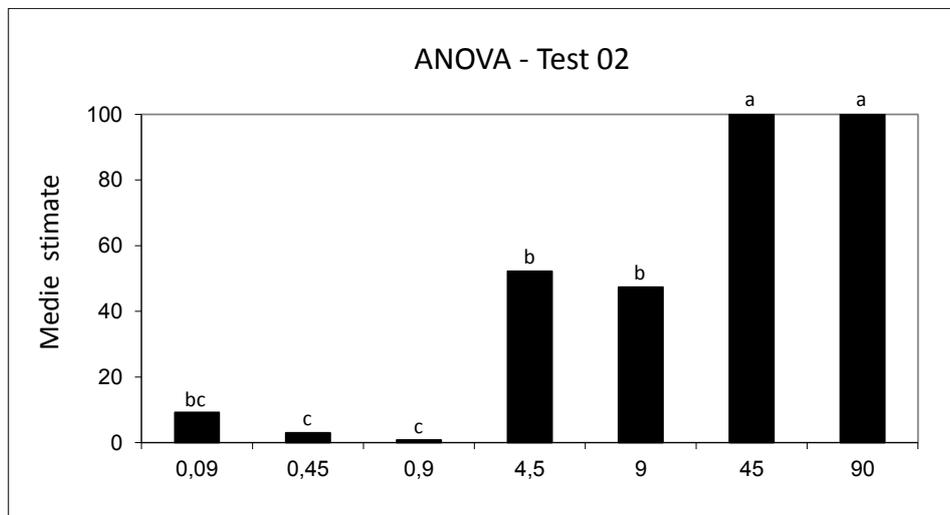


Figura 10.24 – Risultati del test ANOVA per il test di tossicità n. 02.

I risultati dei singoli test sono riportati in dettaglio in Appendice (pag.309). L'informazione complessiva, invece, è stata ottenuta effettuando, sull'insieme dei punti sperimentali, una regressione su base logaritmica, la quale ha permesso di ricavare la seguente relazione:

$Y = 3,549 \ln(X) + 5,626$ , con un coefficiente di determinazione  $R^2 = 0,493$  ed un errore standard  $\varepsilon = 1,326$ . La rappresentazione grafica di quanto anticipato è affidata alla seguente figura 10.25.

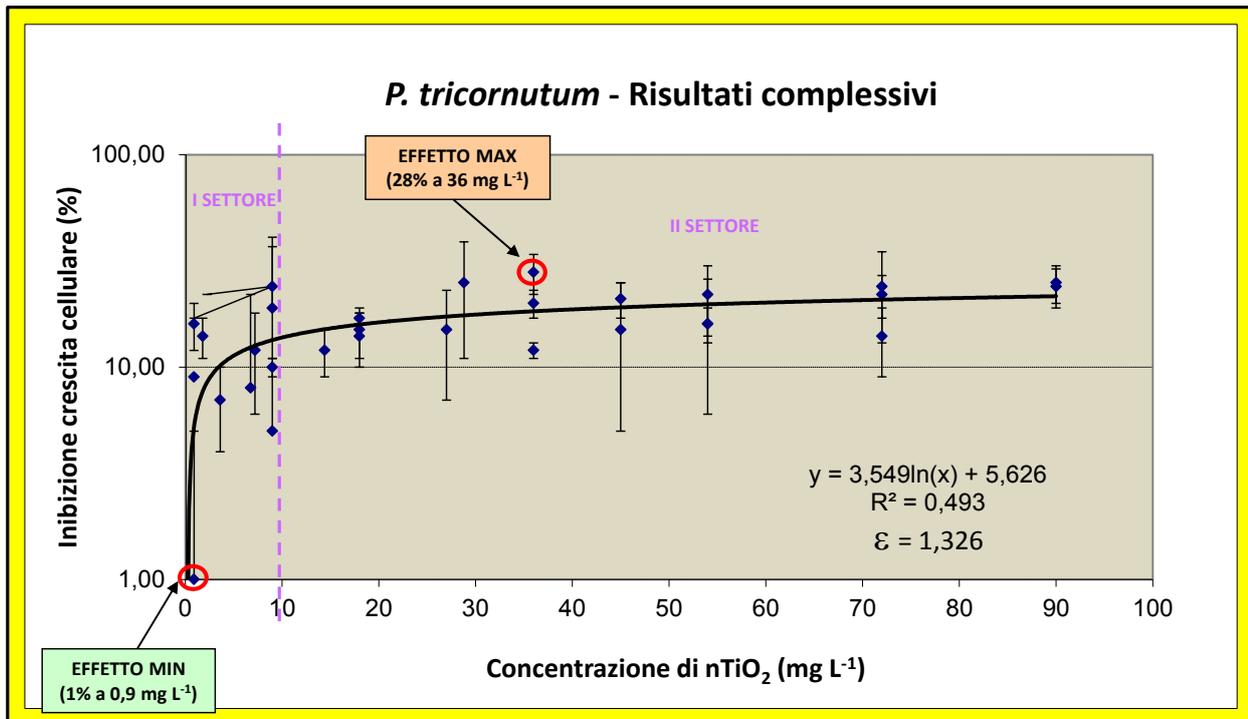


Figura 10.25 – Grafico complessivo degli effetti del nTiO<sub>2</sub> nei confronti di *P. tricornutum*.

Come si può osservare, le percentuali di effetto sono comprese tra un valore minimo, pari a 1%, ed uno massimo, pari a 28%, corrispondenti alle concentrazioni di nTiO<sub>2</sub> pari a 0,9 mg L<sup>-1</sup> e 36 mg L<sup>-1</sup>, rispettivamente. Non essendosi mai manifestato il 50% di effetto, non è stato possibile ricavare il valore di EC50. Il valore di EC20, invece, è stato calcolato mediante l'equazione logaritmica e corrisponde a 57 (42 - 72) mg L<sup>-1</sup>. Dai test preliminari n 01 e 02, però, emerge un'evidente discrepanza, poichè tali test fornivano un valore di EC50 medio pari a 24 (8 - 44) mg L<sup>-1</sup>. Si è dell'avviso, però, che tale anomalia sia difficilmente attribuibile alle condizioni operative, dal momento che:

- ✓ i diversi test hanno sempre seguito le stesse rigorose linee guida dei protocolli standard internazionali;
- ✓ il ceppo algale è sempre stato il medesimo e i controlli delle colture rispetto al tossico di riferimento, eseguiti per ciascun test, ne hanno convalidato la bontà;
- ✓ l'operatore è sempre stato il medesimo, ovvero il sottoscritto, e ciò va a beneficio di una ridotta variabilità nell'errore manuale.

Dati questi precedenti, si presume che gli elementi responsabili di tale variabilità possano essere le dispersioni di nTiO<sub>2</sub>. Infatti, anche se preparate sempre con la stessa metodica, come più volte ribadito, il comportamento delle ENP all'interno di un mezzo acquoso è molto variabile e un diverso stato di agglomerazione può implicare una diversità nelle quantità effettive del materiale

prelevato e trasferito nei pozzetti. Quest'ultimo aspetto potrebbe collegarsi a quanto osservato nel grafico 10.25.

Nel grafico riassuntivo dei risultati si può infatti notare che, in funzione della modalità di distribuzione dei punti, è possibile distinguere due aree (settori) differenti. Nel I settore, collocato nell'intervallo di concentrazioni compreso tra 0 e 10 mg L<sup>-1</sup>, i punti mostrano una dispersione maggiore, poiché le percentuali di effetto variano tra 1% e 24%. Nel II settore, invece, compreso tra 10 e 90 mg L<sup>-1</sup>, i punti sono distribuiti in una fascia più ristretta e le percentuali di effetto variano tra 12% e 28%. Una seconda differenza apprezzabile, tra le due aree, sembrerebbe consistere nella diversa variabilità dei risultati corrispondenti ad una stessa concentrazione. Nel I settore, infatti, in corrispondenza della stessa concentrazione, test diversi forniscono risultati di effetto che variano all'interno di un intervallo più ampio, rispetto a quanto avviene per il II settore. E' il caso per esempio della concentrazione pari a 9 mg L<sup>-1</sup>, in corrispondenza della quale i test n 01 A, 03, 04 e 07 hanno fatto registrare valori di effetto pari a 24%, 19%, 5% e 10%, rispettivamente (intervallo = 19%). A concentrazioni maggiori, invece, questo fenomeno sembra essere più contenuto. Ad esempio, i test n 9 A, 9 B e 9 C, effettuati alla concentrazione di 36 mg L<sup>-1</sup>, mostravano effetti rispettivamente pari a 12%, 20% e 28% (intervallo = 16%), mentre i test n 9 A, 9 B e 9 C, in corrispondenza di una concentrazione di 72 mg L<sup>-1</sup> evidenziavano effetti rispettivamente pari a 14%, 22% e 24% (intervallo = 10%).

Per concentrazioni più basse, comprese tra 0 e 10 mg L<sup>-1</sup>, la variabilità di prove differenti sembrerebbe essere maggiore, rispetto a quanto si può osservare per concentrazioni superiori a 10 mg L<sup>-1</sup>. Forse, la minore variabilità degli effetti osservata nel secondo settore potrebbe corrispondere ad una meno ampia variabilità della granulometria degli agglomerati. Infatti, le analisi sulla stabilità a lungo termine delle dispersioni (cfr. par. 10.1.2.5) hanno evidenziato che, se la concentrazione è maggiore, le ENP sedimentano più rapidamente rispetto alle dispersioni meno concentrate, come del resto hanno potuto confermare anche Keller et al (2010) nel loro lavoro, in cui impiegavano dispersioni di nTiO<sub>2</sub> in acqua salata alle concentrazioni di 10, 50, 100 and 200 mg L<sup>-1</sup>. Probabilmente, come ipotizzato al paragrafo 10.1.2.3, ciò accade perché statisticamente aumentano le probabilità di incontro delle ENP e, di conseguenza, in minor tempo possono formarsi degli agglomerati più pesanti. Dal momento che le ENP sedimentano più rapidamente, è ragionevole aspettarsi effetti maggiori nei confronti di un'alga bentonica ma, allo stesso tempo, si può supporre che tali effetti, misurati in test differenti, siano anche più omogenei. Viceversa, nel caso del primo settore, i processi di sedimentazione possono essere più lunghi e, di conseguenza, questo può portare alla formazione di una più ampia gamma di agglomerati. Il risultato potrebbe essere uno scenario espositivo ben differenziato, responsabile

di una maggiore variabilità di quanto rilevato in test differenti condotti con le stesse concentrazioni.

In generale, si attesta che non è agevole riuscire a confrontare i dati di tossicità ricavati per la tesi con la produzione bibliografica. Allo stato attuale, infatti, in letteratura esiste un unico articolo inerente gli effetti del nTiO<sub>2</sub> nei confronti di alghe marine che riporta i risultati di un test sull'inibizione della crescita cellulare a 96 h eseguito con le specie *Dunaliella tertiolecta*, *Isochrysis galbana*, *Skeletonema marinoi* e *Thalassiosira pseudonana* (Miller et al, 2010). La miscela di ENP utilizzata (Degussa-Evonik) si componeva di 81% anatasio e 19% rutilo, con dimensioni comprese tra 15 e 20 nm, risultando pertanto confrontabile con quella utilizzata in questo lavoro di tesi. Le concentrazioni utilizzate corrispondevano a 0, 10, 100, 500 e 1000 µg L<sup>-1</sup>. Gli autori hanno concluso che il nTiO<sub>2</sub> non causa alcun effetto di inibizione della crescita agli organismi, poiché è insolubile in acqua. Queste evidenze sperimentali contrastano con quanto ottenuto in questo lavoro di tesi ma si ritiene che la mancanza di effetto, riscontrata da Miller et al (2010), sia semplicemente da attribuire alle basse concentrazioni di nTiO<sub>2</sub> utilizzate nello studio citato.

Diversamente, il materiale bibliografico disponibile è maggiore, se si considerano gli ambienti d'acqua dolce. Al paragrafo 6.2.3 si è avuto modo di prendere visione di quanto sia stato prodotto finora in letteratura a proposito di nTiO<sub>2</sub> e alghe unicellulari di acqua dolce. Nella figura 10.26 e nelle tabelle 10.27 e 10.28 è riportata una sintesi in modo da poter tentare un confronto con i risultati ottenuti in questo lavoro di tesi.

Il grafico riassume i risultati dei test ecotossicologici condotti sulle diverse specie algali, dai diversi autori, riportando, nei due assi delle ordinate, i valori di EC50 e quelli dell'inibizione cellulare, rispettivamente. Le tabelle, invece, riportano rispettivamente le differenti condizioni sperimentali (caratteristiche del nTiO<sub>2</sub> e tecnica usata per realizzare le dispersioni) messe in atto per l'esecuzione dei vari test e la classificazione tassonomica dei diversi organismi.

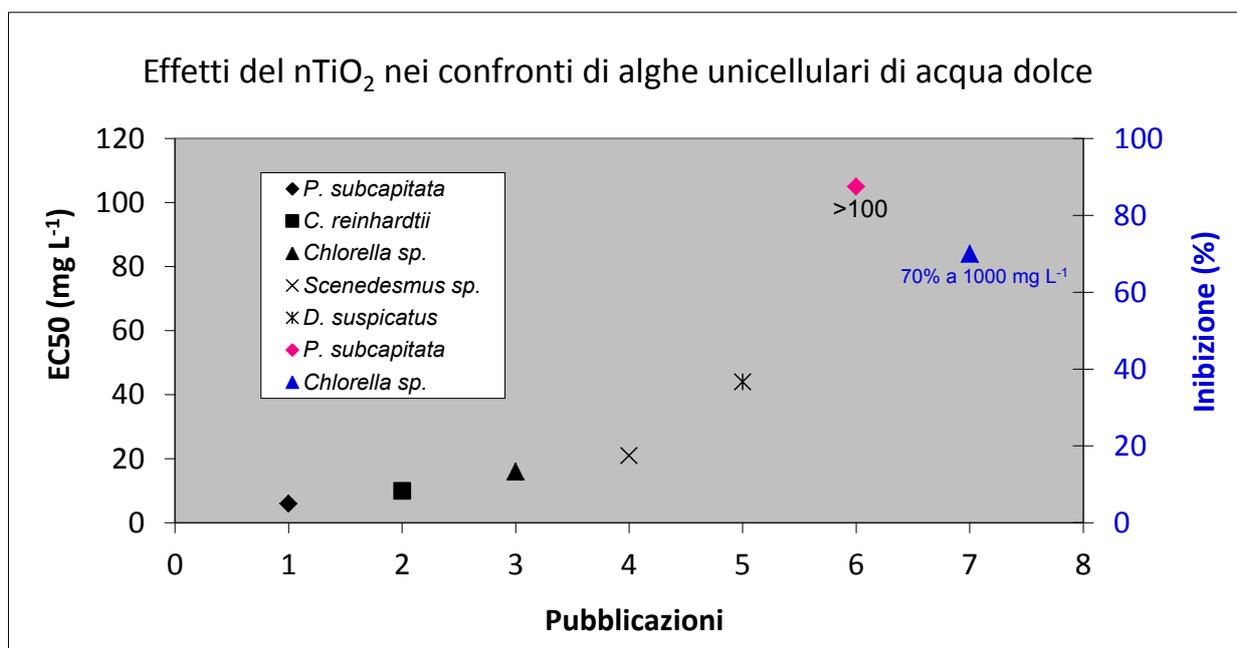


Figura 10.26 – Confronto dei dati di letteratura (dicembre, 2011) inerenti gli effetti del nTiO<sub>2</sub> nei confronti di alghe unicellulari di acqua dolce. L'ordinata principale (a sx) riporta i valori di EC<sub>50</sub> (mg L<sup>-1</sup>), quella secondaria (in blu) l'inibizione della crescita cellulare (%), non esprimibile come EC<sub>50</sub>.

Specie	Produttore TiO <sub>2</sub> Fasi cristallochimiche e Percentuale	Diametro dichiarato	Tecnica Dispersione	Rif. bibliografico
■ <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Degussa; A(80%) + R(20%) (P25)	21 nm	n.d.	Wang et al, 2008
▲ <i>Chlorella sp.</i>	Zhejiang Hongsheng Material Technology Co., China; A(100%); R(100%)	5-10 nm; 50 nm	Sonicazione per 30 min a 100 W in acqua deionizzata	Ji et al, 2010
▲ <i>Chlorella sp</i>	Sigma-Aldrich; A(100%)	< 25 nm	Sonicazione per 30 min a 750 W in medium algale	Sadiq et al, 2011
* <i>Desmodesmus suspicatus</i>	A(80%); A(100%)	25 nm; 10 nm	Ultrasuoni in medium algale; stirring in acqua deionizzata	Hund-Rinke & Simon, 2006
◆ <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Sigma-Aldrich	25-70 nm	Ultrasuoni per 30 min nel medium algale	Aruoja et al, 2009
◆ <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Sigma-Aldrich	<40 nm	n.d.	Velzeboer et al, 2008
× <i>Scenedesmus sp.</i>	Sigma-Aldrich; A(100%)	< 25 nm	Sonicazione per 30 min a 750 W in medium algale	Sadiq et al, 2011

Tabella 10.27 – Comparazione delle condizioni sperimentali impiegate nei diversi test ecotossicologici, in riferimento al grafico x.x. A = anatasio; R = rutilo.

<b>Regno</b>	Plantae	Plantae	Plantae	Plantae
<b>Phylum</b>	Chlorophyta	Chlorophyta	Chlorophyta	Chlorophyta
<b>Classe</b>	Chlorophyceae	Chlorophyceae	Chlorophyceae	Chlorophyceae
<b>Famiglia</b>	Chlamydomonadaceae	Chlorellaceae	Scenedesmaceae	Selenastraceae
<b>Genere</b>	<i>Chlamydomonas</i>	<i>Chlorella</i>	<i>Desmodesmus</i>	<i>Pseudokirchneriella</i>
<b>Specie</b>	<i>C. reinhardtii</i>	<i>Chlorella. sp.</i>	<i>D. subspicatus</i>	<i>P. subcapitata</i>

Tabella 10.28 - Classificazione tassonomica dei diversi organismi impiegati nei test ecotossicologici di figura 10.26.

Naturalmente, nell'interpretazione di tali risultati, non si può soprassedere sul fatto che la diversità delle specie impiegate nei test di tossicità, proposti in figura 10.26, *in primis* sia di per sé un importante causa di variabilità. Gli organismi sono tassonomicamente differenti (tab. 10.28) e possiedono come unica caratteristica comune il fatto di essere specie planctoniche appartenenti alla classe delle Chlorophyceae. In ogni caso, il confronto con la letteratura fa emergere come, quanto prodotto finora, sia in generale **difficilmente confrontabile** a causa delle variabilità delle **condizioni sperimentali utilizzate**: composizione del prodotto differente, differenti metodi di dispersione, concentrazioni di esposizione differenti, tempi di esposizione differenti, specie, popolazioni ed endpoint differenti. Anche quando i diversi autori utilizzano la stessa specie, sono valutati endpoint differenti, come ad esempio hanno fatto Ji et al (2010) e Sadiq et al (2011) per *Chlorella sp.* in cui sono state considerate, rispettivamente, l'inibizione della crescita a 6 gg. e l'inibizione della crescita a 72 h, oppure Aruoja et al (2009) e Velzeboer et al (2008) per *P. subcapitata* in cui sono state considerate, rispettivamente, l'inibizione della crescita e della fotosintesi.

Probabilmente, come già discusso in precedenza, la diversità delle condizioni sperimentali si riflette anche sul diverso stato di dispersione delle ENP che, di conseguenza, influenza l'esposizione degli organismi. Le procedure di QA e QC, infatti, garantiscono l'idoneità degli organismi impiegati nei test ecotossicologici. In particolare, la validità dei controlli positivi e negativi, previsti per ognuno dei test effettuati, dovrebbe portare ad escludere eventuali fattori di disturbo che sono legati non soltanto alla componente biologica ma anche ai mezzi in cui questa viene coltivata e mantenuta. Quindi, per esclusione, è ragionevole supporre che la bassa confrontabilità riscontrata nei risultati sia anche attribuibile ad un comportamento molto variabile delle ENP disperse nel mezzo acquoso.

Attualmente, il problema è **comune alla nanoecotossicologia** nel suo complesso. Kahru et al (2010) affermano chiaramente che c'è una grande variabilità nei risultati, non solo tra ENP differenti e specie diverse ma anche per lo **stesso tipo di ENP** e lo stesso gruppo di organismi. Alle stesse conclusioni sono giunti anche Scown et al (2010), i quali dichiarano, nella loro review, che la misura degli effetti per batteri, alghe e invertebrati acquatici varia considerevolmente anche per la stessa ENP e che, nonostante si siano osservati degli effetti avversi, c'è comunque una mancanza di consistenza in queste osservazioni.

Nel tentativo di interpretare i risultati di effetto di questo lavoro di tesi, mettendoli in relazione al processo di precipitazione delle ENP, si è provato ad utilizzare l'informazione apportata dalle curve di deposizione (cfr. par. 10.1.2). Nel grafico 10.29 sono mostrati gli andamenti di deposizione del nTiO<sub>2</sub>, calcolati a partire da concentrazioni iniziali differenti (0,1; 1 e 10 mg L<sup>-1</sup>), rispetto al tempo e, in relazione a queste, è indicata la curva di esposizione teorica per le alghe.

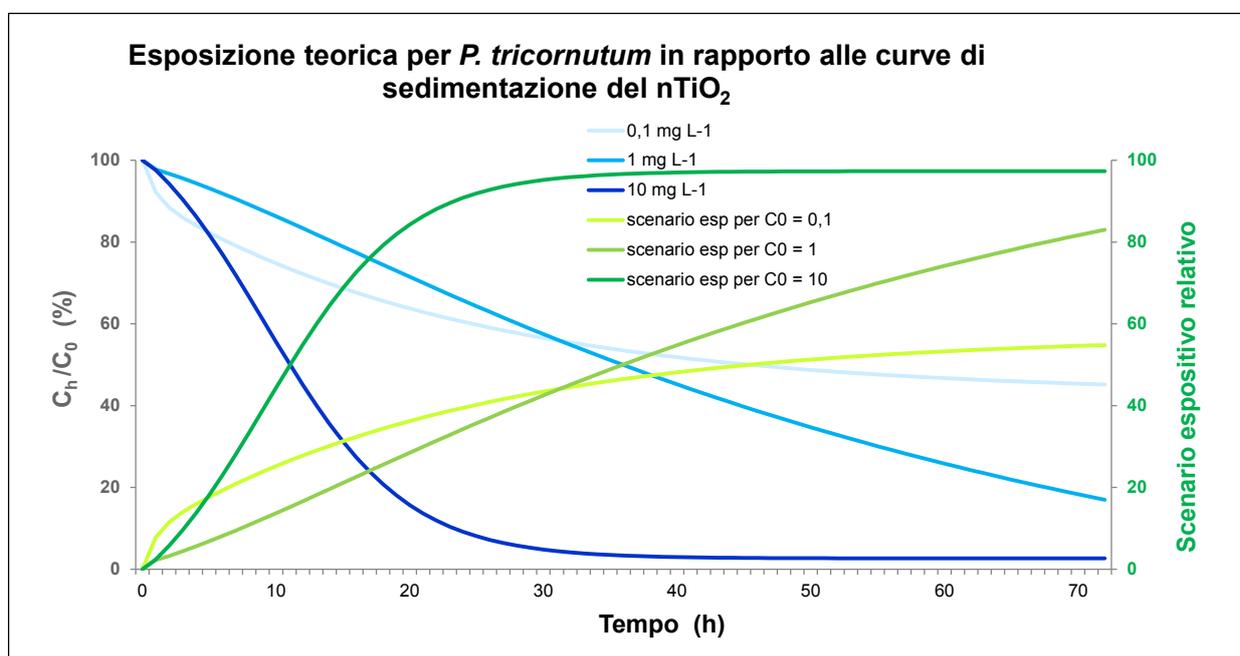


Figura 10.29 – Nel grafico si può osservare l'andamento delle 3 curve di deposizione del nTiO<sub>2</sub> per una concentrazione iniziale, rispettivamente, di 0,1, 1 e 10 mg L<sup>-1</sup>. Nelle ordinate principali si legge il valore del rapporto percentuale della concentrazione di nTiO<sub>2</sub> al tempo  $h$  ( $C_h$ ) rispetto alla concentrazione iniziale ( $C_0$ ). Nelle ordinate secondarie (in verde) si può osservare l'andamento teorico dello scenario espositivo relativo per l'alga *P. tricornutum* nelle 72 h, espresso da punteggio numerico compreso tra 0 (esposizione minima) e 100 (esposizione massima).

Nel caso specifico, il fatto che il nTiO<sub>2</sub> precipiti sul fondo non dovrebbe diminuire la rappresentatività del test, poiché il *P. tricornutum*, utilizzato nei test ecotossicologici è un'alga

bentonica e, di conseguenza, se le ENP si depositano sul fondo dei pozzetti, lo scenario espositivo per tale organismo non dovrebbe cambiare. Il problema semmai, si potrebbe verificare utilizzando delle alghe planctoniche, come ad esempio *Dunaliella tertiolecta*. E' altresì vero, però, che quest'ultima osservazione contrasta con quanto osservato in precedenza (fig. 10.26), a proposito dei test algali in acqua dolce. Le specie utilizzate in letteratura, infatti, erano tutte planctoniche e perciò, secondo il modello di esposizione ricavato dalle leggi del decadimento (fig. 10.29), non avrebbero dovuto manifestare degli effetti di tossicità o, per lo meno, questi avrebbero dovuto essere più contenuti rispetto a quelli registrati per *P. tricornutum*. Invece, i valori di EC50 riportati in figura 10.26 indicano chiaramente la presenza di un effetto tossico del nTiO<sub>2</sub> anche per le alghe planctoniche ed in molti casi addirittura superiore, anche se dello stesso ordine di grandezza, a quello mostrato da *P. tricornutum*. Naturalmente bisogna essere cauti nel confronto di questi casi di studio, tenendo presente la variabilità legata all'utilizzo di specie differenti ed ai mezzi acquosi impiegati (acqua dolce e acqua marina). E' bene ribadire ancora una volta che, secondo la letteratura, l'acqua marina ha una forza ionica maggiore che destabilizza le ENP e le costringe a sedimentare più rapidamente (Monteiro-Riviere and Tran, 2007). Del resto, è altresì vero che lo studio di Dabrunz et al. (2011), riportato al par. 10.1.2, illustrava delle curve di deposizione per il nTiO<sub>2</sub> in acqua dolce, in cui si evidenziava una velocità di sedimentazione del materiale più rapida di quella rilevata per le acque salate in questo lavoro di tesi.

Risulta palese quale sia la difficoltà di comprendere le dinamiche legate ai processi di dispersione e di deposizione delle ENP in acqua, fenomeno che si riflette, ancora una volta, nell'incertezza e nella bassa confrontabilità dei risultati, dovute ad uno scenario espositivo poco chiaro.

#### 10.3.2.1 Variazioni al protocollo: test con l'alginato

La necessità di lavorare con delle ENP omogeneamente disperse nel mezzo, ha portato a prendere in considerazione l'introduzione, nell'acqua marina, di un mezzo disperdente quale l'alginato. Da un punto di vista meramente chimico, le prove effettuate dalla dr.ssa Sarah Callegaro avevano dimostrato l'effettiva efficacia di tale mezzo come agente stabilizzante (Callegaro, comunicazione personale, articolo in preparazione). Difatti, alle concentrazioni di 0,45 mg L<sup>-1</sup>, l'alginato stabilizzava le ENP mantenendole in sospensione omogeneamente e per almeno 50 ore (fig. 10.30). Inoltre, gli agglomerati formati mantenevano un diametro costante di circa 270 nm per tutto il periodo dell'osservazione (Callegaro, comunicazione personale, articolo in preparazione). Infine, un ulteriore vantaggio era costituito dal fatto che, le diverse

dispersioni, una volta preparate, potevano essere risospese, anche a distanza di qualche giorno, mediante semplice agitazione per un minuto, evitando, in questo modo, le operazioni di sonicazione.

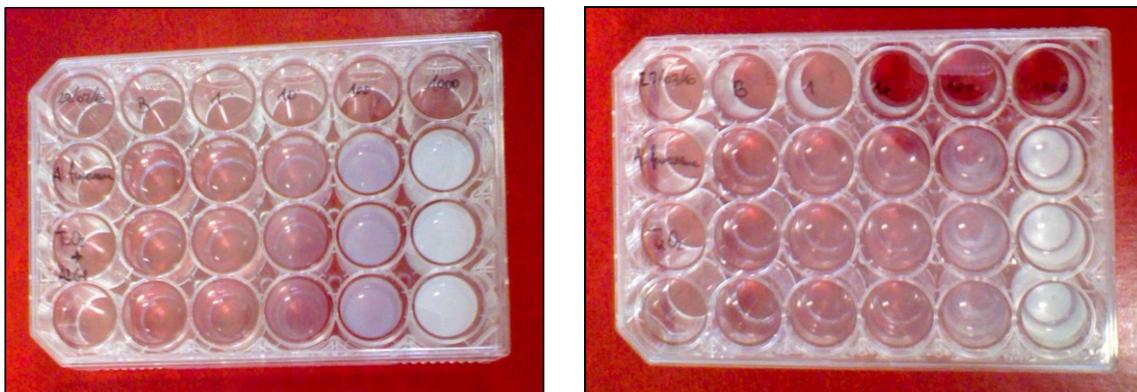


Figura 10.30 – Confronto tra presenza ed assenza di alginato. In ogni piastra, le concentrazioni delle dispersioni di nTiO<sub>2</sub> aumentano progressivamente (0; 1; 10; 100; 1000 mg L<sup>-1</sup>). A 48 h dall'inizio del test, nella piastra di sinistra (con alginato) il nTiO<sub>2</sub> è ancora sospeso, come si vede osservando la maggiore lattescenza dell'acqua; in quella di destra, invece, si può notare come il nTiO<sub>2</sub> sia già abbondantemente precipitato.

In presenza ed assenza di alginato sono state testate le dispersioni di nTiO<sub>2</sub> alle concentrazioni nominali pari a 0; 0,9; 9 e 45 mg L<sup>-1</sup>.

Dai grafici, visibili nelle figure 10.31 e 10.32, si evince come, in presenza di alginato, gli effetti delle ENP siano nulli in entrambi i test (nn. 07 e 08). Nelle piastre di confronto, invece, in cui il test è stato condotto secondo il protocollo (UNI EN ISO, 2006) si sono potuti registrare dei valori di effetto, benchè lievi. Più in particolare, il test n. 07 ha evidenziato effetti di inibizione pari al 10% ed al 21%, rispettivamente, per 9 mg L<sup>-1</sup> ed a 45 mg L<sup>-1</sup>. Per il test n. 08, l'effetto massimo di inibizione (15%) si è potuto osservare a 45 mg L<sup>-1</sup>.

Il test ANOVA eseguito sulle singole concentrazioni ha evidenziato che, nel test n. 07 senza alginato, esiste una variazione statisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) della varianza dei dati (fig. 10.35), a differenza, invece, di quanto avviene nel test 07 in presenza di alginato, dal momento che i dati sono quasi costanti. Per il test n. 08, nel trattamento senza alginato (il solo per cui si possa eseguire l'ANOVA), non si è registrata una variazione statisticamente significativa nella varianza dei dati. Infine, è stato eseguito il test ANOVA fra coppie di test analoghi (07 vs 08; 07 con alginato vs 08 con alginato). Il confronto della varianza dei dati tra i test 07 e 08 ha messo in luce l'esistenza di una differenza statisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) nella varianza dei dati. (fig. 10.36). Tra il test 07 con alginato e 08 con alginato, invece, non vi è alcuna differenza statisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) della varianza.

Per aumentare la significatività del confronto tra i test con e senza alginato sono stati forniti anche i risultati dei controlli positivi ( $K_2Cr_2O_7$ ), riassunti nei grafici in figura 10.33 e 10.34. In questi, appare evidente come gli andamenti degli effetti siano confrontabili.

Il test ANOVA eseguito sulle singole concentrazioni ha evidenziato che, per il tossico di riferimento del test ecotossicologico n. 07 senza alginato, esiste una variazione statisticamente significativa della varianza dei dati ( $p < 0,05$ ) (fig. 10.37), la qual cosa è vera anche nel caso del tossico di riferimento del test n. 07 con l'alginato (fig. 10.39). Anche per il tossico di riferimento del test n.08, in entrambi i casi (con e senza alginato), esiste una variazione statisticamente significativa della varianza dei dati ( $p < 0,05$ ) (figg. 10.38 e 10.39).

Dal confronto della coppia di controlli positivi senza alginato, il test ANOVA ha indicato che esiste una variazione statisticamente significativa fra i dati ( $p < 0,05$ ) (fig. 10.38); lo stesso evento ( $p < 0,05$ ) si verifica nel caso della coppia di controlli positivi con l'alginato (fig. 10.39).

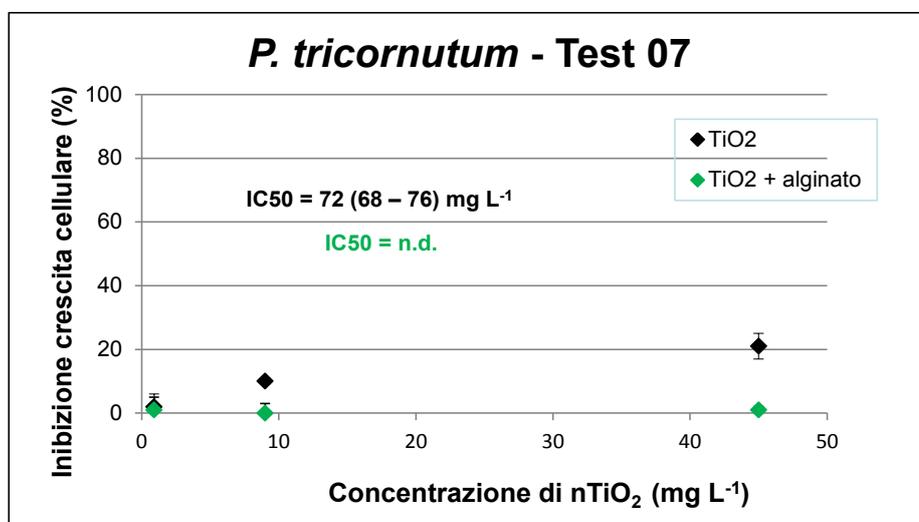


Figura 10.31 – Confronto dei risultati del test di inibizione della crescita cellulare con il nTiO<sub>2</sub> nei confronti di *P. tricornutum* in presenza ed in assenza di alginato. In evidenza i valori di IC<sub>50</sub> (n.d. = non determinabile).

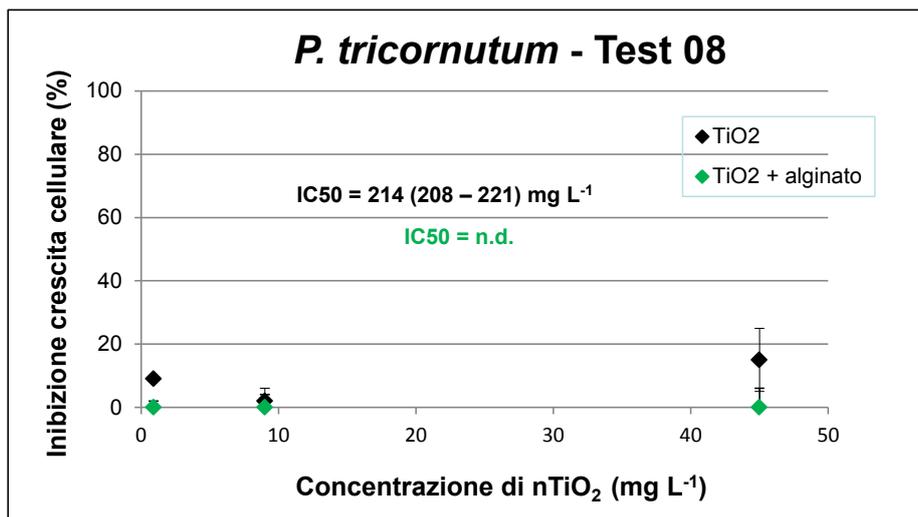


Figura 10.32 - Confronto dei risultati del test di inibizione della crescita cellulare con il nTiO<sub>2</sub> nei confronti di *P. tricornutum* in presenza ed in assenza di alginato. In evidenza i valori di IC<sub>50</sub> (n.d. = non determinabile).

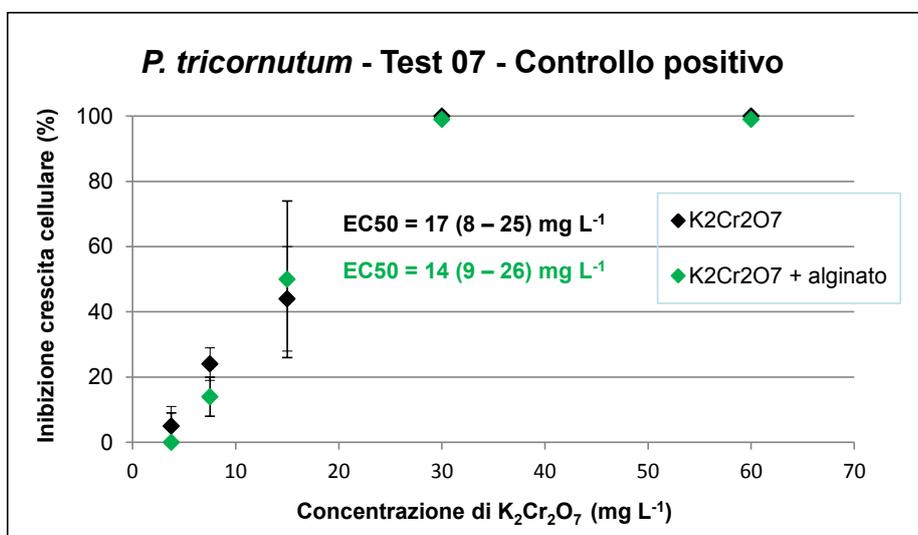


Figura 10.33 - Confronto dei risultati del test di inibizione della crescita cellulare con il K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> nei confronti di *P. tricornutum* in presenza ed in assenza di alginato.

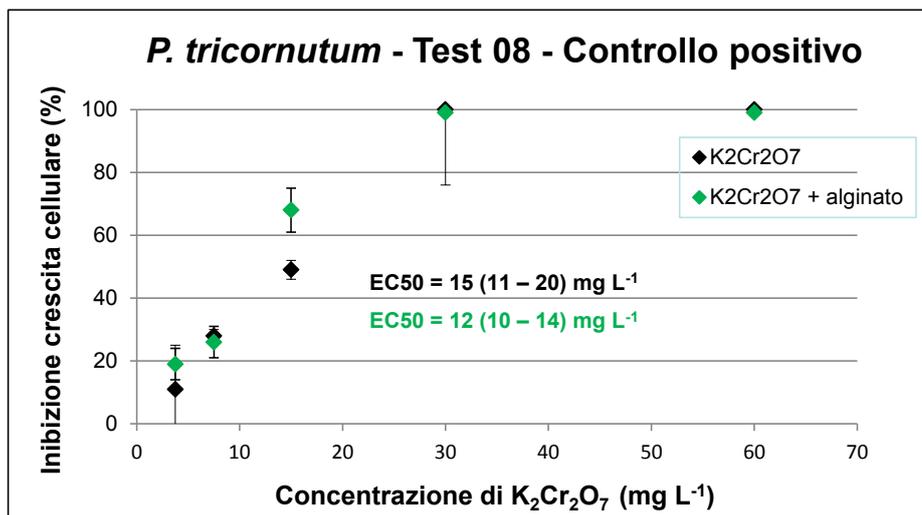


Figura 10.34 - Confronto dei risultati del test di inibizione della crescita cellulare con il  $K_2Cr_2O_7$  nei confronti di *P. tricornutum* in presenza ed in assenza di alginato.

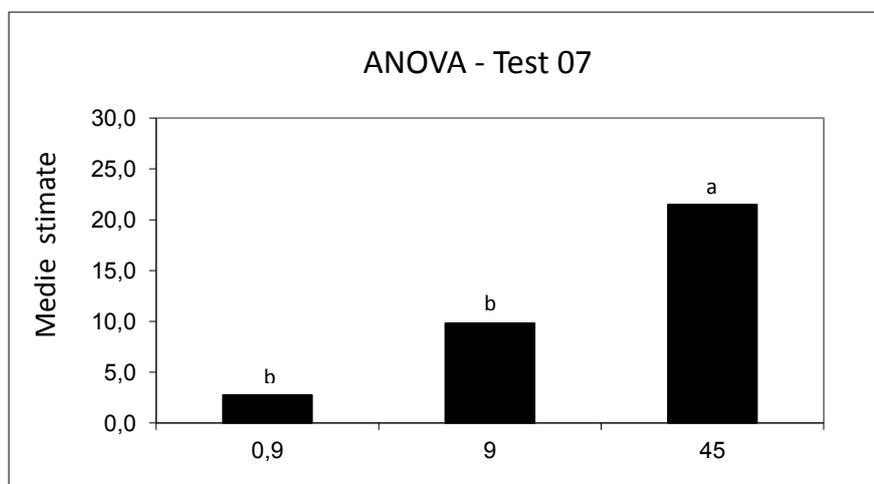


Figura 10.35 – Risultati del test ANOVA per il test di tossicità n. 07.

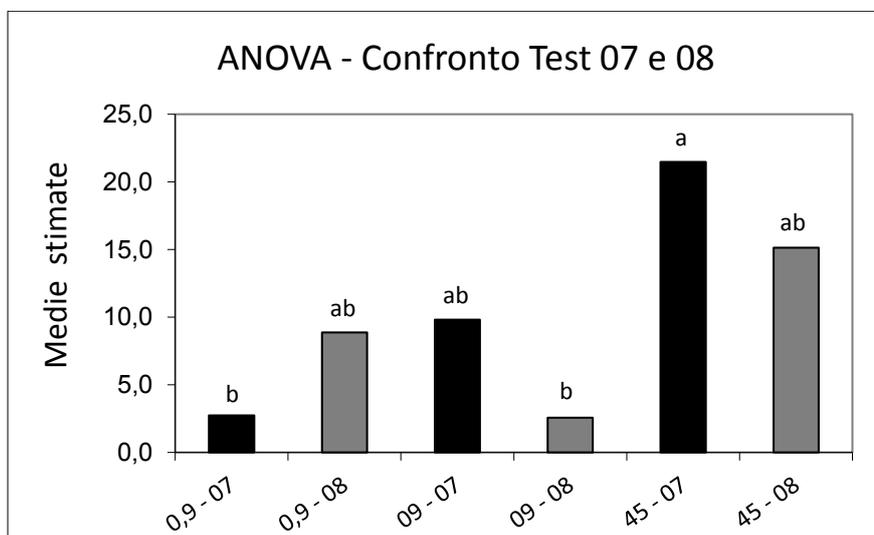


Figura 10.36 – Risultati del test ANOVA per i test ecotossicologici nn. 07 e 08.

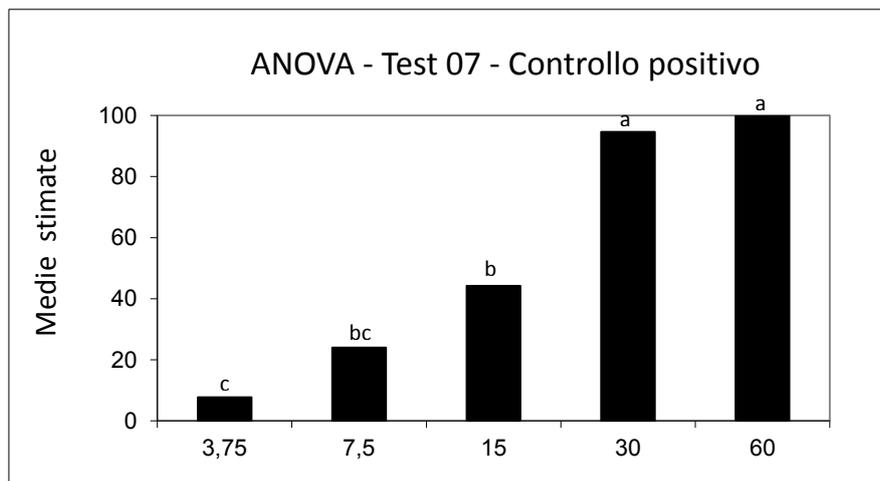


Figura 10.37 – Risultati del test ANOVA per il controllo positivo del test ecotossicologico n. 07.

