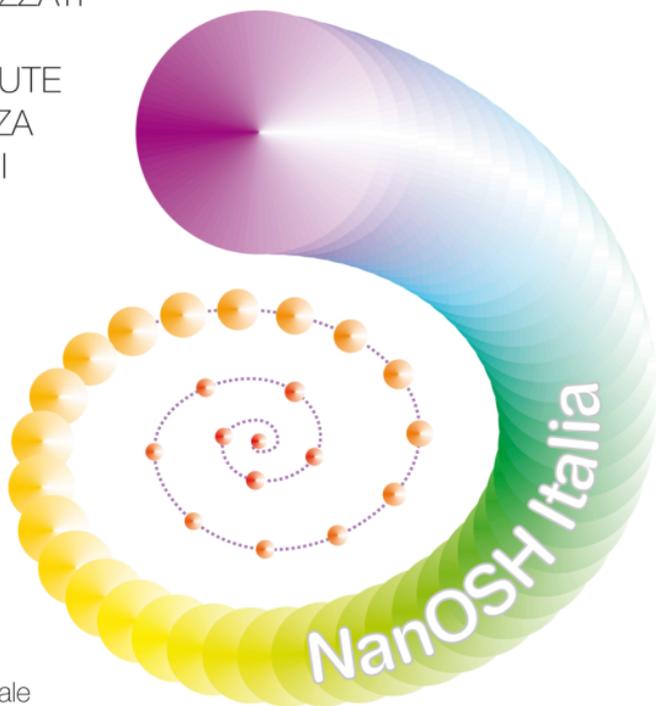


LIBRO BIANCO

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)

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)

COORDINAMENTO SCIENTIFICO

Sergio Iavicoli, *INAIL, Dipartimento di Medicina del Lavoro - ex ISPESL*

AUTORI

Stefano Bellucci, *Istituto Nazionale di Fisica Nucleare, Laboratori Nazionali di Frascati*

Enrico Bergamaschi, *Università degli Studi di Parma*

Pier Alberto Bertazzi, *Clinica del Lavoro "Luigi Devoto", Università degli Studi di Milano*

Fabio Boccuni, *INAIL, Dipartimento di Medicina del Lavoro - ex ISPESL*

Giuseppe Bonifaci, *INAIL, Sovrintendenza Medica Generale*

Stefano Casciardi, *INAIL, Dipartimento di Igiene del Lavoro - ex ISPESL*

Paola Castellano, *INAIL, Dipartimento di Igiene del Lavoro - ex ISPESL*

Giuseppe Castellet y Ballarà, *INAIL, CONTARP*

Delia Cavallo, *INAIL, Dipartimento di Medicina del Lavoro - ex ISPESL*

Domenico Cavallo, *Clinica del Lavoro "Luigi Devoto", Università degli Studi di Milano*

Danilo Cottica, *Fondazione Salvatore Maugeri di Pavia*

Carla Fanizza, *INAIL, Dipartimento di Installazioni di Produzione e Insedimenti Antropici - ex ISPESL*

Luca Fontana, *Università Cattolica del Sacro Cuore di Roma*

Flaminio Galli, *INAIL, Direzione Centrale Prevenzione*

Angela Goggiamani, *INAIL, Sovrintendenza Medica Generale*

Matteo Goldoni, *INAIL, Centro Studi e Ricerche di Parma - ex ISPESL*

Elena Grignani, *Fondazione Salvatore Maugeri di Pavia*

Sergio Iavicoli, *INAIL, Dipartimento di Medicina del Lavoro - ex ISPESL*

Ivo Iavicoli, *Università Cattolica del Sacro Cuore di Roma*

Francesca Larese Filon, *Università degli Studi di Trieste*

Andrea Magrini, *Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"*

Elvio Mantovani, *AIRI-Nanotec IT*

Achille Marconi, *Istituto Superiore di Sanità*

Marco Mirabile, *INAIL, Dipartimento di Medicina del Lavoro - ex ISPESL*

Luigi Monica, *INAIL, Dipartimento di Tecnologie di Sicurezza - ex ISPESL*

Antonio Pietrojusti, *Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"*

Andrea Porcari, *AIRI-Nanotec IT*

Lorenzo Sacchi, *INAIL, Dipartimento di Medicina del Lavoro - ex ISPESL*

Cinzia Lucia Ursini, *INAIL, Dipartimento di Medicina del Lavoro - ex ISPESL*

GRUPPO EDITORIALE

Fabio Boccuni, *(Coordinamento Segreteria Scientifica "NanOSH Italia"), INAIL, Dipartimento di Medicina del Lavoro - ex ISPESL*

Marina Catelli, *INAIL, Dipartimento di Medicina del Lavoro - ex ISPESL*

Paola Castellano, *INAIL, Dipartimento di Igiene del Lavoro - ex ISPESL*

Sergio Iavicoli, *INAIL, Dipartimento di Medicina del Lavoro - ex ISPESL*

Laura Medei, *INAIL, Dipartimento di Medicina del Lavoro - ex ISPESL*

Cinzia Lucia Ursini, *INAIL, Dipartimento di Medicina del Lavoro - ex ISPESL*

Realizzazione a cura di *INAIL, Dipartimento di Medicina del Lavoro - ex ISPESL*

La costituzione del Polo della Salute e della Sicurezza, avvenuta a seguito del riordino degli Enti, rappresenta una scelta politica di straordinaria importanza per il Sistema Paese.

L'INAIL, attraverso l'incorporazione di ISPEL e IPSEMA, attori istituzionali strategici in materia, diventa un vero e proprio consulente globale della sicurezza e della prevenzione sui luoghi di lavoro.

L'obiettivo è chiaro: migliorare le prestazioni e gli standard qualitativi dei servizi lungo le quattro aree tematiche di prevenzione, tutela assicurativa, cura e riabilitazione/reinserimento.

In tale percorso il ruolo della ricerca è fondamentale e, con l'acquisizione delle funzioni già proprie dell'ISPEL, l'Istituto si arricchisce di nuove professionalità che, unite a quelle esistenti, non possono che potenziarne l'azione.

Oggi, per i cosiddetti "rischi lavorativi tradizionali" siamo in grado di offrire un'adeguata tutela integrata, ma la continua innovazione tecnologica ci pone di fronte a nuove problematiche per la soluzione delle quali è indispensabile che la ricerca svolga appieno il suo ruolo.

Questo Libro Bianco sulle nanotecnologie, la cui stesura è iniziata nel 2009, rappresenta, dunque, uno dei primi atti di condivisione e collaborazione nell'ambito dell'avvenuta incorporazione tra Enti che hanno avuto, finora, storie diverse, ma un comune obiettivo: la tutela e la sicurezza dei lavoratori.

Marco Fabio Sartori
Presidente dell'INAIL

“ . . . **E** siste una preoccupazione a livello mondiale circa i rischi, precedentemente sconosciuti, causati dalle nuove tecnologie, dai nuovi processi operativi e dai cambiamenti strutturali. Di solito le nuove scoperte avvengono e sono applicate dall’industria prima che siano ben chiari i loro effetti sulla salute e sulla sicurezza...”.

(ILO, International Labour Office, Giornata Mondiale per la salute e la sicurezza sul lavoro, 28 aprile 2010).

L’ILO, in relazione allo studio dei nano materiali, ha così sottolineato l’esigenza sempre più pressante che la ricerca scientifica si applichi allo studio dei rischi lavorativi derivanti dalle nuove tecnologie, attraverso un metodo di condivisione delle conoscenze e di confronto sui progressi e sulle carenze della ricerca applicata, volto ad individuare strategie innovative e promuovere la creazione e il potenziamento di partnership tra le Istituzioni nazionali- internazionali competenti e le reti esistenti in questo campo.

La ricerca scientifica nel settore della salute e sicurezza sul lavoro fornisce, da sempre, contributi rigorosi ed elabora strumenti per la predisposizione di procedure di valutazione e gestione dei rischi negli ambienti di lavoro. Ora è chiamata allo studio di un nuovo contesto, quanto mai complesso, legato ai rischi emergenti dall’uso delle nanotecnologie.

Ecco il perché di questo Libro Bianco, nato dalla collaborazione e dal dialogo tra figure professionali competenti e avviato, nel 2009, dall’Istituto Superiore per la Prevenzione e la Sicurezza del Lavoro (ISPESL), le cui funzioni sono state recentemente acquisite dall’INAIL.

Nell’ambito della salute e della sicurezza dei lavoratori l’attività di ricerca svolge un ruolo basilare e irrinunciabile, ed è per questo che sono particolarmente lieto di presentare questo preziosissimo contributo.

Giuseppe Lucibello
Direttore Generale dell’INAIL

Prefazione

L'Istituto Superiore per la Prevenzione E la Sicurezza del Lavoro (ISPESL) da alcuni anni sostiene l'importanza di valutare la situazione attuale sulla sicurezza e la salute legate allo sviluppo delle nanotecnologie in ambiente di lavoro.

Le nanotecnologie trovano applicazione in vari settori, tra cui sanità, biotecnologie, produzione di energia pulita, informazione e comunicazioni, chimica, industrie elettroniche e militari, agricoltura ed edilizia. Si prevede che entro il 2020 il 20% circa di tutti i prodotti fabbricati nel mondo impiegheranno una certa quota di nanotecnologie. Si tratta tuttavia di tecnologie emergenti ed i rischi associati alla produzione e all'utilizzo di nanomateriali sono per lo più sconosciuti. C'è un sostanziale squilibrio di conoscenze tra applicazione delle nanotecnologie e il loro impatto sulla salute. Le informazioni attualmente disponibili sugli effetti sulla salute e la valutazione del rischio da nanomateriali nei luoghi di lavoro sono limitate; non sono ancora note metodologie sistematiche per valutarne l'esposizione e, dato l'uso intensivo e altamente diversificato che l'industria fa dei nanomateriali, è difficile effettuare una stima del numero di lavoratori esposti.

Questa lacuna di conoscenze impone alla comunità scientifica del settore della Salute e Sicurezza del Lavoro la necessità di unire gli sforzi per fornire una opinione condivisa sulla sicurezza e la salute dei lavoratori che utilizzano, manipolano o producono nanomateriali. La collaborazione in ambito nazionale ed internazionale risulta cruciale per valutare e gestire correttamente questo rischio emergente.

In quest'ottica l'ISPESL ha avviato una serie di iniziative di ricerca nel settore, tra cui la creazione del un Network Nazionale *ad-hoc* sulla materia (denominato "NanOSH Italia") con le finalità di promuovere la cooperazione e avviare attività integrate di ricerca nell'ambito dei rischi da esposizione lavorativa a nanomateriali, sviluppando un approccio multidisciplinare per la valutazione del rischio.

Primo risultato di questa collaborazione è il presente Libro Bianco con cui si intende contribuire ad avviare una seria ed autorevole discussione per la definizione delle *policy* necessarie ad assicurare uno sviluppo delle nanotecnologie in Italia, lungo la linea dell'equilibrio tra esigenze di competitività e sostenibilità, e riduzione del rischio per i lavoratori.

Il Coordinatore Scientifico

Dott. Sergio Iavicoli

Indice degli argomenti

Sommario Esecutivo	9
Introduzione	23
Capitolo 1 Definizioni dei nanomateriali	25
1.1 Definizione dimensionale e strutturale dei nanomateriali	25
1.2 Definizione chimico-fisica e chimica dei nanomateriali	30
Bibliografia	39
Capitolo 2 Prospettive nei settori produttivi in Italia	43
2.1 Settori di produzione, utilizzo e sviluppo delle nanotecnologie	43
2.2 Mappa delle industrie e dei laboratori di ricerca attivi	47
2.3 Stime dei lavoratori potenzialmente esposti	53
2.4 Conclusioni	55
Bibliografia	55
Capitolo 3 Mappatura e necessità della ricerca	57
3.1 Andamento della ricerca nell'ambito dei FP dell'UE	57
3.2 Iniziative in ambito nazionale	65
Bibliografia	78
Allegati	79
Capitolo 4 Protocolli di acquisizione delle informazioni e metodi di caratterizzazione dell'esposizione a nanomateriali	95
4.1 Identificazione delle fonti di aerodispersione	95
4.2 Potenziali vie di esposizione	100
4.3 Rassegna di metodi per la caratterizzazione dell'esposizione inalatoria a nanomateriali.	105
4.4 Approccio alla valutazione dell'esposizione professionale a nanomateriali: la strategia	115
Bibliografia	120

Capitolo 5 Effetti sulla salute dei nanomateriali ingegnerizzati	125
Premessa	125
5.1 Effetti genotossici ed ossidativi	129
5.2 Effetti citotossici	135
5.3 Effetti respiratori	142
5.4 Effetti cutanei	149
5.5 Effetti sul Sistema Nervoso Centrale	154
5.6 Effetti cardiovascolari	163
5.7 Effetti immunologici	168
Bibliografia	171
Capitolo 6 Valutazione e gestione del rischio	183
6.1 Principio di precauzione	183
6.2 Approccio alla Valutazione del Rischio	185
6.3 Possibili misure di prevenzione e protezione	189
6.4 Esempi di Buone Pratiche	191
Bibliografia	198
Capitolo 7 Prospettive di policy e strategie di comunicazione	199
7.1 La regolamentazione nello sviluppo delle nanotecnologie	199
7.2 Necessità di sviluppo della Comunicazione del Rischio	210
Bibliografia	220
Glossario	223

Sommario esecutivo

1. Definizioni dei nanomateriali

Le nanotecnologie presto troveranno applicazione in molti ambiti della vita e del lavoro rendendo possibili forti innovazioni, pertanto sorge la necessità di fornire all'industria ed alla ricerca gli strumenti adatti per lo sviluppo e l'utilizzo responsabile e sostenibile di tali tecnologie. Inoltre, risulta essenziale avere a disposizione sistemi di misura validi e protocolli di valutazione basati su standard di indubbia certezza.

L'utilizzo di una terminologia univoca nella descrizione dei concetti fondamentali e di definizioni e classificazioni, riconosciute dai principali organismi e istituzioni del settore, è la base per affrontare un approccio alla salute e sicurezza occupazionale per il rischio emergente introdotto dalle nanotecnologie.

Il campo d'interesse del Libro Bianco è circoscritto agli aspetti legati all'esposizione in ambiente di lavoro a nanomateriali (NM) ingegnerizzati (o specificatamente prodotti). Questi possiedono caratteristiche chimico-fisiche ben precise che li distinguono dal resto del particolato ambientale e che possono contribuire alla definizione della pericolosità nel contesto dell'interazione con l'organismo umano (quali dimensioni, massa, composizione chimica, area superficiale, concentrazione, stato di aggregazione e di agglomerazione, solubilità in acqua e chimica superficiale, struttura morfologica); tuttavia, ad oggi, non risulta ancora opportunamente definita un'opinione univoca circa le specifiche relazioni con gli effetti tossici.

L'esperienza derivante dagli studi di igiene industriale può costituire un punto di partenza su cui sviluppare ed ampliare la valutazione del rischio. È però fondamentale, al fine di fissare opportuni limiti igienistici di riferimento per l'esposizione e per la messa a punto di adeguati sistemi di prevenzione e di protezione per i lavoratori e per l'ambiente, individuare in maniera univoca i parametri "corretti" da valutare in relazione agli aspetti di tossicità, ricorrendo, a supporto degli studi inerenti l'interazione biologica, ad un approccio metrologico multiparametrico, caratterizzato dall'utilizzo di opportune tecniche di valutazione dell'esposizione e di monitoraggio negli ambienti di lavoro.

2. Prospettive nei settori produttivi in Italia

Le nanotecnologie interessano in maniera trasversale un'ampia gamma di discipline scientifiche e di settori applicativi. Da ciò deriva la difficoltà di inquadrare tali tecnologie in settori definiti di produzione, utilizzo e sviluppo.

La situazione a livello nazionale è fotografata nel "Secondo Censimento delle nanotecnologie in Italia", realizzato da AIRI/Nanotec IT nel 2006. Il documento ha messo in evi-

denza l'esistenza nel Paese di un'attività consistente che coinvolge circa 180 tra strutture di ricerca pubbliche e imprese. L'attività è distribuita su tutto il territorio nazionale, con circa il 57% di strutture situate al Nord, il 28% al Centro ed il restante 15% al Sud.

Numerose iniziative sono state intraprese negli ultimi anni con l'obiettivo di migliorare l'uso delle risorse, aumentare l'efficienza operativa complessiva e rafforzare l'impegno: centri di eccellenza per le nanotecnologie sono stati creati in diverse Università; attività di ricerca, anche collocate in sedi diverse, sono state collegate indirizzandole verso obiettivi comuni; alcuni Distretti Tecnologici hanno fatto delle nanotecnologie un'area prioritaria di ricerca.

L'attività di ricerca e sviluppo in corso, a livello sia pubblico sia privato, riguarda un ampio spettro di ambiti tematici quali chimica e materiali (strutturali e funzionali), nanoelettronica e fotonica, bio(nano)scienze, medicale e strumentazione. Le potenziali ricadute applicative riguardano comparti produttivi fondamentali che vanno da quello della farmaceutica e sviluppo di dispositivi elettromedicali, alla cosmetica, all'elettronica e informatica, dai trasporti, all'ambiente e all'energia, ma anche a settori che interessano tipicamente le piccole e medie imprese, come il tessile e la moda, il calzaturiero, l'alimentare, i materiali da costruzione, la meccanica avanzate e la salvaguardia dei beni culturali.

Inoltre, nanoscienze e nanotecnologie hanno un ruolo di rilievo nei programmi dei principali Enti di Ricerca e delle Università italiani, nell'ambito dei quali sono presenti strutture e competenze riconosciute a livello internazionale. Riguardo ad aspetti trasversali relativi alle nanotecnologie, quali la metrologia e la caratterizzazione dei NM ed i potenziali rischi associati a questi, sono attivi il Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) l'Istituto Superiore di Sanità (ISS), l'Istituto nazionale di fisica nucleare (INFN), l'Istituto Nazionale di Ricerca Metrologica (I.N.RI.M), l'Istituto Superiore per la Prevenzione e per la Sicurezza sul Lavoro (ISPESL) e l'Istituto Nazionale Infortuni sul Lavoro (INAIL).

Infine, un recente studio condotto dall'Associazione Italiana per la Ricerca Industriale (AIRI) nel 2009, fornisce un'indicazione sufficientemente ampia circa le esigenze di sviluppo in termini tecnologici della parte più innovativa del sistema industriale e dei servizi avanzati del Paese per sostenere le proprie istanze di sviluppo. Alle nanotecnologie viene attribuito un ruolo particolarmente importante nei settori microelettronica e semiconduttori, chimica, farmaceutica e biotecnologie energia, ambiente, in un'ottica di sviluppo a breve-medio termine (normalmente 3 anni).

3. Mappatura e necessità della Ricerca

Le principali iniziative di ricerca nazionali finanziate sull'impatto delle nanotecnologie su salute, ambiente e sicurezza, le quali hanno evidente rilevanza per la ricerca in

ambito di Salute e Sicurezza dei Lavoratori si collocano all'interno dei Programmi Quadro di ricerca della Commissione Europea, in qualità di partenariati o coordinamento di progetti, e all'interno di progetti finanziati da alcuni Ministeri e dalle Regioni.

In ambito Europeo, i Programmi Quadro di Ricerca e Sviluppo Tecnologico (Framework Programmes – FP) costituiscono, dal 1984, il principale strumento finanziario attraverso cui la Commissione Europea, organo esecutivo dell'Unione Europea, indirizza e sostiene la ricerca sull'innovazione tecnologica basata sulla collaborazione transnazionale. In questi 25 anni se ne sono succeduti sette: il FP7, l'ultimo in ordine di tempo, è stato avviato nel 2007 e si concluderà nel 2013.

Per quanto riguarda i progetti di ricerca finanziati, che riguardano gli impatti su ambiente, salute e sicurezza (Environmental, Health and Safety – EHS) delle nanotecnologie, con evidenti ricadute in ambito di salute e sicurezza del lavoro, si riscontra una presenza significativa delle organizzazioni italiane. Nel FP6 su quindici progetti di ricerca relativi all'impatto delle nanotecnologie su salute e sicurezza, sette vedono la partecipazione di partner italiani, mentre nel FP7 sui dieci progetti avviati nei primi due anni operatività (fino al settembre 2009) quattro vedono la partecipazione di partner italiani.

Complessivamente su 28 progetti finanziati nel corso degli ultimi tre programmi quadro (1998 – 2009), 12 vedono la partecipazione di partner italiani. I partenariati italiani sono complessivamente 19 ad opera di 16 organizzazioni diverse (dato che alcune di esse partecipano a più progetti). Si tratta per il 43% di Enti Pubblici di Ricerca (sono comprese in questa categoria anche le Università), per il 38% di società private e per il 19% di organizzazioni non governative (ONG).

Per quanto riguarda il piano finanziario, negli ultimi tre FP, oltre il 50% dei finanziamenti per la ricerca sugli impatti EHS delle nanotecnologie sono assegnati a progetti che vedono la partecipazione di almeno un partner italiano.

Si evidenziano inoltre varie iniziative finanziate dalle Regioni: la Lombardia con il progetto "Nanoscienze per materiali e applicazioni biomediche" e la fondazione del "Centro Europeo di Nanomedicina"; il Piemonte con i progetti "NANOSAFE", "Danno citotossico e genotossico indotto da nanoparticelle e micro particelle di silice: basi molecolari e strategie di prevenzione ed inattivazione" e "Materiali nanostrutturati biocompatibili per applicazioni biomediche"; il Veneto che finanzia 6 progetti in collaborazione con il Distretto Veneto Nanotech, avviato nel 2005.

Il Ministero dell'Istruzione Università e Ricerca tra il 2004 e il 2009 ha finanziato 5 progetti per un totale di circa 650.000 Euro, su tematiche inerenti agli impatti dei nanomateriali sulla salute umana, ai meccanismi molecolari alla base della risposta cellulare, all'interazione con sistemi biologici, ai meccanismi di citotossicità e geno-

tossicità e a studi chimico-fisici e di tossicità su modelli in vivo ed in vitro.

Infine il Ministero della Salute ha finanziato per 465.000 Euro il progetto “Nano-OSH Italia” nell’ambito del programma strategico del bando per la ricerca sanitaria del 2006 coordinato dall’ISPESL: il progetto, che si concluderà nel 2011, intende sviluppare una metodologia innovativa per la valutazione del rischio da esposizione lavorativa a nanotubi di carbonio opportunamente prodotti e funzionalizzati, da utilizzare a fini preventivi.

4. Protocolli di acquisizione delle informazioni e metodi di caratterizzazione dell’esposizione a nanomateriali.

Diversi ambiti professionali sono interessati dalla problematica relativa alle esposizioni a nanomateriali (NM) e nanoparticelle (NP): dai settori di produzione a quelli caratterizzati dalla presenza di cicli di lavorazione o processi durante i quali particelle di dimensioni nanometriche vengono rilasciate in maniera occasionale come sottoprodotto di reazioni termiche e chimiche.

Nell’ambito della produzione “volontaria” i NM destinati alle nanotecnologie vengono realizzati mediante il metodo “ascendente” (bottom-up), che consiste nel costruire i materiali assemblandoli dagli atomi secondo schemi predefiniti (attraverso processi di natura chimica e fisica), e quello “discendente” (top-down), parte integrante dell’industria elettronica per la miniaturizzazione dei materiali e dei componenti, che comporta generalmente processi di tipo meccanico.

Tuttavia, come evidenziato, non sempre le NP negli ambienti di lavoro sono il prodotto finale del ciclo tecnologico, in quanto NP metalliche e/o di ossidi metallici si sviluppano durante particolari processi chimo-fisici quali, ad esempio, combustioni, nucleazioni e condensazioni durante operazioni di rifinitura e lavorazione dei metalli, applicazione di spray ad alta temperatura, operazioni di saldatura, molatura e incisione dei metalli/leghe.

Le caratteristiche delle particelle che si generano da questi processi dipendono dalle condizioni chimico-fisiche in cui questi avvengono, tuttavia le particelle primarie hanno generalmente un diametro compreso fra 10 e 50 nm e coagulano rapidamente, in funzione della maggiore concentrazione nel punto di origine, fino a raggiungere dimensioni superiori a quelle delle NP.

Potenziati vie di esposizione. La via di esposizione più comune alle particelle aerodisperse negli ambienti lavorativi è quella inalatoria. Gli agglomerati di NP si depositano in funzione del loro diametro nelle diverse regioni polmonari e, in modo predominante, in quella alveolare, oltre che nelle regioni tracheobronchiale ed extra-toracica. Il destino delle NP, a seguito della deposizione, dipende dalle loro caratteristiche di

biopersistenza e dal potenziale di traslocazione ad altri organi e tessuti, sebbene ad oggi siano in corso ricerche per determinare i fattori che regolano tali fenomeni ed i meccanismi che contribuiscono all'agglomerazione e de-agglomerazione delle NP, nonché il loro ruolo nell'attività tossica dopo l'inalazione. In particolare, le NP si depositano ad alte percentuali lungo tutte le vie aeree, riscontrando, all'aumentare del diametro, una diminuzione della deposizione totale ed un aumento della componente alveolare.

L'interazione tra le NP e i sistemi biologici, invece, può variare in base alle specifiche caratteristiche chimico-fisiche delle NP mentre per le nanofibre la deposizione è altamente dipendente dal tipo di fibra.

In tale contesto un punto fondamentale della tematica da approfondire per l'individuazione di valori limite di esposizione inalatoria di riferimento (ad oggi non ancora definiti in ambito nazionale ed internazionale) riguarda gli aspetti relativi alle differenze o analogie riscontrabili nell'impatto biologico di NP discrete e di agglomerati/aggregati di NP (contenenti lo stesso volume di materiale e che subiscono processi di de-agglomerazione o disaggregazione dopo la deposizione) che si depositano nel sistema respiratorio. Tali valori, infatti, dovranno tenere conto in maniera globale sia di NP discrete che di agglomerati/aggregati di NP nel caso in cui si riscontri una similitudine negli effetti sulla salute derivanti dall'esposizione (in relazione ad una indipendenza dalle caratteristiche dimensionali delle particelle che si depositano). Nel caso contrario dovranno necessariamente essere fissati limiti igienistici differenziati per NP discrete e agglomerati/aggregati di NP.

Per quanto riguarda l'esposizione a NP per contatto cutaneo, sono ad oggi in corso studi sulla eventuale penetrazione delle NP (in particolare TiO e ZnO) attraverso la cute intatta con un conseguente potenziale dannoso.

Il sistema olfattivo ed il tratto gastro-enterico, infine, sono interessati da una percentuale non trascurabile di NP caratterizzate da bassi diametri aerodinamici. Queste, infatti, possono depositarsi nelle alte vie aeree, in particolare nella mucosa olfattiva, essere assorbite nel sistema nervoso centrale attraverso i nervi olfattivi, oppure essere ingerite attraverso deglutizione del muco che incorpora e ripulisce le NP depositate lungo il tratto respiratorio, ingestione di cibi ed acqua contaminati, o contatto orale con mani e superfici contaminate.

Metodi per la caratterizzazione dell'esposizione inalatoria a NM. In considerazione delle diverse caratteristiche chimico-fisiche delle NP (dimensioni, morfologia, composizione chimica, area superficiale ecc.) che possono concorrere a provocare potenziali effetti avversi sulla salute, l'aspetto metrologico, nell'ambito della caratterizzazione dell'esposizione inalatoria a NM, presenta una particolare criticità. Allo stato attuale, infatti, le ricerche nel settore sono orientate all'individuazione dei

parametri “corretti” da valutare nella definizione dell’esposizione a NP mediante l’ausilio di tecniche di campionamento e di analisi applicabili nell’ambito di indagini negli ambienti *indoor*. Sebbene, come evidenziato, allo stato attuale non possano essere individuati standard igienistici, le tecniche di misura da applicare nella valutazione dell’esposizione a NP negli ambienti di lavoro vengono indicate da norme di riferimento (quali la ISO/TR 27628, 2007. ISO/TR 12885, 2008) che individuano le modalità più appropriate di misura dell’esposizione inalatoria a NP, aerosol nanostrutturati e a NP ingegnerizzate.

Le tecniche di monitoraggio e di caratterizzazione ad oggi disponibili nel settore, discusse nelle suddette norme, rendono fattibile una valutazione dell’esposizione a particelle di dimensioni nanometriche in termini di massa (associata anche alla sua caratterizzazione chimica), numero, area superficiale, analisi morfologica attraverso il ricorso ad una vasta gamma di strumentazioni. È necessario, comunque, sottolineare, ai fini dell’ottimizzazione del processo globale di valutazione del rischio a NP, l’importanza di una armonizzazione dei diversi sistemi di analisi ad oggi disponibili, per superare le criticità dovute all’impiego di un unico sistema di misura. Ad esempio la determinazione di massa, attraverso l’uso di impattori statici a cascata che consentono il prelievo del materiale suddiviso in intervalli dimensionali, sebbene permetta di effettuare la caratterizzazione chimica delle particelle raccolte sui singoli substrati (attraverso diverse tecniche analitiche *off-line*), richiede l’utilizzo di ulteriori idonee strumentazioni per l’acquisizione dei dati inerenti al numero, alla superficie, nonché per discriminare gli agglomerati/aggregati di NP dalle singole NP.

I campionatori ed i contatori di NP presenti oggi sul mercato devono, tuttavia, essere destinati ad un adattamento in termini di compattezza, portabilità e costi ai fini di applicazioni di routine negli ambienti di lavoro. La valutazione e la caratterizzazione dell’esposizione professionale a nanoaerosol trova, infatti, limitazioni dovute alla mancanza di idonei campionatori di tipo “personale” e, pertanto, l’impiego combinato e contemporaneo di apparecchiature multiple per le misure *in-situ* e per l’analisi *off-line* dei parametri considerati maggiormente significativi, rappresenta al momento lo strumento di elezione nell’ambito della valutazione dell’esposizione professionale a particelle di dimensioni nanometriche. Risulta, quindi, necessario, ricorrere ad un’appropriata strategia di campionamento che tenga conto delle limitazioni interpretative per una stima dell’esposizione personale basata su campionamenti di area. I dati ottenuti dall’impiego di campionatori statici sono, infatti, influenzati dalle variazioni nelle caratteristiche degli aerosol in relazione alla sorgente (distanza, emissioni multi-sorgente, ecc.), nonché ai movimenti dell’aria dovuti alla ventilazione forzata ed al verificarsi di processi di nucleazione di specie chimiche in fase gassosa o di accrescimento per coagulazione o per condensazione, che portano a variazioni spazio-

temporali della massa, del numero e della distribuzione dimensionale dei nanoaerosol. I risultati dei campionamenti di NP realizzati attraverso l'utilizzo di tali dispositivi devono essere, pertanto, sottoposti ad una specifica valutazione se tradotti in termini di "esposizione personale" del lavoratore e, conseguentemente, alcuni aspetti fondamentali dovranno essere considerati nell'ambito della predisposizione di una corretta strategia di monitoraggio. Previo esame dettagliato dello scenario di esposizione (valutazione di ulteriori attività lavorative ad esempio comportanti l'utilizzo di attrezzi da lavoro, presenza di fumo, rilevazione di sorgenti secondarie, ecc.), anche in relazione agli andamenti relativi ai flussi di aria (ad esempio a causa della presenza di ventilazioni forzate) determinanti nelle variazioni spazio-temporali degli aerosol, dovranno essere appropriatamente selezionate le postazioni di campionamento ai fini di una interpretazione affidabile dei dati in relazione all'esposizione personale. In particolare, poiché gli aerosol di NP sono miscele complesse di diversa origine, deve essere prevista una ottimizzazione dei metodi di campionamento e di analisi al fine di una corretta attribuzione delle varie possibili sorgenti emmissive involontarie (ad esempio ricorrendo all'utilizzo dei profili di sorgente della *Principal Component Analysis*) anche in considerazione di eventuali contributi provenienti dall'ambiente esterno. Nell'ambito della procedura di valutazione dell'esposizione professionale a NP risulta, quindi, fondamentale, in attesa dell'individuazione del sistema metrologico più appropriato per la valutazione dell'esposizione alle NP e di valori limite di esposizione professionale per NP, mettere a punto appropriate strategie di campionamento e protocolli di misura finalizzati alla determinazione della composizione chimica (anche per la caratterizzazione delle impurezze dovute a composti organici eventualmente presenti nei NM ingegnerizzati a causa delle procedure di produzione) e della distribuzione dimensionale di particelle di dimensione nanometrica mediante un approccio multiparametrico.

5. Effetti sulla salute dei nanomateriali ingegnerizzati

Studi epidemiologici ed informazioni riguardanti gli effetti tossici dei nanomateriali (NM) su popolazioni esposte non sono ancora disponibili. La quasi totalità degli studi, infatti, è stata effettuata o su sistemi in vitro o su animali da laboratorio (principalmente topi) e le informazioni relative agli effetti su organi e apparati sono a volte estrapolate dai risultati ottenuti a livello cellulare. Gli studi prodotti negli ultimi anni hanno evidenziato potenziali effetti genotossico-ossidativi e citotossici a livello cellulare ed effetti respiratori, cutanei, neurotossici, cardiovascolari, immunologici, causati da NM.

Effetti genotossico-ossidativi. La maggior parte degli studi sulla genotossicità dei NM riguarda nanotubi di carbonio (CNT) e particelle di ossidi metallici che possono pro-

vocare danno al DNA sia direttamente sia indirettamente, tramite l'induzione di stress ossidativo. A seconda delle dimensioni e dello stato di aggregazione, i NM possono entrare nella cellula attraverso diffusione passiva ed endocitosi, quindi possono penetrare nel nucleo mediante diffusione attraverso la membrana nucleare, trasporto attraverso i complessi dei pori nucleari o in seguito al dissolvimento della membrana nucleare durante la divisione cellulare. Una volta nel nucleo, possono interagire con il DNA o con le proteine istoniche, causando danno al materiale genetico. Il danno genotossico può essere anche indotto indirettamente attraverso l'interazione con altre proteine cellulari, come quelle implicate nei processi di divisione cellulare, attraverso la generazione di radicali liberi dell'ossigeno, di fenomeni infiammatori, oppure per alterazione della funzione di proteine implicate nella risposta riparativa al danno al DNA.

Effetti citotossici. Gli studi attualmente disponibili sugli effetti citotossici dei NM sono numerosi e mostrano un'ampia variabilità tra le diverse nanoparticelle (NP) circa l'abilità di causare effetti tossici. Effetti citotossici ed apoptotici sono stati mostrati per i CNT, ma molto sembra dipendere dallo stato di aggregazione, dalla presenza di metalli catalizzatori, dalla presenza di gruppi di funzionalizzazione, dal grado di purezza, dalla lunghezza e dal diametro. I fullereni sembrano essere meno citotossici anche se la risposta dipende dal tipo cellulare. Per le NP metalliche c'è un'ampia variabilità nella risposta dipendente dal tipo di metallo: effetti sono stati osservati per NM a base di argento, rame, zinco, molibdeno, alluminio. Mentre per i *quantum dot* gli effetti osservati sono da mettere in relazione con le dimensioni e con il tipo di rivestimento presente.

Effetti respiratori. Studi *in vitro* e *in vivo* hanno riportato che il polmone rappresenta il principale organo bersaglio degli effetti tossici dei NM. La maggior parte degli studi sugli effetti sul sistema respiratorio riguarda i CNT, i cui effetti negativi sembrano essere in relazione con la tossicità su differenti popolazioni cellulari, la capacità di determinare fibrosi, l'attività asbesto-simile, il bioaccumulo e i livelli potenzialmente bassi di biodegradazione di tali NM. In particolare sono state osservate alcune somiglianze tra le proprietà patogenetiche dei CNT a parete multipla e quelle delle fibre di asbesto riconducibili a risposte infiammatorie e stress ossidativo.

Nel complesso gli studi *in vitro* suggeriscono che i NM ingegnerizzati siano in grado di esercitare sui sistemi biologici analizzati, prevalentemente cellule bronchiali, polmonari e macrofagi alveolari, effetti citotossici non trascurabili. Gli studi *in vivo* evidenziano come l'esposizione a NM provochi la comparsa di un'importante risposta infiammatoria polmonare acuta, la formazione di lesioni granulomatose ed enfisematose, la deposizione di collagene con conseguente fibrosi interstiziale e l'induzione di un significativo stress ossidativo. Tuttavia, i differenti tipi di NM mostrano gradi di tossicità piuttosto variabili, rendendo impossibile generalizzazioni. Ulteriori studi sono

pertanto necessari per definire la reale tossicità di questi NM a livello del sistema respiratorio.

Effetti cutanei. Per quanto riguarda gli effetti a livello cutaneo, vi sono evidenze in letteratura che le NP possano svolgere un'azione irritativa locale sui cheratinociti e che possano parzialmente penetrare lo strato corneo della cute e l'epidermide, entrando nel circolo sistemico: i dati disponibili sono comunque ancora troppo pochi per poterne trarre conclusioni definitive. Attualmente le informazioni maggiori provengono dall'industria farmaceutica, che ha studiato l'effetto delle NP di ossido di zinco (ZnO) e di biossido di titanio (TiO₂) utilizzate per la formulazione di creme protettive. Dati significativi sull'uomo non sono ancora disponibili anche se dal 1997 numerose formulazioni cosmetiche contengono NP, specie quelle con azione di schermo solare. Sono necessarie pertanto ulteriori ricerche sistematiche, per meglio definire il rischio cutaneo dell'esposizione a NP.

Effetti sul Sistema Nervoso Centrale. Diversi studi, sia *in vitro* sia *in vivo*, hanno osservato la capacità da parte delle NP di provocare effetti neurotossici. In particolare sono stati evidenziati significativi effetti neurotossici in cellule neuronali e gliali di derivazione animale ed umana ed in diversi modelli animali esposti a NP. Il principale meccanismo mediante il quale i NM esibiscono la loro tossicità, anche a livello del Sistema Nervoso Centrale (SNC), è rappresentato dall'induzione di un importante stress ossidativo. Inoltre, le NP sarebbero in grado di alterare la normale integrità della barriera emato-encefalica (BEE) e modulerebbero l'espressione di molteplici geni coinvolti nella risposta infiammatoria e nell'apoptosi.

Sono auspicabili ulteriori studi che verifichino gli eventuali effetti neurotossici provocati dagli altri NM ingegnerizzati, oltre a quelli metallici finora principalmente indagati, quali NP di carbonio e *quantum dot*.

Effetti cardiovascolari. Relativamente all'apparato cardiovascolare, l'esposizione di topi e ratti a CNT ha evidenziato sviluppo di ateromi, trombosi arteriosa e aggregazione piastrinica. Altri studi hanno valutato i possibili effetti dei CNT sull'infiammazione sistemica, che è ormai considerata uno dei fattori principali predisponenti all'aterosclerosi, evidenziando una significativa attivazione dei parametri di infiammazione sistemica e dei biomarcatori di attivazione dei neutrofili.

Appare mandatorio, prima di giungere ad una qualsiasi conclusione sui possibili effetti cardiovascolari delle NP ingegnerizzate, che vengano condotti ulteriori studi in grado di rispecchiare nel modo più fedele le condizioni espositive attese nell'attività lavorativa e nell'ambiente in genere.

Effetti immunologici. Pochi dati, prevalentemente derivati da studi *in vitro*, sono attualmente disponibili in letteratura, relativi ad effetti sul sistema immunitario. Tali dati suggeriscono la possibilità che le NP, una volta raggiunta la circolazione sistemica,

interagiscano con le proteine circolanti o presenti sulla superficie delle cellule determinando l'esposizione di residui amminoacidici normalmente non esposti (epitopi criptici) con la possibilità di una risposta autoimmunitaria. Altro possibile meccanismo di danno è costituito dall'interferenza con i processi di opsonizzazione e quindi con la *clearance* di materiale estraneo (es. microorganismi) normalmente eliminato in virtù di tale processo. I dati disponibili sono da considerarsi del tutto insufficienti per esprimere un giudizio di tossicità delle NP ingegnerizzate sul sistema immunitario, anche alla luce delle dosi elevate utilizzate.

Nel complesso, dagli studi disponibili emerge un'ampia variabilità negli effetti citotossici e genotossici osservati che dipende dalle specifiche caratteristiche dei NM utilizzati di cui è necessario tener conto.

Inoltre dato che nei diversi studi vengono solitamente utilizzate elevate quantità di NM, è auspicabile che vengano eseguiti ulteriori studi che utilizzino i NM più diffusi, e quindi più rilevanti dal punto di vista delle possibili esposizioni, a concentrazioni inferiori.

Infine, dagli studi *in vivo* a livello di organo ed apparato il sistema respiratorio, nervoso e cardiovascolare sembrano essere i più coinvolti anche se i dati disponibili sono ancora insufficienti per potere dare risposte chiare sugli effetti dei NM ingegnerizzati per la salute dell'uomo.

6. Valutazione e Gestione del Rischio

I nanomateriali (NM) possono comportare nuovi rischi di esposizione ad un numero sempre crescente di lavoratori, visto il loro sempre più diffuso impiego industriale. In quest'ottica i NM sono stati inseriti nella strategia comunitaria sulla salute e sicurezza sul lavoro come argomento su cui lavorare nel contesto dell'identificazione dei rischi nuovi ed emergenti. Inoltre la Commissione Europea ha sviluppato un piano di azione per implementare un approccio sicuro, integrato e responsabile alle nanotecnologie. Ciò porta ad una maggiore necessità di informazioni al fine di un'efficace gestione del rischio di esposizione. Al fine di poter raggiungere quest'obiettivo, sono necessarie conoscenze sul possibile approccio da seguire nella valutazione del rischio di esposizione a NM e sulle possibili misure di prevenzione e protezione da adottare per il corretto trattamento e riduzione del rischio.

Anche per i NM è possibile seguire un approccio alla valutazione del rischio che riprenda quello già in uso per le sostanze che espongono i lavoratori al rischio chimico. In particolare la "Valutazione del rischio", anche nel caso specifico, va intesa come l'insieme di tutte quelle operazioni, conoscitive ed operative, che devono essere at-

tuate per addivenire ad una stima del rischio di esposizione ai NM per la sicurezza e la salute dei lavoratori, in relazione allo svolgimento delle lavorazioni.

La valutazione del rischio è un'operazione complessa ed iterativa che necessariamente richiede, per ogni ambiente o posto di lavoro considerato, l'identificazione delle sorgenti di rischio di esposizione a NM presenti nel ciclo lavorativo, l'individuazione dei conseguenti potenziali rischi di esposizione a NM in relazione allo svolgimento delle lavorazioni e la stima dell'entità dei rischi di esposizione a NM connessi con le situazioni di interesse prevenzionistico individuate.

In virtù del principio di precauzione è necessario ridurre al minimo l'esposizione e ciò è possibile sia riducendo la durata di esposizione e/o il numero delle persone esposte, sia la concentrazione dei NM stessi, attraverso la messa in atto di idonee misure di prevenzione e protezione. Queste dovrebbero seguire la scala di priorità che va dall'eliminazione dei NM, alla loro sostituzione con materiali non pericolosi, all'isolamento/confinamento o segregazione della fonte di esposizione, alle misure tecniche per captare, limitare ed espellere i NM, alle modifiche dell'organizzazione del lavoro e all'utilizzo di DPI come integrazione alle misure tecniche.

Infine l'implementazione di una serie di buone pratiche (ad esempio utilizzando l'approccio del *control banding* in un programma di gestione del rischio può contribuire a minimizzare l'esposizione dei lavoratori ai NM.

7. Prospettive di policy e strategie di comunicazione

La regolamentazione della produzione e dell'utilizzo delle nanotecnologie, e in particolare i cosiddetti nanomateriali (NM) ingegnerizzati, è resa necessaria dall'esigenza sia di ridurre i rischi per la salute, la sicurezza e l'ambiente (EHS) che di gestire le implicazioni etiche, legali e sociali (ELSI) che ne derivano.

Allo stato attuale, tuttavia, la definizione di un sistema di regolamentazione soddisfacente è resa complicata dalle incertezze legate alla caratterizzazione dei NM e del loro impatto per ciò che riguarda EHS e questo complica la definizione di procedure di valutazione del rischio e dei livelli di esposizione associati al loro utilizzo.

Alcune questioni chiave sono ancora oggetto di un intenso dibattito sia a livello istituzionale che tra i diversi portatori di interesse a causa:

- della varietà di materiali e applicazioni;
- del comportamento e delle caratteristiche uniche dei NM (alla nanoscala);
- della mancanza di normative tecniche condivise per la nomenclatura e la metrologia dei materiali;
- della natura proprietaria delle informazioni;
- della necessità di comunicazione e di confronto tra discipline diverse.

La regolamentazione di questo settore dipende , quindi, sostanzialmente e prioritariamente dallo sviluppo delle conoscenze.

Altra questione ancora aperta è, inoltre, quella degli strumenti normativi attraverso i quali dare attuazione a tale regolamentazione. Le possibili strade sono:

- **la via legislativa** (*“hard regulation”*) che comporta la definizione di un sistema di norme cogenti e del relativo apparato sanzionatorio che ne garantisca il rispetto. La percorribilità di questa strada è complicata dalla suddetta incertezza delle conoscenze e quindi dalla difficoltà di trovare il necessario consenso per la definizione (e la ratifica in norme cogenti) dei punti di equilibrio attraverso cui contemperare le varie esigenze di tutela con l’esigenza di non pregiudicare irragionevolmente le attività di ricerca e sviluppo (e l’ottenimento dei potenziali benefici connessi). Dall’analisi svolta si evidenzia che in generale, al momento la strada seguita per regolamentare la materia a livello legislativo è quella dell’adeguamento e/o dell’integrazione (attraverso specifiche tecniche, linee guida, ecc.) del quadro normativo esistente che disciplina la produzione, l’uso e la commercializzazione delle sostanze chimiche e/o di altre normative di settore come, per esempio, quelle relative alla salute e alla sicurezza dei lavoratori e alla sicurezza ambientale.

Inoltre, ai fini della disciplina delle attività correlate all’impiego dei NM, risultano di particolare importanza questioni ancora oggetto di dibattito come, tra le altre, l’applicabilità del principio di precauzione e l’individuazione di chi sia soggetto all’onere di provare la non pericolosità dei prodotti (produttore o autorità pubblica).

- **la via delle sviluppo di misure volontarie** (*“self regulation”*) la cui efficacia è basata sul riconoscimento da parte dei diversi portatori di interesse della loro validità e, soprattutto, della loro capacità di trovare punti di convergenza tra i diversi interessi in gioco. Tuttavia, soprattutto quando sono promosse a livello istituzionale la loro efficacia, a causa appunto del loro carattere volontario, rischia di essere spesso inficiata da un’adesione spontanea limitata. In relazione alle misure volontarie l’analisi condotta ha permesso di distinguere tre livelli di intervento:
 - Sistemi di Monitoraggio, che hanno l’obiettivo di accrescere le conoscenze dei soggetti impegnati, a diverso titolo, nelle attività di regolamentazione circa l’entità e la diffusione dell’uso dei NM e le tipologie e modalità di produzione.
 - Codici di Condotta che hanno l’obiettivo di definire valori, principi e linee guida che possano favorire uno sviluppo sicuro e responsabile delle nanotecnologie.
 - Sistemi di Gestione del Rischio, generalmente sviluppati a livello industriale, che hanno l’obiettivo di accrescere il livello di sicurezza nella gestione, manipolazione e utilizzo dei NM ingegnerizzati.