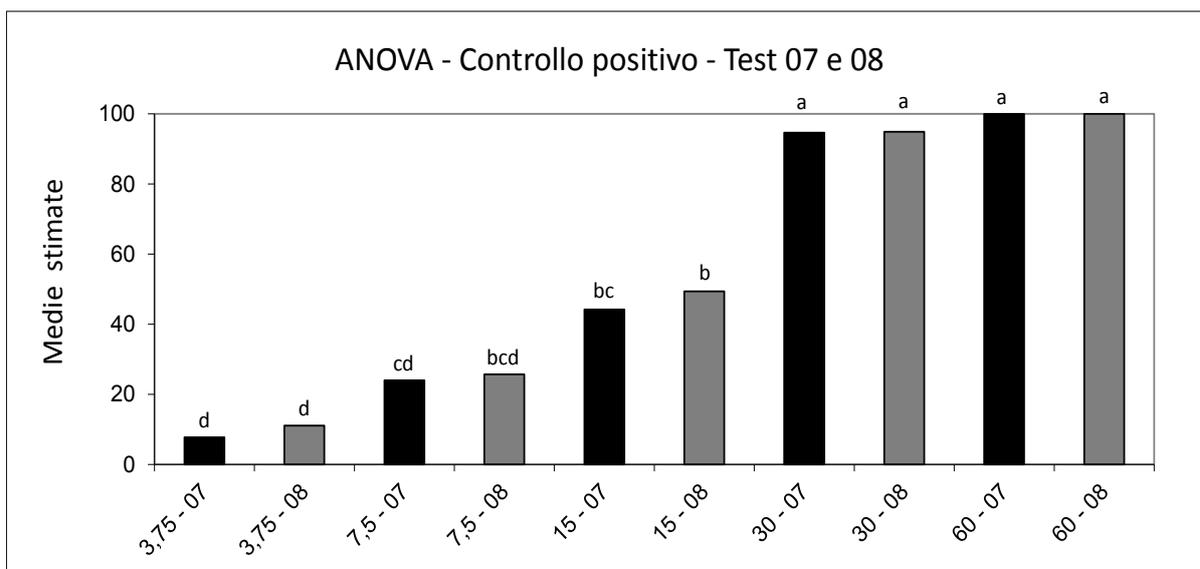


Figura 10.38 – Risultati del test ANOVA per il controllo positivo dei test ecotossicologici nn. 07 e 08.

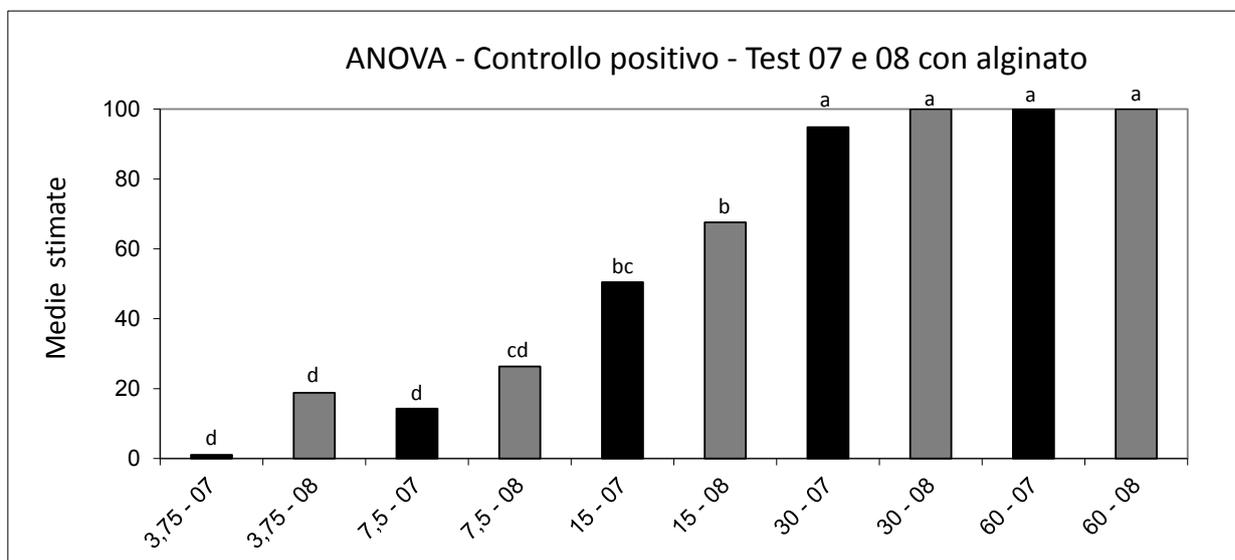


Figura 10.39 – Risultati del test ANOVA per il controllo positivo dei test ecotossicologici nn. 07 e 08 con alginato.

Sembrerebbe, quindi, che la presenza di alginato causi la diminuzione degli effetti del nTiO<sub>2</sub>, probabilmente perché può diminuire l'esposizione degli organismi alle ENP. Infatti, è plausibile supporre che l'alginato possa aver interagito con il nTiO<sub>2</sub> (ad esempio con un processo di chelazione), rallentandone la **sedimentazione** e riducendo lo scenario espositivo rispetto a quello che si prefigurerebbe, invece, durante l'esecuzione di un test tradizionale.

In un'altra ipotesi si potrebbe riconoscere all'alginato la capacità di modificare le proprietà del nTiO<sub>2</sub>, supponendo che questo possa limitare la **bioaccessibilità** e, dunque, anche la relativa reattività delle ENP. Non si esclude, naturalmente, la possibilità che tale risultato possa essere dato dall'azione combinata di entrambi gli eventi.

E' giusto ricordare come l'alginato, essendo ricavato dalla biomassa algale in decomposizione, abbia qualche potenzialità nutriente nei confronti di *P. tricornutum* e questo potrebbe dare vita a possibili falsi negativi. L'ipotesi però, di per sé plausibile, non si giustifica nel momento in cui si confrontano i dati di effetto dei controlli positivi (figg. 10.33 e 10.34). Infatti, gli effetti benefici dell'apporto di nutrimento per le alghe dovrebbero evidenziarsi anche nei test col tossico di riferimento e, di conseguenza, le piastre contenenti il K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> e l'alginato, dovrebbero mostrare effetti di tossicità più contenuti rispetto alle piastre con il solo K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>. Le evidenze ricavate, invece, mostrano chiaramente che non c'è differenza nei risultati di effetto per le differenti piastre dei controlli positivi, con e senza alginato.

In sintesi, in riferimento all'esperienza condotta sull'utilizzo di alginato come stabilizzante per le ENP, si è portati ad escludere l'impiego di tale sostanza per la sperimentazione futura, quantomeno con l'alga *P. tricornutum*. L'alginato, infatti, si è rivelato efficace nel suo ruolo chimico di stabilizzante ma il suo impiego nei test ecotossicologici sembrerebbe aggiungere degli ulteriori fattori di confusione ad una situazione sperimentale già complessa di per sé. Innanzitutto, la concentrazione finale del prodotto (0,45 mg L<sup>-1</sup>), necessaria al mantenimento delle ENP in sospensione, risulta essere poco rappresentativa di un reale scenario ambientale. A questo, vanno aggiunte le perplessità sollevate pocanzi, ovvero il rischio di incorrere in falsi negativi, causati dall'effetto combinato di uno scenario espositivo ridotto (per un'alga bentonica) e di una probabile azione nutriente, nei confronti degli organismi, da parte dell'alginato.

Nel corso di questo lavoro si è potuto osservare come diversi autori, per misurare gli effetti di alcune ENP, stressino il sistema agendo su determinate condizioni. E' il caso, ad esempio, di Hund-Rinke and Simon (2006), oppure di Heinlaan et al (2008), che nei loro test ecotossicologici con il nTiO<sub>2</sub> ricorrono ai raggi UV per magnificare gli effetti del nTiO<sub>2</sub>. Queste metodologie si discostano dal nostro modo di operare poiché, a nostro avviso, agendo in questa

maniera si può diminuire la rappresentatività ambientale e si rischia di aumentare lo stress degli organismi esposti.

Un'ultima osservazione di carattere generale. Osservando le foto in figura 10.30, raffiguranti le piastre contenenti il nTiO<sub>2</sub>, si potrebbe ipotizzare che la presenza stessa del ENM sia, di per sé, un fattore di disturbo perché, aumentando la **torbidità** del mezzo, può **diminuire la capacità fotosintetica** delle alghe. Questo potrebbe portare a dei falsi positivi. La ricerca bibliografica in proposito ha fatto emergere due casi di studio. Nel primo (Hund-Rinke and Simon, 2006) gli autori hanno valutato il cosiddetto “**shading effect**”, mediante l’allestimento di un test a “sandwich”, come illustrato in figura 10.40. La specie investigata era il *Desmodesmus subspicatus*.

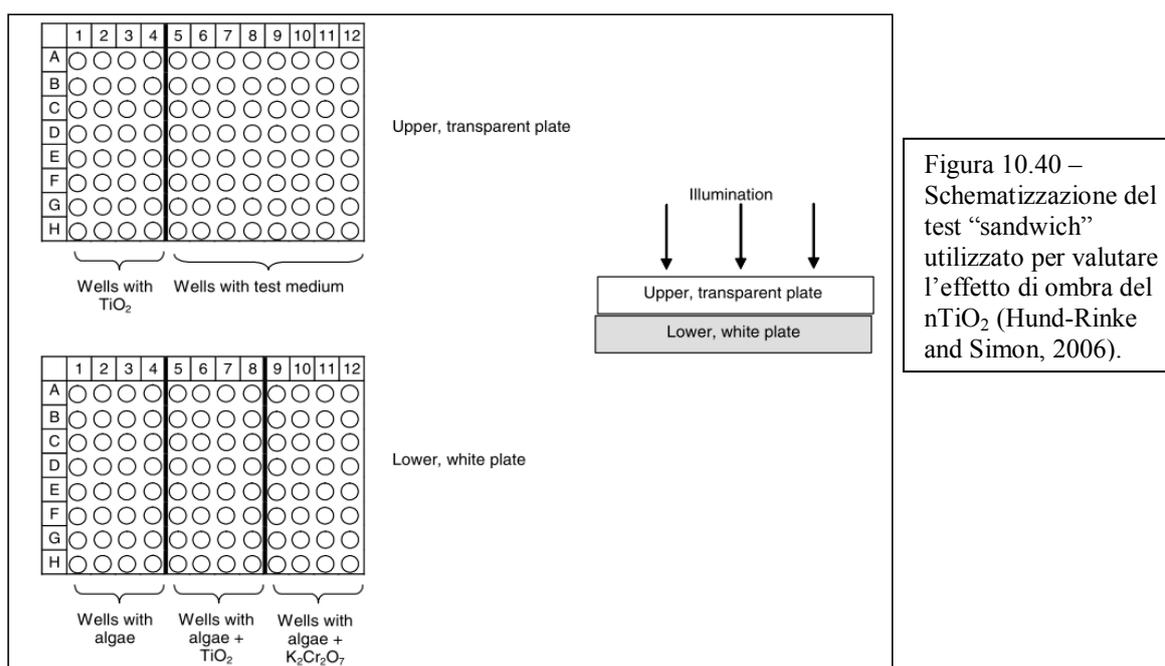


Figura 10.40 – Schematizzazione del test “sandwich” utilizzato per valutare l’effetto di ombra del nTiO<sub>2</sub> (Hund-Rinke and Simon, 2006).

I risultati hanno dimostrato che gli effetti di schermatura della luce, causati dalla presenza delle ENP non ha causato la diminuzione della crescita algale, visto che, indipendentemente dalle concentrazioni di nTiO<sub>2</sub> utilizzate (0 – 50 mg L<sup>-1</sup>), la crescita rilevata era sempre confrontabile con il controllo.

Nel secondo (Aruoja et al, 2009), la specie utilizzata era l’alga *Pseudokirchneriella subcapitata* e lo shading effect è stato valutato mediante l’allestimento di un test come in figura 10.41.

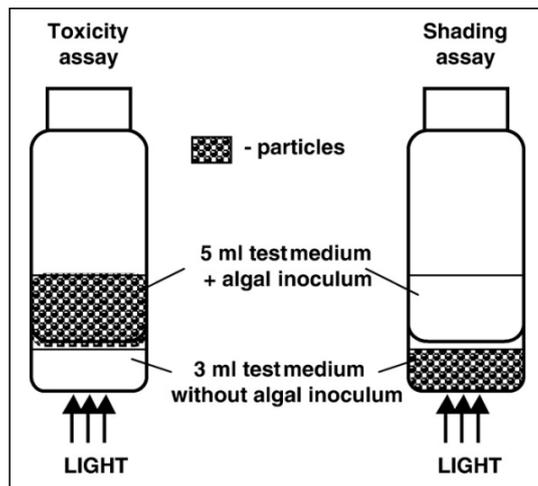


Figura 10.41 – Schematizzazione del test utilizzato per valutare l'effetto di ombra del nTiO<sub>2</sub> (Aruoja et al, 2009).

Anche in questo caso è risultato che la presenza delle ENP non causa un effetto schermante tale da inibire la crescita algale.

### 10.3.3 Altre evidenze sperimentali

Fin dai primi esperimenti, con l'ausilio delle osservazioni microscopiche, si è notata la formazione crescente di ammassi cellulari all'aumentare della concentrazione di nTiO<sub>2</sub> (figg. 10.42 a) e b)). Al crescere della quantità di ENP non solo aumenta il numero di queste formazioni ma anche il numero di organismi che le compongono.

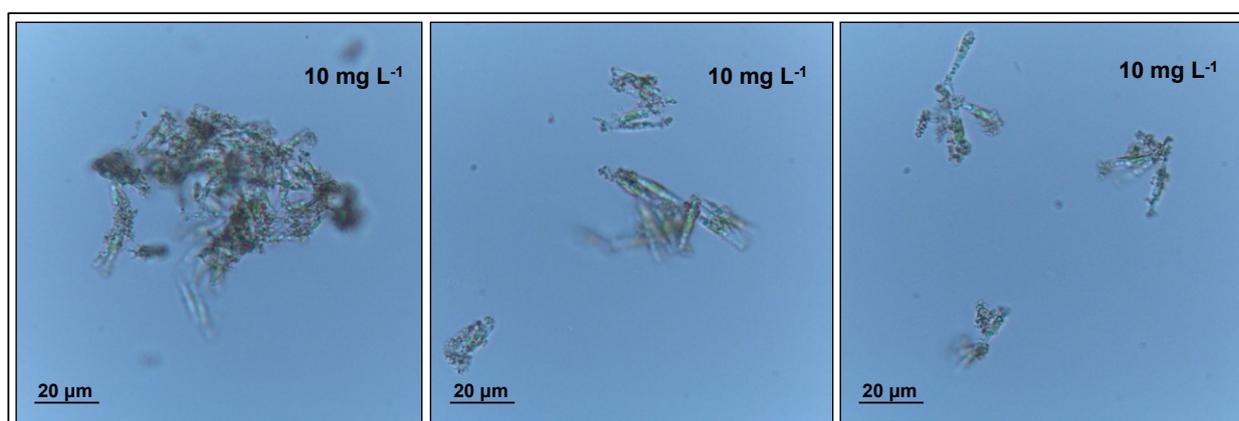


Figura 10.42 a) e b) – Formazioni di ammassi di cellule di *P. tricornutum*. All'aumentare della concentrazione di  $n\text{TiO}_2$ , da 1 a  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , crescono il numero degli ammassi ed anche il numero di cellule che li compongono.

Alla luce delle osservazioni condotte, è possibile supporre che il  $n\text{TiO}_2$  possa esercitare una qualche interferenza nel processo di separazione delle cellule durante la fase di riproduzione per

scissione. A questo proposito si vuol citare un articolo di Perreault et al (2010) in cui agli autori, dopo aver esposto una coltura cellulare di *C. reinhardtii* alle NP di oro, è capitato di rilevare la presenza di cellule dimensionalmente maggiori di altre. L'analisi più approfondita di questi elementi ha messo in luce la formazione di agglomerati, composti da più cellule figlie, intrappolate all'interno della parete cellulare della cellula madre. Il meccanismo, ipotizzato da parte degli autori, sembra essere quello di una probabile interferenza del nAu sul meccanismo di separazione della parete cellulare originaria che, quindi, non sarebbe più in grado di scindersi, liberando le cellule neonate.

Anche Fouqueray et al (2011) hanno osservato che l'alga *P. subcapitata*, esposta a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  di nTiO<sub>2</sub>, mostrava la tendenza a formare agglomerati, misti di alghe e ENP. Le ENP in questione erano T-Lite™ ed in acqua formavano agglomerati di dimensioni comprese tra 300 nm e 20 μm.

#### 10.3.4 Riepilogo dei risultati conseguiti con *P. tricornutum*

La sperimentazione con l'alga bruna *P. tricornutum* ha prodotto risultati fra loro ampiamente variabili. I test preliminari, infatti, hanno fornito un valore medio di IC50 =  $24 \text{ mg L}^{-1}$ , in linea con quanto riscontrato in letteratura (Sadiq et al, 2011; Werheit et al, 2007). L'analisi globale di tutti i punti sperimentali, invece, indicava valori di effetto nettamente inferiori (effetto massimo = 28% a  $36 \text{ mg L}^{-1}$ ) per i quali non è stato possibile calcolare un'IC50 complessiva. Si presume che, data l'uniformità delle condizioni operative, gli elementi responsabili di tale variabilità possano essere le dispersioni di nTiO<sub>2</sub>, per le quali, il diverso stato di agglomerazione all'interno di un mezzo acquoso può portare a scenari espositivi effettivi altrettanto variabili.

L'utilizzo di alginato, come mezzo disperdente le ENP in acqua marina, ha evidenziato una riduzione negli effetti del nTiO<sub>2</sub>, rispetto agli stessi trattamenti in assenza di alginato. Si suppone che questa sostanza rallenti la **sedimentazione** delle ENP, riducendo lo scenario espositivo rispetto al controllo, oppure che possa limitarne la **bioaccessibilità** e, dunque, anche la relativa reattività. Si ritiene tuttavia che l'alginato, essendo ricavato dalla biomassa algale in decomposizione, abbia qualche potenzialità nutriente nei confronti di *P. tricornutum* e questo potrebbe dare vita a possibili falsi negativi. Inoltre, la concentrazione finale del prodotto ( $0,45 \text{ mg L}^{-1}$ ), necessaria al mantenimento delle ENP in sospensione, risulta essere poco rappresentativa di un reale scenario ambientale. Per tali motivi si è ritenuto di non procedere con il suo utilizzo per questa linea di ricerca. Infine, con *P. tricornutum* si sono potuti osservare anche degli effetti subletali e cioè la formazione di agglomerati cellulari che, all'aumentare della concentrazione di nTiO<sub>2</sub>, crescono sia nella frequenza, sia nel numero di cellule che li compongono. Si ipotizza che le ENP possano esercitare una qualche interferenza nel processo di

separazione delle cellule durante la fase di riproduzione per scissione. Un fenomeno analogo è stato osservato anche da Perreault et al (2010) e da Fouqueray et al (2011).

## 10.4 Test con i molluschi bivalvi *Mytilus galloprovincialis* e *Crassostrea gigas*

### 10.4.1 Carte di controllo

Al fine di garantire un livello accettabile di qualità dei dati ecotossicologici prodotti, ciascun test di controllo, effettuato con il tossico di riferimento, è stato confrontato con la **carta di controllo** del Gruppo di Ricerca del laboratorio di Ecotossicologia (fig. 10.43). Questa raccoglie l'informazione complessiva di tutti i test di controllo eseguiti nell'ambito del laboratorio nel corso degli anni e pertanto attesta la riproducibilità del test. I valori di EC50, riferiti all'embriotossicità con i bivalvi, sono stati calcolati con il metodo non parametrico Trimmed Spearman-Kärber (TSK).

#### 10.4.1.1 Carta di controllo per *C. gigas*

Come si può constatare la media del valore di EC50 rispetto al  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  è risultata pari a 12,94 (12,04 – 13,90)  $\mu\text{g L}^{-1}$ , con un coefficiente di variazione ( $[\text{SD} / \text{media}] \cdot 100$ )  $\text{CV} = 20\%$ , per  $n = 13$ . I limiti di validità inferiore e superiore ( $\text{EC}_{50} \text{ medio} \pm 2 \cdot \text{SD}$ ) sono, rispettivamente, pari a 7,88 e 17,99  $\text{mg L}^{-1}$ . In particolare, il valore di EC50 per il controllo positivo del test effettuato durante la tesi (in nero nel grafico) è risultato pari a 10,44 (9,50 – 11,47)  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

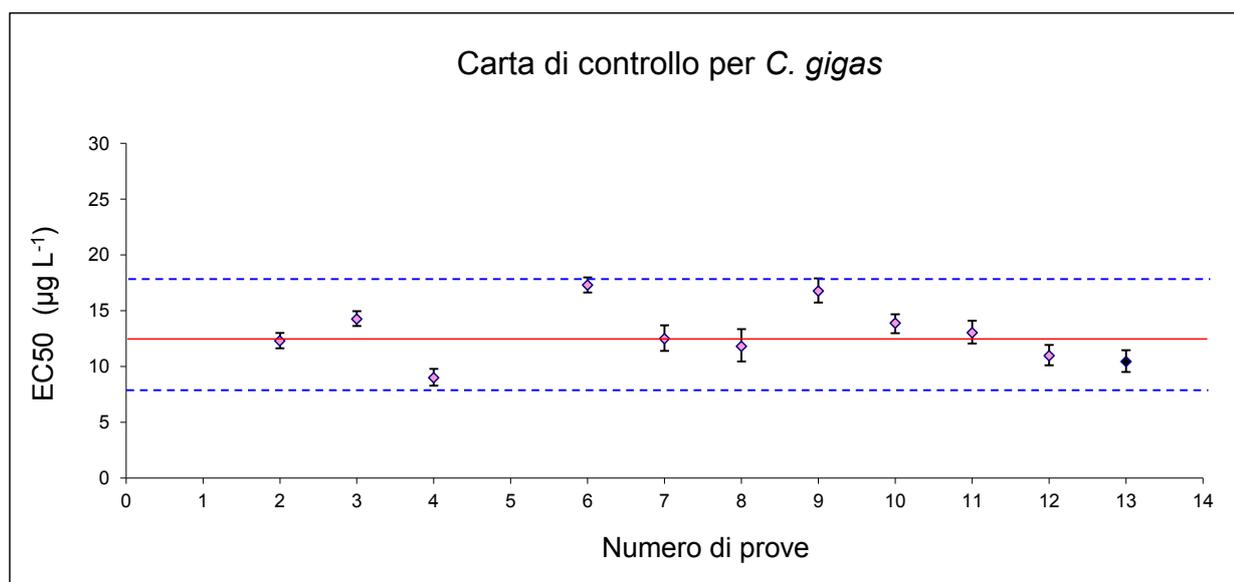


Figura 10.43 – Carta di controllo per il test di inibizione della crescita cellulare con *C. gigas*. In nero il controllo positivo del test effettuato per questo lavoro di tesi.

#### 10.4.1.2 Carta di controllo per *M. galloprovincialis*

Come si può constatare (fig. 10.44) la media del valore di EC50 rispetto al  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  è risultata pari a 15,12 (14,13 – 16,19)  $\text{mg L}^{-1}$ , con un coefficiente di variazione ( $[\text{SD} /$

media]·100) CV = 19%, per n = 12. I limiti di validità inferiore e superiore (EC50 medio ± 2·SD) sono, rispettivamente, pari a 9,37 e 20,88 mg L<sup>-1</sup>. In particolare, per questo test, il valore di EC50 (in nero nel grafico) è risultato pari a 11,39 (10,61 – 12,21) µg L<sup>-1</sup>.

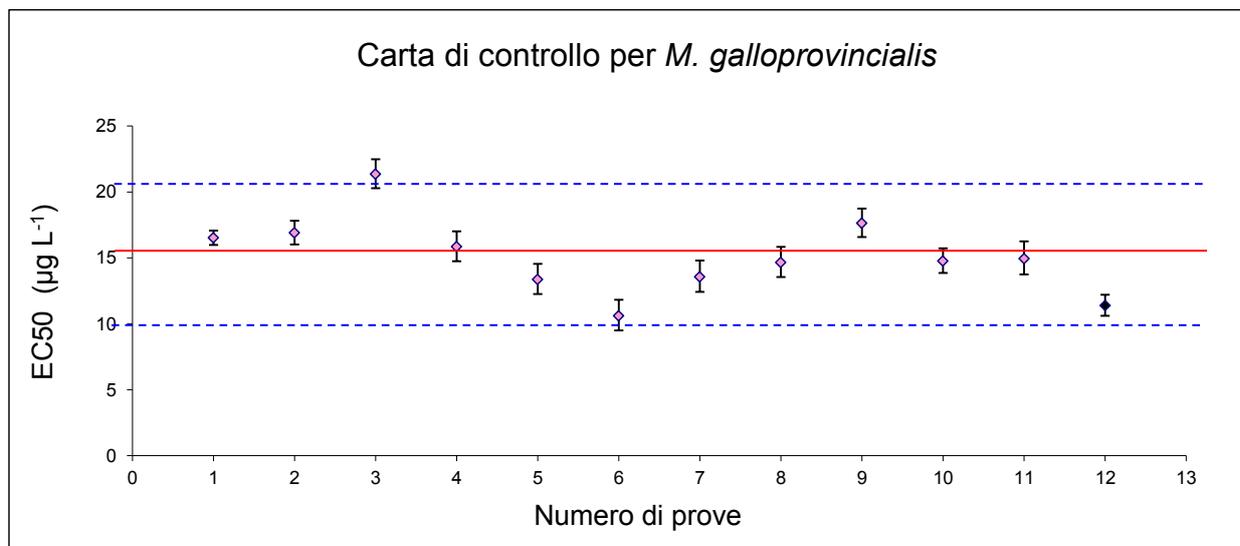


Figura 10.44 – Carta di controllo per il test di embriotossicità con *M. galloprovincialis*. In nero il controllo positivo del test effettuato per questo lavoro di tesi.

#### 10.4.2 Evidenze sperimentali per *C. gigas*

Il test di embriotossicità, condotto con l’ostrica *C. gigas*, aveva come obiettivo quello di testare gli eventuali effetti tossici del nTiO<sub>2</sub> alle concentrazioni nominali di 0; 1; 10 e 100 mg L<sup>-1</sup>.

I risultati del test, riportati in figura 10.45, hanno evidenziato la presenza di un effetto rilevante (82%) alla concentrazione più bassa, pari a 1 mg L<sup>-1</sup> di nTiO<sub>2</sub>, mentre, per valori 10 e 100 volte superiori, l’effetto di tossicità è risultato essere estremamente contenuto.

L’analisi statistica ha evidenziato che esiste una differenza statisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) nella varianza dei dati, che sono distribuiti in due gruppi differenti (fig. 10.46).

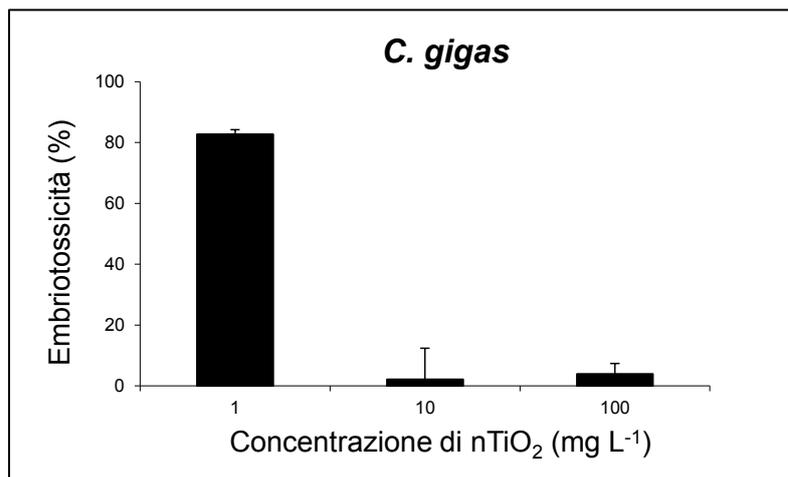


Figura 10.45 - Risultati del test di embriotossicità con il nTiO<sub>2</sub> nei confronti di *C. gigas*.

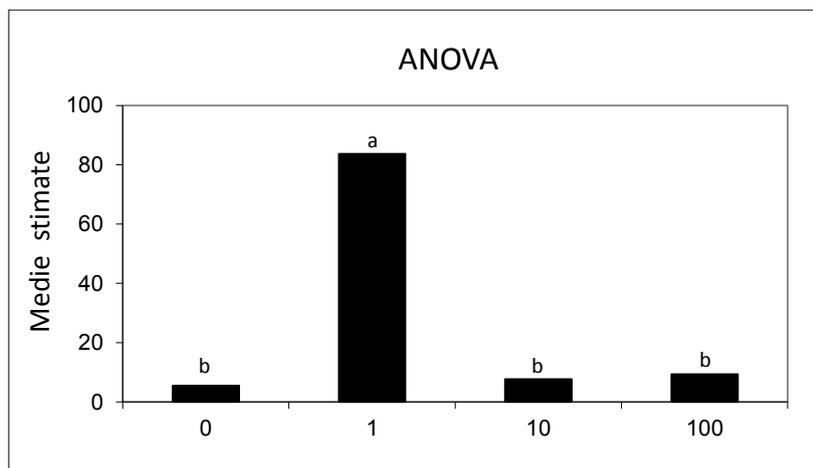


Figura 10.46 - Risultati del test ANOVA per il test ecotossicologico con *C. gigas*. Il valore 0 corrisponde al controllo negativo

Nel tentativo di interpretare questi risultati, si vogliono richiamare le curve di deposizione e le relative equazioni matematiche che ne descrivono l'andamento, di cui si è già fatto utilizzo nel precedente paragrafo dedicato ai risultati ottenuti con *P. tricornutum* (cfr. par. 10.3.2.). Con tali curve si è calcolato quello che potrebbe essere lo scenario espositivo effettivo per gli embrioni di *C. gigas*. Il calcolo è stato effettuato per le concentrazioni pari a 1 e 10 mg L<sup>-1</sup>. Non si è in possesso della curva di deposizione per la concentrazione pari a 100 mg L<sup>-1</sup> ma, è ragionevole supporre, che l'andamento della precipitazione delle ENP, per una concentrazione iniziale così elevata, sia più rapido di quello della curva dei 10 mg L<sup>-1</sup>.

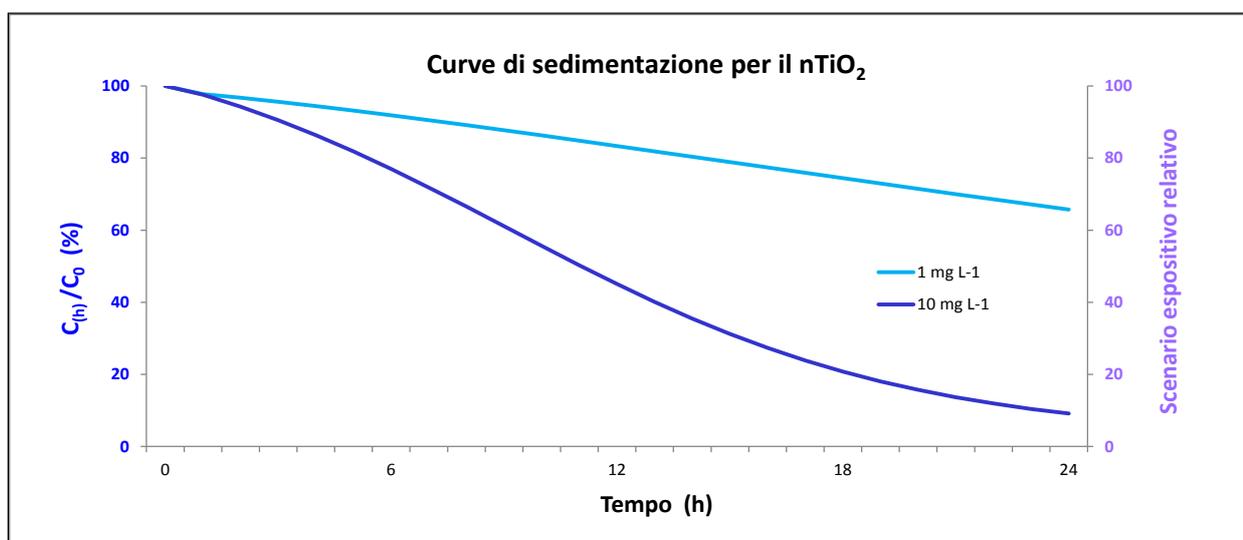


Figura 10.47 – Nel grafico si può osservare l'andamento delle 2 curve di deposizione del nTiO<sub>2</sub> per una concentrazione iniziale, rispettivamente, di 1 e 10 mg L<sup>-1</sup>. Nelle ordinate principali (in blu) si legge il valore del rapporto percentuale della concentrazione di nTiO<sub>2</sub> al tempo h (C<sub>t</sub>) rispetto alla concentrazione iniziale (C<sub>0</sub>). Nelle ordinate secondarie (in viola) si può osservare l'andamento teorico dello scenario espositivo relativo per gli embrioni di *C. gigas* nelle 24 h successive

all'inoculo, espresso da punteggio numerico compreso tra 0 (esposizione minima) e 100 (esposizione massima).

Innanzitutto, si vuol far notare che le curve di deposizione, a differenza di quanto osservato per *P. tricornutum*, coincidono con le curve dello scenario espositivo calcolato e questo perché le larve di *C. gigas* non sono bentoniche ma planctoniche e possono spostarsi liberamente nella colonna d'acqua.

Secondo quanto riportato dal modello, se inizialmente si sono introdotte delle dispersioni a concentrazione pari a 1 e 10 mg L<sup>-1</sup>, trascorse 24 h dall'inoculo, tali concentrazioni, a causa della deposizione, dovrebbero essersi ridotte, rispettivamente, del 34% e del 91%. Naturalmente, se si ragiona in senso assoluto e si confrontano i valori della **massa** delle ENP, ancora presenti nella colonna d'acqua dopo 24 h, si evince che, delle concentrazioni originarie pari a 1 e 10 mg L<sup>-1</sup>, potrebbero essere rimasti, rispettivamente, 0,66 e 0,9 mg L<sup>-1</sup>. L'esigua differenza esistente tra le due concentrazioni da sola non sembra sufficiente a giustificare gli effetti rilevati a 1 e a 10 mg L<sup>-1</sup>. Probabilmente in questo caso, una chiave di lettura più corretta rispetto all'aspetto quantitativo potrebbe essere rappresentata dalle **dimensioni** delle ENP, presumendo che la differenza nell'effetto possa essere stata in parte causata da una variazione nello stato di agglomerazione e, quindi, dimensionale delle ENP. A supporto di questa considerazione, si richiama quanto approfondito al precedente paragrafo 5.1.2, a proposito del paradosso della massa, e cioè che il concetto tradizionale di **dose** non sembrerebbe essere l'unità di misura più indicata per descrivere il reale scenario espositivo degli organismi esposti alle ENP. Tale ruolo, secondo Savolainen et al (2010), spetterebbe invece alla proprietà fisica dell'area superficiale. Esempio, a questo proposito, è il caso di studio di Oberdörster et al (2005), in cui gli autori, testando il potere infiammatorio del nTiO<sub>2</sub> a 20 nm e 250 nm su polmoni di ratto, hanno presentato i risultati della propria ricerca, prima, in funzione della massa e, poi, dell'area superficiale. Nel secondo caso, l'interpretazione dei risultati appariva più immediata, come si può osservare in figura 10.48.

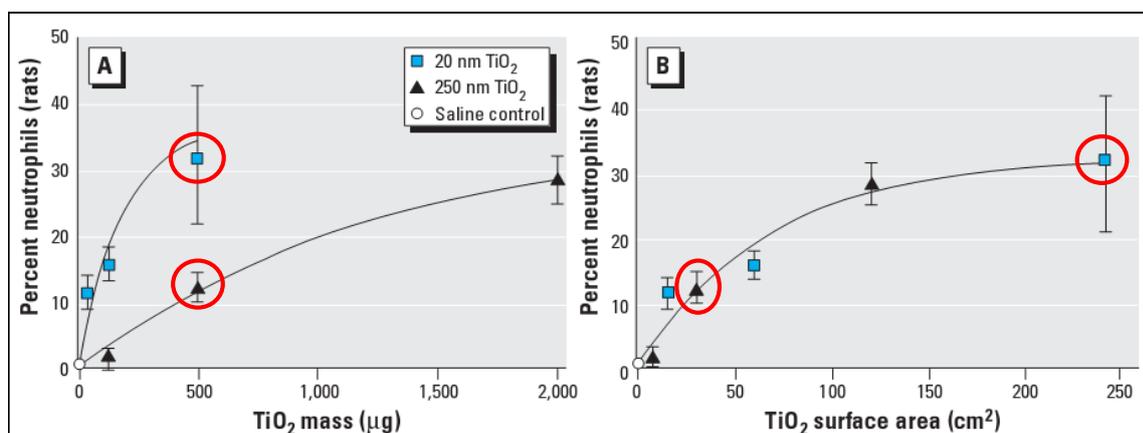


Figura 10.48 – Percentuale di neutrofili nelle cellule polmonari di ratto; confronto degli effetti sia rispetto alla massa ( $\mu\text{g}$ ), sia rispetto all'area superficiale ( $\text{cm}^2$ ) (Oberdörster et al, 2005).

Quindi, tornando ai risultati di questo lavoro di tesi, si potrebbe ipotizzare che, quanto verificato, sia riconducibile ad una diversa bioaccessibilità del nTiO<sub>2</sub>, legata alle dimensioni delle ENP piuttosto che alle sue quantità effettive. Infatti, si è ribadito più volte (parr. 5.1.2 e 10.1.2) che, a concentrazioni minori, il nTiO<sub>2</sub> forma aggregati di minor dimensione e questo, a sua volta, incide su due aspetti:

- 1) gli aggregati possono essere soggetti più facilmente ad uptake; in questa fase del loro ciclo vitale, infatti, le larve hanno dimensioni all'incirca pari a 75-100  $\mu\text{m}$  e, benché ancora non si nutrano, processi di assorbimento possono aver luogo a livello delle membrane respiratorie e/o per contatto diretto dell'organismo nella sua interezza con la sospensione di NP;
- 2) gli aggregati di minor dimensione hanno tempi di residenza maggiori all'interno della colonna d'acqua, poiché sedimentano più lentamente rispetto a quelli di dimensioni superiori. Probabilmente i tempi di esposizione alle ENP sono più lunghi, dato che la larva in poco tempo si rende mobile all'interno della colonna d'acqua a disposizione.

Attualmente, non esistono lavori di letteratura specifici sugli effetti del nTiO<sub>2</sub> nei confronti di ostriche, tuttavia ne esistono alcuni su altri molluschi bivalvi. Più in particolare sono stati prodotti dei lavori su mitili e su abaloni. Nei risultati di questi lavori, riportati nel successivo paragrafo 10.4.3, sono individuabili delle analogie con quanto è emerso dall'attività sperimentale con i mitili effettuata per questo lavoro di tesi.

#### 10.4.3 Evidenze sperimentali per *Mytilus galloprovincialis*

Il test di embriotossicità, condotto con *M. galloprovincialis*, aveva come obiettivo quello di testare gli eventuali effetti tossici del nTiO<sub>2</sub> alle concentrazioni nominali di 0; 0,5; 1; 4; 8; 16; 32 e 64 mg L<sup>-1</sup>. Le informazioni relative sono state riassunte nel grafico 10.49. A beneficio di una migliore interpretazione, i dati sono stati forniti come frequenze di effetto contro il logaritmo delle concentrazioni di nTiO<sub>2</sub>. La risposta al nTiO<sub>2</sub> è massima a 4 mg L<sup>-1</sup> e 8 mg L<sup>-1</sup>, in diminuzione per concentrazioni minori e maggiori, rispettivamente. I valori di EC50 sono stati ricavati come soluzioni dell'equazione di secondo grado del paraboloide e sono pari, rispettivamente, a 1,23 (0 – 4,15) mg L<sup>-1</sup> e 38,56 (35,64 – 41,47) mg L<sup>-1</sup>. Gli intervalli fiduciali sono stati calcolati in questa maniera: (valore di EC50) ± 2·(dev.st.).

L'analisi statistica ha evidenziato che esiste una differenza statisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) nella varianza dei dati, che sono distribuiti in 6 gruppi differenti (fig. 10.50).

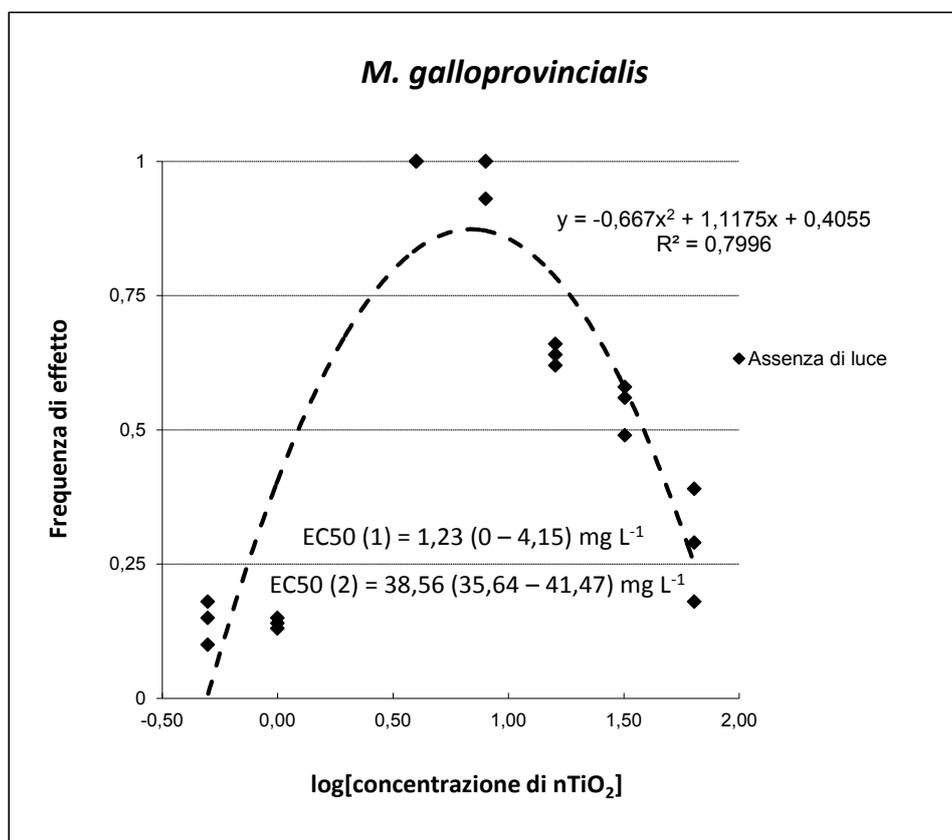


Figura 10.49 - Risultati del test di embriotossicità con il nTiO<sub>2</sub> nei confronti di *M. galloprovincialis*. In evidenza i valori di EC50 calcolati come soluzioni dell'equazione di II grado del paraboloide.

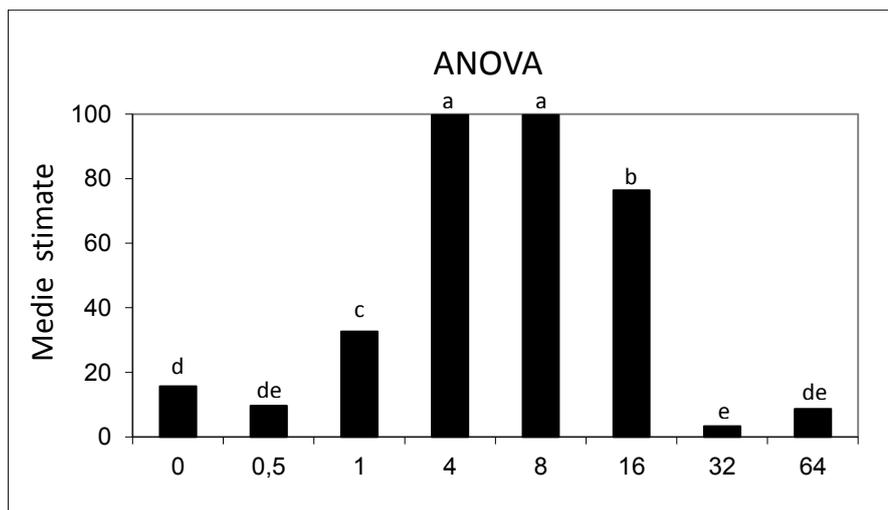


Figura 10.50 – Risultati del test ANOVA per il test ecotossicologico con *M. galloprovincialis*.

Come per *C. gigas*, gli effetti di embriotossicità rilevati con *M. galloprovincialis* non sembrano essere correlati alla concentrazione e, forse, anche in questo caso tale parametro potrebbe non dimostrarsi il più adeguato per descrivere il reale scenario espositivo.

A tal proposito, si sono volute nuovamente utilizzare le curve di deposizione, questa volta però, considerando le concentrazioni in senso assoluto e non il loro decremento percentuale rispetto al tempo trascorso. Poiché non si disponeva delle curve specifiche di deposizione per ognuna delle concentrazioni impiegate nel test, si è utilizzata la seguente semplificazione:

- l'andamento della curva di deposizione della dispersione a concentrazione 0,5 mg L<sup>-1</sup> è stato calcolato col modello realizzato per la curva a 0,1 mg L<sup>-1</sup>;
- gli andamenti delle curve di deposizione delle dispersioni a concentrazione 1 e 4 mg L<sup>-1</sup> sono stati calcolati col modello realizzato per la curva a 1 mg L<sup>-1</sup>;
- gli andamenti delle curve di deposizione delle dispersioni a concentrazione 8, 16, 32 e 64 mg L<sup>-1</sup> sono stati calcolati col modello realizzato per la curva a 10 mg L<sup>-1</sup>.

Il risultato dell'applicazione dei modelli di deposizione è visibile in figura 10.51.

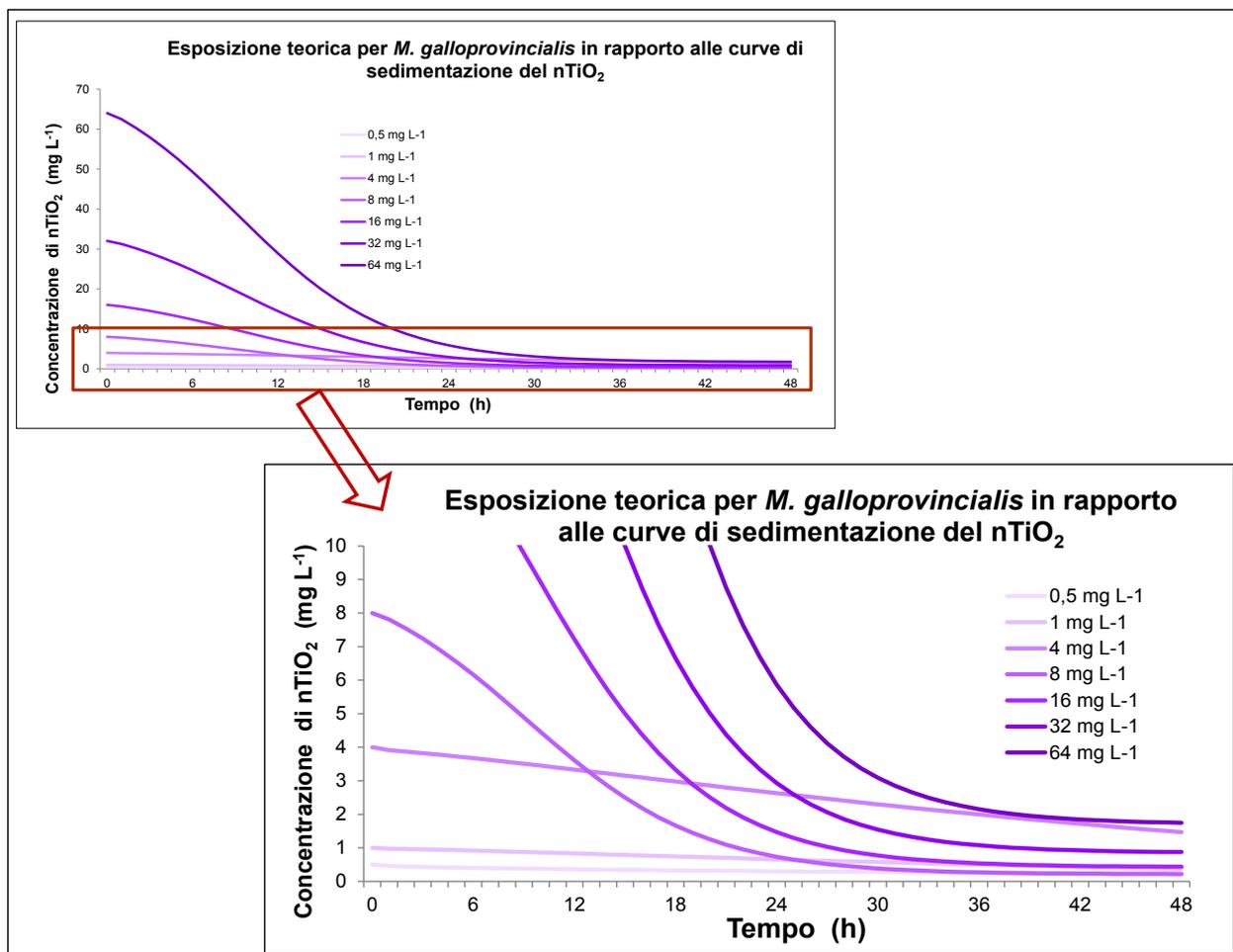


Figura 10.51 – Nel grafico sono riportate le curve di deposizione, in funzione del tempo, calcolate per diverse concentrazioni iniziali di ENP. Si noti come la curva dei 4 mg L<sup>-1</sup> sovrasti le curve degli 8, 16 e 32 mg L<sup>-1</sup>, dopo un tempo di esposizione rispettivamente di circa 14, 20 e 25 h.

Come si può notare, la curva di deposizione corrispondente alla concentrazione nominale di 4 mg L<sup>-1</sup>, trascorse circa 13 h, si trova al di sopra della curva corrispondente a 8 mg L<sup>-1</sup> e, dopo circa 20 h e 26 h, rispettivamente, è al di sopra anche delle curve di deposizione corrispondenti a 16 e 32 mg L<sup>-1</sup>. Questo fenomeno, potrebbe avvalorare, ancora una volta, l'ipotesi di uno scenario espositivo effettivamente superiore nel caso di concentrazioni minori di ENP, fenomeno che giustificherebbe il maggior effetto osservabile in corrispondenza di una concentrazione pari a 4 mg L<sup>-1</sup>.

Come si è avuto modo di apprendere al paragrafo 6.2.6, ad oggi, in letteratura esistono quattro lavori incentrati sull'effetto del nTiO<sub>2</sub> nei confronti dei molluschi, due dei quali proprio su *M. galloprovincialis* (individui adulti). Non sono disponibili a tutt'oggi dati relativi ad embrioni di bivalvi. Canesi et al (2009) hanno studiato le conseguenze dell'esposizione degli emociti di individui adulti di *M. galloprovincialis* (studio *in vitro*) al nTiO<sub>2</sub> P25 Degussa-Evonik (purezza dichiarata > 99,5%), per concentrazioni da 1,5 a 10 mg L<sup>-1</sup>. E' emerso che la stabilità della

membrana lisosomiale (LMS) non è stata compromessa ma c'è stato un rilascio di enzimi lisosomiali in risposta allo stress; inoltre, si è osservata la produzione di ossiradicali extracellulari e di nitriti, nonché l'aumento della fosforilazione dell'enzima p38 MAPK. In un altro lavoro Canesi et al (2010) hanno utilizzato la stessa ENP impiegata nello studio precedente, esponendo questa volta gli individui adulti (studio *in vivo*). Sono stati valutati gli effetti sui lisosomi degli emociti e della ghiandola digestiva (DG) per concentrazioni di 0,05, 0,2, 1 e 5 mg L<sup>-1</sup>. Ne è derivato un decremento negli emociti della LMS di 54% e 73% rispettivamente a 1 e 5 mg L<sup>-1</sup> ed un decremento della LMS nella DG di 66% e 54% rispettivamente a 1 e 0,2 mg L<sup>-1</sup>. Negli organismi si è inoltre osservato un incremento della lipofuscina (6 volte >) a 5 mg L<sup>-1</sup> ed un aumento della catalasi nella DG del 157% e del 200%, rispettivamente a 1 e 5 mg L<sup>-1</sup>. È interessante notare come esista una corrispondenza, inerente le concentrazioni a cui si sono registrati gli effetti maggiori, tra quanto visto da Canesi et al (2010) e quanto sperimentato in questa tesi di dottorato: nel primo caso, infatti, queste erano 1 e 5 mg L<sup>-1</sup>, nel secondo 4 e 8 mg L<sup>-1</sup>, con effetti evidenti già a 1 mg L<sup>-1</sup>.

Zhu et al (2011a) hanno lavorato con esemplari adulti del gasteropode *Haliotis diversicolor supertexta*, effettuando un test acuto di tossicità a 96 h con 0,1, 1 e 10 mg L<sup>-1</sup> di nTiO<sub>2</sub> (Nanjing High Technology Nano Material Co., China; Ø < 10 nm). Non si è osservato alcun effetto di mortalità a tutte le concentrazioni ma c'è stato un aumento dei valori dell'enzima antiossidante SOD (SuperOxide Dismutasi) per 1 mg L<sup>-1</sup>, mentre a 10 mg L<sup>-1</sup> i valori erano uguali a quelli del controllo; ad 1 mg L<sup>-1</sup> è diminuito il valore di GSH (Glutathione) ma è aumentato il livello della perossidazione lipidica (LPO); sono aumentati inoltre i valori di NO per 1 e 10 mg L<sup>-1</sup>. Anche in questo caso, quindi, gli effetti sembrerebbero essere più rilevanti a 1 mg L<sup>-1</sup> che non a 10 mg L<sup>-1</sup>, confermando l'inversione di tendenza già segnalata, in questa tesi, a proposito dei mitili e delle ostriche. Infine, Zhu et al (2011b) hanno presentato i risultati dell'unico test effettuato su **embrioni** di molluschi. Ancora una volta la specie era il gasteropode *Haliotis diversicolor supertexta* e la ENP la stessa del precedente lavoro. In questo caso l'obiettivo era quello di osservare se la presenza delle ENP (2 mg L<sup>-1</sup>) potesse aumentare l'assorbimento dei TBT ed i conseguenti effetti avversi. Si è visto che, in effetti, in presenza di ENP gli EC50 del TBT, relativi al mancato sviluppo delle uova ed alle malformazioni, passano da 46,5 e 13,4 ng L<sup>-1</sup>, rispettivamente, a 2,11 e 1,87 ng L<sup>-1</sup> (diminuiscono cioè di 20 e 7 volte); inoltre, l'attività di SOD e GSH diminuisce in presenza del complesso NP-TBT.

Appare chiaro, anche in questo contesto, come la diversità delle condizioni sperimentali utilizzate non permetta un adeguato confronto dei risultati ottenuti tenuto anche conto degli obiettivi diversi degli studi.

#### 10.4.3.1 Variazioni al protocollo: esposizione con fotoperiodo

Per verificare se la presenza di luce potesse aumentare gli effetti di embriotossicità del nTiO<sub>2</sub>, favorendo la produzione di ROS, assieme al test tradizionale è stato allestito un test in cui gli organismi sono stati esposti alle ENP in presenza di luce, a 6 – 10 klx, con un fotoperiodo di 12 h. Anche in questo caso, si è operata una trasformazione nei dati ed i risultati sono stati forniti come frequenze di effetto contro il logaritmo delle concentrazioni di nTiO<sub>2</sub> (fig. 10.52). Come nel caso del test tradizionale, la risposta al nTiO<sub>2</sub> sembra essere massima a 4 mg L<sup>-1</sup> e 8 mg L<sup>-1</sup>, in diminuzione per concentrazioni minori e maggiori, rispettivamente. I valori di EC50 sono stati ricavati come soluzioni dell'equazione di secondo grado del paraboloide e sono pari, rispettivamente, a 1,04 (0 – 4,74) mg L<sup>-1</sup> e 25,96 (13,31 – 28,31) mg L<sup>-1</sup>.

In particolare, a 1 mg L<sup>-1</sup> e 16 mg L<sup>-1</sup> si osserva un effetto maggiore, nel caso della piastra illuminata (rispettivamente 33% e 76%), rispetto a quella non illuminata (rispettivamente 14% e 64%). Viceversa, a 32 mg L<sup>-1</sup> e 64 mg L<sup>-1</sup> si è notato un effetto maggiore nella piastra non illuminata (rispettivamente 54% e 29%), in confronto a quella illuminata (rispettivamente 3% e 9%).

L'analisi statistica ha evidenziato che esiste una differenza statisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) nella varianza dei dati, all'interno di ogni singolo test, differenza che non è presente, invece, se si confrontano i due test distinti (fig. 10.53).

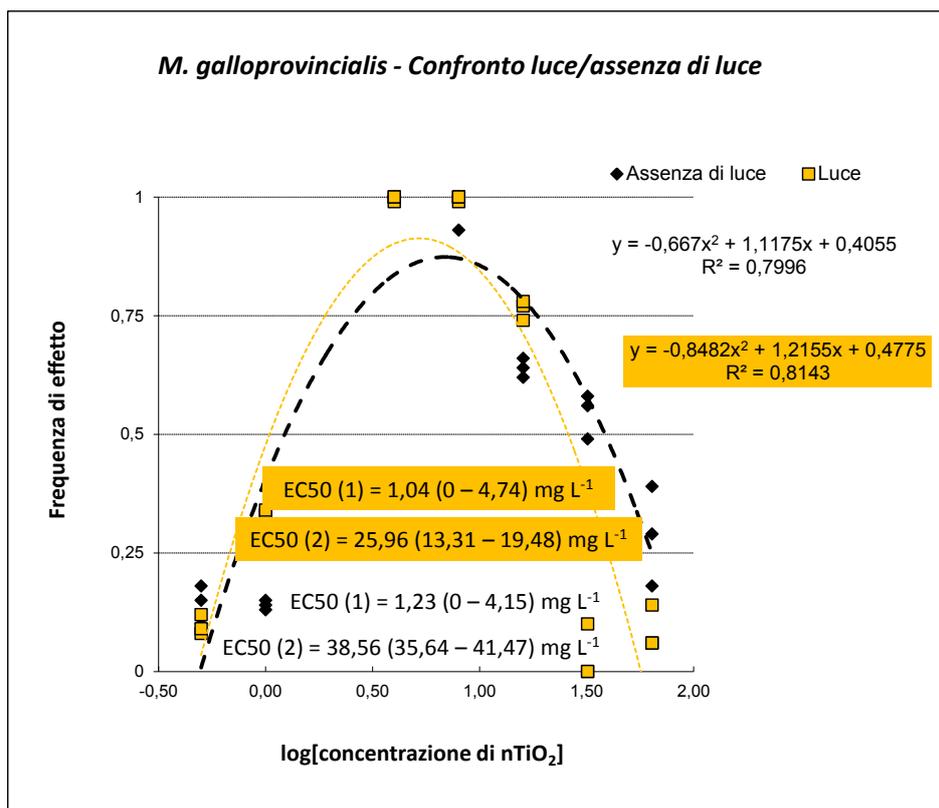


Figura 10.52 - Risultati del test di embriotossicità con il nTiO<sub>2</sub> nei confronti di *M. galloprovincialis*. Confronto tra il test tradizionale e quello condotto con il fotoperiodo di 12 h. In evidenza i valori di EC50 calcolati come soluzioni dell'equazione di II grado.

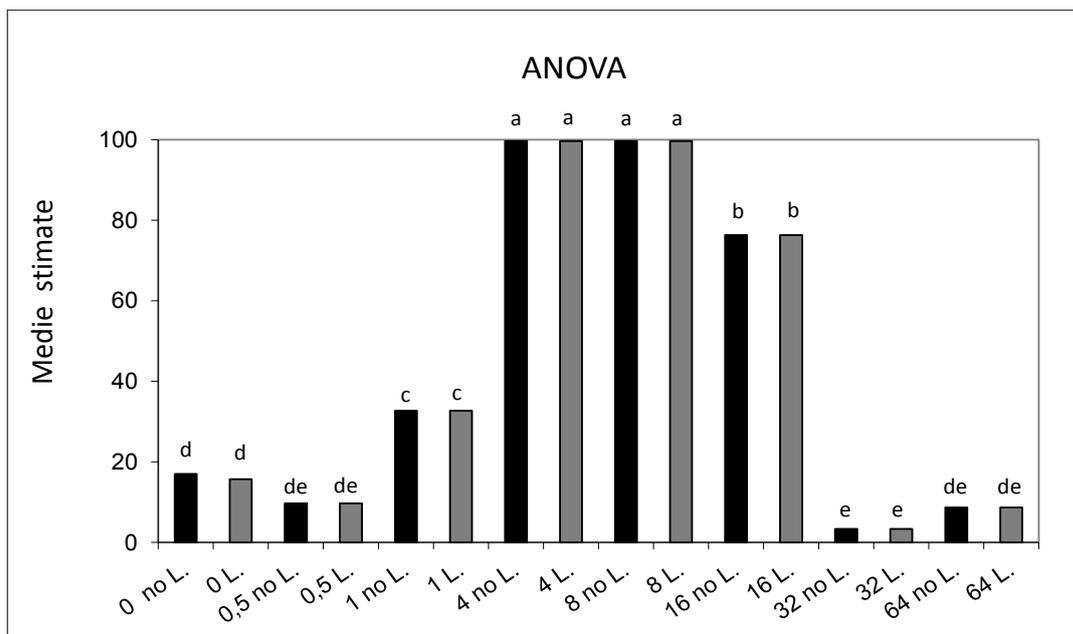


Figura 10.53 – Risultati del test ANOVA per il test di tossicità con *M. galloprovincialis*. Confronto del test condotto secondo il protocollo (no L.) con la replica esposta alla luce (L.) (fotoperiodo = 12 h).

Nonostante non vi sia una differenza statisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) tra gli effetti osservati nei due diversi scenari espositivi, è pur vero che, se si confrontano gli EC50(2), si può notare come quello corrispondente al test condotto in oscurità ( $38,56 \text{ mg L}^{-1}$ ) sia circa 1,5 volte quello corrispondente allo scenario modificato ( $25,96 \text{ mg L}^{-1}$ ). Questo significa che il medesimo effetto di tossicità, in quest'ultimo scenario, si è manifestato a concentrazioni più basse, lasciando intendere che, probabilmente, la presenza di luce possa avere aumentato la tossicità del nTiO<sub>2</sub>.

Ci sono comunque delle evidenze di tossicità, ad esempio quelle ottenute a 32 e 64 mg L<sup>-1</sup>, che mostrano un comportamento inatteso, probabilmente giustificabile con gli oramai noti problemi di riproducibilità, legati più che altro ad un diverso stato di dispersione delle ENP.

#### 10.4.4 Altre evidenze sperimentali

A partire da concentrazioni di nTiO<sub>2</sub> pari a 30 - 40 mg L<sup>-1</sup>, in più occasioni, durante le letture al microscopio, si sono osservate delle particolari geometrie sul fondo dei pozzetti (figg. 10.54 e 10.55). Queste forme sembrerebbero essere una sorta di sagome delle larve sullo strato di ENP. Un'ipotesi sulla loro formazione potrebbe essere la seguente:

- la larva, che rimane per un certo tempo depositata sul fondo, per effetto della deposizione, si trova ricoperta di polveri di nTiO<sub>2</sub>;

- poiché l'organismo è un filtratore, le ENP introdotte con l'acqua risulterebbero irritanti per la larva;
- la larva, in risposta, inizierebbe a secernere muco, il quale si depositerebbe all'esterno tutto attorno all'organismo;
- quando infine la larva si sposta dal fondo, lascerebbe una sorta di impronta, da lei stessa creata, che infatti ne ricalcherebbe la sagoma.

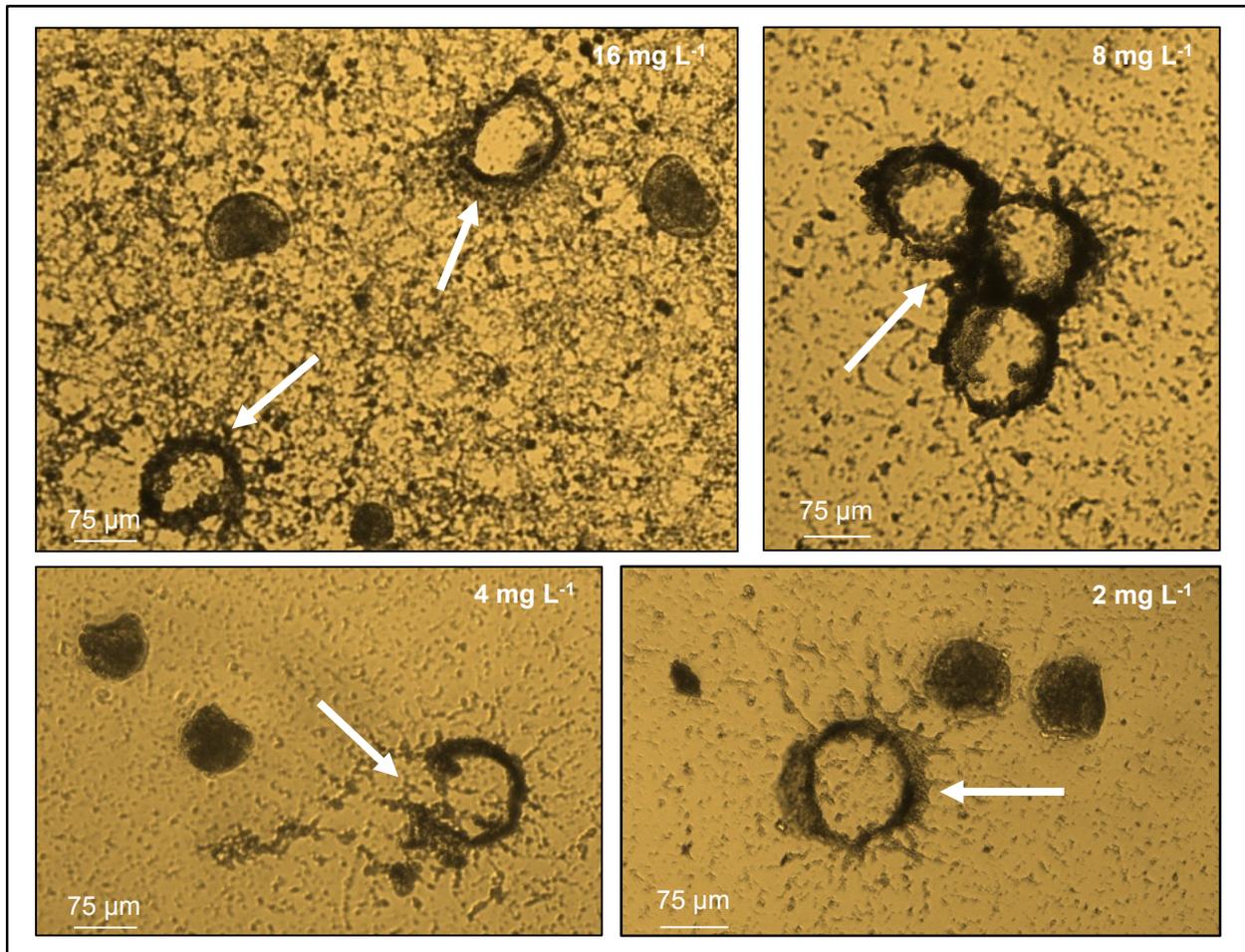


Figura 10.54 – Inaspettate geometrie sul fondo dei pozzetti. La loro forma ricalca la sagoma delle larve di *M. galloprovincialis* e, in alcuni casi, risulta distinguibile la presenza di muco. Un'ipotesi suggerisce che siano le stesse larve a creare tali forme, come risultato dell'emissione di muco, conseguente all'irritazione indotta dalle ENP.

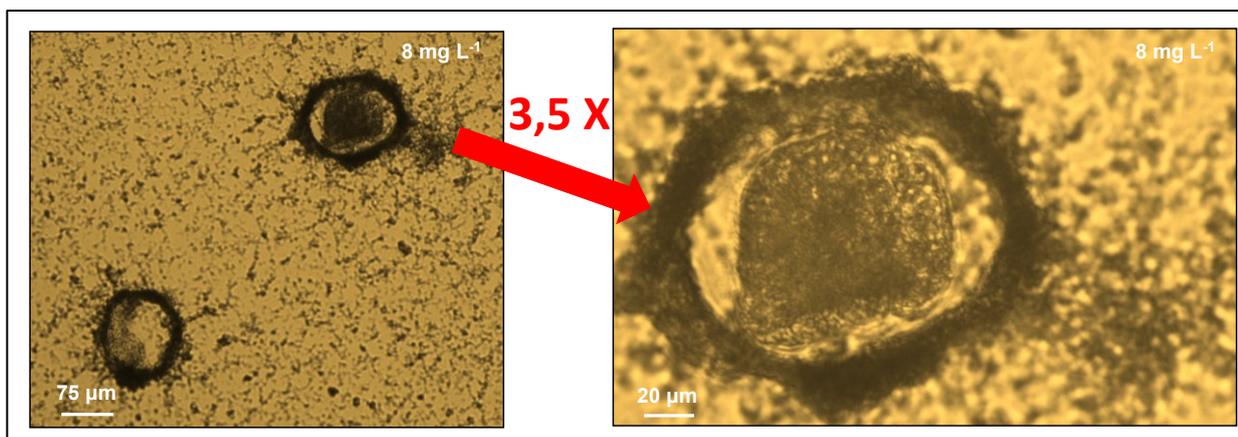


Figura 10.55 – Dettaglio di un'impronta: al suo interno è ancora presente la larva di *M. galloprovincialis*.

In letteratura, la produzione di muco da parte di *M. galloprovincialis*, in risposta ad un agente irritante, trova riscontro, per esempio, nello studio di Hietanen et al (1988). In tale studio, gli autori avevano esposto alcuni esemplari adulti di questo bivalve allo  $ZnCl_2$  (fino a  $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) per 24 h, ricavando un valore di  $EC_{50}$  pari a  $20,8 \text{ mg L}^{-1} \pm 10 \text{ mg L}^{-1}$  ed osservando la produzione di muco, a partire da una concentrazione di  $4 \text{ mg L}^{-1}$ , nel 20 - 50% degli esemplari esposti. Le secrezioni, fra l'altro, sono risultate più durature in funzione della crescente concentrazione, arrivando a perdurare anche 3 settimane dopo l'esposizione. Esami istologici hanno confermato anche un aumento del diametro delle cellule secretorie positivamente correlato alla concentrazione di esposizione.

#### 10.4.5 Riepilogo dei risultati conseguiti con i molluschi bivalvi

I risultati conseguiti con i bivalvi hanno confermato l'importanza dell'intervallo dimensionale come chiave di lettura più idonea per l'interpretazione degli effetti delle ENP nei confronti degli organismi. Più in particolare, per gli embrioni di *C. gigas* gli effetti massimi (82%) sono stati registrati alla concentrazione di  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , mentre a 10 e  $100 \text{ mg L}^{-1}$  tali effetti erano quasi nulli.

Un discorso analogo si può fare anche per gli embrioni di *M. galloprovincialis*, che, esposti a concentrazioni comprese tra  $0,5$  e  $64 \text{ mg L}^{-1}$ , hanno permesso di osservare gli effetti massimi (100%) alle concentrazioni di  $4$  e  $8 \text{ mg L}^{-1}$ . Si è constatato, inoltre, che la presenza di luce non contribuisce ad innalzare gli effetti tossici del  $nTiO_2$  sugli organismi. Le coppie di valori di  $EC_{50}$  ricavate per l'esperimento al buio e per quello con fotoperiodo sono risultate rispettivamente pari a  $1,23$  e  $38,56 \text{ mg L}^{-1}$  e  $1,04$  e  $25,96 \text{ mg L}^{-1}$ .

Infine, come per le alghe, si sono potuti osservare anche degli effetti subletali e cioè la formazione, sullo strato di ENP, di una sorta di sagome che ricalcano il contorno delle larve. La

loro genesi sembra essere dovuta alla produzione di muco da parte degli embrioni, in risposta all'azione irritante delle ENP.

## 10.5 Test con il crostaceo *Artemia franciscana*

### 10.5.1 Carta di controllo

Al fine di garantire un livello accettabile di qualità dei dati ecotossicologici prodotti, ciascun test di controllo, effettuato con il tossico di riferimento, è stato confrontato con la carta di controllo del Gruppo di Ricerca del laboratorio di Ecotossicologia (fig. 10.56). Il programma statistico ufficiale per il calcolo degli EC50 per *Artemia* è Probit, che si basa su un metodo parametrico. Come si può constatare la media del valore di EC50, rispetto al  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , è risultata pari a 7,83 (6,50 - 13,50)  $\text{mg L}^{-1}$ , con un coefficiente di variazione ( $[\text{SD} / \text{media}] \cdot 100$ )  $\text{CV} = 36\%$ , per  $n = 23$ . I limiti di validità inferiore e superiore ( $\text{EC50 medio} \pm 2 \cdot \text{SD}$ ) sono, rispettivamente, pari a 2,18 e 13,49  $\text{mg L}^{-1}$ .

A Probit, per confronto, si è affiancato il metodo non parametrico Trimmed Spearman-Kärber (TSK), i cui risultati sono riassunti nella carta di controllo in figura 10.57.

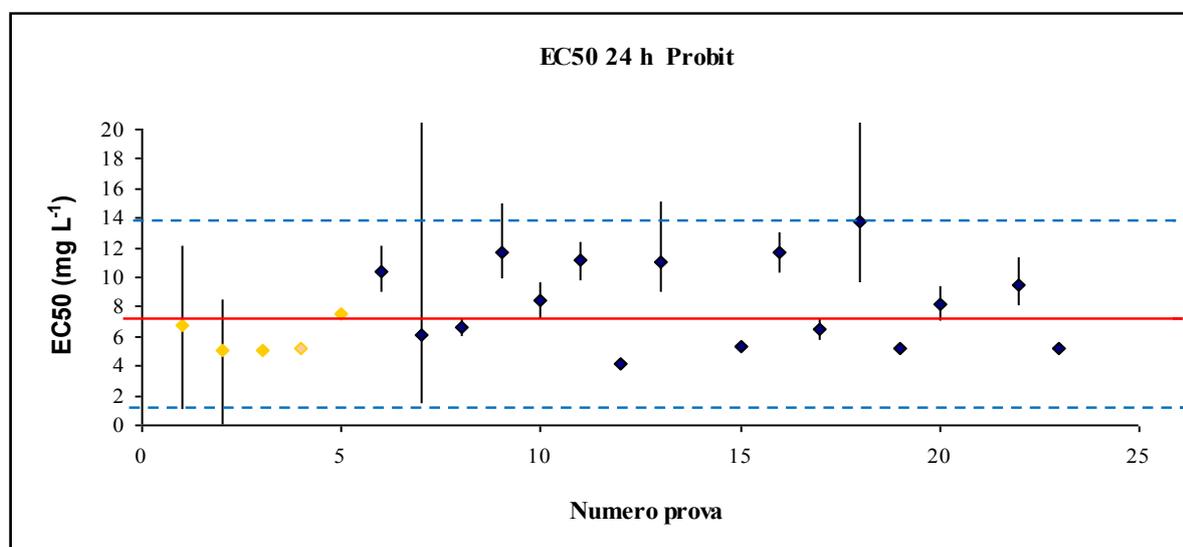


Figura 10.56 – Carta di controllo per il test di immobilizzazione con *A. franciscana*. Elaborazione con Probit. In nero i controlli positivi dei test effettuati per questo lavoro di tesi.

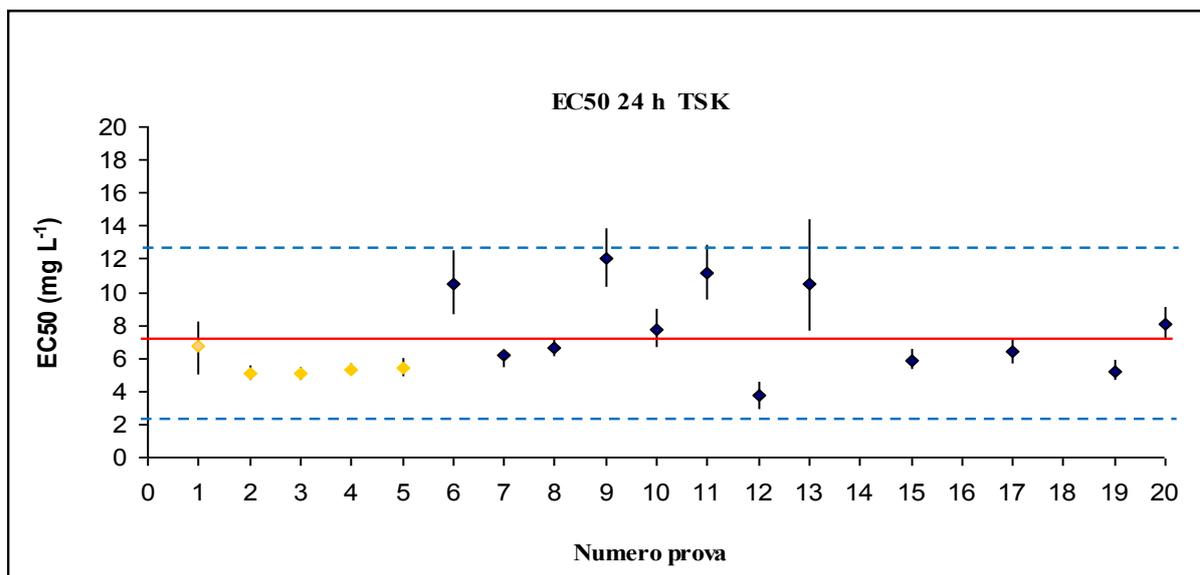


Figura 10.57 – Carta di controllo per il test di inibizione della crescita cellulare con *A. franciscana*. Elaborazione con TSK. In nero i controlli positivi dei test effettuati per questo lavoro di tesi.

Inoltre, poiché le letture del test a 96 h sono effettuate ogni 24 h, è importante verificare la validità del controllo positivo anche a 48, 72 e 96 h. Le relative carte di controllo si trovano in appendice. Qui si riporta una tabella riassuntiva con i valori di EC50 calcolati con entrambi i metodi (fig. 10.58).

	48 h		72 h		96 h	
	Probit	TSK	Probit	TSK	Probit	TSK
<b>EC50 (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>4,18</b> <b>(2,71 - 5,79)</b>	<b>4,70</b> <b>(4,07 - 5,44)</b>	<b>2,58</b> <b>(1,78 - 3,53)</b>	<b>3,42</b> <b>(3,06 - 3,84)</b>	<b>2,00</b> <b>(1,65 - 2,15)</b>	<b>2,41</b> <b>(2,12 - 2,76)</b>
SD	1,38	1,39	0,89	1,07	0,22	0,71
CV (%)	32,93	29,56	34,32	31,40	11,15	29,35
lim sup (mg L <sup>-1</sup> )	6,93	7,48	4,35	5,57	2,45	3,82
lim inf (mg L <sup>-1</sup> )	1,43	1,92	0,81	1,27	1,55	0,99

Figura 10.58 – Valori medi di EC50 calcolati a 24, 48, 72 e 96 h. Il calcolo è stato effettuato con Probit e con TSK.

### 10.5.2 Evidenze sperimentali

Complessivamente, per questa ricerca sono stati eseguiti 16 test acuti con i campioni di ENM e con il relativo tossico di riferimento ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ). 7 di questi hanno avuto una durata di 24 h, gli altri 9 test, invece, di 96 h. In 6 test si sono apportate modifiche al protocollo, variando i fattori luce e nutrimento; in 1 test si sono misurati gli effetti in presenza ed assenza di alginato; 1 test è stato effettuato per provare a valutare il bioaccumulo di ENP, nutrendo i crostacei con due differenti colture algali. In realtà, tutta la parte sperimentale condotta in assenza di modifiche al protocollo potrebbe considerarsi propedeutica alla parte in cui tali modifiche sono state attuate.

Globalmente, le concentrazioni nominali di ENP utilizzate sono variate in un intervallo complessivo compreso tra  $10^{-4}$  mg L<sup>-1</sup> e 1000 mg L<sup>-1</sup>. Anche nel caso dei crostacei, l'approccio che ha portato al restringimento del suddetto intervallo, è stato di tipo empirico. In base ai risultati di volta in volta osservati, quindi, si è effettuata la calibrazione sperimentale e, quindi, in un secondo momento è stato possibile incentrare l'attività di ricerca nell'intervallo di concentrazioni nominali compreso tra 0,01 mg L<sup>-1</sup> e 100 mg L<sup>-1</sup>. Un vantaggio offerto dal test con *A. franciscana*, è stato quello di poter far variare non soltanto le concentrazioni ma anche i **tempi di esposizione**, poiché, come previsto dal protocollo APAT & IRSA CNR (2003), tale test può essere esteso sino a 96 h dopo l'inizio dell'esposizione.

Test n.	Endpoint	Concentrazioni di nTiO <sub>2</sub> nominali utilizzate (mg L <sup>-1</sup> )	n. repliche per concentrazione	n. repliche per test	Modifiche al protocollo
01	24 h	0; 10 <sup>-4</sup> ; 10 <sup>-3</sup> ; 10 <sup>-2</sup> ; 10 <sup>-1</sup> ; 1; 10	3	2	
02	24 h	0; 10 <sup>-4</sup> ; 10 <sup>-3</sup> ; 10 <sup>-2</sup> ; 10 <sup>-1</sup> ; 1; 10	3	2	
03	24 h	0; 10 <sup>-4</sup> ; 10 <sup>-3</sup> ; 10 <sup>-2</sup> ; 10 <sup>-1</sup> ; 1; 10	3	2	
04	24 h	0; 0,1; 1; 10; 100	3	1	
05	24 h	0; 0,1; 1; 10; 100	3	1	
06	24 h	0; 100; 200; 500; 1000	3	1	
07	96 h	0; 10; 50; 100; 500; 1000	3	2	
08	24 h	0; 10; 20; 30; 40; 50	3	1	Illuminazione pre-inoculo
09	24 h	0; 10; 20; 30; 40; 50	3	3	Illuminazione pre-inoculo differenziata
10	96 h	0; 10; 20; 30; 40; 50	3	3	Presenza/ assenza di luce e di cibo
11	96 h	0; 2; 4; 8; 16; 32; 64	3	4	Presenza/ assenza di luce e di cibo
12	96 h	0; 0,5; 1; 4; 8; 16; 32; 64	3	4	Presenza/ assenza di luce e di cibo
13	96 h	0; 2; 4; 8; 16; 32; 64	3	2	Presenza/ assenza di luce e cibo
14	96 h	0; 2; 4; 8; 16; 32; 64	3	2	Presenza/ assenza di luce e cibo
15	96 h	0; 0,01; 0,1; 1; 5; 10; 30; 50; 70; 90	3	10	Presenza/ assenza di alginato
16	96 h	0; 0,1; 1; 10; 50	3	2	Bioaccumulo

Figura 10.59 – Tabella riassuntiva dei test ecotossicologici effettuati con *A. franciscana*.

I primi 3 test di immobilizzazione a 24 h (nn. 01 - 03), per i quali si sono utilizzate le dispersioni a concentrazione 0; 10<sup>-4</sup>; 10<sup>-3</sup>; 10<sup>-2</sup>; 10<sup>-1</sup>; 1 e 10 mg L<sup>-1</sup>, non hanno fatto emergere alcun effetto di tossicità del nTiO<sub>2</sub>. In queste prime prove, si è voluto affiancare, al controllo negativo, un secondo controllo negativo, indicato nel grafico come “0S”, costituito da ASW1 sottoposta a sonicazione per 20 min a 100 W, ovvero alle stesse condizioni a cui sono state sottoposte le dispersioni di ENP. Questo è stato fatto per verificare se, a prescindere da altre cause, la stessa sonicazione potesse costituire un fattore di disturbo per i nauplii, modificando gli esiti degli esperimenti.

Il grafico, in figura 10.60, riassume il risultato medio dei 3 test nelle rispettive repliche A e B. L'analisi statistica della varianza ha dimostrato che quest'ultima varia in maniera statisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), sia tra test differenti, sia all'interno di uno stesso test tra diverse concentrazioni.

Dati questi primi risultati, si è deciso di innalzare il valore delle concentrazioni da testare. I test di tossicità nn. 04 e 05 sono stati quindi condotti con dispersioni a concentrazione 0; 0,1; 1; 10 e 100 mg L<sup>-1</sup>. Anche in questo caso, non è stato possibile osservare evidenze di tossicità per i crostacei. L'assenza di effetti di immobilizzazione è stata riscontrata anche con il test n. 06, allestito alle concentrazioni di 0; 100; 200; 500 e 1000 mg L<sup>-1</sup>.

Dai risultati ottenuti con i primi 6 test, è scaturita la decisione di non modificare l'intervallo di concentrazioni ma di estendere, invece, il tempo di contatto degli organismi con le ENP. Aumentare ancora le concentrazioni delle dispersioni, infatti, oltre ad una perdita di rappresentatività ambientale, avrebbe causato dei seri problemi per le operazioni di lettura dei test, per via della lattescenza dei mezzi, fenomeno già osservato anche per le esperienze con *P. tricornutum* (cfr. par. 10.3.2).

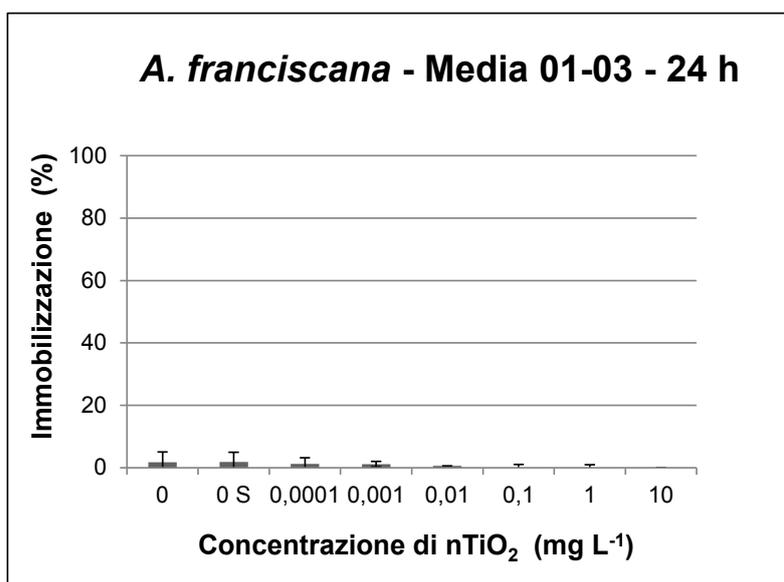


Grafico 10.60 – Media dell'effetto di immobilizzazione dei test nn. 01-03 nelle due repliche A e B. L'etichetta 0S si riferisce al controllo negativo sottoposto a sonicazione (20 min a 100 W).

Nel test n. 07, lo scopo è stato quello di valutare la tossicità del nTiO<sub>2</sub> a concentrazioni pari a 0; 10; 50; 100; 500 e 1000 mg L<sup>-1</sup>, questa volta per un'esposizione estesa di 96 h. I risultati, come si può osservare in figura 10.61, evidenziano effetti di tossicità dalla concentrazione di 50 mg L<sup>-1</sup> a partire già dalle prime 24 h, a differenza di quanto osservato precedentemente.

L'analisi statistica della varianza ha dimostrato che quest'ultima varia in maniera statisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) all'interno della stessa serie temporale, per concentrazioni differenti, mentre non c'è variazione statisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) tra differenti serie temporali.

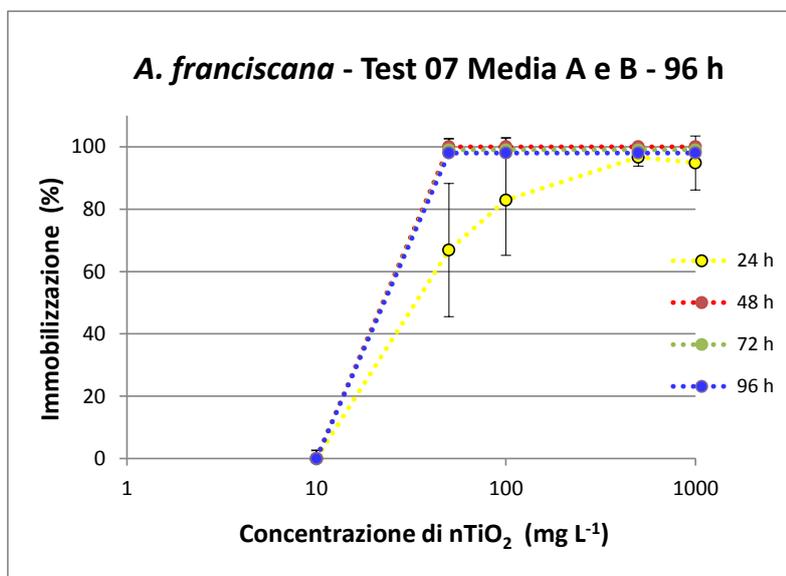


Grafico 10.61 – Risultati del test di immobilizzazione a 96 h del nTiO<sub>2</sub> nei confronti di *A. franciscana*. I risultati rappresentano la media delle due repliche A e B.

La serie dei risultati di effetto a 24 h è l'unica a mostrare un andamento crescente. Le altre 3 serie (48 h, 72 h e 96 h) hanno dei valori di immobilizzazione praticamente costanti e pari al 100%, fatto che conferma il ruolo determinante assunto dal tempo di esposizione, a parità di concentrazioni impiegate. Si è pensato quindi che fosse il caso di diminuire nuovamente i valori di concentrazione, visto che queste, per i prolungati tempi di esposizione, risultavano troppo elevate.

Ricapitolando, per un tempo di esposizione pari a 24 h, non si è potuto osservare alcun effetto nell'intervallo di concentrazione compreso tra  $10^{-4}$  e  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ . Invece di innalzare ulteriormente le concentrazioni, si è deciso di aumentare i tempi di esposizione fino a 96 h: gli effetti si sono manifestati in modo evidente, per cui si è deciso di proseguire con i test a 96 h, limitando l'intervallo di concentrazioni tra  $0,5$  e  $64 \text{ mg L}^{-1}$ .

Come anticipato all'inizio del paragrafo, i test, a partire dal n. 08 in avanti, sono stati eseguiti apportando delle variazioni al protocollo originale. Per ognuno di essi, comunque, esiste la corrispondenza di un test di controllo, condotto secondo le linee guida ufficiali.

### 10.5.2.1 Variazioni al protocollo: modifiche ai parametri illuminazione e nutrimento

#### Premessa

In generale, ciascuno dei test a 96 h è stato condotto in parallelo a test ecotossicologici eseguiti nelle modalità previste dal protocollo. Questo per rispondere alle seguenti esigenze:

- poter confrontare i test modificati con quelli facenti riferimento ai protocolli;
- uniformare il più possibile le condizioni operative dei diversi test, a beneficio di una maggior confrontabilità dei risultati;
- ottimizzare le tempistiche del lavoro, visto che ciascun test dura 7 gg. (3 gg. di preparazione + 4 gg. di esposizione).

Va inoltre precisato che, iniziando sistematicamente l'attività sperimentale, si è reso evidente un problema di mortalità degli organismi nei controlli negativi e/o positivi, a 48 h dall'inizio del test, indipendentemente dalle diverse condizioni operative impiegate. Una ricerca bibliografica mirata, su esperienze pregresse di altri autori, ha permesso di constatare come, in questo tipo di test ecotossicologici, il problema della sopravvivenza dei crostacei, dopo le 48 h, fosse di fatto già noto. Nella loro ricerca, Savorelli et al (2007) hanno valutato l'idoneità di diverse acque artificiali con degli esperimenti che utilizzavano *A. franciscana*, protrattisi oltre 14 gg. Ne sono emersi i risultati che, per praticità, sono riportati qui sotto in forma di grafico (fig. 10.62).