- **la via dello sviluppo di normative tecniche** (“Standards”) attualmente intese, principalmente, a definire, descrivere, specificare, misurare e caratterizzare i NM e i nanoprodotto e che, quindi, si configurano prevalentemente come funzionali allo sviluppo dei livelli di regolamentazione cogenti o volontari. Tuttavia possono talvolta essere sviluppati standard prestazionali e procedure di gestione del rischio idonei ad essere impiegati come strumento di regolamentazione di specifiche attività a cui gli operatori di settore possono fare volontariamente riferimento per attestare verso l’esterno la correttezza del loro operato. L’efficacia degli standard, qualora non integrati in livelli di regolamentazione cogente, è prevalentemente basata sull’autorevolezza delle organizzazioni che li emanano e sull’ampio riconoscimento da parte dei diversi portatori di interesse della loro validità scientifica. Dall’analisi condotta risultano numerose iniziative portate avanti sia in ambito nazionale che internazionale per arrivare alla definizione di standard relativi al settore delle nanotecnologie.

La comunicazione rappresenta un passaggio chiave nella gestione del rischio relativo al trattamento e all’uso dei NM in ambito lavorativo. Una comunicazione appropriata costituisce, infatti, un aspetto basilare sia per assicurare l’effettiva adozione da parte dei lavoratori di comportamenti corretti sotto il profilo della prevenzione, sia per scongiurare il crearsi di dinamiche allarmistiche infondate dal punto di vista scientifico, sia per sollecitare comportamenti proattivi da parte dei datori di lavoro. La comunicazione rappresenta un aspetto chiave sia per dare forza alle norme esistenti sia per sopperire alle lacune di tale regolamentazione, stimolando l’adozione volontaria di comportamenti corretti da parte dei lavoratori o l’adozione di codici di autoregolamentazione da parte dei datori.

Un comunicazione appropriata dovrebbe essere:

- **credibile** cioè provenire da fonti riconosciute come autorevoli ed affidabili da parte dei destinatari. Nello specifico ambito di un settore come quello delle nanotecnologie, caratterizzato da uno stato delle conoscenze, per certi versi, ancora insufficiente, ciò significa dover fare soprattutto i conti con il rischio della contraddittorietà delle fonti.
- **corretta** cioè veicolare un messaggio completo (non caratterizzato cioè da omissioni tese a perseguire un effetto persuasivo) ed effettivamente suffragato da riscontri scientifici ed obiettivo. Anche sotto questo profilo la comunicazione relativa al settore delle nanotecnologie propone alcune problematiche peculiari vista la mancanza, in alcuni casi, di dati certi sugli impatti e le incertezze nella stima del rischio. Si noti che veicolare messaggi non corretti può comportare il rischio di compromettere irrimediabilmente la credibilità della fonte.

- **chiara** cioè facilmente e pienamente comprensibile da parte dei destinatari. Nel caso delle nanotecnologie ciò significa riuscire a superare le difficoltà create dalla necessità di misurarsi con l'esigenza di trasferire conoscenze basate su nozioni complesse e di evitare l'uso di una terminologia tecnica non immediatamente comprensibile dai non addetti ai lavori. Si noti che un'eccessiva semplificazione del messaggio può, a volte, comportare il rischio di pregiudicarne la correttezza.

Inoltre, nello sviluppare una strategia di una comunicazione efficace, occorre tener conto sia delle caratteristiche dei canali di informazione utilizzati, sia dei destinatari del messaggio. Anche se non vi sono precise regole per la scelta degli strumenti più idonei con cui conseguire gli obiettivi, sembra, comunque, utile tenere presenti le caratteristiche rilevanti dei soggetti coinvolti o dei gruppi, al fine di raggiungere tutti in modo efficace. Occorre quindi acquisire una conoscenza approfondita dei potenziali destinatari del messaggio (la loro percezione e comprensione delle questioni trattate, le loro attese, il loro stato delle conoscenze, ecc.), ai quali, utilizzando i canali di informazione più idonei, fornire fonti informative accurate e facilmente accessibili.

Tuttavia tra le varie strategie di comunicazione possibili, la comunicazione bidirezionale, basata sul coinvolgimento attivo dei destinatari e l'interazione diretta con i soggetti portatori delle molteplici conoscenze (e punti di vista) necessarie a restituire una visione complessiva delle problematiche trattate, sembra essere la più idonea per affrontare un tema come quello del rischio legato allo sviluppo e all'uso delle nanotecnologie sul quale potrebbe non essere difficile incontrare atteggiamenti di scetticismo, diffidenza e disinteresse.

Infine un ultimo aspetto da tenere in considerazione sono le modalità attraverso cui viene presentato il messaggio, che incidono sulla recettività del pubblico nei confronti dei temi trattati. In questo caso potrebbe essere opportuno focalizzarsi sulle tecniche di *message framing* proprie della comunicazione persuasiva e contestualizzare il messaggio adattandolo al reale impiego delle nanotecnologie e non a situazioni di laboratorio estremamente specialistiche.

Introduzione

Nel campo delle nanotecnologie il gap tra il progresso tecnologico e la ricerca in ambito di Salute e Sicurezza del Lavoro è ancora molto ampio. Gli studi relativi agli effetti sulla salute e all'analisi del rischio da esposizione a nanomateriali (NM) sono limitati e non esistono metodologie validate per la valutazione del rischio in ambiente di lavoro. Pertanto, a fronte dello squilibrio tra le scarse conoscenze sui rischi per la salute connessi con l'utilizzo dei NM e la diffusione esponenziale che le nanotecnologie avranno nei prossimi anni, è necessario sviluppare la ricerca nel settore con particolare attenzione alla analisi del rischio per i lavoratori esposti ed evidenziare le criticità e i bisogni delle politiche di salute e sicurezza dei lavoratori, correlati con lo sviluppo delle nanotecnologie, nell'ottica di indirizzare gli sforzi verso un approccio responsabile e sostenibile al loro utilizzo.

L'Istituto Superiore per la Prevenzione E la Sicurezza del Lavoro (ISPESL) ha istituito nel 2008 il "Network nazionale per l'individuazione di misure di prevenzione protezione connesse con l'esposizione a nanomateriali in ambito lavorativo" (NanoOSH Italia) che si pone i seguenti obiettivi principali:

- potenziare e consolidare a livello nazionale la collaborazione nell'attività di ricerca sui rischi da esposizione lavorativa a NM, effettuando una ricognizione dei bisogni, delle priorità e delle possibilità di finanziamento;
- sviluppare un approccio multidisciplinare alla valutazione del rischio promuovendo attività di ricerca integrate;
- individuare strumenti idonei per lo sviluppo della comunicazione ed il trasferimento delle conoscenze nel settore.

Il Network è composto da ricercatori che a diverso titolo operano nel settore della salute e sicurezza dei NM in ambiente di lavoro all'interno dell'ISPESL e dai rappresentanti degli Enti e delle Università che hanno mostrato maggiore sensibilità alla problematica a livello nazionale.

Il "Libro Bianco sull'esposizione a nanomateriali ingegnerizzati e gli effetti sulla salute e sicurezza dei lavoratori" costituisce il primo risultato di questo gruppo di lavoro; tale risultato rappresenta il tentativo di definire lo stato dell'arte in Italia sul tema e può costituire il punto di partenza per la discussione sugli impatti di salute e sicurezza del lavoro e sulle prospettive di regolamentazione, cercando il coinvolgimento delle Istituzioni e delle parti sociali.

Il lavoro è stato svolto in due fasi successive. Nella prima è stato definito il piano dell'opera, sono stati individuati gli argomenti chiave della trattazione e i sottogruppi di esperti per ciascun argomento; quindi al termine del processo di revisione editoriale è stato pubblicato il libro bianco. Nella seconda fase è iniziato un processo di

identificazione di stakeholder nazionali attivi nel settore della salute e sicurezza del lavoro e interessati all'impatto delle nanotecnologie in questo settore, seppur con approccio differente alla materia trattata. La realizzazione di tale processo di consultazione permette di acquisire il contributo e i differenti punti di vista di quella parte del mondo istituzionale, delle imprese, della ricerca e dell'economia, che in Italia ha, a diverso titolo, un ruolo nello sviluppo responsabile e sostenibile delle nanotecnologie. Attraverso questo percorso il Libro Bianco, tramite l'acquisizione anche delle conoscenze e dei differenti punti di vista di cui è portatore, intende proporre una ricognizione sulle prospettive e sulle problematiche relative allo sviluppo delle nanotecnologie e ai rischi in ambiente di lavoro, a livello nazionale.

capitolo 1

Definizioni dei nanomateriali

Danilo Cottica (coordinatore), *Fondazione Salvatore Maugeri di Pavia*

Stefano Bellucci, *Istituto Nazionale di Fisica Nucleare, Laboratori Nazionali di Frascati*

Fabio Boccuni, *INAIL, Dipartimento di Medicina del Lavoro - ex ISPESL*

Stefano Casciardi, *INAIL, Dipartimento di Igiene del Lavoro - ex ISPESL*

Paola Castellano, *INAIL, Dipartimento di Igiene del Lavoro - ex ISPESL*

Matteo Goldoni, *INAIL, Centro Studi e Ricerche di Parma - ex ISPESL*

Elena Grigniani, *Fondazione Salvatore Maugeri di Pavia*

Achille Marconi, *Istituto Superiore di Sanità*

1.1 Definizione dimensionale e strutturale dei nanomateriali

Le nanotecnologie presto troveranno applicazione in molti ambiti della vita e del lavoro e renderanno possibili forti innovazioni in tutte le aree relative alla comunicazione, alla salute alle produzioni manifatturiere, ai materiali ed alle tecnologie basate sulla conoscenza, pertanto la maggior parte delle autorità del settore ritengono necessario fornire all'industria ed alla ricerca gli strumenti adatti per lo sviluppo e l'utilizzo di tali tecnologie. Inoltre, è essenziale che i legislatori e le agenzie che si occupano di protezione ambientale e della salute abbiano a disposizione sistemi di misura validi e protocolli di valutazione basati su standard di indubbia certezza (ISO, 2010).

In questo senso occorre definire alcuni concetti fondamentali, per inquadrare l'ambito della presente trattazione.

Innanzitutto, con il termine "Nanoscienze" si intende il risultato di una cooperazione interdisciplinare tra fisica, chimica, biologia, biotecnologia, scienze dei materiali ed ingegneria con il fine di studiare i fenomeni e la manipolazione di materiali alla scala atomica e molecolare, le cui proprietà differiscono significativamente da quelli di dimensioni maggiori (Royal Society, 2004; IRGC, 2006).

Per le finalità di questo documento si assume la definizione di nanotecnologia fornita dalla *National Nanotechnology Initiative* (NNI 2006a,b,c), il programma di Ricerca e Sviluppo fondato dal governo federale degli Stati Uniti per coordinare i molteplici sforzi in materia di scienza, ingegneria e tecnologia alla nanoscala. Questa definizione prevede che il termine "Nanotecnologia" possa essere affiancato ad un processo o ad un prodotto solo se sono rispettate le seguenti condizioni:

(1) sviluppo di ricerca e tecnologia a livello atomico, molecolare o macromolecolare,

in una scala dimensionale che vada approssimativamente da 1 a 100 nanometri;
(2) creazione ed utilizzo di strutture, dispositivi e sistemi che abbiano proprietà e funzioni innovative dovute alla loro grandezza;
(3) capacità di controllare o manipolare la materia alla scala atomica. Tale definizione è stata ripresa anche dall'*Environmental Protection Agency* (EPA), l'Agenzia per la protezione ambientale statunitense, e dal *National Institute of Occupational Safety and Prevention* (NIOSH) nei loro documenti principali di riferimento sul tema delle nanotecnologie (EPA, 2007; NIOSH, 2009).

Esistono, inoltre, definizioni che differiscono per le dimensioni in base alle quali si considerano i materiali alla nanoscala: alcune includono quelli superiori ai 100 nm¹, ed altre identificano i nanomateriali (NM) come "quei materiali che abbiano componenti strutturati con almeno una delle dimensioni inferiore ai 100 nm (Royal Society, 2004) e che includono nanoparticelle (NP), ovvero particelle caratterizzate da tutte e tre le dimensioni tra circa 1 nm e 100 nm (ISO, 2008).

La definizione di nanotecnologia scelta in questa sede si riferisce ai materiali alla nanoscala intenzionalmente prodotti in laboratorio o a livello industriale. Questi nanomateriali sono detti "ingegnerizzati" escludendo, quindi, tutto il particolato esistente in natura (il particolato proveniente dagli incendi delle foreste, o i particolati biologici, ecc.) e tutto quello che proviene in modo casuale da prodotti dell'uomo (dai motori diesel, dagli impianti energetici, ecc), sebbene rientri comunque nella scala dimensionale compresa tra 1 e 100 nm.

I NM ingegnerizzati possono ulteriormente essere suddivisi in base alle modalità con cui vengono prodotti, ovvero con tecniche sia "top-down" (lett: dall'alto verso il basso) sia "bottom-up" (lett: dal basso verso l'alto) (Royal Society, 2004). Il procedimento "top-down" prevede il taglio o il passaggio in una fresatrice di un campione di materiale unico e molto largo per ottenerne il corrispettivo alla nanoscala e nella configurazione desiderata; al contrario, l'approccio "bottom-up" prevede l'assemblaggio di subunità più piccole per ottenerne il corrispettivo più largo alla nanoscala tramite procedimenti simili alla sintesi chimica. Molte applicazioni della tecnica "top-down" vengono utilizzate da anni, come i procedimenti litografici per la produzione manuale dei chip per computer, mentre gli approcci "bottom-up", come quelli per la produzione dei nanotubi, sono relativamente nuovi. La tecnica che viene utilizzata per produrre il nanomateriale può influenzare il tipo di rischio per la salute dell'uomo associato al nanomateriale stesso (Thomas K and Sayre P, 2005). Le basi concettuali delle nanotecnologie sono state espone per la prima volta nel 1959 dal fisico Richard Feynman nel suo discorso dal titolo "In fondo c'è molto spazio" (Feynman R, 1959). Feynman ha studiato la possibilità di manipolare la materia

¹ www.lanl.gov/mst/nano/definition.html

a livello dei singoli atomi o molecole, immaginando come sarebbe stata l'intera Enciclopedia Britannica scritta sulla testa di uno spillo e prevedendo così una crescente possibilità di esaminare e controllare la materia alla nanoscala. Tuttavia, il termine "nanotecnologia" non compare fino al 1974, quando Norio Taniguchi, un ricercatore dell'Università di Tokyo (Giappone) lo ha utilizzato in riferimento alla possibilità di costruire materiali in modo molto preciso a livello nanometrico (Taniguchi M, 1974). All'epoca, la spinta iniziale verso la miniaturizzazione venne dall'industria elettronica, che aveva l'obiettivo di sviluppare la strumentazione utilizzata per creare dispositivi elettronici sui chip di silicene sempre più piccoli (e quindi più veloci e più complessi). Infatti, già agli inizi degli anni Settanta, negli Stati Uniti d'America veniva utilizzata dalla IBM una tecnica, chiamata litografia a fascio di elettroni, per creare nanostrutture e dispositivi piccoli 40 – 70 nm (Royal Society, 2004).

Dall'inizio del nuovo millennio, lo sviluppo delle nanotecnologie ha registrato un andamento esponenziale, testimoniato dal numero di prodotti commercializzati e dall'entità dei fondi dedicati alla ricerca e sviluppo nel settore.

Le prospettive indicate da Roco e altri (Roco MC, 2004; Roco MC, 2006; Renn O and Roco MC, 2006) identificavano quattro generazioni "sovrapponibili" (nel tempo) di nuovi prodotti nanotecnologici e di processi che avrebbero avuto potenziale sviluppo tra il 2000 e il 2020. Ogni generazione di prodotti è stata di seguito elencata inserendo tra parentesi l'anno di creazione dei primi prototipi:

1. Nanostrutture passive (2001): prodotto della ricerca primaria sui materiali nanostrutturati e sugli strumenti di misura e controllo di processi alla scala nanometrica, quali nanoparticelle, nanomateriali e nanotubi di carbonio.
2. Nanostrutture attive (2005): dispositivi e sistemi per l'immagazzinamento e la conversione di energia; strumenti per medicina molecolare e sistemi alimentari; nanoelettronica; strumentazioni e manifatture 3D alla nanoscala.
3. Sistemi di Nanosistemi (2010): nanostrutture eterogenee e sistemi supramolecolari ingegnerizzati, quali tessuti artificiali e sistemi sensoriali; interazioni quantiche all'interno di sistemi alla nanoscala; sistemi elettromeccanici alla nanoscala; terapia focalizzata sulla cellula con nanodispositivi.
4. Nanosistemi molecolari (2015): manipolazione al livello atomico per la progettazione di molecole e sistemi supramolecolari; dinamica di singola molecola; macchine molecolari; progettazione di grandi ed eterogenei sistemi molecolari; interazione controllata tra luce e materia con rilevanza per la conversione dell'energia.

Ad oggi sembrerebbe che tale andamento abbia subito addirittura un'accelerazione con un'anticipazione della data di inizio di ciascuna fase (lavicoli S et al, 2009).

Per la nanotecnologia quindi – molto di più che per altri ambiti – è richiesta l'integrazione di molte scienze diverse con l'ingegneria e con competenze e discipline

tecniche; le sue applicazioni entreranno in ogni settore e sfera della vita (comunicazione, salute, lavoro, mobilità, casa, tempo libero, energia, alimentazione) e saranno accompagnate da cambiamenti sociali, economici ed ecologici (IRGC, 2006).

Tuttavia, le stesse proprietà che rendono i NM unici da un punto di vista chimico, fisico e biologico, rispetto a particelle di dimensioni maggiori dello stesso materiale, possono contribuire a causare un rischio per la salute umana e per l'ambiente. A tali dimensioni, infatti, i NM iniziano a mostrare proprietà particolari che influenzano il loro comportamento fisico, chimico e biologico con effetti che, al momento, sono lontani da un'interpretazione precisa del loro impatto sull'ambiente e sulla salute umana.

Oltre alle nanotecnologie, che producono ed utilizzano deliberatamente dette strutture chimiche, esiste un vasto campo di ambiti produttivi e di ambienti di vita e di lavoro in cui i NM possono rappresentare una fonte di rischio (durante la produzione dei NM stessi, fino alla formulazione ed utilizzo di prodotti contenenti NM, per arrivare alle fasi del loro smaltimento o riciclaggio) e che possono essere presi in considerazione per scopi preventivi.

1.1.1 Definizioni igienistico-industriali

Quando si parla di microparticelle e nanoparticelle è opportuno riprendere un concetto della chimica-fisica applicato all'igiene industriale che è di notevole rilevanza per gli strumenti di campionamento del particolato aerodisperso, quando si preveda il frazionamento delle diverse classi dimensionali. Le frazioni granulometriche delle polveri aerodisperse sono classificate in base al "diametro aerodinamico" delle particelle, definito come il "diametro di una sfera di densità pari a 1 g/cm^3 con la stessa velocità di sedimentazione nelle stesse condizioni di temperatura, pressione ed umidità".

La norma UNI-EN 481:1994 "Atmosfera nell'ambiente di lavoro – Definizione delle frazioni granulometriche per la misurazione delle particelle aerodisperse." definisce molto bene le tre frazioni, inalabile, toracica e respirabile, delle polveri aerodisperse e fornisce specifiche tecniche per gli strumenti di campionamento necessari (HSE, 2004). Quando viceversa si parla di "polveri fini", "particelle ultrafini" in bibliografia difficilmente si reperiscono definizioni del *range* dimensionale loro attribuito. Nel 1998 Preining definì le polveri ultrafini come quelle aventi un diametro inferiore a 100 nm (Preining O, 1998). Analogamente, la Royal Society ha proposto una definizione di nanotecnologia che porta a definire le nanoparticelle come quelle aventi diametro inferiore a 100 nm (Royal Society, 2004).

La ISO definisce una nanoparticella come "una particella con un diametro sufficientemente piccolo per proprietà chimiche e fisiche [...]. Un diametro superiore nominale,

ma non esclusivo, per le nanoparticelle è di 40 nm". La norma definisce poi altre due importanti classi di particolato aerodisperso (ISO, 2005):

- 1) *agglomerato*: un gruppo di particelle legate da forze relativamente deboli quali Van der Waals, elettrostatiche e di tensione superficiale;
- 2) *aggregato*: particella eterogenea in cui i diversi componenti non sono facilmente separabili, perché legati da forze molto stabili.

Facile intuire la rilevanza della definizione ai fini tossicologici e della relativa misura (campionamento ed analisi).

Per classificare le particelle con diametro aerodinamico inferiore a 0,5 μm , si dovrebbe utilizzare il "diametro di diffusione", definito come il "diametro di una sfera con lo stesso coefficiente di diffusione nelle stesse condizioni di temperatura, pressione ed umidità". Quando si parla di NP siamo nel secondo caso e quindi si evidenzia un potenziale contributo del processo di diffusione alla loro aerodispersione.

La Commissione Tedesca per i MAK (concentrazioni massime ammissibili per le sostanze chimiche nell'aria nei luoghi di lavoro che, nello stato delle conoscenze attuali, non alterano la salute dei lavoratori, né provocano un fastidio indebito – MAK Commission: Commissione per lo studio delle sostanze pericolose nei luoghi di lavoro), infine, prende in considerazione gli agglomerati per sviluppare una definizione di particella ultrafine di questo tipo: "Particelle Ultrafini (nanoparticelle) [...] comprendendo i loro aggregati ed agglomerati come componenti di polveri o fumi. Le loro particelle primarie sono caratterizzate da un diametro di diffusione equivalente di meno di 100 nm" (BIA, 2003; HSE, 2004).

1.1.2 Le nanoparticelle in igiene industriale ed occupazionale

Molti materiali utilizzati nelle nanotecnologie sono costituiti da nanoparticelle o materiali fibrosi che inizialmente sono prodotti allo stato di aerosol o sospensioni colloidali. La maggior parte dei nanomateriali attualmente prodotti o prossimi ad essere immessi sul mercato viene catalogata dalla Organization for Economic Co-operation and Development (OECD, 2008) nelle seguenti tipologie:

- *Fullereni* (C_{60}): molecole di carbonio con strutture cave, a gabbia; la famiglia dei fullereni è vasta, ma il più conosciuto è il C_{60} , un composto con numero di atomi di carbonio pari a 60 a creare una struttura sferica, formata da pannelli pentagonali o esagonali.
- *Nanotubi di carbonio* (*Carbon Nanotubes – CNT*): cilindri di fogli di grafite arrotolati e chiusi ad un'estremità, possono essere a parete singola (*Single Wall – SWCNT*) o multipla (*Multi Wall – MWCNT*), a seconda che si compongano di un singolo foglio oppure di più fogli disposti in una struttura coassiale. Per le loro dimensioni (rapporto

lunghezza/diametro) cadono nella definizione convenzionale di fibre, sono altamente elettrostatici e si agglomerano in fasci o filamenti di circa 20 – 50 nm di diametro. Poiché il processo produttivo prevede l'uso di catalizzatori metallici, il materiale finale può contenere metalli quali ferro, nichel, cobalto.

- *Materiali a base di metalli e/o ossidi di metalli* quali:
 - nanoparticelle di argento e di ferro;
 - diossidi di titanio e di silicio;
 - ossidi di alluminio, cerio e zinco.
- *Nero di carbone (Carbon black)*.
- *Polistirene*.
- *Dendrimeri*: polimeri sintetici di struttura nanometrica costruiti da unità ramificate (dal greco *déndron* – albero). Le superfici dei dendrimeri sono caratterizzate da numerosi terminali di catena che possono essere adattati ai fini della realizzazione di specifiche funzioni chimiche (ad esempio per l'impiego come catalizzatori o come vettori di farmaci a causa della presenza di cavità interne alla struttura tridimensionale)
- *Nanoclays* (nanoargille): argille minerali con strutture caratterizzate da una morfologia a lamina.

In aggiunta alle tipologie riportate nella suddetta lista vanno anche menzionati i seguenti NM:

- *Nanodots* (nanocristalli): strutture cristalline di composti quali cadmio, selenio, tellurio e zolfo; il loro diametro nominale è dell'ordine di diversi nanometri; sono reperibili in sospensione in un veicolante o inglobati in un solido (polistirene, poliuretano, policarbonato, silice).
- *Carbon nanofoam* (nanoschiuma di carbonio): è la quinta forma allotropica conosciuta del carbonio, costituita da mazzi di atomi di carbonio con diametro medio di 6 – 9 nm, interconnessi casualmente a formare una struttura simile al tessuto. È un solido poroso, estremamente leggero, che funziona da semiconduttore; ha proprietà magnetiche e contiene ferro e nichel come impurezze.
- *Quantum dots* (punti quantici): sono NP cristalline con proprietà legate alle dimensioni, dovute agli effetti del confinamento quantico sullo stato degli elettroni (ISO, 2009).

1.2 Caratteristiche chimico-fisiche e proprietà chimiche dei nanomateriali

La ricerca in questo campo si pone alcune questioni fondamentali, ossia se l'esposizione a NM e NP rappresenti un fattore di rischio per la salute dei lavoratori, e come le proprietà chimico-fisiche e chimiche influenzino tale rischio di esposizione.

Diversi studi hanno dimostrato che la presenza di NP e di nanoaerosol in vari ambiti lavorativi, di natura intenzionale (prodotte o manipolate) o sviluppate nell'ambito di emissioni involontarie durante particolari processi chimico-fisici, può comportare potenziali rischi per la salute e per la sicurezza dei lavoratori sulla base di evidenze sperimentali relative a correlazioni fra esposizioni e insorgenza di patologie che interessano, in particolare, il tratto respiratorio ed il sistema immunologico e nervoso (Marconi A, 2006; Ostiguy C et al, 2006).

Le ricerche, in particolare documentate attraverso studi su animali ed *in vitro*, hanno, infatti, posto in evidenza la possibilità di insorgenza di effetti nefrotossici, genotossici e sul sistema riproduttivo, nonché di granulomi e tumori al sistema polmonare (Oberdöster G et al, 1994; Borm P et al, 2004) e di traslocazione ad altri tessuti od organi (Oberdöster G et al, 2002; Oberdöster G et al, 2004) in relazione alle diverse caratteristiche chimico-fisiche delle NP. Tuttavia, allo stato attuale, a causa del numero limitato di studi, dei brevi periodi di esposizione, della differente composizione delle NP testate e, spesso, delle inusuali vie di esposizione negli ambienti di lavoro, molti aspetti di tale problematica richiedono ulteriori approfondimenti per un corretto approccio nella valutazione dell'esposizione professionale a NP.

Particolare attenzione deve essere, quindi, focalizzata sugli aspetti metrologici in quanto, sebbene diversi parametri (quali dimensioni, massa, composizione chimica, area superficiale, concentrazione, stato di aggregazione e di agglomerazione, solubilità in acqua e chimica superficiale, struttura morfologica) possano contribuire all'entità della pericolosità dell'interazione delle NP con l'organismo umano, ad oggi non risulta ancora opportunamente definita un'opinione univoca circa le specifiche relazioni con gli effetti tossici.

È quindi fondamentale, al fine di fissare opportuni limiti igienistici di riferimento per l'esposizione a NP per la messa a punto di adeguati sistemi di prevenzione e di protezione per i lavoratori e per l'ambiente, individuare in maniera univoca i parametri "corretti" da valutare in relazione agli aspetti della tossicità delle NP, ricorrendo, a supporto degli studi inerenti all'interazione biologica delle NP, ad un approccio metrologico multiparametrico, caratterizzato dall'utilizzo di opportune tecniche di campionamento e di analisi negli ambienti *indoor*.

La caratterizzazione chimico-fisica del particolato ultrafine è estremamente importante per distinguere tra NP naturalmente aerodisperse nell'ambiente o rilasciate occasionalmente quali sottoprodotti di reazioni termiche e chimiche, come, ad esempio, nei processi di stampa (He C et al, 2007; Kagi N et al 2007) o, più in generale, di combustione, e NP ingegnerizzate e nanoaerosol ingegnerizzati (*engineered nanoparticles* e *engineered nanoaerosol*) specificatamente prodotte/i e/o manipolate a livello industriale. Queste ultime, infatti, possiedono caratteristiche chimico-fisiche ben precise

che le distinguono dal resto del particolato ambientale (Oberdorster G et al 2005a). Sebbene molte delle proprietà chimico-fisiche delle nanoparticelle ingegnerizzate risiedano nel nucleo, di particolare interesse sono anche le proprietà della superficie o del guscio (*shell*), poiché rappresentano i punti con i quali gli organismi vengono immediatamente a contatto (Christian P et al, 2008).

Per quanto riguarda gli aspetti dimensionali, si è rilevato come questi influenzino notevolmente la deposizione delle NP (in particolare nel tratto respiratorio, soprattutto a livello alveolare), che risulta particolarmente elevata per particelle con raggio aerodinamico <100 nm (Oberdorster G et al, 2005a; ICRP 1994; ICRP, 2002; Bailey M, 1994). Inoltre, le NP possono entrare direttamente nelle cellule attraverso le membrane e traslocare, prevalentemente per diffusione, in altre zone del corpo (Oberdorster G et al, 2005a; BeruBe K, 2007; Card JW et al, 2008) eludendo i macrofagi alveolari e trasmigrando nell'interstizio polmonare, sebbene questo non sia stato definitivamente dimostrato sull'uomo (Oberdorster G et al, 2005a; BeruBe K, 2007; Card JW et al 2008; Oberdorster G et al, 2005b).

Se le dimensioni sono piccole, infatti, si possono creare nella particella piani cristallini discontinui, che fanno aumentare il numero di difetti strutturali e modificano notevolmente la configurazione elettronica del materiale (Nel A et al, 2006).

Lo stato di aggregazione o agglomerazione può influire sulla deposizione, sulla tossicità locale e sulla tossicocinetica delle NP, a causa di variazioni significative del raggio aerodinamico (maggiore nell'aggregato) e dell'area di superficie complessiva occupata dalle NP, che si riduce (Tsuji et al, 2006; Borm PJ et al, 2006); in tal modo, il comportamento di grandi aggregati di NP diviene assimilabile a quello di particelle fini *in vivo* (Tsuji et al, 2006; Borm PJ et al, 2006).

L'aggregazione/agglomerazione dipende, oltre che dalle proprietà intrinseche delle NP e dal loro numero, anche dalle proprietà del mezzo in cui esse si trovano (pH, forza ionica, materiale organico dissolto nel mezzo stesso) (Christian P et al, 2008).

Il volume occupato e la massa diminuiscono al diminuire delle dimensioni, ma con un conseguente aumento dell'area di superficie per unità di massa e, pertanto, del potenziale per avere interazioni biologiche (Oberdorster G et al, 2005a; Borm PJ et al, 2006; Warheit DB, 2008). Quando la particella si riduce nelle dimensioni, infatti, la percentuale di atomi che si trova a livello superficiale aumenta in relazione a quella che occupa il resto del volume (Oberdorster G et al, 2005b; Nel A et al, 2006; Yang W et al, 2008). Questo può influenzare tanto la carica quanto la composizione superficiale e l'attività catalitica della superficie stessa, oltre ad aumentare il numero di potenziali gruppi reattivi sulla superficie cellulare (Card JW et al, 2008; Nel A et al, 2006; Warheit DB, 2008; Warheit DB et al, 2008; Nel AE et al, 2009). Come conseguenza, è ipotizzabile che i gruppi reattivi sulla superficie modifichino l'attività biologica della NP e

siano perciò rilevanti nel definirne la tossicità. A parità di composizione chimica, quindi, l'area di superficie per unità di massa appare un parametro estremamente rilevante nel definire la tossicità di una NP (Oberdorster G et al, 2005b).

La reattività superficiale dipende, inoltre, dalla composizione chimica stessa (presenza di gruppi reattivi sulla superficie), dalla carica superficiale (che influenza molto anche la deposizione delle particelle soprattutto a livello polmonare), dall'attività catalitica, dalla capacità di assorbimento e desorbimento di molecole, dalle imperfezioni dei cristalli e dalle impurezze (Oberdorster G et al, 2005a; Yang W et al, 2008; Nel AE et al, 2009; Aillon KL et al, 2009).

Anche la porosità contribuisce al significativo aumento dell'area di superficie totale, che si va ad aggiungere all'area di superficie geometrica (Powers KW et al, 2006a). Se in alcuni casi un'aumentata reattività superficiale (con una conseguente aumentata attività biologica) produce effetti positivi (per esempio, attività antiossidante, veicolazione e rilascio intracellulare di sostanze terapeutiche, grazie ad un'alta capacità di penetrazione della NP), in altri possono manifestarsi effetti tossici (per esempio, induzione di stress ossidativo e citotossicità) (Oberdorster G et al, 2005b; Nel A et al, 2006; Yang W et al, 2008; Limbach et al, 2007), in altri ancora effetti positivi e tossici contemporaneamente (Oberdorster G et al, 2005b; Yang W et al, 2008). Infine, la reattività superficiale risulta fondamentale nel definire le interazioni tra NP e macromolecole biologiche (proteine, elementi del citoscheletro, collagene, strutture di membrana, recettori, DNA, ecc.). In molti casi, quindi, le NP mostrano lo stesso potenziale infiammatorio citotossico di particelle più grandi, anche a parità di composizione chimica.

Le dimensioni e la chimica/reattività superficiale influenzano anche la tossicocinetica delle particelle dopo la loro deposizione a livello alveolare (Oberdorster G et al, 2005b; Powers KW et al, 2006a; Balbus JM et al, 2007).

Per entrare più in dettaglio, alcuni autori si soffermano in particolare su composizione chimica, carica ed energia superficiale: sebbene non sia ancora del tutto chiaro quanto la chimica del nucleo influenzi la tossicità di una NP, la composizione chimica della superficie può avere un effetto sull'aggregazione/agglomerazione, sull'assorbimento di biomolecole e perciò sulla dissoluzione, distribuzione, e biopersistenza *in vivo*. Allo stesso modo, la carica netta superficiale è fondamentale nel definire non solo l'interazione tra NP e molecole biologiche, ma anche la loro capacità di penetrazione attraverso le membrane cellulari. Le membrane cellulari sono cariche negativamente a pH fisiologico, e questo favorisce la penetrazione di NP cariche positivamente per via di interazioni elettrostatiche (Nel AE et al, 2009; Elder A et al, 2009). È stato, inoltre, supposto che una superficie cationica possa portare ad un incontrollato trasporto cationico nel lisosoma, con conseguente citotossicità (Xia T et al, 2009). Infine, superfici

a bassa energia (idrofobiche) vengono assorbite in modo aspecifico e possono favorire lo "srotolamento delle proteine" (*protein unfolding*). Inoltre, avendo proprietà "analoghe al surfactante" (*surfactant-like*), possono disorganizzare i componenti lipidici delle membrane cellulari ed aumentare la penetrazione epiteliale. Di contro, superfici ad alta energia (idrofiliche), in particolare quelle con bassa carica negativa o neutra, hanno bassa affinità con le proteine e limitano l'accumulo cellulare (Nel AE et al, 2009; Elder A et al, 2009). Il legame tra NP e proteine può generare complessi più mobili che possono accedere a siti tissutali normalmente inaccessibili. Inoltre, la denaturazione o degradazione delle proteine sulla superficie di NP può portare a modificazioni funzionali e strutturali, con possibile inibizione totale o parziale dell'attività enzimatica. Il fatto che le superfici delle NP siano idrofobiche o idrofiliche, lipofiliche o lipofobiche, cataliticamente attive o passive può avere un effetto importante sulla loro tossicità (Nel A et al, 2006, Nel AE et al, 2009; Dutta D et al, 2007).

In diversi casi, è possibile utilizzare dei rivestimenti per modificare le proprietà della superficie delle NP, sia per ridurre la reattività, sia per prevenire aggregazione ed agglomerazione, favorendone, quindi, la dispersione e mantenendone inalterate le proprietà di interesse. Tuttavia, la traslocazione delle particelle dal tratto respiratorio alla circolazione sistemica può essere accelerata, alterando la distribuzione delle NP nel corpo (Warheit DB, 2008; Carlotti ME et al, 2009; Clift MJ et al, 2008; Gupta AK et al, 2007, Leonov AP et al, 2008; Mancini MC et al, 2008; Nakano K et al, 2009; Okassa LN et al, 2007; Ryman-Rasmussen JP et al, 2007).

Per quanto riguarda gli aspetti inerenti alla solubilità o la biopersistenza (durabilità), si è rilevato che tali proprietà influiscono sia sulla definizione dell'organo bersaglio delle NP, sia sui meccanismi di *clearance* delle particelle, sia sulla tossicocinetica. Inoltre, la presenza di sostanze tossiche in NP altamente solubili, come alcuni metalli, può provocare un'esposizione diretta a ioni metallici con i conseguenti effetti tossici (Card JW et al, 2008; Borm PJ et al, 2006; Balbus JM et al, 2007; Borm P et al, 2006). Si parla anche di degradabilità: NM non degradabili possono accumularsi negli organi e nelle cellule, causando alterazioni biologiche a lungo termine. D'altra parte, i NM biodegradabili possono portare ad un'inattesa tossicità a causa di prodotti di degradazione tossici (Aillon KL et al, 2009).

Un altro parametro considerato fondamentale per definire la tossicità delle NP è la loro forma. Sebbene in generale l'effetto della forma sulla tossicità sia ancora largamente sconosciuto, così come quello della porosità, è noto, tuttavia, che quest'ultima può influire sulla deposizione e sull'assorbimento delle NP nel corpo.

Un discorso a parte meritano invece i materiali fibrosi (Oberdorster G et al, 2005a; Oberdorster G et al, 2005b). In particolare, l'esposizione a fibre è associata ad un aumentato rischio di fibrosi e cancro polmonare dopo esposizione prolungata, ed i parametri importanti per definire la tossicità di una fibra sono dose, dimensioni e biopersistenza. La

penetrazione a livello polmonare delle fibre è inversamente proporzionale al loro diametro. Questo è particolarmente rilevante per alcune NP di grande interesse industriale, quali i nanotubi. In diversi studi sugli animali, infatti, è stato osservato come l'esposizione a nanotubi provochi gli stessi effetti polmonari osservati per altre fibre notoriamente tossiche (quali l'asbesto), anche se si suppone che parte degli effetti sia provocata dalle impurezze metalliche (Al_2O_3 , Fe_2O_3 , TiO_2), presenti nei nanotubi come conseguenza della lavorazione necessaria per generarli (Oberdorster G et al, 2005a; Oberdorster G et al, 2005b).

In conclusione, alcuni autori riportano le principali caratteristiche chimico-fisiche che influenzano la tossicità delle NP (Tabella 1.1) indicando, in alcuni casi, la caratterizzazione minima necessaria affinché uno studio di tossicità *in vivo/in vitro* abbia un significato. Molti altri autori concordano sostanzialmente con i parametri riportati in tabella, distinguendo, in alcuni casi, anche le caratteristiche chimico-fisiche importanti sulla base della loro classificazione (Aillon KL et al, 2009; Ju-Nam Y and Lead JR, 2008; Lewinski N et al, 2008, Shulte PA et al, 2009). Altri autori presentano schemi in cui le proprietà chimico-fisiche sono immediatamente connesse alla tossicità (Nel A et al, 2006; Nel AE et al, 2009; Xia T et al, 2009; Fischer HC and Chan WCW, 2007). Sulla base di alcuni studi (Aillon KL et al, 2009; Murdock RC et al, 2008), l'European Agency for Safety and Health at Work (EU-OSHA), nella sua revisione della letteratura, indica i seguenti attributi che caratterizzano le NP: forma, area di superficie, chimica di superficie, composizione, omogeneità di composizione tra nucleo e superficie, eterogeneità della distribuzione della composizione, solubilità, carica (nei fluidi biologici), struttura cristallina, porosità, cambio nelle dimensioni e/o struttura dopo deposizione, rilascio di componenti costitutivi dopo deposizione, stimolo associato al comportamento, risposta funzionale all'ambiente.

Sulla base di questi attributi, pur ammettendo che non esiste un parametro fisico-chimico universale per caratterizzare la tossicità delle particelle nanostrutturate, l'Agenzia suggerisce, come test minimi da effettuare prima di uno studio di tossicologia, i seguenti parametri: dimensioni, distribuzione, area di superficie specifica, struttura cristallina, reattività superficiale, composizione superficiale, purezza (EU-OSHA, 2009). Riportando anche i test suggeriti da Murdock et al., 2008 (Murdock RC et al, 2008), l'EU-OSHA propone altri possibili parametri interessanti nella caratterizzazione delle NP: forma, potenziale zeta, solubilità, potenziale idrofobico (EU-OSHA, 2009). È, pertanto, evidente che la completa caratterizzazione delle NP richiede l'utilizzo di tecniche talvolta sofisticate e non ancora completamente ottimizzate (Murdock RC et al, 2008; Ju-Nam Y and Lead JR, 2008; Hasselov M et al, 2008).

Per quanto riguarda l'identificazione e la caratterizzazione della specifica composizione chimica dei NM, risulta importante sottolineare alcuni aspetti di particolare ri-

Tabella 1.1 – Caratteristiche chimico-fisiche essenziali delle NP correlabili alla tossicità.	
<ul style="list-style-type: none"> • dimensioni delle particelle e loro distribuzione in stato umido e area di superficie (stato secco) nei mezzi utilizzati per l'esposizione • struttura cristallina/cristallinità • stato di aggregazione • composizione e rivestimento superficiale • reattività superficiale • metodo di sintesi e/o loro preparazione, incluse le modificazioni post-sintesi • purezza del campione 	Warheit, 2008, Murdock et al., 2008 Card JW et al, 2008
<ul style="list-style-type: none"> • dimensioni • forma • composizione chimica • cristallinità • proprietà superficiali (area, porosità, carica, modificazioni superficiali, presenza di rivestimenti) • stato di agglomerazione/aggregazione • biopersistenza • dose assorbita 	Oberdorster et al., 2005a,b
<ul style="list-style-type: none"> • numero di particelle e distribuzione delle dimensioni • dose a livello dell'organo bersaglio • trattamenti superficiali • livello di aggregazione/agglomerazione • carica superficiale • forma e/o potenziale elettrostatico di attrazione • metodo di sintesi (liquida o gassosa, modificazioni post-sintesi) 	Tsuji et al., 2006
<ul style="list-style-type: none"> • dimensioni e distribuzione delle dimensioni • forma • area di superficie • potenziale e proprietà redox • purezza/presenza di contaminanti • attività catalitica diversa dalla generazione di ROS 	Balbus et al., 2007
<ul style="list-style-type: none"> • numero di particelle e dimensioni • dose di superficie • rivestimenti superficiali • capacità di agglomerare/aggregare • carica superficiale • metodi di sintesi 	Borm et al., 2006
<ul style="list-style-type: none"> • stato di aggregazione • composizione elementare e concentrazione di massa • numero di particelle • forma • dimensioni e distribuzione delle dimensioni • solubilità • speciazione (metalli) • area di superficie e porosità • carica di superficie • chimica di superficie 	Tiede et al., 2008

Tabella 1.1 – Caratteristiche chimico-fisiche essenziali delle NP correlabili alla tossicità.

<ul style="list-style-type: none"> • dimensioni • forma • carica • stato di aggregazione • irregolarità superficiali • idrofobicità • presenza di rivestimenti o gruppi funzionali superficiali 	Xia et al. 2009
--	-----------------

levanza nella valutazione del rischio tossicologico ed ecologico.

Una completa caratterizzazione richiede, infatti, che, oltre alla struttura e alla composizione dei NM, vengano prese in considerazione ulteriori proprietà (peso molecolare, punto di ebollizione e di congelamento, pressione di vapore, coefficiente di partizione ottanolo-acqua, solubilità in acqua, reattività, stabilità); le informazioni inerenti alla formulazione e al metodo di preparazione del NM risultano importanti nel determinare il grado di purezza e la variabilità del prodotto, nonché, ovviamente, la performance e le prospettive di utilizzo.

La diversità e la complessità dei NM presenti in commercio contribuiscono a rendere l'identificazione e la caratterizzazione chimica aspetti di particolare rilievo. Una specifica tipologia di NM, infatti, può essere prodotta mediante processi differenti, ciascuno dei quali può generare derivati dello stesso materiale, con proprietà chimiche e chimico-fisiche diverse e, di conseguenza, proprietà tossicologiche ed ecologiche potenzialmente differenti (Oberdorster G et al 2005).

Le proprietà chimiche sopra menzionate potrebbero rivelarsi fondamentali nell'identificazione di una potenziale pericolosità associata ad un dato NM, sebbene, come già evidenziato, contribuiscano in maniera altrettanto rilevante la dimensione e la distribuzione dimensionale delle particelle, il rapporto superficie/volume, la forma, le caratteristiche elettroniche e superficiali, lo stato di dispersione/agglomerazione (Powers KW et al, 2006b) e la conduttività.

Sarà, pertanto, necessario disporre di un ampio spettro di informazioni circa le proprietà del NM in oggetto, la cui completa caratterizzazione permetterà di valutare in modo appropriato il rischio di esposizione e conseguentemente di predisporre misure di prevenzione e di protezione per la salute umana e per l'ambiente.

Si riportano in Tabella 1.2 alcuni esempi relativi alle principali proprietà chimiche, nonché ai settori di impiego di alcune tipologie di NM attualmente presenti in commercio ed evidenziati nell'ambito della problematica dei NM quali contaminanti emergenti dalla *U.S. Environmental Protection Agency (EPA) Federal Facilities Restoration and Reuse Office (FFRRO)* (EPA, 2009).

Tabella 1.2 – Proprietà chimiche ed utilizzo di NM ² .			
Tipologie di nanomateriali (NM)	Esempi	Proprietà chimiche	Impiego
A base di carbonio (naturali o ingegnerizzati)	<i>Fullereni/Buckyballs</i> (Carbonio 60, Carbonio 20, Carbonio 70); nanotubi di carbonio; <i>nanodiamonds</i> ; <i>nanowires</i> .	Stabili, limitata reattività, composti interamente da carbonio, forti antiossidanti.	Applicazioni biomediche, supercondensatori, sensori, fotovoltaici.
Ossidi metallici (naturali o ingegnerizzati)	TiO ₂ , ZnO, CeO ₂	Alta reattività, proprietà fotolitiche	Fotocatalizzatori, pigmenti, veicolazione di farmaci, diagnostica medica, protettori dai raggi UV nelle creme solari, additivi nei diesel
Metalli zero-valenti (ingegnerizzati)	<i>Nanoscale Zero-Valent Iron</i> (nZVI), <i>Emulsified Zero-Valent Iron</i> (EZVI), <i>Bimetallic Nanoscale Particles</i> (BNPs). I BNP includono ferro elementare ed un catalizzatore metallico (quale Au, Ni, Pa o Pt)	Alta reattività superficiale. Comuni materiali di partenza utilizzati nella produzione includono: sali ferrici (Fe [III]) o ferrosi (Fe [II]) con sodio boroidruro	Impieghi nelle acque, nei sedimenti e nei suoli per la riduzione di contaminanti quali nitrati, tricloroetilene e tetracloroetilene
Quantum dots (ingegnerizzati)	Quantum dots a base di CdSe, CdTe e ZnSe	Semiconduttori impaccati i cui eccitoni sono confinati in tutte e tre le dimensioni spaziali. Possibili strutture metalliche includono: CdSe, CdTe, CdSeTe, ZnSe, InAs, o PbSe, per il nucleo e CdS o ZnS per il guscio.	Diagnostica medica, fotovoltaici, telecomunicazioni e sensori
Dendrimeri (ingegnerizzati)	Polimeri iper ramificati; <i>dendrigraft polymers</i> e dendroni.	Altamente ramificati; polimeri multifunzionali	Rilascio di farmaci, sensori chimici, elettrodi modificati e agenti di trasferimento di DNA
NM compositi (ingegnerizzati)	Caratterizzati da due differenti NM o NM combinati con <i>nanoclays</i> . Possono anche includere NM combinati con polimeri sintetici e resine.	Componenti multifunzionali; caratteristiche catalitiche	Potenziati applicazioni nel rilascio di farmaci. Utilizzati anche per ottimizzare proprietà meccaniche e dei ritardanti di fiamma.
NM di argento (ingegnerizzati)	Argento colloidale, fili di argento, polvere di nanoargento ed argento polimerico	Alta reattività superficiale, forti proprietà antimicrobiche	Applicazioni mediche, purificazione dell'acqua, impieghi come antimicrobici. Utilizzati in diversi prodotti commerciali.

² Materiale tratto da EPA, 2009. Emerging Contaminants-Nanomaterials Fact Sheet. EPA 505-F-09-011.

Bibliografia

- Aillon KL, Xie Y, El-Gendy N, Berkland CJ, Forrest ML. Effects of nanomaterial physicochemical properties on in vivo toxicity. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009;61:457-66.
- Bailey M. The New ICRP Model for the Respiratory Tract. *Radiat Prot Dosimetry* 1994;53:107-14.
- Balbus JM, Maynard AD, Colvin VL, Castranova V, Daston GP, Denison RA, et al. Meeting report: hazard assessment for nanoparticles-report from an interdisciplinary workshop. *Environ Health Perspect.* 2007;115:1654-9.
- Report 7/2003e; BIA-Workshop "Ultrafine aerosols at workplaces". Berufsgenossenschaftliches Institute für Arbeitsschutz - BIA- Germany.
- Borm P., Schins R., Albrecht C. Inhaled particles and lung cancer. Part B: Paradigm and risk assessment. *Int J Cancer* 2004; 110(1): 3-14
- Borm PJ, Robbins D, Haubold S, Kuhlbusch T, Fissan H, Donaldson K, et al. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECE-TOC. Part B *Fibre Toxicol.* 2006;3:11.
- Borm P, Klaessig FC, Landry TD, Moudgil B, Pauluhn J, Thomas K, et al. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part V: role of dissolution in biological fate and effects of nanoscale particles. *Toxicol Sci.* 2006;90:23-32.
- Card JW, Zeldin DC, Bonner JC, Nestmann ER. Pulmonary applications and toxicity of engineered nanoparticles. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008;295:L400-11.
- Carlotti ME, Ugazio E, Sapino S, Fenoglio I, Greco G, Fubini B. Role of particle coating in controlling skin damage photoinduced by titanium nanoparticles. *Free Radic Res.* 2009;43:312-22.
- Christian P, Von der Kammer F, Baalousha M, Hofmann T. Nanoparticles: structure, properties, preparation and behaviour in environmental media. *Ecotoxicology.* 2008;17:326-43.
- Clift MJ, Rothen-Rutishauser B, Brown DM, Duffin R, Donaldson K, Proudfoot L, et al. The impact of different nanoparticle surface chemistry and size on uptake and toxicity in a murine macrophage cell line. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008;232:418-27.
- Dutta D, Sundaram SK, Teeguarden JG, Riley BJ, Fifield LS, Jacobs JM, et al. Adsorbed proteins influence the biological activity and molecular targeting of nanomaterials. *Toxicol Sci.* 2007; 100:303-15.
- Elder A, Vidyasagar S, DeLouise L. Physicochemical factors that affect metal and metal oxide nanoparticle passage across epithelial barriers. *Nanomed Nanobiotech.* 2009; 1:434-50.
- EPA. Nanotechnology White Paper. Environmental Protection Agency (EPA), USA; 2007.
- EPA. Emerging Contaminants-Nanomaterials Fact Sheet. EPA 505-F-09-011. September 2009:1 - 7
- EU-OSHA. Workplace exposure to nanoparticles. Madrid, Spain: European Agency for Safety and Health at Work (EU-OSHA); 2009.
- Feynman R. There's plenty of room at the bottom. 1959 Available from: www.its.caltech.edu/~feynman/plenty.html.
- Fischer HC and Chan WCW. Nanotoxicity: the growing need for in vivo study. *Curr Opin Biotech.* 2007;18:565-71.
- Gupta AK, Naregalkar RR, Vaidya VD, Gupta M. Recent advances on surface engineering of magnetic iron oxide nanoparticles and their biomedical applications. *Nanomed.* 2007;2:23-39.
- Hasselov M, Readman JW, Ranville JF, Tiede K. Nanoparticle analysis and characterization methodologies in environmental risk assessment of engineered nanoparticles *Ecotoxicology.* 2008;17:344-61.
- He C., Morawska L., Taplin L. Particle Emission Characteristics of Office Printers. *Environmental Sci. Technol.* 2007; 41: 6039–45
- HSE. Nanoparticles: An occupational Hygiene review; Research Report 274: HSE Books. 2004;10. Health and Safety Executive (HSE), UK.
- Iavicoli S, Rondinone BM, Bocconi F. Occupational safety and health's role in sustainable, responsible nanotechnology: gaps and needs. *Hum Exp Toxicol.* 2009;28:433–43.
- ICRP. International Commission on Radiological Protection: human respiratory tract model for radiological protection, Publication 66 Ann ICRP. 1994;24 (Issues 1-3).
- ICRP. International Commission on Radiological Protection: guide for practical application of the ICRP human respiratory tract model: ICRP supporting guidance 3. Approved by ICRP committee 2 in October 2000. *Ann ICRP.* 2002;32 (issues 1-2).
- ISO. Workplace Atmospheres – Ultrafine, nanoparticle and nano-structured aerosol – Inhalation exposure characterization and assessment.

- International Standardization Organisation. ISO/TR 27628, 2007.
- ISO. Nanotechnologies. Terminology and definitions for nano-objects. Nanoparticle, nanofibre and nanoplat. UNI CEN ISO/TS 27687, 2010.
 - IRGC. White paper on nanotechnology governance. International Risk Governance Council (IRGC), Geneva, Jun 2006.
 - Ju-Nam Y and Lead JR. Manufactured nanoparticles: an overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. *Sci Total Environ.* 2008;400:396-414.
 - Kagi N Fujii S, Horiba Y, Namiki N, Ohtani Y, Emi H, Tamura H, kim YS. Indoor air quality for chemical and ultrafine particle contaminants from printers. *Build Environ.* 2007; 42(5): 1949 -54
 - Leonov AP, Zheng J, Clogston JD, Stern ST, Patri AK, Wei A. Detoxification of gold nanorods by treatment with polystyrenesulfonate. *ACS Nano.* 2008;2:2481-8.
 - Lewinski N, Colvin V, Drezek R. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small.* 2008;4:26-49.
 - Limbach LK, Wick P, Manser P, Grass RN, Bruinink A, Stark WJ. Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress. *Environ Sci Technol.* 2007;41:4158-63.
 - Mancini MC, Kairdolf BA, Smith AM, Nie S. Oxidative quenching and degradation of polymer-encapsulated quantum dots: new insights into the long-term fate and toxicity of nanocrystals in vivo. *J Am Chem Soc.* 2008;130:10836-7.
 - Marconi A. Particelle fini, ultrafini e nanoparticelle in ambiente di vita e di lavoro: possibili effetti sanitari e misura dell'esposizione inalatoria. *G Ital Med Lav Erg* 2006; 28(3): 258-65
 - Murdock RC, Braydich-Stolle L, Schrand AM, Schlager JJ, Hussain SM. Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique. *Toxicol Sci.* 2008;101:239-53.
 - Nakano K, Egashira K, Masuda S, Funakoshi K, Zhao G, Kimura S, et al. Formulation of nanoparticle-eluting stents by a cationic electrodeposition coating technology: efficient nano-drug delivery via bioabsorbable polymeric nanoparticle-eluting stents in porcine coronary arteries. *JACC Cardiovasc Interv.* 2009;2:277-83.
 - Nel A, Xia T, Madler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science.* 2006;311: 622-7.
 - Nel AE, Madler L, Velegol D, Xia T, Hoek EM, Somasundaran P, et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat Mater.* 2009;8:543-57.
 - NIOSH. Approaches to Safe Nanotechnology. Managing the Health and Safety Concerns Associated with Engineered Nanomaterials. National Institute of Occupational Safety and Prevention (NIOSH), USA. 2009.
 - NNI. What is Nanotechnology? National Nanotechnology Initiative (NNI), USA. 2006. Available from: http://www.nano.gov/html/facts/home_facts.html.
 - NNI. About the NNI. National Nanotechnology Initiative (NNI), USA. 2006. Available from: http://www.nano.gov/html/about/home_about.html.
 - NNI. Environmental, Health and Safety Research Needs for Engineered Nanoscale Materials. National Nanotechnology Initiative (NNI), USA. 2006. Available from: <http://www.nano.gov>.
 - Oberdöster G., Ferin J. Lehnert Be. Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury, *Environ Health Perspect* 1994;102 (Suppl 5):173-9.
 - Oberdöster G., Sharp Z., Atudorei V., Elder A., Gelein R., Lunts A., Kreyling W., Cox C. Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J. Toxicol Environ. Health A* 2002; 65(20): 1531-43.
 - Oberdöster G., Sharp Z., Atudorei V., Elder A., Gelein R., Lunts A., Kreyling W., Cox C. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal. Toxicol Environ. Health* 2004; 16(6-7): 437- 45.
 - Oberdorster G, Maynard A, Donaldson K, Castranova V, Fitzpatrick J, Ausman K, et al. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Part Fibre Toxicol.* 2005;2:8.
 - Oberdorster G, Oberdorster E, Oberdorster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect.* 2005;113:823-39.
 - OECD. List of manufactured nanomaterials and list of endpoints for phase one of the OECD testing programme ENV/JM/MONO. 2008;13. 2
 - Jun 2008. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Environment Directorate Joint Meeting of the Chemicals

- Committee and the Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology. Series on the safety of manufactured nanomaterials Number 6.
- Okassa LN, Marchais H, Douziech-Eyrolles L, Herve K, Cohen-Jonathan S, Munnier E, et al. Optimization of iron oxide nanoparticles encapsulation within poly(d,l-lactide-co-glycolide) sub-micron particles. *Eur J Pharm Biopharm.* 2007;67:31-8.
 - Ostiguy C., Lapointe G., Menard L., Cloutier Y., Trottier M., Boutin M., Antoun M., Normand C. Les nanoparticules: Etat des connaissances sur les risques en santé et sécurité du travail, rapport IRSST soumis, IRSTT. Montreal, Canada. 2006.
 - Powers KW, Brown SC, Krishna VB, Wasdo SC, Moudgil BM, Roberts SM.. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part VI. Characterization of nanoscale particles for toxicological evaluation. *Toxicol Sci.* 2006;90:296-303.
- Powers KW, Brown SC, Krishna VB, Wasdo SC, Moudgil BM, Robert SM. Research Strategies for safety evaluation of nanomaterials, Part IV: characterization of Nanoscale Particles for toxicological Evaluation. *Toxicol Sci.* 2006; 90(29): 296-303.
- Preining O. The physical nature of very, very small particles and its impact on their behaviour. *Journal of Aerosol Science* 1998; 29: 481-95.
 - Roco MC. Nanoscale Science and Engineering: Unifying and Transforming Tools. *American Institute of Chemical Engineers Journal* 2004; 50(5): 890-7.
 - Roco MC. Societal implications of nanoscience and nanotechnology: Maximizing human benefit. *Journal of Nanoparticle Research* 2005; 7: 1-13.
 - Royal Society. Nanoscience and nanotechnologies. The Royal Society and Royal Academy of Engineering Nanotechnology, UK. July 2004.
 - Ryman-Rasmussen JP, Riviere JE, Monteiro-Riviere NA. Surface coatings determine cytotoxicity and irritation potential of quantum dot nanoparticles in epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2007;127:143-53.
 - Schulte PA, Schubauer-Berigan MK, Mayweather C, Geraci CL, Zumwalde R, McKernan JL. Issues in the development of epidemiologic studies of workers exposed to engineered nanoparticles. *J Occup Environ Med.* 2009;51: 323-35.
 - Taniguchi M. On the basic concept of nanotechnology. In *Proceedings of the International Congress on Prod Eng.* Tokyo, Japan: JSPE. 1974.
 - Thomas K and Sayre P. Research Strategies for Safety Evaluation of Nanomaterials, Part I: Evaluating the Human Health Implications of Exposure to Nanoscale Materials. *Toxicol Sci.* 2005;87(2):316-21.
 - Tiede K, Boxall ABA, Tear SP, Lewis J, David H, Hasselov M. Detection and characterization of engineered nanoparticles in food and the environment. *Food Add Contam.* 2008;25:795-821.
 - Tsuji JS, Maynard AD, Howard PC, James JT, Lam CW, Warheit DB, et al. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part IV: risk assessment of nanoparticles. *Toxicol Sci.* 2006;89:42-50.
 - Warheit DB. How meaningful are the results of nanotoxicity studies in the absence of adequate material characterization? *Toxicol Sci.* 2008;101:183-5.
 - Warheit DB, Sayes CM, Reed KL, Swain KA. Health effects related to nanoparticle exposures: environmental, health and safety considerations for assessing hazards and risks. *Pharmacol Ther.* 2008;120:35-42.
 - Xia T, Li N, Nel AE. Potential health impact of nanoparticles. *Annu Rev Public Health.* 2009;30:137-50.
 - Yang W, Peters JI, Williams III RO. Inhaled nanoparticles - A current review. *Int J Pharm.* 2008;356:239-47.

capitolo 2

Prospettive nei settori produttivi in Italia

Luigi Monica (coordinatore), *INAIL, Dipartimento di Tecnologie di Sicurezza - ex ISPESL*
Fabio Boccuni, *INAIL, Dipartimento di Medicina del Lavoro - ex ISPESL*
Andrea Porcari, *AIRI-Nanotec IT*

2.1 Settori di produzione, utilizzo e sviluppo delle nanotecnologie

È opinione pressoché unanime che le nanotecnologie saranno tra i promotori principali dello sviluppo tecnologico di questo inizio del XXI secolo. “Nanotecnologie” è, infatti, un termine collettivo per indicare l’insieme delle tecniche e dei processi basati sulle conoscenze derivanti dalla scienza dei materiali, dalla fisica quantistica, dalla chimica supra-molecolare, dalla biologia molecolare, che consentono di osservare, misurare e manipolare la materia su scala atomica e molecolare (il mondo delle nanotecnologie è quello compreso nell’intervallo 1-100 nanometri). Per la prima volta, sfruttando le proprietà e i comportamenti spesso specifici della materia alla scala nanometrica, si è in grado di manipolarla per ottenere materiali e dispositivi con caratteristiche grandemente migliorate o del tutto nuove.

Le nanotecnologie costituiscono un nuovo modo di produrre e, in conseguenza del loro carattere abilitante, sono ritenute in grado di innescare una vera e propria rivoluzione tecnologica, capace di influenzare quasi tutti i più importanti settori produttivi e la stessa vita quotidiana.

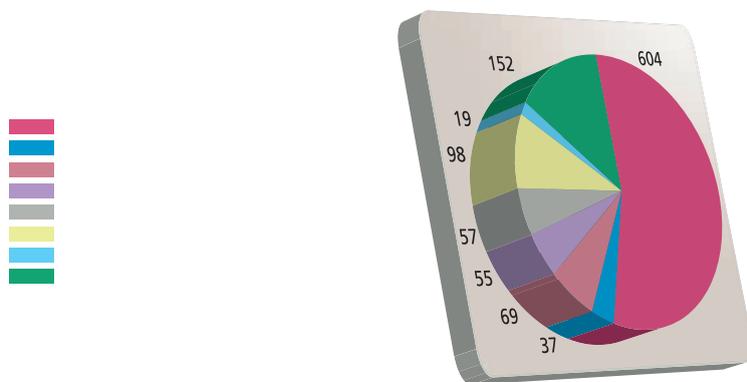
L’attenzione per queste tecnologie emergenti a livello mondiale è cresciuta in maniera quasi esponenziale negli ultimi 8-9 anni ed ha coinvolto tutti i Paesi più importanti. In origine, i finanziamenti pubblici, hanno rappresentato il propellente principale di questa attività, ma negli ultimi anni è cresciuto progressivamente, soprattutto negli Stati Uniti e nell’Est asiatico, anche l’impegno dei privati. Si stima che attualmente, nel mondo, la spesa per ricerca e sviluppo nelle nanotecnologie ammonti complessivamente a più di 13 miliardi di dollari, suddivisi all’incirca in parti uguali, tra settore pubblico e privato (Lux Research, 2008).

Si stima siano più di 2.000 le imprese che nel mondo sono impegnate in questo settore,

la gran parte (circa il 70%) sono PMI, ma anche molti grandi nomi dell'industria mondiale dedicano risorse crescenti alle nanotecnologie, convinti della loro importanza strategica per accrescere e/o difendere il proprio posizionamento tecnologico e competitivo.

2.1.1. Il mercato delle nanotecnologie

Alcuni prodotti derivanti dalle nanotecnologie (i cosiddetti "nano-related products") sono già in commercio ed una recente indagine negli Stati Uniti ne ha individuati circa 1.000 (Figura 2.1).



Aree di utilizzo	Esempi
Salute e Benessere fisico	Cosmetici, abbigliamento, sport, cura della persona, creme solari, ecc.
Elettrodomestici	Batterie, condizionatori, frigoriferi, lavatrici, purificatori, ecc.
Automobile	Accessori e finiture, sigillanti, lucidatori per macchine, catalizzatori, pneumatici, ecc.
Varie	Rivestimenti e trattamenti superficiali
Elettronica e Informatica	Processori, hard-disk, cuffie, chips, display, pulitori antibatterici per pc, carta, fotografia, ecc.
Cibo e Bevande	Attrezzi da cucina, contenitori per il cibo, integratori di minerali e vitamine, rigeneratori dell'olio per frittura, ecc.
Prodotti per bambini	Peluche e biberon antibatterici, giocattoli, ecc.
Casa e Giardino	Materiali da costruzione e rivestimento, prodotti per la casa, purificatori, prodotti antibatterici per animali domestici, pittura anti-graffio, ecc.

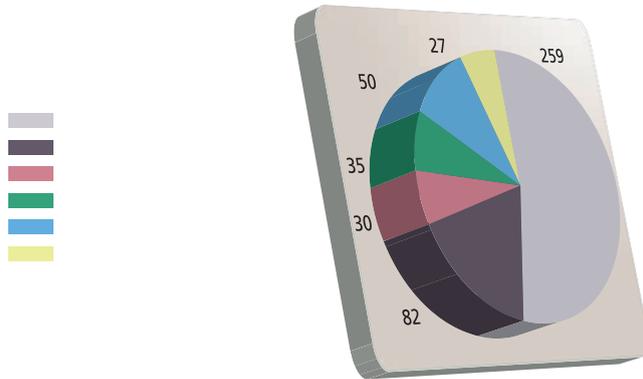


Figura 2.1 – I prodotti di consumo derivati dalle nanotecnologie nel mondo: a) per aree di utilizzo; b) per materiale.

Il mercato dei prodotti nei quali sono incorporate nanotecnologie è stato stimato in circa 147 miliardi di dollari nel 2007 e circa 310 miliardi nel 2008, ma l'analisi della *Lux Research* del 2008 prevede che questo mercato possa crescere fino a circa 3000 miliardi dopo il 2015! (Figura 2.2)

Si ritiene che i settori candidati a trarre maggior vantaggio dall'uso e dalla diffusione delle nanotecnologie siano i seguenti:

- nanoelettronica/fotonica;
- materiali (funzionali e strutturali) con una molteplicità di applicazioni che possono spaziare dai trattamenti superficiali, all'utensileria, al tessile e abbigliamento, alle costruzioni, ecc.;
- cura della salute (nanobiotecnologie, nanomedicina).

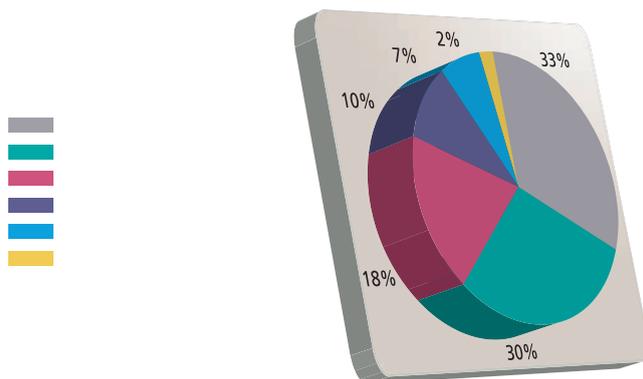


Figura 2.2 – Stima del mercato mondiale dei nanoproducti al 2015, valori riferiti ad un mercato totale stimato di circa 1000 miliardi di dollari nel 2015 – National Science Foundation, USA.

Tuttavia, anche altri settori fondamentali, quali ad esempio quelli dell'energia, dei trasporti o dell'ambiente, possono trovare nelle nanotecnologie soluzioni grandemente innovative ed efficaci in un'ottica di sviluppo responsabile.

2.1.2. Prospettive di sviluppo in Italia

Le nanotecnologie, come già largamente trattato, interessano in maniera trasversale un'ampia gamma di discipline scientifiche e di settori applicativi. Da ciò deriva la difficoltà di inquadrare tali tecnologie in settori definiti di produzione, utilizzo e sviluppo.

Un recente studio condotto dall'Associazione Italiana per la Ricerca Industriale (AIRI) ha dato vita alla 7° edizione del Rapporto "Tecnologie Prioritarie per l'Industria" e tale studio, pur non essendo esaustivo, dà un'indicazione sufficientemente ampia circa le esigenze di sviluppo in termini tecnologici della parte più innovativa del sistema industriale e dei servizi avanzati del Paese per sostenere le proprie istanze di sviluppo¹ (AIRI, 2009). Le Nanotecnologie sono presenti in 8 settori su 10 analizzati dallo studio² ed in tali ambiti, in un'ottica di sviluppo a breve-medio termine (normalmente 3 anni), un loro ruolo particolarmente importante viene identificato nei seguenti settori:

Microelettronica e semiconduttori

1. "Nano on Micro" (integrazione di nanomateriali su piattaforme microlavorate per sensori e biochip).
2. Tecnologie per componenti optoelettronici e fotonici (nanotecnologie per componenti ottici ad alta integrazione, per sensori di nuova generazione).

Chimica

1. Nanomateriali per catalisi di processi chimici (nanomateriali per catalizzatori in forma solida, per membrane catalitiche, per purificazione e stoccaggio di gas ad alta efficienza e sostenibilità).
2. Imballaggi per alimenti (nanomateriali per ottimizzare la *shelf-life* – data di scadenza – sensori per monitorare lo stato di conservazione del contenuto dell'imballaggio).
3. Formulati cementizi per l'edilizia (nuova possibile discontinuità tecnologica dovuta alle nanotecnologie attraverso il controllo della struttura della materia).

Farmaceutica e biotecnologie

1. Nanotecnologie applicate alla medicina (sistemi di somministrazione di farmaci,

¹ I circa 110 associati industriali di AIRI coprono più del 50% delle spese di R&S dell'intera industria nazionale.

² I 10 settori analizzati in "Tecnologie Prioritarie per l'Industria" sono: Informatica e Telecomunicazioni, Microelettronica e semiconduttori, Energia, Chimica, Farmaceutica & Biotecnologie, Ambiente, Trasporti, Aeronautica, Spazio, Beni strumentali e meccanica.

nanomateriali per dispositivi medici, biosensori, nanobisturi, nuovi sistemi di diagnostica per immagini *in vivo*).

2. Sistemi di trasporto (nanoparticelle fosfolipidiche contenenti molecole con azione farmacologica per la somministrazione mirata dei farmaci).

Energia

1. Tecnologie innovative per la valorizzazione dell'energia solare (fotovoltaico innovativo di terza generazione: nanocristalli semiconduttori; network nanometrico per celle solari organiche).
2. Tecnologie per lo stoccaggio dell'idrogeno (stoccaggio solido in leghe e composti intermetallici innovativi, ossidi nanostrutturati, ecc.).

Ambiente

1. Nuove tecnologie per il trattamento e il riutilizzo delle acque (sviluppo di nuovi materiali nanoporosi *zeolite-like*, ovvero con proprietà analoghe alla zeolite).
2. Sistemi di riduzione dell'inquinamento e controllo della qualità dell'aria (realizzazione di materiali sensibili nanostrutturati, sensori, catalizzatori).

2.2 Mappa delle industrie e dei laboratori di ricerca attivi

2.2.1 Le nanotecnologie in Italia

L'attività nelle nanotecnologie in Italia ha avuto negli ultimi anni un incremento costante e costituisce ormai una realtà di tutto rispetto. Il "2° Censimento delle Nanotecnologie in Italia", (AIRI, 2006) eseguito da AIRI/Nanotec IT nel 2006 (una nuova Terza edizione è in preparazione), ha messo in evidenza la presenza di circa 200 strutture impegnate in attività di Ricerca e Sviluppo (R&S) in questo campo. Circa il 57% di queste fa riferimento ad istituzioni pubbliche ed il restante 43% ad imprese private. Rispetto al primo Censimento del 2004 il numero di queste ultime è più che raddoppiato e sicuramente la terza edizione del Censimento registrerà un'ulteriore crescita. L'attività è distribuita su tutto il territorio nazionale ed in Figura 2.3 è riportato il numero delle strutture (pubbliche e private) che hanno risposto all'ultimo Censimento, presenti in ciascuna Regione. La concentrazione più elevata è nella parte centro-settentrionale del Paese, con la Lombardia, con più del 20% di strutture ed il 30% di addetti riportati dal Censimento, a guidare il lotto. Va tuttavia sottolineato che il Sud, ancorché con numeri più piccoli, non gioca un ruolo secondario, dato che le strutture presenti possono vantare un elevato livello di competenze e di apparecchiature e, in genere, buona massa critica.

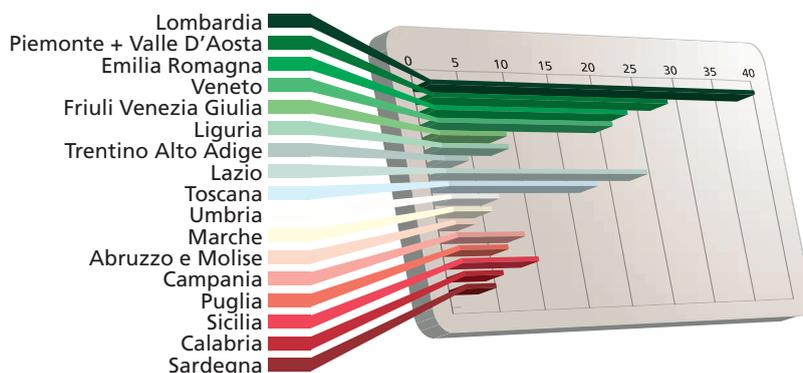


Figura 2.3 – Distribuzione geografica delle strutture di ricerca attive nelle nanotecnologie.

Numerose iniziative sono state intraprese negli ultimi anni con l'obiettivo di migliorare l'uso delle risorse, aumentare l'efficienza operativa complessiva e rafforzare l'impegno. Centri di eccellenza per le nanotecnologie (Tabella 2.1) sono stati creati presso varie Università con il supporto del Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca (MIUR) e alcune di esse hanno attivato corsi di laurea (di II livello), Master e Dottorati dedicati alle nanotecnologie. In alcune Università, le attività di ricerca, anche collocate in sedi diverse, sono state collegate indirizzandole verso obiettivi comuni.

Tabella 2.1. Centri di Eccellenza in Italia

- Center for Nanostructured Surfaces and Interfaces (NIS)- **Università di Torino**
- Laboratory of Electrochemical Miniaturised Technologies for Analysis and Research (LATEMAR)- **Politecnico di Torino**
- Center of Engineering of Nanostructured Materials and Surfaces (NEMAS)- **Politecnico di Milano**
- Interdisciplinary Centre for Materials and Nanostructured Interfaces (CIMAINA)- **Università di Milano**
- Center for Preparation, Development and Characterization of Nanostructured Materials and Surfaces (CENMAT)-**Università di Trieste**
- Center for Nanostructured Innovative Materials for Chemical, Physical and Biomedical Application (CEMIN)- **Università di Perugia**
- Center for the Preparation and Treatment of Organic Material at Nano-scale for Application in Photonics, Optoelectronics, Transformation and Separation (CEMIF.CAL)-**Università della Calabria**

Tra i Distretti Tecnologici creati in alcune Regioni con il supporto del MIUR, al fine di favorire lo sviluppo tecnologico in settori avanzati specifici, alcuni hanno le nanotecnologie tra gli obiettivi prioritari delle loro attività (Tabella 2.2). Veneto Nanotech, avviato nel 2005, si concentra esclusivamente sulle nanotecnologie. Nello stesso anno nel Distretto è stato attivato un laboratorio per la nanofabbricazione, NanoFab, e nel 2007 lo *European Centre for the Sustainable Impact of Nanotechnology* (ECSIN, Centro Europeo per l'Impatto Sostenibile delle Nanotecnologie).

Tab. 2.2 – Distretti Tecnologici impegnati nelle nanotecnologie

Regione	Area/e di ricerca	Coordinamento
Veneto	Nanotecnologie applicate ai materiali	Veneto Nanotech S.c.p.a
Friuli Venezia Giulia	Nano-Biotechnology	Centro per la Biomedicina Molecolare CBM S.c.r.l.
Campania	Materiali Polimerici e Compositi	IMAST S.c.a.r.l.
Puglia	Nanoscienze, Bioscienze, Infoscienze	DHitech S.c.a.r.l.
Umbria	Materiali speciali metallurgici, micro- e nanotecnologie, meccanica avanzata, mecatronica	DTU – Regione Umbria

Lo spettro delle attività di ricerca è molto ampio e le aree di studio non differiscono in maniera sostanziale quando si passa dalle imprese alle strutture di ricerca pubbliche. Particolare attenzione è riservata ai materiali (strutturali e funzionali), alla nanoelettronica e fotonica, alle bioscienze, all’ambito medicale ed alla strumentazione. Come indicato in precedenza, le potenziali ricadute applicative riguardano comparti produttivi fondamentali che vanno da quello della cura della salute, all’elettronica e ICT, dai trasporti, all’ambiente e l’energia, ma anche settori tradizionali, tipici del *made in Italy*, come il tessile e la moda, il calzaturiero, il packaging alimentare, i materiali da costruzione, la meccanica avanzata, i beni culturali.

Crescente, inoltre, è l’attenzione dedicata alle problematiche connesse con lo sviluppo responsabile delle nanotecnologie, fondamentali per il loro successo. Attualmente sono tre i Gruppi di Lavoro impegnati in tal senso: oltre al Gruppo di Lavoro ISPEL, di cui al presente Libro Bianco, il Gruppo di Lavoro UNI – Nanotecnologie, in sintonia con le attività di ISO TC 229 ed il Gruppo di Lavoro INAIL “Rischi emergenti nel campo delle nanotecnologie”.

2.2.2 I protagonisti

A) Le Istituzioni Pubbliche

Le nanotecnologie hanno ormai un posto di rilievo nell’agenda delle principali organizzazioni pubbliche di ricerca (CNR/INFN, INSTM, INFN, ENEA) e dell’Università. Queste ricoprono un ruolo chiave nello sviluppo e nella promozione delle nanotecnologie nel Paese e, come detto, rappresentano complessivamente circa il 57% delle strutture riportate dal Censimento.

Il *Consiglio Nazionale delle Ricerche* (CNR), in cui nel 2004 è confluito l’*Istituto Nazionale per la Fisica della Materia* (INFN), è la maggiore istituzione della ricerca pub-

blica italiana. Tale impegno si è sviluppato parallelamente a iniziative volte ad ottimizzare l'uso delle risorse e, dal 2006, la maggior parte delle iniziative del CNR in materia di nanotecnologie fa riferimento a due dipartimenti creati allo scopo: il *Dipartimento dei Materiali e dei Dispositivi* ed il *Dipartimento della Progettazione Molecolare*³.

Fra gli Istituti, afferenti ai due Dipartimenti e maggiormente impegnati nelle nanotecnologie, ci sono l'*Institute for the Study of Nanostructured Materials* (CNR-ISMN), con sedi a Roma, Bologna e Palermo, il *National Enterprise for nanoScience and nanoTechnology* (CNR-NEST) di Pisa, il *National Nanotechnology Lab* (CNR-NNL) di Lecce, il *NanoStructures and bioSystems at Surfaces* (CNR-S3) di Modena, e l'*Advanced Technology and Nanoscience National Laboratory* (CNR-TASC) con sede a Trieste.

Il *Consorzio Interuniversitario Nazionale per la Scienza e Tecnologia dei Materiali* (INSTM) coordina le Unità di Ricerca collocate in 44 Università italiane ed il suo interesse è rivolto principalmente alle scienze chimiche. Dal 2004, per rendere più efficace l'attività del Consorzio, sono stati creati quindici Centri di Riferimento (INSTM-RC) che collegano unità di ricerca collocate spesso in università differenti. Le nanotecnologie rappresentano l'obiettivo primario (qualche volta esclusivo) della maggior parte di questi centri⁴.

Oltre a quelle facenti riferimento a INSTM, il Censimento ha individuato all'incirca altre 40 strutture universitarie attive nelle nanotecnologie. Queste, come mostrato in Figura 2.4, rappresentano il 35% del totale, e la loro attività si riferisce alla fisica, alla scienza dei materiali, all'ingegneria, (in particolare all'ingegneria elettronica), alla biotecnologia/bioingegneria, alla chimica, alle scienze farmaceutiche e, in un numero limitato di casi, alla meccanica e all'ambiente.

³ sito web di riferimento: http://www.cnr.it/istituti/Perareetematiche_eng.html

⁴ sito web di riferimento: http://87.241.56.172/test_new_version/index.php?targetpage=include-ricerca-laboratori.php

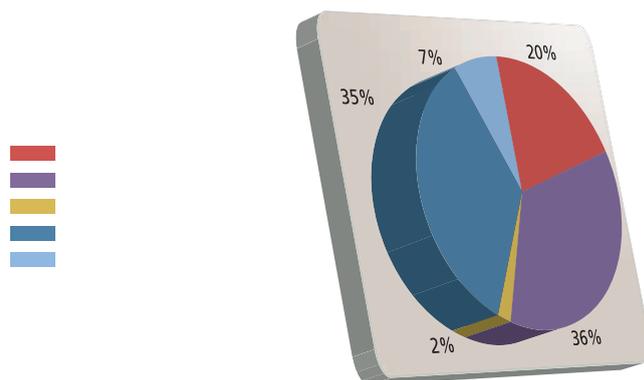


Figura 2.4 – Distribuzione (%) delle strutture tra le Istituzioni prese in considerazione.

Presso l'*Istituto Italiano di Tecnologie* (IIT) è attiva una *Nanobiotech facility* dedicata a sviluppare ricerche nell'ambito delle bio-nanotecnologie. L'Istituto è parte di una rete di centri di ricerca che coinvolge alcuni importanti laboratori nazionali sulle nanotecnologie, quali il CNR-NNL, il CNR-NEST, la *Scuola Superiore Sant'Anna* di Pisa e conduce, anche attraverso questa rete, ricerche in diversi ambiti applicativi delle nanotecnologie, tra i quali la nanomedicina, materiali intelligenti, immagazzinamento e produzione di energia.

Anche l'*Istituto Nazionale di Fisica Nucleare* (INFN) e l'*Ente per l'Energia l'Ambiente e le Nuove Tecnologie* (ENEA) sono impegnati in attività di R&S nelle nanotecnologie anche se il loro impegno è al momento meno intenso rispetto alle istituzioni citate in precedenza. All'ENEA l'attività in questo campo è condotta nell'ambito del Dipartimento Tecnologie Fisiche e Nuovi Materiali (FIM), mentre all'INFN essa è concentrata presso il Laboratori Nazionali di Frascati (LNF).

Riguardo ad aspetti trasversali relativi alle nanotecnologie, quali la metrologia e la caratterizzazione dei nanomateriali ed i potenziali rischi associati a questi, sono attivi l'*Istituto Superiore di Sanità* (ISS), l'*Istituto Nazionale di Ricerca Metrologica* (INRIM), ed i sopracitati ISPESL e INAIL.

B) L'Industria

Il numero di imprese italiane attive nelle nanotecnologie è cresciuto in maniera costante durante gli ultimi anni ed il 2° Censimento (AIRI, 2006) ha identificato 86 imprese attive in questo campo. Una forte crescita, rispetto al 2004, quando le imprese impegnate nelle nanotecnologie erano risultate essere soltanto 20.

Come mostrato in Figura 2.5, le Piccole e Medie Imprese (PMI), che sono responsabili della maggior parte dell'incremento registrato, rappresentano circa il 70% del totale.

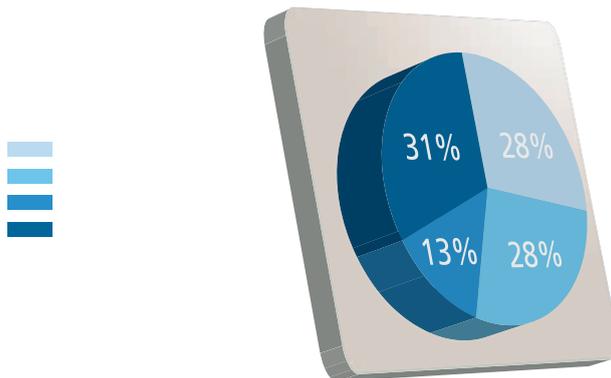


Figura 2.5 – Numero delle strutture (%) con riferimento alla dimensione delle Imprese.

Molte di esse sono di dimensioni micro (con meno di 10 addetti), spesso *spin off* o *start up* (più di un terzo delle PMI sono risultate ricadere in questa tipologia).

Quantitativamente, lo sforzo si concentra nelle strutture che fanno riferimento alle società più grandi. Queste comprendono grandi aziende nazionali come *ENI* (energia e catalizzatori); *Centro Ricerche Fiat-CRF*, *Brembo*, *Pirelli* (settore auto); *Bracco Imaging*, *Fidia Advanced Biopolymers* (biomedicina); *Colorobbia*, (materiali); *Centro Sviluppo Materiali-CSM* (materiali); *CTG* (Italcementi) e *Mapei*, (materiali per costruzioni); *Gruppo Finmeccanica*, che ha raggruppato le proprie attività nelle nanotecnologie nel *Nano-materials and Nanotechnology Focus Group*, che riunisce le sue società attive nel campo (tra cui in particolare *Alenia Aeronautica*, *MBDA*, *Thales Alenia Space*, *Elsag Datamat*, *Selex Sistemi Integrati*, *Selex Communications*); *Basell Poliolefine*, *Mascioni*, *Saati* (tessili); *Saes Getters* (tecnologie del vuoto); *STMicroelectronics*, *Numonyx* (semiconduttori).

Le PMI non svolgono tuttavia un ruolo marginale e sono importanti per diffondere le applicazioni di queste tecnologie emergenti. Per ricordarne solo alcune, possiamo citare: *Ape Research*, *Avago Technologies*, *Eontych*, *Organic Spintronics*, *Silicon Bio-*

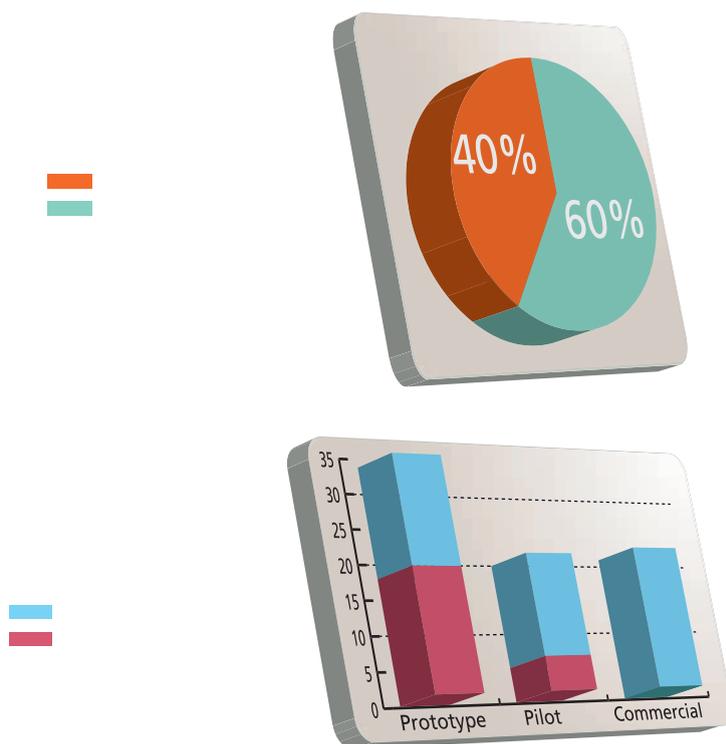


Figura 2.6 – a) Numero di strutture (%) per tipologia; b) Numero di strutture rispetto allo stadio della produzione.

systems, Microla, BilCare Technologies (strumentazione, sensori); *MBN, Xenia materials* (nanomateriali); *Grado Zero Espace, SmartTex, MecTex* (tessili); *Nanosurfaces, Kenosistec, Plasma Solutions* (trattamenti superficiali); *Finceramica, Tethis, Nanovector, Mavisud, Sinerga, Xeptagen* (*nanobiotech*, medicale), *Centro Ricerche Plast Ottica* (*lighting*), *Trustech* (*technology services*).

Le grandi imprese sono normalmente focalizzate sul proprio core business mentre le PMI tendono ad esplorare una più ampia varietà di potenziali applicazioni per ampliare la loro offerta sfruttando il carattere multisettoriale delle nanotecnologie. Il settore della strumentazione vede le PMI particolarmente attive, ma anche il medicale è un settore di notevole interesse per queste imprese, visto che circa il 25% delle PMI è impegnato proprio in questo campo.

2.2.3 Applicazioni e prodotti derivati dalle nanotecnologie

Tra le organizzazioni censite da AIRI, circa il 35% di esse dichiara di sviluppare prodotti nanotecnologici a livello di prototipo, pilota o commerciale. I grafici mostrano come ovviamente solo le strutture private vantino processi a livello commerciale, ma l'aspetto interessante è che alcune strutture pubbliche estendono il loro impegno verso lo sviluppo di prototipi.

2.3 Stime dei lavoratori potenzialmente esposti

Punto critico per qualsiasi processo di analisi del rischio (sia esso emergente o conosciuto) è l'individuazione del valore esposto a rischio; questo passo, nell'ambito della salute e sicurezza del lavoro, si traduce nella stima della popolazione lavorativa esposta. Trattandosi in questa sede di un rischio emergente, quale l'esposizione a nanomateriali deliberatamente prodotti o utilizzati, per il quale esiste una mancanza di informazioni ancora da colmare, tale esposizione non può che essere definita, in questa fase, "potenziale".

In ambito internazionale si segnala l'attività di reportistica presente in letteratura che ha prodotto alcune stime correlate con l'impatto economico della diffusione delle nanotecnologie nella produzione industriale; in questo senso un report di *Lux Research* ha stimato che dieci milioni di impiegati nel settore manifatturiero nel 2014 – l'11% del totale degli impiegati nel settore – saranno coinvolti nella fabbricazione di prodotti nanotecnologici (*Lux Research*, 2004); un altro studio del NIOSH ha previsto, in linea con la stima precedente, che entro il 2015 il mercato globale dei prodotti nanotecnologici impiegherà un milione di lavoratori negli Stati Uniti (NIOSH, 2007). Un approccio sistematico alla quantificazione dei lavoratori potenzialmente esposti

è stato fornito in un report pubblicato dall'*Health and Safety Executive* (HSE), che propone una metodologia per stimare i lavoratori esposti nel Regno Unito. Nel report si individuano tre gruppi di attività: ricerca e sviluppo delle nanotecnologie in università e aziende; processi esistenti di manifattura ultrafine; processi di manipolazione delle polveri. In aggiunta a queste tre categorie vengono considerati tutti quei processi in cui le nanoparticelle sono un derivato delle produzioni (ad es. saldatura e raffinazione). Con questo criterio vengono stimati circa 105.000 lavoratori potenzialmente esposti nelle prime tre categorie e circa 1.000.000 di lavoratori potenzialmente esposti nella quarta (HSE, 2004).

Sulla base di questo approccio, che divide in quattro categorie i settori lavorativi potenzialmente a rischio, si è tentato di quantificare l'impatto in termini di numero di lavoratori coinvolti nei settori produttivi interessati dalla diffusione delle nanotecnologie, in Italia. Si è stimato che il numero di lavoratori attualmente impiegati nelle categorie economiche potenzialmente coinvolte dallo sviluppo delle nanotecnologie superi le 900.000 unità. Questo risultato fornisce la dimensione dell'impatto potenziale del problema sulla popolazione lavorativa in Italia (Bocconi et al, 2008).

Per passare dalla stima dei lavoratori potenzialmente esposti al numero effettivo degli esposti è necessario analizzare caso per caso le tecnologie impiegate in un processo definito a rischio, identificare le singole fasi di lavoro in cui può verificarsi l'esposizione ed il numero di lavoratori in esse impiegati; quindi analizzare lo scenario in cui avviene l'esposizione, la frequenza, la durata e le caratteristiche dei nanomateriali presenti nell'ambiente di lavoro.

Il *Department of Energy* degli Stati Uniti ha definito "*lavoratore esposto alle nanoparticelle ingegnerizzate*" ogni lavoratore che si trovi in una o più delle seguenti condizioni:

- manipola particelle ingegnerizzate alla scala nanometrica che abbiano il potenziale di disperdersi in aria;
- trascorre quotidianamente (una quantità significativa di) tempo in un'area in cui nanoparticelle ingegnerizzate possono disperdersi potenzialmente in aria;
- lavora con attrezzature che possono essere contaminate o possono rilasciare nanoparticelle ingegnerizzate durante il funzionamento o la manutenzione.

Inoltre, visto lo stato attuale delle conoscenze sui livelli dose-risposta, il documento suggerisce di includere tutti i lavoratori coinvolti nella fabbricazione di prodotti nanotecnologici, a prescindere dal livello (alto o basso) di esposizione. Questa definizione dovrebbe fornire una prima identificazione del numero dei lavoratori esposti al rischio ed è suscettibile di essere ridefinita nel momento in cui nuove informazioni sugli effetti sulla salute si rendano disponibili (US Department of Energy, 2008).

Dall'applicazione di questa definizione in ciascuna realtà lavorativa, derivano le suc-

cessive fasi della valutazione del rischio e le scelte da effettuare nella gestione del rischio in ambiente di lavoro. Pertanto, si può concludere che, date le attuali conoscenze, la stima dei lavoratori esposti deve essere realizzata caso per caso, a seconda della specifica produzione considerata.

2.4 Conclusioni

Da quanto esposto in questo capitolo, risulta evidente come in Italia vi sia un'attività di R&S, nelle nanotecnologie, piuttosto intensa che coinvolge sia la ricerca pubblica che quella industriale. La ricerca pubblica è ancora prevalente, ma l'impegno delle imprese private è crescente e si riferisce ad importanti settori industriali e questo *trend* sembra continuare.