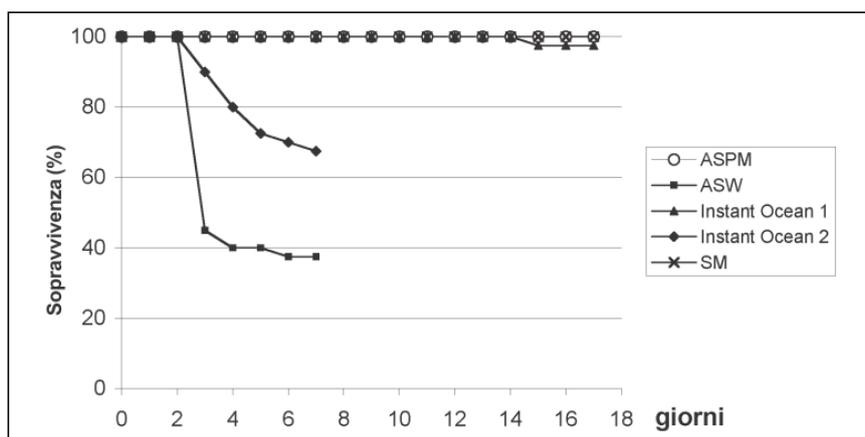


Figura 10.62 – Sopravvivenza di *A. franciscana* nelle diverse acque marine artificiali (Savorelli et al, 2007).

Le acque utilizzate sono ASPM (cfr. Appendice), ASW (sali del kit ARTOXKIT + milliQ), Instant Ocean® 1 (cfr. tab. 9.22; 35 g di Instant Ocean® in 1 L di milliQ), Instant Ocean® II (35 g di Instant Ocean® in 1 L di milliQ e condizionata su filtri biologici per almeno una settimana prima del suo impiego), SM (analoga a ASTM usata per questa tesi, cfr. tab. 9.27).

Per non incorrere in confusione si fa presente che l'ASW1, utilizzata per i crostacei in questo lavoro di tesi, non corrisponde all'ASW indicata da Savorelli et al (2007), bensì a quella che tali

autori indicano con SM (Standard Methods), preparata secondo la ricetta A.P.H.A (American Public Health Association), A.W.W.A. (American Water Works Association), W.P.C.F. (Water Pollution Control Federation) (1989).

Secondo quanto riportato nello studio di Savorelli et al (2007), solo ASW ed Instant Ocean 2, sembrerebbero causare il problema della mortalità, dopo 48 h dall'inoculo dei crostacei. L'acqua SM, invece, sembrerebbe essere un mezzo in grado di garantire l'esecuzione di un test con *Artemia* a 96 h senza creare interferenze, cosa che però, in questo lavoro di tesi, non ha trovato conferma.

Tenuto conto di tali evidenze sperimentali, si è scelto di presentare i risultati dei test sub cronici a 96 h ma di commentarli limitatamente alle 48 h di esposizione, periodo per il quale, i vari test ecotossicologici condotti sono stati convalidati dalla bontà dei controlli negativi e positivi.

### Disegno sperimentale

Come anticipato all'inizio di questo paragrafo, partendo dal test di immobilizzazione a 96 h, previsto dal **protocollo** APAT & IRSA CNR (2003) (cfr. par. 9.3.4), si è deciso di far variare le condizioni sperimentali di luce e nutrimento, come riportato in tabella (10.63). Si sono così ottenuti **3 scenari di esposizione principali**: **(1)** uno scenario di esposizione previsto dal protocollo, con fotoperiodo di 12 h e nutrimento dei nauplii dopo 48 h dall'inizio del test; **(2)** uno scenario senza fotoperiodo (sempre al buio) ma con nutrimento dei nauplii dopo 48 h dall'inizio del test, per verificare se la presenza di luce naturale potesse aumentare gli effetti tossici del nTiO<sub>2</sub>; **(3)** uno scenario con il fotoperiodo ma assenza di nutrimento dei nauplii, per valutare, in generale, il ruolo della fase alimentare e per verificare se la presenza della sospensione algale fornita in qualità di nutrimento, comportandosi da possibile chelante, potesse avere la capacità di diminuire l'effetto di tossicità delle ENP. Ciascuno dei differenti scenari espositivi (1, 2 e 3), a sua volta, è stato suddiviso in **4 sottoscenari**, in funzione del tempo di esposizione: (a) 24 h, (b) 48 h, (c) 72 h e (d) 96 h. Ad esempio, lo scenario (2) (c) indica quello scenario in cui i crostacei sono stati esposti al nTiO<sub>2</sub> senza fotoperiodo ma con il nutrimento (2), il tutto osservato a 72 h (c) dall'inizio dell'esposizione.

Nel complesso, i 5 test (nn. 10 – 14), allestiti con tali scenari, sono stati eseguiti in un intervallo di concentrazioni nominali compreso tra 0 e 64 mg L<sup>-1</sup>.

SCENARIO	CONDIZIONI SPERIMENTALI		DURATA DELL'ESPOSIZIONE			
	FOTOPERIODO	NUTRIMENTO	24 h	48 h	72 h	96 h
(1)	si	si	(a)	(b)	(c)	(d)
(2)	no	si	(a)	(b)	(c)	(d)
(3)	si	no	(a)	(b)	(c)	(d)

Tabella 10.63 – Suddivisione dei diversi scenari e sottoscenari espositivi, in funzione, rispettivamente, delle condizioni sperimentali e della durata dell'esposizione.

## Risultati

Si è scelto di presentare i risultati suddividendoli per scenari espositivi. Complessivamente, analizzando i dati ricavati dai 5 test, non sempre è stato possibile determinare il valore dell'EC50, di conseguenza, per alcuni dei diversi sottoscenari si sono potute riportare solamente le percentuali di effetto minimo e massimo e le relative concentrazioni a cui tali effetti sono stati rilevati. I risultati sono riportati nei seguenti grafici e nelle loro relative tabelle in figura 10.64-66 a), b) e c).

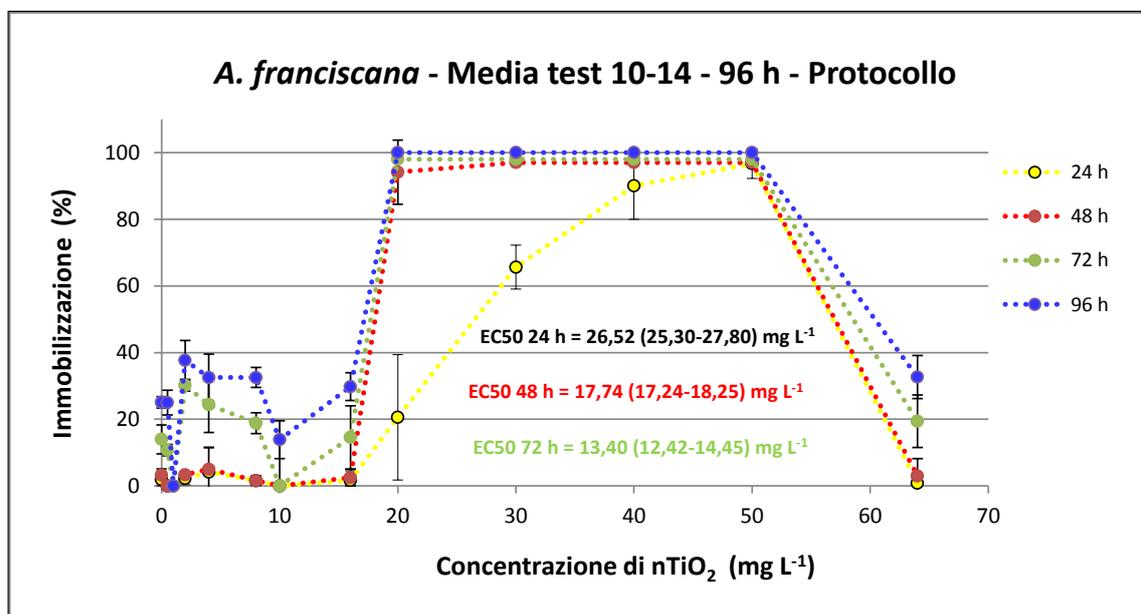


Figura 10.64 a) – Risultati dei test di immobilizzazione a 96 h, con *A. franciscana*, allestiti secondo lo scenario espositivo (1) previsto dal protocollo APAT & IRSA CNR (2003). I risultati rappresentano la media dei test nn. 10-14.

(1) ILLUMINAZIONE ED ALIMENTAZIONE (APAT & IRSA CNR, 2003)				
tempo	24 h	48 h	72 h	96 h
EC50 (mg L <sup>-1</sup> )	26,52 (25,30-27,80)	17,74 (17,24-18,25)	13,40 (12,42-14,45)	n.d.
effetto MIN	0% a 0,5 mg L <sup>-1</sup>	0% a 0,5 mg L <sup>-1</sup>	0% a 1 mg L <sup>-1</sup>	0% a 1 mg L <sup>-1</sup>
effetto MAX	97% a 50 mg L <sup>-1</sup>	100% a 30 mg L <sup>-1</sup>	100% a 20 mg L <sup>-1</sup>	100% a 20 mg L <sup>-1</sup>

Figura 10.64 b) – Valori di EC50, di effetto minimo e massimo e rispettive concentrazioni per lo scenario espositivo (1). I risultati raggruppano quanto emerso complessivamente dai 5 test (nn. 10 - 14).

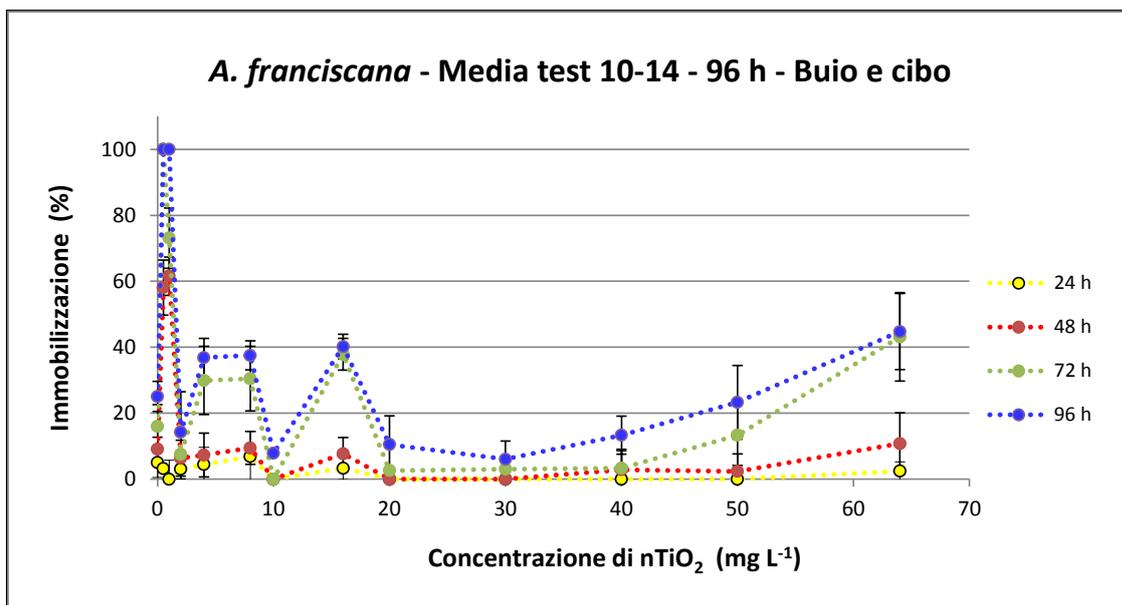


Figura 10.65 a) – Risultati dei test di immobilizzazione a 96 h, con *A. franciscana*, allestiti secondo lo scenario espositivo (2) “Assenza di illuminazione ma presenza di alimentazione”. I risultati rappresentano la media dei test nn. 10-14.

<b>(2) ASSENZA DI ILLUMINAZIONE MA PRESENZA DI ALIMENTAZIONE</b>				
tempo	24 h	48 h	72 h	96 h
EC50 (mg L <sup>-1</sup> )	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
effetto MIN	0% a 1 mg L <sup>-1</sup>	0% a 10 mg L <sup>-1</sup>	0% a 10 mg L <sup>-1</sup>	6% a 30 mg L <sup>-1</sup>
effetto MAX	7% a 8 mg L <sup>-1</sup>	62% a 1 mg L <sup>-1</sup>	100% a 0,5 mg L <sup>-1</sup>	30% a 0,5 mg L <sup>-1</sup>

Figura 10.65 b) – Valori di EC50, di effetto minimo e massimo e rispettive concentrazioni per lo scenario espositivo (2). I risultati raggruppano quanto emerso complessivamente dai 5 test (nn. 10 - 14).

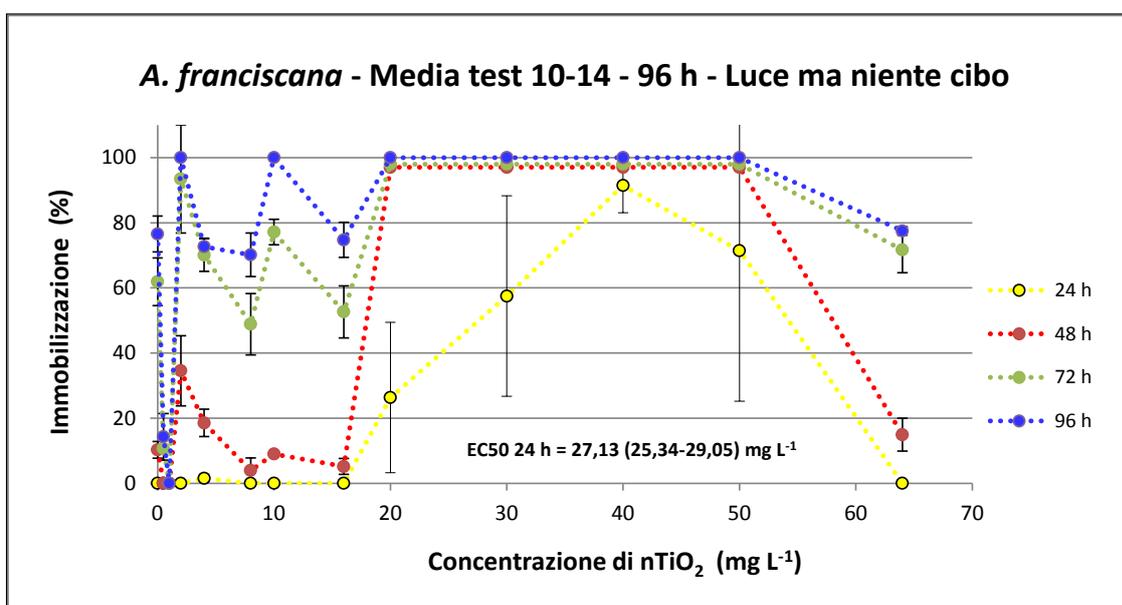


Figura 10.66 a) – Risultati dei test di immobilizzazione a 96 h, con *A. franciscana*, allestiti secondo lo scenario espositivo (3) “Presenza di illuminazione ma assenza di alimentazione”. I risultati rappresentano la media dei test nn. 10-14.

<b>(3) PRESENZA DI ILLUMINAZIONE MA ASSENZA DI ALIMENTAZIONE</b>				
<b>tempo</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>	<b>72 h</b>	<b>96 h</b>
<b>EC50 (mg L<sup>-1</sup>)</b>	27,13 (25,34-29,05)	n.d.	n.d.	n.d.
<b>effetto MIN</b>	0% a 0,5 mg L <sup>-1</sup>	0% a 0,5 mg L <sup>-1</sup>	0% a 1 mg L <sup>-1</sup>	0% a 1 mg L <sup>-1</sup>
<b>effetto MAX</b>	91% a 40 mg L <sup>-1</sup>	100% a 20 mg L <sup>-1</sup>	100% a 20 mg L <sup>-1</sup>	100% a 2 mg L <sup>-1</sup>

Figura 10.66 b) – Valori di EC50, di effetto minimo e massimo e rispettive concentrazioni per lo scenario espositivo (3). I risultati raggruppano quanto emerso complessivamente dai 5 test (nn. 10 - 14).

Lo scenario (1) “Illuminazione ed alimentazione”, che ricalca esattamente le linee guida previste dal protocollo, sembra evidenziare l’esistenza di una correlazione positiva tra gli effetti di tossicità riscontrati e la concentrazione di ENP. Tali effetti, inoltre, come ci si potrebbe aspettare, sembrano aumentare di intensità in funzione dei tempi di esposizione. Più in particolare, a 24 h è stato possibile osservare come la tossicità fosse nulla fino ad una concentrazione pari a 16 mg L<sup>-1</sup>, oltre la quale invece, questa aumentava fino a raggiungere il valore massimo (97%) in corrispondenza di 50 mg L<sup>-1</sup>. Alla massima concentrazione testata (64 mg L<sup>-1</sup>), invece, non si sono registrati effetti di tossicità. L’andamento della curva a 48 h sembrava essere analogo a quello osservato per le 24 h, con un’unica differenza: l’aumento degli effetti di tossicità, a partire da 16 mg L<sup>-1</sup>, era molto più rapido e le percentuali di effetto massime erano raggiunte già tra i 20 ed i 30 mg L<sup>-1</sup> di ENP. Queste si mantenevano costanti fino ad una concentrazione di 50 mg L<sup>-1</sup>, oltre la quale, come già constatato, non si manifestava alcuna tossicità. L’analisi ANOVA tra le due serie ha messo in luce l’esistenza di una somiglianza statisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) tra le coppie di dati, come si può osservare in figura 10.67.

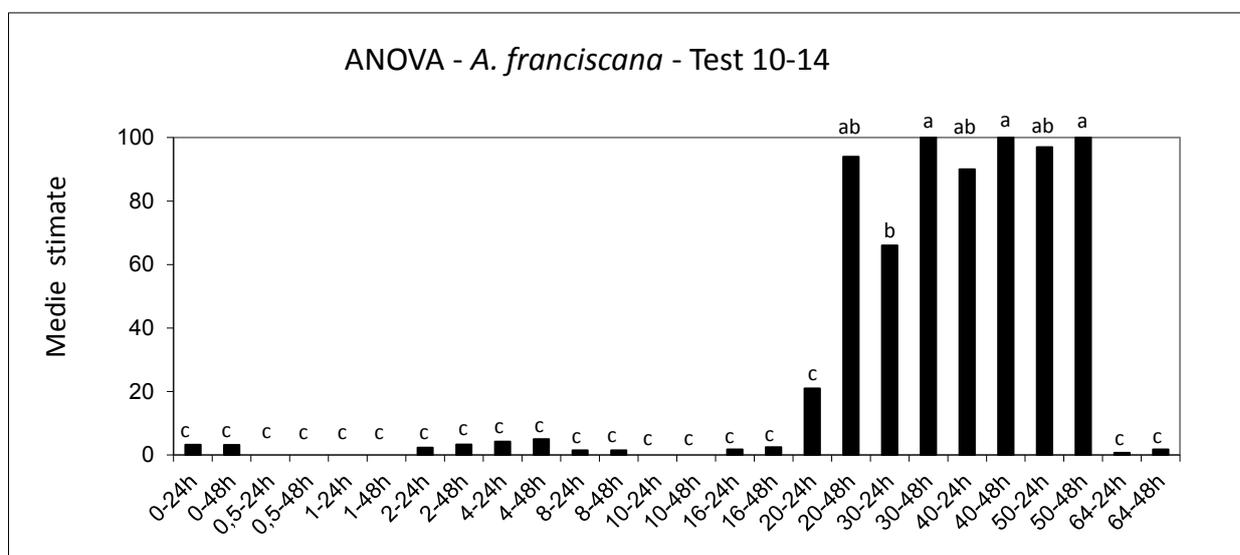


Figura 10.67 – Risultati del test ANOVA dello scenario (1); confronto tra la serie a 24 h e quella a 48 h.

Per quanto riguarda, invece, le curve a 72 h e a 96 h, gli effetti di tossicità apparivano già dalle basse concentrazioni. Infatti, in corrispondenza di una concentrazione di  $2 \text{ mg L}^{-1}$ , a 72 h e a 96 h, rispettivamente, erano osservabili effetti del 30% e del 40%, valori che rimanevano grosso modo costanti fino a  $16 \text{ mg L}^{-1}$ , con un unico lieve ribasso in corrispondenza di  $10 \text{ mg L}^{-1}$ . Poi, molto rapidamente, tra i  $16$  ed i  $20 \text{ mg L}^{-1}$ , la tossicità, per entrambe le curve, raggiungeva i valori massimi, rimanendo costante fino ad una concentrazione di  $50 \text{ mg L}^{-1}$ , oltre la quale si assisteva ad una sensibile diminuzione degli effetti. Per i 3 differenti sottoscenari, 24 h, 48 h e 72 h, i valori di EC50 ricavati sono risultati, rispettivamente pari a 26,52 (25,30-27,80); 17,74 (17,24-18,25); 13,40 (12,42-14,45).

Nel complesso, quindi, come già anticipato, gli effetti di tossicità sembravano aumentare con la concentrazione di ENP impiegata ed anche col trascorrere del tempo di osservazione. Ciascuna delle serie dei 4 diversi sottoscenari può essere suddivisa in 3 parti distinte:

- una prima parte in cui gli effetti si mantengono molto bassi (24 h e 48 h) o bassi (72 h e 96 h);
- una seconda parte in cui si manifesta l'aumento evidente degli effetti di tossicità, la cui rapidità è funzione del tempo di osservazione (minima per le 24 h, massima per le 96 h);
- una terza parte in cui gli effetti massimi si mantengono costanti.

Rimane da discutere la sensibile diminuzione degli effetti di tossicità, riscontrata a  $64 \text{ mg L}^{-1}$ . Ancora una volta le possibili spiegazioni potrebbero ricercarsi nel fenomeno dell'agglomerazione delle ENP, che porterebbe alla formazione di particelle di granulometria tali da non costituire, per i crostacei, un problema in termini di disponibilità.

Come già puntualizzato per il caso delle alghe e dei molluschi, anche per i crostacei non è possibile un confronto con la letteratura, dal momento che, alla data odierna, non c'è produzione letteraria in merito agli effetti del  $\text{nTiO}_2$  nei confronti dei crostacei di acqua marina. Tuttavia, rimanendo nell'ambito dell'acqua dolce, si vuol segnalare la review di Kahru et al (2010), in cui viene fornito il valore medio di EC50 ricavato da 10 test ecotossicologici con crostacei esposti al  $\text{nTiO}_2$ . Il suddetto valore di EC50, risulta pari a  $67,7 \text{ mg L}^{-1}$  e le specie a cui si riferisce lo studio sono: *Daphnia magna*, *Daphnia pulex*, *Ceriodaphnia dubia*, *Thamnocephalus platyurus* e *Chydorus sphaericus*.

Il dato fornito appare poco indicativo poiché accorpa in sé un'informazione cumulativa molto generica che non distingue tra specie, endpoint, tipo di  $\text{nTiO}_2$  e metodologie di esecuzione del test differenti. Si profila nuovamente il problema della difficoltà di comparazione dei diversi lavori effettuati.

Lo scenario (2) “Assenza di illuminazione ma presenza di alimentazione” sembrerebbe evidenziare una riduzione degli effetti di tossicità del nTiO<sub>2</sub>. A 24 h, a meno delle barre d’errore, gli effetti di tossicità si mantenevano praticamente costanti e molto bassi (< 10%), a tutte le concentrazioni. A 48 h è stato possibile rilevare una situazione analoga ma con una rilevante differenza: a 0,5 mg L<sup>-1</sup> e a 1 mg L<sup>-1</sup> gli effetti di tossicità raggiungevano i massimi valori, rispettivamente 58% e 62%. Il fenomeno mette in luce tre aspetti importanti. Il primo è costituito dal fatto che, quanto visto, potrebbe confermare ancora una volta l’importanza delle dimensioni estremamente ridotte degli agglomerati nella determinazione del reale scenario espositivo, dal momento che tali agglomerati possono perdurare dispersi più a lungo, oltre ad avere una maggiore probabilità di assunzione da parte degli organismi. Il secondo aspetto, invece, induce ad una riflessione su quelli che potrebbero essere i possibili meccanismi di tossicità. Poiché i test sono stati condotti in assenza di luce, che è in grado di innescare il processo di produzione dei ROS, allora si potrebbe ipotizzare che la tossicità rilevata non abbia un’origine fotochimica, bensì **meccanica**, legata probabilmente all’irritazione e/o all’ostruzione delle vie respiratorie dei nauplii ed ai possibili danni dovuti all’ingestione. Il terzo aspetto, infine, ribadisce la poca riproducibilità dei test ecotossicologici aventi come tossico un ENM. Infatti, il picco di effetto rilevato in corrispondenza di 0,5 mg L<sup>-1</sup> e 1 mg L<sup>-1</sup> non si è manifestato nello scenario (1), sebbene l’operatore, la metodica di dispersione delle ENP e del trasferimento di queste all’interno dei pozzetti fossero gli stessi. L’analisi ANOVA tra le due serie ha evidenziato che le differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ ) nella varianza dei dati erano minime, come si può osservare in figura 10.68.

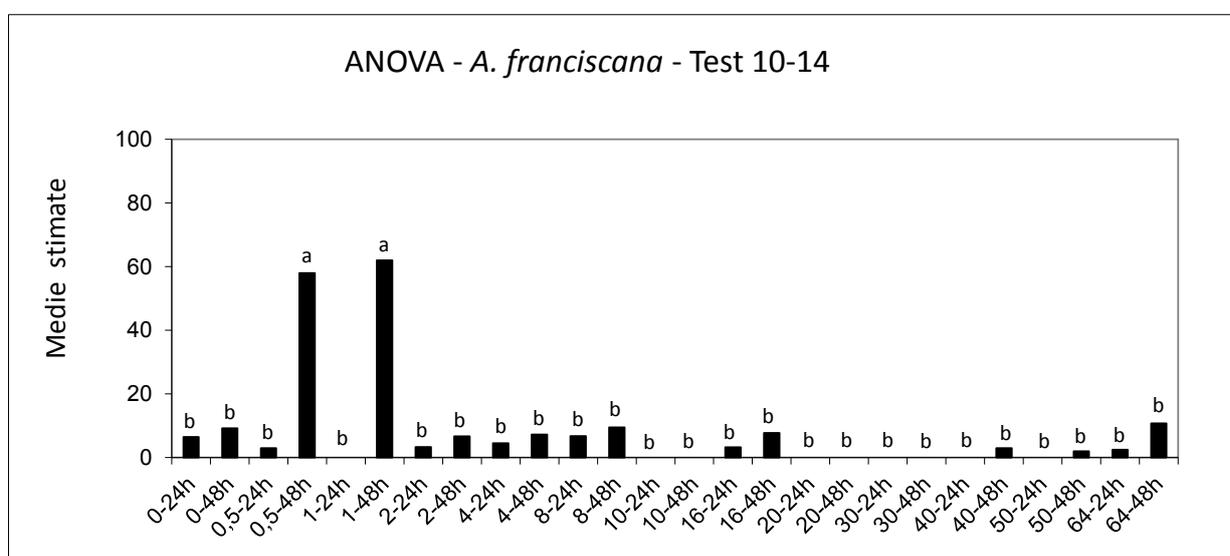


Figura 10.68 – Risultati del test ANOVA dello scenario (2); confronto tra la serie a 24 h e quella a 48 h.

Per quanto riguarda le evidenze di tossicità delle osservazioni effettuate a 72 h e a 96 h, si è potuto osservare come queste ricalcassero l'andamento di quelle registrate a 48 h, con valori però maggiori dovuti evidentemente al maggior tempo di contatto dei crostacei con il tossico. L'analisi ANOVA ha rilevato che, complessivamente, tra le tre serie di dati non c'erano differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ ). Come illustrato nella tabella 10.65 b), non è stato possibile determinare i valori di EC50 per i 4 differenti sottoscenari, da 24 a 96 h.

Complessivamente, per questo scenario (2), ad eccezione del picco di effetto osservato in corrispondenza di  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  e  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , la tossicità non supera il valore del 40%, evidenza che porterebbe a presumere un'effettiva diminuzione degli effetti avversi dovuta all'assenza del fotoperiodo e, quindi, ad una diminuita produzione di ROS da parte delle ENP. Sugli effetti legati all'assenza di luce si potrebbe avanzare un'ulteriore spiegazione e cioè che, forse, più semplicemente, la mobilità dei nauplii al buio potrebbe essere ridotta. Secondo questa ipotesi, quindi, da una parte ci sarebbe un risparmio in termini **bioenergetici** e dall'altra una minore **attività respiratoria**, con la conseguente diminuzione dell'ingresso delle ENP negli organismi. Naturalmente, non è escluso che, quanto osservato, potrebbe essere dipeso dall'azione sinergica di entrambi i fenomeni.

Lo scenario (3) "Presenza di illuminazione ma assenza di alimentazione", tra tutti, è quello che dovrebbe offrire le condizioni di sopravvivenza più ardue per i nauplii di *A. franciscana*. Tale scenario, infatti, combina gli effetti della luce, in grado di attivare la frazione fotocatalitica del nTiO<sub>2</sub> e causare l'emissione di ROS, con quelli legati alla mancanza di un elemento che possa sottrarre le ENP dalla colonna d'acqua o che ne schermi l'azione. Ovviamente, si deve tener in considerazione il fatto che l'assenza di cibo è di per se stessa causa di indebolimento per gli organismi. Le evidenze di tossicità osservate a 24 h hanno mostrato un andamento confrontabile con la serie a 24 h dello scenario (1) e lo stesso si è potuto affermare per la serie a 48 h, con un'unica eccezione, ovvero un effetto di tossicità marcato (35%) in corrispondenza di una concentrazione pari a  $2 \text{ mg L}^{-1}$ . A parte questa differenza, si ribadisce che le serie di dati a 24 h e a 48 h dello scenario (1) e quelle dello scenario (3) risultavano confrontabili. Il test ANOVA ha confermato l'esistenza di una bassa variabilità statisticamente significativa tra le coppie di risultati ricavati nei due differenti scenari (figg. 10.69 e 10.70). La cosa è coerente, visto che, fino a 48 h dopo l'esposizione, gli scenari espositivi (1) e (3) sono identici e, quindi, se non subentrano gli ormai noti problemi di riproducibilità, legati all'utilizzo delle ENP, non dovrebbe esserci motivo di divergenza tra i risultati. Una differenza con lo scenario (1) è la tossicità, in generale più elevata, evidente sia a 72 h che a 96 h anche per

concentrazioni < 20 mg L<sup>-1</sup>. Il valore di EC50 calcolato a 24 h è risultato pari a 27,13 (25,34-29,05).

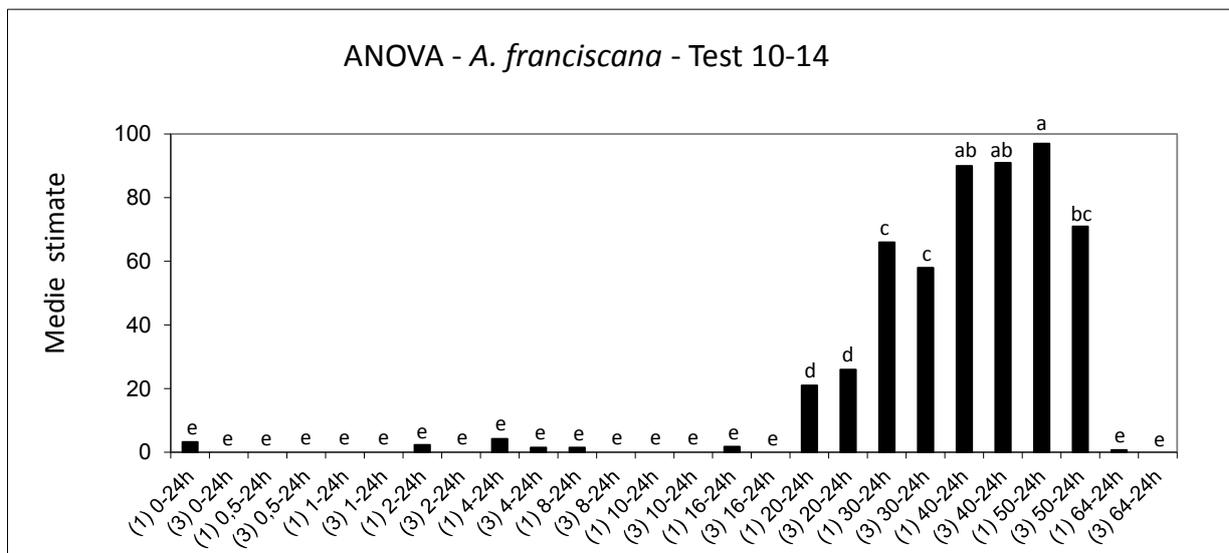


Figura 10.69 – Risultati del test ANOVA: confronto tra la serie a 24 h dello scenario (1) con quella a 24 h dello scenario (3).

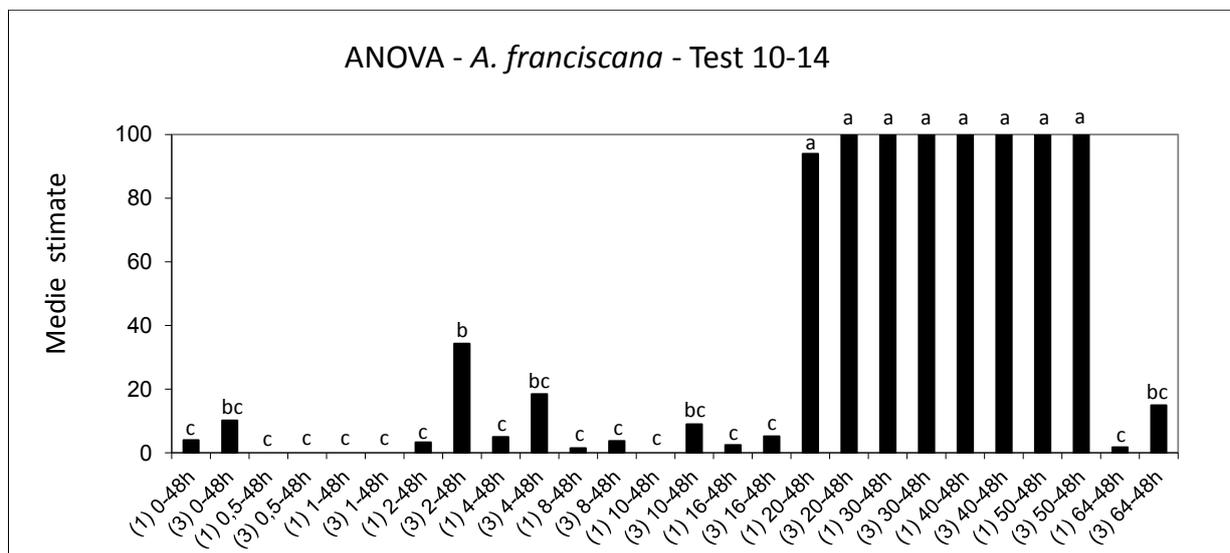


Figura 10.70 – Risultati del test ANOVA: confronto tra la serie a 48 h dello scenario (1) con quella a 48 h dello scenario (3).

Dopo le 48 h, nello scenario (1) è prevista la somministrazione di coltura algale ai nauplii di *Artemia*, cosa che non avviene nello scenario (3) e, quindi, sarebbe plausibile aspettarsi delle differenze tra le serie a 72 h e a 96 h dei due diversi scenari espositivi (1) e (3). Effettivamente, nel terzo scenario le serie a 72 h e a 96 h, per concentrazioni ≤ 16 mg L<sup>-1</sup>, hanno fatto registrare effetti di tossicità più alti rispetto al primo scenario, con valori medi pari a 50% e 60%, rispettivamente; per concentrazioni > di 16 mg L<sup>-1</sup>, invece, non sono apprezzabili differenze tra i

due scenari, essendosi potuto osservare sempre valori di effetto massimi, ad eccezione della concentrazione pari a  $64 \text{ mg L}^{-1}$ , in corrispondenza della quale le percentuali di tossicità sono diminuite (72% e 78%, rispettivamente). L'analisi della varianza dei dati ha permesso di ricavare che non esistono delle differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ ) tra le serie dei due differenti scenari.

Le evidenze sperimentali emerse e discusse sembrerebbero confermare l'ipotesi iniziale, ovvero che lo scenario (3), unendo la presenza di luce all'assenza di nutrimento, sia quello in grado di offrire le condizioni più ostili alla vita di *Artemia*. Sugli eventuali effetti legati alla presenza della luce si è già discusso durante la presentazione dei risultati dello scenario (2). Per quanto riguarda, invece, gli effetti dell'assenza di nutrimento si vogliono mettere in luce due aspetti. Il primo, come già accennato, si collega al fatto che la mancanza di cibo per i nauplii, da un punto di vista energetico, sia di per sé una condizione svantaggiosa rispetto agli altri scenari. Il secondo, invece, prende in considerazione l'assenza di un probabile effetto chelante che la sospensione algale potrebbe avere nei confronti delle ENP. Il potere chelante di una sostanza aggiunta al mezzo acquoso può costituire un elemento molto importante nella determinazione del reale scenario espositivo. Durante la presentazione dei risultati dello scenario (2), si è ipotizzato un meccanismo di tossicità causato dall'effetto irritante delle ENP per le vie respiratorie dei nauplii. Se la sospensione algale, però, fosse in grado di legarsi alle ENP, formando agglomerati più grossolani, il processo potrebbe portare ad un abbattimento delle particelle irritanti le quali, depositandosi sul fondo, sarebbero meno disponibili per i crostacei. In assenza di nutrimento questa sottrazione verrebbe a mancare. Si potrebbe ulteriormente obiettare che, sebbene la concentrazione delle ENP nella colonna d'acqua, una volta chelate, possa diminuire, di contro, la loro disponibilità attraverso il cibo potrebbe aumentare. I nauplii affamati, cibandosi della sospensione algale depositatasi, potrebbero ingerire così anche le ENP. A questo punto, però, rimarrebbe da verificare se gli effetti legati alle due diverse vie di esposizione, quella respiratoria e quella alimentare, possano essere confrontabili. Potrebbe darsi che l'azione irritante per le vie respiratorie porti alla manifestazione degli effetti avversi più rapidamente, rispetto all'ingestione e che quindi, per apprezzare degli effetti legati a questa seconda via di esposizione, 96 h non siano sufficienti.

### 10.5.2.2 Variazioni al protocollo: test con l'alginato

Come già proposto per l'alga *P. tricornutum* (cfr. par. 10.3.2.1), anche con *A. franciscana* si è tentata la sperimentazione con le ENP in presenza di alginato ( $0,45 \text{ mg L}^{-1}$ ), dal momento che questo sembrerebbe possedere un potere stabilizzante sulle dispersioni (Callegaro, comunicazione personale, articolo in preparazione). Nel caso dei crostacei, l'evoluzione dello scenario espositivo, nel tempo, dovrebbe essere opposta rispetto a quella per l'alga bentonica analoga a quella osservata per i bivalvi, visto che i nauplii di *Artemia* possono nuotare liberamente lungo la colonna d'acqua. Le ENP infatti, come è ormai noto, si depositano sul fondo in funzione della loro concentrazione iniziale, liberando la colonna d'acqua in tempi relativamente brevi. Quanto appena espresso può essere visualizzato con il modello riportato in figura 10.71.

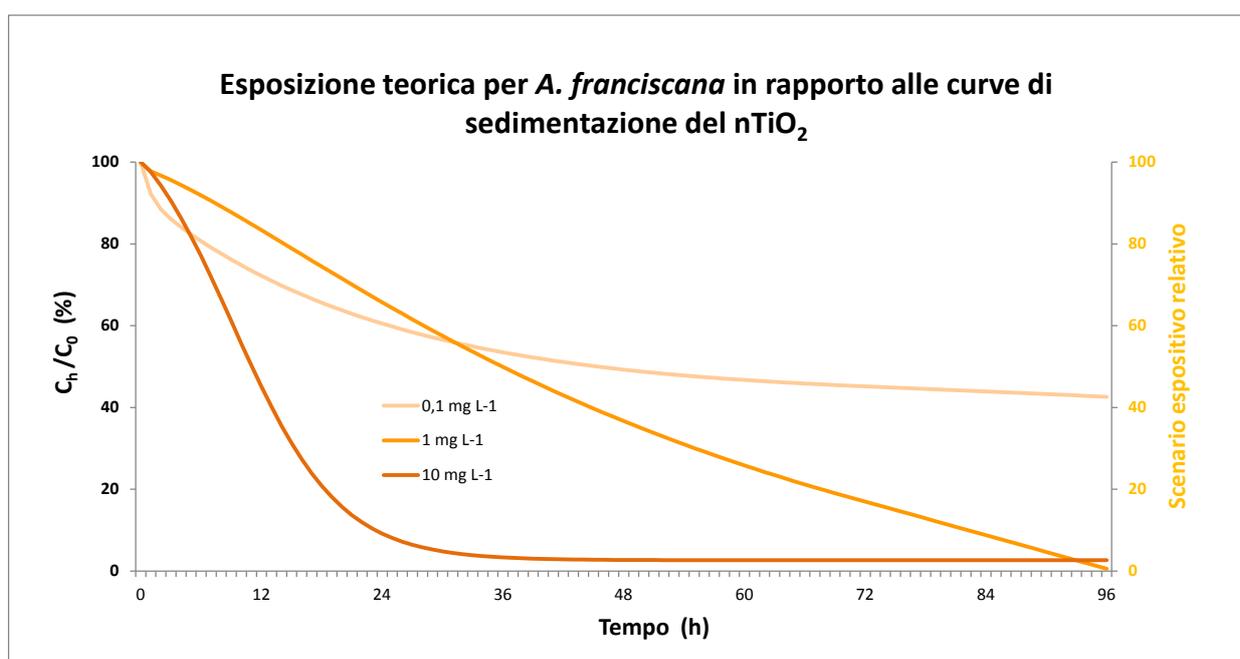


Figura 10.71 – Nel grafico si può osservare l'andamento delle 3 curve di deposizione del nTiO<sub>2</sub> per una concentrazione iniziale, rispettivamente, di 0,1, 1 e 10 mg L<sup>-1</sup>. Nelle ordinate principali si legge il valore del rapporto percentuale della concentrazione di nTiO<sub>2</sub> al tempo h (C<sub>h</sub>) rispetto alla concentrazione iniziale (C<sub>0</sub>). Nelle ordinate secondarie (in arancio) si può osservare l'andamento teorico dello scenario espositivo relativo per i nauplii di *A. franciscana* nelle 96 h successive all'inizio dell'esposizione, espresso da punteggio numerico compreso tra 0 (esposizione minima) e 100 (esposizione massima).

In presenza ed assenza di alginato sono state testate le dispersioni di nTiO<sub>2</sub> alle concentrazioni nominali pari a 0; 0,01; 0,1; 1; 5; 10; 30; 50; 70 e 90 mg L<sup>-1</sup>. L'immobilizzazione di *A. franciscana* è stata osservata ogni 24 h per 2 giorni. Trascorse 24 h, nessun effetto è stato

rilevato, né in presenza né in assenza di alginato, analogamente a quanto evidenziato al termine delle 48 h complessive di esposizione.

Nelle figg. 10.72 e 10.73, rispettivamente, sono riportati i dati di effetto relativi all'esposizione di 24 h e di 48 h, in relazione alle diverse concentrazioni di ENP utilizzate, sia in presenza che in assenza di alginato.

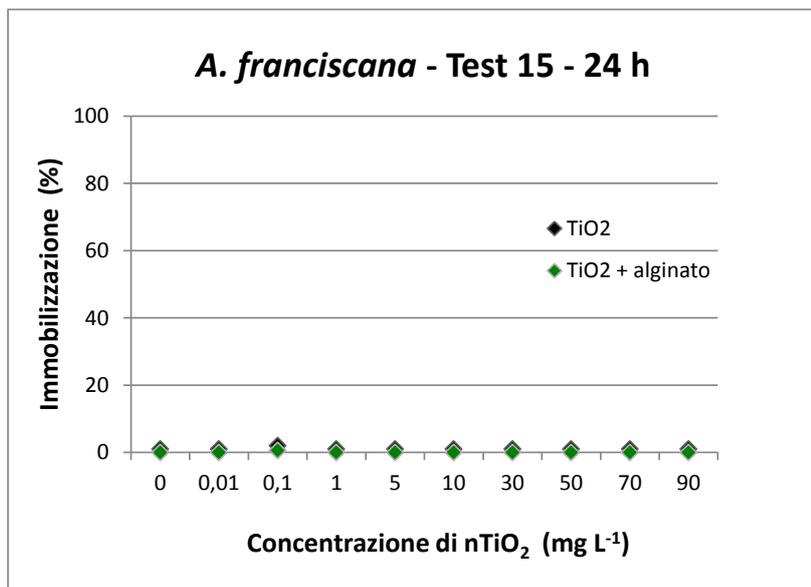


Figura 10.72 - Effetti del nTiO<sub>2</sub> nei confronti di *A. franciscana* a 24 h in presenza ed in assenza di alginato.