Le nanotecnologie, come detto sopra, possono essere uno strumento strategico di crescita del Paese sia per quanto riguarda i settori ad alto contenuto tecnologico, sia per quelli più tradizionali. Per sfruttare al massimo questa possibilità, tuttavia, sarebbe necessario che ciò avvenisse nell'ambito di una visione strategica nazionale, che porti a far emergere priorità e obiettivi, che consenta di evitare frammentazioni o ridondanze e faccia emergere le eccellenze, faciliti l'ottimizzazione dell'uso delle risorse. In tale ottica, si favorirebbe anche uno sviluppo "responsabile", esigenza, questa, ritenuta unanimemente essenziale affinché le grandi promesse di queste tecnologie si realizzino effettivamente con successo.

Bibliografia

- AIRI. Second Italian Nanotechnology Census, II Edizione. Associazione Italiana per la Ricerca Industriale (AIRI) – Centro Italiano per le Nanotecnologie, Roma. 2006.
- AIRI. Le innovazioni del prossimo futuro. Tecnologie prioritarie per l'industria. VII edizione. Associazione Italiana per la Ricerca Industriale (AIRI), Roma; 2009.
- Bocconi et al. Potential occupational exposure to manufactured nanoparticles in Italy. *Journal of Cleaner Production*, 2008; 16: 949-56.
- HSE. Nanoparticles: An occupational hygiene review. UK Health and Safety Executive, 2004.
- Lux Research . Sizing nanotechnology's value chain. Lux Research Inc., New York; 2004.
- Lux Research . Overhyped technology starts to reach potential: nanotech to impact \$3.1 trillion in manufactured goods in 2015. Lux Research Inc., New York; 2008.
- NIOSH. Progress toward safe nanotechnology in the workplace. US National Institute of Occupational Safety and Health, 2007.
- US Department of Energy. Approach to Nanomaterial ES&H. US Department of Energy, 2008.

capitolo 3

Mappatura e necessità della Ricerca

Pier Alberto Bertazzi (coordinatore), *Clinica del Lavoro “Luigi Devoto”, Università degli Studi di Milano*

Enrico Bergamaschi, *Università degli Studi di Parma*

Fabio Boccuni, *INAIL, Dipartimento di Medicina del Lavoro - ex ISPESL*

Domenico Cavallo, *Clinica del Lavoro “Luigi Devoto”, Università degli Studi di Milano*

Sergio Iavicoli, *INAIL, Dipartimento di Medicina del Lavoro - ex ISPESL*

Marco Mirabile, *INAIL, Dipartimento di Medicina del Lavoro - ex ISPESL*

3.1 Andamento della Ricerca nell’ambito dei Programmi Quadro dell’Unione Europea

I Programmi Quadro di Ricerca e Sviluppo Tecnologico – conosciuti in inglese come *Framework Program* (FP) – costituiscono dal 1984 il principale strumento finanziario attraverso cui la Commissione Europea, organo esecutivo dell’Unione Europea, indirizza e sostiene la ricerca sull’innovazione tecnologica basata sulla collaborazione transnazionale. In questi 25 anni se ne sono succeduti sette: il FP7, l’ultimo in ordine di tempo, è stato avviato nel 2007 e si concluderà nel 2013 (EC, 2008a; EC, 2008b).

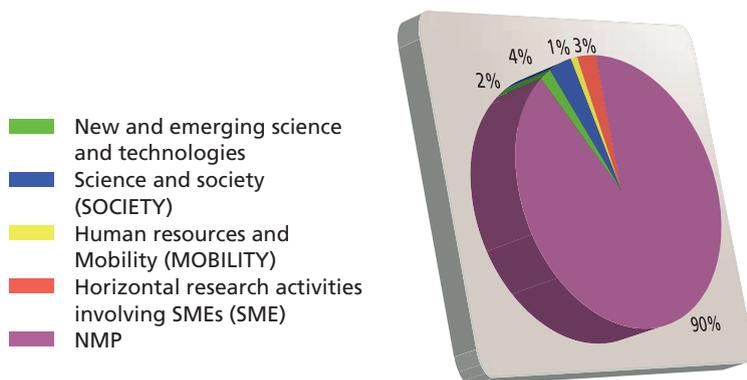
I primi progetti di ricerca sulle nanotecnologie risultano finanziati a partire dal FP3 (1991-1994), ma è solo con l’avvio del FP6 (2002-2006) che una priorità di ricerca viene espressamente dedicata a questo tema (*“Nanosciences, nanotechnologies, materials & new production technologies”* – NMP). A questa crescente attenzione per le nanotecnologie è corrisposto, non solo un aumento delle risorse dedicate, ma anche un ampliamento dell’ambito delle tematiche di ricerca. Si è gradualmente passati da una ricerca prettamente incentrata sullo sviluppo tecnologico ad una ricerca sempre più aperta allo sviluppo responsabile e sostenibile, che tenga conto dell’impatto ambientale, socio-economico, sanitario e di salute e sicurezza delle nanotecnologie – meglio definiti *“Environmental, Health and Safety (EHS) issues”* dalla *National Nanotechnology Initiative* del governo degli Stati Uniti (NNI, 2008). Tali progetti hanno evidente rilevanza per la ricerca in ambito di Salute e Sicurezza dei Lavoratori (SSL).

Si evidenzia inoltre un progresso per quanto riguarda il tipo di approccio ai progetti di ricerca: mentre i progetti del FP5 erano incentrati su ricerca cosiddetta *scattered*, riguardante le questioni iniziali legate al rischio emergente, già nel FP6 i progetti si sono concentrati principalmente sugli aspetti tossicologici e di *capacity building*; i progetti avviati

nell'ambito del FP7 si focalizzano sullo sviluppo di una massa critica e le possibili risposte alle domande chiave che emergono nello sviluppo dell'analisi del rischio. Tali questioni riguardano tossicità ed effetti sulla salute, metodi di misura e monitoraggio ambientale, sviluppo di modelli applicabili in condizioni di esposizione reali, criteri per la sorveglianza sanitaria e implementazione della comunicazione del rischio (Iavicoli et al, 2009).

La Tabella 3.1.1 riassume i progetti di ricerca finanziati che riguardano gli impatti EHS delle nanotecnologie (tre nel FP5, 15 nel FP6 e già 10 nei primi due anni di operatività del FP7). Complessivamente nel FP6 sono stati stanziati per la priorità "Nanosciences and nanotechnologies, Materials and new Production technologies" (NMP) circa 1.500 milioni di euro da ripartire in cinque anni, di cui circa 28 milioni di euro sono stati impiegati per finanziare 11 progetti di ricerca sugli impatti EHS (pari al 2% del budget complessivo stanziato). A questi vanno aggiunti gli oltre 3 milioni di euro impiegati sotto altre priorità – New and Emerging Science and Technology (NEST), Society (SOCIETY), Mobility (MOBILITY) e Small and Medium Enterprises (SME) – per finanziare altri 4 progetti di ricerca sempre sugli impatti delle nanotecnologie. In aggiunta a questo conto bisogna, infine, considerare le risorse (di cui non si conosce l'importo preciso) destinate nell'ambito del progetto CANaPE (progetto finanziato complessivamente per 6,4 milioni di euro) al Work Package sullo studio degli impatti. Nel Settimo Programma Quadro il budget assegnato alla priorità NMP arriva a toccare i 3.500 milioni di euro da ripartire in sette anni. Di questi, circa 17 milioni di euro sono stati impiegati fino ad ora per finanziare 7 progetti di ricerca sugli impatti EHS (un impegno che ad ora corrisponde allo 0,4% del budget complessivamente stanziato). Anche nel caso del FP7 vanno aggiunti gli importi finanziati sotto altre priorità. Nello specifico sono stati, ad oggi, impiegati all'incirca 4 milioni di euro per finanziare, nell'ambito delle priorità SIS (Science in Society) e HEALTH, tre ulteriori progetti (vedi Figura 3.1.1).

Figura 3.1.1 – Percentuale dei finanziamenti per i progetti sugli impatti EHS delle nanotecnologie rispetto alle misure del FP6 e FP7 a cui fanno riferimento.



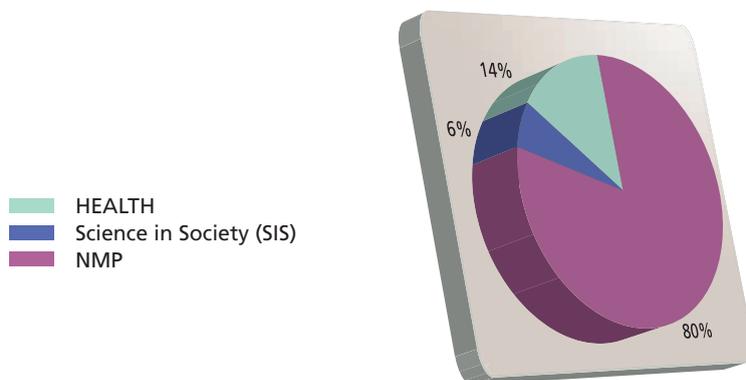


Tabella 3.1.1 – Progetti relativi agli impatti sulla salute delle nanotecnologie nell'ambito dei FP5, FP6 e FP7

FP5 - PROGETTI RELATIVI A IMPATTI DELLE NANOTECNOLOGIE SU EHS		
Progetto	Finanziamento	Costo totale del progetto
NANO-PATHOLOGY	999.937	1.166.049
NANODERM	1.097.994	1.396.888
NANOSAFE	322.787	330.556
TOTALE	2.420.718	2.893.493
FP6 - PROGETTI RELATIVI A IMPATTI DELLE NANOTECNOLOGIE SU EHS		
Progetto	Finanziamento	Costo totale del progetto
CELLNANOTOX	2.600.000	3.651.500
DIPNA	2.793.235	4.535.199
IMPART	699.913	699.913
NANOINTERACT	3.300.000	4.616.544
NANOSH	2.400.000	4.000.000
PARTICLE-RISK	799.576	1.120.000
NANOSAFE	6.999.837	12.400.000
NANOTRANSPORT	450.000	450.000
NANOCAP	1.310.000	1.310.000
SAPHIR	8.100.000	15.800.000
NANOTOX	399.894	408.544
NANOTOX 2	180.134	180.134
NANO DIALOGUE	850.000	850.000
EURONANOFORUM2005	300.000	926.997
NANOAIR	1.073.792	1.414.893
TOTALE	32.256.381	52.363.724

Tabella 3.1.1 – Progetti relativi agli impatti sulla salute delle nanotecnologie nell’ambito dei FP5, FP6 e FP7

FP7 - PROGETTI RELATIVI A IMPATTI DELLE NANOTECNOLOGIE SU EHS		
Progetto	Finanziamento	Costo totale del progetto
NANOIMPACTNET	2.000.000	3.190.000
NANOMMUNE	3.360.000	4.310.000
NANOPLAT	599.855	792.810
ENRHES	199.938	279.659
NHECD	1.450.000	1.620.000
NANORETOX	3.190.000	5.190.000
FRAMINGNANO*	675.044	742.934
OBSERVATORYNANO*	4.000.000	5.140.000
NANOTEST	2.990.000	3.940.000
NEURONANO	2.498.000	4.783.539
TOTALE	20.964.837	29.985.403

*contengono work packages dedicati agli impatti su EHS.

3.1.1 Analisi della partecipazione italiana ai progetti di ricerca relativi agli impatti EHS delle nanotecnologie, finanziati nell’ambito dei FP della Commissione Europea.

Come evidenziato nel paragrafo precedente, i primi progetti di ricerca relativi all’impatto EHS delle nanotecnologie risultano finanziati con il FP5 (1998–2002). Si tratta di tre progetti, tra i quali uno, NANO-PATHOLOGY (vedi scheda in Allegato), vede la partecipazione di due partner italiani, uno dei quali ne è anche coordinatore. Il progetto raccoglie circa il 40% sia dei finanziamenti assegnati dal FP5 per i progetti di ricerca sugli impatti delle nanotecnologie, sia del budget complessivo di questi progetti (cofinanziamento UE più risorse partner).

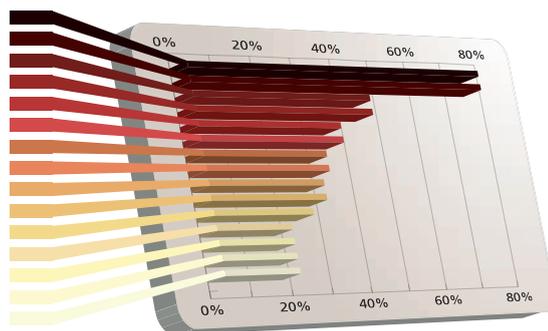
Nel FP6, su quindici progetti di ricerca relativi all’impatto delle nanotecnologie su salute e sicurezza, sette vedono la partecipazione di partner italiani. Da questo conto resta escluso il progetto CANaPE che, fra l’altro, ha visto il coinvolgimento di un partner italiano, ma è stato un progetto principalmente di sviluppo tecnologico, anche se prevedeva attività marginali di studio degli impatti EHS. I progetti che hanno coinvolto partner italiani sono CELLNANOTOX, DIPNA, PARTICLE-RISK, NANOCAP, SAPHIR, NANOTOX e NANO DIALOGUE (vedi schede in Allegato). Nei progetti di ricerca del FP6 inerenti agli impatti delle nanotecnologie, l’Italia risulta essere il quarto paese più rappresentato, con 13 partenariati. Come evidenziato già in precedenza l’Italia è presente in sette progetti su quindici; due progetti sono coordinati da istituzioni italiane.

I progetti partecipati da partner italiani raccolgono circa il 48% sia dei finanziamenti assegnati dal FP6 per i progetti di ricerca sugli impatti delle nanotecnologie, sia del budget complessivo di questi progetti (cofinanziamento UE più risorse partner).

Nel FP7 sui dieci progetti di ricerca relativi all'impatto delle nanotecnologie su salute e sicurezza, avviati nei primi due anni di operatività al settembre 2009, quattro vedono la partecipazione di partner italiani. I progetti che hanno coinvolto partner italiani sono: NANORETOX, FRAMINGNANO, OBSERVATORYNANO, NANOTEST (vedi schede in appendice al capitolo). Nei dieci progetti di ricerca finanziati del FP7 inerenti agli impatti EHS, si contano quattro partner provenienti dall'Italia (costituiti da tre organizzazioni differenti poiché in due casi troviamo lo stesso partner). Inoltre, l'Italia è rappresentata nel 40% dei progetti finanziati. Uno dei dieci progetti è coordinato da un partner italiano. È interessante osservare come i progetti partecipati da partner italiani raccolgano oltre il 50% dei finanziamenti assegnati dal FP7 per i progetti di ricerca sugli impatti delle nanotecnologie.

Complessivamente, su 28 progetti finanziati nel corso degli ultimi tre programmi quadro (1998 – 2009), 12 vedono la partecipazione di partner italiani. La Figura 3.1.2 riassume il quadro della presenza dei diversi Paesi all'interno dei progetti sugli impatti EHS delle nanotecnologie, in termini di percentuale sul totale dei progetti finanziati, e mostra il trend della presenza italiana negli ultimi tre FP.

I partenariati italiani sono complessivamente 19, ad opera di 16 organizzazioni diverse (dato che alcune di esse partecipano a più progetti). Si tratta per il 43% di



**% di progetti su impatto nanotecnologie
con partner italiani
negli ultimi tre Programmi Quadro**

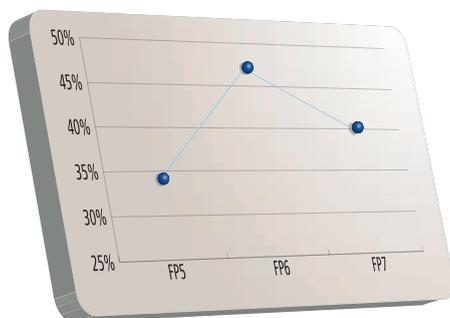


Figura 3.1.2 – Percentuale dei progetti sugli impatti EHS delle nanotecnologie negli ultimi tre FP

Enti Pubblici di Ricerca (sono comprese in questa categoria anche le Università), per il 38% di società private e per il 19% di Organizzazioni Non Governative (ONG) (Figura 3.1.3).

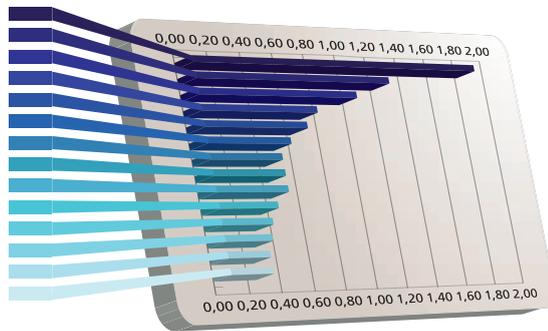
Al fine di avere un'informazione aggiuntiva sulla dimensione complessiva e sull'andamento dell'impegno italiano all'interno dei progetti di ricerca negli ultimi tre FP, è stato elaborato un *indice di presenza*, pari al numero di partenariati sul numero



Figura 3.1.3 – Partner italiani nei progetti per tipologia negli ultimi tre FP.

complessivo di progetti finanziati negli ultimi tre programmi quadro sugli impatti EHS delle nanotecnologie (Figura 3.1.4).

Se si prendono in considerazione tutti e tre i FP (5, 6 e 7), i progetti coordinati da organizzazioni italiane sono quattro. La figura 3.1.5 mostra come l'Italia sia seconda solo alla Gran Bretagna nel numero di progetti coordinati.



Indice di presenza partner italiani nei progetti per Programma Quadro

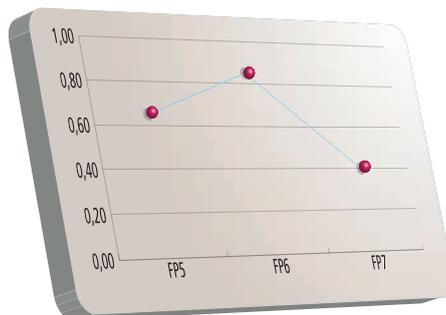


Figura 3.1.4 – Indice di presenza

Progetti coordinati dai diversi paesi

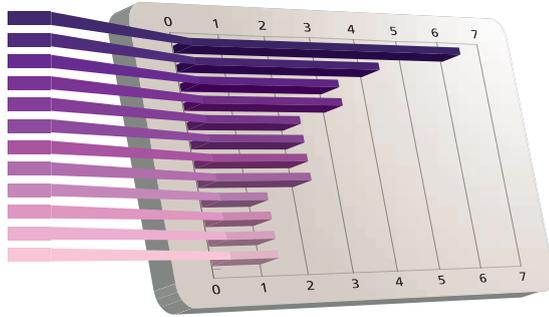


Figura 3.1.5 – Progetti coordinati.

Per quanto riguarda il piano finanziario, negli ultimi tre FP oltre il 50% dei finanziamenti è assegnato a progetti che vedono la partecipazione di almeno un partner italiano (Figura 3.1.6).

In relazione ai contenuti dei progetti riguardanti l’impatto delle nanotecnologie su salute e sicurezza che coinvolgono organizzazioni italiane, si possono individuare quattro categorie (Figura 3.1.7): ricerca di laboratorio finalizzata ad ampliare le conoscenze sulle interazioni tossicologiche tra nanoparticelle, ambiente ed esseri umani;



Figura 3.1.6 - Percentuale dei finanziamenti assegnati.

miglioramento delle procedure di sicurezza nelle produzioni basate sulle nanoparticelle; *governance* dello sviluppo delle nano-tecnologie e coinvolgimento degli *stakeholders* nell'analisi dei rischi per la sicurezza e la salute e nella definizione di un quadro di regole condivise; contributo all'analisi degli impatti in progetti di sviluppo tecnologico (vedi CANaPE).

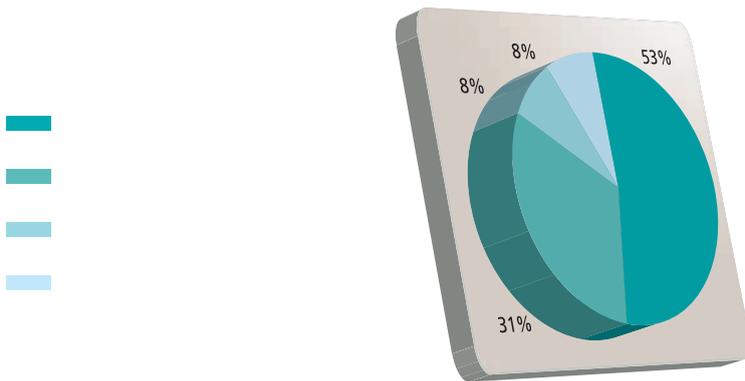


Figura 3.1.7 – Tipologia dei progetti sull'impatto delle nanotecnologie, finanziati dagli ultimi tre Programmi Quadro.

3.2 Iniziative in ambito nazionale

3.2.1 Regione Lombardia

1. Progetto "Nanoscienze per materiali e applicazioni biomediche"

La Regione Lombardia ha stipulato nel 2008, nell'ambito dell'Accordo Quadro con il Consiglio Nazionale delle Ricerche, una convenzione per la realizzazione del progetto triennale "Nanoscienze per materiali e applicazioni biomediche", dell'importo complessivo di 10 milioni di euro, con cofinanziamento regionale di 5 milioni di euro (di cui circa 2,5 destinati alla piattaforma 1 del progetto "Sistemi nanostrutturati per materiali e applicazioni biomediche" e i restanti 2,5 alla piattaforma 2 "Sviluppo di antibiotici").

2. Centro Europeo di nanomedicina

Nel luglio 2009 è stata inaugurata la Fondazione "Centro Europeo di Nanomedicina", promossa e fortemente voluta dal Presidente della Regione Lombardia, in collaborazione con 9 centri di ricerca pubblici e privati presenti sul territorio, e per la quale sono

previsti finanziamenti pari a 4,5 milioni di euro in tre anni (a partire dal 2009), nell'ambito del Programma Attuativo Regionale del Fondo Aree Sottoutilizzate (PAR-FAS). Lo scopo è realizzare un Centro di ricerca scientifica di eccellenza, di livello internazionale, in materia di nanomedicina, in grado di dare risposte concrete alle crescenti richieste di strumenti diagnostici e terapeutici efficaci, non invasivi e personalizzati, in particolare per la cura delle malattie tumorali, cardiovascolari e neurologiche. La nascita della Fondazione fa seguito ad un Protocollo d'intesa, sottoscritto il 21 marzo del 2007 dallo stesso Presidente della Regione, con i nove "soci fondatori":

1. Fondazione IFOM (Istituto FIRC di Oncologia Molecolare)
2. Fondazione IRCCS "Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico"
3. Istituto Europeo di Oncologia" (IEO)
4. Fondazione "Scuola Europea di Medicina Molecolare" (SEMM)
5. STMicroelectronics S.r.l.
6. Genextra S.p.A.
7. Politecnico di Milano
8. Università degli Studi di Milano
9. Università degli Studi di Pavia

Inoltre, ha già chiesto formalmente di aderire alla Fondazione anche l'Istituto Neurologico Besta, mentre altri importanti centri, tra cui l'Istituto Nazionale Tumori di Milano e l'Istituto Italiano di Tecnologie di Genova, hanno già manifestato interesse in questa direzione. La Fondazione opererà attraverso i suoi organi (Comitato dei Garanti, Presidente e Giunta di Presidenza, Direttori scientifici e Comitato scientifico) realizzando, promuovendo e sostenendo attività di ricerca, attraverso la stipula di convenzioni con enti pubblici e privati o la partecipazione ad altre associazioni, fondazioni, enti e istituzioni con obiettivi simili. Inoltre, potrà promuovere e organizzare seminari, corsi di formazione, manifestazioni, convegni, incontri, oltre che gestire direttamente o indirettamente spazi e laboratori, istituire premi e borse di studio, ecc. Grazie alla complementarietà e alla condivisione di competenze tra i soggetti fondatori, il nuovo Centro promuoverà e svolgerà programmi interdisciplinari di ricerca scientifica con lo scopo di sviluppare tecnologie e approcci altamente innovativi nell'ambito della nanomedicina. L'obiettivo finale atteso è ottenere un impatto positivo sulla salute delle persone e in generale sulla qualità della vita, facendo emergere ulteriormente le potenzialità del sistema sanitario lombardo, già fortemente orientato alla ricerca, all'innovazione e alle nuove tecnologie.

Con la nascita del Centro Europeo di Nanomedicina potranno, quindi, essere sviluppate soluzioni avanzate per la diagnostica precoce e lo screening di massa per patologie tumorali e cardiovascolari, basate su analisi proteomiche, genomiche e metaboliche e per il rilascio controllato spaziale e temporale di terapie personalizzate.

3.2.2 Regione Piemonte

1. Progetto: "NANOPARTICLES: FROM THEIR IMPACT ON THE ENVIRONMENT AND HUMAN HEALTH TO SAFER PRODUCTION AND USAGE - NANOSAFE"

Ente Coordinatore: Centro "G. Scansetti" (Interdepartmental Centre for Studies on Asbestos and other Toxic Particulates), Università degli Studi di Torino.

Partner: Progetto in collaborazione con il NIS - Centro Interdipartimentale di Eccellenza per le Superfici ed Interfacce Nanostrutturate; Politecnico di Torino, Università del Piemonte Orientale; PMI varie.

Ente Finanziatore: Bando regionale per la ricerca industriale e lo sviluppo precompetitivo (CIPE-2006)

Finanziamento: 1.000.000 Euro

Data inizio: 2007

Data fine: 2010

Obiettivi: Il progetto riguarda i possibili effetti nocivi indotti da alcune nanoparticelle di impiego industriale e prodotte da impianti di incenerimento rifiuti. Lo scopo è quello di fornire indicazioni per un utilizzo sicuro dei nanomateriali e per la gestione delle particelle emesse da inceneritori. In questo progetto verranno studiati vari nanomateriali (nanotubi di carbonio, compositi, NP di TiO_2 per la cosmesi, SiO_2 e Fe_2O_3) di vari tagli dimensionali, sintetizzati dai proponenti. Dopo adeguata caratterizzazione, i nanomateriali saranno utilizzati per i saggi finalizzati a definire risposte biologiche, quali infiammazione e genotossicità, su colture *in vitro*. In base ai risultati *in vitro*, verranno selezionati alcuni nanomateriali da sottoporre a valutazione *in vivo* su roditori; il TiO_2 verrà testato su cute di maiale o umana ricostituita. Le informazioni ottenute sulla tossicità e sul comportamento biologico serviranno a migliorare la gestione dei nanomateriali nelle fasi di produzione ed utilizzazione. Inoltre, serviranno come base di partenza per lo sviluppo di una batteria di test di screening per testare la tossicità dei nuovi materiali.

Riferimenti:

- Carlotti ME, Ugazio E, Gastaldi L, Sapino S, Vione D, Fenoglio I, Fubini B. Specific effects of single antioxidants in the lipid peroxidation caused by nano-titania used in sunscreen lotions. *J Photochem Photobiol B*. 2009;96(2):130-5. Epub 2009 May 19.
- Fenoglio I, Greco G, Livraghi S, Fubini B. Non-UV-induced radical reactions at the surface of TiO_2 nanoparticles that may trigger toxic responses. *Chemistry*. 2009;15(18):4614-21.
- Carlotti ME, Ugazio E, Sapino S, Fenoglio I, Greco G, Fubini B. Role of particle coating in controlling skin damage photoinduced by titania nanoparticles. *Free Radic Res*. 2009;43(3):312-22. Epub 2009 Feb 5.

2. Progetto per la ricerca sanitaria finalizzata finanziato dalla Regione Piemonte: Danno citotossico e genotossico indotto da nanoparticelle e micro particelle di silice: basi molecolari e strategie di prevenzione ed inattivazione (2006-2008)

3. Regione Piemonte - Bando ricerca scientifica Piemonte 2004. Settore: Nanotecnologie e nanoscienze, "Materiali nanostrutturati biocompatibili per applicazioni biomediche".

3.2.3 Regione Veneto

1. EuroNanoMed

- **Titolo esteso:** EUROpean network of trans-national collaborative RTD projects in the field of NANOMEDicine
- **Coordinatore:** Atomic Energy Commission (CEA)/COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE CEA. FRANCE - Dr. Pierre-Noël LIRSAC
- **Altri Partner:**
 - Service public de Wallonie / Direction générale opérationnelle Economie, Emploi et Recherche (SPW) - Belgio
 - Agence nationale de la Recherche (ANR) - Belgio
 - Federal Ministry of Education and Research (BMBF) - Germania
 - VDI Technologiezentrum GmbH (VDI) - Germania
 - National Office for research and technology (NKTH) - Ungheria
 - The Icelandic Centre for Research (RANNIS) - Islanda
 - Regione Veneto - Economic Development, Research and Innovation Department (VED) - Italia
 - **Veneto Nanotech S.C.p.A. (Veneto Agency) - Italia**
 - Ministry of Health, The Chief scientist office (CSO-MOH) - Israele
 - Latvian Academy of Sciences (LAS) - Lettonia
 - Science Council of Lithuania (LSC) -Lituania
 - National centre for research and development (NCBIR) - Polonia
 - National Science Foundation (FCT) - Portogallo
 - National Authority for Scientific research (ANCS) - Romania
 - National Center for Programme Management (CNMP) - Romania
 - Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) - Spagna
 - Industry, Trade and Tourism Department- Basque Government (ITT) - Spagna
 - INNOBASQUE Parque Tecnológico de Bizkaia (INNOBASQUE) - Spagna
 - Swedish Research Council (SRC) - Svezia
 - VINNOVA - Svezia
 - Swiss National Science Foundation (SNF) - Svizzera
 - SenterNovem - Olanda
 - The Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) - Turchia
- **Obiettivi:** Coordinamento di attività di ricerca transnazionali nel campo della Nanomedicina. Veneto Nanotech svolge la funzione di segretariato internazionale per la gestione delle domande di contributo ed è coinvolto in alcune

attività per la revisione dello stato dell'arte sulle questioni legate all'impatto della nanomedicina sulla salute.

- **Website:** <http://www.euronanomed.net/>

2. NanoSustain

- **Titolo esteso:** *Development of sustainable solutions for nanotechnology-based products based on hazard characterization and LCA*
- **Coordinatore:** NordMiljö AB – Svezia
- **Altri Partner:**
 - INSTITUTE OF NANOTECHNOLOGY – Regno Unito
 - DET NATIONALE FORSKNINGSCENTER FOR ARBEJDSMILJØ - Danimarca
 - VALTION TEKNILLINEN TUTKIMUSKESKUS - Finlandia
 - UNIVERSITÄT BREMEN - Germania
 - **VENETO NANOTECH SCPA - Italia**
 - COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES - DIRECTORATE GENERAL JOINT
 - RESEARCH CENTRE – JRC - Belgio
 - KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS - Lituania
 - NATIONAL INSTITUTE FOR RESEARCH AND DEVELOPMENT IN MICROTECHNOLOGIES - Romania
 - NANOLOGICA AB - Svezia
 - NANOGATE AG - Germania
 - UPM-KYMMENE OYJ - Finlandia
 - AMROY EUROPE LTD - Finlandia
- **Durata del progetto:** 36 mesi
- **Ente finanziatore:** Commissione Europea (FP 7 - NMP)
- **Ammontare totale del finanziamento:** € 2.497.100
- **Obiettivi:** Obiettivo principale del progetto è la messa a punto di una procedura di Life Cycle Assessment. Veneto Nanotech è coinvolta in tutte le attività del progetto, anche se l'impegno maggiore si ha negli studi di LCA e nella parte di coordinamento delle attività di valutazione e validazione.

3. Impatto di prodotti nanotecnologici innovativi su motori molecolari intracellulari e sulla permeabilità delle barriere biologiche

- **Coordinatore:** VENETO NANOTECH, Italia
- **Ente Finanziatore:** Regione Veneto (per tramite ECSIN – European Center for the Sustainable Impact of Nanotechnology).
- **Obiettivi:** Le attività sono state focalizzate nello studio dell'impatto dei prodotti nanotecnologici sui motori molecolari delle cellule e delle barriere biologiche mediante esperimenti che hanno coinvolto diverse facilities tra cui la risonanza magnetica, l'*optical imaging* e l'*imaging* in microscopia elettronica.

4. Valutazione di fenomeni di tossicità, delle alterazioni dell'espressione genica e dei relativi meccanismi d'azione di nanomateriali in sistemi cellulari eucariotici e procariotici

- **Coordinatore:** VENETO NANOTECH, Italia
- **Ente Finanziatore:** Regione Veneto (per tramite ECSIN – European Center for the Sustainable Impact of Nanotechnology)
- **Obiettivi:**
 - individuare e sviluppare alcune specifiche tecniche di caratterizzazione chimico-fisica di nanoparticelle commerciali e di sintesi;
 - individuare tecnologie adatte alla valutazione dell'impatto *in vitro* su cellule eucariotiche e procariotiche di nanoparticelle;
 - mettere a punto una serie di test parametrici per la valutazione finale dell'impatto delle nanoparticelle su cellule animali.

5. Determinazione di nanoparticelle ingegnerizzate in test tossicologici e valutazione della loro pericolosità ambientale

- **Coordinatore:** VENETO NANOTECH, Italia
- **Ente Finanziatore:** Regione Veneto (per tramite ECSIN – European Center for the Sustainable Impact of Nanotechnology).
- **Obiettivi:** Migliorare lo stato generale delle conoscenze sul comportamento ambientale ed eco-tossicologico di nanoparticelle e nanomateriali, nonché definire procedure e metodologie finalizzate alla valutazione dei possibili scenari di esposizione per l'uomo e per l'ambiente, tenendo conto delle peculiari caratteristiche di questi nuovi prodotti nelle diverse fasi del ciclo di vita, dalla produzione alla messa in discarica/riciclo.

6. Monitoraggio ambientale su produzioni nanotecnologiche

- **Coordinatore:** CIVEN
- **Data d'inizio:** 01/01/2007
- **Data di fine progetto:** 30/06/2009
- **Ente Finanziatore:** Regione Veneto
- **Ammontare totale del finanziamento:** € 340.000
- **Obiettivi:** Censire le possibili sorgenti di nanoparticelle ingegnerizzate nei luoghi di lavoro deputati o collegati alle nanotecnologie, nonché quantificarne e caratterizzarne le emissioni. Le attività sono state articolate in tre diverse linee di progetto, nello specifico: analisi dello stato dell'arte nel campo delle nanoparticelle e delle nanotecnologie; valutazione della presenza di nanoparticelle nell'ambiente; determinazione di composti organici ed elementi in tracce nel particolato fine, ultrafine e nanoparticelle.

3.2.4 Progetti in ambito Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca (MIUR)

1. Impatto dei nanotubi sulla salute umana

Ente Coordinatore: Università degli Studi di Roma "Tor Vergata" - Dipartimento di BIOPATOLOGIA E DIAGNOSTICA PER IMMAGINI (Prof. A. Bergamaschi)

Partner:

- Università degli Studi di ROMA "Tor Vergata" - Dip. Neuroscienze
- Università degli Studi di Camerino - Dip. Biologia Molecolare, Cellulare e Animale
- Università degli Studi della Tuscia - Dip. Agrobiologia e Agrochimica

Ente Finanziatore: MIUR Anno 2005 - prot. 2005062028

Finanziamento: € 102.000

Data inizio: 2005

Data fine: 2006

Obiettivi: Far luce sugli effetti che i nanotubi possono esercitare sul metabolismo/vitalità cellulare. Speciale attenzione è stata posta nel materiale (nanotubi di carbonio) da testare, data l'eterogeneità delle preparazioni, che possono condizionare risultati contraddittori in termini tossicologici. Il progetto ha, inoltre, esplorato le molte possibili funzionalizzazioni dei nanotubi per ottenere specifiche applicazioni, nonché le implicazioni tossicologiche di alcune di tali funzionalizzazioni. In particolare, è stato studiato quale trattamento chimico sia in grado di ridurre la citotossicità. Sono state analizzate le risposte di diverse linee cellulari in termini di induzione di apoptosi, influenza sul ciclo e la proliferazione cellulare, nonché modulazioni redox, possibili alterazioni genetiche, quali disturbo a livello di mitosi e danno al DNA.

Riferimenti:

- Ghibelli L, Magrini A, De Nicola M, Cerella C, D'Alessio M, Bergamaschi A. Lack of direct cytotoxic effect of intracellular nanotubes. *G Ital Med Lav Ergon.* 2005;27(3):383-4.
- Bottini M, Magrini A, Bottini M, Mustelin T, Bellucci S, Bergamaschi A. Citotossicità di nanotubi di carbonio a parete multipla ossidati. In *Atti del 68° Congresso Nazionale SIMLII Medicina del lavoro: tra acquisizioni e nuove frontiere.* 2005 Oct 5-8. Parma, Italia. MUP Editore, 2005. pp 355-7.
- Bottini M, Bruckner S, Nika K, Bottini N, Bellucci S, Magrini A, et al. Multi-walled carbon nanotubes induce T lymphocyte apoptosis. *Toxicol Lett.* 2006;160(2):121-6.
- Bottini M, Cerignoli F, Dawson MI, Magrini A., Rosato N, Mustelin T. Full-length single-walled carbon nanotubes decorated with streptavidin-conjugated quantum dots as multivalent intracellular fluorescent nanoprobe. *BIOMACROMOLECULES.* 2006;7(8):2259-63.
- Bottini M, Magrini A., Di Venere A, Bellucci S, Dawson MI, Rosato N, et al. Synthesis and characterization of supramolecular nanostructures of carbon nanotubes and ruthenium-complex Luminophores. *J Nanosci Nanotechnol.* 2006;5:1381-6.
- Bottini M, Magrini A., Rosato N, Bergamaschi A, Mustelin T. Dispersion of pristine single-

walled carbon nanotubes in water by a thiolated organosilane: application in supramolecular nanoassemblies. *J Phys Chem B*. 2006;110(28):13685-8.

- De Nicola M, Mirabile Gattia D, Bellucci S, De Bellis G, Micciulla F, Pastore R, et al. Effect of different carbon nanotubes on cell viability and proliferation. *J Phys Chem B*. 2007;19:1-7.
- Bottini M, Cerignoli F, Mills DM, D'Annibale F, Leone M, Rosato N, et al. Luminescent silica nanobeads: characterization and evaluation as efficient cytoplasmatic transporters for T-lymphocytes. *J Am Chem Soc*. 2007;129(25):7814-23.

2. Studio dei meccanismi molecolari alla base della risposta cellulare a polveri di silice cristallina ed amorfa, e ricerca di una correlazione tra citotossicità e stato della superficie delle particelle.

Ente Coordinatore: Università degli Studi di Torino (Prof. Dario Ghigo)

Partner:

- Dipartimento di Chimica IFM
- NIS Centre of Excellence and INSTM (Materials Science and Technology National Consortium)
- Università di Torino; Dipartimento per lo Studio del Territorio e delle sue Risorse, Genova.

Ente Finanziatore: MIUR (COFIN2004, prot. 2004054901_003)

Finanziamento: € 107.000

Data inizio: 2004

Data fine: 2005

Obiettivi: Il progetto di ricerca si propone di utilizzare polveri di silice cristallina ed amorfa, tal quali o modificate in condizioni sperimentali strettamente controllate, in modo che differiscano tra loro per poche specifiche caratteristiche di superficie, per consentire di correlare in maniera univoca gli effetti biologici di queste particelle a ben determinate proprietà chimico-fisiche. Ciò potrebbe, da un lato consentire di aumentare la conoscenza dei meccanismi patogenetici della silice, dall'altro individuare tecniche di inattivazione del potenziale patogeno delle polveri. Accanto alla preparazione di materiali a base silicea aventi proprietà superficiali ben definite, caratterizzati spettroscopicamente e mediante microcalorimetria, il progetto ha esaminato le interazioni dei materiali con cellule epiteliali e fibroblasti polmonari umani e con macrofagi alveolari murini, scelti in quanto rappresentano i principali bersagli *in vivo* dell'azione tossica, sia infiammatoria sia cancerogena, delle silici. In particolare è stato studiato l'effetto sul metabolismo ossidoriduttivo cellulare, sulla produzione di radicali liberi, sul danno ossidativo a carico di lipidi di membrana e del DNA, su apoptosi e proliferazione cellulare ed azione proinfiammatoria.

Riferimenti:

- Onida B, Borello L, Busco C, Ugliengo P, Goto Y, Inagaki S, et al. The surface of ordered mesoporous benzene-silica hybrid material: an infrared and ab initio molecular modeling study. *J Phys Chem B*. 2005;109(24):11961-6.
- Onida B, Camarota B, Ugliengo P, Goto Y, Inagaki S, Garrone E. Mesoporous benzene-silica

- hybrid materials with a different degree of order in the wall structure: an IR comparative study. *J Phys Chem B*. 2005;109(46):21732-6.
- Rimola A, Tosoni S, Sodupe M, Ugliengo P. Does silica surface catalyse peptide bond formation? New insights from first-principles calculations. *Chemphyschem*. 2006;7(1):157-63.
 - Bolis V, Busco C, Ugliengo P. Thermodynamic study of water adsorption in high-silica zeolites. *J Phys Chem B*. 2006;110(30):14849-59.
 - Rimola A, Sodupe M, Tosoni S, Civalleri B, Ugliengo P. Interaction of glycine with isolated hydroxyl groups at the silica surface: first principles B3LYP periodic simulation. *Langmuir*. 2006;22(15):6593-604.
 - Fenoglio I, Tomatis M, Lison D, Muller J, Fonseca A, Nagy JB, et al. Reactivity of carbon nanotubes: free radical generation or scavenging activity? *Free Radic Biol Med*. 2006;40(7):1227-33.
 - Elias Z, Poirot O, Fenoglio I, Ghiazza M, Danière MC, Terzetti F, et al. Surface reactivity, cytotoxic, and morphological transforming effects of diatomaceous Earth products in Syrian hamster embryo cells. *Toxicol Sci*. 2006;91(2):510-20.
 - Rimola A, Sodupe M, Ugliengo P. Aluminosilicate surfaces as promoters for peptide bond formation: an assessment of Bernal's hypothesis by ab initio methods. *J Am Chem Soc*. 2007;129(26):8333-44. Epub 2007 Jun 7.
 - Gazzano E, Turci F, Foresti E, Putzu MG, Aldieri E, Silvagno F, et al. Iron-loaded synthetic chrysotile: a new model solid for studying the role of iron in asbestos toxicity. *Chem Res Toxicol*. 2007;20(3):380-7.
 - Aina V, Perardi A, Bergandi L, Malavasi G, Menabue L, Morterra C, et al. Cytotoxicity of zinc-containing bioactive glasses in contact with human osteoblasts. *Chemical-Biological Interact*. 2007;167:207-18.
 - Singh S, Shi T, Duffin R, Albrecht C, Van Berlo D, Höhr D, et al. Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO₂: role of the specific surface area and of surface methylation of the particles. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007;222(2):141-51.
 - Riganti C, Orecchia S, Silvagno F, Pescarmona GP, Betta PG, Gazzano E, et al. Asbestos induces nitric oxide synthesis in mesothelioma cells via Rho signaling inhibition. *Am. J. Respir Cell Mol Biol*. 2007;36(6):746-56.
 - Riganti C, Doublier S, Aldieri E., Orecchia S, Betta PG, Gazzano E et al. Asbestos induces doxorubicin resistance in MM98 mesothelioma cells via HIF-1α. *Eur Resp J*. 2008;32:443-51.
 - Polimeni M, Gazzano E, Ghiazza M, Fenoglio I, Bosia A, Fubini B, et al. Quartz inhibits glucose 6-phosphate dehydrogenase in murine alveolar macrophages. *Chem Res Toxicol*. 2008;21(4):888-94.
 - Fenoglio I, Greco G, Tomatis M, Muller J, Raymundo-Piñero E, Béguin F, et al. Structural defects play a major role in the acute lung toxicity of multiwall carbon nanotubes: physicochemical aspects. *Chem Res Toxicol*. 2008;21(9):1690-7.
 - Muller J, Huaux F, Fonseca A, Nagy JB, Moreau N, Delos M, et al. Structural defects play a major role in the acute lung toxicity of multiwall carbon nanotubes: toxicological aspects. *Chem Res Toxicol*. 2008;21(9):1698-705

3. Interazione con i sistemi biologici di materiali nanoparticolati di nuova sintesi: modelli sperimentali per la stima del rischio per la salute umana.

Ente Coordinatore: Università degli Studi di Parma, Dip. CLINICA MEDICA, NEFROLOGIA E SCIENZE DELLA PREVENZIONE (Prof. Enrico Bergamaschi)

Partner:

- Università Cattolica del Sacro Cuore Ist. Medicina del lavoro (Prof. A. Bergamaschi)

- Università degli Studi "G. d'Annunzio" CHIETI-PESCARA- Dip. SCIENZE BIOMEDICHE (Prof. P. Boscolo)
- Università degli Studi di ROMA "Tor Vergata" - Dip. Biopatologia e Diagnostica per immagini (Prof. A. Magrini)
- Joint Research Centre- EuropeanCommission - Institute for Health and Consumer Protection ISPRA (VA)

Ente Finanziatore: MIUR

Finanziamento: € 140.000 (costo totale € 204.000)

Data inizio: 2006

Data fine: 2008

Obiettivi: La Ricerca si proponeva di chiarire i meccanismi alla base della tossicità di nanotubi di carbonio e nanoparticelle di elementi metallici, indagando le relazioni struttura-attività derivate dallo studio e dalla valutazione di effetti rilevanti su sistemi biologici e sviluppare nuovi metodi *in vitro* per valutare la tossicità dei nanomateriali di nuova sintesi, così da individuare una batteria di test utilizzabili per la stima del rischio per la salute umana in seguito ad esposizione a nanomateriali di nuova sintesi. Sono stati studiati: i) la permeabilità transepiteliale dei nanomateriali attraverso l'epitelio respiratorio; ii) gli effetti di tipi diversi di nanomateriali su alcuni tipi cellulari di rilevanza biologica: cellule epiteliali delle vie respiratorie, cellule infiammatorie di origine monocito-macrofagica, cellule staminali umane da sangue di cordone in corso di differenziazione in linfociti T o NK, cellule endoteliali umane, linfociti da sangue periferico; iii) i meccanismi alla base dei cambiamenti di sopravvivenza e/o apoptosi, di proliferazione cellulare, di espressione di geni coinvolti nella risposta infiammatoria e nei meccanismi di stress ossidativo indotti dalla presenza di nanomateriali; iv) il danno al DNA, anche di tipo ossidativo, mediante test di genotossicità (Comet e micronucleo); v) la coerenza fra diversi parametri di tossicità, ottenuti con modelli *in vitro*, su modelli *in vivo* o *ex vivo*, questi ultimi finalizzati alla valutazione dell'impatto sul sistema nervoso autonomico.

Riferimenti:

- Magrini A, Bergamaschi A, Bergamaschi E. Carbon nanotubes (CNT) and nanoparticles (NP): interaction with lung epithelium and other biological systems. *G Ital Med Lav Ergon.* 2006;28(3):266-9.
- Bergamaschi E, Bussolati O, Magrini A, Bottini M, Migliore L, Bellucci S, et al. Nanomaterials and lung toxicity: interactions with airways cells and relevance for occupational health risk assessment. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2006;19(4 Suppl):3-10.
- Petrarca C, Perrone A, Verna N, Verginelli F, Ponti J, Sabbioni E, et al. Cobalt nano-particles modulate cytokine in vitro release by human mononuclear cells mimicking autoimmune disease. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2006;19(4 Suppl):11-4.
- Coppeta L, Legramante J, Galante A, Bergamaschi A, Bergamaschi E, Magrini A, et al. Interaction between carbon nanotubes and cardiovascular autonomic nervous system regulation: proposal of an animal model and preliminary findings. *G Ital Med Lav Ergon.* 2007;29(3 Suppl):465-7.
- Bottini M, D'Annibale F, Magrini A, Cerignoli F, Arimura Y, Dawson MI, et al. Quantum dot-

- doped silica nanoparticles as probes for targeting of T-lymphocytes. *Int J Nanomedicine*. 2007;2(2):227-33.
- Bottini M, Magrini A, Dawson MI, Rosato N, Bergamaschi A, Mustelin T. Noncovalently silylated carbon nanotubes decorated with quantum dots. *Carbon*. 2007;45(3):673-6.
 - Colognato R, Bonelli A, Bonacchi D, et al. Analysis of cobalt ferrite nanoparticles induced genotoxicity on human peripheral lymphocytes: comparison of size and organic grafting-dependent effects. *Nanotoxicology* 2007;1(4): 301-8.
 - M. De Nicola, D. M. Gattia, S. Bellucci, G. De Bellis, F. Micciulla, R. Pastore, A. Tiberia, C. Cella, et al. Effect of different carbon nanotubes on cell viability and proliferation. *J Phys Condens Matter*. 2007;19:395013-20.
 - De Nicola M, Bellucci S, Traversa E, Magrini A, Bergamaschi A, Ghibelli L. Carbon nanotubes on Jurkat cells: effects on cell viability and plasma membrane potential. *J. Phys Condens Matter*. 2008;20:4744204.
 - Bergamaschi E, Migliore L, Bergamaschi A, Bussolati O, Boscolo P, Colognato R, et al. Studio dei meccanismi di tossicità di nano particelle di nuova sintesi: implicazioni per la stima del rischio occupazionale. *G Ital Med Lav Ergon*. 2008;30(1):457-63.
 - Colognato R, Bonelli A, Ponti J, Farina M, Bergamaschi E, Sabbioni E, et al. Comparative genotoxicity of cobalt nanoparticles and ions on human peripheral leukocytes in vitro. *Mutagenesis*. 2008;23(5):377-82.
 - Cato MH, D'Annibale F, Mills DM, Cerignoli F, Dawson MI, Bergamaschi E, et al. Cell-type specific and cytoplasmic targeting of PEGylated carbon nanotube-based nanoassemblies. *J Nanosci Nanotechnol*. 2008;8(5):2259-69.
 - Rotoli BM, Bussolati O, Bianchi MG, Barilli A, Balasubramanian C, Bellucci S, et al. Non-functionalized multi-walled carbon nanotubes alter the paracellular permeability of human airway epithelial cells. *Toxicol Lett*. 2008;178(2):95-102.
 - Bergamaschi E. Occupational exposure to nanomaterials: Present knowledge and future development. *Nanotoxicology*. 2009;3(3):194-201.
 - Rotoli B, Bussolati O, Barilli A, Zanello P, Bianchi M, Magrini A, et al. Airway barrier dysfunction induced by exposure to carbon nanotubes in vitro: which role for fiber length? *Hum Exp Toxicol*. 2009;28(6-7):361-8.
 - Legramante J, Valentini F, Magrini A, Palleschi G, Sacco S, Iavicoli I, et al. Cardiac autonomic regulation after lung exposure to carbon nanotubes. *Hum Exp Toxicol*. 2009;28(6-7):369-75.
 - De Nicola M, Nuccitelli S, Mirabile Gattia D, Traversa E, Magrini A, Bergamaschi A, et al. Effects of Carbon Nanotubes on Human Monocytes. *Natural Compounds and Their Role in Apoptotic Cell Signaling Pathways: Ann. NY Acad Sci*. 2009;1171:600-5.

4. Studio dei meccanismi di citotossicità e genotossicità di nanoparticelle di silice e silicati fibrosi nanometrici con dimensioni, struttura e composizione strettamente controllate.

Ente Coordinatore: Università degli Studi di Torino – Dipartimento di GENETICA, BIOLOGIA E BIOCHIMICA (Prof. Dario Ghigo)

Partner:

- Politecnico di Torino
- Università di Bologna (Dip. di Chimica)
- Università di Torino (Centro "G. Scansetti")
- Università di Parma (Dip. di Medicina Sperimentale)
- Università di Pisa (Dip. di Scienze Ambientali)

Ente Finanziatore: MIUR Anno 2007 - prot. 2007498XRF

Finanziamento: € 130.422

Data inizio: 2008

Data fine: 2009

Obiettivi: Chiarire il ruolo della relazione struttura/tossicità dei materiali nanostrutturati a base di silice, indagando il ruolo della reattività di superficie e gli effetti biologici di NP sintetiche di silice cristallina e amorfa e di NF sintetiche di crisotilo aventi proprietà e caratteristiche di superficie strettamente controllate e modificabili in maniera indipendente. Vengono confrontate particelle nano- e micrometriche con caratteristiche chimiche simili e studiata la correlazione tra caratteristiche fisico-chimiche e la loro: reattività di superficie, generazione di radicali liberi, capacità di indurre stress ossidativo, reazione infiammatoria, citotossicità, genotossicità e transizione E-M in colture cellulari ed *in vivo*, capacità di attraversare la barriera epitelio-endoteliale sia in modelli *in vitro* che *in vivo*.

Riferimenti:

- Polimeni M, Gazzano E, Ghiazza M, Fenoglio I, Bosia A, Fubini B, et al. Quartz inhibits glucose 6-phosphate dehydrogenase in murine alveolar macrophages. *Chem Res Toxicol.* 2008;21(4):888-94.
- Ghiazza M, Gazzano E, Bonelli B, Fenoglio I, Polimeni M, Ghigo D, et al. Formation of a vitreous phase at the surface of some commercial diatomaceous earth prevents the onset of oxidative stress effects. *Chem Res Toxicol.* 2009;22(1):136-45.

5. Rischi dell'esposizione a materiali nano strutturati: studi chimico-fisici e di tossicità su modelli *in vivo* ed *in vitro* per la caratterizzazione dei meccanismi fisiopatologici e dei profili cinetico delle particelle.

Ente Coordinatore: Università degli Studi di PAVIA (Prof. Luigi Manzo)

Partner:

- Università di Parma (Lab. Tossicologia Industriale)
- Università di Siena
- Università Torino

Ente Finanziatore: MIUR

Finanziamento: € 176.000

Data inizio: 2007

Data fine: 2009

Obiettivi:

- Sviluppare una strategia di ricerca multidisciplinare per la valutazione delle caratteristiche di sicurezza dei nanomateriali;
- Definire criteri e standard per la caratterizzazione chimico-fisica dei nanomateriali destinati a studi tossicologici, requisito di cruciale importanza per assicurare la riproducibilità degli esperimenti tossicologici;

- Definire indici quantitativi di misura applicabili alla valutazione del rischio, per quanto riguarda sia il comportamento biocinetico sia gli effetti prodotti dalle nanoparticelle [silice (SiO₂) contenenti o meno cadmio o cobalto, e nanotubi di carbonio (CNT)] nei sistemi biologici;
- Verificare se le caratteristiche chimico-fisiche e la reattività di superficie si traducano in specifici effetti e meccanismi biologici;
- Determinare gli “effetti critici” ed i rapporti dose-risposta su preparati cellulari in vitro (es. polmone e SNC);
- Valutare l’eventuale uptake delle nanoparticelle in cellule e tessuti (traslocazione) dopo applicazione in colture cellulari o somministrazione in animali;
- Caratterizzare indicatori precoci di danno a carico delle vie respiratorie (es. indici d’inflammatione, marker di stress ossidativo, citochine, chemochine, livelli di proteine nitate, profilo proteomico), misurabili in matrici biologiche accessibili (es. sangue periferico, urine, liquido di lavaggio broncoalveolare).

Riferimenti:

- Goldoni M, Caglieri A, De Palma G, Longo S, Acampa O, Poli D, et al. Development and set-up of a portable device to monitor air way exhalation and deposition of particulate matter. *Biomarkers*. 2009;14(5):326-39.

3.2.5 Progetti in ambito Ministero della Salute (Mds)

1. Nano-OSH Italia

Ente Coordinatore: ISPESL – Istituto Superiore per la Prevenzione e la Sicurezza del Lavoro

Partner:

- Istituto Nazionale di Fisica Nucleare (INFN), Laboratori Nazionali di Frascati,
- Università di Roma “Tor Vergata”
- Fondazione Salvatore Maugeri
- ARPA Puglia

Ente Finanziatore: Ministero della Salute e ISPESL

Finanziamento: € 465.000

Data inizio: 02/01/2008

Data fine: 02/01/2011

Obiettivo: Sviluppare una metodologia innovativa per la valutazione del rischio da esposizione lavorativa a nanomateriali (nanomateriali). I risultati contribuiranno ad individuare un sistema integrato di metodi d’indagine per la caratterizzazione di nanotubi di carbonio (NTC) opportunamente prodotti e funzionalizzati, di monitoraggio ambientale dell’esposizione in settori lavorativi a rischio, di monitoraggio dell’esposizione in un gruppo selezionato di lavora-

tori e di valutazione degli effetti e di stima dei processi produttivi a rischio di esposizione lavorativa. Tali risultati saranno sintetizzati nello sviluppo di un modello generale per la valutazione del rischio da utilizzare a fini preventivi.

Riferimenti:

- Scarselli M, Scilletta C, Tombolini F, Castrucci P, Diociaiuti M, Casciardi S, et al. Multiwall Carbon Nanotubes Decorated with Copper Nanoparticles: Effect on the Photocurrent Response. *J Phys Chem C*. 2009;113(14):5860-4.
- Giulianini M, Waclawik ER, Bell JM, Scarselli M, Castrucci P, De Crescenzi M, et al. Poly (3-hexyl-thiophene) coil-wrapped single wall carbon nano tube investigated by scanning tunneling spectroscopy. *Appl Phys Lett*. 2009;95:143116.
- Giulianini M, Waclawik ER, Bell JM, De Crescenzi M, Castrucci P, Scarselli M, et al. Regioregular poly (3-hexyl-thiophene) helical self-organization on carbon nanotubes. *Appl Phys Lett*. 2009;95: 013304.
- El Khakani MA, Le Borgne V, Aïssa B, Rosei F, Scilletta C, Speiser E, et al. Photocurrent generation in random networks carbonnanotubes grown by an "all-laser" process. *Appl Phys Lett*. 2009;95:083114.
- Iavicoli S, Rondinone BM, Bocconi F. Occupational safety and health's role in sustainable, responsible nanotechnology: gaps and needs. *Hum Exp Toxicol*. 2009;28:433-43.
- Bocconi F, Rondinone B, Petyx C, Iavicoli S. Potential occupational exposure to manufactured nanoparticles in Italy. *J Cleaner Prod*. 2008;16:949-56.
- Di Sotto A, Chiaretti M, Carru GA, Bellucci S, Mazzanti G. Multi-Walled Carbon Nanotubes: lack of mutagenic activity in the bacterial reverse mutation assay. *Toxicol Lett*. 2009;184(3):192-7.

Bibliografia

- EC. EU nanotechnology R&D in the field of health and environmental impact of nanoparticles. European Commission DG Research, 28 Jan 2008a. (<http://cordis.europa.eu/nanotechnology> ultimo accesso 30 settembre 2009)
- EC. Proceedings of the workshop on research projects on the safety of nanomaterials: reviewing the knowledge gaps. European Commission DG Research, Brussels 17-18 Apr 2008b.
- Iavicoli S, Rondinone BM, Bocconi F. Occupational Safety and Health's role in sustainable and responsible nanotechnology: gaps and needs. *Hum Exp Toxicol* 2009; 28: 433-43.
- NNI. Strategy for Nanotechnology-related Environmental, Health and Safety Research. Executive Office of the President of the United States, National Science and Technology Council, National Nanotechnology Initiative, Feb 2008.

ALLEGATO 1

**SCHEDE SINTETICHE DEI PROGETTI DI RICERCA,
CON PARTNER ITALIANI,
RELATIVI AGLI IMPATTI EHS DELLE NANOTECNOLOGIE,
FINANZIATI NELL'AMBITO DEI PROGRAMMI QUADRO
DELLA COMMISSIONE EUROPEA SU RICERCA E SVILUPPO
(FP5-FP6-FP7)**

FP5 – Progetti di Ricerca della Commissione Europea

1. NANO-PATHOLOGY

- **Titolo esteso:** *The role of Micro and Nano particles in biomaterial-induced pathologies*
- **Coordinatore:** Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), *Italia*
(Dr. Manuela Arata)
- **Altri Partner:**
 - Johannes Gutenberg Universitaet Mainz, *Germania*.
 - University of Cambridge, *Regno Unito*.
 - Biomatech SA, *Francia* .
 - Fei Italia Srl, *Italia*.
- **Data d'inizio:** 01/01/2002
- **Data di fine progetto:** 30/06/2005
- **Durata del progetto:** 42 mesi
- **Ente finanziatore:** Commissione Europea (FP 5 - Quality of life)
- **Ammontare totale del finanziamento:**
€ 999.937 (costo totale € 1.166.049)
- **Obiettivi:**
 - Sviluppare un metodo innovativo e tecnologico di diagnosi capace di identificare la presenza di micro e nanoparticelle di natura esogena nei processi patologici ritenuti allo stato attuale di natura sconosciuta.
 - Investigare i meccanismi patogeni.
 - Impiegare la sperimentazione animale disponibile ei modelli *in-vitro* per investigare i meccanismi patogeni delle malattie potenzialmente indotte dalle particelle *micro* e *nano*.
 - Determinare la rilevanza patologica delle nano-particelle.
- **Website:** <http://www.nanopathology.it/paginei/menu.htm>

FP6 – Progetti di Ricerca della Commissione Europea

1. NANO-PATHOLOGY

- **Titolo esteso:** *Cellular interaction and toxicology with engineered nanoparticles*
- **Coordinatore:** Tel-Aviv University, *Israele* (Prof. Rafi Korenstein)
- **Altri Partner:**
 - Jrc- Institute For Health And Consumer Protection, *Belgio*
 - Institut National De La Sante Et De La Recherche Medicale (Inserm), *Francia*
 - Westfälische Wilhelms-Universität, *Germania*
 - J. Gutenberg University Of Mainz, *Germania*
 - Basf Aktiengesellschaft, *Germania*
 - Tp21 Gmbh, *Germania*
 - Colorobbia Italia Spa, *Italia*
- **Data d'inizio:** 01/11/2006
- **Data di fine progetto:** 30/04/2010
- **Durata del progetto:** 42 mesi
- **Ente finanziatore:** Commissione Europea (FP 6 - NMP)
- **Ammontare totale del finanziamento:**
€ 2.600.000 (costo totale € 3.651.500)
- **Obiettivi:**
 - Svelare la correlazione tra le caratteristiche fisico-chimiche delle nanoparticelle e il loro potenziale tossico su vari organi del corpo umano.
 - Sviluppare un innovativo set multidisciplinare di test e di indicatori per la profilazione tossicologica delle nanoparticelle.
- **Website:** <http://www.fp6-cellnanotox.net/index.html>

3. DIPNA

- **Titolo esteso:** *Development of an integrated platform for nanoparticle analysis to verify their possible toxicity and the eco-toxicity*
- **Coordinatore:** Consorzio Nazionale Interuniversitario per le Scienze Fisiche della Materia (Cnism) - Laboratorio dei Biomateriali, Dipartimento di Neuroscienze Dell'università Di Modena e Reggio Emilia, *Italia* (Dr. Antonietta M. Gatti).
- **Altri Partner:**
 - "Paris-Lodron" Universitat Salzburg, *Austria*
 - JRS, Institute for Health and Consumer Protection (IHCP) / European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) UNIT, *Belgio*
 - Fraunhofer Institute of Biomedical Engineering, *Germania*
 - Grimm Aerosol Technik, *Germania*
 - **Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Italia**
 - **Università della Magna Graecia di Catanzaro, Italia**
 - Vlaamse Instelling voor Technologisch Onderzoek NV, *Olanda*
 - Fundacio Privada Institut Catala de Nanotecnologia, *Spagna*
 - Centre Suisse d'Electronique et de Microtechnique SA Recherche et Développement (CSEM SA), *Svizzera*
- **Data d'inizio:** 01/11/2006
- **Data di fine progetto:** 31/10/2009
- **Durata del progetto:** 36 mesi
- **Ente finanziatore:** CE (FP 6 - NMP)
- **Ammontare totale del finanziamento:**
€ 2.793.235 (costo totale € 4.535.199)
- **Obiettivi:**
 - Evidenziare le interazioni tra nanoparticelle e cellule.
 - Migliorare la comprensione dei possibili rischi correlati alle nanoparticelle e i criteri per valutare tali rischi caso per caso.
 - Mettere a punto un sistema di valutazione dei rischi per la salute degli operatori delle nanotecnologie, cittadini e utilizzatori finali e identificare delle procedure di sicurezza.
 - Sviluppare nuovi parametri per la scoperta dell'inquinamento da nanoparticelle.
 - Sviluppare criteri per la prevenzione e definire *standard* di riferimento per le autorità pubbliche.
 - Sviluppare una piattaforma per validare sul campo gli strumenti di *biodetection* per i rischi associati alle nanoparticelle.
- **Website:** <http://www.dipna.eu>

4. PARTICLE-RISK

- **Titolo esteso:** *Risk Assessment of Exposure to Particles*
- **Coordinatore:** Institute of Occupational Medicine, *Regno Unito* (Dr Tran Lang)
- **Altri Partner:**
 - National Institute of Occupational Health, *Danimarca*
 - University of Edinburgh, *Regno Unito*
 - Napier University, *Regno Unito*
 - Forschungsz fuer Umwelt und Gesundheit GMBH, *Germania*
 - **Consorzio Venezia Ricerche, Italia**
 - **Università Cà Foscari di Venezia, Italia**
- **Data d'inizio:** 01/06/2005
- **Data di fine progetto:** 31/08/2008
- **Durata del progetto:** 36 mesi
- **Ente finanziatore:** Commissione Europea (FP 6 - NEST)
- **Ammontare totale del finanziamento:**
€ 799.576 (costo totale € 1.120.000)
- **Obiettivi:**
 - Acquisizione dei dati relativi a cinque particelle potenzialmente generate da nuove tecnologie emergenti.
 - Valutazione, attraverso esperimenti *in vitro* e sperimentazione su cavie, del rischio derivante dall'esposizione a questi materiali.
- **Website:** <http://www.iom-world.com/particlerisk/>

5. NANOCAP

- **Titolo esteso:** *Nanotechnology capacity building NGOS*
- **Coordinatore:** IVAM UVA BV, *Olanda* (Drs. Jacques Cornelis e Pieter Van Broekhuizen)
- **Altri Partner:**
 - PPM FORSCHUNG UND BERATUNG ARBEIT GESUNDHEIT UMWELT, *Austria*
 - KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN, *Belgio*.
 - AARHUS UNIVERSITET, *Danimarca*.
 - UNIVERSITY OF ESSEX, *Regno Unito*.
 - TECHNISCHE UNIVERSITÄT DARMSTADT, *Germania*
 - FREIE UND HANSESTADT HAMBURG, BEHÖRDE FÜR WISSENSCHAFT UND FORSCHUNG, KOOPERATIONSSTELLE HAMBURG, *Germania*.
 - MEDITERRANEAN INFORMATION OFFICE FOR ENVIRONMENT, CULTURE AND SUSTAINABLE DEVELOPMENT, *Grecia*
 - AMICUS, *Irlanda*
 - **LEGAMBIENTE LOMBARDIA ONLUS**, *Italia*
 - STICHTING NATUUR EN MILIEU, *Olanda*
 - PUBLIC INSTITUTION BALTIC ENVIRONMENTAL FORUM (LITH. VIESOJI ISTAIGA BALTIJOS APLINKOS FORUMAS), *Lituania*.
 - FEDERATIE NEDERLANDSE VAKBEWEGING, *Olanda*
 - UNIVERSITEIT VAN AMSTERDAM, *Olanda*
 - EUROPEAN ENVIRONMENTAL BUREAU / BUREAU EUROPÉEN DE L'ENVIRONNEMENT
 - EUROPEAN TRADE UNION INSTITUTE FOR RESEARCH, EDUCATION, HEALTH AND SAFETY
- **Data d'inizio:** 01/09/2006
- **Data di fine progetto:** 31/08/2009
- **Durata del progetto:** 36 mesi
- **Ente finanziatore:** Commissione Europea (FP 6 - Society)
- **Ammontare totale del finanziamento:** € 1.310.000
 - Migliorare, attraverso un dibattito a livello europeo sulle nanotecnologie tra ONG ambientali e sindacati, la comprensione delle problematiche etiche delle nanotecnologie e dei rischi per l'ambiente, per la salute e per la sicurezza dei lavoratori.
 - Sviluppare raccomandazioni per mettere le pubbliche autorità nelle condizioni di gestire i rischi per la salute, la sicurezza e l'ambiente derivanti dalla rapida introduzione delle nanotecnologie nella società.
 - Fornire all'industria gli strumenti necessari per fare un uso responsabile delle nanotecnologie, così come stimolare gli operatori industriali ed accademici a concentrarsi su di una riduzione delle fonti riguardanti le nanotecnologie e a rendere la valutazione dei rischi una dimensione cruciale del loro lavoro.
- **Website:** <http://www.nanocap.eu/Flex/Site/Page.aspx?PageID=&Lang=>

6. SAPHIR

- **Titolo esteso:** *Safe, integrated & controlled production of high-tech multifunctional materials and their recycling.*
- **Coordinatore:** Compagnie Industrielle Des Lasers, CILAS, *Francia* (Mr. Christophe Goepfert)
- **Altri Partner:**
 - EADS FRANCE (INNOVATION WORKS DEPARTMENT), *Francia*
 - FRAUNHOFER - GESELLSCHAFT ZUR FOERDERUNG
 - DER ANGEWANDETEN FORSCHUNG E.V., *Germania*
 - EADS CCR, *Francia*
 - UNIVERSITA DE SHERBROOKE, *Canada*
 - **CENTRO RICERCHE PLAST-OPTICA SPA, *Italia***
 - ARKEMA France, *Francia*
 - BRITISH CERAMIC RESEARCH LIMITED, *Regno Unito*
 - STOCKHOLMS UNIVERSITET (STOCKHOLM UNIVERSITY), *Svezia*
 - CENTER FOR RESEARCH AND TECHNOLOGY HELLAS, *Grecia*
 - QINETIQ NANOMATERIALS LTD, *Regno Unito*
 - INSTITUT JOZEF STEFAN, *Slovenia*
 - FUNDACION LABEIN, *Spagna*
 - TEKNA PLASMA SYSTEMS INC, *Canada*
 - NIRO A/S, *Danimarca*
 - INSTITUT NATIONAL DE L'ENVIRONNEMENT INDUSTRIEL ET DES RISQUES, *Francia*
 - ECOLE POLYTECHNIQUE FEDERALE DE LAUSANNE, *Svizzera*
 - ARCELOR RESEARCH LIEGE SCRL, *Belgio*
 - MECACHROME SAS, *Francia*
 - ZENTRUM FUER BRENNSTOFFZELLEN-TECHNIK GMBH, *Germania*
 - IRD FUEL CELLS A/S, *Danimarca*
 - C-TECH INNOVATION LTD, *Regno Unito*
 - COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE (CEA), *Francia*
 - ALMA CONSULTING GROUP SAS, *Francia*
- **Data d'inizio:** 01/10/2006
- **Data di fine progetto:** 30/09/2010
- **Durata del progetto:** 48 mesi
- **Ente finanziatore:** CE (FP 6 - NMP)
- **Ammontare totale del finanziamento:** 8.100.000 (costo totale € 15.800.000)
- **Obiettivi:**

Mettere a punto procedure per garantire una produzione sicura, controllata e integrata, che includa il loro riciclo, di prodotti high-tech multifunzionali basati sulle nanostrutture, assicurandone al contempo la competitività. In particolare si propone di mettere a punto:

- sequenze produttive durante le quali non si verificano rilasci di nanoparticelle;
 - sequenze produttive che consistano nel legare in modo sicuro processi elementari esistenti o emergenti;
 - sequenze produttive controllate da sistemi innovativi che assicurino l'efficienza, l'affidabilità e la tracciabilità del prodotto e al contempo una produzione nel complesso sicura.
- **Website:** <http://www.saphir-project.eu/>

7. NANOTOX

- **Titolo esteso:** *Nano-particle characterization and toxicity*
- **Coordinatore:** Chalex Research Ltd, *Regno Unito* (Mr. Mark Pullinger)
- **Altri Partner:**
 - NANOCYL S. A., *Belgio*
 - BULGARIAN ACADEMY OF SCIENCES, *Bulgaria*
 - HELSINKI UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, *Finlandia*
 - THE UNIVERSITY OF MANCHESTER, *Regno Unito*
 - **CONSORZIO PER LO SVILUPPO DEI SISTEMI A GRANDE INTERFASE, *Italia***
 - MBN NANOMATERIALIA SPA, *Italia*
 - NOFER INSTITUTE OF OCCUPATIONAL MEDICINE, *Polonia*
 - CMP CIENTIFICA SL, *Spagna*
- **Data d'inizio:** 01/31/2005
- **Data di fine progetto:** 31/01/2007
- **Durata del progetto:** 24 mesi
- **Ente finanziatore:** Commissione Europea (FP 6 - NMP)
- **Ammontare totale del finanziamento:**
€ 408.544 (costo totale € 399.894)
- **Obiettivi:**
Fornire un supporto investigativo per l'evidenziazione dell'impatto tossicologico delle nanoparticelle sulla salute umana e sull'ambiente. In particolare il progetto intende:
 - esaminare e mettere a sistema le conoscenze nel campo delle proprietà fisiche e chimiche dei differenti tipi di nanoparticelle e di nanocristalli, della loro trasformazione e uso, degli effetti sugli esseri umani e del loro impatto ambientale, della mutagenicità e genotossicità, degli standard di sicurezza, ecc.;
 - mappare le attività di ricerca in corso e i loro sviluppi, inserendoli in un database europeo on-line;
 - elaborare linee guida e raccomandazioni per supportare le istituzioni europee nella definizione di standard, norme, politiche e codici pratici finalizzati alla produzione all'uso sicuro delle nanoparticelle.
- **Website:** <http://www.dipna.eu>

8. CANaPE

- **Titolo esteso:** *Carbon Nanotubes for Applications in Electronics, Catalysis, Composites and Nano-Biology*
- **Coordinatore:** The Chancellor, Masters and Scholars of the University of Cambridge, *Regno Unito* (Prof. John Robertson)
- **Altri Partner:**
 - CRIF-WALLONIE, *Belgio*
 - UNIVERSITE DE LIEGE - CENTRE SPATIAL DE LIEGE, *Belgio*
 - UNIVERSITE MONTPELLIER II, *Francia*
 - THALES, *Francia*
 - IMPERIAL COLLEGE OF SCIENCE TECHNOLOGY AND MEDICINE, *Regno Unito*
 - THOMAS SWAN & CO LTD, *Regno Unito*
 - HITACHI EUROPE LTD, *Regno Unito*
 - MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FORDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V, *Germania*
 - DARMSTADT UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, *Germania*
 - NANOSCAPE, *Germania*
 - STMICROELECTRONICS SRL, *Italia*
 - CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE, *Italia*
 - SWISS FEDERAL LABORATORIES FOR MATERIALS TESTING AND RESEARCH, *Svizzera*
- **Data d'inizio:** 01/06/2004
- **Data di fine progetto:** 31/05/2008
- **Durata del progetto:** 48 mesi
- **Ente finanziatore:** Commissione Europea (FP 6 - NMP)
- **Ammontare totale del finanziamento:**
€ 6.400.000 (costo totale € 8.650.000)
- **Obiettivi:**
Arrivare alla produzione su larga scala di nanotubi in carbonio attraverso l'impiego del metodo del deposito dei vapori chimici. Tra gli obiettivi specifici del progetto, vi sono anche quelli di:
 - condurre studi tossicologici sui nanotubi in carbonio per valutare i possibili rischi per la salute umana;
 - testare la biocompatibilità dei nanotubi e dei polimeri compositi.
- **Website:** <http://www.canapeweb.com/>

9. NANO DIALOGUE

- **Titolo esteso:** *Enhancing dialogue on nanotechnologies and nanosciences in society at the European level*
- **Coordinatore:** Fondazione IDIS-Città della Scienza, Atelier e Progetti di Comunicazione Department, Science Centre Department, *Italia*
(Dr. Luigi Amodio)
- **Altri Partner:**
 - FLANDERS TECHNOLOGY INTERNATIONAL FOUNDATION, *Belgio*
 - ASSOCIATION EUROPEENNE DES EXPOSITIONS SCIENTIFIQUES, TECHNIQUES ET INDUSTRIELLES, *Belgio*
 - SCIENCE CENTRE AHHAA FOUNDATION, *Estonia*
 - CENTRE DE CULTURE SCIENTIFIQUE, TECHNIQUE ET INDUSTRIELLE DE GRENOBL, *Francia*
 - UNIVERSITY OF WESTMINSTER, *Regno Unito*
 - DEUTSCHES MUSEUM, *Germania*
 - ASSOCIAZIONE MACROSCOPIC QUANTUM COHERENCE AND COMPUTING, *Italia*
 - CIÊNCIA VIVA - AGÊNCIA NACIONAL PARA A CULTURA CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA, *Portogallo*
 - FUNDACIÓ PARC CIENTÍFIC DE BARCELONA, *Spagna*
 - UNIVERSEUM AB, *Svezia*
- **Data d'inizio:** 01/03/2005
- **Data di fine progetto:** 28/02/2007
- **Durata del progetto:** 24 mesi
- **Ente finanziatore:** Commissione Europea (FP 6 - NMP)
- **Ammontare totale del finanziamento:**
850.000 (costo totale € 935.078)
- **Obiettivi:**
Stabilire, a livello europeo, un processo di comunicazione integrato e un dibattito sociale sulle nanotecnologie e le nanoscienze. Il progetto intende in particolare:
 - fornire informazioni e aumentare la consapevolezza pubblica sugli ultimi sviluppi della tecnologia in questo campo;
 - aumentare il dialogo sociale tra la comunità dei ricercatori, i cittadini e gli altri attori sociali, al fine di identificare le principali istanze provenienti da questi gruppi;
 - fornire alla Commissione, così come ai singoli esperti, raccomandazioni riguardanti le maggiori preoccupazioni sociali legate alle nanoscienze.
- **Website:** <http://www.canapeweb.com/>

FP7 – Progetti di Ricerca della Commissione Europea

10. NANORETOX

- **Titolo esteso:** *The reactivity and toxicity of engineered nanoparticles: risks to the environment and human health*
- **Coordinatore:** Natural History Museum Cromwell Road, *Regno Unito* (Ms. Vanessa Pike)
- **Altri Partner:**
 - COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES - DIRECTORATE GENERAL JOINT RESEARCH CENTRE - JRC, *Belgio*
 - ROSKILDE UNIVERSITETSCENTER, *Danimarca*
 - UNIVERSITE CATHOLIQUE DE L OUEST ASSOCIATION SAINT YVES, *Francia*
 - UNIVERSITE DE NICE - SOPHIA ANTIPOLIS, *Francia*
 - INTRINSIQ MATERIALES LIMITED, *Regno Unito*
 - IMPERIAL COLLEGE OF SCIENCE, TECHNOLOGY AND MEDICINE, *Regno Unito*
 - KING'S COLLEGE LONDON, *Regno Unito*
 - AHAVA DEAD SEA LABORATORIES LTD, *Israele*
 - UNIVERSITA' DI PISA, *Italia*
 - UNIVERSIDAD DEL PAIS VASCO/EUSKAL HERRIKO UNIBERTSITATEA, *Spagna*
 - DEPARTMENT OF THE INTERIOR USA, *Stati Uniti*
- **Data d'inizio:** 01/12/2008
- **Data di fine progetto:** 30/11/2012
- **Durata del progetto:** 48 mesi
- **Ente finanziatore:** Commissione Europea (FP 7 - NMP)
- **Ammontare totale del finanziamento:**
€ 3.190.000 (costo totale € 5.190.000)
- **Obiettivi:**

Esplorare i rischi per la salute e per l'ambiente derivanti dai nanomateriali. In particolare si è inteso indagare:

 - come l'ambiente in cui le nanoparticelle vengono rilasciate incida sulle loro proprietà fisicochimiche e sulla loro bioreattività;
 - come l'ambiente impatti sulla capacità delle nanoparticelle di penetrare le cellule e di produrre effetti tossici;
 - quali sono le condizioni di interazione con le nanoparticelle che pongono maggiormente a rischio la salute umana.

Tale ricerca è stata finalizzata allo sviluppo di un modello per il Risk Assessment.
- **Website:** <http://www.nanorettox.eu/>

11. FRAMINGNANO

- **Titolo esteso:** *International multi-stakeholder dialogue platform framing the responsible development of nanosciences and nanotechnologies*
- **Coordinatore:** Associazione Italiana per la Ricerca Industriale, *Italia*
(Mr. Guido Frigessi Di Rattalma)
- **Altri Partner:**
 - TECHNOLOGICKE CENTRUM AV CR, *Repubblica Ceca*
 - FONDATION EURACTIV, *Belgio*
 - NATIONAL INSTITUTE FOR PUBLIC HEALTH AND THE ENVIRONMENT, *Olanda*
 - INSTITUTE OF NANOTECHNOLOGY, *Regno Unito*
 - THE INNOVATION SOCIETY LTD, *Svizzera*
- **Data d'inizio:** 01/05/2008
- **Data di fine progetto:** 31/03/2010
- **Durata del progetto:** 23 mesi
- **Ente finanziatore:** Commissione Europea (FP 7 - SIS)
- **Ammontare totale del finanziamento:**
€ 675.044 (costo totale € 742.934)
- **Obiettivi:**
Supportare l'attivazione di un dialogo sul tema delle nanotecnologie che coinvolga i diversi portatori di interesse, quali gli scienziati, le istituzioni, la comunità industriale e i cittadini in generale, al fine di definire soluzioni per una regolamentazione costruttiva e praticabile che ne promuovano uno sviluppo responsabile. Il progetto condurrà all'elaborazione di un Piano per la *Governance* che disegnerà le tappe di un processo deliberativo, finalizzato a creare le condizioni per uno sviluppo responsabile delle NS&T a livello Europeo, oltre ad includere raccomandazioni per la ricerca scientifica e l'azione politica.
- **Website:** <http://www.framingnano.eu/>

12. OBSERVATORYNANO

- **Titolo esteso:** *European observatory for science-based and economic expert analysis of nanotechnologies, cognisant of barriers and risks, to engage with relevant stakeholders regarding benefits and opportunities.*
- **Coordinatore:** Institute of Nanotechnology - Stirling University Innovation Park, *Regno Unito* (Ms. Robina Fisher)
- **Altri Partner:**
 - Aarhus Universitet, *Danimarca*
 - SPINVERSE OY, *Finlandia*
 - Commissariat a l'Energie Atomique (CEA), *Francia*
 - INSTITUTE OF OCCUPATIONAL MEDICINE LIMITED, *Regno Unito*
 - TRIPLE INNOVA GMBH, *Germania*
 - NMTC (NANO & MICRO TECHNOLOGYCONSULTING), *Germania*
 - VDI TECHNOLOGIEZENTRUM GMBH, *Germania*
 - TECHNISCHE UNIVERSITAET DARMSTADT, *Germania*
 - ASSOCIAZIONE ITALIANA PER LA RICERCA INDUSTRIALE – AIRI, *Italia*
 - RIJKSINSTITUUT VOOR VOLKSGEZONDHEID EN MILIEU, *Olanda*
 - UNIVERSITEIT MAASTRICHT, *Olanda*
 - MALSCH TECHNOVALUATION, *Olanda*
 - TECHNOLOGICKE CENTRUM AKADEMIE VED CESKE REPUBLIKY VEREJNA VYZKUMNA INSTITUCE, *Repubblica Ceca*
 - BAX & WILLEMS SL, *Spagna*
 - EIDGENOESSISCHE MATERIALPRUEFUNGS- UND FORSCHUNGSANSTALT, *Svizzera*
- **Data d'inizio:** 01/04/2008
- **Data di fine progetto:** 31/03/2012
- **Durata del progetto:** 48 mesi
- **Ente finanziatore:** Commissione Europea (FP 7 - NMP)
- **Ammontare totale del finanziamento:**
€ 4.000.000 (costo totale € 5.140.000)
- **Obiettivi:**
Legare lo sviluppo scientifico e tecnologico delle nanotecnologie al loro impatto socio-economico, allo scopo di ridurre tale impatto e collocare il loro sviluppo in una scala temporale realistica. A questo scopo il progetto condurrà un'analisi della letteratura scientifica, delle strategie di investimento nazionali e dei mercati e indagini tramite questionari, interviste e workshop destinati ad accademici ed esponenti chiave dell'industria e del mondo finanziario.
- **Website:** <http://www.observatory-nano.eu/project/>

13. NANOTEST

- **Titolo esteso:** *Development of methodology for alternative testing strategies for the assessment of the toxicological profile of nanoparticles used in medical diagnostics*
- **Coordinatore:** Norsk Institutt for Luftforskning*, *Norvegia* (Dr. Maria Dusinka)
- **Altri Partner:**
 - COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES - DIRECTORATE GENERAL JOINT RESEARCH CENTRE JRC, *Belgio*
 - KOBENHAVNS UNIVERSITET, *Danimarca*
 - UNIVERSITE DE PARIS VII DENIS DIDEROT, *Francia*
 - UNIVERSITY HOSPITALS BRISTOL NHS FOUNDATION TRUST, *Regno Unito*
 - INSTITUTE OF OCCUPATIONAL MEDICINE, *Regno Unito*
 - NATIONAL CENTER FOR SCIENTIFIC RESEARCH "DEMOKRITOS", *Grecia*
 - NMTC (NANO & MICRO TECHNOLOGYCONSULTING), *Germania*
 - VDI TECHNOLOGIEZENTRUM GMBH, *Germania*
 - TECHNISCHE UNIVERSITAET DARMSTADT, *Germania*
 - **UNIVERSITA CA' FOSCARI DI VENEZIA, Italia**
 - SLOVENSKA ZDRAVOTNICKA UNIVERZITA V BRATISLAVE, *Slovacchia*
 - ADVANCED IN VITRO CELL TECHNOLOGIES S.L., *Spagna*
 - HOSPICES CANTONAUX CHUV, *Svizzera*
- **Data d'inizio:** 01/04/2008
- **Data di fine progetto:** 30/09/2011
- **Durata del progetto:** 42 mesi
- **Ente finanziatore:** Commissione Europea (FP 7 - HEALTH)
- **Ammontare totale del finanziamento:**
€ 2.990.000 (costo totale € 3.940.000)
- **Obiettivi:**
Sviluppare strategie alternative di analisi con un'alta capacità di trattamento, basate su metodi *in vitro* e *in silico* e finalizzate a valutare il profilo tossicologico delle nano particelle usate della diagnostica medica. Gli obiettivi specifici sono:
 - definire le proprietà delle nanoparticelle e caratterizzare quelle da usare;
 - studiare le interazioni delle nanoparticelle con molecole, cellule e organismi e sviluppare metodi *in vitro* per studiare il loro potenziale tossicologico;
 - validare i risultati di breve termine ottenuti *in vitro* con modelli *in vivo*, studiando gli effetti delle nanoparticelle negli animali e negli esseri umani allo scopo di evidenziare la sensibilità individuale;
 - sviluppare modelli *in silico* delle interazioni con le nanoparticelle.
- **Website:** <http://www.nanotest-fp7.eu/>

capitolo 4

Protocolli di acquisizione delle informazioni e metodi di caratterizzazione dell'esposizione a nanomateriali

Danilo Cottica (coordinatore), *Fondazione Salvatore Maugeri*

Stefano Bellucci, *INFN*

Stefano Casciardi, *INAIL, Dipartimento di Igiene del Lavoro - ex ISPESL*

Paola Castellano, *INAIL, Dipartimento di Igiene del Lavoro - ex ISPESL*

Matteo Goldoni, *INAIL, Centro Ricerche di Parma - ex ISPESL*

Elena Grigniani, *Fondazione Salvatore Maugeri*

Ivo Iavicoli, *Università Cattolica del Sacro Cuore di Roma*

Achille Marconi, *ISS*

4.1 Identificazione delle fonti di aerodispersione

La produzione "volontaria" di nanomateriali (NM) destinati alle nanotecnologie viene realizzata attraverso due processi chimico-fisici diversi (INRS, 2007): il metodo "ascendente" (*bottom-up*) e quello "discendente" (*top-down*), già in precedenza definiti. Il primo è il frutto della ricerca nel campo delle nanotecnologie e consiste nel costruire i materiali desiderati assemblandoli dagli atomi secondo schemi predefiniti; il secondo è parte integrante dell'industria elettronica per la miniaturizzazione dei materiali e dei componenti. In termini dimensionali i due processi convergono nel campo delle nanoparticelle (NP). La "via ascendente" fa riferimento a processi di natura chimica e fisica mentre quella "discendente" comporta generalmente processi di tipo meccanico.

Non sempre le NP sono il prodotto finale del ciclo tecnologico. Spesso la maggior parte delle NP presenti nell'ambiente di lavoro è associata alla formazione attraverso processi di nucleazione e condensazione partendo da aerosol precursori quali gas, liquidi e solidi. Questi processi possono individuarsi tra quelli che sviluppano e/o implicano elevata energia termica, quali: rifinitura e lavorazione dei metalli, applicazione mediante spray ad alta temperatura, varie applicazioni delle tecniche di saldatura, molatura e incisione dei metalli/leghe; i prodotti "indesiderati" che ne derivano sono particelle metalliche e/o di ossidi metallici di dimensioni nanoparticellari, ampia area superficiale specifica e spesso bassa solubilità.

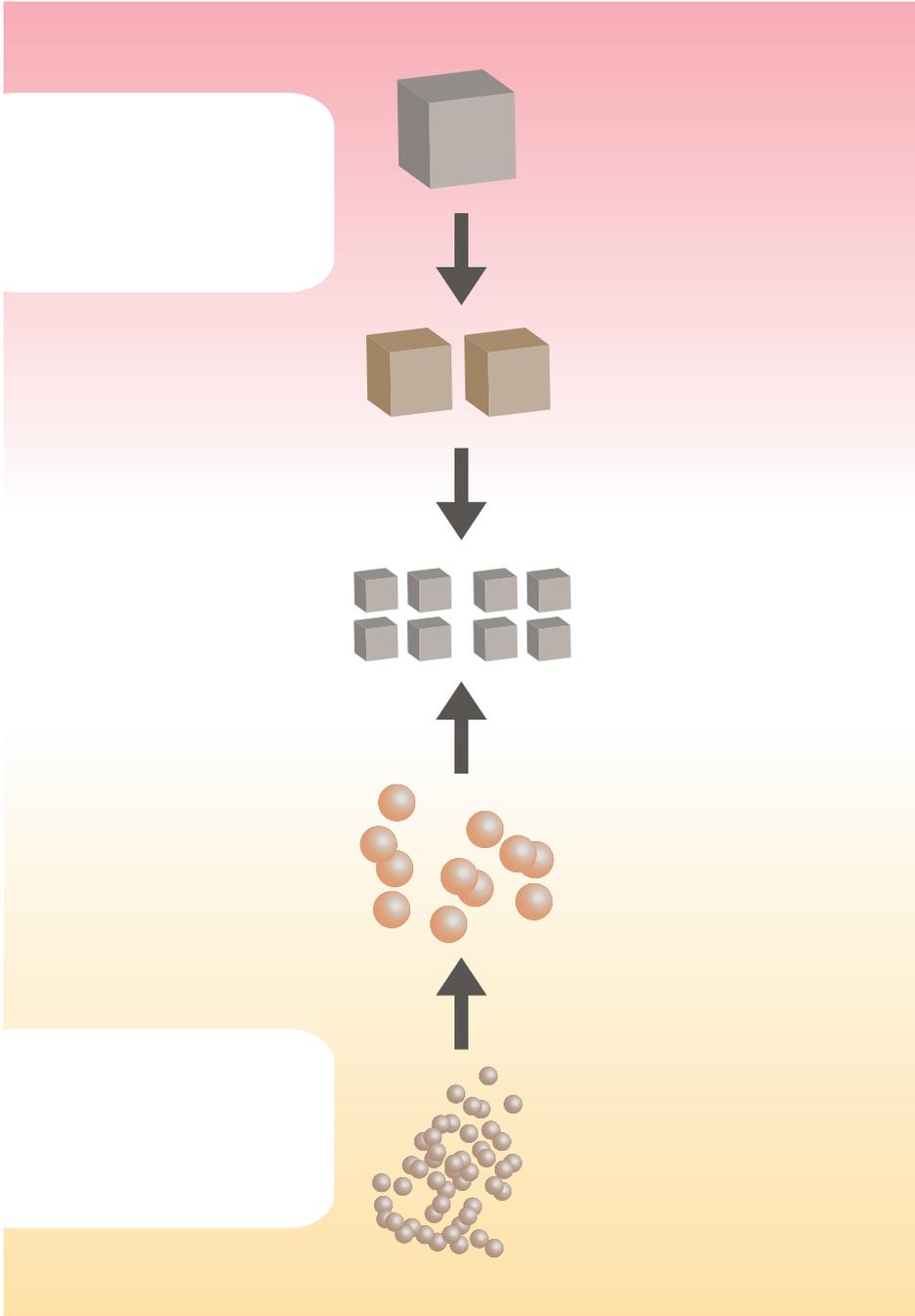


Figura 4.1 - Processi chimico fisici di formazione dei NM (INRS, 2007).

Anche i classici processi di combustione portano alla formazione di NP attraverso reazioni in fase vapore e di nucleazione/condensazione.

Le caratteristiche delle particelle che si generano da questi processi dipendono dalle condizioni chimico-fisiche in cui tali processi avvengono. Tuttavia, le particelle primarie hanno generalmente un diametro compreso fra 10 nm e 50 nm e coagulano rapidamente in funzione della maggior concentrazione nel punto d'origine fino a raggiungere dimensioni superiori a quelle definite per le NP.