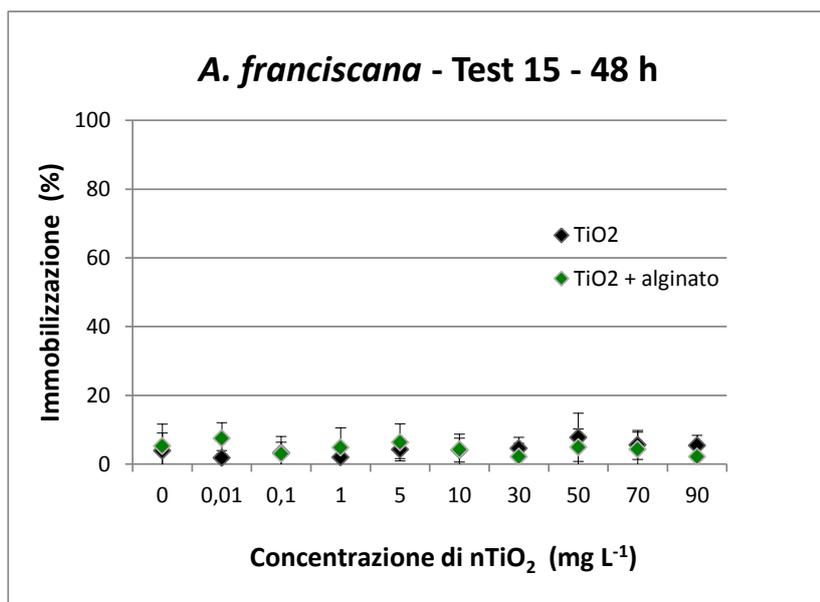


Figura 10.73 - Effetti del nTiO<sub>2</sub> nei confronti di *A. franciscana* a 48 h in presenza ed in assenza di alginato.

Se si confrontano ora i risultati dei controlli positivi (CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O), si può osservare una cosa interessante. Nel controllo positivo, in presenza di alginato, non sono stati rilevati effetti di sorta

dopo 24 h, mentre a 48 h è stato notato solo un leggero effetto. Nel controllo positivo in assenza di alginato, è stato determinato un EC50 a 24 h pari a 9,45 mg L<sup>-1</sup> e a 48 h pari a 5,73 mg L<sup>-1</sup>.

Il confronto delle serie a 24 h, con e senza alginato, ha fatto emergere l'assenza di una differenza statisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) nelle varianze dei dati, fatta eccezione per le concentrazioni pari a 8,4 mg L<sup>-1</sup> e 15 mg L<sup>-1</sup> (fig. 10.76). Tale omogeneità non è presente, invece, tra le serie a 48 h, con e senza alginato, le cui varianze medie si distribuiscono in 4 classi differenti (fig. 10.77).

Gli effetti di tossicità sono stati riportati graficamente nelle figure 10.74 e 10.75, rispettivamente per i controlli positivi con e senza alginato a 24 h e a 48 h di esposizione.

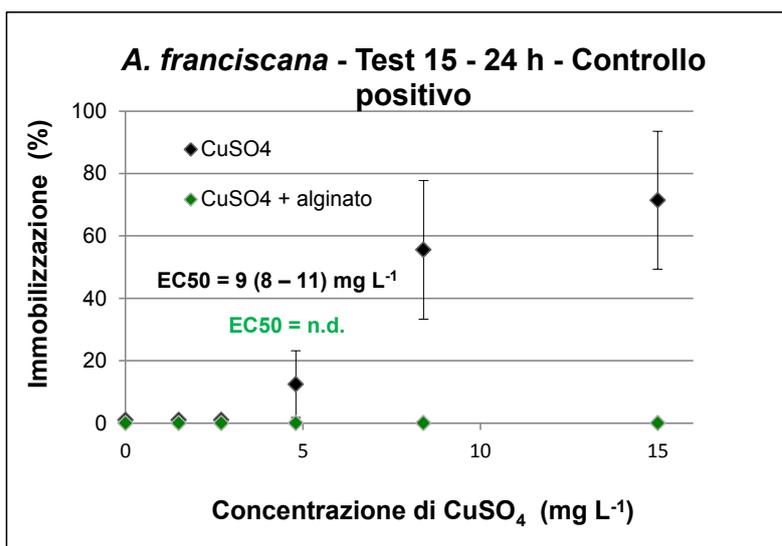


Figura 10.74 - Confronto degli effetti del controllo positivo in presenza ed in assenza di alginato (CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O) a 24 h. In evidenza i valori di EC50 (n.d. = non determinabile).

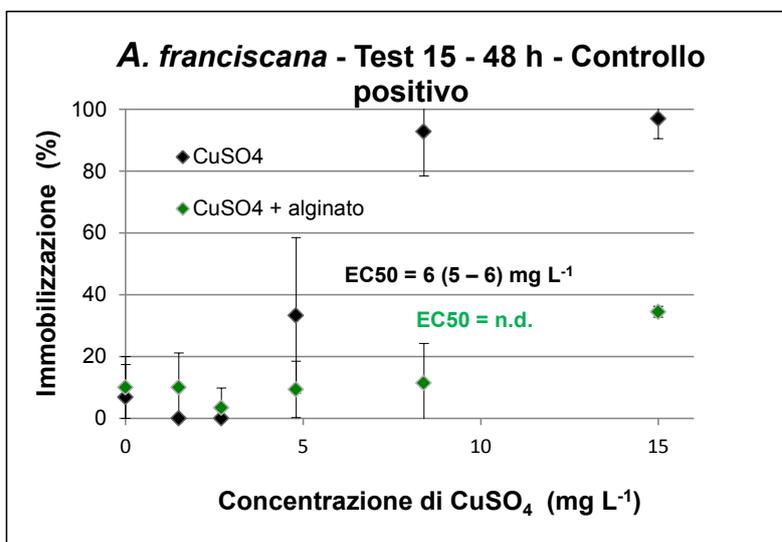


Figura 10.75 - Confronto degli effetti del controllo positivo in presenza ed in assenza di alginato (CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O) a 48 h. In evidenza i valori di EC50 (n.d. = non determinabile).

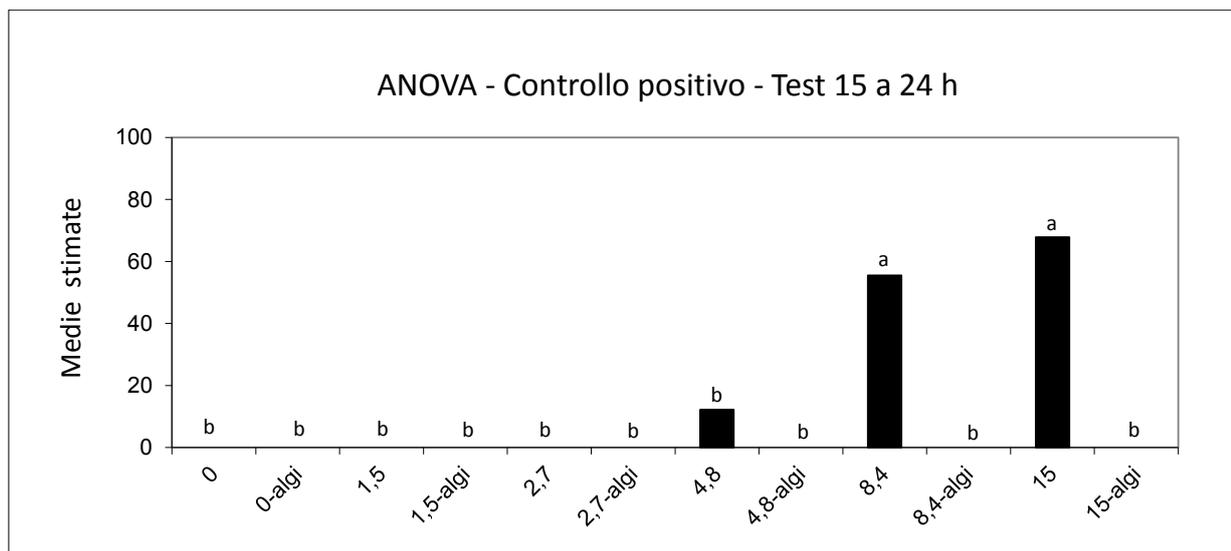


Figura 10.76 – Risultati del test ANOVA per il controllo positivo: confronto tra le serie a 24 h con e senza alginato.

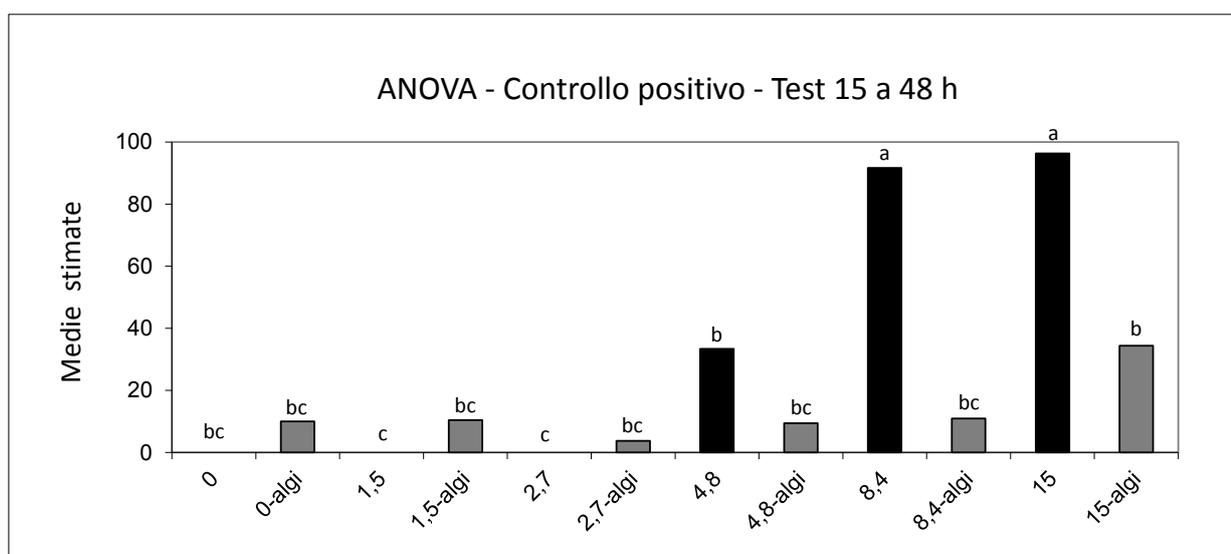


Figura 10.77 – Risultati del test ANOVA per il controllo positivo: confronto tra le serie a 48 h con e senza alginato.

Queste differenze nel controllo positivo non si sono verificate nel caso del test con l'alginato con *P. tricorntutum*, per il quale, si vuol ricordare, il tossico di riferimento è rappresentato dal  $K_2Cr_2O_7$  (cfr. par. 10.3.2.1) e, forse, la spiegazione risiede proprio nella differente natura dei tossici. Nel caso del  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  l'azione tossica è espletata dal **catione** bivalente  $Cu^{2+}$ , mentre invece, nel caso del  $K_2Cr_2O_7$ , è l'anione bivalente  $Cr_2O_7^{2-}$  il responsabile dell'effetto tossico. Poiché è stato rilevato che l'alginato è in grado di **adsorbire** i cationi bivalenti (Fatin-Rouge et al, 2006), questo potrebbe giustificare la riduzione dell'effetto tossico del  $Cu^{2+}$  in presenza dello stesso.

In ogni caso, a differenza di quanto visto per le alghe (cfr. par. 10.3.2.1), la presenza di alginato non sembra ridurre gli effetti tossici del  $nTiO_2$  e questo potrebbe, a sua volta, dipendere da altri due aspetti. Il primo di questi è rappresentato dal fatto che l'eventuale azione chelante, nel caso

di un organismo in grado di nuotare liberamente, non sortisce l'effetto di diminuire l'esposizione alle ENP, semmai quello di aumentarla. L'altro aspetto riguarda l'eventuale potere nutriente dell'alginato che, a differenza di quanto ipotizzato per le alghe, probabilmente, non costituirebbe una risorsa alimentare disponibile per i crostacei.

Infine, si vuol osservare che, forse, la presenza di alginato potrebbe costituire un fattore di disturbo, per almeno tre motivi e cioè:

- 1) potrebbe interferire con la bioenergetica degli organismi, i quali, trovandosi a nuotare in un mezzo più denso, sarebbero sottoposti ad uno stress maggiore;
- 2) potrebbe degradare il mezzo in cui è presente visto che si deteriora, contribuendo ad aumentare i già noti problemi legati alla qualità dell'acqua nei test a 96 h;
- 3) nel caso in cui i nauplii lo metabolizzassero, questo potrebbe essere restituito dagli organismi stessi come catabolita, e, quindi, contribuire anche in questo modo alla riduzione della qualità dell'acqua.

Non si ritiene pertanto una modifica da adottare.

#### 10.5.2.3 Variazioni al protocollo: illuminazione del nTiO<sub>2</sub> pre-inoculo

Tra i test che hanno previsto variazioni del protocollo, i nn. 08 e 09 sono gli unici test ecotossicologici condotti per una durata di sole 24 h. Lo scopo di questi esperimenti era quello di verificare se l'illuminazione preventiva delle dispersioni di nTiO<sub>2</sub> potesse causare effetti di tossicità maggiori, correlati all'innescò di eventuali reazioni fotocatalitiche in grado di produrre i ROS. Per **illuminazione preventiva** si intende l'esposizione alla luce delle diverse dispersioni di ENP, **prima dell'introduzione** degli organismi.

In pratica, nel caso del test n. 08, dopo la sonicazione, le dispersioni a diversa concentrazione (0; 10; 20; 30; 40 e 50 mg L<sup>-1</sup>) sono state trasferite nei pozzetti e, quindi, illuminate per 30 min con una lampada a luce fredda di potenza pari a 150 W. Gli organismi sono stati inoculati al termine dell'illuminazione e, successivamente, il test ha seguito le fasi previste dalle linee guida ed esposte al paragrafo 8.3.4 ovvero, per ribadirlo, l'esposizione è stata condotta in assenza di luce e a temperatura controllata (25 °C ± 1 °C). Una seconda piastra è stata allestita come controllo. In questa, il test si è svolto fedelmente alle linee guida con un'unica eccezione: anche se le dispersioni non sono state illuminate preventivamente, gli inoculi degli organismi sono avvenuti comunque dopo 30 min dal trasferimento di tali dispersioni nei pozzetti, per uniformare le condizioni operative delle due piastre.

I risultati hanno chiaramente evidenziato che non è stato riscontrato alcun effetto di immobilizzazione, per nessuna delle concentrazioni impiegate, sia nella piastra di controllo, sia in quella pre-illuminata.

Il test n. 09, condotto a concentrazioni 0; 10; 20; 30; 40 e 50 mg L<sup>-1</sup>, si è svolto con le stesse modalità seguite per il test n. 08. La differenza risiede nel fatto che, per il test n. 09, la durata dell'illuminazione preventiva è stata diversificata in 3 periodi di lunghezza differente: 30 min, 1 h e 12 h.

Anche in questo caso, nessun effetto di immobilizzazione è stato osservato, per nessuna delle concentrazioni impiegate, sia nella piastra di controllo, sia in quella pre-illuminata.

Evidentemente, gli effetti dell'attività fotocatalitica non si sono manifestati e, per questo fenomeno, può esistere più di una giustificazione.

1) Potrebbe essere stata insufficiente l'**esposizione** alla luce, per una questione di tempi e/o di intensità luminosa.

2) Forse, la **lunghezza d'onda** della lampada a luce fredda non è appropriata per condurre questo tipo di esperimento. In effetti, come già esposto al paragrafo 10.3.2.1, diversi autori hanno voluto testare le proprietà fotocatalitiche del nTiO<sub>2</sub>, utilizzando nei propri esperimenti delle lampade UV (Hund-Rinke and Simon, 2006; Reeves et al, 2007). La loro scelta non è stata condivisa in questo lavoro di tesi, poiché, nel limite del possibile, si è voluto ricreare uno scenario espositivo più simile alle condizioni ambientali naturali.

3) Probabilmente le reazioni di produzione dei ROS, ammesso che possano essersi innescate, non riescono a protrarsi anche dopo la cessazione dell'esposizione alla sorgente luminosa.

4) Più semplicemente, potrebbe essere che, relativamente alle concentrazioni utilizzate, il tempo di contatto con le ENP sia stato insufficiente per il manifestarsi di effetti di tossicità, anche ammesso che sia stata innescata la produzione dei ROS.

### 10.5.3 Riepilogo dei risultati conseguiti con *A. franciscana*

Da quanto emerso nel corso di questa sperimentazione, per misurare gli effetti di tossicità del nTiO<sub>2</sub> impiegando il crostaceo *A. franciscana*, sono maggiormente indicati test ecotossicologici che abbiano tempi di esposizione superiori alle 24 h.

Partendo dal test di tossicità a 96 h e variando opportunamente le condizioni di luce e cibo, si sono ottenuti 3 scenari espositivi differenti. Il primo (1), per cui erano previsti fotoperiodo e il nutrimento dei nauplii, evidenziava l'esistenza di una correlazione positiva tra gli effetti di tossicità riscontrati e la concentrazione di ENP; l'intensità degli effetti, inoltre, era positivamente correlata anche ai tempi di osservazione. E' stato possibile ricavare dei valori di EC50 che, per

l'esposizione di 24, 48 e 72 h, erano rispettivamente pari a 26,52 mg L<sup>-1</sup>, 17,74 mg L<sup>-1</sup> e 13,40 mg L<sup>-1</sup>. Il secondo scenario (2), per cui era previsto il nutrimento dei nauplii ma senza illuminazione, si è rivelato essere quello più favorevole alle condizioni di sopravvivenza dei crostacei. Infatti, nelle prime 48 h, gli effetti si sono mantenuti quasi nulli, ad eccezione di due picchi (a 48 h) in corrispondenza di 0,5 mg L<sup>-1</sup> (58%) e 1 mg L<sup>-1</sup> (62%). E' interessante osservare come, anche in questo caso, i valori di effetto massimo compaiano in corrispondenza delle concentrazioni minime. Data l'assenza di luce, inoltre, si presume che gli effetti evidenziati non siano di origine foto-chimica ma meccanica, legati probabilmente all'irritazione e/o all'ostruzione delle vie respiratorie dei nauplii ed ai possibili danni dovuti all'ingestione. Potrebbe anche darsi che il minor effetto manifestatosi sia causato dal fatto che, al buio, i nauplii si muovano (e quindi respirino) di meno. Il terzo scenario (3), per cui era previsto fotoperiodo ma assenza di cibo, si è mostrato il più duro in termini di condizioni di sopravvivenza dei nauplii. Tale scenario, infatti, combina gli effetti della luce (emissione di ROS) con quelli legati alla mancanza di un elemento che possa sottrarre le ENP dalla colonna d'acqua o che ne schermi l'azione. Ovviamente, si deve tener in considerazione il fatto che l'assenza di cibo è di per se stessa causa di indebolimento per gli organismi. A 72 h e a 96 h, infatti, la mortalità è stata generalmente elevata anche a concentrazioni < 20 mg L<sup>-1</sup>. Per l'esposizione di 24 h, è stato possibile ricavare un valore di EC50 pari a 27,13 mg L<sup>-1</sup>.

Anche con *A. franciscana* è stato testato l'impiego di alginato come mezzo disperdente le ENP nei mezzi acquosi. Sia in presenza che in assenza di alginato, nessun effetto di mortalità si è reso evidente, nell'intervallo di concentrazioni comprese tra 0,01 e 90 mg L<sup>-1</sup>. In presenza di alginato, però, rispetto al controllo, si è osservata un'importante riduzione degli effetti di tossicità, per quanto riguarda i controlli positivi (CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O). Si pensa che il fenomeno sia giustificabile con la capacità dell'alginato di **adsorbire** i cationi bivalenti (Fatin-Rouge et al, 2006), come appunto il Cu<sup>2+</sup>.

Nessuna differenza rispetto al controllo, invece, è stata osservata negli esperimenti che prevedevano l'illuminazione dei mezzi acquosi contenenti nTiO<sub>2</sub>, prima dell'introduzione dei nauplii.

## 10.6 Analisi specifiche

### 10.6.1. Risultati del test di bioaccumulo

L'esperimento è stato allestito per quantificare l'eventuale accumulo di Ti, usando come modello biologico il crostaceo *A. franciscana*. Il test è stato condotto, in due repliche, come un tradizionale test sub-acuto a 96 h, secondo le linee guida del protocollo APAT & IRSA CNR (2003). Dopo 48 h di esposizione al tossico, una delle due repliche (R1) è stata nutrita con l'alga bentonica *P. tricorutum*, mentre per l'altra (R2), si è utilizzata l'alga *D. tertiolecta*, flagellata e natante. Si è scelto di diversificare l'alimentazione proprio perché le due specie algali, all'interno dei pozzetti, si distribuiscono diversamente, come le ENP e, quindi, potrebbero osservarsi delle differenze nell'assunzione del nTiO<sub>2</sub>, legate al diverso cibo disponibile.

Sono stati registrati e riportati di seguito sia la tossicità che si è manifestata nel corso dello svolgimento del test (a 24, 48, 72 e 96 h), sia il bioaccumulo a 96 h. Inoltre, trattandosi di un test statico, condotto per un tempo prolungato, si è tenuto sotto controllo un parametro, l'NH<sub>3</sub>, che potrebbe contribuire alla tossicità manifestata durante il test.

#### 10.6.1.1 Evidenze di tossicità nelle 96 h

I risultati complessivi del test, a 96 h, sono stati riassunti nei seguenti grafici 10.78 e 10.79.

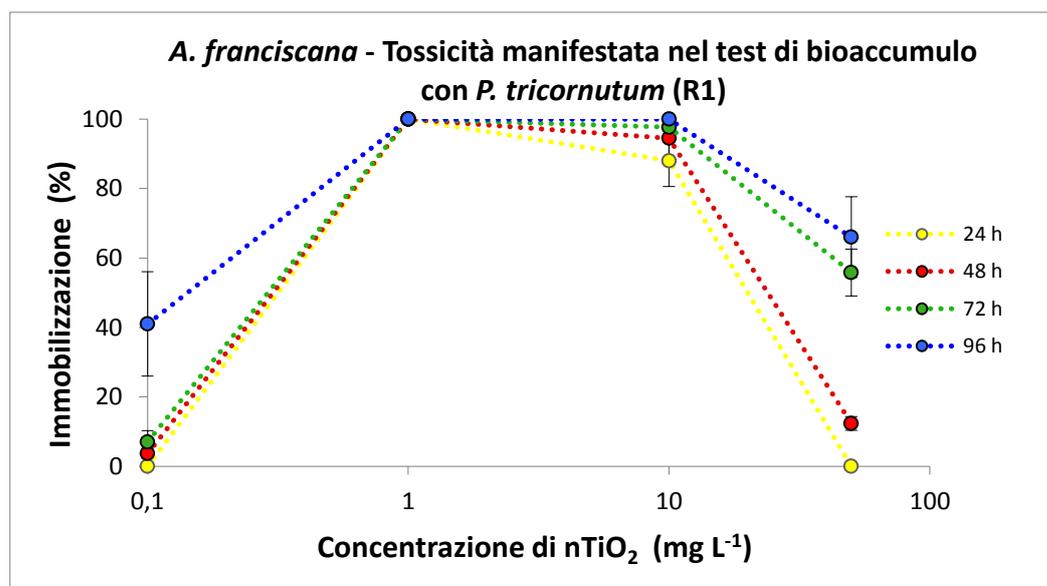


Figura 10.78 – Evidenze di tossicità del test di bioaccumulo a 96 h con *A. franciscana* e *P. tricorutum*. L'alga, coltivata in un mezzo incontaminato, è stata somministrata ai crostacei dopo 48 h dall'inizio dell'esposizione, in misura di c.a 10<sup>6</sup> cellule.

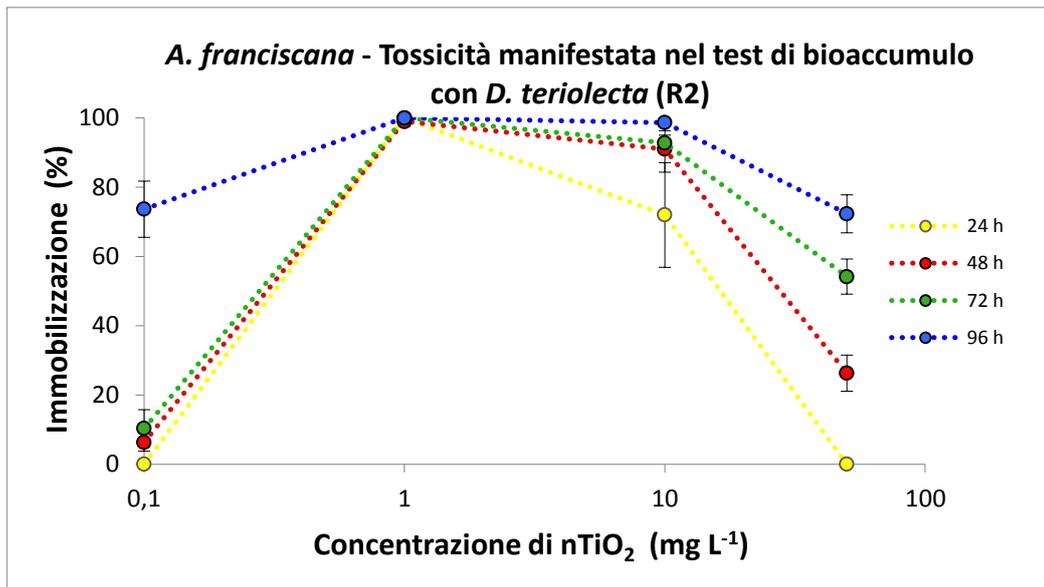


Figura 10.79 – Evidenze di tossicità del test di bioaccumulo a 96 h con *A. franciscana* e *D. teriolecta*. L'alga, coltivata in un mezzo incontaminato, è stata somministrata ai crostacei dopo 48 h dall'inizio dell'esposizione, in misura di c.a 10<sup>6</sup> cellule.

Come si può osservare, i risultati di tossicità ottenuti non sembrano dipendere dalla tipologia di alimento fornito ai nauplii di *Artemia*. In entrambi i casi, infatti, già a 24 h, si è assistito alla manifestazione dell'effetto massimo in corrispondenza della concentrazione minima di ENP fornita (1 mg L<sup>-1</sup>). A 10 mg L<sup>-1</sup>, invece, la percentuale di immobilizzazione, a 24 h, risultava relativamente inferiore, cioè 88% e 72%, rispettivamente, per R1 ed R2. Le osservazioni fatte a 48 h, 72 h e 96 h, invece, evidenziavano effetti molto simili tra loro, da 95% a 100% per R1 e da 91% a 99% per R2. Infine, in corrispondenza della massima concentrazione testata (50 mg L<sup>-1</sup>), si sono registrati gli effetti minimi. In questo caso la dipendenza degli effetti dai tempi di osservazione risulta evidente. Bisogna comunque specificare che, a 96 h, il controllo negativo per entrambe le repliche presenta dei valori di effetto superiori al limite tollerato (15%), rispettivamente, 41% e 74% per R1 ed R2, a conferma di quanto già evidenziato all'inizio del paragrafo 10.5.2.1.

Il confronto delle varianze per le repliche R1 ed R2 col test ANOVA (figg. 10.80 a)-d)) ha confermato che non risultano evidenti differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ ) tra le varianze dei dati, con due uniche eccezioni: sono differenti, a 24 h, i valori corrispondenti alla concentrazione di 10 mg L<sup>-1</sup>, mentre, a 96 h, sono differenti i valori corrispondenti ai controlli negativi.

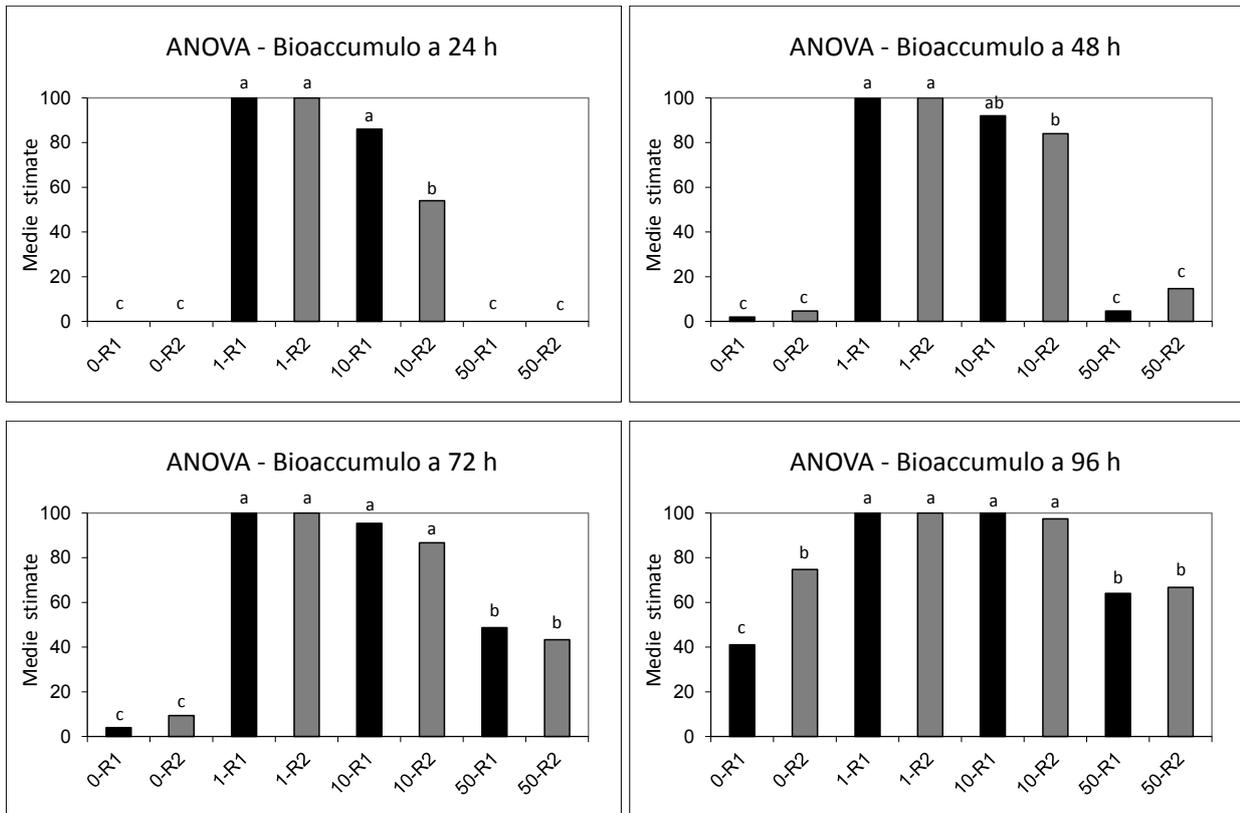


Figura 10.80 a)–d) - Risultati del test ANOVA per il test di bioaccumulo: confronto tra le repliche R1 ed R2, nei vari tempi (24 h – 96 h).

### 10.6.1.2 Risultati del contenuto di ammoniaca

I risultati ricavati col test per il contenuto di ammoniaca dei pozzetti sono riassunti nel seguente grafico 10.81.

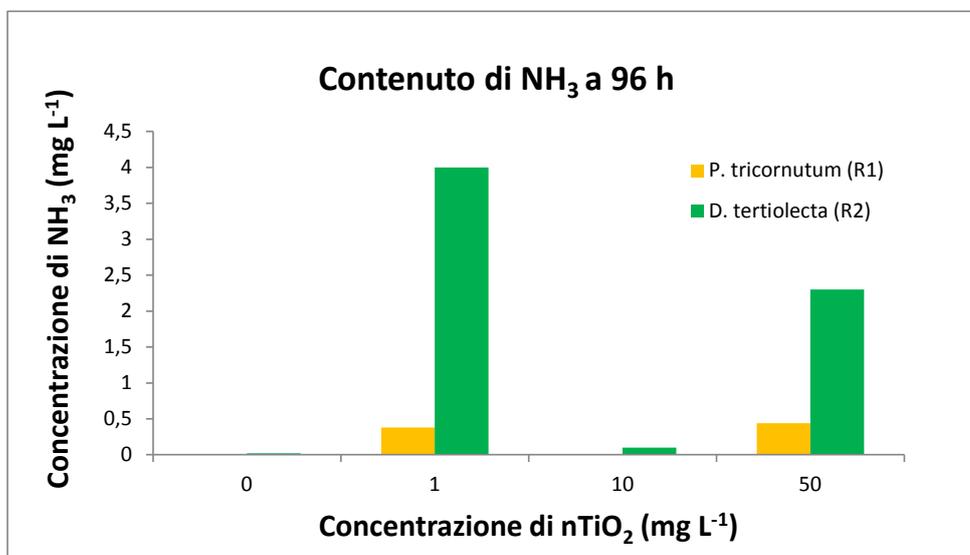


Figura 10.81 – Contenuto di NH<sub>3</sub> nei mezzi utilizzati per il test di bioaccumulo, a 96 h, con *A. franciscana*; i nauplii erano stati nutriti, rispettivamente, con le alghe *P. tricornutum* (in arancio) e *D. tertiolecta* (in verde).

Come si può notare, a parità di concentrazione di nTiO<sub>2</sub>, laddove i crostacei sono stati nutriti con l'alga *D. tertiolecta* il contenuto di NH<sub>3</sub> è risultato notevolmente maggiore. Questo potrebbe significare che ci sia stata una maggior produzione di cataboliti. Poiché, però, preventivamente alla somministrazione, erano stati effettuati i conteggi cellulari per entrambe le specie algali (cfr. par. 9.4.1), è plausibile escludere che le ragioni delle diversità rilevate possano ricondursi a differenti quantità dei due alimenti forniti. Piuttosto, appaiono più probabili le seguenti due ipotesi:

- 1) *D. tertiolecta* potrebbe risultare più **appetibile** per i nauplii, rispetto a *P. tricorutum* e, di conseguenza, a parità di cellule algali disponibili, *D. tertiolecta* potrebbe essere consumata più rapidamente ed in quantità maggiori;
- 2) *D. tertiolecta*, essendo una specie natante al pari dei nauplii, potrebbe risultare più **disponibile** rispetto alla bentonica *P. tricorutum*; per nutrirsi di quest'ultima, infatti, i crostacei sarebbero costretti a raggiungere il fondo dei pozzetti, cosa che, probabilmente, preferiscono evitare, a causa dell'accumulo di ENP.

In ogni caso, indipendentemente da un'eventuale assunzione diversificata, confrontando i dati di tossicità del test, non sembrano emergere differenze che possano essere correlate ai diversi livelli di NH<sub>3</sub> registrati. Fino a 48 h, si ribadisce, le due repliche del test R1 ed R2 non presentano differenze per quanto riguarda quelle che sono le condizioni di esecuzione; dopo le 48 h, R1 ed R2 ricevono una quantità di cellule algali confrontabile ma costituita da specie diverse. A partire da questo punto, gli scenari dovrebbero diversificarsi. I valori di NH<sub>3</sub> sono stati rilevati sui mezzi raccolti dopo 96 h ma, per semplificare l'argomentazione, si supponga che gli effetti osservati si siano manifestati già a partire da 72 h. Confrontando i valori di NH<sub>3</sub> rilevati alle concentrazioni di nTiO<sub>2</sub> pari a 1 mg L<sup>-1</sup>, si può vedere come questi siano ben diversi ovvero 0,38 mg L<sup>-1</sup> e 4 mg L<sup>-1</sup>, rispettivamente per R1 ed R2; eppure, per le due repliche, la tossicità a 72 h è risultata identica (100%). Lo stesso fenomeno si ripropone anche per le concentrazioni di nTiO<sub>2</sub> pari a 50 mg L<sup>-1</sup>, dove i valori di NH<sub>3</sub> rilevati, sono stati di 0,44 mg L<sup>-1</sup> e 2,3 mg L<sup>-1</sup>, rispettivamente, per R1 ed R2. Anche in questo caso, la tossicità rilevata a 72 h è stata del 56% e 54%, rispettivamente, per R1 ed R2, quindi, confrontabile nonostante le diverse concentrazioni di ammoniaca. I cataboliti, dunque, non sembrerebbero essere responsabili delle differenze di effetto osservate, che, quindi, sono attribuibili alle sole ENP.

A conferma di ciò, infine, si vuol citare l'articolo di Ostrensky et al (1992) in cui sono stati analizzati gli effetti dell'ammoniaca nei confronti dei nauplii del genere *Artemia*, per un'esposizione massima di 96 h, ricavando delle EC50 comprese tra 650 mg L<sup>-1</sup> (24 h) e 399 mg L<sup>-1</sup>

(96 h). Tali valori porterebbero, decisamente, ad escludere che gli effetti registrati in questo test possano essere stati causati dalla presenza di ammoniaca, il cui valore massimo corrispondeva a  $4 \text{ mg L}^{-1}$ .

#### 10.6.2 Risultati delle analisi con ICP-OES

La quantificazione del contenuto totale di Ti delle dispersioni, a diversa concentrazione, ha evidenziato una discreta corrispondenza tra le concentrazioni nominali e quelle reali misurate. Si deve tener presente, infatti, che la massa del Ti totale, corrisponde a circa il 60% del  $\text{TiO}_2$  totale e, di conseguenza, le concentrazioni nominali di  $\text{TiO}_2$  pari a 1, 10 e  $50 \text{ mg L}^{-1}$  corrispondono a concentrazioni nominali di Ti pari a 0,6, 6 e  $30 \text{ mg L}^{-1}$ .

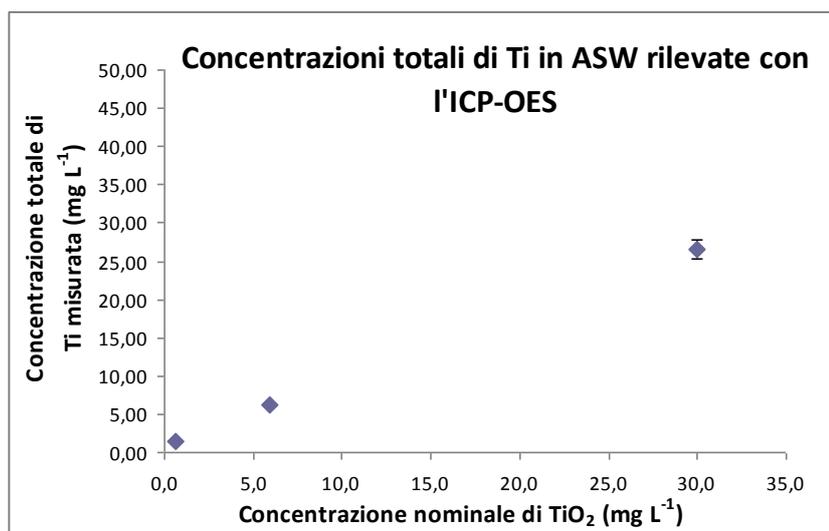


Figura 10.82 – Risultati delle analisi con ICP-OES del contenuto totale di Ti nelle dispersioni utilizzate per il test di bioaccumulo a 96 h con *A. franciscana*. Le diverse aliquote delle dispersioni sono state prelevate non appena terminata la sonicazione.

Come si può osservare nel grafico in figura 10.82 ai valori di concentrazione nominale pari a 0,6, 6 e  $30 \text{ mg L}^{-1}$  corrispondono, rispettivamente, concentrazioni reali pari a  $1,40 \pm 0,02 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $6,16 \pm 0,07 \text{ mg L}^{-1}$  e  $26,54 \pm 1,24 \text{ mg L}^{-1}$ . In termini percentuali ciò equivale ad affermare che a  $0,6 \text{ mg L}^{-1}$  la concentrazione reale corrisponde al 233% di quella nominale; a  $6 \text{ mg L}^{-1}$  la corrispondenza è del 102% e si riduce a 89% nel caso di  $30 \text{ mg L}^{-1}$ . Il fenomeno è difficilmente spiegabile, dal momento che le differenti dispersioni sono state preparate, per diluizione, partendo da una stessa soluzione stock di concentrazione pari a  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  e questa, a sua volta, era stata preparata mediante una pesata diretta del  $n\text{TiO}_2$ . L'errore, quindi, dovrebbe essere proporzionale in tutte le dispersioni, mentre invece, questo non si verifica. Ancora una volta, quindi, verrebbe da pensare ad un problema legato alla diversa velocità di precipitazione

degli agglomerati in funzione della concentrazione di partenza. Le curve di sedimentazione prodotte ed utilizzate in questo lavoro e quelle fornite dagli altri autori (cfr. par. 10.1.2.5) però, non giustificano una precipitazione così rapida delle ENP disperse. Bisogna considerare, infatti, che le aliquote per le diluizioni sono state prelevate pochi secondi dopo il termine del processo di sonicazione. Da ciò si potrebbe dedurre che, forse, la discordanza abbia un'origine nella distribuzione non omogenea delle ENP, seppur disperse mediante sonicazione. Se tale ipotesi fosse verificata, ne deriverebbe che il contenuto di ENP in aliquote differenti, prelevate dalla stesso campione, potrebbe essere non necessariamente lo stesso, rischiando di divenire, di volta in volta, praticamente aleatorio. Naturalmente, tale critica deve essere considerata sotto un'ottica costruttiva, senza sminuire il valore scientifico di quanto prodotto fino ad oggi: semplicemente, questa è l'ennesima conferma dell'importanza o, meglio, della necessità di affiancare delle analisi chimiche di quantificazione ai test ecotossicologici condotti con le ENP in ciascun trattamento.

Per quanto riguarda il contenuto totale di Ti rimasto nei pozzetti al termine del test di bioaccumulo (96 h), le analisi hanno permesso di ricavare i risultati riportati in figura 10.83. Tali valori corrispondono al Ti che non è stato assunto dai crostacei (separati dal mezzo – cfr. par. 9.4.1).

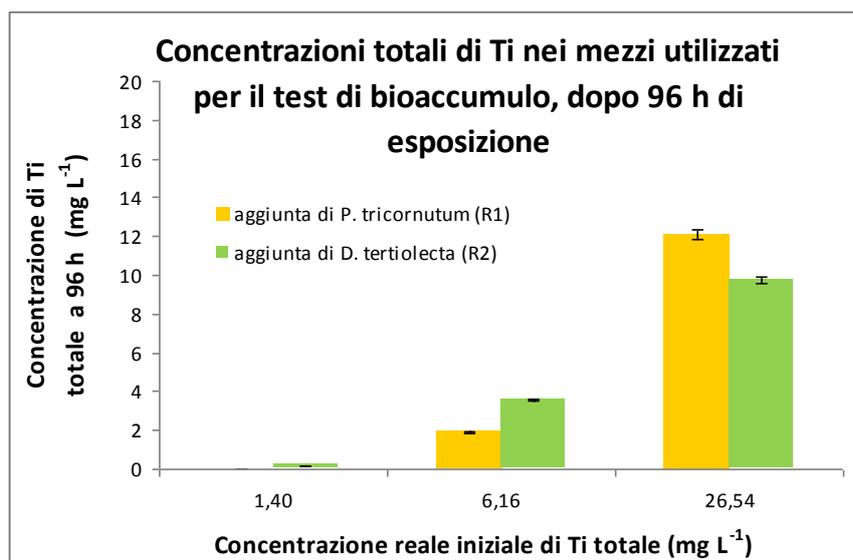


Figura 10.83 – Risultati delle analisi con ICP-OES del contenuto totale di Ti residuo nei pozzetti, dopo 96 h dall'inizio del test.

I dati analitici evidenziano che le differenze tra coppie di valori (R1 ed R2), corrispondenti alla stessa concentrazione, sono minime. Nei pozzetti in cui la concentrazione iniziale **reale** era di 1,4 mg L<sup>-1</sup> è stata rilevata una concentrazione totale di Ti pari a 0 ± 0,0 mg L<sup>-1</sup> e 0,3 ± 0,0 mg L<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>, rispettivamente per R1 ed R2; dove c'erano 6 mg L<sup>-1</sup> ne sono stati rilevati 2,1 ± 0,0 mg L<sup>-1</sup> e 3,7 ± 0,0 mg L<sup>-1</sup>, rispettivamente per R1 ed R2 ed infine, in corrispondenza di 26,5 mg L<sup>-1</sup> iniziali, sono stati rilevati 12,3 ± 0,2 mg L<sup>-1</sup> e 9,8 ± 0,1 mg L<sup>-1</sup> per R1 ed R2, rispettivamente. Mediando il dato delle 2 repliche R1 ed R2, si ricava che nei pozzetti, dopo un'esposizione di 96 h dei crostacei a concentrazioni di 1,4, 6,16 e 26,5 mg L<sup>-1</sup> iniziali, rimangono, rispettivamente 11%, 46% e 42%, come sintetizzato nella seguente tabella 10.84.

CONCENTRAZIONE ATTESA di Ti (mg L <sup>-1</sup> )	CONCENTRAZIONE MISURATA a 96 h (mg L <sup>-1</sup> ) – media R1 e R2	RECUPERO (%)	DIFFERENZA (%)
1,40	0,16	11	89
6,16	2,86	46	54
26,54	11,05	42	58

Figura 10.84 – Recupero e perdita medi percentuali del Ti totale misurato all'interno dei pozzetti dopo 96 h.

Infine, con l'ausilio dell'ICP-OES, sono state quantificate le concentrazioni totali di Ti nei nauplii di *A. franciscana*, esposti alle ENP per 96 h complessive. I risultati, riassunti in figura 10.85, sono stati espressi come mg di Ti totale per unità di volume, in modo tale da poter agevolare il calcolo del bilancio di massa.

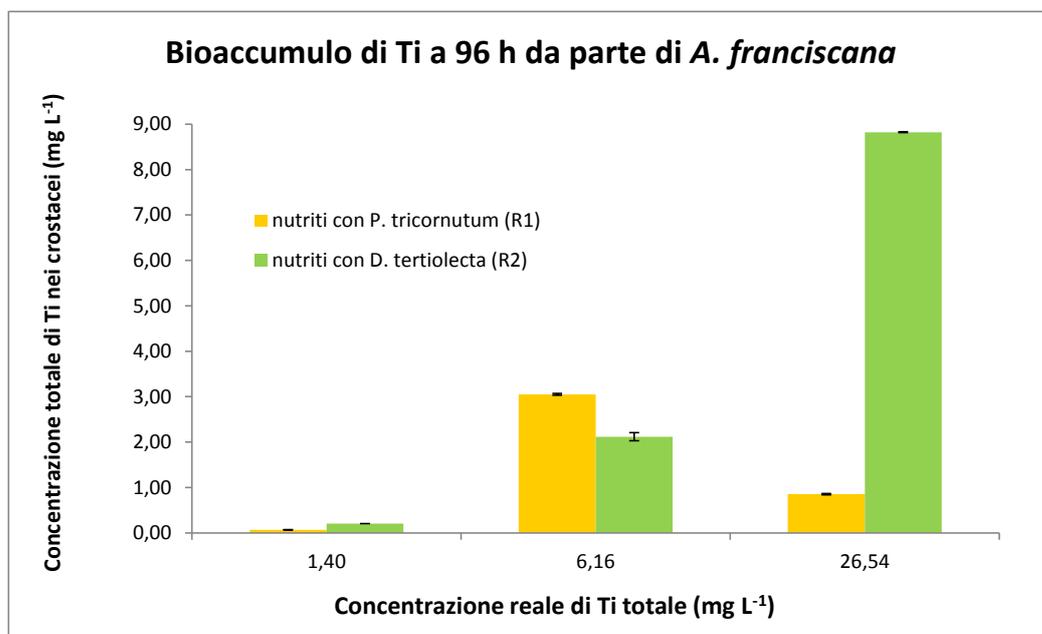


Figura 10.85 – Risultati delle analisi con ICP-OES del contenuto totale di Ti nei nauplii di *A. franciscana*, dopo 96 h dall'inizio del test.

Come si può osservare, i valori rilevati per le due serie R1 ed R2 non sembrano differire in maniera significativa ( $p < 0,05$ ), fatta eccezione per la concentrazione pari a  $26,54 \text{ mg L}^{-1}$ . In corrispondenza di  $1,40$ ,  $6,16$  e  $26,54 \text{ mg L}^{-1}$ , i valori delle repliche R1 ed R2 sono risultati, rispettivamente, pari a  $0,07 \pm 0,00 \text{ mg L}^{-1}$  e  $0,21 \pm 0,00 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $3,05 \pm 0,09 \text{ mg L}^{-1}$  e  $2,12 \pm 0,02 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $0,86 \pm 0,01 \text{ mg L}^{-1}$  e  $8,82 \pm 0,01 \text{ mg L}^{-1}$ .

Solamente per la replica R2 il bioaccumulo sembra essere positivamente correlato alle concentrazioni crescenti di Ti, mentre per R1, il picco di bioaccumulo si manifesta a  $6,16 \text{ mg L}^{-1}$ , dopodichè si osserva un'evidente diminuzione. Per questi motivi, nel caso dell'alimentazione con *P. tricornutum*, non è stato possibile ricavare alcuna relazione matematica lineare tra i valori del contenuto di Ti negli organismi ed il logaritmo delle concentrazioni effettive di Ti totale. Osservando i risultati, infatti, si può vedere che il massimo dell'assunzione si verifica in corrispondenza di  $6,16 \text{ mg L}^{-1}$  e non di  $26,54 \text{ mg L}^{-1}$ . Si potrebbe pensare, quindi, che questa diversità nell'accumulo di Ti sia correlabile al tipo di alga assunta dai crostacei che, come ribadito in precedenza, ha un comportamento bentonico. Nel tentativo di interpretare questa evidenza, si è reso necessario un confronto dei dati di tossicità del test con quelli di bioaccumulo (cfr. figg. 10.78) e, tale accostamento, ha fatto emergere due osservazioni.

La prima consiste nel fatto che nei dati di tossicità, già a **24 h**, si osservano effetti di immobilizzazione, pari a 100% e 88%, rispettivamente per concentrazioni di 1 e  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , corrispondenti a  $1,40$  e  $6,16 \text{ mg L}^{-1}$  reali. È stato più volte menzionato, però, che le alghe erano somministrate ai crostacei solamente **dopo 48 h** di esposizione e quindi ciò significa che i nauplii erano già morti, ancor prima della somministrazione algale. Perciò, la quantità di Ti presente al loro interno probabilmente è imputabile soltanto all'**assunzione diretta** dal mezzo acquoso avvenuta precedentemente, durante le prime 24 h (o in quelle successive per i pochi sopravvissuti). Decade perciò l'ipotesi secondo la quale, per nutrirsi dell'alga bentonica, i nauplii siano costretti a scendere verso il fondo del pozzetto, dove si concentrano maggiormente le ENP.

La seconda osservazione, conseguenza della prima, si basa sul fatto che se è vero che il bioaccumulo è dovuto all'assunzione di Ti dai mezzi acquosi, allora la mortalità dei crostacei potrebbe non essere necessariamente legata all'aspetto **quantitativo** di tale assunzione. Infatti, dal confronto tra i grafici 10.78 e 10.85, emerge che, a 24 h, la mortalità è maggiore (100%) in corrispondenza di una concentrazione di bioaccumulo pari a  $0,07 \text{ mg L}^{-1}$  mentre, ad un bioaccumulo di  $3,05 \text{ mg L}^{-1}$  (43 volte maggiore) corrisponde una mortalità del 88%. Ancora una volta, quindi, sembrerebbe che per la determinazione del reale scenario espositivo si debbano

valutare altri parametri (area superficiale, stato di agglomerazione, ecc.) e non fermarsi al mero aspetto quantitativo.

Nel caso in cui gli individui siano stati nutriti con *D. tertiolecta*, invece, è osservabile una relazione lineare esistente fra i dati di bioaccumulo ( $\text{mg g}^{-1}$ ) ed il ln della concentrazione di Ti impiegata nel test, relazione che è rappresentata da una retta avente equazione  $Y = 0,0416 \ln(X) - 0,0099$ , con  $R^2 = 0,9975$  ed un errore standard  $\varepsilon = 0,0369$ , come si può osservare in figura 10.86.

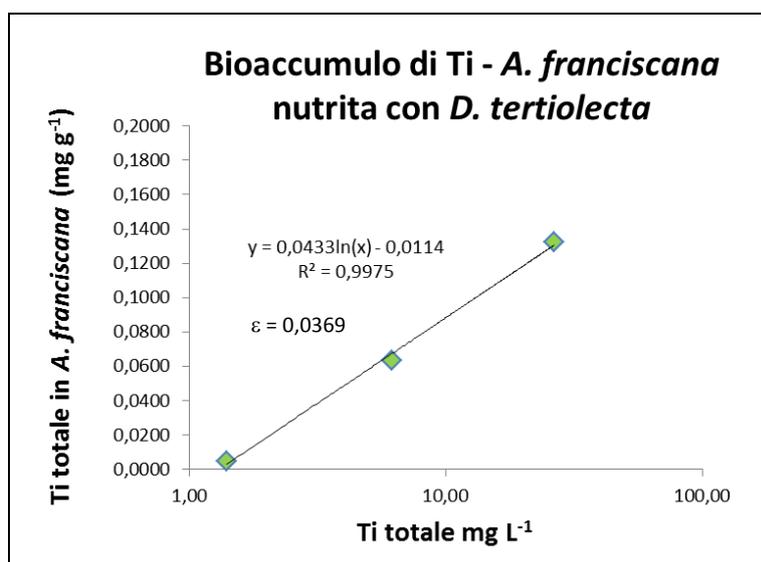


Figura 10.86 – Bioaccumulo di Ti da parte dei nauplii di *A. franciscana* nutriti con *D. tertiolecta*.

Ad ogni modo, anche per il trattamento in presenza di *D. tertiolecta*, valgono le due osservazioni espresse in precedenza nel caso di *P. tricorutum*. Infatti, se si confrontano le evidenze di tossicità del test con i dati di bioaccumulo si può convenire che l'assunzione di Ti da parte dei nauplii dev'essere antecedente l'aggiunta delle alghe, visto che, a 24 h, sono già osservabili (fig. 10.79) effetti di immobilizzazione pari a 100% e 72%, rispettivamente per concentrazioni di 1 e 10  $\text{mg L}^{-1}$ , corrispondenti a 1,40 e 6,16  $\text{mg L}^{-1}$  reali. Inoltre, sebbene l'accumulo sia maggiore all'aumentare della concentrazione di Ti totale impiegata, gli effetti di mortalità non sembrano essere correlati a tale crescita.

Considerando, infine, i valori reali di Ti totale misurati:

- al termine della sonicazione ( $C_t$ );
- all'interno dei pozzetti dopo 96 h di esposizione dei crostacei ( $C_w$ );
- nei bioti ( $C_b$ )

è possibile calcolare il bilancio di massa come segue:

$$C_t = C_w + C_b + X$$

dove X rappresenta la perdita operativa legata ai vari passaggi operativi (filtrazione, trasferimenti, ecc.).

I risultati del bilancio di massa sono stati riassunti nella seguente tabella 10.87.

SPECIE ALGAL FORNITA	CONCENTRAZIONE INIZIALE EFFETTIVA di Ti (mg L <sup>-1</sup> )	CONCENTRAZIONE MISURATA NEI POZZETTI a 96 h (mg L <sup>-1</sup> )	CONCENTRAZIONE ALL'INTERNO DEGLI ORGANISMI (mg L <sup>-1</sup> )	RECUPERO (%)	PERDITA (%)
<i>P. tricornutum</i>	1,40	0,00	0,07	5,36	94,64
<i>P. tricornutum</i>	6,16	2,06	3,05	83,06	16,94
<i>P. tricornutum</i>	26,54	12,26	0,86	49,41	50,59
<i>D. tertiolecta</i>	1,40	0,31	0,21	37,24	62,76
<i>D. tertiolecta</i>	6,16	3,65	2,12	93,75	6,25
<i>D. tertiolecta</i>	26,54	9,84	8,82	70,32	29,68

Figura 10.87 – Bilancio di massa per il Ti totale impiegato nel test di bioaccumulo.

Dal bilancio finale sembrerebbe che, per entrambe le serie, la differenza maggiore tra i valori di Ti attesi e quelli effettivamente recuperati si verifichi alla concentrazione minore di 1,40 mg L<sup>-1</sup>, dove le perdite sono, rispettivamente, 95% e 63% per R1 ed R2. Il caso ottimale corrisponde alla concentrazione intermedia di 6,16 mg L<sup>-1</sup> (17% e 6%, per R1 ed R2) mentre, a 26,54 mg L<sup>-1</sup> si perdono, rispettivamente, il 51% ed il 29% per R1 ed R2. Il fenomeno, nel suo complesso, è difficilmente spiegabile. Nel caso particolare della concentrazione minore (1,40 mg L<sup>-1</sup>), una possibile spiegazione potrebbe risiedere nel fatto che, partendo da valori già bassi, eventuali perdite di materiale durante le varie fasi operative potrebbero portare ad un ammanco finale proporzionalmente maggiore.

### 10.6.3 Riepilogo dei risultati del test di bioaccumulo

I risultati di tossicità ottenuti non sembrano essere dipendenti dalla specie algale somministrata come alimento ai nauplii di *Artemia*. Gli effetti massimi, sia in presenza di *P. tricornutum*, sia in presenza di *D. tertiolecta*, sono apparsi in corrispondenza della concentrazione minima di ENP fornita (1 mg L<sup>-1</sup>), già a 24 h. Tali effetti erano leggermente inferiori in corrispondenza di 10 mg L<sup>-1</sup> e diminuivano significativamente per 50 mg L<sup>-1</sup>. L'analisi delle quantità di cataboliti (NH<sub>3</sub>) prodotti in seguito all'assimilazione dei nutrienti, ha portato ad escludere che la loro presenza sia responsabile in qualche misura degli effetti di tossicità registrati che, di conseguenza, sono attribuibili alle sole ENP.

Il contenuto di Ti totale nelle dispersioni analizzate con ICP-OES ha permesso di rilevare una discrepanza tra i valori attesi e quelli analitici. Poiché i prelievi erano stati effettuati partendo dalla medesima soluzione stock ma l'errore non risultava proporzionale alle concentrazioni presunte di ENP nelle dispersioni, ancora una volta è stata ipotizzata un'incertezza nello stato di omogeneità delle suddette dispersioni, incertezza che, a sua volta, sarebbe legata alla diversa velocità di precipitazione degli agglomerati in funzione della concentrazione di partenza.

Le analisi con ICP-OES del contenuto totale di Ti nei crostacei hanno messo in evidenza che, nel caso in cui era somministrata l'alga *P. tricornutum* come nutrimento, il bioaccumulo di Ti non risultava correlato alle concentrazioni di questo nei mezzi acquosi. Inoltre, e ciò è valido per entrambe le alghe utilizzate, la mortalità dei nauplii risultava indipendente dal processo alimentare, poiché alti valori di tossicità si manifestavano già a 24 h. In aggiunta, ci sono delle valide ragioni per supporre che la mortalità dei crostacei potrebbe non essere necessariamente legata al semplice aspetto quantitativo dell'assunzione di Ti.

Il bilancio di massa, infine, ha evidenziato l'esistenza di ingenti perdite di materiale rispetto alle quantità di partenza, in particolar modo alla più bassa concentrazione impiegata ( $1,40 \text{ mg L}^{-1}$ ).

#### 10.6.4 Acquisizione di immagini con il TEM

NOTA: a causa dell'insorgenza di un problema tecnico, il microscopio TEM non è stato disponibile nel periodo stabilito; pertanto, l'acquisizione di immagini inerenti l'assunzione di  $n\text{TiO}_2$  da parte delle cellule algali è stata comunque condotta da ECSIN con l'ausilio di un microscopio confocale. Le immagini al TEM saranno effettuate quanto prima, poiché vincolanti per le pubblicazioni in corso.

Sono state acquisite una serie di immagini al confocale (Leica TCS SP5 II) di cui si riporta la seguente a titolo esemplificativo. L'immagine rappresenta una popolazione di *P. tricornutum* esposta per 72 h a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  di  $n\text{TiO}_2$  (presa immagini ad opera di Dr. Ivan Micetic, ECSIN – Veneto Nanotech, sede di Rovigo).

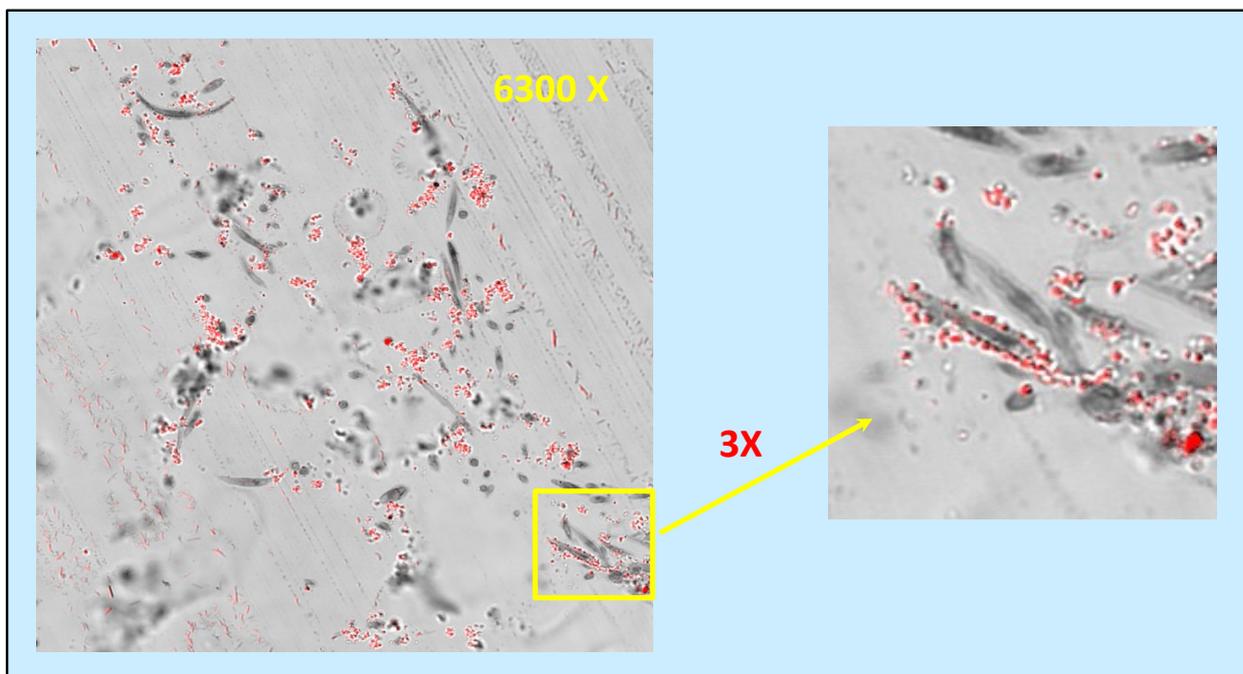


Figura 10.88 – Immagini al microscopio confocale di una popolazione di *P. tricorutum* esposta a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  di  $\text{nTiO}_2$  (in rosso). A sx l'ingrandimento è pari a 6300x; a dx il dettaglio ha un ingrandimento circa di 18900x.

Per via della riflessione del laser, il  $\text{nTiO}_2$  assume una colorazione rossa. Apparentemente, le ENP non sembrano essere presenti all'interno delle cellule algali. Il dettaglio, ulteriormente ingrandito di 3 volte, ha evidenziato come le ENP si dispongono esternamente agli organismi e, in particolare, attorno alla parete cellulare. Probabilmente, le poche ENP visibili all'interno delle alghe sono dovute al taglio al microtomo del campione fissato in resina e potrebbero essere state trascinate nella sede attuale dalla lama in vetro utilizzata allo scopo (Dr. Micetic, comunicazione personale).



## 11. CONCLUSIONI

Quest'ultimo capitolo costituisce l'epilogo di tutto il lavoro di ricerca inerente gli effetti del  $n\text{TiO}_2$  nei confronti di organismi di acqua marina. E' costituito dall'elenco sommario delle evidenze sperimentali ottenute, dei criticismi emersi e delle proposte per lo sviluppo della futura attività di ricerca. In chiusura del capitolo è riportata anche la disseminazione, resa possibile dalle informazioni e dalle competenze acquisite durante i tre anni di formazione.

# 11. CONCLUSIONI

## 11.1 Risultati, criticismi emersi e proposte per l'attività futura

Quello dei nanomateriali e delle nanotecnologie è un fiorente settore industriale che, già da alcuni anni, alimenta un mercato altrettanto florido e destinato, fra l'altro, ad aumentare per via della quantità crescente di investimenti che è in grado di attirare. Nella fattispecie, il nTiO<sub>2</sub>, da un punto di vista quantitativo, è attualmente il materiale più sintetizzato, poiché impiegato in prodotti di largo consumo quali cosmetici, filtri solari e pitture murali. Per via di tale diffusione, si prevede che, nei prossimi anni, quantità crescenti di nTiO<sub>2</sub> siano destinate a venire a contatto con le matrici ambientali ed è ragionevole supporre che gli ambienti marini rappresentino i recettori finali di questa forma di inquinamento.

In questa tesi di dottorato è stata dunque testata la tossicità delle ENP di TiO<sub>2</sub> su una batteria di organismi di acqua marina, la cui varietà ha permesso di ricavare, nel complesso, sia informazioni di carattere ecotossicologico, sia alcune idee per l'attività futura.

Nel caso del test Microtox® con il batterio *V. fischeri* non si sono evidenziati degli effetti tossici rilevanti e tali evidenze sono in linea con quanto osservato anche da altri autori. In letteratura, l'opinione comune è che i batteri, non internalizzando le NP, siano a priori più resistenti alla loro azione tossica rispetto ai protisti ed ai metazoi che invece hanno sistemi di internalizzazione delle NP molto ben sviluppati. L'utilizzo di *V. fischeri* per la misura della tossicità del nTiO<sub>2</sub> appare poco indicato, data la bassa sensibilità da esso dimostrata nei confronti di queste ENP.

I test di inibizione della crescita cellulare a 72 h con l'alga bruna *P. tricornutum* hanno prodotto risultati fra loro ampiamente variabili, alcuni dei quali, in linea con i risultati presenti in letteratura a proposito di specie d'acqua dolce. Si presume che la causa di tale variabilità debba essere ricercata nella mancanza di un'effettiva quantificazione del Ti presente all'interno delle dispersioni utilizzate nei test ecotossicologici. Le dispersioni, infatti, possiedono un'omogeneità effimera per definizione e, come conseguenza, il prelievo di aliquote diverse, pur se effettuato da una stessa dispersione, non garantisce necessariamente il prelievo della stessa quantità di ENM, fenomeno che aumenta la variabilità dello scenario espositivo. Questa evidenza può portare a scenari espositivi effettivi di volta in volta variabili tra loro, in maniera quasi casuale. Nei test con *P. tricornutum*, l'utilizzo di alginato come mezzo disperdente le ENP in acqua marina ha fatto registrare una riduzione negli effetti del nTiO<sub>2</sub>, rispetto agli stessi trattamenti in assenza di alginato. Si suppone che questa sostanza possa rallentare la sedimentazione delle ENP oppure che possa limitarne la bioaccessibilità; in entrambi i casi esso porterebbe ad una riduzione dello

scenario espositivo effettivo. Ad ogni modo, c'è ragione di credere che l'alginato possa fungere da nutriente per le alghe, dando vita a possibili falsi negativi ed inoltre, la concentrazione finale del prodotto, necessaria al mantenimento delle ENP in sospensione, risulta essere poco rappresentativa di un reale scenario ambientale. Per tali motivi si è ritenuto di non procedere con il suo utilizzo per questa linea di ricerca. Nel corso dell'attività sperimentale con *P. tricorutum* si è avuto modo di osservare anche delle risposte peculiari e cioè la formazione di agglomerati cellulari che, all'aumentare della concentrazione di nTiO<sub>2</sub>, crescono sia nella frequenza, sia nel numero di cellule che li compongono. Si ipotizza che le ENP possano esercitare delle interferenze nel processo di separazione delle cellule durante la fase di riproduzione per scissione.

I test di embriotossicità con i molluschi bivalvi *C. gigas* e *M. galloprovincialis* hanno offerto lo spunto per la riflessione sull'importanza dell'intervallo dimensionale delle ENP come chiave di lettura più indicata a descrivere il reale scenario espositivo degli organismi esposti ad esse. Per entrambe le specie, infatti, gli effetti massimi si sono potuti registrare alle concentrazioni più basse impiegate. Altre volte, nel corso del seguente lavoro, si è ribadito come una minore concentrazione di ENP possa implicare la formazione di agglomerati dimensionalmente più piccoli e questo può voler dire maggior rapporto superficie/volume (maggior reattività), maggior tempo di residenza delle ENP nella colonna d'acqua e maggiore facilità di assunzione degli agglomerati da parte degli organismi. Come segnalato nel caso delle alghe, anche con gli embrioni di *M. galloprovincialis* si sono potute osservare delle risposte peculiari e cioè la formazione, sullo strato di ENP, di una sorta di sagome che ricalcano il contorno delle larve. La loro genesi sembra essere dovuta alla produzione di muco da parte degli embrioni, in risposta all'azione irritante del nTiO<sub>2</sub>.

La sperimentazione con il crostaceo *A. franciscana* ha fatto emergere come, per misurare gli effetti di tossicità del nTiO<sub>2</sub>, siano maggiormente indicati test ecotossicologici che abbiano tempi di esposizione superiori alle 24 h. Partendo dal test di tossicità a 96 h e variando opportunamente le condizioni di luce e cibo, si sono ottenuti 3 scenari espositivi differenti. Il primo (1), per cui erano previsti fotoperiodo e il nutrimento dei nauplii, evidenziava l'esistenza di una correlazione positiva tra gli effetti di tossicità riscontrati e la concentrazione di ENP; l'intensità degli effetti, inoltre, era positivamente correlata anche ai tempi di osservazione. Il secondo scenario (2), per cui era previsto il nutrimento dei nauplii ma senza illuminazione, si è rivelato essere quello più favorevole alle condizioni di sopravvivenza dei crostacei. Infatti, nelle prime 48 h, gli effetti si sono mantenuti quasi nulli, ad eccezione di due picchi (a 48 h) in corrispondenza delle concentrazioni più basse impiegate, come accaduto per i molluschi bivalvi.

Data l'assenza di luce, inoltre, si presume che gli effetti evidenziati non siano di origine fotochimica ma meccanica, legati probabilmente all'irritazione e/o all'ostruzione delle vie respiratorie dei nauplii ed ai possibili danni dovuti all'ingestione. Potrebbe anche darsi che il minor effetto manifestatosi sia causato dal fatto che, al buio, i nauplii si muovano (e quindi respirino) di meno. Il terzo scenario (3), per cui era previsto fotoperiodo ma assenza di cibo, si è mostrato il più duro in termini di condizioni di sopravvivenza dei nauplii. Tale scenario, infatti, combina gli effetti della luce (emissione di ROS) con quelli legati alla mancanza di un elemento che possa sottrarre le ENP dalla colonna d'acqua o che ne schermi l'azione. Anche con *A. franciscana* è stato testato l'impiego di alginato come mezzo disperdente le ENP nei mezzi acquosi ma, sia in presenza che in assenza di questo, nessun effetto di mortalità si è reso evidente. La riduzione degli effetti di tossicità, per quanto riguarda i controlli positivi ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) nel trattamento con l'alginato, invece, sembra giustificabile con la capacità dell'alginato di adsorbire i cationi bivalenti, come appunto il  $\text{Cu}^{2+}$ . Nessuna differenza rispetto al controllo, invece, è stata osservata negli esperimenti che prevedevano l'illuminazione dei mezzi acquosi contenenti  $\text{nTiO}_2$ , prima dell'introduzione dei nauplii. Con *A. franciscana* è stato condotto anche un test di bioaccumulo a 96 h, per verificare l'assunzione di Ti dai mezzi acquosi, da parte dei crostacei, quando questi sono nutriti con sospensioni algali differenti: *P. tricornutum* (benthonica) e *D. tertiolecta* (planctonica). I risultati di tossicità ottenuti non sembrano essere dipendenti dalla specie algale somministrata come alimento ai nauplii di *Artemia*. Gli effetti massimi, sia in presenza di *P. tricornutum*, sia in presenza di *D. tertiolecta*, sono apparsi in corrispondenza della concentrazione minima di ENP fornita, già a 24 h. Il contenuto di Ti totale nelle dispersioni analizzate con ICP-OES ha permesso di rilevare una discrepanza tra i valori attesi e quelli analitici. Poiché i prelievi erano stati effettuati partendo dalla medesima soluzione stock ma l'errore non risultava proporzionale alle concentrazioni presunte di ENP nelle dispersioni, come per le alghe, è stata ipotizzata un'incertezza nello stato di omogeneità delle suddette dispersioni, incertezza che, a sua volta, sarebbe legata alla diversa velocità di precipitazione degli agglomerati in funzione della concentrazione di partenza.

Le attività sperimentali condotte nell'ambito di questa tesi, unite ai risultati documentati da alcuni autori, hanno permesso di fare emergere un primo aspetto cruciale in questo tipo di ricerche ovvero la bassa ripetibilità delle misure e, quindi, la necessità di una effettiva quantificazione delle ENP. Le pubblicazioni scientifiche in ambito tossicologico ed ecotossicologico hanno evidenziato un grado progressivo di approfondimento nella definizione del reale scenario espositivo, grazie all'integrazione crescente dei dati ecotossicologici con quelli chimici di caratterizzazione. Le risultanze di questa tesi fanno emergere la convinzione che

l'ulteriore passo avanti debba essere costituito dalla quantificazione precisa delle ENP impiegate negli esperimenti, utilizzando strumenti quali ICP-OES e ICP-MS. Senza questa fondamentale operazione, pur in possesso dei dati di caratterizzazione, non si possono collegare in maniera significativa le concentrazioni utilizzate agli eventuali effetti osservati sugli organismi. Come si è potuto constatare in più occasioni, durante le attività sperimentali condotte per questa ricerca, le tecniche di dispersione non garantiscono necessariamente l'omogeneità della distribuzione delle ENP. Di conseguenza, c'è il rischio che il prelievo di aliquote differenti, pur se effettuato in rapida successione e standardizzando le varie fasi, porti al trasferimento di quantità sempre diverse di ENP.

Un secondo aspetto importante, emerso dalla sperimentazione con le ENP, è la necessità del cambiamento dell'ottica sotto la quale interpretare i risultati. Diverse volte, infatti, ci si è resi conto di come la dimensione degli agglomerati e l'area superficiale fossero chiavi di lettura ben più rappresentative del reale scenario espositivo di quanto non lo fosse il concetto di concentrazione. Questo nuovo tipo di approccio si distacca da quello più classico, secondo il quale "è la dose a fare il veleno". Accanto alla quantificazione, quindi, risulta di notevole importanza la misura della distribuzione dimensionale delle NP nel tempo.

Come terzo aspetto, si vuole richiamare l'attenzione sulla comparsa di risposte che, attualmente, nei test ecotossicologici condotti con sostanze tradizionali non costituiscono degli endpoint valutabili per la misura della tossicità degli inquinanti ma che, in futuro, qualora venga documentata la loro ricorrenza, potrebbero essere presi in considerazione come nuovi endpoint caratteristici, da affiancare a quelli tradizionali, per la sperimentazione degli effetti avversi delle ENP.

Ricapitolando, data l'esperienza maturata con questo lavoro di tesi, il proseguimento della futura attività di ricerca per testare gli effetti di una o più ENP su organismi di acqua marina, verrebbe gestito nel seguente modo:

- ❖ innanzitutto si utilizzerebbe una batteria di organismi per i quali esistano dei protocolli standard internazionali e che possano costituire un punto di riferimento, soprattutto nel caso in cui si volesse apportare delle modifiche a tali linee guida. La batteria dovrebbe comprendere 1) un'alga unicellulare bentonica ed una planctonica, dotata di motilità, in modo da confrontare scenari espositivi diversi, utilizzando però le stesse ENP; 2) un bivalve, con cui condurre test sugli embrioni, che sono particolarmente sensibili; 3) un crostaceo, che può offrire la possibilità di differenziare più scenari espositivi; 4) un

polichete errante, come organismo modello per valutare l'esposizione specificatamente dai sedimenti, determinando bioaccumulo e tossicità;

- ❖ si rafforzerebbe la collaborazione con uno o più laboratori analitici in grado di fornire supporto nelle diverse fasi dell'attività ecotossicologica sperimentale, sia prima, mediante le analisi di caratterizzazione dei materiali, sia durante, mediante le analisi di quantificazione delle ENP all'interno dei mezzi acquosi da condurre contestualmente ai test ecotossicologici; nell'interpretazione dei risultati, tuttavia, oltre alla quantità delle ENP si dovrebbero considerare anche le dimensioni degli agglomerati di ENP;
- ❖ andrebbe prestata attenzione ad eventuali risposte subletali o comunque non previste dalle linee guida dei test ecotossicologici, poiché queste, se sistematiche, potrebbero essere considerate come nuovi endpoint per la misura degli effetti delle ENP;
- ❖ si escluderebbero dalla sperimentazione, invece, le operazioni che potrebbero stressare il sistema, facendo diminuire la sua rappresentatività ambientale, come ad esempio: 1) l'utilizzo di raggi UV, 2) l'impiego di agenti disperdenti delle ENP, quali solventi organici oppure alginato, 3) il mantenimento in agitazione delle piastre con lo scopo di risospendere continuamente le ENP.

Un'ultima raccomandazione generale. Ciascuno dei tentativi e degli esperimenti eseguiti per questo dottorato di ricerca ha contribuito a delineare un quadro generale della situazione e soprattutto delle problematiche inerenti la sperimentazione con gli ENM, anche quando i risultati ottenuti, all'apparenza, potevano sembrare poco significativi o addirittura contraddittori rispetto ad altri dati ricavati in precedenza. Alcune esperienze, maturate lungo questo percorso, hanno avuto come effetto quello di generare nuovi interrogativi, ognuno dei quali, se considerato sotto un'ottica costruttiva, potrebbe divenire un nuovo punto di partenza per ulteriori approfondimenti. In questo, quindi, si è concordi con l'opinione di Tiede et al (2009) che incoraggiano la discussione e la diffusione dei cosiddetti "negative data". Nessun dato, del resto, può definirsi di per sé negativo, perché in ogni caso apporta dell'informazione comunque utile, dato il livello di conoscenza della materia attualmente basso.

## 11.2 Disseminazione

Come anticipato nell'introduzione, è stato possibile riversare parte dell'esperienza acquisita durante la formazione del dottorato di ricerca in diverse attività scientifiche.

### 11.2.1 Posters presentati

- ❖ Minetto D., Callegaro S., Losso C., Libralato G., Poiana G., Marcomini A., Volpi Ghirardini A. "Toxicity evaluation of TiO<sub>2</sub> nanoparticles towards seawater organisms." 4<sup>th</sup> International Conference on the Environmental Effects of Nanoparticles and Nanomaterials – 6-9 settembre 2009, Vienna – Austria.
- ❖ Minetto D., Callegaro S., Losso C., Libralato G., Poiana G., Marcomini A., Volpi Ghirardini A. "The toxic effect of TiO<sub>2</sub> nanoparticles towards the marine algae *Phaeodactylum tricorutum*." Nanotoxicology 2010 – 2 - 4 giugno 2010, Edinburgh, Regno Unito.
- ❖ Callegaro S., Minetto D., Losso C., Poiana G., Volpi Ghirardini A. and Marcomini A. "Integrated approach for the environmental exposure and risk assessment of nanoparticles." 3<sup>rd</sup> EuCheMS Chemistry Congress Chemistry - the Creative Force – 29 agosto – 2 settembre 2010, Nürnberg, Germania.
- ❖ Minetto D., Libralato G., Losso C., Volpi Ghirardini A. "Impact of nano-TiO<sub>2</sub> to marine organisms: *Phaeodactylum tricorutum* and *Artemia franciscana*." SETAC Europe 21<sup>st</sup> Annual Meeting "Ecosystem protection in a sustainable world: a challenge for Science and Regulation" - 15 - 19 maggio 2011, Milano.
- ❖ Libralato G., Minetto D., Totaro S., Marcomini A. and Volpi Ghirardini "Effects of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on *Mytilus galloprovincialis* 48 h". 6th SETAC World Congress / SETAC Europe 22nd Annual Meeting "Securing a sustainable future: Integrating science, policy and people" – 20 – 24 maggio 2012, Berlino, Germania.
- ❖ Poiana G., Callegaro S., Minetto D., Bilanicova D., Libralato G., Volpi Ghirardini A., Hasseloff M., Marcomini A. "Stabilisation of nanometric titanium dioxide in artificial seawater for *in vivo* ecotoxicity bioassays". 6th SETAC World Congress / SETAC Europe 22nd Annual Meeting "Securing a sustainable future: Integrating science, policy and people" – 20 – 24 maggio 2012, Berlino, Germania.

### 11.2.2 Seminario di approfondimento

- ❖ Seminario sul tema "Nanoparticelle e Nanomateriali" per il corso di Ecotossicologia, della prof.ssa Annamaria Volpi Ghirardini, corso di Laurea Triennale in Scienze

Ambientali, Università Ca' Foscari Venezia, Facoltà di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali, Corso di Laurea in Scienze Ambientali. I seminari sono stati tenuti in: maggio 2010, maggio 2011 e novembre 2011.

### 11.2.3 Presentazioni orali

- ❖ “TiO<sub>2</sub> nanoparticles effects to saltwater organisms: preliminary results.” Ricerca e applicazione delle metodologie ecotossicologiche in ambienti acquatici – Giornate di Studio, 4<sup>a</sup> Edizione I.S.P.R.A. – C.I.B.M. 20 - 22 ottobre, Livorno.

### 11.2.4 Pubblicazioni

#### 11.2.4.1 Riviste nazionali

- ❖ Minetto D., Losso C., Libralato G., Callegaro S., Pojana G., Marcomini A. and Volpi Ghirardini A. “TiO<sub>2</sub> nanoparticles effects to saltwater organisms: preliminary results”. Ricerca e applicazione delle metodologie ecotossicologiche in ambienti acquatici – Giornate di Studio, 4<sup>a</sup> Edizione I.S.P.R.A. – C.I.B.M., 20 - 22 ottobre 2010 (ISBN 9788844804817).

#### 11.2.4.2 Riviste internazionali

Riguardo ai tre successivi articoli, si fa presente che, alla data odierna, questi sono in attesa di sottomissione.

- ❖ Callegaro S., Minetto D., Pojana G., Libralato G., Volpi Ghirardini A., Martin Hassellöv and Marcomini A. “Enhanced colloidal stability of titanium dioxide nanoparticles in artificial seawater for ecotoxicity tests/bioassays with marine organisms”
- ❖ Libralato G., Minetto D., Totaro S., Mičetić I., Pigozzo A., Sabbioni E., Marcomini A., and Volpi Ghirardini A. “Effects of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on *Mytilus galloprovincialis* 48 h-old larvae.”
- ❖ Minetto D., Libralato G., Pojana G. and Volpi Ghirardini A. “Effect of TiO<sub>2</sub> nanoparticles towards marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* and anostracan crustacean *Artemia franciscana*.”

## APPENDICE

### Risultati dei test ecotossicologici

Nell'appendice sono riportati esclusivamente quei risultati ai quali non si è stato dato risalto negli altri capitoli della tesi.

#### I-a Risultati dei test di inibizione della crescita cellulare con *P. tricornutum*

Le seguenti figure (I.02 – I.08) evidenziano gli effetti di inibizione della crescita cellulare nei confronti di *P. tricornutum*, causati dall'esposizione al nTiO<sub>2</sub> per 72 h. I risultati sono già normalizzati rispetto al controllo negativo di ciascun test.

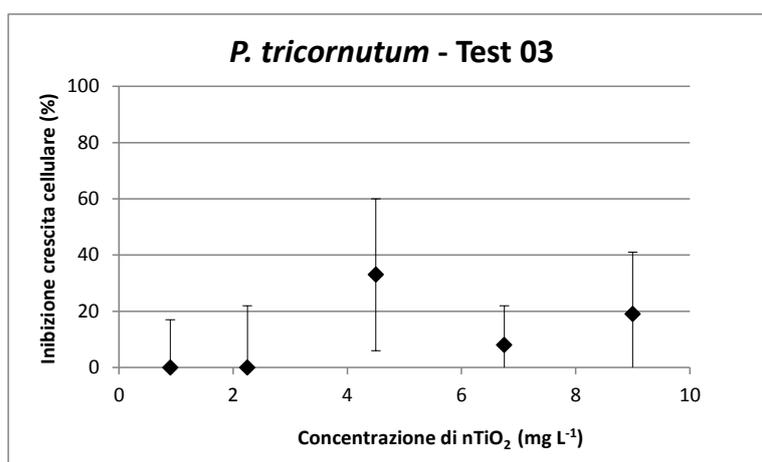


Figura I-01.

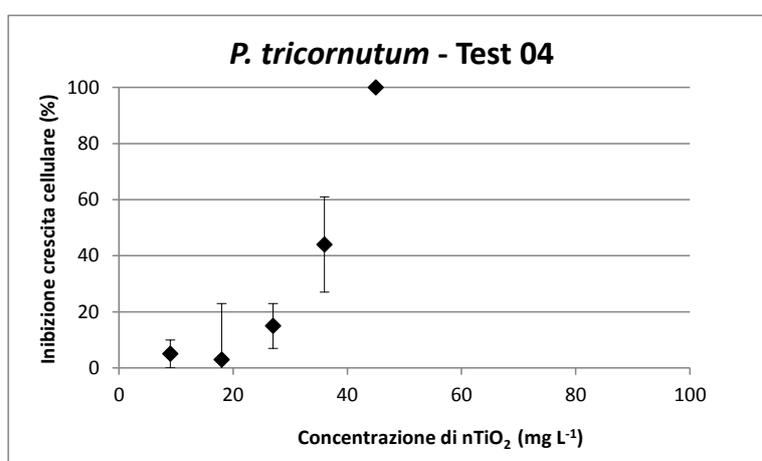


Figura I-02.

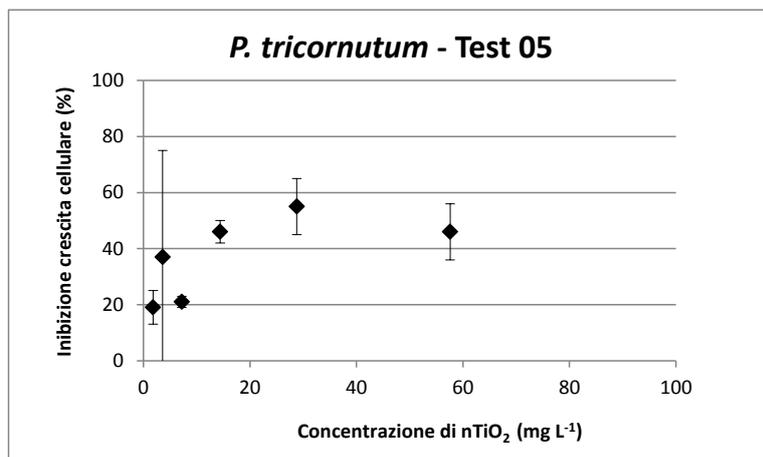


Figura I-03.

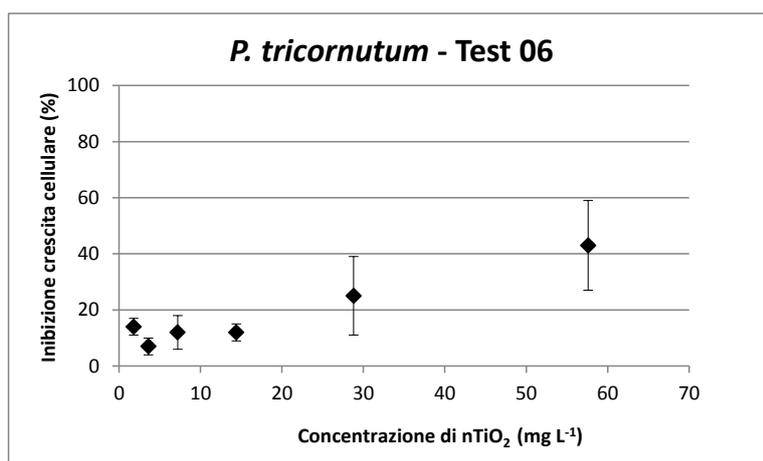


Figura I-04.

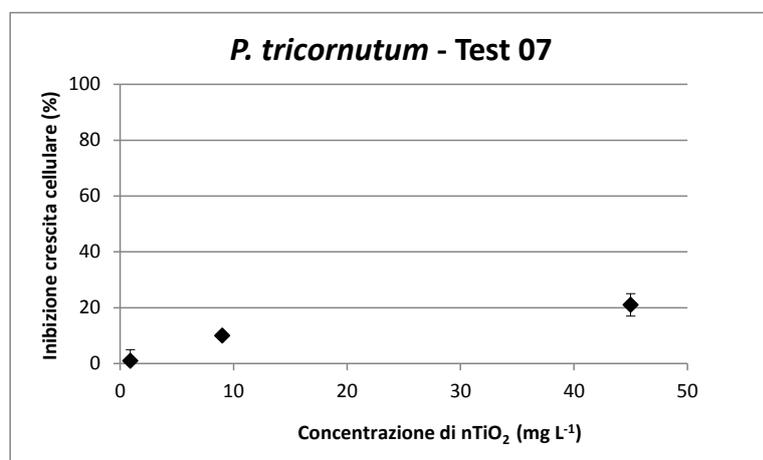


Figura I-05.

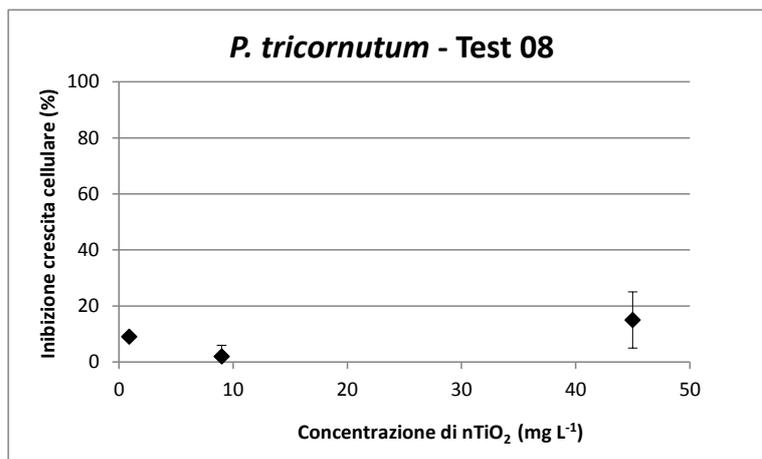


Figura I-06.