Particelle generate da sorgenti puntuali, ad alta temperatura e concentrazione – quali ad esempio i fumi di saldatura – sono destinate ad una rapida condensazione già a breve distanza dalla sorgente per cui, al fine della valutazione della potenziale

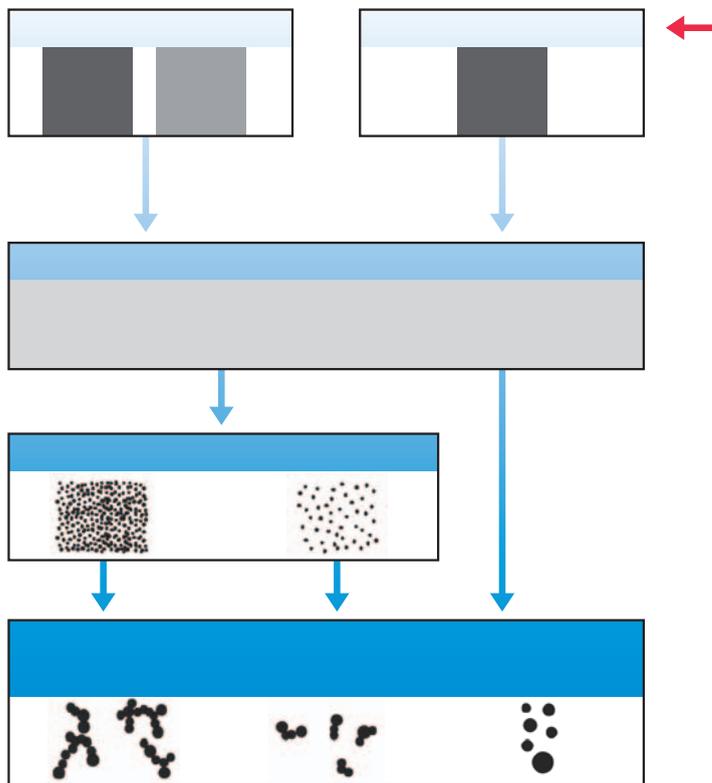


Figura 4.2 - Processi di formazione delle NP (BIA, 2003).

esposizione a NP, diventerà fondamentale definire ad esempio la posizione delle vie respiratorie dell'operatore rispetto alla sorgente e di conseguenza la posizione del substrato di campionamento. Al contrario, in sorgenti "diffuse", con temperature alla sorgente relativamente più basse quali la rifinitura dei metalli/leghe, si avrà una rapida diminuzione del processo di coagulazione, con la conseguenza che le particelle nanometriche generate saranno in grado di mantenere le loro caratteristiche dimensionali e di aerodispersarsi maggiormente, con più possibilità d'interessare le vie respiratorie dell'operatore e/o di altre persone nelle vicinanze.

Un altro gruppo di processi termici che portano alla generazione di aerosol aventi un'elevata area superficiale specifica riguarda la formazione del nero di carbone (carbon black), le NP di TiO₂, i fumi da vaporizzazione di allumina e silice. Spesso questi processi generano particelle agglomerate di dimensioni superiori a quelle delle NP (maggiori di 100 nm), che tuttavia sono caratterizzate da un'area superficiale specifica superiore a 300 m²/g. Nello stesso gruppo vanno annoverati materiali, prodotti per via umida ma utilizzati come polveri secche, quali il nero di rutenio, il nero di palladio ed alcuni tipi di TiO₂

4.1.1 Processi di fabbricazione di nano-oggetti o NM

Attualmente i processi tecnologici che consentono la fabbricazione di oggetti/NM possono essere riassunti come in Tabella 4.1.

Tabella 4.1 - Processi di formazione delle NP	
Categoria	Tipo di Processo
Per via fisica	<ul style="list-style-type: none"> • Evaporazione/condensazione • Ablazione laser • Scarica elettrica • Fiamme di combustione • Pirolisi mediante laser • Microonde • Irraggiamento ionico o elettrochimico • Decomposizione catalitica • Deposizione in fase vapore (deposizione fisica in fase vapore)
Per via chimica	<ul style="list-style-type: none"> • Reazione in fase vapore (<i>deposizione chimica in fase vapore</i>) • Reazioni in fase liquida: co-precipitazione chimica, idrolisi, ecc. • Reazioni in fase solida • Fluidi supercritici con reazione chimica • Tecniche in soluzione/gel: a base di silice, ossidi di metalli
Per via meccanica	<ul style="list-style-type: none"> • Frantumazione ad alta energia o sintesi meccanica • Saldatura • Tecniche di deformazione ad alta energia meccanica: torsione, frizione, laminazione, ecc.

Tali processi comportano i rischi di potenziale esposizione riassunti in Tabella 4.2.

Tabella 4.2 - Rischi di potenziale esposizione nei processi produttivi intenzionali di NP			
Processi di sintesi	Formazione delle particelle	Rischi potenziali di inalazione	Rischio cutaneo potenziale rischio di ingestione
Da fase gassosa	In aria	Dispersione diretta dal reattore; Recupero del prodotto; Lavorazioni successive al recupero e imballaggio	Contaminazione da particelle aerodisperse nell'ambiente di lavoro; Manipolazione del prodotto Pulizia / manutenzione dell'impianto
Da fase vapore	Sul substrato	Recupero del prodotto Lavorazioni successive al recupero e imballaggio	Contaminazione da polveri asciutte nell'ambiente di lavoro; Manipolazione del prodotto Pulizia / manutenzione dell'impianto
Colloidale	Sospensione liquida	Essiccamento del prodotto Lavorazione e travaso	Travaso/ Contaminazione dell'ambiente di lavoro; Manipolazione del prodotto Pulizia / manutenzione dell'impianto
Attrito meccanico	Sospensione liquida	Essiccamento del prodotto Lavorazione e travaso	Travaso/ Contaminazione dell'ambiente di lavoro; Manipolazione del prodotto Pulizia / manutenzione dell'impianto

4.1.2 Fonti di aerodispersione di NP

Nella Tabella 4.3 sono riportati esempi individuati dall'*International Standardization Organisation (ISO)* di potenziali fonti d'esposizione a NP in termini di cicli tecnologici/attività che ne comportano la formazione anche non intenzionale (ISO/TR, 2007):

Tabella 4.3 - Fonti di aerodispersione di NP	
Processo	Fonte/attività specifica
Processi a caldo	<ul style="list-style-type: none"> • Raffinazione dei metalli • Fusione dell'acciaio • Galvanica • Taglio metalli mediante torcia termica • Rivestimento mediante spray termico • Applicazione di cere a caldo • Fusione dell'alluminio • Fusione del ferro • Saldatura • Taglio metalli mediante laser • Cottura
Combustione	<ul style="list-style-type: none"> • Motori diesel • Motori con combustibili gassosi • Impianti di riscaldamento a gas • Motori a benzina • Inceneritori
Aerosol negli ambienti indoor	<ul style="list-style-type: none"> • Formazione di aerosol per reazione fra emissioni in fase gas/vapore da macchine d'ufficio, materiali per la pulizia
Processi meccanici	<ul style="list-style-type: none"> • Processi di rettifica, molatura, affilatura, levigatura e lavorazioni con utensili in genere • Trapanatura ad alta velocità
Generazione di particolato da processi a fiamma	<ul style="list-style-type: none"> • Produzione di nero di carbone (<i>carbon black</i>) • Produzione di silice vaporizzata • Produzione di TiO₂ ultrafine • Produzione di allumina vaporizzata
Manipolazione materiali	<ul style="list-style-type: none"> • Manipolazione di polveri di nanoparticelle • Manipolazione di depositi colloidali secchi
Nanotecnologie	<ul style="list-style-type: none"> • Produzione di nanotubi • Manipolazione ed uso di nanoparticelle precostruite • Produzione in fase gassosa di nanoparticelle precostruite • Aerosol di sospensioni, soluzioni e miscele di nanoparticelle precostruite

4.2 Potenziali vie di esposizione

Esistono quattro vie principali attraverso le quali i lavoratori possono essere esposti ai NM: inalatoria, cutanea, olfattiva e ingestiva.

4.2.1 Inalazione

La via di esposizione più comune alle particelle aerodisperse negli ambienti lavorativi è quella inalatoria. Come avviene per altri tipi di particelle, la deposizione di NP nel tratto respiratorio è determinata dal loro diametro. Gli agglomerati di NP si depositeranno in funzione del diametro dell'intero agglomerato e non di quello delle singole NP costituenti. Conformemente al modello di deposizione accreditato (ICRP, 1994) è prevista una sostanziale deposizione in tutte le diverse regioni polmonari, in modo predominante nella regione alveolare, ma anche nelle regioni tracheobronchiale ed extra-toracica (Figura 4.3) (ISO, 2008; Yeh HC et al. 1996).

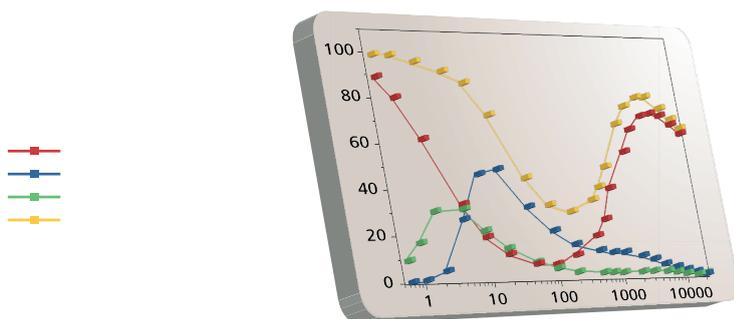


Figura 4.3 – Probabilità di deposizione totale e regionale delle particelle nel tratto respiratorio umano in funzione delle loro dimensioni sulla base del modello ICRP 66. La frazione depositata include la probabilità delle particelle inalabili (inalabilità). Viene considerato un soggetto che respira con il naso e svolge un lavoro standard.

Occorre, altresì, considerare che, a seguito della deposizione, il destino delle NP dipende dalla loro biopersistenza (durabilità), e dal loro potenziale di traslocazione ad altri organi e tessuti. Sono tuttora in corso ricerche per determinare i fattori che regolano tali fenomeni ed i meccanismi che contribuiscono all'agglomerazione e de-agglomerazione delle NP, nonché il loro ruolo nell'attività tossica dopo l'inalazione (Maynard AD and Kuempel ED, 2005).

L'*International Commission on Radiological Protection* (ICRP) ha di recente aggiornato e commentato i modelli di deposizione delle particelle nelle vie aeree in base al loro diametro aerodinamico, distinguendo 5 aree: 1) regione extratoracica 1 (RE1) che comprende il naso anteriore; 2) regione extratoracica 2 (RE2) che comprende il passaggio nasale posteriore, bocca, laringe e faringe; 3) regione bronchiale 1 (RB1) che comprende trachea e bronchi; 4) regione bronchiale 2 (RB2) che comprende bronchioli e bronchioli terminali; 5) regione alveolare-interstiziale (RA) (ICRP, 1994; ICRP, 2002; Bailey MR et al, 2003). Utilizzando il modello *Activity Median Thermodynamic Diameter* (AMTD), che basa le sue ipotesi partendo dall'assunto che la deposizione delle particelle con diametro aerodinamico minore di 100 nm avvenga prevalentemente per diffusione, l'ICRP ha calcolato la percentuale di deposizione delle NP fissando parametri sperimentali al contorno per applicare il modello, qui riassunti:

- Distribuzione log-normale del diametro delle particelle;
- Densità 3 g/cm³; la densità comunque influisce poco sulla deposizione delle NP.
- Fattore di forma 1.5, ossia particelle compatte, irregolari e non sferiche.

In Tabella 4.4 è riportata la deposizione in percentuale nei diversi compartimenti, considerando i lavoratori in due diverse condizioni: attività lavorativa normale (flusso=1.2 m³/h) ed intensa (flusso 1.7 m³/h) e con due diversi tipi di respirazione: nasale e buccale.

Tabella 4.4 - Percentuale di deposizione delle NP nei diversi compartimenti delle vie aeree secondo il modello ICRP

Lavoratore flusso normale (1.2 m3/h) – Respirazione per naso - Respirazione per bocca						
D.A (nm)	RE1 (%)	RE2 (%)	RB1 (%)	RB2 (%)	RA (%)	Totale (%)
5	16.0 – 7.5	18.0 – 18.0	5.6 – 6.2	26.0 – 30.0	27.0 – 30.0	92.0 – 91.0
10	8.7 – 4.2	9.8 – 9.9	3.0 – 3.2	19.0 – 20.0	47.0 – 50.0	88.0 – 87.0
20	5.3 – 2.6	5.9 – 6.0	1.8 – 1.8	12.6 – 13.0	49.0 – 50.0	74.0 – 73.0
50	3.2 – 1.5	3.4 – 3.4	1.0 – 1.0	7.2 – 7.4	31.0 – 32.0	46.0 – 45.0
100	3.2 – 1.2	3.2 – 2.4	0.8 – 0.8	4.8 – 4.8	21.0 – 21.0	33.0 – 30.0
Lavoratore flusso forzato (1.7 m3/h) – Respirazione per naso -Respirazione per bocca						
D.A (nm)	RE1 (%)	RE2 (%)	RB1 (%)	RB2 (%)	RA (%)	Totale (%)
5	14.0 – 6.3	17.0 – 17.0	4.8 – 5.4	26.0 – 28.0	32.0 – 35.0	92.0 – 92.0
10	7.6 – 3.6	9.6 – 9.6	2.6 – 2.8	17.2 – 18.2	51.0 – 54.0	88.0 – 88.0
20	4.7 – 2.2	5.8 – 5.8	1.5 – 1.6	11.4 – 11.8	50.0 – 51.0	74.0 – 73.0
50	2.8 – 1.3	3.3 – 3.4	0.9 – 0.9	6.4 – 6.6	31.0 – 32.0	45.0 – 44.0
100	2.9 – 1.1	3.2 – 2.4	0.7 – 0.7	4.2 – 4.2	20.0 – 21.0	31.0 – 29.0

Partendo dal presupposto che tra le condizioni ci sono variazioni anche significative (nella respirazione buccale la deposizione in RE1 è chiaramente inferiore che nella respirazione nasale), prendiamo in considerazione la respirazione nasale ad attività lavorativa normale per spiegare in dettaglio i risultati.

Le particelle assai piccole (5 nm) si depositano ad alte percentuali (92%) più o meno lungo tutte le vie aeree: 34% nella regione extratoracica (RE1+RE2), 31.6% nella regione bronchiale (RB1+RB2) e 27% in RA. A 10 nm si ha un leggero calo della deposizione totale (88%), ma aumenta la deposizione alveolare rispetto alle altre due frazioni. Questo fenomeno diventa man mano più evidente quando aumenta il diametro aerodinamico fino a 100 nm, dove la deposizione totale scende al 33%, di cui il 21% alveolare. In sostanza, quindi, la componente alveolare diviene man mano preponderante all'aumentare delle dimensioni, pur diminuendo la deposizione totale. Sulla base di questi dati, quindi, l'interazione tra NP e basse vie aeree è forse la più rilevante dal punto di vista tossicologico. C'è infine da sottolineare che, poiché i modelli di deposizione dipendono dalle dimensioni, si presume che NP strutturate e particelle ultrafini non strutturate abbiano percentuali di deposizione comparabili. Può invece variare l'interazione tra le NP e i sistemi biologici in base alle specifiche caratteristiche chimico-fisiche delle NP (vedi Capitolo 1, paragrafo 1.2).

Il modello non è ovviamente valido per le nanofibre, poiché la lunghezza può essere anche di diversi micron. In questi casi, la deposizione è altamente dipendente dal tipo di fibra ed esistono prevalentemente modelli animali di deposizione (Szoke R et al, 2007; Lentz TJ et al 2003; Warheit DB et al, 1994; Coin PG et al, 1992; Tanaka I et al, 1994; Yamato H et al 1994).

Nonostante l'accumulo cellulare, la tossicità e la tossicocinetica delle NP strutturate inalate dipendano altamente dalle specifiche caratteristiche chimico-fisiche delle particelle stesse, si possono individuare alcune caratteristiche comuni utili per definire l'interazione tra polmoni e NP (Yang W et al, 2008). Inizialmente, le particelle vengono incorporate nel fluido che ricopre la superficie epiteliale alveolare, *epithelial lining fluid* (ELF), con un'efficienza inversamente proporzionale alle dimensioni (Geiser M et al, 2003), senza che per questo il film formato dal surfactante venga destabilizzato (Stuart D et al, 2006). Le particelle più solubili si dissolvono *in situ*. Le molecole insolubili nel muco e nel *lining fluid*, d'altra parte, non sono assorbite rapidamente, ma possono subire una traslocazione fisica, in base alla regione dove sono depositate (Oberdorster G et al, 2005) e ai sistemi difensivi dell'organismo. Diversi meccanismi possono quindi attivarsi: trasporto mucociliare, fagocitosi da parte dei macrofagi ed endocitosi (Gumbleton M, 2001; Arredouani M et al 2004).

Il trasporto mucociliare è efficiente prevalentemente nelle alte vie aeree (Heyder J et al, 1986), mentre fagocitosi ed endocitosi sono i meccanismi prevalenti di trasporto

delle particelle depositate negli alveoli (Sibille Y and Reynolds HY, 1990). Se le micro-particelle sono rimosse dai macrofagi con alta efficienza, le particelle di diametro aerodinamico $<0.26 \mu\text{m}$ possono eludere il sistema macrofagico grazie alle loro piccole dimensioni (Chono S et al, 2006; Lauweryns JM and Baert JH, 1977). Per questa ragione, le NP arrivano ad interagire facilmente con le cellule dell'epitelio (Nel A et al, 2006). Si pensa che il fenomeno prevalente di endocitosi sia in tale sede il trasporto attraverso caveole, anche se questo fenomeno deve essere ancora dimostrato in vivo (Rejman J et al, 2004). Le caveole sono micro-domini delle membrane cellulari contenenti caveolina-1, ampiamente espressi dai capillari dei polmoni e dalle cellule alveolari di tipo I. Le caveole trasportano macroparticelle e particelle con diametro dell'ordine dei nanometri dai polmoni al sangue (Oberdorster G et al, 2005; Rejman J et al, 2004). L'espansione inspiratoria e la contrazione espiratoria degli alveoli polmonari può portare all'apertura e alla chiusura delle caveole (aperture di 40-100 nm), giustificando così il trasporto assistito di macromolecole/NP attraverso la membrana alveolare ed il passaggio delle NP attraverso la barriera alveolo-capillare (Patton JS, 1996) e l'accumulo di particelle nell'interstizio (Semmler-Behnke M et al 2007; Brown JS, et al, 2002). Tuttavia, non c'è accordo tra studi che si sono occupati della traslocazione extra-polmonare delle NP e non è ancora chiaro in che misura le NP inalate raggiungano la circolazione sistemica e di conseguenza altri organi (Card JW, et al, 2008). È infine possibile anche il trasporto attraverso i pori ed è stato dimostrato che l'accumulo di NP all'interno delle cellule non avviene necessariamente solo per endocitosi, ma anche per diffusione ed interazioni adesive (Geiser M et al, 2005).

4.2.1.1 Definizione dei Valori Limite di Soglia

Un ulteriore punto della tematica sul quale focalizzare l'attenzione è legato alle incertezze nell'individuazione di eventuali differenze o analogie riscontrabili nell'impatto biologico di NP che si depositano nel sistema respiratorio rispetto a quello di agglomerati o aggregati contenenti lo stesso volume di materiale che subiscono processi di de-agglomerazione o disaggregazione dopo la deposizione, Così come viene evidenziato anche dalla Norma ISO/TR 27628 (ISO/TR, 2007), se la risposta biologica è associata con l'area superficiale dell'aerosol depositato, per un dato volume di materiale la risposta all'agglomerato/aggregato con una struttura aperta simil-frattale sarà presumibilmente simile a quella di una dose equivalente di particelle discrete. D'altra parte se le interazioni biologiche che seguono la deposizione sono governate dal diametro delle particelle, è verosimilmente ipotizzabile che la risposta a NP discrete che si depositano nel tratto respiratorio differirà da quella di una dose equivalente di particelle agglomerate/aggregate che non si separano nella fase di deposizione.

Sulla base di tali premesse è opportuno evidenziare che la definizione di standard normativi di riferimento dovrà considerare alcuni aspetti fondamentali: in particolare i Valori Limite di esposizione professionale dovranno tenere conto in maniera globale sia di NP discrete, sia di agglomerati/aggregati di NP nel caso in cui si riscontri una similitudine negli effetti sulla salute derivanti dall'esposizione (in relazione ad una possibile indipendenza dalle caratteristiche dimensionali delle particelle che si depositano); nel caso contrario dovranno invece necessariamente essere fissati limiti igienistici differenziati.

4.2.2 Contatto cutaneo

Negli ambienti lavorativi si può verificare esposizione ai NM per contatto cutaneo durante la loro produzione o utilizzo o per contatto con superfici contaminate. È tuttora oggetto di discussione se e di quanto le NP siano in grado di penetrare nella cute intatta e di causare effetti dannosi. La maggior parte degli studi sperimentali è stata realizzata con singoli tipi di NM, come TiO_2 e ZnO su cute intatta. È stato, inoltre, dimostrato l'assorbimento cutaneo di nanoAg su cute danneggiata (Larese, 2009) e di nanoAu su cute di ratto (Sanovane, 2009).

Gli eventuali effetti sotto lo sforzo di flessione della cute e la penetrazione attraverso la cute danneggiata necessitano ancora di accurata esplorazione (Tinkle SS et al, 2003; Nohynek GJ et al, 2007; Crosera M et al, 2009). La stessa situazione si riscontra nel caso del possibile ruolo dei solventi nel meccanismo di penetrazione cutanea da parte delle NP.

4.2.3 Altre vie d'esposizione

In letteratura, sono riportate altre due possibili vie di esposizione: attraverso il sistema olfattivo e attraverso il tratto gastro-enterico.

Per via dei modelli di deposizione nelle vie aeree presentati nel paragrafo precedente, è evidente come una percentuale non trascurabile di NP, soprattutto se piccole (diametro aerodinamico minore di 50 nm), possa depositarsi nelle alte vie aeree ed in particolare nella mucosa olfattiva. Questa deposizione può giustificare l'assorbimento di NP nel sistema nervoso centrale per passaggio nei nervi olfattivi (Oberdorster G et al, 2004; Elder A et al, 2006). Tale passaggio, tuttavia, dipende enormemente dalle proprietà chimico-fisiche delle particelle e dalla variabilità inter-specie (Oberdorster G et al, 2005) e al momento non è ancora stata dimostrata in vivo sull'uomo.

NM in forma di particelle, d'altra parte, possono essere ingeriti deglutendo il muco che incorpora e ripulisce le NP depositate lungo il tratto respiratorio, nonché per assunzione

di cibi ed acqua contaminati oppure per contatto orale con mani e superfici contaminate (Lomer MC et al, 2002; Tiede K et al, 2008). Diversi studi sui ratti hanno dimostrato che particelle tra 50 nm e 20 μm possono essere assorbite attraverso le placche di Peyer del piccolo intestino, nonostante esse coprano solo una piccola porzione del piccolo intestino stesso (Jani P et al, 1990; O'Hagan DT, 1996; Gullberg E et al, 2006), ma si suppone anche le NP possano essere assorbite dagli enterociti intestinali (Carr KE et al, 1996; Hillyer JF and Albrecht RM, 2001; Des Rieux A et al, 2006). Fattori chimico-fisici che possono influire sul processo di assorbimento intestinale (*persorption*) sono la carica e ovviamente le dimensioni delle NP (Jani P et al, 1990; Florence AT, 1997; Hussain N et al, 2001; Gaumet M et al, 2009). Anche in questo caso, studi sull'uomo sono praticamente assenti (Des Rieux A et al, 2006).

4.3 Rassegna dei metodi per la caratterizzazione dell'esposizione inalatoria a nanomateriali.

La presenza dei NM ingegnerizzati nei luoghi di lavoro e nell'ambiente generale rappresenta un'immediata sfida su come gestire effettivamente la salute e la sicurezza negli ambienti di vita e di lavoro. Ancora poco è conosciuto su quali possano essere i rischi immediati o come gestirli e ancora meno su come sia possibile prevedere e gestire i rischi da queste nuove tecnologie nei prossimi anni (Maynard, 2007). Questo può essere attribuito al recente sviluppo del settore delle nanotecnologie, oltre che alla carenza di informazioni sull'esposizione umana e sulle condizioni lavorative. In particolare le nostre capacità di misurare l'esposizione a NM negli ambienti di lavoro sono limitate dalla tecnologia corrente. Al momento, infatti, si riscontrano molte lacune riguardo all'identificazione, alla caratterizzazione ed alla valutazione della potenziale esposizione lavorativa nel settore delle nanotecnologie a causa delle scarse informazioni inerenti agli aspetti metrologici (quali dimensioni, massa, composizione chimica, area superficiale, concentrazione, stato di aggregazione e di agglomerazione, solubilità in acqua e chimica superficiale) che possono concorrere a determinare il grado di tossicità e la pericolosità dell'interazione dei NM con l'organismo umano e che portano, di conseguenza, alla mancata individuazione di valori limite igienistici di riferimento.

La determinazione simultanea di più caratteristiche richiede pertanto l'impiego contemporaneo di apparecchiature multiple e, inoltre, sebbene i più recenti sviluppi della tecnologia offrano strumentazioni in grado di misurare gran parte dei parametri considerati maggiormente significativi, le caratteristiche di questi strumenti non ne consentono l'uso personale. In attesa dello sviluppo di strumentazione personale in grado di fornire la misura dei parametri appropriati, applicabile al monitoraggio sistematico dell'esposizione, è necessario operare disegnando un'idonea strategia di campiona-

mento che tenga conto delle limitazioni interpretative per una stima dell'esposizione basata su campionamenti di area (Marconi, 2007).

Una buona parte delle informazioni riportate è basata sulla documentazione in corso di preparazione da parte del *National Institute for Occupational Safety and Health* (NIOSH) (NIOSH, 2008) e del *Working Party on Nanomaterials* (WNPM) dell'*OECD, Steering Group 8 (SG8)*.

Poiché attualmente non esistono valori limite di esposizione occupazionali per i NM (con l'eccezione del nero di carbone in Giappone), per affrontare il problema della valutazione dell'esposizione occorre adottare un approccio basato su di una valutazione qualitativa (o semi-quantitativa) in grado di determinare l'esistenza di un rilascio di NM durante le fasi del processo produttivo.

Tale sistema di valutazione è imperniato sul confronto tra le concentrazioni di particelle vicino al punto di emissione e le concentrazioni di fondo. Benché i risultati di questa valutazione non possano essere interpretati come rappresentativi dell'esposizione personale, essi forniscono una determinazione semi-quantitativa del rilascio di NM nell'ambiente di lavoro e possono essere utilizzati vantaggiosamente dagli esperti sanitari e della sicurezza, e dagli igienisti industriali. L'ottenimento di questi risultati, infatti, consente di effettuare una stima semi-quantitativa dell'esposizione personale (Koshi, 1980) che può orientare la scelta nella selezione di appropriate tecniche di mitigazione dell'esposizione (ad esempio per la protezione cutanea) (Wendel-de-Joode, 2003). La loro acquisizione, inoltre, permette di determinare se le misure di prevenzione esistenti siano adeguate al controllo delle emissioni o se siano necessari ulteriori controlli.

Diversi paesi in questi ultimi anni hanno dato inizio ad indagini per la determinazione dell'esposizione negli insediamenti produttivi in cui sono utilizzate le nanotecnologie, sviluppando specifici protocolli di valutazione. Negli Stati Uniti, il NIOSH ha organizzato gruppi operativi per la valutazione dei processi lavorativi, dei materiali e delle tecnologie di controllo associati alle nanotecnologie fin dal 2006¹ (Methner, 2007; Methner, 2008). Queste iniziative hanno consentito una generale valutazione della strumentazione in grado di fornire la caratterizzazione dei NM negli ambienti di lavoro e la preparazione di indicazioni per la valutazione delle emissioni che permettono di caratterizzare semi-quantitativamente i luoghi di lavoro dove può verificarsi il rilascio di NM (NIOSH, 2007; NIOSH, 2008).

A livello europeo sono state attivate numerose iniziative di studio che spaziano dall'identificazione delle sorgenti di NM, alla caratterizzazione delle NP, al campionamento ed alla misura in tempo reale, alla determinazione dell'esposizione inalatoria e cutanea, allo studio del comportamento aerodinamico dei NM (adesione, coagula-

¹ www.cdc.gov/niosh/docs/2008-121/ ; www.cdc.gov/niosh/docs/2008-120/

zione, aggregazione e/o agglomerazione), fino alle strategie e tecniche per la valutazione della distinzione tra contributo del fondo rispetto alle specifiche emissioni di NM. Maggiori e più aggiornate informazioni su queste attività sono reperibili nelle presentazioni dei vari progetti di ricerca europei (NANOSAFE2, NANOSH, NANOTRANSPORT, NANODEVICE, IMPART, etc.) descritti nel Capitolo 3 della presente trattazione.

L'ISO ha predisposto importanti documenti informativi ed orientativi per la valutazione e la gestione dei rischi potenzialmente associati all'uso dei NM negli ambienti lavorativi, nei quali viene affrontato il tema della valutazione e della misura dell'esposizione occupazionale a NP, aerosol nanostrutturati e a NP ingegnerizzate (ISO/TR, 2007; ISO/TR, 2008; ISO/NP TS, 2008), nonché esaminati gli aspetti inerenti alla terminologia (UNI CEN ISO/TS, 2010; ISO/DTS, 2010). Negli USA, già nel 2007 l'*American Society of Testing Materials* (ASTM) ha pubblicato una guida per la manipolazione dei NM negli ambienti lavorativi (ASTM, 2007).

Finché non saranno disponibili informazioni sui meccanismi di azione biologica associati ai NM, non vi sarà certezza sulla più appropriata tecnica di misura per determinare l'esposizione lavorativa. Sulla base delle conoscenze disponibili, numerosi sono i parametri con potenziale rilievo sanitario che occorrerebbe conoscere per caratterizzare l'esposizione ai NM.

Per la valutazione dell'esposizione e della dose, oltre alle informazioni tradizionali sulla massa e la sua caratterizzazione, sarebbero necessari dati sulla distribuzione dimensionale, sul numero e/o sull'area superficiale e, possibilmente, sul chimismo superficiale delle particelle.

Benché esistano tecniche appropriate alla misura di questi parametri, solo alcune di queste sono applicabili per la determinazione di routine dell'esposizione. Nel caso dei NM, appare, al momento, di difficile realizzazione la completa caratterizzazione dell'esposizione mediante la determinazione di tutti i parametri che possono avere rilevanza tossicologica.

Nelle sezioni a seguire verranno esaminati gli aspetti inerenti alle principali tecniche di campionamento e di analisi nell'ambito della strategia di approccio alla valutazione dell'esposizione professionale.

4.3.1 I sistemi di campionamento e di misura

Allo stato attuale non esiste un metodo di campionamento che permetta di valutare l'esposizione al particolato aerodisperso nanometrico. Ogni tentativo di valutare l'esposizione alle NP che caratterizzano i NM deve essere basato sull'impiego di più tecniche di campionamento e di misura (Tabella 4.5).

Tabella 4.5: Metodi per il campionamento e la misura di NP		
Misura	Metodo	Commento
Massa	Campionatore personale con separazione in classi dimensionali	Attualmente non esiste un dispositivo che campioni la frazione con un taglio nell'intervallo dimensionale inferiore ai 100 nm. È pertanto necessaria la rilevazione gravimetrica o chimica off-line. La massa potrebbe essere anche derivata da misure della distribuzione dimensionale.
	Campionatori statici con separazioni in classi dimensionali	Gli unici dispositivi che offrono un taglio dimensionale inferiore ai 100 nm (fino all'ordine dei 10 nm) sono gli impattori a cascata.
	Tapered Element Oscillating Microbalance (TEOM®)	Per la misura on-line della concentrazione di massa dei nanoaerosol con un idoneo ingresso selettivo alle dimensioni.
	Scanning Mobility Particle Sizer (SMPS)	Analisi in tempo reale e suddivisione delle particelle in classi dimensionali, si basa sulla mobilità elettrica delle particelle; intervallo da 3 nm a 800 nm.
	Electrical Low Pressure Impactor (ELPI)	Analisi in tempo reale, si basa sulla separazione inerziale e la carica delle particelle. Misura della concentrazione numerica. Raccolta dei campioni.
Numero	Optical Particle Counter (OPC)	Non rilevabili particelle inferiori a 300 nm.
	Condensation Particle Counters (CPC)	Analisi in tempo reale di particelle fino a 100 nm.
	Scanning Mobility Particle Sizer (SMPS)	Analisi in tempo reale e suddivisione delle particelle in classi dimensionali, si basa sulla mobilità elettrica delle particelle; intervallo da 3 nm a 800 nm.
	Electrical Low Pressure Impactor (ELPI)	Analisi in tempo reale, si basa sulla separazione inerziale e la carica delle particelle. Misura della concentrazione numerica. Raccolta dei campioni.
Area di superficie	Epifaniometro	Misura la radioattività indotta delle particelle che è proporzionale all'area superficiale attiva.
	Caricatori a diffusione	Misura dell'area superficiale attiva sotto 100 nm in funzione dell'aderenza alla superficie di ioni positivi. Necessitano di preseparatori.
	SMPS	Analisi in tempo reale e suddivisione delle particelle in classi dimensionali, si basa sulla mobilità elettrica delle particelle; intervallo da 3 a 800 nm.
	ELPI	Analisi in tempo reale, si basa sulla separazione inerziale e la carica delle particelle. Misura della concentrazione numerica. Raccolta dei campioni.
	BET (Brunauer, Emmett and Teller method)	Si basa sulla misura dell'assorbimento di un gas (N ₂) sulla superficie delle particelle.
Analisi d'immagine	Scanning Electron-Microscopy (SEM); Transmission Electron-Microscopy (TEM)	Analisi indiretta dell'area proiettata delle NP. I campioni possono essere raccolti da campionatori personali o campionatori statici a selezione dimensionale.

Le tecniche di monitoraggio e di caratterizzazione ad oggi disponibili nel settore, discusse nelle norme ISO/TR 27628 (ISO/TR, 2007) e ISO/TR 12885 (ISO/TR, 2008), rendono fattibile una valutazione dell'esposizione a NP e nanoaerosol in termini di massa, numero e area superficiale e rappresentano una base per lo sviluppo di ulteriori standard per la caratterizzazione dell'esposizione, per quanto la maggior parte delle strumentazioni in tale settore sia comunque destinata ad un adattamento in termini di compattezza, portabilità e costi ai fini di applicazioni di routine negli ambienti di lavoro.

La valutazione e la caratterizzazione dell'esposizione professionale a NM (così come a NP e a nanoaerosol) è fortemente limitata dalla mancanza di strumentazioni idonee per il campionamento di tipo personale e, pertanto, l'impiego combinato di dispositivi per le misure *in-situ* e per l'analisi *off-line* di campioni rappresenta al momento lo strumento di elezione nell'ambito della valutazione dell'esposizione personale negli ambienti di lavoro.

I campioni di aerosol possono essere prelevati con sistemi che selezionano la frazione inalabile, toracica e respirabile. Poiché le attuali conoscenze suggeriscono che le regioni di scambio gassoso sono potenzialmente più suscettibili alle NP (ICRP, 1994; Yeh, 1996), la frazione da prelevare dovrebbe essere quella respirabile. Tale determinazione di massa (associata eventualmente alla sua caratterizzazione chimica), tuttavia, non fornisce informazioni sul numero, le dimensioni, e la superficie, ma può essere utilizzata come una misura surrogata se si possiedono informazioni sulla distribuzione dimensionale o sull'area superficiale specifica (Möhlmann, 2004).

L'uso dei sistemi ad impatto convenzionali per la determinazione dell'esposizione ai NM risulta limitato, in quanto la dimensione limite di impatto è situata in pratica tra 200 e 300 nm. Esistono impattori a bassa pressione, del tipo Electrical Low Pressure Impactor (ELPI)², i quali campionano le particelle dopo averle caricate elettricamente. La loro carica in ogni stadio di impatto viene misurata da un elettrometro multicanale. Un sistema simile (nano-MOUDI) è stato introdotto recentemente sul mercato³. Questi strumenti possono misurare particelle fino a circa 10 nm come prelevatori statici, ma le loro dimensioni e complessità ne precludono l'utilizzo come campionatori personali. Attualmente, tuttavia, è disponibile sul mercato un tipo di impattore personale che fornisce una dimensione di taglio a 250 nm (Misra, 2002) e potrebbe essere usato per approssimare la misura della concentrazione di massa di NP nella zona respiratoria del lavoratore. Questi strumenti offrono il vantaggio di consentire la caratterizzazione chimico-fisica delle particelle raccolte sui singoli substrati, ma hanno la limitazione di non discriminare gli agglomerati di NP da singole particelle con le stesse dimensioni.

² www.dekati.com

³ <http://appliedphysicsusa.com/moudi.asp>

La misura della concentrazione numerica di particelle aerodisperse a partire da 10 nm risulta relativamente semplice mediante i *Condensation Particle Counter* (CPC) e può essere estesa senza difficoltà fino a 3 nm. Questi sistemi convogliano le particelle entranti in una camera soprassaturata di vapore (alcol butilico, isopropilico), in tal modo sulle particelle più piccole si ha la formazione di goccioline da 100 a 1000 volte maggiori delle dimensioni iniziali delle particelle (McMurry, 2000). Le goccioline, quindi, attraversano un sensore ottico che misura l'attenuazione della luce ed i risultati vengono convertiti in concentrazione.

Questi strumenti vengono largamente utilizzati per la misura delle particelle ultrafini nell'atmosfera urbana (Kim, 2002; Zhu, 2002; Aalto, 2005; Marconi, 2007a). Poiché questi sistemi non forniscono la separazione in classi dimensionali (salvo l'eventuale selezione all'ingresso), risulta difficile distinguere tra le diverse sorgenti di NM generati dai singoli processi, oppure tra queste e quelle presenti nel fondo dell'ambiente. Queste limitazioni sono state evidenziate nel recente studio in un impianto per la produzione di nero di carbone (Kuhlbusch, 2004). Malgrado ciò, l'utilizzo di queste misure, eseguite vicino alle potenziali sorgenti, è stato proposto per l'identificazione grezza delle NP emesse dalle sorgenti lavorative (Brouwer, 2004).

I dispositivi di questo tipo sono utilizzabili solo in modo statico, ma di recente è disponibile un tipo portatile che opera in un intervallo da 10 nm a 1.000 nm ed a concentrazioni fino a 105 p/cm³. Strumenti che forniscono informazioni sia sul numero che sulle dimensioni delle NP sono oggi disponibili commercialmente. Benché siano più complessi e costosi, gli *Scanning Mobility Particle Sizers* (SMPS)⁴ consentono la misura della distribuzione dimensionale approssimativamente da 3 nm a 800 nm (Flagan, 2001). Questi dispositivi operano fornendo una carica elettrostatica alle particelle e separandole in funzione della loro mobilità elettrica tramite il passaggio tra due elettrodi o tra una nube di ioni generati da una sorgente radioattiva. Le particelle così separate vengono conteggiate mediante un CPC. La più recente versione di questo tipo di strumentazione, il *Fast Mobility Particle Sizer* (FMPS)⁴, consente di ottenere la distribuzione dimensionale ancora più rapidamente (pochi secondi, rispetto a qualche minuto dello SMPS) e, grazie ad una serie di elettrometri come sensori della carica delle particelle, evita l'uso della sorgente radioattiva.

Le tecniche finora descritte, benché sensibili nella determinazione di particelle con dimensioni di qualche nanometro, sono limitate nella loro capacità di distinguere le singole NP da quelle formate da agglomerati di particelle più piccole.

Diversi studi tossicologici supportano la necessità di misurare l'area superficiale delle NP, in quanto maggiormente correlata con i potenziali effetti biologici (HSE, 2004; EPA, 2005; NIOSH, 2008). Tradizionalmente questo parametro è misurato con la tecnica

⁴www.tsi.com

analitica *Brunauer-Emmet-Teller* (BET), che viene applicata ai materiali pulverulenti in massa, sfruttando le caratteristiche di assorbimento di gas quali azoto, kripton, argon. I campioni forniti dal monitoraggio (su filtri o substrati) negli ambienti lavorativi non consentono di ottenere una massa sufficiente per questo tipo di analisi, che potrebbe, invece, avere un ruolo in una complessiva strategia di monitoraggio se applicata al materiale in massa entrante nel processo lavorativo in esame.

Lo strumento che attualmente consente la misura diretta dell'area superficiale delle particelle aerodisperse è l'epifaniometro (Baltensperger, 1988). Tale dispositivo misura la quantità di radioattività generata da ioni aderenti alla superficie delle particelle, la quale risulta proporzionale all'area superficiale attiva, almeno per dimensioni inferiori a 100 nm. L'epifaniometro non risulta adatto ad un largo utilizzo negli ambienti lavorativi a causa della sua dipendenza da una sorgente radioattiva.

Strumenti di più recente generazione (elettrometri a carica diffusa) potrebbero trovare un uso più largo in ambienti lavorativi, in quanto basati sullo stesso principio del precedente dispositivo, ma operanti con la generazione e l'adesione di ioni positivi unipolari alla superficie delle particelle di aerosol (Keller, 2001).

Tali strumenti sono soggetti a possibili errori se le particelle aerodisperse sono dotate di cariche preesistenti o multiple, tuttavia studi di laboratorio hanno mostrato una buona correlazione con le misure di area superficiale derivate dall'esame in *Transmission Electron-Microscopy* (TEM) per particelle minori di 100 nm (Ku, 2005), mentre una recentissima versione di questo tipo di strumento ha fornito dati che si correlano bene con l'area superficiale delle particelle depositate nel tratto respiratorio umano (Wilson, 2004). Per la misura dell'area superficiale è possibile partire dalle informazioni sulla distribuzione dimensionale, in quanto è stata dimostrata l'associazione tra il diametro di mobilità delle particelle e l'area superficiale nel campo del cammino libero molecolare (Rogak, 1993; Wilson, 2004; Ku, 2005). In tal modo può essere effettuata una stima ragionevole dell'area superficiale, partendo da una distribuzione dimensionale che abbia un diametro modale fino a 100 nm (Maynard, 2002). Questo approccio, tuttavia, richiede strumentazione e sistemi di calcolo difficilmente applicabili al monitoraggio sistematico dell'esposizione.

Come è stato esaminato, diversi campionatori consentono il prelievo del materiale, generalmente su membrane, già suddiviso in intervalli granulometrici.

Questo permette di effettuare ulteriori indagini off-line dei NM tramite analisi chimiche e le microscopie elettroniche ed a scansione di sonda. La misura gravimetrica, sebbene rappresenti la continuità con l'approccio del monitoraggio tradizionale, risulta molto poco sensibile ai NM costituiti da NP.

Per quanto riguarda le metodologie analitiche impiegate nell'ambito della caratterizzazione chimica qualitativa e quantitativa delle sostanze presenti in campioni raccolti

su filtro (attraverso l'impiego di strumentazioni quali gli impattori statici a cascata) sempre più frequente è il ricorso a tecniche ifenate off-line scelte in base alla composizione chimica dei NM in esame.

In particolare l'applicazione di tecniche di *Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry* (ICP-MS) (Montaser, 1998), caratterizzate dalla combinazione di una strumentazione per la spettroscopia in emissione a plasma con un sistema di rivelazione a spettrometria di massa, consente di effettuare determinazioni qualitative e quantitative delle componenti inorganiche di NM a base di metalli o ossidi di metalli naturali o ingegnerizzati. Inoltre, attraverso l'accoppiamento di tecniche di cromatografia liquida (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) a sistemi di rivelazione di spettrometria di massa (HPLC-MS, HPLC-MS-MS) o a fotodiodi (*Diode Array Detector*, DAD) e di gascromatografia a sistemi di rivelazione di spettrometria di massa (GC-MS) è possibile effettuare una caratterizzazione delle impurezze dovute a composti organici a diverso grado di volatilità, eventualmente presenti nei NM ingegnerizzati a causa delle procedure di produzione, che rappresentano un importante contributo al rischio espositivo professionale a nanoaerosol. L'analisi morfologica dei NM si può effettuare tramite tecniche di microscopia elettronica a scansione (SEM) ed a scansione di sonda. La microscopia elettronica a scansione (*Scanning Electron Microscopy*, SEM) (Goldstein, 1981) permette di ottenere informazioni sulla morfologia del NM (forme e dimensioni) con risoluzione inferiori ai 50 nm.

La microscopia elettronica a trasmissione (*Transmission Electron Microscopy*, TEM) (Williams, 1996) permette di ottenere informazioni strutturali con risoluzioni inferiori al nanometro. Inoltre, la TEM tramite la diffrazione degli elettroni, nelle sue diverse modalità (*Selected Area Electron Diffraction*, SAED; *Convergent Beam Electron Diffraction*, CBED; nanodiffrazione), e l'alta risoluzione (*High Resolution TEM*, HRTEM) consente di studiare la struttura cristallina dei NM, mettendo in evidenza anche la presenza di materiale amorfo e di difetti nel reticolo.

Informazioni sulla composizione in elementi dei NM si possono ottenere attraverso l'abbinamento della spettroscopia a dispersione di energia dei raggi X (*Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*, EDXS) ai microscopi elettronici a trasmissione ed a scansione e della spettroscopia a perdita di energia degli elettroni (*Electron Energy Loss Spectroscopy*, EELS) ai microscopi elettronici a trasmissione. Inoltre, analizzando la forma fine dello spettro EELS in prossimità della soglia di un elemento (*Energy-Loss Near Edge Structure*, ELNES), si possono ricavare informazioni sulla natura dei legami chimici di quel determinato elemento, mentre lo studio delle oscillazioni nello spettro successive al picco (*EXtended Energy-Loss Fine Structure*, EXELFS) consente di ottenere informazioni strutturali sul NM.

Anche le microscopie a scansione di sonda possono essere utilizzate per la caratterizzazione dei NM (Albonetti, 2006). Tali microscopi forniscono informazioni morfologiche e mappe di determinate proprietà fisiche della superficie dei NM, con risoluzioni inferiori al nanometro.

Infine, studi inerenti alla composizione chimica superficiale dei NM ed alla struttura elettronica vengono condotti mediante il ricorso di metodologie convenzionali ed avanzate spettro-nanoscopiche quali la microscopia di emissione a fotoelettroni (*PhotoElectron Emission Microscopy*, PEEM), la spettroscopia di fotoemissione a raggi X (*X-ray-photoemission-spectroscopy*, XPS) e la Spettroscopia Ultravioletta a fotoelettroni (*Ultraviolet Photoelectron Spectroscopy*, UPS).

Per assicurare l'ottenimento di misure affidabili, è importante attivare un programma di controllo e garanzia di qualità basato sui seguenti elementi:

- impiego di analizzatori di particelle a lettura diretta calibrati dal costruttore;
- esecuzione giornaliera del controllo del punto di zero su tutti i contatori prima del loro uso;
- calibrazione delle pompe prima e dopo ogni seduta di campionamento (o almeno dopo ogni giornata di prelievi);
- ricorso a laboratori accreditati per le analisi di ogni campione di processo, di fondo, o in massa, assieme ad un appropriato numero di bianchi di campo e di laboratorio.

Per quanto riguarda l'uso di NM di riferimento da includere nelle attività di controllo di qualità, attualmente ne sono disponibili solo alcuni tipi, come ad esempio NP di oro (RM 8011, RM 8012, RM 8013) prodotte dall'*U.S. National Institute of Standards and Technology* (NIST) e quelle di silice (CRM-N° IRMM-204) fornite dalla Commissione *European Joint Research Centre – Institute for Reference Materials and Measurements* (IRMM), Geel, Belgium⁵

Questi tipi di particelle nanometriche hanno morfologia sferica e sono certificati principalmente per le loro dimensioni e, quindi, possono essere utilizzati per la calibrazione ed il controllo di qualità degli strumenti che misurano le dimensioni delle particelle.

Il maggior ostacolo alla produzione di NM di riferimento è l'assenza di consenso sui parametri metrologici e sui metodi.

4.3.1.1 Analisi critica dei mezzi disponibili per la stima/misura dell'esposizione

La strategia di misura basata sulla determinazione delle emissioni per derivare una stima dell'esposizione è suscettibile di vari tipi di limitazioni riguardanti: 1) la variabilità della

⁵per maggiori informazioni consultare il sito: http://ec.europa.eu/dgs/jrc/index.cfm?id=2820&obj_id=220&dt_code=HLN&lang=en.

concentrazione numerica di NP negli ambienti lavorativi, 2) il limite superiore dell'intervallo di misura entro cui operano i CPC, 3) lo stato di aggregazione delle NP presenti nell'aerosol, 4) il difetto di selettività da parte degli strumenti contatori di particelle.