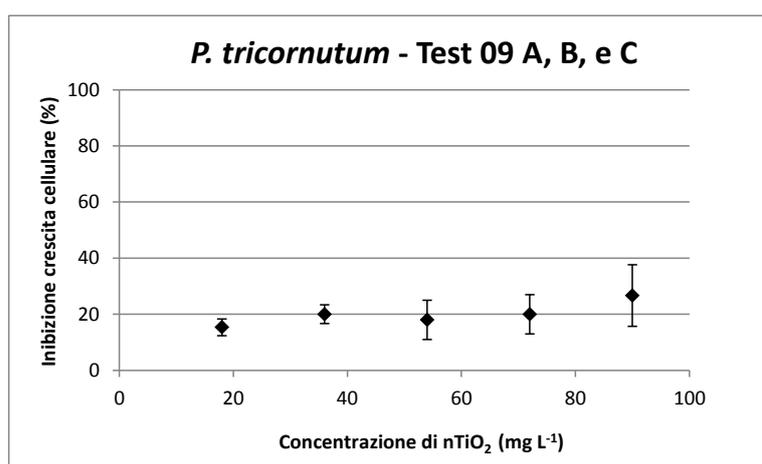


Figura I-07.

### I-b Risultati dei test di immobilizzazione con *A. franciscana*

Le seguenti figure (I.09 – I.11) mostrano gli effetti di immobilizzazione nei confronti di *A. franciscana*, causati dall'esposizione al nTiO<sub>2</sub> per 24 h (1 h alla luce + 23 h al buio).

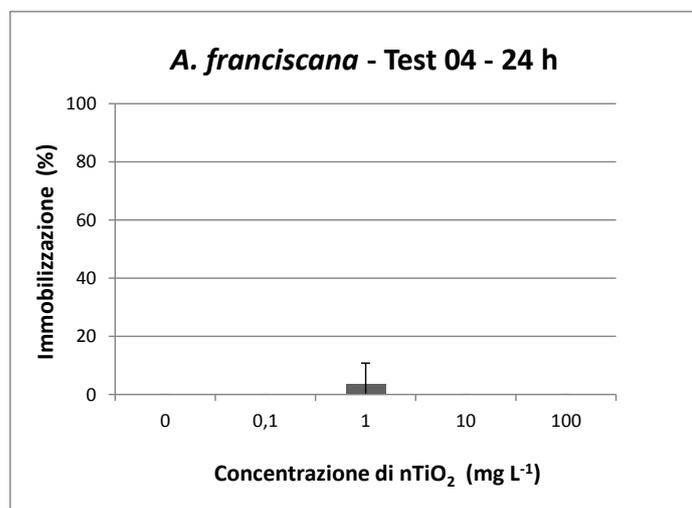


Figura I-08.

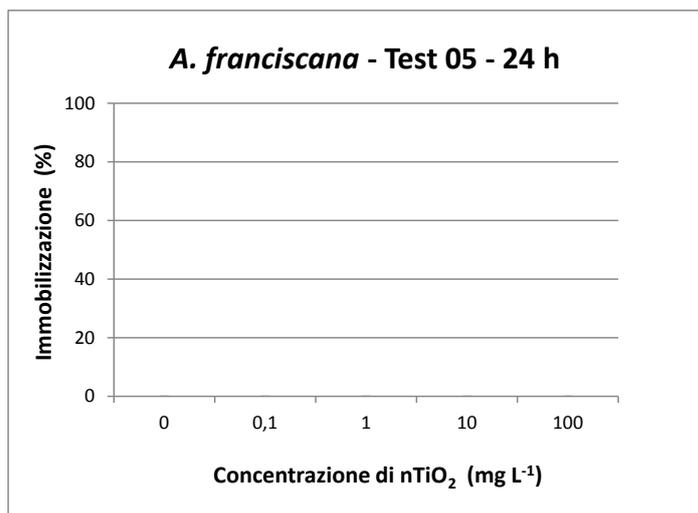


Figura I-09.

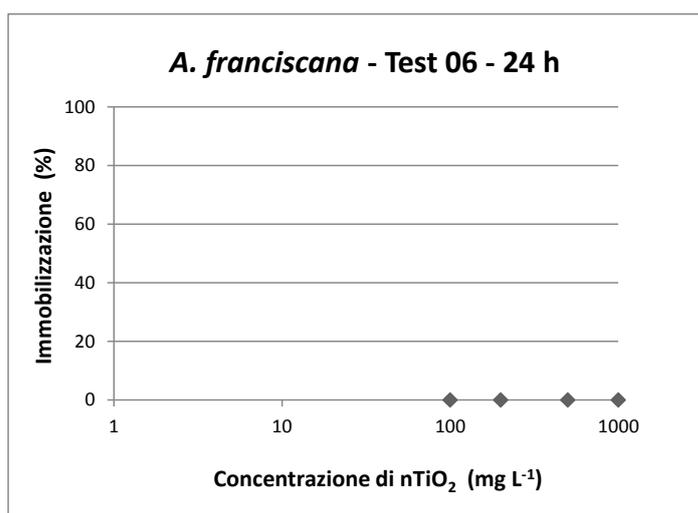


Figura I-10.

### I-c Risultati dei test di immobilizzazione con *A. franciscana* e nTiO<sub>2</sub> pre-trattato

Le seguenti figure I.12 e I.13 mostrano gli effetti di immobilizzazione nei confronti di *A. franciscana*, causati dall'esposizione al nTiO<sub>2</sub> per 24 h. Nel primo caso il nTiO<sub>2</sub> è stato illuminato per 30 min con una lampada a luce fredda della potenza di 150 W. Nel secondo caso invece, sono stati differenziati i tempi di illuminazione, rispettivamente, 30 min, 1 h e 12 h. In entrambi i casi il trattamento di illuminazione è stato fatto prima dell'introduzione dei nauplii.

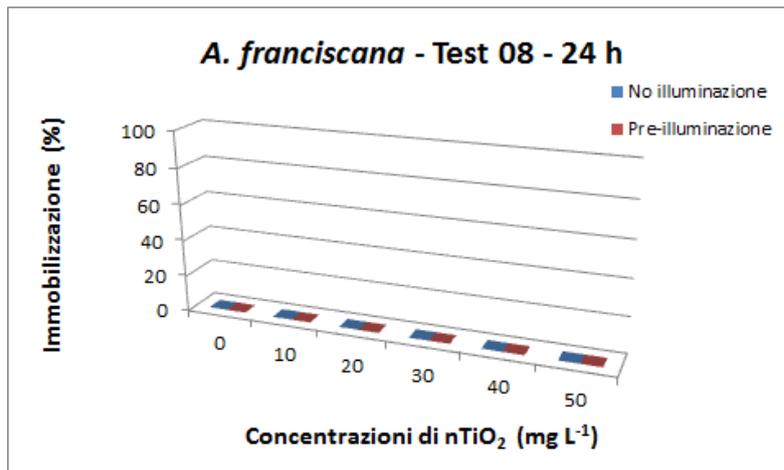


Figura I.11.

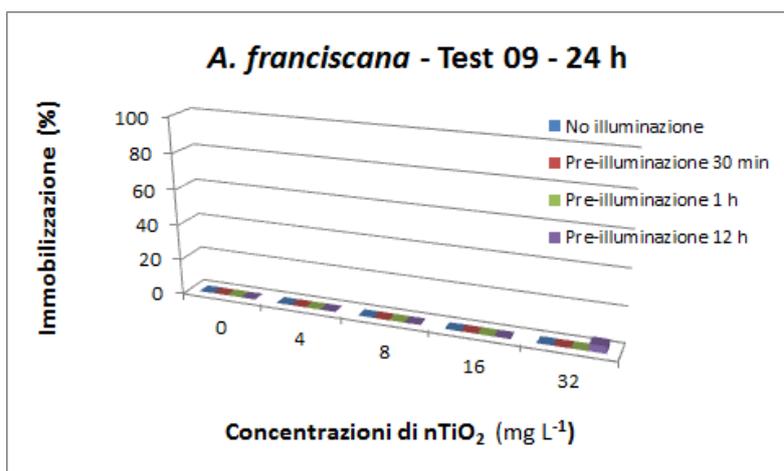


Figura I.12.



## BIBLIOGRAFIA

### Articoli e protocolli

#### A

- Adams L.K., Lyon D.Y., Alvarez P.J.J. (2006). "Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>, and ZnO water suspensions." *Water Research* 40(19): 3527-3532.
- Allen A.E., Dupont C.L., Oborník M., Horák A., Nunes-Nesi A., Mc Crow J.P., Zheng H., Johnson D.A., Hu H., Fernie A.R., Bowler C. (2011). Evolution and metabolic significance of the urea cycle in photosynthetic diatoms." *nature* 473(7346): 203-207.
- Amézaga-Madrid P., Silveyra-Morales R., Còrdoba-Fierro L., Nevàrez-Moorillòn G.V., Miki-Yoshida M., Orrantia-Borunda E., Solis F.J. (2003). "TEM evidence of ultra structural alteration on *Pseudomonas aeruginosa* by photocatalytic TiO<sub>2</sub> thin films." *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 70(1): 45-50.
- APAT-IRSA CNR - Acute toxicity test with *Artemia franciscana*, Analytical methods for waters, Report 29, 2003.
- A.P.H.A., A.W.W.A., W.P.C.F. (1989). "Standard methods for the examination of water and wastewater". 17th edition, A.P.H.A., Washington, 8, 1-23.
- Aruoja V., Dubourguier H-C, Kasemets K, Kahru A. (2009). "Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO<sub>2</sub> to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*." *Science of The Total Environment* 407(4): 1461-1468.
- ASTM International. E 1563-98 (1998).

#### B

- Bai W., Zhang Z., Tian W., He X., Ma Y., Zhao Y., Chai Z. (2009). "Toxicity of zinc oxide nanoparticles to zebrafish embryo: a physicochemical study of toxicity mechanism." *Journal of nanoparticle Research* 12(5): 1645-1654.
- Ballestri M., Baraldi A., Gatti M.A., Furci L., Bagni A., Loria P., Rapanà R.M., Carulli N., Albertazzi A. (2001). "Liver and Kidney Foreign Bodies Granulomatosis in a Patient With Malocclusion, Bruxism, and Worn Dental Prostheses." *Gastroenterology* 121(5): 1234-1238.
- Barillet S., Simon-Deckers A., Herlin-Boime C., Mayne-L'Hermite M., Reynaud C., Cassio D., Gouget B., Carrière M. (2010). "Toxicological consequences of TiO<sub>2</sub>, SiC nanoparticles and multi-walled carbon nanotubes exposure in several mammalian cell types: an in vitro study." *Journal of nanoparticle Research* 12(1): 61-73.
- Barker H.A. (1935). "Photosynthesis in diatoms." *Archives of Microbiology* 6(1): 141-156.
- Baun A., Sorensen S.N., Rasmussen R.F., Hartmann R.B., Koch C.B. (2008). "Toxicity and bioaccumulation of xenobiotic organic compounds in the presence of aqueous suspensions of aggregates of nano-C<sub>60</sub>." *Aquatic Toxicology* 86(3): 379-387.
- Bernardeschi M., Guidi P., Scarcelli V., Frenzilli G., Nigro M. (2010). "Genotoxic potential of TiO<sub>2</sub> on bottlenose dolphin leukocytes." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396(2): 619-623.
- Blaise C., Gagnè F., Ferard J.F., Eullaffroy P. (2008). "Ecotoxicity of selected nano-materials to aquatic organisms." *Environmental Toxicology* 23(5): 591-598.
- Borm P.J.A., Schins R.P.F., Albrecht C. (2004). "Inhaled particles and lung cancer, part B: Paradigms and risk assessment." *International Journal of Cancer* 110(1): 3-14.

- Bouldin J. L., Ingle T.M., et al. (2008). "Aqueous toxicity and food chain transfer of quantum dots™ in freshwater algae and *Ceriodaphnia dubia*." *Environmental Toxicology and Chemistry* 27(9): 1958-1963.
- Brunauer S., Emmett P.H., Teller E. (1938). "Adsorption of gases in multimolecular layers." *J. Am. Chem. Soc.* 60: 309–319.
- Brant J., Lecoanet H., Wiesner M.R. (2005). "Aggregation and deposition characteristics of fullerene nanoparticles in aqueous systems." *Journal of Nanoparticle Research* 7(4): 545-553.
- Buffet P., Fossi Tankoua O., Pan J., Berhanu D., Herrenknecht C., Poirier L., Amiard-Triquet C., Amiard J., Bérard J., Risso C., Guibolini M., Roméo M., Reip P., Valsami-Jones E., Mouneyrac C. (2011). "Behavioural and biochemical responses of two marine invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* to copper oxide nanoparticles." *Chemosphere*.
- Brunet L., Lyon D. Y., Hotze E.M., Alvarez P.J.J., Wiesner M.R. (2009). "Comparative photoactivity and antibacterial properties of C<sub>60</sub> fullerenes and titanium dioxide nanoparticles." *Environmental Science & Technology* 43(12): 4355-4360.
- Bundshuh M. Zubrod J.P., Englert D., Seitz F., Rosenfeldt R.R., Schulz R. (2011). "Effects of nano-TiO<sub>2</sub> in combination with ambient UV-irradiation on a leaf shredding amphipod." *Chemosphere* 85(10): 1563-1567.
- Buzea C., Pacheco I.I., Robbie K. (2007). "Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity." *Biointerphases* 2,(4). December 2007.
- Bystrzejewska-Piotrowska G., Golimowsky J., Urban P.L. (2009). "Nanoparticles: Their potential toxicity, waste and environmental management." *Waste Management* 29(9): 2587-2595.

## C

- Calabrese E.J. and Baldwin L.A. (2002). "Defining hormesis." *Human & Experimental Toxicology* 21(2): 91-97.
- Cañas J.E., Qi B., Li S., Maul J. D., Cox S. B., Das S., Green M. J. (2011). "Acute and reproductive toxicity of nano-sized metal oxides (ZnO and TiO<sub>2</sub>) to earthworms (*Eisenia fetida*)." *Journal of Environmental Monitoring* 13(12): 3351-3357.
- Canesi L., Ciacci C., Vallotto D., Gallo G., Marcomini A., Pojana G. (2009). "*In vitro* effects of suspensions of selected nanoparticles (C<sub>60</sub> fullerene, TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>) on *Mytilus* hemocytes." *Aquatic Toxicology* 96(2): 151-158.
- Canesi L., Fabbri R., Gallo G., Vallotto D., Marcomini A., Pojana G. (2010). "Biomarkers in *Mytilus galloprovincialis* exposed to suspensions of selected nanoparticles (Nano carbon black, C<sub>60</sub> fullerene, Nano-TiO<sub>2</sub>, Nano-SiO<sub>2</sub>)." *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 100(2): 168-177.
- Cattaneo A., Gornati R., Chiriva-Internati M., Bernardini G. (2009). "Ecotoxicology of nanomaterials: the role of invertebrate testing " *Invertebrate Survival Journal* 6: 78-97.
- Chen D. H., Li K., Yuan R. (2007). "Photocatalytic coating on road pavements/structures for NO<sub>x</sub> abatement." Annual project report submitted to Houston Advanced Research Center and Office of Air Quality Planning and Standards – U.S. Environmental Protection Agency.
- Chen J., Dong X., Xin Y, Zhao M. (2011). "Effects of titanium dioxide nano-particles on growth and some histological parameters of zebrafish (*Danio rerio*) after a long-term exposure." *Aquatic Toxicology* 101(3-4): 493-499.

- Chen J. and Poon C. (2009). "Photocatalytic construction and building materials: From fundamentals to applications." *Building and Environment* 44(9): 1899-1906.
- Chen T., Lin C., Tseng M. (2011) "Behavioral effects of titanium dioxide nanoparticles on larval zebrafish (*Danio rerio*)." *Marine Pollution Bulletin* 63(5-12): 303-308.
- Chen X. and Schluesener H.J. (2008). "Nanosilver: A nanoparticle in medical application." *Toxicology Letters* 176(1): 1-12.
- Cherchi C. and Gu A.Z. (2010). "Impact of titanium dioxide nanomaterials on nitrogen fixation rate and intracellular nitrogen storage in *Anabaena variabilis*." *Environmental Science & Technology* 44(21): 8302-8307.
- Choi Y., Umabayashi T., Yoshikawa M. (2004). "Fabrication and characterization of C-doped anatase TiO<sub>2</sub> photocatalysts." *Journal of Materials Science* 39(5): 1837-1839.
- Costanza C. (2007). "Fotosensore di permanenza ambientale (Ecopersistenza)" Tesi di Dottorato, Università degli studi di Roma "La Sapienza".

## D

- Dabrunz A., Duyster L., Prasse C., Seitz F., Rosenfeldt R., Schilde C., Schaumann G.E., Schulz R. (2011). "Biological surface coating and molting inhibition as mechanisms of TiO<sub>2</sub> nanoparticle toxicity in *Daphnia magna*." *PLoS ONE* 6(5).
- De Zwart D. and Slooff W. (1983). "The Microtox as an alternative assay in the acute toxicity assessment of water pollutants", *Aquatic Toxicology* n. 4, 129-138.
- Diaconescu B., Pohl K., Vattuone L., Savio L., Hofmann P., Silkin V.M., Pitarke J.M., Chulkov E.V., Echenique P.M., Fariás D., Rocca M. (2007). "Low-energy acoustic plasmons at metal surfaces." *Nature* 448, 57-59.
- Drobne D., Jemec A., Tkalec Z.P. (2009). "In vivo screening to determine hazards of nanoparticles: Nanosized TiO<sub>2</sub>." *Environmental Pollution* 157(4): 1157-1164.
- Dunn K. and Edwards-Jones V. (2004). "The role of Acticoat™ with nanocrystalline silver in the management of burns." *Burns* 30, Supplement 1(0): S1-S9.
- Dutka D.J. and Kwan K.K. (1981). "Comparison of three microbial toxicity screening tests with Microtox test." *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, vol. 27, 753-757.
- Dyrssen D., Hansson I. (1973). "Ionic medium effects in sea water - A comparison of acidity constants of carbonic acid and boric acid in sodium chloride and synthetic sea water." *Marine Chemistry* 1(2): 137-149.

## E, F

- Esteban-Tejeda L., Malpartida F., Esteban-Cubillo A., Pecharroman C., Moya J.S. (2009). "The antibacterial and antifungal activity of a soda-lime glass containing silver nanoparticles " *Nanotechnology* 20(8): 6.
- Fairbairn E.A., Keller A.A., Mädler L., Zhou D., Pokhrel S., Cherr G.N. (2011). "Metal oxide nanomaterials in seawater: Linking physicochemical characteristics with biological response in sea urchin development." *Journal of Hazardous Materials* 192(3): 1565-1571.
- Fan W., Cui M., Liu H., Wang C., Shi Z., Tan C., Yang X. (2011). "Nano-TiO<sub>2</sub> enhances the toxicity of copper in natural water to *Daphnia magna*." *Environmental Pollution* 159(3): 729-734.

- Fang X., Yu R., Li B., Somasundaran P., Chandran K. (2010). "Stresses exerted by ZnO, CeO<sub>2</sub> and anatase TiO<sub>2</sub> nanoparticles on the *Nitrosomonas europaea*." *Journal of Colloid and Interface Science* 348(2): 329-334.
- Farré M., Gajda-Schranz K., Kantiani L., Barcelò D. (2009). "Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 393(1): 81-95.
- Fatin-Rouge N., Dupont A., Vidonne A., Dejeu J., Fievet P., Foissy A. (2006) "Removal of some divalent cations from water by membrane-filtration assisted with alginate" *Water Research* 40: 1303-1309.
- Federici G., Shaw B.J., Handy R.D. (2007). "Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects." *Aquatic Toxicology* 84(4): 415-430.
- Ferry J.L., Craig P., Hexel C., Sisco P., Frey R., Pennington P.L., Fulton M.H., Scott I.G., Decho A.W., Kashiwada S., Murphy S.J., Shaw T.J. (2008). "Transfer of gold nanoparticles from the water column to the estuarine food web." *Nature nanotechnology* 4(7): 441-444.
- Feschet-Chassot E., Raspal V., Sibaud Y., Awitor O.K., Bonnemoy F., Bonnet J.L., Bohatier J. (2011). "Tunable functionality and toxicity studies of titanium dioxide nanotube layers." *Thin Solid Films*.
- Forbes M.S., Raison R.J., Skjemstad J.O. (2006). "Formation, transformation and transport of black carbon (charcoal) in terrestrial and aquatic ecosystems." *Science of The Total Environment* 370(1): 190-206.
- Fouqueray M., Dufils B., Vولات B., Chaurand P., Botta C., Abacci K., Labille J., Rose J., Garric J. (2011). "Effects of aged TiO<sub>2</sub> nanomaterial from sunscreen on *Daphnia magna* exposed by dietary route." *Environmental Pollution* 163(1): 55-61.
- Francius G., Tesson B., Dague E., Martin-Jezequel V., Dufrene I.F. (2008). "Nanostructure and nanomechanics of live *Phaeodactylum tricornutum* morphotypes." *Environmental microbiology* 10(5): 1344-1356.
- French R. A., Jacobson A. R., Kim B., Isley S.L., Penn L., Baveye P.C. (2009). "Influence of ionic strength, pH, and cation valence on aggregation kinetics of titanium dioxide nanoparticles." *Environmental Science & Technology* 43(5): 1354-1359.
- Fujishima A., Zhang X., Tryk D. (2008). "Solar photocatalysis, photodegradation of a commercial detergent in aqueous TiO<sub>2</sub> dispersions under sunlight irradiation." *Solar Energy* 77(5): 525-532.

## G

- Gagné F., Auclair J., Turcotte T., Fournier M., Gagnon C., Sauvé S., Blaise C. (2008). "Ecotoxicity of CdTe quantum dots to freshwater mussels: Impacts on immune system, oxidative stress and genotoxicity." *Aquatic Toxicology* 86(3): 333-340.
- Gaikwad R.M. e Sokolov I. (2008). "Silica nanoparticles to polish tooth surfaces for caries prevention." *Journal of Dental Research* 87(10): 980-983.
- Gaiser B.K., Fernandes T.F., Jepson M., Lead J.R., Tyler C.R., Stone V. (2009). "Assessing exposure, uptake and toxicity of silver and cerium dioxide nanoparticles from contaminated environments." *Environmental Health* 8: 4.
- Galloway T., Lewis C., Dolciotti I., Johnston B.D., Moger J., Regoli F. (2010). "Sublethal toxicity of nano-titanium dioxide and carbon nanotubes in a sediment dwelling marine polychaete." *Environmental Pollution* 158(5): 1748-1755.
- Gatti A.M. (2004). "Biocompatibility of micro- and nano-particles in the colon. Part II." *Biomaterials* 25(3): 385-392.

- Gentile E. (2010). "Il ruolo di *Phaeodactylum tricornutum* nella valutazione della tossicità di acque di scarico da recapitare in ambienti di transizione e marino-costieri." Tesi di Laurea Magistrale in Scienze Ambientali, Dipartimento di Scienze Ambientali, Statistiche e Informatiche – Università Cà Foscari, Venezia.
- Ghafari P., St.Denis C., Power M.E., Jin X., Tsou V., Mandal H.S., Bols N.C., Tang X.S. (2008). "Impact of carbon nanotubes on the ingestion and digestion of bacteria by ciliated protozoa." *Nature nanotechnology* 3: 347-351.
- George S., Xia T., Rallo R., Zhao Y., Ji Z., Lin S., Wang X., Zhang H., France B., Schoenfeld D., Damoiseaux R., Liu R., Lin S., Bradley K. A., Cohen Y., Nel A. E. (2011). "Use of a high-throughput screening approach coupled with in vivo zebrafish embryo screening to develop hazard ranking for engineered nanomaterials." *ACS Nano* 5(3): 1805-1817.
- Gireesh R., Gopinathan C.P. (2004). "Effect of salinity and pH on the larval development and spat production of *Paphia malabarica*." *Journal of the Marine Biological Association of India*, 46 (2): 146 - 153, July - Dec., 2004.
- Gomes T., Pinheiro J.P., Cancio I., Pereira C.G., Cardoso C., Bebianno M.J. (2011). "Effects of copper nanoparticles exposure in the mussel *Mytilus galloprovincialis*." *Environmental Science and Technology* 45(21): 9356-9362.
- Gottschalk F., Scholz R.W., Sonderer T., Nowack B. (2009). "Probabilistic material flow modeling for assessing the environmental exposure to compounds: Methodology and an application to engineered nano-TiO<sub>2</sub> particles." *Environmental Modelling & Software* 25(3): 320-332.
- Griffith R.J., Luo J., Gao J., Bonzongo J., Barber D.S. (2008). "Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms." *Environmental Toxicology and Chemistry* 27(9): 1972-1978.
- Gulson B. McCall M., Korsch M., Gomez L., Casey P., Oytam Y., Taylor A., McCulloch M., Trotter J., Kinsley L., Greenoak G. (2010). "Small Amounts of Zinc from Zinc Oxide Particles in Sunscreens Applied Outdoors Are Absorbed through Human Skin." *Toxicological Sciences* 118(1): 140-149.

## H

- Hans M.L., Lowman A.M. (2002). "Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting." *Current Opinion in Solid State and Materials Science* 6(4): 319-327.
- Hao L., Wang Z., Xing B. (2009). "Effect of sub-acute exposure to TiO<sub>2</sub> nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in Juvenile Carp (*Cyprinus carpio*)." *Journal of Environmental Sciences* 21(10): 1459-1466.
- Hartmann N.B., Von der Kammer F., Hofmann T., Baalousha M., Ottofuelling S., Baun A. (2009). "Algal testing of titanium dioxide nanoparticles - Testing considerations, inhibitory effects and modification of cadmium bioavailability." *Toxicology* 269(2-3): 190-197.
- Hastings J.W., Potrikus C.J., Gupta S.C., Kurfurst M., Makemson J. (1985). "Biochemistry and physiology of bioluminescent bacteria." *Advanced in microbial physiology*, vol. 26, Academic press inc. (London).
- Heckmann L., Hovgaard M.B., Sutherland D.S., Autrup H., Besenbacher F., Scott-Fordsmann J.J. (2011). "Limit-test toxicity screening of selected inorganic nanoparticles to the earthworm *Eisenia fetida*." *Ecotoxicology* 20(1): 226-233.

- Heinlaan M., Ivask A., Blinova I., Dubourguier H.C., Kahru A. (2008). "Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO<sub>2</sub> to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*." *Chemosphere* 71(7): 1308-1316.
- Hietanen B., Sunila I., Kristoffersson R. (1988). "Toxic effects of zinc on the common mussel *Mytilus edulis* L. (Bivalvia) in brackish water. Physiological and histopathological studies." *Annales zoologici Fennici* 25: 7.
- His E., Seaman R.N.L., Beiras R. (1997). "A simplified bivalve larval bioassay method for seawater quality assessment." *Water Research* 31, 351–355.
- Hochmannova L. and Vytrasova J. (2010). "Photocatalytic and antimicrobial effects of interior paints." *Progress in Organic Coatings* 67(1): 1-5.
- Hu C.W., Li M., Cui Y.B., Li D.S., Chen J., Yang L.Y. (2010). "Toxicological effects of TiO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles in soil on earthworm *Eisenia fetida*." *Soil Biology and Biochemistry* 42(4): 586-591.
- Hund-Rinke K. e Simon M. (2006). "Ecotoxic effect of photocatalytic active nanoparticles (TiO<sub>2</sub>) on algae and daphnids." *Environmental Science and Pollution Research* 13(4): 225-232.

## I

- Isenberg D.L. (1993). "The Microtox toxicity test: a developer's commentary. In "Ecotoxicology Monitoring" a c. di Richardson M., 3-15, VCH Weinheim (Germany), 1993
- Isley S.L., Penn R.L. (2006). "Relative brookite and anatase content in sol-gel-synthesized titanium dioxide nanoparticles." *The Journal of Physical Chemistry B* 110(31): 15134-15139.
- ISO 10706 (2000) - Water quality - Determination of long term toxicity of substances to *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea).
- Ivask A., Bondarenko O., Jepihhina N., Kahru A. (2010). "Profiling of the reactive oxygen species-related ecotoxicity of CuO, ZnO, TiO<sub>2</sub>, silver and fullerene nanoparticles using a set of recombinant luminescent *Escherichia coli* strains: differentiating the impact of particles and solubilised metals." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398(2): 701-716.

## J

- Jamieson T., Bakhshi R., Petrova D., Pocock R., Imani M., Seifalian A.M. (2007). "Biological applications of quantum dots." *Biomaterials* 28(31): 4717-4732.
- Jemec A., Drobne D., Remskar M., Sepcic K., Tisler T. (2008). "Effects of ingested nano-sized titanium dioxide on terrestrial isopods (*Porcellio scaber*)." *Environmental Toxicology and Chemistry* 27(9): 1904-1914.
- Ji J., Long Z., Lin D. (2011). "Toxicity of oxide nanoparticles to the green algae *Chlorella* sp." *Chemical Engineering Journal* 170(2-3): 525-530.
- Johnston B.D., Scown T.M., Moger J., Cumberland S.A., Baalousha M., Linge K., Van Aerle R., Jarvis K., Lead J.R., Tyler C.R. (2010). "Bioavailability of Nanoscale Metal Oxides TiO<sub>2</sub>, CeO<sub>2</sub>, and ZnO to fish." *Environmental Science & Technology* 44(3): 1144-1151.
- Joner E.J., Hartnik T., Amudsen C.E. (2008). "Environmental fate and ecotoxicity of engineered nanoparticles". Norwegian Pollution Control Authority (2008) Report no. TA 2304/2007. Ås. 64 pp.

- Jovanovic B., Anastasova L., Rowe E.W., Zhang Y., Clapp A.R., Palic D. (2010). "Effects of nanosized titanium dioxide on innate immune system of fathead minnow (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820)." *Ecotoxicology and Environmental Safety*.
- Jovanovic B., Ji T., Palic D. (2011). "Gene expression of zebrafish embryos exposed to titanium dioxide nanoparticles and hydroxylated fullerenes." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74(6): 1518-1525.
- Ju-Nam Y. and Lead J. R. (2008). "Manufactured nanoparticles: an overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications." *Science of The Total Environment* 400(1-3): 396-414.

## K

- Kaegi R., Ulrich A., Sinnet B., Vonbank R., Wichser A., Zuleeg S., Simmler H., Brunner S., Vonmont H., Burkhardt M., Boller M. (2008). "Synthetic TiO<sub>2</sub> nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment." *Environmental Pollution* 156(2): 233-239.
- Kahru A., Dubourguier H.C. (2010). "From ecotoxicology to nanoecotoxicology." *Toxicology* 269(2-3): 105-119.
- Kanel S. R., Manning B., Charlet L., Choi H. (2005). "Removal of arsenic(III) from groundwater by nanoscale zero-valent iron." *Environmental Science & Technology* 39(5): 1291-1298.
- Kasemets K., Ivask A., Dubourguier H.C., Kahru A. (2009). "Toxicity of nanoparticles of ZnO, CuO and TiO<sub>2</sub> to yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Toxicology in Vitro* 23(6): 1116-1122.
- Keller A., Wang H., Zhou D., Lenihan H.S., Cherr G., Cardinale B.J., Miller R., Ji Z. (2010). "Stability and Aggregation of Metal Oxide Nanoparticles in Natural Aqueous Matrices." *Environmental Science & Technology* 44(6): 1962-1967.
- Keller V., Keller N., Ledoux M.J., Lett M.C. (2005). "Biological agent inactivation in a flowing air stream by photocatalysis." *The Royal Society of Chemistry* 2005.
- Kim K.J., Sung W.S., Suh B.K., Moon S.K., Choi J.S., Kim J.G., Lee D.G. (2008). "Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*." *Biometals* 22(2).
- Kim K.T., Klaine S.J., Cho J., Kim S., Kim S.D. (2010). "Oxidative stress responses of *Daphnia magna* exposed to TiO<sub>2</sub> nanoparticles according to size fraction." *Science of The Total Environment* 408(10): 2268-2272.
- Klaine S.J., Alvarez P.J.J., Batley G.E., Fernandes T.F., Handy R.D., Lyon D.Y., Mahendra S., McLaughlin M.J., Lead J.R. (2008). "Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects." *Environmental Toxicology and Chemistry* 27(9): 1825-1851.
- Klaper R., Crago J., Barr J., Arndt D., Setyowati K., Chen J. (2008). "Toxicity biomarker expression in daphnids exposed to manufactured nanoparticles: Changes in toxicity with functionalization." *Environmental Pollution* 157(4): 1152-1156.
- Krause B., Petzold G., Pegel S., Pötschke P. (2009). "Correlation of carbon nanotube dispersability in aqueous surfactant solutions and polymers." *Carbon* 47 (3): 602-612.
- Kuentz M. e Rothlisberger D. (2003). "Rapid assessment of sedimentation stability in dispersions using near infrared transmission measurements during centrifugation and oscillatory rheology." *Eur J Pharm Biopharm* 56 (3):355-361.
- Kumar A., Pandey A.K., Singh S.S., Shanker R., Dhawan A. (2011a). "Cellular uptake and mutagenic potential of metal oxide nanoparticles in bacterial cells." *Chemosphere*.
- Kumar A., Pandey A.K., Singh S.S., Shanker R., Dhawan A. (2011b). "A flow cytometric method to assess nanoparticle uptake in bacteria." *Cytometry Part A*.

## L

- Laban G., Nies L.F., Turco R.F., Bickham J.W., Sepúlveda M.S. (2010). "The effects of silver nanoparticles on fathead minnow (*Pimephales promelas*) embryos." *Ecotoxicology* 19(1): 185-195.
- Lapied E., Nahmani J.Y., Moudilou E., Chaurand P., Labille J., Rose J., Exbrayat J., Oughton D.H., Joner E.J. (2011). "Ecotoxicological effects of an aged TiO<sub>2</sub> nanocomposite measured as apoptosis in the anecic earthworm *Lumbricus terrestris* after exposure through water, food and soil." *Environment International* In Press, Corrected Proof.
- Lee B.C, Kim S., Shon H.K., Vigneswaran S., Kim S.D., Cho J., Kim I.S., Choi K.H., Kim J.B., Park H.J., Kim J.H. (2008). "Aquatic toxicity evaluation of TiO<sub>2</sub> nanoparticle produced from sludge of TiCl<sub>4</sub> flocculation of wastewater and seawater." *Journal of Nanoparticles Research*.
- Lee K.H. and Ruby E.G (1995). "Symbiotic role of the Viable but Nonculturable State of *Vibrio fischeri* in Hawaiian Coastal Seawater." *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 61, n. 1, 278-283.
- Lee K.S., El-Sayed M. (2006). "Gold and silver nanoparticles in sensing and imaging: sensitivity of plasmon response to size, shape, and metal composition." *The Journal of Physical Chemistry B* 110(39): 19220-19225.
- Lee S., Kim S., Choi J. (2009). "Genotoxicity and ecotoxicity assays using the freshwater crustacean *Daphnia magna* and the larva of the aquatic midge *Chironomus riparius* to screen the ecological risks of nanoparticle exposure." *Environmental Toxicology and Pharmacology* 28(1): 86-91.
- Lee S., Lee J., Kim K., Sim S.J., Gu M.B., Yi J., Lee J. (2009). "Eco-toxicity of commercial silver nanopowders to bacterial and yeast strains" *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 14(4): 6.
- Lewin J.C., Lewin R.A., Philpott D.E. (1958). "Observation on *Phaeodactylum tricorutum*" *Journal of general microbiology* 18: 418-426.
- Li M., Czymmek K.J., Huang C.P. (2011). "Responses of *Ceriodaphnia dubia* to TiO<sub>2</sub> and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles: a dynamic nano-toxicity assessment of energy budget distribution." *Journal of Hazardous Materials*.
- Liu G., Men P., Harris P.L.R., Rolston R.K., Perry G., Smith M.A. (2006). "Nanoparticle iron chelators: A new therapeutic approach in Alzheimer disease and other neurologic disorders associated with trace metal imbalance." *Neuroscience Letters* 406(3): 189-193.
- Liu G., Wang D., Wang J., Mendoza C. (2011). "Effect of ZnO particles on activated sludge: Role of particle dissolution." *Science of The Total Environment*.
- Lomer M.C.E., Thompson R.P.H., Powell J.J. (2002). "Fine and ultrafine particles of the diet: influence on the mucosal immune response and association with Crohn's disease." *Proceedings of the Nutrition Society* 61(01): 123-130.
- Lomer M.C.E., Hutchinson C., Volkert S., Greenfield S.M., Catterall A., Thompson R.P.H. and Powell J.J. (2004). "Dietary sources of inorganic microparticles and their intake in healthy subjects and patients with Crohn's disease." *British Journal of Nutrition* 2004(92): 9.
- Losso C. (2003). "Valutazione dell'applicabilità all'ambiente lagunare e validazione di saggi tossicologici che utilizzano specie autoctone." Tesi di Dottorato in Scienze Ambientali, Dipartimento di Scienze Ambientali – Università Cà Foscari, Venezia.
- Lovern S.B. e Klaper R. (2006). "*Daphnia magna* mortality when exposed to titanium dioxide and fullerene (C<sub>60</sub>) nanoparticles." *Environmental Toxicology and Chemistry* 25(4): 1132-1137.

- Lovern S.B., Strickler J.R., Klaper R. (2007). "Behavioral and physiological changes in *Daphnia magna* when exposed to nanoparticle suspensions (titanium dioxide, nano-C<sub>60</sub>, and C(60)HxC(70)Hx)." *Environmental Science & Technology* 41(12): 4465-4470.
- Lucarelli M., Gatti A.M., Savarino G., Quattroni P., Martinelli L., Monari E., Boraschi D. (2004). "Innate defence functions of macrophages can be biased by nano-sized ceramic and metallic particles." *Eur. Cytokine Netw* 15(4): 8.
- Lundy, P., C. F. Wurster, et al. (1984). "A two-species marine algal bioassay for detecting aquatic toxicity of chemical pollutants." *Water Research* 18(2): 187-194.
- Lyon D.Y., Fortner J.D., Sayes C.M., Colvin V.L., Hughes J.B. (2005). "Bacterial cell association and antimicrobial activity of a C<sub>60</sub> water suspension." *Environmental Toxicology and chemistry* 24(11): 2757-2762.

## M

- Makemson J.C., Fulyafil N., Basson P. (1992). "Association of luminous bacteria with artificial and natural surfaces in Arabian Gulf seawater." *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 58, n. 7, 2341-2343.
- Manodori, L., Benedetti A. (2009). "Nanoparticles monitoring in workplaces devoted to nanotechnologies." *Journal of Physics: Conference Series* 170.
- Maser W.K., Benito A.M., Martinez M.T. (2002). "Production of carbon nanotubes: the light approach." *Carbon* 40(10): 1685-1695.
- Maynard A. D. (2008). "Living with nanoparticles." *Nano Today* 3(1-2): 64-64.
- McFall-Ngai M.J and Ruby E.G. (2000). "Developmental biology in marine invertebrate symbioses." *Current Opinion in Microbiology*, vol. 3, Issue 6, 603-607.
- Menard A., Drobne D., Jemec A. (2011). "Ecotoxicity of nanosized TiO<sub>2</sub>. Review of in vivo data." *Environmental Pollution* 159(3): 677-684.
- Miao A., Zhang X., Luo Z., Chen C., Chin W., Santschi P.H., Quigg A. (2010). "Zinc oxide-engineered nanoparticles: Dissolution and toxicity to marine phytoplankton." *Environmental Toxicology and Chemistry* 29(12): 2814-2822.
- Miguez B. and Combarro M.P (2003). "Bacteria associated with sardine (*Sardina pilchardus*) eggs in a natural environment (Ria de Vigo, Galicia, northwestern Spain)." *FEMS Microbiology Ecology*, 44, 329.
- Miller R.J., Lenihan H.S., Muller E.B., Tseng N., Hanna S.K., Keller A.A. (2010). "Impacts of metal oxide nanoparticles on marine phytoplankton." *Environmental Science & Technology* 44(19): 7329-7334.
- Monteiro-Riviere N.A., Inman A.O. (2006). "Challenges for assessing carbon nanomaterial toxicity to the skin." *Carbon* 44(6): 1070-1078.
- Moore M.N. (2006). "Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment?" *Environment International* 32: 967-976.
- Mortimer M., Kasemets K., Heinlaan M., Kurvet I., Kahru A. (2008). "High throughput kinetic *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for study of toxic effects of nanoparticles." *Toxicology in Vitro* 22(5): 1412-1417.
- Mortimer M., Kasemets K., Heinlaan M., Kurvet I., Kahru A. (2010). "High throughput kinetic *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for study of toxic effects of nanoparticles." *Toxicology in Vitro* 22(5): 1412-1417.

- Mouchet F., Landois P., Sarremejean E., Bernard G., Puech P., Pinelli E., Flahaut E., Gauthier R. (2008). "Characterisation and in vivo ecotoxicity evaluation of double-wall carbon nanotubes in larvae of the amphibian *Xenopus laevis*." *Aquatic Toxicology* 87(2): 127-137.
- Mu L. and Sprando R. L. (2010). "Application of nanotechnology in cosmetics." *Pharmaceutical Research* 27(8): 1746-1749.
- Müller N. (2007). "Nanoparticles in the environment - Risk Assessment based on exposure-modelling - What concentrations of nano titanium dioxide, carbon nanotubes and nano silver are we exposed to?" Diploma Thesis, Department of Environmental Sciences – ETH Zurich, Switzerland.
- Myung-Hwan P., Keun-Hee K., Huk-Hee H., Jin-Seog K., Soon-Jin H. (2009). "Selective inhibitory potential of silver nanoparticles on the harmful cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*." *Biotechnology*(32): 423-428.

## N

- Naha P.C., Casey A., Tenuta T., Lynch I., Dawson K.A., Byrne H.J., Davoren M. (2009) "Preparation, characterization of NIPAM and NIPAM/BAM copolymer nanoparticles and their acute toxicity testing using an aquatic test battery." *Aquatic Toxicology* 92(3): 146-154.
- Nations S., Long M., Wages M., Canas J., Maul J.D., Theodorakis C., Cobb G.P. (2011). "Effects of ZnO nanomaterials on *Xenopus laevis* growth and development." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74(2): 203-210.
- Nemmar A., Hoylaerts M.F., Hoet P.H.M., Dinsdale D., Smith T., Xu H., Vermeylen J., Nemery B. (2004). "Ultrafine Particles Affect Experimental Thrombosis in an In Vivo Hamster Model." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 166(7): 998-1004.
- Nicolau D.E., Phillimore J., Cross R., Nicolau D.V. (2000). "Nanotechnology at the crossroads: the hard or the soft way?" *Microelectronics Journal* 31(7): 611-616.
- Nowack B., Bucheli T.D. (2007). "Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment." *Environmental Pollution* 150(1): 5-22.
- Nunes B.S., Carvalho F.D., Guilhermino L.M., Van Stappen G. (2006) "Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing." *Environmental pollution* 144(2006): 453-462.

## O

- Oberdörster E. (2004). "Manufactured nanomaterials (Fullerene, C<sub>60</sub>) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass." *Environmental health perspectives* 112(10): 1058-1062.
- Oberdörster G., Ferin J., Lehnert B.E. (1994). "Correlation between Particle Size, *In Vivo* Particle Persistence, and Lung Injury." *Environ Health Perspect* 102(5): 7.
- Oberdörster G., Oberdörster E., Oberdörster J. (2005). "Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles." *Environmental health perspectives* 113(7): 823-839.
- Oberdörster E., Zhu S., Blickey T.M., McClellan-Green P., Haasch M.L. (2006). "Ecotoxicology of carbon-based engineered nanoparticles: effects of fullerene (C<sub>60</sub>) on aquatic organisms." *Caron* 44(6): 1112-1120.
- Orndorff S.A. and Colwell R.R. (1980). "Distribution and identification of luminous bacteria from the Sargasso sea." *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 39, n. 5, 983-987.

Ostrensky A., Wasielesky J.W., Pestana D. (1992). "Acute toxicity of ammonia to *Artemia sp.*" *An Acad Bras Cienc.* 64(4): 391-395.

## P

Palaniappan P.L.R.M. and Pramod K.S. (2011). "Raman spectroscopic investigation on the microenvironment of the liver tissues of Zebrafish (*Danio rerio*) due to titanium dioxide exposure." *Vibrational Spectroscopy* 56(2): 146-153.

Pantani C., Arizzi Novelli A., Maggitti M.C., Volpi Ghirardini A. (1994). "Impiego del test Microtox nella valutazione della tossicità di sostanze pure, effluenti e matrici solide". Atti seminario di studi "Dalla tossicologia alla ecotossicologia" a c. di Azzoni R., De Marco N., Sansoni G., Pordenone 16-17 settembre 1994.

Paterson G., Ataria J.M., Hoque M.E., Burns D.C., Metcalfe C.D. (2011). "The toxicity of titanium dioxide nanopowder to early life stages of the Japanese medaka (*Oryzias latipes*)." *Chemosphere* 82(7): 1002-1009.

Peigney A., Laurent Ch, Flahaut E., Bacsá R.R., Rousset A. (2001). "Specific surface area of carbon nanotubes and bundles of carbon nanotubes." *Carbon* 39(4): 507-514.

Perreault F., Bogdan N., Morin M., Claverie J., Popovic R. (2010). "Interaction of gold nanoglycodendrimers with algal cells (*Chlamydomonas reinhardtii*) and their effect on physiological processes." *nanotoxicology* 0(0): 1-12.

Petica A., Gavriľiu G., Lungu M., Buruntea M., Panzaru C. (2008). "Colloidal silver solutions with antimicrobial properties." *Materials Science and Engineering: B* 152(1-3): 22-27.

Peng X., Palma S., Fischer N.S., Wong S. (2011). "Effect of morphology of ZnO nanostructures on their toxicity to marine algae." *Aquatic Toxicology* 102(3-4): 186-196.