Sul punto 1), occorre tenere conto che possono esistere differenze di ordini di grandezza nelle concentrazioni numeriche di aerosol, in funzione della numerosità e del tipo di sorgenti in grado di emettere particelle. Campagne di monitoraggio su diversi giorni e stagioni possono fornire le informazioni necessarie a capire la variabilità nella concentrazione numerica esistente per le misurazioni di fondo ed in quelle vicine alle sorgenti dove avviene la manipolazione di NM.

Nel caso 2), poiché gli strumenti CPC presentano generalmente un limite di concentrazione massima misurabile non superiore a 100.000 p/cm³, è possibile estendere l'intervallo di misura ricorrendo ad un sistema di diluizione tramite il posizionamento a monte dell'ingresso di una apposita cartuccia con filtro *HEPA* (High Efficiency Particulate Air) (Peters, 2006).

Il problema indicato al punto 3) si verifica in quanto al momento del campionamento la distribuzione dimensionale del NM ed il suo stato di aggregazione (o agglomerazione) possono essere ignoti e, di conseguenza, l'uso di strumenti a lettura diretta per dimensionare/conteggiare le particelle possono fornire solo un'indicazione semi-quantitativa dell'entità delle potenziali emissioni. Ciò vale se le misure di fondo effettuate con CPC e OPC sono in grado di fornire dati sulle concentrazioni di particelle con dimensioni superiori a quelle definite dall'ISO per le NP (approssimativamente comprese tra 1 nm e 100 nm) (UNI CEN ISO/TS, 2010). In ogni caso, i due tipi di strumenti possono essere utilizzati simultaneamente per ottenere una valutazione semi-quantitativa, dimensionalmente differenziata dell'aerosol da campionare.

I CPC forniscono la misura numerica delle particelle totali per unità di volume di aria nell'intervallo dimensionale 10-1.000 nm. Gli OPC sono in grado di misurare il numero totale di particelle per unità di volume di aria nell'ambito di un minimo di quattro intervalli dimensionali: 300 - 500 nm; 500 - 1.000 nm; 1.000 - 10.000 nm, e maggiore di 10.000 nm. Per la determinazione della concentrazione numerica delle particelle nanometriche i risultati generati dai due tipi di strumenti devono essere combinati assieme.

Ad esempio, un dato di concentrazione numerica elevata ottenuta con il CPC simultaneamente con un'alta concentrazione nell'intervallo dimensionale (300-500 nm) fornita dall'OPC può indicare la possibile presenza di particelle nanometriche.

All'inverso, una bassa concentrazione con il CPC, assieme ad una elevata concentrazione, nell'intervallo, maggiore di 1.000 nm riscontrata con l'OPC, può indicare la presenza di particelle di grandi dimensioni o agglomerati di NP.

La verifica di questa assunzione può essere effettuata per mezzo dell'analisi con le tecniche di microscopia elettronica a trasmissione (TEM) ed a scansione (SEM).

Le limitazioni indicate al punto 4) possono essere trattate nel modo che segue. La selettività costituisce un parametro critico nella caratterizzazione dell'esposizione in termini di concentrazione numerica delle particelle.

Particelle aerodisperse con dimensioni nanometriche sono presenti in molti luoghi di lavoro e spesso hanno origine da molteplici sorgenti, quali combustioni, emissioni auto veicolari, ed infiltrazioni di aria esterna. I contatori di particelle generalmente non sono in grado di selezionare in funzione di una specifica sorgente o tipo di composizione rendendo molto difficoltosa la differenziazione tra particelle incidentali e quelle associate allo specifico processo in base alla sola concentrazione numerica. Strumenti quali i CPC e gli OPC, quindi, devono essere usati per identificare le sorgenti di NP ed i campioni basati sui filtri per la verifica delle dimensioni, forma, e composizione chimica al fine di differenziare i due diversi tipi di NP.

4.4 Approccio alla valutazione dell'esposizione professionale a nanomateriali: la strategia

Una considerazione particolare merita la strategia per la valutazione dell'esposizione negli ambienti lavorativi. Attualmente le stime dell'esposizione personale vengono derivate da misure ottenute con strumenti statici pertanto, per un'affidabile interpretazione dei risultati, è essenziale identificare tutte le potenziali sorgenti di emissione di NM, interne ed esterne all'ambiente lavorativo, registrare il regime di correnti d'aria, nonché e gli spostamenti dell'addetto rispetto alle sorgenti ed alla posizione dello strumento.

Sulla base degli aspetti di igiene occupazionale descritti in questa rassegna si può concludere che, attualmente, non esiste un metodo di campionamento per caratterizzare l'esposizione a NP. Risulta, quindi, necessario adottare un approccio basato sull'uso di diversi strumenti e su di una appropriata strategia di campionamento.

In tale contesto, nell'ambito della Commissione Europea, lo *Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks* (SCENIHR, 2006) parte dalle seguenti considerazioni per la messa a punto di una corretta strategia di valutazione dell'esposizione professionale a NM:

1. non esiste ad oggi un'opinione condivisa sulla scelta dei parametri che devono rappresentare la misura più appropriata nell'ambito della valutazione dell'esposizione (massa, numero, area superficiale, chimica superficiale, ecc.);
2. non sono al momento disponibili campionatori personali per effettuare misure di NP;

3. devono essere necessariamente elaborate tecniche innovative per il campionamento e la messa a punto di strategie per la valutazione dell'esposizione sia in ambito professionale sia nel settore ambientale;
4. risulta indispensabile individuare valori limite di esposizione professionale per le sostanze chimiche aerodisperse in forma nanoparticellare tenendo presenti le eventuali possibili differenze che si possono riscontrare negli effetti biologici a seconda che si tratti di NP discrete o di agglomerati/aggregati di NP.

Finché non verrà stabilito quale sia il sistema metrologico più appropriato per la valutazione dell'esposizione alle NP biologicamente attive, la comunità scientifica condivide l'orientamento di raccomandare l'utilizzo di diversi tipi di strumenti per fornire la caratterizzazione più completa possibile dell'aerosol nel luogo di lavoro ove vengono prodotte, manipolate o impiegate NP.

Questo approccio, richiedendo l'utilizzo di campionatori statici, rende difficoltosa l'applicazione delle normali procedure di campionamento personale previste per la valutazione dell'esposizione individuale ai fini della conformità con i valori limite di esposizione (premessa comunque la mancanza, allo stato attuale, di standard normativi di riferimento per sostanze chimiche aerodisperse in forma nanoparticellare) oppure per le elaborazioni epidemiologiche. Sulla base di tali premesse è, pertanto, opportuno sviluppare un'appropriata strategia per il campionamento (e/o le misurazioni), prima e durante il monitoraggio (Tabella 4.6).

Tabella 4.6 - Considerazioni da prendere prima e durante il campionamento (da *Technical Report ISO/TR 27628/2007*)

Considerazioni	Obiettivo	Strumento
Sorgente	Identificare e localizzare sorgenti singole/ multiple di nanoaerosol nell'ambiente di lavoro; identificare la penetrazione di aerosol ambientali nel luogo di lavoro	Contatore di particelle a condensazione (CPC); registrare osservazioni sulle attività generatrici di emissioni
Ventilazione	Monitorare il flusso d'aria e la trasmissione di aerosol attraverso l'ambiente di lavoro	Anemometri; <i>Smoke tube</i> ; gas traccianti; osservazioni e registrazione di aperture porte, ecc.
Attività nel luogo di lavoro	Interpretazione dei dati registrati direttamente dalla strumentazione in vista delle variazioni dei parametri di esposizione	Sistema di osservazione: monitorare le attività che generano le emissioni; CPC
Comportamento del lavoratore	Interpretare le differenze spaziali alla luce del tempo di residenza nei diversi luoghi	Sistema di osservazione: monitorare le posizioni dei lavoratori rispetto alla sorgente/lettura dei campioni

L'individuazione di un appropriato luogo di campionamento è la chiave per una interpretazione affidabile dei dati ai fini di stimare l'esposizione personale.

La prima azione da intraprendere dovrebbe essere l'individuazione nel luogo di lavoro di sorgenti di NP, verificando, nel contempo, la presenza di eventuali sorgenti esterne, quali ulteriori attività industriali, traffico veicolare, ecc., che possono influire sulla concentrazione interna della quota nanometrica dell'aerosol.

Il ricorso a campionatori statici per NP implica che i campioni vengano raccolti in punti più prossimi possibili alle potenziali sorgenti di emissione, per consentire la massima accuratezza nella determinazione del rilascio di NM e per identificare i luoghi in cui risulta più probabile l'esposizione dei lavoratori. Di conseguenza, i risultati di questo tipo di campionamenti dovrebbero essere interpretati come un indicatore del rilascio di NM e della necessità di controlli più efficaci.

È importante che le misure di esposizione vengano condotte anche prima della produzione o lavorazione dei NM per ottenere dati sulle concentrazioni di fondo. I dati di concentrazione raccolti durante la produzione o lavorazione potranno essere così confrontati con i valori di fondo per valutare un eventuale aumento del parametro scelto. Un altro metodo consiste nell'effettuare misurazioni simultanee delle concentrazioni all'interno e all'esterno del luogo di lavoro, utilizzando due identiche strumentazioni, così da sottrarre il contributo dovuto all'esterno alle concentrazioni di NP rilevate all'interno. Questo metodo, tuttavia, comporta costi rilevanti ed è basato sull'assunzione che le particelle esterne non subiscano cambiamenti durante il loro trasporto all'interno dei luoghi di lavoro.

Inoltre, come precedentemente sottolineato, poiché gli aerosol di NP possono essere costituiti da miscele complesse di diversa origine, i metodi di campionamento e di analisi potranno essere ottimizzati ai fini di una corretta attribuzione delle varie possibili sorgenti emmissive involontarie (ad esempio ricorrendo all'utilizzo dei profili di sorgente della *Principal Component Analysis*) anche in considerazione di eventuali contributi provenienti dall'ambiente esterno.

In tale contesto risulta, quindi, opportuno mettere a punto protocolli di misura, ottimizzati in tutte le fasi succitate, nell'ambito della procedura di valutazione dell'esposizione professionale a NP, finalizzati alla determinazione della *composizione chimica* e della *distribuzione dimensionale* di NP e microparticelle presenti nell'ambiente di lavoro ricorrendo all'approccio multiparametrico caratterizzato da diverse tecniche di campionamento e di analisi.

Un ulteriore parametro da tenere sotto controllo è il flusso d'aria, per determinare la trasmissione di aerosol nell'ambiente di lavoro. Lo strumento più appropriato in questo caso è un generatore di fumo che, comunque, non può essere utilizzato contemporaneamente alle misurazioni, essendo esso stesso un generatore di aerosol.

Durante l'accertamento dell'esposizione tutte le attività svolte nell'ambiente di lavoro dovrebbero essere osservate in modo da fornire ulteriori informazioni utili all'interpretazione dei risultati dei campionamenti statici. L'attenzione deve essere rivolta alla presenza di attività supplementari in grado di generare aerosol, come l'uso di specifiche apparecchiature, la presenza di fumatori o di sorgenti secondarie come la risospensione di depositi di aerosol a causa di spostamenti di aria indotti dal movimento di persone o l'attività di veicoli. Sebbene la risospensione di polvere sia probabilmente caratterizzata da particelle grandi, il processo può giocare un ruolo nel rilascio di NP nell'aria. Infine, dovrebbero essere monitorate le variazioni della posizione del lavoratore rispetto alla sorgente nell'intervallo di tempo programmato per il campionamento. I risultati pesati di postazioni multiple campionate possono essere usati per stimare le esposizioni personali.

Nella valutazione iniziale può essere utile l'aggiunta di campioni dalle superfici qualora esista la possibilità di contaminazione da NM delle superfici per sedimentazione dall'aria, per il rilascio causato da perdite, oppure per migrazione di materiale da un luogo all'altro dell'impianto produttivo.

Per migliorare la confrontabilità dei dati di esposizione, la pratica consueta di esprimere l'esposizione personale come valore riferito al turno di otto ore dovrebbe essere seguita anche nel caso dei nanoaerosol. Di conseguenza, per quanto possibile i risultati delle misure di esposizione di breve periodo dovrebbero essere convertiti in dati basati sul turno di otto ore, ricalcolandone i valori ponderati sul tempo. In tutti i casi in cui l'esposizione a breve termine è l'obiettivo dell'indagine, l'intervallo temporale delle misurazioni deve essere documentato, rammentando che il periodo di tempo di riferimento generalmente raccomandato in igiene del lavoro per questo tipo di valutazioni è pari a 15 minuti.

Nella Figura 4.4 viene rappresentata in modo schematico la strategia finora delineata, basata principalmente sulle indicazioni elaborate dal NIOSH e dall'OECD.

L'approccio strategico incentrato sull'acquisizione di diversi parametri per la determinazione della presenza e identificazione di NP consente di effettuare una stima semi-quantitativa dell'esposizione personale.

Tuttavia, poiché questo tipo di indagine si basa su campionamenti statici o di area, la stima dell'esposizione lavorativa dovrà essere trattata con particolare attenzione (ISO/TR, 2008).

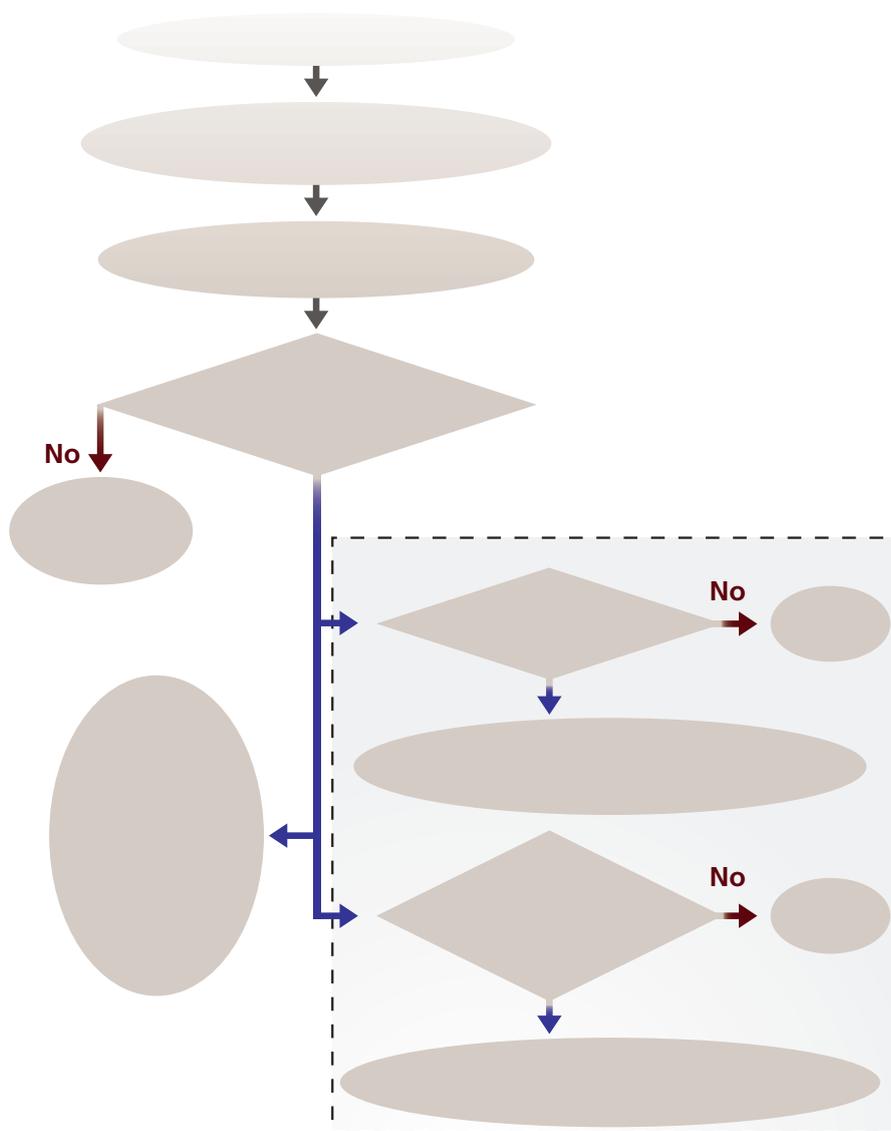


Figura 4.4 - Schema della strategia di campionamento secondo le indicazioni di NIOSH e OECD.

Bibliografia

- Aalto P, Paatero P, Kulmala M, Hameri K, Forastiere F, Cattani G, Marconi A, Cyrus J, Von Lot, S, Zetzsche K, Peters A, Bouso L, Castano-Vinyals G, Sunyer J, Lanki T, Pekkanen J, Sjovald B, Berglund N, Bellander T, Nyberg F. Aerosol number concentration measurements in five European cities using TSI-3022 condensation particle counter over three year period during HEAPSS (Health Effects of Air Pollution on Susceptible Subpopulations). *J Air Waste Manag Assoc.* 2005;55:1064-76.
- Albonetti C, Cavallini M, Kshirsagar R, Biscarini F. Microscopie a scansione di forza di nanostrutture molecolari: morfologia, proprietà e nanofabbricazione. In: Quaglino D, Falcieri E, Catalano M, Diaspro A, Montone A, Mengucci P, Pellicciari C editors. 1956-2006 Cinquanta anni di microscopia in Italia tra storia, progresso ed innovazione. Società Italiana di Scienze Microscopiche. 2006;181- 206.
- Arredouani M, Yang Z, Ning Y, Qin G, Soininen R, Tryggvason K, et al. The scavenger receptor MARCO is required for lung defense against pneumococcal pneumonia and inhaled particles. *J Exp Med.* 2004;200:267-72.
- ASTM. American Society of Testing Materials. ASTM E2535 – 2007. Standard guide for handling unbound engineered nanoscale particles in occupational settings.
- Bailey MR, Ansoborlo E, Guilmette RA, Paquet F. Practical application of the ICRP Human Respiratory Tract Model. *Radiat Prot Dosimetry.* 2003;105:71-6.
- Baltensperger U, HW Gaggeler, DT Jost. The Epi-phanometer, e new device for continuous aerosol monitoring. *J Aerosol Sci.* 1988;19 (7): 931-4.
- Berufsgenossenschaftliches Institute fur Arbeitsschutz - BIA-Report 7/2003e; BIA-Workshop "Ultrafine aerosols at workplaces".
- Brouwer DH, Gijsbers JH, Lurvink MW. Personal exposure to ultrafine particles in the workplace: exploring sampling techniques and strategies. *Ann Occup Hyg.* 2004; 48 (5): 439-53.
- Brown JS, Zeman KL, Bennett WD (2002). Ultrafine particle deposition and clearance in the healthy and obstructed lung. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166:1240-7.
- Carr KE, Hazzard RA, Reid S, Hodges GM. The effect of size on uptake of orally administered latex microparticles in the small intestine and transport to mesenteric lymph nodes. *Pharm Res.* 1996;13:1205-9.
- Chono S, Tanino T, Seki T, Morimoto K. Influence of particle size on drug delivery to rat alveolar macrophages following pulmonary administration of ciprofloxacin incorporated into liposomes. *J Drug Target.* 2006;14:557-66.
- Coin PG, Roggli VL, Brody AR. Deposition, clearance, and translocation of chrysotile asbestos from peripheral and central regions of the rat lung. *Environ Res.* 1992;58:97-116.
- Crosera M, Bovenzi M, Maina G, Adami G, Zannette C, Florio C, Filon Larese F. Nanoparticle dermal absorption and toxicity: a review of the literature. *Int Arch Occup Environ Health.* 2009. In press.
- Des Rieux A, Fievez V, Garinot M, Schneider YJ, Preat V. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach. *J Control Release.* 2006;116:1-27.
- Elder A, Gelein R, Silva V, Feikert T, Opanashuk L, Carter J, et al. Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system. *Environ Health Perspect.* 2006;114:1172-8.
- Environmental Protection Agency. External Review Draft Nanotechnology White Paper. EPA, 2005. Available from: <http://www.epa.org>.
- Flagan RC. Electrical techniques. In: Aerosol measurement: principles, techniques and applications, Baron PA and Willeke K. John Wiley & Sons, New York, 537-68, 2001.
- Florence AT. The oral absorption of micro- and nanoparticles: neither exceptional nor unusual. *Pharm Res.* 1997;14:259-66.
- Gaumet M, Gurny R, Delie F. Localization and quantification of biodegradable particles in an intestinal cell model: the influence of particle size. *Eur J Pharm Sci.* 2009;36:465-73.
- Geiser M, Schrch S, Gehr P. Influence of surface chemistry and topography of particles on their immersion in the lung's surface-lining layer. *J Appl Physiol.* 2003;94:1793-801.
- Geiser M, Rothen-Rutishauser B, Kapp N, Schurch S, Kreyling W, Schulz H, et al. Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ Health Perspect.* 2005;113:1555-60.
- Card JW, Zeldin DC, Bonner JC, Nestmann ER. Pulmonary applications and toxicity of engineered nanoparticles. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008;295:L400-11.

- Goldstein JI, Newbury DE, Echlin P, Joy DC, Fiori C, Lifshin E. Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis. New York (NY): Plenum Press; 1981.
- Gullberg E, Keita AV, Salim SY, Andersson M, Caldwell KD, Soderholm JD, et al. Identification of cell adhesion molecules in the human follicle-associated epithelium that improve nanoparticle uptake into the Peyer's patches. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;319:632-9.
- Gumbleton M. Caveolae as potential macro-molecule trafficking compartments within alveolar epithelium. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;49:281-300.
- Heyder J, Gebhart J, Rudolf G, Schiller CF, Stahlhofen W. Deposition of particles in the human respiratory-tract in the size range in the range 0.005-15 μm . *J Aerosol Sci.* 1986;17: 811-25.
- Hillyer JF, Albrecht RM. Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles. *J Pharm Sci.* 2001;90:1927-36.
- HSE. Health and Safety Executive. Nanoparticles: An occupational hygiene review. Research report 274, 2004. Available from: <http://www.hse.uk>.
- Hussain N, Jaitley V, Florence AT. Recent advances in the understanding of uptake of microparticulates across the gastrointestinal lymphatics. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;50:07-42.
- ICRP. International Commission on Radiological Protection. Human respiratory tract model for radiological protection. Oxford, England: Pergamon, Elsevier Science Ltd., ICRP Publication No. 66, 1994.
- ICRP. International Commission on Radiological Protection: guide for practical application of the ICRP human respiratory tract model: ICRP supporting guidance 3. Approved by ICRP committee 2 in October 2000. *Ann ICRP.* 2002;32 (issues 1-2).
- INRS. Les nanomatériaux, 15/03/2007. Available from : <http://www.inrs.fr>
- ISO/DTS. International Standardization Organisation. Nanotechnologies – Vocabulary – Part. 1: Core terms. ISO/DTS 80004-1/2010.
- ISO/NP TS. International Standardization Organisation. Guidelines for occupational risk management applied to engineered nanomaterials based on a “ control banding approach”. ISO/NP TS 12901-2/2008.
- ISO/TR. International Standardization Organisation. Workplace atmospheres – Ultrafine, nanoparticle and nano-structured aerosols – Inhalation exposure characterization and assessment. Technical Report ISO/TR 27628/2007.
- ISO/TR. International Standardization Organisation. Health and Safety Practices in Occupational. Settings Relevant to Nanotechnologies. Technical Report ISO/TR 12885/2008.
- Jani P, Halbert GW, Langridge J, Florence AT . Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa: quantitation and particle size dependency. *J Pharm Pharmacol.* 1990;42:821-6.
- Keller A, Fierz M, Siegmann K, Siegmann HC, Fillippov A. Surface science with nanosized particles in a carrier gas. *J Vacuum Sci Technol a Vacuum Surface Films.* 2001;19 (1):1-8.
- Kim S, Shen S, Sioutas C, Zhu Y, Hinds W. Size distribution and diurnal and seasonal trends of ultrafine particles in source and receptor sites of the Los Angeles Basin. *J Air Waste Manag Assoc.* 2002; 52:297-307.
- Koshi, S. Proposition for a method of evaluating the work environment with regard to airborne toxic substances, *Ind Health.* 1980;18:179-86.
- Ku BK and Maynard AD. Comparing aerosol surface-area measurement of monodisperse ultrafine silver agglomerates using mobility analysis, transmission electron microscopy and diffusion charging. *J Aerosol Sci.* 2005. Available from: www.elsevier.com.
- Kuhlbusch T.A.J., Neumann S. and Fissan H. Number Size Distribution, Mass Concentration, and Particle Composition of PM1, PM 2,5 and PM10 in Bag Filling Areas of Carbon Black Production. *J Occup Environ Hyg.* 2004;1:660-71.
- Larese Filon, F., D'Agostin, F., Crosera, M., Adami, G., Renzi, N., Bovenzi, M., Maina, G. Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin, *Toxicol.* 2009; 255: 33-37.
- Lauweryns JM, Baert JH. Alveolar clearance and the role of the pulmonary lymphatics. *Am Rev Resp Dis.* 1977;115:625-83.
- Lentz TJ, Rice CH, Succop PA, Lockey JE, Dement JM, LeMasters GK. Pulmonary deposition modeling with airborne fiber exposure data: a study of workers manufacturing refractory ceramic fibers. *Appl Occup Environ Hyg.* 2003;18:278-88.

- Lomer MC, Thompson RP, Powell JJ. Fine and ultrafine particles of the diet: influence on the mucosal immune response and association with Crohn's disease. *Proc Nutr Soc.* 2002;61:123-30.
- Marconi A, Cattani G, Cusano M, Ferdinandi M, Inglessis M, Viviano G, Settimo G. Two years of fine and ultrafine particles measurements in Rome, Italy. *J Toxicol Environ Health, Part A.* 2007;70:213-21.
- Marconi A, Fanizza C., Castellet y Ballarà G.. Particelle ultrafini e nanoparticelle: tecniche di misura convenzionali ed avanzate per la determinazione dell'esposizione inalatoria; *Riv Inf Mal Prof, INAIL.*2007;2:261-78.
- Maynard AD, Zimmer AT. Evaluation of grinding aerosols in terms of alveolar dose: The significance of using mass, surface-area and number metrics. *Ann Occup Hyg.* 2002;46 (Suppl. 1): 320-2.
- Maynard A.D. Nanotechnology: The next big thing, or much ado about nothing? *Ann Occup Hyg.* 2007;5(1):1-12.
- Maynard AD and Kuempel ED. Airborne nanostructured particles and occupational health. *J Nanop Res.* 2005;7:587-614.
- McMurry PH. A review of atmospheric aerosol measurements. *Atmos Environ.* 200: 34: 1959-99.
- Methner, M.M., Birch, M.E, Evans, D.E., Ku, B.K., Crouch, K.G., Hoover, M.D. Mazzukelli LF. Case study: Identification and characterization of potential sources of worker exposure to carbon nanofibers during polymer composite laboratory operations. *J Occup Environ Hyg.* 2007;4(12), D125-30.
- Methner, M. Engineering case reports (Old L. Editor). Effectiveness of local exhaust ventilation in controlling engineered nanomaterial emissions during reactor cleanout operations. *J Occup Environ Hyg.* 2008;5(6): D63-9.
- Misra C, Singh M, Shen S, Sioutas C, Hall PM. Development and evaluation of a personal cascade impactor sampler (PCIS). *J Aerosol Sci.* 2002;33(7):1027-48.
- Möhlmann C. German activity on the ultra-fine particles in the workplaces. *Proceedings of the First International Symposium on Occupational Health Implications of Nanomaterials-Nanomaterials: a risk to health at work?*, 12-14 Oct 2004, Buxton, UK. P. 128-30.
- Montaser A. *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry.* Wiley-VCH. New York (NY); 1998.
- Nel A, Xia T, Madler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science.* 2006;311: 622-7.
- NIOSH. National Institute for Occupational Safety and Health. Strategic Plan for NIOSH Nanotechnology Research: Filling the Knowledge Gaps, 2007. Available from: http://www.cdc.gov/niosh/topics/nanotech/strat_plan.html.
- NIOSH. National Institute for Occupational Safety and Health. Approaches to Safe Nanotechnology: An Information Exchange with NIOSH, 2008. Available from: <http://www.cdc.gov/niosh/topics/nanotech/safenano/>.
- Nohynek GJ, Lademann J, Ribaud C, Roberts MS. Grey goo on the skin? Nanotechnology, cosmetic and sunscreen safety. *Crit Rev Toxicol.* 2007;37: 251-77.
- Oberdorster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W, et al. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol.* 2004;16:437-45.
- Oberdorster G, Oberdorster E, Oberdorster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect.* 2005;113:823-39.
- O'Hagan DT. The intestinal uptake of particles and implications for drug and antigen delivery. *J Anat.* 1996;189 (Pt 3):477-82.
- Patton JS. Mechanisms of macromolecule absorption by the lungs. *Adv Drug Deliv Rev.* 1996;19:3-36.
- Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS, Hoekstra D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J.* 2004;377:159-69.
- Rogak SN, Flagan RC, Nguyen HV. The mobility and structure of aerosol agglomerates. *Aerosol Sci Technol.* 1993;18 (1): 25-47.
- Sonavane, G., Tomoda, K., Sano, A., Ohshima, H, Terada, H., Makino, K. In vitro permeation of gold nanoparticles through rat skin and rat intestine: Effect of particle size. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2008; 65: 1-10.
- SCENIHR. European Commission Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks. Opinion on the appropriateness of existing methodologies to assess the potential risks associated with engineered and adventitious products of nanotechnologies. 2006.
- Semmler-Behnke M, Takenaka S, Fertsch S, Wenk A, Seitz J, Mayer P, et al. Efficient elimination of inhaled nanoparticles from the alveolar

- region: evidence for interstitial uptake and subsequent reentrainment onto airways epithelium. *Environ Health Perspect.* 2007;115:728-33.
- Sibille Y, Reynolds HY. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am Rev Resp Dis.* 1990;141:471-501.
 - Stuart D, Lobenberg R, Ku T, Azarmi S, Ely L, Roa W, et al. Biophysical investigation of nanoparticle interactions with lung surfactant model systems. *J Biomed Nanotechnol.* 2006;2:245-52.
 - Szoke R, Alföldy B, Balashazy I, Hofmann W, Sziklai-Laszlo I. Size distribution, pulmonary deposition and chemical composition of Hungarian biosoluble glass fibers. *Inhal Toxicol.* 2007;19:325-32.
 - Tanaka I, Oyabu T, Ishimatsu S, Hori H, Higashi T, Yamato H. Pulmonary deposition and clearance of glass fiber in rat lungs after long-term inhalation. *Environ Health Perspect.* 1994;102 Suppl 5:215-6.
 - Tiede K, Boxall ABA, Tear SP, Lewis J, David H, Hasselov M. Detection and characterization of engineered nanoparticles in food and the environment. *Food Add Contam.* 2008;25:795-821.
 - Tinkle SS, Antonini JM, Rich BA, Robert JR, Salmen R, De Pree K, Adkins EJ. Skin as a route of exposure and sensitization in chronic beryllium disease. *Environ Health Perspect.* 2003;111:1202-8.
 - UNI CEN ISO/TS. International Standardization Organisation. Terminologia e definizioni relative a nano-oggetti - Nanoparticelle, nanofibre e nanolastre. UNI CEN ISO/TS 27687/2010.
 - Warheit DB, Hartsky MA, McHugh TA, Kellar KA. Biopersistence of inhaled organic and inorganic fibers in the lungs of rats. *Environ Health Perspect.* 1994;102 Suppl 5:151-7.
 - Wendel-de-Joode, B. van, Brouwer, D.H., Vermeulen, R., van Hemmen, J.J., Heederik, D., Kromhout, H. DREAM: A method for semi-quantitative dermal exposure assessment. *Ann Occ Hyg.* 2003;47, 71-87.
 - Williams DB, Carter CB. Transmission electron microscopy: a textbook for materials science. 2nd ed. New York (NY): Plenum Press; 1996.
 - Wilson WE. Use of the electrical aerosol detector as an indicator for the total particle surface area deposited in the lung. Proceedings of the 2004 Air and Waste Management Association Conference.
 - Yamato H, Hori H, Tanaka I, Higashi T, Morimoto Y, Kido M. Retention and clearance of inhaled ceramic fibres in rat lungs and development of a dissolution model. *Occup Environ Med.* 1994;51:275-80.
 - Yang W, Peters JI, Williams III RO. Inhaled nanoparticles - A current review. *Int J Pharm.* 2008;356:239-47.
 - Yeh HC, Cuddihy RG, Phalen RF, Chang IY. Comparison of calculated respiratory-tract deposition of particles based on the proposed NCRP model and the new ICRP 66 model. *Aerosol Scie Technol.* 1996;25:134-40.
 - Zhu, Y., Hinds, W.C., Kim, S., Sioutas, C. Concentration and size distribution of ultrafine particles near a major highway. *J Air Waste Manag Assoc.* 2002;52(9):1032-42.

capitolo 5

Effetti sulla salute dei nanomateriali ingegnerizzati

Delia Cavallo (coordinatore), *INAIL, Dipartimento di Medicina del Lavoro - ex ISPESL*

Carla Fanizza, *INAIL, Dipartimento di Installazioni di Produzione e Insediamenti Antropici - ex ISPESL*

Luca Fontana, *Università Cattolica del Sacro Cuore di Roma*

Ivo Iavicoli, *Università Cattolica del Sacro Cuore di Roma*

Francesca Larese Filon, *Università di Trieste*

Andrea Magrini, *Università di Roma "Tor Vergata"*

Antonio Pietroiusti, *Università di Roma "Tor Vergata"*

Lorenzo Sacchi, *INAIL, Dipartimento di Medicina del Lavoro - ex ISPESL*

Cinzia Lucia Ursini, *INAIL, Dipartimento di Medicina del Lavoro - ex ISPESL*

Premessa

La produzione e l'utilizzo crescente di nanomateriali (NM) ingegnerizzati in ambito occupazionale con conseguente potenziale esposizione per un numero sempre più ampio di lavoratori addetti e i pochi dati disponibili sui rischi per la salute di tali composti evidenziano la necessità di implementare le conoscenze riguardanti i possibili effetti biologici (sia a livello molecolare-cellulare sia a livello di organo e di apparato) indotti da tale esposizione. Poiché la produzione, la diffusione e l'utilizzo dei NM ingegnerizzati in diversi settori sono piuttosto recenti e la valutazione dell'esposizione nei soggetti esposti presenta diverse difficoltà, non sono ancora disponibili studi epidemiologici ed informazioni riguardanti gli effetti tossici dei NM su popolazioni esposte. La quasi totalità degli studi disponibili è stata effettuata o su sistemi *in vitro* o su animali da laboratorio (principalmente topi) e le informazioni relative agli effetti su organi e apparati sono a volte estrapolate dai risultati ottenuti a livello cellulare.

Gli studi prodotti negli ultimi anni hanno evidenziato potenziali effetti citotossici e genotossico-ossidativi a livello cellulare ed effetti respiratori, cutanei, immunologici, neurotossici, cardiovascolari, causati da NM.

La maggior parte degli studi sugli effetti cellulari dei NM utilizza concentrazioni abbastanza elevate di tali composti ed evidenzia principalmente effetti citotossici. I pochi studi attualmente disponibili sugli effetti delle esposizioni a basse dosi di NM ingegnerizzati evidenziano effetti genotossici, ossidativi ed infiammatori che

potrebbero essere implicati nell'instaurarsi di un processo di cancerogenesi. La maggior parte di questi riguarda nanotubi di carbonio e particelle di ossidi metallici che possono indurre danno al DNA, sia direttamente sia indirettamente, tramite l'induzione di stress ossidativo. Gli effetti cellulari dei NM sono influenzati dalle dimensioni, dalla elevata area di superficie e dalle proprietà chimico-fisiche (quali contaminanti metallici o cariche di superficie) che ne determinano la reattività e lo stato di aggregazione. Tali proprietà rendono complesso lo studio degli effetti e del loro meccanismo d'azione.

Esistono alcune evidenze sperimentali che le nanoparticelle (NP) ingegnerizzate possano penetrare nella circolazione sistemica e raggiungere vari organi ed apparati. Le principali vie di assorbimento sembrano essere costituite dal polmone, dalla mucosa nasale, dalla cute e dall'apparato gastroenterico, con conseguente accumulo in molti tessuti quali rene, muscoli, milza e femore (Singh et al., 2006). Relativamente agli effetti a livello di organo e di apparato, la maggior parte degli studi riguarda gli effetti sui sistemi respiratorio, nervoso e cardiovascolare, osservati *in vivo* su topi e ratti, mentre pochi dati sono attualmente disponibili riguardo i sistemi immunitario e cutaneo.

Diversi studi hanno mostrato come i NM ingegnerizzati, in particolare i nanotubi di carbonio e le NP contenenti metalli, possano indurre stress ossidativo e processi di infiammazione polmonare. La maggior parte degli studi riguarda i nanotubi di carbonio (CNT), i cui effetti negativi sul sistema respiratorio sembrano essere in relazione con la tossicità su differenti popolazioni cellulari, la capacità di determinare fibrosi, l'attività asbesto-simile, il bioaccumulo e i livelli potenzialmente bassi di biodegradazione di tali NM. In particolare sono state osservate alcune somiglianze tra le proprietà patogenetiche dei nanotubi di carbonio a parete multipla e quelle delle fibre di asbesto riconducibili a risposte infiammatorie e stress ossidativo.

Gli studi *in vivo* sugli effetti delle NP sul sistema nervoso centrale (SNC) riguardano principalmente le NP metalliche ed evidenziano effetti neurotossici dovuti principalmente ad induzione di stress ossidativo. È noto che le NP, assorbite principalmente attraverso la via inalatoria, hanno la capacità di dislocare dal sito di penetrazione per poi raggiungere il SNC attraverso un meccanismo di trasporto trans-sinaptico o direttamente captate nel SNC attraverso le terminazioni nervose della mucosa nasale (nervo olfattivo e nervo trigemino) e tracheobronchiale (afferenze del nervo vago). Le NP inalate, inoltre, attraversano la barriera respiratoria e tramite il torrente circolatorio possono raggiungere il SNC attraversando la barriera emato-encefalica (BEE) nei casi in cui questa, come avviene in alcune condizioni patologiche, non è completamente funzionante.

Gli studi sui possibili effetti delle NP ingegnerizzate sull'apparato cardiovascolare riguardano prevalentemente osservazioni *in vivo* su topi e ratti esposti a nanotubi di carbonio (CNT) ed evidenziano effetti sullo sviluppo di ateromi, trombosi arteriosa e aggregazione piastrinica, anche se alcuni presentano criticità per dosi utilizzate, via di somministrazione e basso numero di animali impiegati. Altri studi hanno valutato i possibili effetti dei CNT sull'infiammazione sistemica, che è ormai considerata uno dei fattori principali predisponenti all'aterosclerosi, evidenziando una significativa attivazione da parte dei nanotubi di carbonio a parete multipla (MWCNT) e dei nanotubi di carbonio a parete singola (SWCNT) - ma in particolare dei MWCNT - dei parametri di infiammazione sistemica quali granulociti, IL-6, CXCL1, IL-5, CCL11, CCL22, e dei biomarcatori di attivazione dei neutrofili.

I pochi dati riguardanti gli effetti a livello immunologico suggeriscono la possibilità che le NP, una volta raggiunta la circolazione sistemica, interagiscano con le proteine circolanti o presenti sulla superficie delle cellule determinando una risposta autoimmunitaria, oppure che interferiscano con i processi di opsonizzazione, e quindi con la clearance di materiale estraneo (es. microrganismi) normalmente eliminato in virtù di tale processo, o ancora che attivino il complemento, attivazione che può essere benefica o dannosa, a seconda delle circostanze.

L'esposizione cutanea a NP può determinare effetti locali sulla cute o essere una via d'ingresso di questi materiali nel circolo sistemico. Sull'argomento è comunque necessario compiere ulteriori studi, con indagini specifiche sulle varie tipologie di NP, perché diversi materiali possono avere diffusione ed effetti diversi sulla cute in relazione alle dimensioni ed alla composizione chimica. Attualmente le informazioni maggiori provengono dall'industria farmaceutica, che ha studiato l'effetto delle NP di ossido di zinco (ZnO) e di biossido di titanio (TiO₂) utilizzate per la formulazione di creme protettive, mentre pochissime informazioni sono disponibili per le altre tipologie di NP.

La figura 5.1 mostra la biocinetica delle NP. Molte vie di assorbimento e traslocazione sono già state accertate, mentre altre vie sono ancora ipotetiche e necessitano di ulteriori studi (Oberdoster et al., 2005).

In questo capitolo vengono riportati i principali studi attualmente disponibili sugli effetti biologici indotti dai NM ingegnerizzati sia a livello molecolare-cellulare (approfondendo principalmente quelli genotossici e citotossici che permettono di capire il meccanismo d'azione di tali materiali) (figura 5.2) sia a livello di organo e apparato (riportando gli effetti immunologici, cutanei, respiratori, sul sistema nervoso centrale e cardiovascolare).

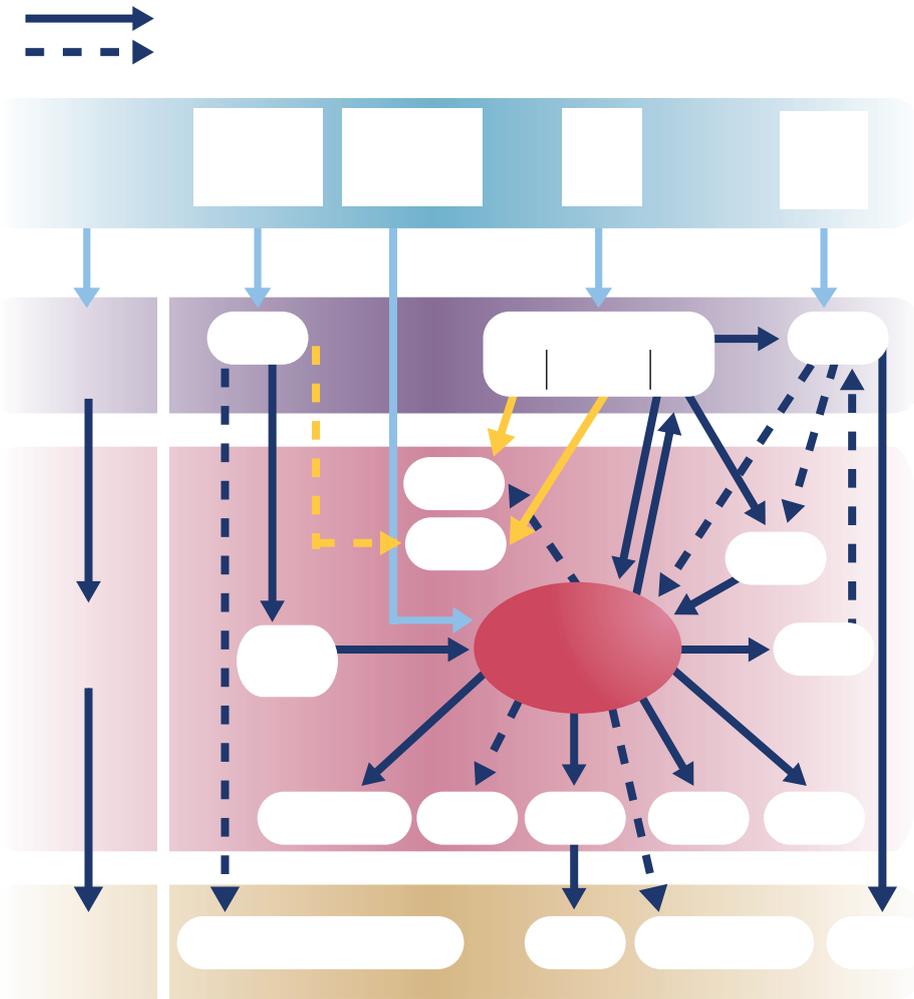


Figura 5.1 Biocinetica delle NP. SNC, sistema nervoso centrale. SNP, sistema nervoso periferico. (Tratta da Oberdoster et al., 2005).

Verranno presi in considerazione NM quali nanotubi di carbonio a parete singola (SWCNT) e multipla (MWCNT), fullereni, NP contenenti metalli (metalli e ossidi di metalli) e quantum dot, considerati rappresentativi di quelli già presenti in commercio, o che saranno presenti a breve, sui quali effettuare studi di tossicologia, e presenti nella lista pubblicata dall'OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), riportata nel Capitolo 1.

stato di aggregazione, i NM possono entrare nella cellula attraverso diffusione passiva, endocitosi mediata da recettori di membrana o endocitosi mediata da proteine di membrana, quindi possono penetrare nel nucleo mediante diffusione attraverso la membrana nucleare (se sufficientemente piccoli), trasporto attraverso i complessi dei pori nucleari o in seguito al dissolvimento della membrana nucleare durante la divisione cellulare (se di dimensioni maggiori o in aggregati). Una volta nel nucleo, possono interagire con il DNA o con le proteine istoniche inducendo danno al materiale genetico in modo diretto, oppure indirettamente attraverso l'inibizione delle proteine nucleari implicate nei processi di replicazione e trascrizione. Il danno genotossico può essere anche indotto indirettamente attraverso l'interazione con altre proteine cellulari, come quelle implicate nei processi di divisione cellulare, attraverso l'induzione di radicali liberi dell'ossigeno, l'induzione di fenomeni infiammatori, oppure per alterazione della funzione di proteine implicate nella risposta riparativa al danno al DNA. La tabella 5.1 riassume i principali meccanismi d'azione ipotizzati dagli studi attualmente disponibili sugli effetti genotossici e citossici dei NM.

5.1.1. Nanomateriali a base di carbonio

Nanotubi di carbonio (CNT)

Lo studio degli effetti genotossici da nanotubi di carbonio (CNT) è di notevole importanza data la somiglianza con l'asbesto, del quale è nota la capacità di indurre danno al materiale genetico e carcinogenesi mediata dalla elevata biopersistenza, generazione locale di radicali liberi e conseguente prolungata risposta infiammatoria. Gli studi sugli effetti genotossici ed ossidativi attualmente disponibili sui nanotubi di carbonio a parete singola (SWCNT) o multipla (MWCNT) sono alquanto contraddittori probabilmente in relazione alla variabilità del materiale utilizzato (purezza, dimensioni, forma, presenza di contaminanti metallici, funzionalizzazione), del mezzo di dispersione, della presenza di cariche di superficie, delle condizioni espositive che non sempre vengono dettagliatamente descritti. I NM fibrosi possono indurre genotossicità sia per interazione diretta con il DNA (SWCNT sono stati osservati nel nucleo) o con il fuso mitotico sia indirettamente tramite stress ossidativo e risposte infiammatorie (Migliore et al., 2010). Studi *in vivo* su ratti e topi hanno indicato che SWCNT possono indurre stress ossidativo e risposta infiammatoria (Folkman et al. 2009, Jacobsen et al. 2009). Induzione di infiammazione, fibrosi e granuloma del polmone in topi esposti a MWCNT è stata riportata in uno studio pilota da Poland et al. (2008) e in studi a più lungo termine tali nanotubi sembrano promuovere anche lo sviluppo di mesotelioma (Sakamoto 2009, Takagi 2008). Mentre in altri studi non sono stati evidenziati effetti ossidativi o infiammatori in topi e ratti esposti a MWCNT (Mitchell et al. 2007, Elgrabli et al., 2008).