Petersen E.J., Akkanen J., Kukkonen V.J.K., Weber W.J. (2009). "Biological Uptake and Depuration of Carbon Nanotubes by *Daphnia magna*." *Environmental Science & Technology* 43(8): 2969-2975.

Ponder S. M., Darab J.G., Mallouk T. (2000). "Remediation of Cr(VI) and Pb(II) aqueous solutions using supported, nanoscale zero-valent iron." *Environmental Science & Technology* 34(12): 2564-2569.

Poon V.K. and Burd A. (2004). "*In vitro* cytotoxicity of silver: implication for clinical wound care." *Burns* 30(2): 140-147.

Prasad G.K., Agarwal G.S., Singh Beer, Rai G.P., Vijayaraghavan R. (2008). "Photocatalytic inactivation of *Bacillus anthracis* by titania nanomaterials." *Journal of Hazardous Materials* 165(1-3): 506-510.

Prencesti E., Ferrara E., Berto S., Fisticaro P., Daniele P.G. (2007). "Development of a reference solution for the pH of seawater." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 388(8): 1877-1883.

## Q

Quadros M.E., Marr M.C. (2010). "Environmental and human health risks of aerosolized silver nanoparticles" - *J. Air & Waste Manage. Assoc.* 60:770-781

Quintana C., Bellefqih S., Laval J.Y., Guerquin-Kern J.L., Wu T.D., Avila J., Ferrer I., Arranz R., Patiño C. (2006). "Study of the localization of iron, ferritin, and hemosiderin in Alzheimer's disease hippocampus by analytical microscopy at the subcellular level." *Journal of Structural Biology* 153(1): 42-54.

## R

- Ragni M. and Ribera D'Alcalà M. (2007). "Circadian variability in the photobiology of *Phaeodactylum tricornutum*: pigment content." *Journal of Plankton Research* 29(2): 141-156.
- Ramaiah N. and Chandramohan D. (1993). "Ecological and laboratory studies on the role of luminous bacteria and their luminescence in coastal pollution surveillance." *Marine Pollution Bulletin*, vol. 26, n. 4, 190-201.
- Ramesh A. and Venugopalan V. K. (1988). "Luminous microflora associated with the fishes *Mugil cephalus* and *Tachysurus arius*." *FEMS Microbiology Letters*, vol. 53, 1, 27-34
- Ramsden C.S., Smith T.J., Shaw B.J., Handy R.D (2009). "Dietary exposure to titanium dioxide nanoparticles in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): no effect on growth, but subtle biochemical disturbances in the brain." *Ecotoxicology* 18(7): 939-951.
- Reardon J., Foreman J.A., Searcy R.L. (1966). "New reactants for the colorimetric determination of ammonia." *Clin. Chim. Acta* 14 (3), 203-205.
- Reeves J.F., Davies S.J., Dodd N.J.F., Jha A.N. (2007). "Hydroxyl radicals (OH) are associated with titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 640(1-2): 113-122.
- Reutergårdh, L. B. and M. Iangphasuk (1997). "Photocatalytic decolourization of reactive azo dye: A comparison between TiO<sub>2</sub> and us photocatalysis." *Chemosphere* 35(3): 585-596.
- Rho J., Park Y., Park K., Choi J. (2010). "Ecotoxicological investigation of CeO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub> nanoparticles on the soil nematode *Caenorhabditis elegans* using gene expression, growth, fertility, and survival as endpoints." *Environmental Toxicology and Pharmacology* 29(2): 167-172.
- Robichaud C. O., Uyar A. E., Darby M.R., Zucker L.G., Wiesner M.R. (2009). "Estimates of upper bounds and trends in nano-TiO<sub>2</sub> production as a basis for exposure assessment." *Environmental Science & Technology* 43(12): 4227-4233.
- Ross P. (1993). "The use of bacterial luminescent system in aquatic toxicity testing." *Ecotoxicology monitoring a c. di Richardson M.*, pg 185-195, VCH Weinheim (Germany).
- Ruby E.G. (1996). "Lessons from a cooperative, bacterial-animal association: the *Vibrio fischeri*-*Euprymna scolopes* light organ symbiosis." *Annual Review of Microbiology*.
- Ruby E.G. and Lee K-H. (1998). "The *Vibrio fischeri*-*Euprymna scolopes* light organ association: current ecological paradigms." *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 64, n. 3, 805-812.
- Ruby E.G. and McFall-Ngai M.J. (1999). "Oxygen-utilizing reactions and symbiotic colonization of the squid light organ by *Vibrio fischeri*." *Trends in Microbiology*, vol. 7 n. 10, 414-419.
- Ruby E.G., Urbanowski M., Campbell J., Dunn A., Faini M., Gunsalus R., Lostroh P., Lupp C., McCann J., Millikan D., Schaefer A., Stabb E., Stevens A., Visick K., Whistler C., Greenberg E.P. (2004). "Complete genome sequence of *Vibrio fischeri*: A symbiotic bacterium with pathogenic congeners." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(8): 3004-3009.

## S

- Sadiq M.I., Dalai S., Chandrasekaran N., Mukherjee A. (2011). "Ecotoxicity study of titania (TiO<sub>2</sub>) NPs on two microalgae species: *Scenedesmus sp.* and *Chlorella sp.*" *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74(5): 1180-1187.

- Savolainen K., Alenius H., Norpa H., Pylkkänen L., Tuomia T., Kasperb G. (2010). "Risk assessment of engineered nanomaterials and nanotechnologies - A review." *Toxicology* 269(2-3): 92-104.
- Savorelli F., Palazzi D., Gorbi G., Invidia M., Sei S., Magaletti E., Manfra L., Gelli F. (2007). "Messa a punto di una metodologia di saggio a 14 giorni su *Artemia franciscana* e *A. parthenogenetica*." *Biologia Ambientale*, 21 (1): 27-36, 2007.
- Sayes C.M., Wahi R., Kurian P.A., Liu Y., West J.L., Ausman K.D., Warheit D.B., Colvin V.L. (2006). "Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells." *Toxicological Sciences* 92(1): 174-185.
- Scala S., Carels N., Falciatore A., Chiusano M.L., Bowler C. (2002). "Genome properties of the diatom *Phaeodactylum tricoratum*." *Plant Physiology* 129(3): 993-1002.
- Schwab F., Bucheli T.D., Lukhele L.P., Magrez A., Nowack B., Sigg L., Knauer K. (2011). "Are Carbon Nanotube Effects on Green Algae Caused by Shading and Agglomeration?" *Environmental Science & Technology*:
- Scott-Fordsmand J.J., Krogh P.H., Schaefer M., Johansen A. (2008). "The toxicity testing of double-walled nanotubes-contaminated food to *Eisenia veneta* earthworms." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71(3): 616-619.
- Scown T.M., Van Aerle R., Tyler C.R. (2020). "Review: Do engineered nanoparticles pose a significant threat to the aquatic environment." *Critical Reviews in Toxicology* 40(7): 653-670.
- Simkò M., Nentwich M., Gazzo A., Fiedeler U. (2010). "How Nanoparticles Enter the human body and their effect there." Nano Trust Dossier No. 003en, November 2010.
- Skocaj M., Filipic M., Petkovic J., Novak S. (2011). "Titanium dioxide in our everyday life; is it safe?" *Radiology and Oncology* 45(4): 227-247.
- Smalley R.E., Weisman R.B. (2003). "Deciphering optical signatures." *Materials Today*, February 2003.
- Smith C.J., Shaw B.J., Handy R.D. (2007). "Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): Respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects." *Aquatic Toxicology* 82(2): 94-109.
- Som C., Berges M., Chaudhry Q., Dusinska M., Fernandes T.F., Olsen S.I., Nowack B. (2010). "The importance of life cycle concepts for the development of safe nanoproducts." *Toxicology* 269(2-3): 160-169.
- Som C., Wick P., Krug H., Nowack B. (2011). "Environmental and health effects of nanomaterials in nanotextiles and façade coatings." *Environment International* 37(6): 1131-1142.
- Soppimath K., Aminabhavi T.M., Kulkarni A.R., Rudzinski W.E. (2001). "Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices." *Journal of Controlled Release* 70(1-2): 1-20.
- Stebbing A.R.D. (1982). "Hormesis - The stimulation of growth by low levels of inhibitors." *The Science of The Total Environment* 22(3): 213-234.
- Strigul N., Vaccari L., Galdun C., Wazne M., Liu X., Christodoulatos C., Jasinkiewicz K. (2009). "Acute toxicity of boron, titanium dioxide, and aluminum nanoparticles to *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*." *Desalination* 248 (2009): 771 - 782.
- Sun H., Zhang X., Niu Q., Chen Y., Crittenden J.C. (2007). "Enhanced accumulation of arsenate in carp in the presence of titanium dioxide nanoparticles." *Water Air and Soil Pollution* 178(1-4): 245-254.

## T

- Tardif F. (2007). "Nanoparticle monitoring - State of the art and development strategies." Nanosafety Hub – Brussels, 23<sup>th</sup> March 2007.
- Tempelton R.C., Ferguson P.L., Washburn K.M., Scrivens W.A., Chandler G.T. (2006). "Life-Cycle Effects of Single-Walled Carbon Nanotubes (SWNTs) on an Estuarine Meiobenthic Copepod" *Environmental Science & Technology* 40(23): 7387-7393.
- Teow Y., Asharani P.V., Prakash Hande M., Valiyaveetil S. (2011). "Health impact and safety of engineered nanomaterials." *Chemical Communications* 47(25): 7025-7038.
- Tesson B., Genet M.J., Fernandez V., Degand S., Rouxhet P.G., Martin-Jézéquel V. 2009. "Surface chemical composition of diatoms." *Chem BioChem*, 10(12): 2011 – 2024.
- The Royal Society & The Royal Academy of Engineering (2004). "Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties." - Nanoscience and nanotechnologies.
- Theng B.K.G., Yuan G. (2008). "Nanoparticles in the Soil Environment." *Elements* 4(6): 395-399.
- Tian F., Cui D., Schwarz H., Gomez Estrada G., Kobayashi H. (2006). "Cytotoxicity of single-wall carbon nanotubes on human fibroblasts." *Toxicology in Vitro* 20(7): 1202-1212.
- Tiede K., Hasselov M., Breitbarth E., Chaudhry Q., Boxall B.A. (2009). "Considerations for environmental fate and ecotoxicity testing to support environmental risk assessments for engineered nanoparticles." *Journal of Chromatography A* 1216(3): 503-509.
- Tomilina I.I., Gremyachikh V.A., Myl'nikov A.P., Komov V.T. (2011). "Changes in biological characteristics of freshwater heterotrophic flagellates and cladocerans under the effect of metal oxide nano- and microparticles." *Inland Water Biology* 4(4): 475-483.

## U

- Uchino T., Tokunaga H., Ando M., Utsumi H. (2002). "Quantitative determination of OH· radical generation and its cytotoxicity induced by TiO<sub>2</sub>-UVA treatment". *Toxicology in vitro* 2002, 16 (5), 629–635.
- UNI EN ISO - Algal growth inhibition test with *Phaeodactylum tricornutum* (UNI EN ISO 1023/53, 2006).
- UNI EN ISO - Bioluminescence inhibition test with *Vibrio fischeri* (Microtox®) (ISO EN ISO 11348-3, 1998).
- U.S. Department of Interior – Fish and Wildlife Service and U.S. Army Corps of Engineers – Coastal Ecology Group Waterways Experiment Station (1988). "Pacific Oyster." Species profiles: life history and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (Pacific Northwest) - Biological Report 82(11.85), TR EL-82-4, September 1988
- Usenko C.Y., Harper S.L., Tanguay R.L. (2007). "In vivo evaluation of carbon fullerene toxicity using embryonic zebrafish." *Carbon* 45(9): 1891-1898.

## V

- Valant J., Drobne D., Sepcic C., Jemec A., Kogej K., Kostanjsek R. (2009). "Hazardous potential of manufactured nanoparticles identified by in vivo assay." *Journal of Hazardous Materials* 171(1-3): 160-165.
- Varotto L. (2007). "Sviluppo e validazione di un cDNA microarray a scala genomica in *Mytilus galloprovincialis*." Tesi di Dottorato in Bioscienze – Indirizzo di Genetica e Biologia molecolare dello sviluppo, Dipartimento di Biologia – Università degli Studi di Padova.

- Vasseur P., Bois F., Ferard J.F., Rast C. (1986). "Influence of physicochemical parameters on the Microtox test response", Toxicity assessment: an international quarterly, vol.1, 283-300.
- Velzeboer I., Hendriks A.J., Ragas M.J., Van de Meent D. (2008). "Aquatic ecotoxicity tests of some nanomaterials." Environmental Toxicology and Chemistry 27(9): 1942-1947.
- Vevers W.F. e Jha A.N. (2008). "Genotoxic and cytotoxic potential of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles on fish cells *in vitro*." Ecotoxicology Volume 17, Number 5 / July, 2008: 410-420

## W

- Wang C., Wang L., Wang Y., Liang Y., Zhang J. (2011). "Toxicity effects of four typical nanomaterials on the growth of *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Agrobacterium tumefaciens*." Environmental Earth Sciences: 1-7.
- Wang H., Wick R.L., Xing B. (2008). "Toxicity of nanoparticulate and bulk ZnO, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and TiO<sub>2</sub> to the nematode *Caenorhabditis elegans*." Environmental Pollution 157(4): 1171-1177.
- Wang J., Asbach C., Fissan H., Hülser T., Kuhlbusch T.A.J., Thompson D., Pui D.Y.H. (2011). "How can nanobiotechnology oversight advance science and industry: examples from environmental, health, and safety studies of nanoparticles (nano-EHS)." Journal of nanoparticle Research 13(4): 1373-1387.
- Wang J., Zhang X., Chen Y., Sommerfeld M., Hu Q. (2008). "Toxicity assessment of manufactured nanomaterials using the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*." Chemosphere 73(7): 1121-1128.
- Ward J.E., Kach D.J. (2009). "Marine aggregates facilitate ingestion of nanoparticles by suspension-feeding bivalves." Marine Environmental Research 68(3): 137-142.
- Warheit D.B., Hoke R.A., Finlay C., Donner E.M., Reed K.L., Sayes C.M. (2007). "Development of a base set of toxicity tests using ultrafine TiO<sub>2</sub> particles as a component of nanoparticle risk management." Toxicology Letters 171(3): 99-110.
- Wiench K., Wohlleben W., Hisgen W., Radke K., Salinas E., Zok S., Landsiedel R. (2009). "Acute and chronic effects of nano- and non-nano-scale TiO<sub>2</sub> and ZnO particles on mobility and reproduction of the freshwater invertebrate *Daphnia magna*." Chemosphere 76(10): 1356-1365.
- Wiesenthal A., Hunter L., Wang S., Wickliffe J. and Wilkerson M. (2011). "Nanoparticles: small and mighty". International Journal of Dermatology 50(3): 247-254.
- Wilson D.P. e Lucas C.E. (1942). "Nitzschia cultures at Hull and at Plymouth." Nature (London) 149: 331.
- Wise K. and Brasuel M. (2011). "The current state of engineered nanomaterials in consumer goods and waste streams: The need to develop nanoproperty-quantifiable sensors for monitoring engineered nanomaterials." Nanotechnology, Science and Applications 4(1): 73-86.
- Wong S.W.Y., Leung P.T.Y., Djurišić A.B., Leung K.M.Y. (2010) "Toxicities of nano zinc oxide to five marine organisms: influences of aggregate size and ion solubility." Analytical Bioanalytical Chemistry: 396:609–618.

## X, Y

- Xiong D., Fang T., Yu L., Sima X., Zhu W. (2011). "Effects of nano-scale TiO<sub>2</sub>, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: Acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage." Science of The Total Environment.

- Yao Y., Li Y., Shao W., Kang Y., Wang H., Huang Z., Liao X., Yin G. (2009). "Antibacterial properties of TiO<sub>2</sub> ceramic pellets prepared using nano TiO<sub>2</sub> powder." *Journal of Wuhan University of Technology--Materials Science Edition* 24(3): 337-342.
- Yeo M. and Kang M. (2008). "Effects of nanometer sized silver materials on biological toxicity during zebrafish embryogenesis." *Bulletin of the Korean Chemical Society* 29(6): 1179-1184.
- Yeo M. and Kang M. (2009). "Effects of Cu (x) TiO (y) nanometer particles on biological toxicity during zebrafish embryogenesis." *Korean Journal of Chemical Engineering* 26(3): 711-718.

## Z

- Zhang X., Sun H., Zhang Z., Niu Q., Chen Y., Crittenden J.C. (2007). "Enhanced bioaccumulation of cadmium in carp in the presence of titanium dioxide nanoparticles." *Chemosphere* 67(1): 160-166.
- Zhang J., Wages M., Cox S.B., Maul J.D., Li Y., Barnes M., Hope-Weeks L., Cobb J.P. (2012). "Effect of titanium dioxide nanomaterials and ultraviolet light coexposure on African clawed frogs (*Xenopus laevis*)."  
*Environmental Toxicology and Chemistry*.
- Zhu X., Chang Y., Chen Y. (2010a). "Toxicity and bioaccumulation of TiO<sub>2</sub> nanoparticle aggregates in *Daphnia magna*." *Chemosphere* 78(3): 209-215.
- Zhu X., Wang J., Zhang X., Chang Y., Chen Y. (2010b). "Trophic transfer of TiO<sub>2</sub> nanoparticles from *Daphnia* to zebrafish in a simplified freshwater food chain." *Chemosphere* 79(9): 928-933.
- Zhu X., Zhu J., Cai Z. (2011a). "The toxicity and oxidative stress of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in marine abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*)."  
*Marine Pollution Bulletin* 63(5-12): 334-338.
- Zhu X., Zhu J., Cai Z. (2011b). "TiO<sub>2</sub> nanoparticles in the marine environment: impact on the toxicity of tributyltin to abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*) embryos." *Environmental Science & Technology* 45(8): 3753-3758.

## Libri, conferenze e comunicati

### A-Z

- AA. VV. (2010). “Libro Bianco – Esposizione a nanomateriali ingegnerizzati ed effetti sulla salute e sicurezza nei luoghi di lavoro” a cura del Network Nazionale per l’individuazione di misure di prevenzione e protezione connesse con l’esposizione a nanomateriali in ambito lavorativo (NanOSH Italia).
- Bergey’s manual of systematic bacteriology vol.1, (1984) Krieg N.R. and Holt J.G. (eds), Williams & Wilkins, Baltimore (Canada).
- Bolognani L. (1990). “Compendio di bioenergetica.” Piccin nuova libreria SPA, Padova (PD).
- Commissione Europea (2004). “I materiali edili "intelligenti" sviluppati nell'UE assorbono ed eliminano l'inquinamento” - Comunicato stampa - Bruxelles, 4 marzo 2004.
- Da Rios G., Lambrugo S., Bacchi M. (2008). "Analisi sperimentale per pavimentazioni urbane fotocatalitiche." 17° Convegno Nazionale S.I.I.V., Enna 10-12 settembre 2008.
- Fiorin M.G. (1993). “Microbiologia: principi e tecniche.” Edizioni Ermes scuola, Milano.
- Madigan M.T. and Martinko J. (2005). “Brock - Biology of Microorganisms”
- Marcomini A. (2009). “Introduction to Risk Assessment of Nanomaterials.” Lezione per la 1<sup>st</sup> Nanosafety Autumn School, Venezia – 16-20 novembre 2009.
- Microbics Corporation (1992). Microtox manual. A toxicity testing handbook.
- Monteiro-Riviere N.A. and Tran C.L. (2007) “Nanotoxicology.” Informa Health Care (1<sup>st</sup> Edition 23 July, 2007).
- Nowach B. (2009). “Environmental exposure assessment of nanomaterials.” Lezione per la 1<sup>st</sup> Nanosafety Autumn School, Venezia – 16-20 novembre 2009.
- Polsinelli M., De Felice M., Galizzi A., Galli E., Mastromei G., Mazza P., Viale G. (1993). “Microbiologia.” Bollati Boringhieri, Torino.
- Sabbioni E. (2010). “Il ruolo scientifico di ECSIN per uno sviluppo responsabile delle nanotecnologie.” Presentazione per l’inaugurazione di ECSIN – Rovigo, 3 dicembre 2010.
- Università degli Studi di Milano (2005). “Trattamenti superficiali e Materiali da costruzione ecologici” – Giornata di Studio dell’Associazione Consiglieri Regionali della Lombardia. Bicocca 17/11/2005.
- Urbini A. (2007). “Appunti ‘malfatti’ di Nanoelettronica.” – 09 aprile 2007.
- Vighi M. and Bacci E. (1998). “Ecotossicologia” UTET, 1998.
- Woodrow Wilson International Center for Scholars and the Pew Charitable Trusts (2005). “Project on Emerging Nanotechnologies.” fondato nell’aprile 2005.
- Zhang W.W., Tong L.P., Guo X.Y., Wang L., Wu R.Q., Zhao G.P., Wang X.F., Du H., Wu L.J., Xu A. (2011). “Reproductive toxicity of anatase TiO<sub>2</sub> nanoparticles in *Caenorhabditis elegans*.” 5th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, iCBBE 2011, Wuhang, 2011.

## SITI INTERNET CONSULTATI

- <http://characterizationmatters.org/>
- [www.aapsj.org](http://www.aapsj.org)
- [www.advantage.bobrosenbaum.com](http://www.advantage.bobrosenbaum.com)
- [www.ageservices.org/doc/Tio2\\_Bioossido\\_di\\_Titanio\\_Fotocatalitico.doc](http://www.ageservices.org/doc/Tio2_Bioossido_di_Titanio_Fotocatalitico.doc)
- [www.atmarmorservice.it](http://www.atmarmorservice.it)
- [www.azonano.com](http://www.azonano.com)
- [www.cd-catalizzatori.net](http://www.cd-catalizzatori.net)
- [www.cheaptubesinc.com](http://www.cheaptubesinc.com)
- [www.classroom.sdmesa.net](http://www.classroom.sdmesa.net)
- [www.cnrs.fr](http://www.cnrs.fr)
- [www.dior.com](http://www.dior.com)
- [www.ebpi.ca](http://www.ebpi.ca)
- [www.ecoblog.it](http://www.ecoblog.it)
- [www.endomoribu.shinshu-u.ac.jp](http://www.endomoribu.shinshu-u.ac.jp)
- [www.epub.oeaw.ac.at/ita/nanotrust-dossiers/dossier003en.pdf](http://www.epub.oeaw.ac.at/ita/nanotrust-dossiers/dossier003en.pdf)
- [www.epub.oeaw.ac.at/ita/nanotrust-dossiers/dossier007en.pdf](http://www.epub.oeaw.ac.at/ita/nanotrust-dossiers/dossier007en.pdf)
- [www.europass.parma.it/page.asp?IDCategoria=553&IDSezione=0&ID=371508](http://www.europass.parma.it/page.asp?IDCategoria=553&IDSezione=0&ID=371508)
- [www.osha.europa.eu/en/news/eu-european-commission-recommendation-on-the-definition-of-nanomaterial](http://www.osha.europa.eu/en/news/eu-european-commission-recommendation-on-the-definition-of-nanomaterial)
- [www.flickr.com](http://www.flickr.com)
- [www.hlasek.com](http://www.hlasek.com)
- [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)
- [www.legambientepse.org](http://www.legambientepse.org)
- [www.lenntech.com/italiano/tavola-periodica-elementi/ti-it.htm](http://www.lenntech.com/italiano/tavola-periodica-elementi/ti-it.htm)
- [www.mater.unimib.it/orienta/files/esperienza%20TiO2.pdf](http://www.mater.unimib.it/orienta/files/esperienza%20TiO2.pdf)
- [www.mednat.org](http://www.mednat.org)
- [www.mindat.org](http://www.mindat.org)
- [www.nanodiagnostics.it](http://www.nanodiagnostics.it)
- [www.nanolawreport.com](http://www.nanolawreport.com)
- [www.nanoproject.org](http://www.nanoproject.org)
- [www.nanosafe.org/scripts/home/publigen/content/templates/show.asp?P=63&L=EN&ITEMID=13](http://www.nanosafe.org/scripts/home/publigen/content/templates/show.asp?P=63&L=EN&ITEMID=13)
- [www.nanosilver.it](http://www.nanosilver.it)
- [www.nanotechproject.org/inventories/consumer/updates/](http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/updates/)
- [www.nanowerk.com](http://www.nanowerk.com)
- [www.neurophilosophy.files.wordpress.com](http://www.neurophilosophy.files.wordpress.com)
- [www.oeaw.ac.at/ita](http://www.oeaw.ac.at/ita)
- [www.oecd.org/env/nanosafety](http://www.oecd.org/env/nanosafety)

- [www.oecd.org/env/nanosecurite](http://www.oecd.org/env/nanosecurite)
- [www.photon.t.u-tokyo.ac.jp](http://www.photon.t.u-tokyo.ac.jp)
- [www.purestcolloids.com](http://www.purestcolloids.com)
- [www.rbclifesciences.com](http://www.rbclifesciences.com)
- [www.rinnovabili.it](http://www.rinnovabili.it)
- [www.samsung.com](http://www.samsung.com)
- [www.soladey.com](http://www.soladey.com)
- [www.solostocks.com](http://www.solostocks.com)
- [www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)
- [www-ibmc.u-strasbg.fr](http://www-ibmc.u-strasbg.fr)



## RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia ECSIN – Veneto Nanotech S.C.p.A. per aver co-finanziato questo dottorato di ricerca.

Si ringraziano inoltre:

- la Dr.ssa Sarah Callegaro e tutto il gruppo di ricerca del prof. Antonio Marcomini (Dipartimento di Scienze Ambientali, Statistiche ed Informatiche – Università Cà Foscari, Venezia), per le analisi di caratterizzazione chimica primaria e secondaria;
- il prof. Giancarlo Rampazzo e il tecnico Flavia Visin (Dipartimento di Scienze Ambientali, Statistiche ed Informatiche, sezione geomineralogica – Università Cà Foscari, Venezia), per le analisi di quantificazione con l'ICP-OES;
- la Dr.ssa Sara Totaro (ECSIN – Veneto Nanotech S.C.p.A), per la esecuzione di analisi in ICP-MS e la caratterizzazione di alcune dispersioni di nTiO<sub>2</sub>;
- il Dr. Ivan Micetic (ECSIN – Veneto Nanotech S.C.p.A), per le valutazioni al microscopio passate e future.

## RINGRAZIAMENTI PERSONALI

Giunto al termine di questo lavoro vorrei riservare ancora qualche riga per dei ringraziamenti personali.

Innanzitutto ringrazio Anna<sup>\*</sup>, tutor del mio dottorato, per avermi offerto questa possibilità e, soprattutto, per avermi concesso piena fiducia e libertà di gestione, scelta coraggiosa (specialmente all'inizio) e non sempre condivisa da tutti i docenti.

Ringrazio Sarah<sup>\*\*</sup> che ha condiviso con me i due terzi di questo percorso, curando personalmente la parte chimica del mio lavoro scrupolosamente e con grande professionalità; col tempo, i grafici e le formule prodotte sbiadiranno tra le pagine della tesi ma il ricordo della tua gentilezza resterà indelebile.

Ringrazio Giovanni<sup>+</sup> che, per meriti, può considerarsi il co-tutor di questo lavoro. La sua disponibilità ad aiutarmi è stata costante ed incondizionata. Da lui, inoltre, ho imparato molte cose sia per quanto riguarda le esperienze di laboratorio, sia per la parte di rielaborazione e l'utilizzo dei dati (ripetiamo insieme: “non esistono dati negativi!”).

Ringrazio il professor Giancarlo Rampazzo, non solamente per l'utilizzo del suo laboratorio ma, soprattutto, per la continua disponibilità al dibattito scientifico positivamente critico e stimolante, nonché per i nostri discorsoni extra-accademici. Come dissi al termine della tesi di laurea, il conto è sempre aperto.

...e siccome dietro un grande uomo c'è sempre una grande donna, ringrazio Flavia<sup>++</sup>, che con competenza e professionalità, mi ha fornito il supporto necessario per le analisi all'ICP-OES e non solo.

Un grande ringraziamento va all'ottimo Kekko<sup>^</sup> per le chiacchierate sul Giappone, sul Tai Chi, sullo Shodo e sulla spiritualità in senso generale, insomma, su “tutto quello che non centra ma zizza con lateneo” e che però fa tanto bene al cuore. In pratica, la mia istituzione filosofico-spirituale personale, all'interno di Cà Foscari.

Ringrazio anche la Sabry<sup>^^</sup>, la mia ex-correlatrice, senza la quale non avrei nemmeno saputo della possibilità di questo dottorato. La lista delle ragioni per cui dovrei ringraziarti sarebbe

molto lunga, per cui ho preferito inserirti solamente alla fine: in questo modo, se arriverai a leggere fino a qui, potrai capire da sola ciò che hai contribuito a produrre.

Ringrazio papà ECSIN per aver co-finanziato l'impresa, in particolar modo vorrei ringraziare alcune persone con cui ho interagito più o meno direttamente e cioè:

il prof. Enrico Sabbioni, con cui ho avuto il piacere di parlare alcune volte e, ogni volta, ho potuto apprendere cose molto interessanti;

la Dr.ssa Laura Manodori per il sostegno e l'incoraggiamento ricevuti durante le cupe ed intricate fasi iniziali di questo progetto.

Ringrazio mamma ACTV per avermi scarrozzato da Spinea a Venezia per tre anni (bus + vaporetto) ad un prezzo veramente irrisorio, alla faccia di chi ne parla male...

Ringrazio il micetto trovatello della Celestia che ho svezzato i primi mesi e ringrazio Sara<sup>§</sup> per averlo adottato e per i suoi inviti a pranzo sempre graditi!

Ringrazio tutti quelli che più o meno direttamente hanno in qualche modo contribuito alla realizzazione del mio lavoro, compresi coloro i quali donano il 5% alla Ricerca.

A me e alla Pata

basta.

\* Prof. Annamaria Volpi Ghirardini

\*\* Dr.ssa Sarah Callegaro

+ Dr. Giovanni Libralato

++ Sig.ra Flavia Visin

^ Prof. Francesco Gonella

^^ Dr.ssa Sabrina Manente

§ Sig.ra Sara Vio

<b>ACRONIMI E GLOSSARIO</b>	pag. 1
<b>1. SCOPO DELLA RICERCA</b>	pag. 11
1.1 Introduzione	pag. 11
1.2 Obbiettivi generali	pag. 14
<b>2. NANOPARTICELLE E NANOTECNOLOGIE</b>	pag. 17
2.1 Definizione di nanoparticelle	pag. 18
2.2 Definizione di nanotecnologia	pag. 20
2.3 Origine delle nanoparticelle	pag. 22
2.3.1 NP naturali	pag. 22
2.3.2 NP antropogeniche non intenzionali	pag. 22
2.3.3 NP antropogeniche intenzionali (ENP)	pag. 22
2.4 Classificazione delle nanoparticelle	pag. 24
2.4.1 Fullereni	pag. 24
2.4.2 Nanotubi al C	pag. 25
2.4.3 Carbon black	pag. 26
2.4.4 ENP basate sul C organico	pag. 27
2.4.5 Quantum dots	pag. 27
2.4.6 ENP metalliche e loro ossidi	pag. 28
2.4.7 Altre ENP	pag. 28
2.5 Caratterizzazione delle nanoparticelle	pag. 29
2.6 Proprietà ed applicazioni: il mercato delle nanoparticelle	pag. 32
2.6.1 Usi ed applicazioni del nAg	pag. 34
2.6.2 Usi ed applicazioni del nAu	pag. 36
2.6.3 Usi ed applicazioni delle ENP organiche	pag. 36
2.6.4 Usi ed applicazioni dei Q-Ds	pag. 38
2.6.5 Usi ed applicazioni del nSiO <sub>2</sub>	pag. 38
2.6.6 Usi ed applicazioni del nZnO	pag. 39
2.6.7 Usi ed applicazioni del nCeO <sub>2</sub>	pag. 39
2.7 Normativa delle nanoparticelle	pag. 40
<b>3. IL NANO BLOSSIDO DI TITANIO</b>	pag. 43
3.1 Introduzione	pag. 44
3.1.1 Proprietà fotocatalitiche del nTiO <sub>2</sub>	pag. 45
3.2 Usi ed applicazioni: il mercato del nTiO <sub>2</sub>	pag. 46
3.2.1 Cosmetici	pag. 47

3.2.2 Trattamento delle superfici	pag. 48
3.2.2.1 Il caso veneziano del Palazzo della Camera di Commercio	pag. 49
3.2.3 Detergenti mineralizzanti	pag. 50
3.2.4 Depurazione delle acque reflue	pag. 51
3.2.5 Depurazione dell'aria	pag. 52
3.2.6 Cementi e marciapiedi	pag. 52
3.2.6.1 Marciapiedi "verdi" contro lo smog: il caso di Signa (Firenze)	pag. 54
3.2.7 Trasferimento di calore e dissipazione	pag. 54
3.2.8 Agenti anti-corrosione	pag. 56
3.2.9 Alimenti	pag. 56
<b>4. SORGENTI E VIE DI INGRESSO DELLE NANOPARTICELLE NELL'AMBIENTE</b>	pag. 57
4.1 Dispersione e comportamento delle ENP nell'ambiente	pag. 58
4.1.1 NP nell'aria	pag. 59
4.1.2 NP nell'acqua	pag. 60
4.1.3 NP nei suoli e nei sedimenti	pag. 61
4.2 I modelli predittivi	pag. 63
4.2.1 Il modello di Gottschalk et al.	pag. 63
4.2.2 I modelli di Nowack	pag. 64
4.3 Un caso di studio reale	pag. 66
4.4 Valutazione del rischio	pag. 68
<b>5. APPROCCIO ECOTOSSICOLOGICO ALLA REALTA' DELLE NANOPARTICELLE</b>	pag. 71
5.1 Considerazioni generali: la nano(eco)tossicologia	pag. 72
5.1.1 Metodologie ed approcci alla materia	pag. 72
5.1.2 Dal paradigma al paradosso della massa	pag. 73
5.2 La produzione bibliografica inerente le ENP	pag. 76
5.2.1 Matrici	pag. 77
5.2.2 Organismi e tipologie dei test	pag. 78
5.2.3 Elenco delle specie	pag. 81
5.2.4 ENP e organismi	pag. 84
<b>6. ECOTOSSICOLOGIA DELLE NANOPARTICELLE</b>	pag. 87
6.1 Introduzione	pag. 88
6.2 Evidenze ecotossicologiche del nTiO <sub>2</sub>	pag. 90
6.2.1 Test coi batteri	pag. 90
6.2.2 Test con funghi e lieviti	pag. 96
6.2.3 Test con le alghe	pag. 98
6.2.4 Test coi nematodi	pag. 103

6.2.5 Test con gli anellidi	pag. 105
6.2.6 Test con i molluschi	pag. 109
6.2.7 Test con gli echinodermi	pag. 112
6.2.8 Test coi crostacei	pag. 112
6.2.9 Test con i pesci	pag. 121
6.2.10 Test con gli anfibi	pag. 129
6.2.11 Test con i cetacei	pag. 130
6.2.12 Riepilogo	pag. 130
<b>6.3 Evidenze ecotossicologiche delle altre ENP</b>	pag. 134
6.3.1 ENP organiche	pag. 134
6.3.1.1 C <sub>60</sub> e CB	pag. 134
6.3.1.2 Nanotubi al C	pag. 136
6.3.2 ENP inorganiche	pag. 137
6.3.2.1 Q-Dots	pag. 137
6.3.2.2 ENP metalliche e loro ossidi	pag. 138
<b>7. TOSSICOLOGIA DELLE ENP</b>	pag. 145
<b>7.1 Tossicocinetica delle ENP</b>	pag. 146
7.1.1 Barriere fisiologiche	pag. 146
7.1.2 Ingresso nelle cellule	pag. 148
<b>7.2 Tossicodinamica delle ENP</b>	pag. 150
7.2.1 Principali meccanismi di tossicità	pag. 150
7.2.2 Effetti di tossicità	pag. 151
7.2.2.1 Effetti sulle vie aeree	pag. 151
7.2.2.2 Effetti neurologici	pag. 152
7.2.2.3 Effetti sulla circolazione sanguigna	pag. 153
7.2.2.4 Effetti su fegato e reni	pag. 153
7.2.2.5 Effetti sul tratto gastrointestinale	pag. 153
7.2.2.6 Effetti sulla cute	pag. 154
<b>8. LA BATTERIA DI ORGANISMI UTILIZZATA NEI TEST DI TOSSICITA'</b>	pag. 157
<b>8.1 Introduzione</b>	pag. 158
<b>8.2 Il batterio <i>Vibrio fischeri</i></b>	pag. 159
8.2.1 Classificazione e morfologia	pag. 159
8.2.2 Fisiologia	pag. 159
8.2.2.1 Metabolismo	pag. 159
8.2.2.2 Bioluminescenza	pag. 160
8.2.3 Ecologia	pag. 160
8.2.4 Il test Microtox®	pag. 161
8.2.4.1 Principi	pag. 161
8.2.4.2 Elaborazione dei dati	pag. 162
8.2.4.3 Caratteristiche	pag. 163

8.2 L'alga unicellulare <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	pag. 165
8.3.1 Classificazione e morfologia	pag. 165
8.3.2 Ecologia	pag. 166
8.3.3 Il test di tossicità	pag. 167
8.3.3.1 Principi	pag. 167
8.3.3.2 Elaborazione dei dati	pag. 167
8.3.3.3 Caratteristiche	pag. 168
8.4 I bivalvi <i>Crassostrea gigas</i> e <i>Mytilus galloprovincialis</i>	pag. 170
8.4.1. Classificazione e morfologia	pag. 170
8.4.2 Ecologia e riproduzione	pag. 172
8.4.3 I test di tossicità	pag. 173
8.4.3.1 Principi	pag. 173
8.4.3.2 Elaborazione dei dati	pag. 174
8.4.3.3 Caratteristiche	pag. 174
8.5 Il crostaceo <i>Artemia franciscana</i>	pag. 176
8.5.1 Classificazione e morfologia	pag. 176
8.5.2 Ecologia e riproduzione	pag. 177
8.5.3 I test di tossicità	pag. 178
8.5.3.1 Principi	pag. 178
8.5.3.2 Elaborazione dei dati	pag. 179
8.5.3.3 Caratteristiche del test	pag. 179
<b>9. MATERIALI E METODI</b>	pag. 181
9.1 Caratterizzazione chimico-fisica e quantitativa del nTiO <sub>2</sub>	pag. 182
9.1.1 Caratterizzazione primaria del nTiO <sub>2</sub>	pag. 183
9.1.1.1 Composizione	pag. 183
9.1.1.2 Dimensioni e forma	pag. 184
9.1.1.3 Fasi cristallografiche	pag. 184
9.1.1.4 Superficie specifica e porosità	pag. 184
9.1.2 Comportamento chimico del nTiO <sub>2</sub> in ASW (caratterizzazione secondaria)	pag. 185
9.1.2.1 Potenziale Z	pag. 185
9.1.2.2 Variazione del pH	pag. 185
9.1.2.3 Dimensioni e distribuzione del materiale sospeso (salinità costante)	pag. 185
9.1.2.4 Dimensioni e distribuzione del materiale sospeso in funzione della salinità	pag. 186
9.1.2.5 Stabilità	pag. 186
9.1.3 Analisi specifiche con ICP-OES e TEM	pag. 186
9.1.3.1 Analisi con ICP-OES per il test di bioaccumulo con <i>A. franciscana</i>	pag. 186
9.1.3.2 Acquisizione di immagini al TEM inerenti l'eventuale presenza di nTiO <sub>2</sub> nell'alga <i>P. tricornutum</i>	pag. 187
9.2 nTiO <sub>2</sub> : preparazione delle dispersioni	pag. 189
9.2.1 Le acque marine ricostruite	pag. 189
9.2.2 Dispersioni di nTiO <sub>2</sub>	pag. 189
9.2.2.1 Prove con l'alginato	pag. 191
9.3 I test di tossicità	pag. 192

9.3.1 Test di tossicità con <i>Vibrio fischeri</i>	pag. 194
9.3.2 Test di tossicità con <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	pag. 197
9.3.3 Test di tossicità con <i>Crassostrea gigas</i> e <i>Mytilus galloprovincialis</i>	pag. 201
9.3.4 Test di tossicità con <i>Artemia franciscana</i>	pag. 205
9.4 Test di bioaccumulo	pag. 209
9.4.1 Conduzione del test	pag. 209
9.5 Controllo di qualità	pag. 215
9.5.1 Acque marine ricostruite e mezzi di crescita	pag. 215
9.5.2 Mantenimento della coltura algale	pag. 216
9.5.3 Taratura della strumentazione	pag. 216
9.5.3.1 pHmetro	pag. 216
9.5.3.2 Salinometro	pag. 216
9.5.2.3 ICP-OES	pag. 216
9.5.4 Vetreria	pag. 216
9.5.5 Pulizia delle bombe in teflon per la digestione	pag. 217
9.5.6 Test di tossicità	pag. 217
<b>10. Risultati e discussione</b>	pag. 218
10.1 Caratterizzazione chimico-fisica del nTiO <sub>2</sub>	pag. 220
10.1.1 Caratterizzazione primaria del nTiO <sub>2</sub>	pag. 220
10.1.2 Comportamento chimico del nTiO <sub>2</sub> in ASW (caratterizzazione secondaria)	pag. 221
10.1.2.1 Potenziale Zeta	pag. 221
10.1.2.2 Variazione del pH	pag. 221
10.1.2.3 Dimensioni e distribuzione del materiale sospeso (salinità costante)	pag. 223
10.1.2.4 Dimensioni e distribuzione del materiale sospeso in funzione della salinità	pag. 226
10.1.2.5 Stabilità	pag. 227
10.2 Test con il batterio <i>Vibrio fischeri</i>	pag. 233
10.2.1 Certificato di analisi	pag. 233
10.2.2 Evidenze sperimentali	pag. 233
10.2.2.1 Variazioni al protocollo	pag. 237
10.2.3 Riepilogo dei risultati conseguiti con <i>V. fischeri</i>	pag. 239
10.3 Test con l'alga unicellulare <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	pag. 240
10.3.1 Carta di controllo	pag. 240
10.3.2 Evidenze sperimentali	pag. 240
10.3.2.1 Variazioni al protocollo: test con l'alginato	pag. 250
10.3.3 Altre evidenze sperimentali	pag. 258
10.3.4 Riepilogo dei risultati conseguiti con <i>P. tricornutum</i>	pag. 260
10.4 Test con i molluschi bivalvi <i>Mytilus galloprovincialis</i> e <i>Crassostrea gigas</i>	pag. 262
10.4.1 Carte di controllo	pag. 262
10.4.1.1 Carta di controllo per <i>C. gigas</i>	pag. 262
10.4.1.2 Carta di controllo per <i>M. galloprovincialis</i>	pag. 262
10.4.2 Evidenze sperimentali per <i>C. gigas</i>	pag. 263
10.4.3 Evidenze sperimentali per <i>Mytilus galloprovincialis</i>	pag. 267

10.4.3.1 Variazioni al protocollo: esposizione con fotoperiodo	pag. 271
10.4.4 Altre evidenze sperimentali	pag. 272
10.4.5 Riepilogo dei risultati conseguiti con i bivalvi	pag. 274
<b>10.5 Test con il crostaceo <i>Artemia franciscana</i></b>	pag. 276
10.5.1 Carta di controllo	pag. 276
10.5.2 Evidenze sperimentali	pag. 277
10.5.2.1 Variazioni al protocollo: modifiche ai parametri illuminazione e nutrimento	pag. 281
10.5.2.2 Variazioni al protocollo: test con l'alginato	pag. 291
10.5.2.3 Variazioni al protocollo: illuminazione del nTiO <sub>2</sub> pre-inoculo	pag. 295
10.5.3 Riepilogo dei risultati conseguiti con <i>A. franciscana</i>	pag. 296
<b>10.6 Analisi specifiche</b>	pag. 298
10.6.1 Risultati del test di bioaccumulo	pag. 298
10.6.1.1 Evidenze di tossicità a 96 h	pag. 298
10.6.2.1 Risultati del contenuto di ammoniaca	pag. 300
10.6.2 Risultati delle analisi con ICP-OES	pag. 302
10.6.3 Riepilogo dei risultati del test di bioaccumulo	pag. 307
10.6.4 Acquisizione di immagini con TEM	pag. 308
<b>11. Conclusioni</b>	pag. 311
11.1 Risultati, criticismi emersi e suggerimenti per l'attività futura	pag. 312
11.2 Disseminazione	pag. 317
11.2.1 Posters presentati	pag. 317
11.2.2 Seminario di approfondimento	pag. 317
11.2.3 Presentazioni orali	pag. 318
11.2.4 Pubblicazioni	pag. 318
11.2.4.1 Riviste nazionali	pag. 318
11.2.4.2 Riviste internazionali	pag. 318
<b>12. Appendice</b>	pag. 319
Risultati dei test ecotossicologici	pag. 319
I-a Risultati dei test di inibizione della crescita cellulare con <i>P. tricornutum</i>	pag. 319
I-b Risultati dei test di immobilizzazione con <i>A. franciscana</i> e nTiO <sub>2</sub> pretrattato	pag. 322
<b>13. Bibliografia</b>	pag. 325
Articoli e protocolli	pag. 325
Libri, conferenze e comunicati	pag. 341
Siti internet consultati	pag. 342
<b>14. Ringraziamenti</b>	pag. 345
<b>Ringraziamenti personali</b>	pag. 346