La maggior parte degli studi *in vitro* effettuati finora sui nanotubi di carbonio riguarda quelli a parete singola SWCNT ed evidenzia stress ossidativo e danno al DNA in diversi tipi cellulari. In particolare sono stati osservati generazione di radicali liberi, accumulo di prodotti di perossidazione e riduzione dell'attività antiossidante in cheratinociti umani (Shvedova et al., 2003a), induzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) in cellule polmonari di ratto (Sharma CS et al., 2007), generazione di ROS e danno al DNA in cellule mesoteliali umane (Pacurari et al., 2008) e danno al DNA in cellule bronchiali umane (BEAS-2B) (Lindberg et al., 2009). Lindberg, in particolare, ha valutato in BEAS-2B gli effetti indotti dall'esposizione a nanotubi di carbonio commerciali (SWCNT >50%, altri CNT ~ 40%) per tempi di 24, 48 e 72 ore, mediante *comet test* e test del micronucleo (MN). Un aumento dose-dipendente del danno al DNA, con effetti più evidenti per le esposizioni più lunghe, è stato evidenziato con il *comet test*, mentre il test del micronucleo ha mostrato un effetto evidente solo dopo 48 ore di esposizione. La genotossicità trovata in questo studio può essere dovuta alla natura fibrosa dei materiali utilizzati e alla presenza di metalli (Co e Mo). Anche per lo studio di Pacurari et al., (2008) – effettuato su cellule mesoteliali umane esposte a SWCNT contenenti contaminanti metallici (Ni, Y e Fe) e nel quale si è evidenziata generazione di ROS e danno al DNA, valutato mediante *comet test* – è stato ipotizzato che l'induzione di danno al DNA, imputabile in parte allo stress ossidativo, potrebbe essere dovuta non solo alla presenza di metalli come impurezze, ma anche alla capacità dei SWCNT di generare ROS.

Secondo alcuni studi (Jacobsen et al., 2008; Zeni et al., 2008), i SWCNT ad elevata purezza non sembrano causare rotture al DNA o aumentare la frequenza di mutazioni, mentre in altri è stata osservata l'induzione di danno al DNA. In particolare Jacobsen et al. (2008) – in uno studio che utilizza l'*Fpg comet test* per valutare il danno diretto e ossidativo al DNA in cellule epiteliali polmonari murine esposte a SWCNT ad elevata purezza – non hanno riscontrato rotture al DNA ma induzione di danno ossidativo. Mentre un danno al DNA in fibroblasti polmonari di hamster cinese (V79) esposte a SWCNT puri è stato osservato mediante *comet test* da Kisin et al. (2007).

In uno studio che utilizzava sia SWCNT che MWCNT commerciali si sono evidenziate induzione di ROS e diminuzione del potenziale di membrana in macrofagi di ratto e cellule polmonari umane, mentre SWCNT purificati con trattamento acido non inducevano effetti; tale risultato suggerisce che la responsabilità degli effetti biologici possa essere ascritta ai metalli in traccia associati ai nanotubi commerciali (Pulskamp et al., 2007).

Il potenziale genotossico dei MWCNT purificati è stato riportato da Muller et al. (2008a), che hanno utilizzato due approcci complementari basati sul test del MN effettuato *in vivo* (dopo somministrazione intratracheale) e *in vitro* (su cellule polmonari di ratto). Tale studio ha dimostrato che i MN derivano sia da eventi clastogenici sia da eventi

aneugenici. Inoltre i MWCNT possono indurre mutazioni puntiformi che possono essere responsabili della loro carcinogenicità (Zhu et al., 2007). Comunque, un recente studio di Wirnitzer et al. (2009) ha rilevato che agglomerati di MWCNT (*baytubes*) non mostrano attività genotossica (induzione di aberrazioni cromosomiche) in cellule V79.

Fullereni

I fullereni vengono considerati meno tossici dei nanotubi di carbonio. Diversi studi hanno dimostrato che i fullereni hanno proprietà antiossidanti e che non evidenziano effetti cito-genotossici significativi mentre altri hanno evidenziato l'induzione di danno ossidativo, rotture al DNA, incremento di MN, mutagenicità e aberrazioni cromosomiche (Singh et al., 2009). In particolare l'esposizione orale a basse dosi di C₆₀ induce la formazione di elevati livelli di 8-ossi-7,8-diidro-2'-deossiguanosina (8-oxodG) nel fegato e nei polmoni di ratto (Folkmann et al., 2009). Dispersioni colloidali di fullereni C₆₀ in acqua hanno mostrato effetti genotossici su linfociti umani valutati mediante *comet test* (Dhawan et al., 2006). Inoltre un recente studio ha dimostrato che l'esposizione a C₆₀ induce la formazione di MN in cellule polmonari A549 e danno al DNA su polmoni di topo (Totsuka et al., 2009).

La discrepanza dei risultati finora ottenuti sugli effetti genotossici dei fullereni sembra essere dovuta a fattori quali la durata dell'esposizione, la preparazione e il tipo cellulare, e il confronto dei dati, non essendo stata effettuata alcuna caratterizzazione chimico-fisica, risulta di difficile attuazione.

5.1.2. Nanoparticelle di metalli e ossidi metallici

Gli ioni dei metalli di transizione (cadmio, cromo, cobalto, rame, ferro, nichel, titanio e zinco), rilasciati da certe NP, possono indurre la produzione del radicale idrossilico ($\cdot\text{OH}$), una delle principali specie che danneggiano il DNA. Inoltre il Fe(II) può causare la produzione di H₂O₂ dall'O₂ molecolare. Nanoparticelle di metalli quali argento e cobalto hanno mostrato effetti genotossici tra cui aumentata espressione e fosforilazione di p53, rotture della catena del DNA e aberrazioni cromosomiche. Anche NP di oro hanno mostrato capacità di indurre danni al DNA indirettamente, attraverso una risposta ossidativa che dipende dal tipo cellulare e dalle dimensioni delle particelle. Le NP di ossidi metallici (TiO₂, ZnO, SiO₂, Fe_xO_x) attraversano la membrana cellulare e si concentrano nella regione perinucleare inducendo indirettamente un danno genotossico tramite la promozione di stress ossidativo (Sharma et al., 2009; Park et al., 2008a) e risposta infiammatoria, oppure possono entrare nel nucleo (TiO₂ e SiO₂), dove formano aggregati con le proteine nucleari della trascrizione e replicazione, inibendole e quindi inducendo danni al materiale genetico. Uno studio in vitro di Kar-

Isson et al., (2008) ha confrontato gli effetti genotossici di particelle di ossidi di metalli (CuO, TiO₂, ZnO, CuZnFe₂O₄, Fe₃O₄, Fe₂O₃) con quelli di NP di carbonio e di MWCNT su cellule A549 mediante comet test e dosaggio dei ROS con 2',7'-diclorofluoresceina diacetato (DCFH-DA). Tutte le particelle, ad eccezione degli ossidi di rame, causavano danno al DNA dopo 4 ore di esposizione; quelle di CuO si sono rivelate le più potenti, seguite da TiO₂. Le particelle di CuO, inoltre, hanno causato il danno ossidativo più elevato, mostrandosi come l'unica specie in grado di indurre un incremento intracellulare di ROS.

Le particelle di TiO₂ inducono scambi tra cromatidi fratelli (SCE), aumento della frequenza di MN, danno al DNA, aumento della frequenza delle mutazioni del gene per l'ipoxantina-guanina fosforibosil transferasi (HPRT) e induzione di delezioni dell'ordine di kilobasi in fibroblasti transgenici di topo (MEF) (Singh et al., 2009). Comunque non tutti gli studi sono concordi sulla genotossicità di tali materiali. Inoltre la risposta cellulare indotta da NP di TiO₂ dipende dalle dimensioni e dalla forma e purtroppo gli studi disponibili non sempre forniscono informazioni sufficienti per poter confrontare i risultati ottenuti. La IARC ha classificato le particelle di TiO₂ nel gruppo dei possibili cancerogeni per l'uomo (Gruppo 2B) sulla base di sufficienti evidenze sperimentali su animali. Induzione di carcinoma polmonare è stata evidenziata in topi e ratti in seguito ad inalazione o instillazione tracheale di particelle di TiO₂ (Pott e Roller, 2005 e Baan et al., 2006) ed effetti genotossici (induzione di MN e danno al DNA) ed ossidativi (induzione di 8-idrossi-2 deossiguanosina) in topi esposti a NP di TiO₂ presenti nell'acqua da bere (Trouiller et al., 2009). Nanoparticelle di ossidi di ferro vengono generalmente ricoperte con polietilenglicole (PEG), destrano o dendrimeri (*dendrimers*), per migliorare la solubilità e la biocompatibilità, oppure con molecole complesse quali anticorpi, peptidi, ormoni o farmaci, che ne migliorano le applicazioni cliniche; tuttavia la stabilità di queste sostanze di rivestimento è ancora sconosciuta.

5.1.3. Quantum dot (QD)

Molto preliminari sono le informazioni attualmente disponibili sugli effetti genotossici dei QD, che si compongono di un nucleo di elementi metallici, tra cui alcuni altamente tossici (Cd, Te, Se e Pb), da un rivestimento protettivo (*cap/shell*), costituito prevalentemente da ZnS, e da gruppi funzionali o di "coating" (gruppo carbossilico, gruppo amminico e polietilenglicole), che li rendono sufficientemente idrofili, ne migliorano la biocompatibilità e bioattività e li rendono più stabili, riducendone l'eventuale tossicità (Singh et al., 2009). I QD che penetrano attraverso i pori della membrana nucleare possono interagire con le proteine istoniche del DNA inducendo

rotture della catena, attivazione di geni quali p53 e condensazione cromatinica. L'aggiunta di gruppi di rivestimento (es. ZnS) sembra avere un effetto protettivo poiché riduce la cito-genotossicità, come evidenziato in studi recenti, anche se la stabilità a lungo termine del rivestimento protettivo non è stata adeguatamente testata. Se il QD è trattenuto nell'organismo per un periodo di tempo molto lungo, il rivestimento protettivo può essere degradato in condizioni fotolitiche e ossidative, con conseguenti penetrazione attraverso i pori della membrana nucleare ed induzione di effetti cito-genotossici (Landsiedel et al., 2009). Numerosi studi dimostrano gli effetti protettivi che il solfuro di zinco conferisce ai QD riducendone la tossicità. Anche il processo di preparazione e quello di purificazione del materiale costituiscono fattori importanti che potrebbero influenzare la genotossicità dei QD. Alcune evidenze dimostrano l'interazione dei QD con il nucleo cellulare, ma pochi studi si sono focalizzati in modo specifico sulla genotossicità di tali materiali.

5.1.4 Conclusioni

In conclusione, ad oggi sono disponibili informazioni relativamente limitate sulla genotossicità dei NM ingegnerizzati. La maggior parte degli studi *in vitro* effettuati finora ha utilizzato il *comet test* – che valuta l'induzione di danno diretto o ossidativo al DNA e che ha fornito risultati positivi per i fullereni, i SWCNT e MWCNT, le particelle di TiO₂, i QD con CdSe/ZnS, le NP d'oro – e il test del MN – che valuta effetti sia clastogeni sia aneugenici e che ha fornito risultati positivi per le particelle di TiO₂, SiO₂, CoCr, ossido di zinco, TiO₂ + irradiazione UV-vis (Landsiedel et al., 2009; Lindberg et al., 2009). Gli studi *in vivo* eseguiti prevalentemente su topi e ratti riguardano principalmente i nanotubi di carbonio, che possono indurre stress ossidativo, infiammazione, fibrosi e granuloma del polmone in topi (Poland et al., 2008), i fullereni, che inducono stress ossidativo e danno al DNA in ratti (Folkmann et al., 2009, Totsuka et al., 2009), e, più recentemente, le NP di TiO₂, che inducono effetti genotossici ed ossidativi in topi (Trouiller et al., 2009).

I risultati di molti studi sono contraddittori principalmente a causa della mancanza di informazioni dettagliate sulle caratteristiche chimico-fisiche dei materiali utilizzati e sul processo di produzione, ma anche sui mezzi di dispersione e i trattamenti utilizzati per la dispersione che possono influenzare l'uptake cellulare, l'interazione con le macromolecole biologiche e quindi la tossicità. È necessario inoltre effettuare ulteriori studi di genotossicità con l'utilizzo simultaneo di più test, tenendo in considerazione la capacità dei NM di interagire con i fluidi biologici, con i mezzi di dispersione, con i coloranti ed altri reagenti in grado di influenzare i risultati. Inoltre, dato che la maggior parte degli studi di genotossicità effettuati finora *in vitro* ha preso in considera-

zione tempi brevi di esposizione, sarebbe auspicabile avviare studi sugli effetti dovuti a esposizioni a tempi più lunghi.

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>TiO₂, ZnO, SiO₂ e Fe₃O₄</i>	Induzione di danno al DNA tramite produzione di ROS e risposta infiammatoria.
	<i>Al₂O₃</i>	Produzione di ROS Risposta pro-infiammatoria
	<i>TiO₂</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^+ , 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>Fe₃O₄</i>	liberazione Fe^{2+} . 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.	

5.2 Effetti citotossici

Gli studi attualmente disponibili sugli effetti citotossici dei NM sono numerosi e mostrano un'ampia variabilità tra le diverse NP per quanto concerne l'abilità di causare effetti tossici (Tabella 5.1). Tale variabilità è influenzata dalle dimensioni, dalla elevata area di superficie e dalle proprietà chimico-fisiche (contaminanti metallici o cariche di

superficie) che ne determinano lo stato di aggregazione, la penetrabilità, la reattività e che rendono complesso lo studio degli effetti e del loro meccanismo d'azione.

5.2.1. Nanomateriali a base di carbonio

Nanotubi di carbonio a parete singola (SWCNT)

Cui et al. (2005) trattarono cellule embrionali umane del rene con SWCNT e riscontrarono una diminuzione dose e tempo-dipendente della capacità di adesione delle cellule, una riduzione della proliferazione cellulare, un aumento nell'induzione dell'apoptosi e un'alterata regolazione del ciclo cellulare. Manna et al. (2005) utilizzando quattro diversi tipi cellulari – cheratinociti umani, cellule di carcinoma della cervice uterina (HeLa), cellule alveolari umane (A549), cellule di carcinoma polmonare (H1299) – osservarono stress ossidativo ed una diminuzione dose-dipendente della vitalità cellulare.

Alcuni studi evidenziarono che i SWCNT funzionalizzati provocano effetti citotossici inferiori rispetto a quelli purificati. Shi Kam et al. (2004) dimostrarono che nanotubi a parete singola funzionalizzati con gruppi carbossilici, biotina e fluoresceina non evidenziavano significativa tossicità nella linea cellulare HL60 (linea leucemica umana) e nella linea cellulare Jurkat T (linfociti T helper derivati da cellule leucemiche umane) dopo un'ora di esposizione. Sayes et al. (2006a) valutarono la citotossicità di tre differenti campioni di SWCNT in una linea cellulare di fibroblasti umani. In questo studio vennero utilizzati tre campioni di SWCNT funzionalizzati – SWCNT-fenil-SO₃H, SWCNT-fenil-(COOH)₂, SWCNT-fenil-SO₃Na – e un campione di nanotubi stabilizzato con un tensioattivo (Pluronic F108). Gli autori rilevarono che i nanotubi diventavano meno citotossici all'aumentare del livello di funzionalizzazione sulla parete laterale. Inoltre, i SWCNT funzionalizzati sulla parete laterale apparivano meno citotossici di quelli stabilizzati con tensioattivo.

Diverse ipotesi sono state proposte per spiegare la citotossicità indotta dai SWCNT. Una di queste è legata all'uso di catalizzatori metallici nella produzione dei nanotubi. Uno studio condotto sui cheratinociti umani (HaCaT) (Shvedova et al., 2003a) esposti a SWCNT rilevava una citotossicità dose e tempo-dipendente. L'esposizione a concentrazioni elevate per lunghi periodi di tempo provocava un aumento dello stress ossidativo, una riduzione dei livelli di glutazione ed alterazioni ultrastrutturali e morfologiche a livello del nucleo e dei mitocondri. Gli autori, inoltre, notarono che l'aggiunta di un chelatore dei metalli si accompagnava a una diminuzione della citotossicità; ciò lasciava supporre che i residui del ferro utilizzato come catalizzatore potessero giocare un ruolo importante nell'induzione della citotossicità osservata. L'aggregazione delle particelle sembra essere un fattore importante nella citotossicità delle NP, ma i risultati di studi condotti da autori diversi mostrano risultati discordanti.

Lo scopo del lavoro di Wick et al., (2007) era determinare come l'agglomerazione possa influenzare la citotossicità dei SWCNT. Gli autori utilizzarono quattro differenti soluzioni di nanotubi: la materia prima coinvolta nella produzione dei nanotubi, gli agglomerati di nanotubi risultanti dal processo di sintesi, fasci di nanotubi ed il pellet di nanotubi ottenuto dalla centrifugazione degli agglomerati. L'aggregazione si verificava in tutte le frazioni di nanotubi, eccetto nei fasci di nanotubi che erano ben dispersi. I fasci di nanotubi non provocavano effetti negativi nelle cellule e ciò confermava l'ipotesi che agglomerati di SWCNT provocassero effetti citotossici. I risultati di uno studio precedente (Tian et al., 2007), nel quale si utilizzavano soluzioni di nanotubi a parete singola non purificati e soluzioni in cui i metalli erano stati rimossi, mostrava una citotossicità più bassa con i nanotubi non purificati. Gli autori proponevano che la più bassa citotossicità dei nanotubi non purificati fosse un risultato della loro aggregazione in particelle più grandi e quindi meno tossiche. Ciò contraddiceva il ragionamento di Wick et al. (2007), secondo il quale gli agglomerati di nanotubi sarebbero citotossici per la loro rigidità e per le maggiori dimensioni, che li portano ad emulare gli effetti indotti dalle fibre di amianto. Nonostante i risultati contrastanti ottenuti possano essere legati all'uso di due differenti linee cellulari, l'effetto dell'aggregazione dei nanotubi di carbonio non risulta accertato.

Nanotubi di carbonio a parete multipla (MWCNT)

Studi sui MWCNT hanno dato risultati simili a quelli ottenuti per i SWCNT. Nei cheratinociti umani (HEK) esposti a concentrazioni crescenti (da 0.1, 0.2, 0.4 mg/ml) di MWCNT (Monteiro-Riviere et al., 2005) è stata riscontrata, tramite microscopia elettronica a trasmissione, la presenza di nanotubi in vacuoli all'interno del citoplasma, liberi nel citoplasma e vicino al nucleo. La percentuale di cellule contenenti nanotubi aumentava da 56% a 24 h a 84% dopo 48 h di esposizione alla dose più elevata. Inoltre, i MWCNT provocavano una diminuzione dose e tempo-dipendente della vitalità cellulare ed un aumentato rilascio di citochina IL-8 alle concentrazioni più elevate. Mentre lo studio svolto da Shvedova et al. (2003a) sui SWCNT proponeva che la citotossicità potesse essere dovuta alla presenza di metalli catalizzatori, la mancanza di particelle di catalizzatori in queste soluzioni di MWCNT suggeriva che gli stessi nanotubi di carbonio fossero potenzialmente pericolosi. Gli autori ipotizzarono che la citotossicità dei nanotubi fosse dovuta all'adesione degli stessi alla membrana cellulare o alla loro internalizzazione. Sato et al. (2005) trovarono aggregati di MWCNT nel citoplasma delle cellule monocitarie umane THP-1. Bottini et al. (2006) osservarono una citotossicità dose e tempo-dipendente nei linfociti T e nelle cellule Jurkat leucemiche. Inoltre, sia i nanotubi puri sia quelli ossidati inducevano apoptosi dose e tempo-dipendente nei linfociti T. Gli autori notarono che i MWCNT puri erano meno citotossici

di quelli ossidati. De Nicola et al. (2008) presentarono una valutazione tossicologica di differenti tipi di nanotubi sulle cellule Jurkat tumorali linfocitiche umane. I risultati indicavano che i nanotubi inducevano apoptosi, accelerando la transizione alla necrosi secondaria, aumentando d'intensità l'apoptosi indotta da agenti di danneggiamento, ed inducendo una iperpolarizzazione della membrana di plasma. Chiaretti et al. (2008) studiarono gli effetti dei MWCNT sulla proliferazione di tre differenti linee cellulari. La linea cellulare umana di adenocarcinoma della mammella MCF-7 mostrava una significativa inibizione della proliferazione per tutte le condizioni esaminate, mentre le cellule muscolari lisce arteriose umane primarie hSMC dimostravano una riduzione della crescita cellulare solo per le più alte concentrazioni di MWCNT dopo 72 ore d'incubazione. Invece, nessuna modificazione della crescita si osservava nella linea cellulare cancerosa coloretale umana Caco-2. Questi sorprendenti risultati si accordano allo studio di Pulskamp et al. (2007) che non hanno determinato alcuna tossicità acuta nella vitalità cellulare e nell'apoptosi in due linee cellulari, quella dei macrofagi alveolari del ratto NR8383 e quella epiteliale polmonare umana A549. Inoltre, il trattamento con MWCNT in entrambe le linee cellulari non induceva alcun rilascio di mediatori infiammatori, ma produceva un incremento delle specie reattive dell'ossigeno intracellulari (ROS), dipendente dalla dose e dal tempo. Anche il buckypaper di nanotubi in carbonio a parete multipla diminuiva la proliferazione delle linee cellulari umane cancerose coloretali (Caco-2), della mammella (MCF-7) già menzionate nel paragrafo precedente, ma si rivelava particolarmente efficace in quelle leucemiche promielotiche HL-60, come scoperto da Bellucci et al. (2009), che allo stesso tempo non riscontravano alcun effetto inibitorio di questo film di nanotubi multiparete nella proliferazione e nella viabilità di due linee di cellule primarie normali, quali le cellule muscolari lisce arteriose umane primarie hSMC ed i fibroblasti dermici (HF). Jia et al. (2005) evidenziarono una diminuzione della vitalità cellulare dose e tempo-dipendente dopo esposizione dei macrofagi alveolari a MWCNT purificati al 95%. Mentre questi autori trovarono un andamento dose-dipendente della citotossicità, Flahaut et al. (2006) trovarono una diminuzione della vitalità nelle cellule endoteliali del cordone ombelicale umano (HUVEC) con diluizioni delle loro soluzioni di MWCNT. Benché gli autori abbiano concluso che i nanotubi utilizzati non fossero tossici, si rilevò tuttavia che la vitalità cellulare sembrava diminuire per esposizioni a concentrazioni decrescenti di nanotubi con un'elevata area superficiale. Questo risultato veniva attribuito dagli autori all'aggregazione dei nanotubi o alla loro aumentata interazione con le cellule per l'elevata dispersione alle concentrazioni più basse. Il lavoro di Muller et al. (2005) dimostrava che i MWCNT più corti sono più tossici di quelli più lunghi. In questo studio sono stati utilizzati macrofagi peritoneali esposti a MWCNT purificati ed a MWCNT purificati e frantumati con un mulino a vibrazione (che

riduce la lunghezza dei nanotubi, ma non ha nessuna influenza sulle altre caratteristiche del materiale). La citotossicità e l'espressione del TNF- α dei MWCNT purificati erano significativamente più basse di quelle dei MWCNT purificati e frantumati. Inoltre, i MWCNT purificati e frantumati si mostravano simili all'amianto e al nerofumo sia nella regolazione dell'espressione del TNF- α sia per la capacità di indurre una citotossicità dose-dipendente.

Fullereni

Dai numerosi studi condotti è emerso che la risposta citotossica indotta dai fullereni dipende dal tipo cellulare impiegato. Infatti, nessun effetto citotossico si riscontra in linee cellulari di macrofagi, mentre in altri tipi cellulari si evidenzia un effetto citotossico dose-dipendente. Fiorito et al. (2006) non trovarono risposte citotossiche indotte dai fullereni purificati nei macrofagi murini. Gli autori osservarono che i C₆₀ avevano un basso assorbimento cellulare, non stimolavano il rilascio di ossido nitrico e non inducevano apoptosi in confronto alla grafite ed ai SWCNT. Jia et al. (2005), dopo aver incubato per 6 ore macrofagi alveolari con C₆₀ (226 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), non riscontrarono una significativa tossicità. Porter et al. (2006) studiarono gli effetti dei C₆₀ nei monociti/macrofagi umani e non riscontrarono una significativa citotossicità, ma a livello subcellulare osservarono che i C₆₀ tendevano ad accumularsi nella cellula (nei lisosomi, nel citoplasma, lungo la membrana nucleare e dentro il nucleo). Sayes et al. (2004) incubarono fino a 48 ore quattro differenti derivati dei fullereni – una forma di aggregato del C₆₀; C₃; Na*₂₋₃[C₆₀O₇₋₉(OH)₁₂₋₁₅]⁽²⁻³⁾; C₆₀(OH)₂₄ – con fibroblasti del derma umano e cellule umane del tumore epatico. Tra le concentrazioni utilizzate solo la più elevata (2400 ppb) risultava citotossica. L'aggiunta di gruppi funzionali sulla superficie, per incrementarne la solubilità, provoca la diminuzione della citotossicità *in vitro*. Infatti, tra i quattro tipi di fullereni utilizzati il C₆₀ purificato risultava il più tossico, mentre il C₆₀ più ricco di gruppi ossidrilici [C₆₀(OH)₂₄] non mostrava effetti citotossici. In uno studio più approfondito, condotto su fibroblasti del derma umano, cellule umane del tumore epatico ed astrociti umani normali, Sayes et al. (2005) dimostrarono che l'apoptosi cellulare indotta dall'esposizione a C₆₀ era dovuta alla perossidazione dei lipidi di membrana da parte dei radicali dell'ossigeno. Infatti, l'aggiunta di un antiossidante, l'acido L-ascorbico, preveniva sia il danno ossidativo sia la tossicità indotta dai fullereni. Rouse et al. (2006) studiarono gli effetti indotti dai fullereni funzionalizzati con amminoacidi nei cheratinociti umani (HEK). Dopo 24 e 48 ore di esposizione furono riscontrati una diminuzione dose-dipendente della vitalità cellulare ed un aumento della fagocitosi delle particelle in cellule esposte a concentrazioni superiori a 0.004 mg/ml.

5.2.2. Nanoparticelle di metalli e ossidi metallici

Lanone et al. (2009) valutarono gli effetti citotossici di 24 diverse NP con diametro aerodinamico equivalente su due linee cellulari polmonari umane le A549 e le THP-1. I NM a base di rame e zinco apparivano più tossici di tutti i composti testati. Ossidi misti di rame e di zinco erano tossici come il rame o lo zinco di per sé. Nanomateriali a base di ossidi di titanio, alluminio, cerio, argento, nichel e zirconio mostravano una tossicità da moderata a bassa, mentre per il carburo di tungsteno non fu osservata nessuna tossicità. L'esposizione a NM di cobalto induceva tossicità nelle cellule THP-1 solamente nel caso di miscele nichel-cobalto-manganese; nessuna tossicità fu riscontrata invece per il solo cobalto.

Braydich-Solle et al. (2005) testarono NP di argento (Ag di 15 nm), di molibdeno (MoO_3 di 30 nm) e di alluminio (Al 30 nm), utilizzando come controllo positivo l'ossido di cadmio, su cellule staminali spermatogoniche di ratto (C18-4). Lo studio dimostrò una tossicità dose-dipendente per tutte le particelle testate, mentre i corrispondenti sali solubili non mostravano effetti significativi. Le NP di argento erano le più tossiche, mentre quelle di triossido di molibdeno erano le meno tossiche. Per quanto riguarda l'apoptosi, dimostrarono che il numero di cellule apoptotiche aumentava in modo dose-dipendente a basse concentrazioni e che con l'aumentare della concentrazione diverse cellule diventavano necrotiche. Per le NP di molibdeno un piccolo numero di cellule apoptotiche fu osservato a partire dalla concentrazione di 25 $\mu\text{g/ml}$, e poche cellule necrotiche a partire da 50 $\mu\text{g/ml}$. La maggior parte delle cellule appariva intatta all'osservazione al microscopio ottico a contrasto di fase.

Lin et al. (2006a) valutarono la citotossicità di NP di ossido di cerio (20 nm) nelle A549. La vitalità cellulare diminuiva significativamente in funzione della dose e del tempo di esposizione. I risultati di tale studio dimostrarono che l'esposizione a concentrazioni da 3.5 a 23.3 $\mu\text{g/ml}$ di NP di ossido di cerio produceva nelle A549 stress ossidativo.

5.2.3. Quantum dot (QD)

Studi effettuati su QD di CdSe ricoperti con ZnS dimostrarono l'efficacia del guscio di ZnS nel ridurre la citotossicità di questi materiali. Infatti, i QD non ricoperti rilasciano ioni cadmio e il cadmio induce la morte cellulare attraverso lo stress ossidativo e il danno mitocondriale. È stato inoltre valutato da diversi autori l'effetto di un ulteriore rivestimento di superficie sulla citotossicità dei QD. Shiohara et al. (2004) studiarono la citotossicità di tre QD di Cd/Se/ZnS rivestiti con acido mercaptoundecanoico (MUA)

con diversa emissione spettrale (verde, giallo e rosso) in tre differenti linee cellulari. Lo studio rivelò che il rivestimento con MUA non è adatto perché aumenta la tossicità dei QD. Hoshino et al. (2004) dimostrarono che il trattamento con il solo rivestimento dei QD, l'acido mercaptoundecanoico (100 µg/ml), causava acuta citotossicità nelle cellule murine del linfoma a cellule T (EL-4).

Ryman-Rasmussen et al. (2007) utilizzarono cheratinociti primari umani neonatali (HEK) per determinare la citotossicità e il potenziale infiammatorio di QD di CdSe con il guscio di ZnS. I QD erano solubili e di due diverse dimensioni QD 565 (4.6 nm) e QD 655 (6 nm per 12 nm), ricoperti con tre differenti rivestimenti: polietilenglicole (PEG), PEG-ammine ed acidi carbossilici. La citotossicità fu osservata per QD 565 e QD 655 ricoperti con acido carbossilico e PEG-ammine dopo 48 ore di esposizione, ed una bassa citotossicità fu osservata per i QD ricoperti con polietilenglicole. Voura et al. (2004) trattarono cellule di melanoma (B16F10) con QD di CdSe/ZnS rivestiti con acido diidrossilipoico e non notarono differenze rilevabili nella crescita di cellule di controllo e trattate con i QD. Hanaki et al. (2003) trattarono cellule renali della scimmia verde africana (VERO) con concentrazioni di 0.24 mg/ml di QD di CdSe/ZnS rivestiti con MUA e con albumina di siero ovino e non trovarono effetti indotti dai QD sulla vitalità cellulare.

Lovric et al. (2005) trovarono che i quantum dot di tellururo di cadmio ricoperti con acido mercaptopropionico e β-mercaptoetilammina erano citotossici alla concentrazione di 10 µg/ml in colture cellulari di feocromocitoma di ratto; al contrario, QD di tellururo di cadmio non ricoperti erano tossici alla concentrazione di 1 µg/ml. La morte cellulare era caratterizzata da condensazione della cromatina e sviluppo di blebs sulla membrana cellulare, aspetti caratteristici dell'apoptosi. La citotossicità era più pronunciata a parità di carica nei QD più piccoli alla stessa concentrazione. Le dimensioni dei QD influenzano anche la distribuzione subcellulare: cationi di QD più piccoli si localizzano nel nucleo, mentre cationi più grandi si localizzano nella matrice citoplasmatica. I meccanismi coinvolti nella morte cellulare erano attribuiti alla presenza di Cd libero.

5.2.4 Conclusioni

In conclusione i dati disponibili mostrano effetti citotossici ed apoptotici per i nanotubi di carbonio (prevalentemente per quelli a parete a singola non funzionalizzati) ma molto sembra dipendere dallo stato di aggregazione, dalla presenza di metalli catalizzatori, dalla presenza di gruppi di funzionalizzazione, dal grado di purezza, dalla lunghezza e dal diametro. Per quanto riguarda i fullereni, questi sembrano essere meno citotossici anche se la risposta dipende dal tipo cellulare: non sono citotossici per i macrofagi mentre lo sono per altri tipi di cellule. Per le NP metalliche c'è un'ampia variabilità nella risposta dipendente dal tipo di metallo: effetti sono stati

osservati per NM a base di argento, rame, zinco, molibdeno, alluminio. Mentre per i QD gli effetti osservati sono da mettere in relazione con le dimensioni e con il tipo di rivestimento presente.

Nel complesso dagli studi disponibili emerge un'ampia variabilità negli effetti citotossici osservati che dipende dalle specifiche caratteristiche dei NM utilizzati di cui è necessario tener conto. Inoltre dato che nei diversi studi vengono solitamente utilizzate elevate quantità di NM è auspicabile che vengano eseguiti ulteriori studi che utilizzino i NM più diffusi, e quindi più rilevanti dal punto di vista delle possibili esposizioni, e a concentrazioni inferiori.

5.3. Effetti respiratori

Studi *in vitro* e *in vivo* hanno riportato che il polmone rappresenta il principale organo bersaglio degli effetti tossici delle NP. Inoltre, la più importante via di assorbimento delle NP è quella respiratoria.

5.3.1. Assorbimento

Sebbene le prime vie aeree costituiscano una robusta barriera al passaggio delle NP, lo stesso non può dirsi per gli alveoli, che costituiscono l'area di scambi gassosi tra il polmone ed il sangue. A questo livello, infatti, lo spessore della separazione tra i due compartimenti si riduce a soli 5 μm . Poiché la maggior parte delle NP ingegnerizzate è presente in ambito occupazionale e ambientale sotto forma di aerosol o sospensioni colloidali, l'esposizione polmonare conseguente ad inalazione nelle vie aeree costituisce la via di esposizione umana più comune per questo materiale (Maynard et al., 2004). L'interazione delle NP ingegnerizzate con il parenchima polmonare può variare a seconda che le NP abbiano una forma sferica o allungata. Le NP di forma sferica si depositano in regioni polmonari diverse in base alle dimensioni e alla struttura fisica (Oberdoster et al., 2005). Una volta depositatesi negli alveoli, le NP di forma sferica sono traslocate nell'interstizio polmonare, probabilmente con meccanismo di transitosi, e da qui nella circolazione sistemica. Berry et al. (1997) hanno descritto per primi la traslocazione delle NP d'oro attraverso l'epitelio alveolare instillando nei ratti per via intratracheale NP d'oro del diametro di 30 nanometri. Diversamente dalle NP sferiche, per quelle di aspetto simil-fibroso, come i nanotubi di carbonio, un ruolo chiave ha, per la traslocazione polmonare, la loro capacità di eludere la sorveglianza dei macrofagi (fagocitosi frustrata) e di potere così introdursi nella circolazione generale. Questa capacità di elusione macrofagica sembra essere più spiccata per le fibre di lunghezza maggiore.

5.3.2. Nanomateriali a base di carbonio

Nanotubi di carbonio (CNT)

Numerosi Autori hanno studiato gli effetti citotossici dei SWCNT e dei MWCNT su linee cellulari polmonari umane e non. Per quanto riguarda i MWCNT è stato osservato mediante l'MTT test che l'esposizione a 5 µg/ml di queste sostanze determina nei macrofagi alveolari murini RAW 264.7, nei macrofagi umani THB-1 e nella linea cellulare di carcinoma polmonare umano A549 effetti citotossici simili a quelli dell'asbesto (Soto et al., 2007). Risultati simili erano stati precedentemente ottenuti su cellule RAW 264.7 e su macrofagi alveolari esposti a SWCNT e MWCNT (Murr et al., 2005; Jia et al., 2005). Effetti citotossici di minore entità sono stati osservati esponendo cellule A549 a concentrazioni crescenti di SWCNT (da 1.56 a 800 µg/ml). Gli effetti citotossici maggiori sono stati osservati mediante il test dell'alar blue, il test di incorporazione del rosso neutrale e l'MTT alle concentrazioni di 400 ed 800 µg/ml ed in assenza di siero (Davoren et al., 2007). Altri Autori hanno evidenziato invece che sulla stessa linea cellulare e su macrofagi alveolari di ratto NR8383 l'esposizione a 5, 10, 50 e 100 µg/ml di MWCNT e di SWCNT purificati non ha determinato effetti tossici (Pulskamp et al., 2007). In particolare nessun effetto tossico è stato riscontrato con il test WST-1 sebbene l'MTT test abbia evidenziato una diminuzione dose-dipendente della vitalità cellulare. Questa discordanza è stata spiegata da alcuni Autori con la capacità dei CNT di interferire con l'MTT test (Worle-Knirsch et al., 2006; Monteiro-Riviere e Inman 2006). Numerosi studi comunque hanno dimostrato la tossicità di queste NP mediante altri test di vitalità cellulare. In cellule RAW 264.7, trattate con concentrazioni di SWCNT comprese tra 12.5 e 30 µg/ml, è stata osservata un'importante diminuzione del numero delle cellule mediante la conta cellulare (Dutta et al., 2007). In cellule A549 e in cellule di epitelio bronchiale umano BEAS-2B il test clonogenico ha mostrato una significativa riduzione delle dimensioni delle colonie cellulari con dosi di SWCNT comprese tra 0 e 400 µg/ml (Herzog et al., 2007). Infine, cellule di mesotelioma umano MSTO211H trattate con concentrazioni di SWCNT non purificati comprese tra 0 e 30 µg/ml ha provocato un'importante riduzione della proliferazione cellulare (Wich et al., 2006).

I lavori presenti in letteratura dimostrano che la citotossicità dei CNT sarebbe correlata alla presenza di impurezze metalliche. Infatti, l'esposizione delle cellule BEAS-2B a SWCNT contenenti il 30% di ferro o il 20% di nichel ha determinato effetti citotossici quali diminuzione della vitalità cellulare, riduzione dei livelli di glutazione ed aumentata produzione dei radicali idrossilici (Shvedova et al., 2007b). Analoghi effetti sono stati riscontrati in cellule A549, BEAS-2B (Herzog et al., 2007, Shvedova et al., 2004) e in cellule RAW 264.7 (Kagan et al., 2006) esposte a SWCNT contenenti ferro a dif-

ferenza di SWCNT purificati che hanno manifestato minimi effetti tossici (Herzog et al., 2007; Kagan et al., 2006). Infatti, i CNT purificati non sono potenti induttori dei radicali liberi dell'ossigeno (ROS) o dei mediatori dell'infiammazione. L'esposizione di cellule RAW 264.7 a SWCNT purificati non ha determinato la produzione intracellulare di ROS o dell'ossido nitrico (NO) (Kagan et al., 2006; Shvedova et al., 2005). Analogamente, in cellule A549 e NR8383 trattate con 5 - 100 µg/ml di MWCNT e di SWCNT purificati non vi è stata produzione di NO, IL-8 e TNF-α mentre, le NP non purificate hanno indotto la produzione di ROS (Pulskamp et al., 2007). Infine, Wang L. et al. (2008) hanno osservato che in fibroblasti polmonari, l'esposizione a SWCNT ha determinato un aumento della produzione di collagene e della proliferazione cellulare del 70%. Questi risultati confermerebbero le reazioni fibrogene dovute ai CNT osservate negli studi *in vivo*.

Pochi sono gli studi *in vivo* che hanno riportato effetti tossici dei CNT sul sistema respiratorio. Per quanto riguarda i SWCNT, in ratti maschi l'instillazione intratracheale di 1 e 5 mg/kg di questi CNT ha determinato un'infiammazione polmonare transitoria seguita dalla formazione non dose-dipendente di granulomi multifocali (Warheit et al., 2004). In topi maschi trattati con concentrazioni di 0.1 e 0.5 mg di SWCNT purificati e non, è stata invece osservata la comparsa dose-dipendente di granulomi interstiziali (Lam et al., 2004). Risultati simili sono stati ottenuti da Shvedova et al. (2005) che, esponendo mediante aspirazione faringea, topi femmine a SWCNT (0-40 µg) hanno osservato l'instaurarsi di un processo infiammatorio acuto e transitorio e la formazione dose-dipendente sia di granulomi epitelioidi sia di fibrosi interstiziale progressiva. Nell'ambito degli studi *in vivo* sono particolarmente importanti gli esperimenti di tossicità inalatoria. Nei topi C57BL/6 il confronto tra esposizione inalatoria (5 mg/m³, per 5 ore al giorno e per 4 giorni) ed aspirazione faringea (5-20 µg) di SWCNT ha evidenziato che entrambi i modelli sperimentali provocano un'importante risposta infiammatoria acuta che, con lo stress ossidativo, conduce allo sviluppo di una polmonite granulomatosa multifocale, seguita da una significativa fibrosi interstiziale (Shvedova et al., 2008b).

Tuttavia, l'esposizione inalatoria è molto più efficace nell'indurre i suddetti effetti tossici. Lo stress ossidativo indotto dai SWCNT è uno dei più importanti meccanismi che contribuiscono alla tossicità polmonare. Il trattamento di topi C57BL/6, privi dell'enzima NADPH ossidasi, con 40 µg di SWCNT ha determinato l'accumulo di polimorfonucleati, un incremento delle cellule apoptotiche, delle citochine pro-infiammatorie, la diminuzione delle citochine anti-infiammatorie, del TGF-β e del collagene (Shvedova et al., 2008c). Sulla base di questi risultati gli Autori hanno concluso che i ROS generati dalla NADPH ossidasi svolgono un ruolo di primaria importanza nella regolazione della risposta polmonare ai SWCNT. Negli stessi animali, alimentati con una

dieta carente in vitamina E, la somministrazione di 40 µg di SWCNT ha determinato una notevole diminuzione degli antiossidanti polmonari inducendo una risposta infiammatoria acuta decisamente più rilevante (Shvedova et al., 2007a).

Per quanto riguarda i MWCNT, Muller et al. (2005), dopo instillazione intratracheale di 0.5, 2 e 5 mg di MWCNT in ratti Sprague-Dawley, hanno osservato un'importante reazione infiammatoria acuta. Due mesi dopo il trattamento, agglomerati di MWCNT depositati nelle vie aeree hanno provocato la comparsa di granulomi ricchi di collagene con alveolite. Simili risultati sono stati ottenuti in topi C57BL/6 che, dopo aspirazione faringea di MWCNT, hanno sviluppato un'inflammatione polmonare tempo e dose-dipendente (Sriram et al., 2007). Tuttavia, nello stesso modello animale l'inhalazione (per 7 e 14 giorni e per 6 ore al giorno) di concentrazioni di MWCNT comprese tra 0.3 e 5 mg/m³ non ha determinato la comparsa di alcun danno polmonare o risposta infiammatoria (Mitchell et al., 2007). Recentemente è stato ipotizzato che la tossicità acuta polmonare osservata in ratti Wistar dopo instillazione intratracheale di 2 mg di MWCNT sia correlata alla presenza di difetti strutturali dei composti (Fenoglio et al., 2008; Muller et al., 2008b). In topi eterozigoti per il gene p53 la somministrazione intraperitoneale di 3 mg di MWCNT ha determinato dopo sei mesi dal trattamento la comparsa di mesotelioma (Takagi et al., 2008). Tuttavia, l'elevata dose di esposizione utilizzata ha sollevato dubbi sulla capacità dei MWCNT di determinare lesioni asbesto-simili (Shvedova et al., 2009). Poland et al. (2008), utilizzando una dose di esposizione più bassa, hanno osservato in topi esposti mediante iniezione intraperitoneale, a 50 µg di MWCNTs "lunghi" l'induzione di un'importante risposta infiammatoria della parete addominale con la presenza di cellule giganti da corpo estraneo. Questi effetti non sono stati invece evidenziati negli animali trattati con MWCNT "corti".

Fullereni

Macrofagi alveolari esposti a fullereni hanno manifestato effetti citotossici a concentrazioni molto elevate (226 µg/cm²) (Jia et al., 2005).

La citotossicità dei fullereni è correlata al loro grado di solubilizzazione ed è inversamente proporzionale al numero di gruppi idrossilici e carbossilici presenti sulla superficie della nanoparticella (Sayes et al., 2004). Infatti, in uno studio *in vitro* eseguito su cellule dell'epitelio polmonare è stato osservato che gli effetti tossici dei fullereni non solubili sono 3-4 volte maggiori rispetto a quelli provocati dai fullereni solubili (Sayes et al., 2007a). L'instillazione intratracheale, in ratti, di fullereni solubili e non, a dosi comprese tra 0.2 e 3 mg/kg, ha evidenziato che entrambi i composti inducono una risposta infiammatoria transitoria che si manifesta un giorno dopo il trattamento. Inoltre, a distanza di tre mesi, nei ratti esposti a 1.5 e 3 mg/kg, è stato osservato un incremento della perossidazione lipidica (Sayes et al., 2007a). L'esposizione inalatoria a 2.22 mg/m³

di fullereni per 3 ore al giorno per dieci giorni consecutivi in ratti maschi Fischer 344 non ha determinato alcuna lesione evidenziabile all'analisi istopatologica del tratto respiratorio (Baker et al., 2008).

5.3.3. Nanoparticelle metalliche

Numerosi studi *in vitro* ed *in vivo* hanno indagato i possibili effetti citotossici e la biocompatibilità delle NP metalliche.

In cellule BEAS-2B l'esposizione a dosi crescenti (da 5 a 40 $\mu\text{g/ml}$) di NP di biossido di Ti (TiO_2) ha determinato la loro penetrazione nel citoplasma e la loro localizzazione nella regione perinucleare. Inoltre, alla dose maggiore la vitalità cellulare si è ridotta del 40% rispetto al controllo e si è osservato un aumentato stress ossidativo dose-dipendente che secondo gli Autori sarebbe responsabile degli effetti citotossici osservati (Park et al., 2008b). Effetti simili sono stati osservati in cellule A549 esposte a concentrazioni di NP di TiO_2 comprese tra 3 e 400 $\mu\text{g/cm}^2$ (Singh et al., 2007). Sayes et al. (2006b) hanno riportato effetti citotossici nella stessa linea cellulare ma solo a concentrazioni relativamente elevate (100 $\mu\text{g/ml}$), dimostrando che l'induzione della risposta infiammatoria e della citotossicità sono dose e tempo-dipendenti. Livelli di citotossicità significativamente inferiori sono stati osservati a concentrazioni comprese tra 0.25 e 100 $\mu\text{g/ml}$ in condizioni sperimentali simili (Simon-Deckers et al., 2008). Karlsson et al. (2009) non hanno invece osservato alcun effetto citotossico o danno mitocondriale a concentrazioni di 40 e 80 $\mu\text{g/ml}$. Questi risultati discordanti potrebbero essere spiegati dalle differenti caratteristiche delle NP quali le dimensioni, la struttura cristallina, la composizione chimica e l'area di superficie.

Anche in ratti, l'instillazione intratracheale di 1 e 5 mg/kg di differenti tipi di NP di TiO_2 ha determinato effetti polmonari riconducibili alla diversa composizione chimica e struttura cristallina delle NP (Warheit et al., 2007). Attraverso l'analisi del BAL si è visto che le NP di Ti inducono un'importante risposta infiammatoria e significativi effetti citotossici. In uno studio simile, topi maschi ICR trattati con 0.1 e 0.5 mg di TiO_2 , hanno manifestato importanti alterazioni morfologiche ed istologiche del tessuto polmonare come la rottura dei setti alveolari, la proliferazione e l'iperplasia dei pneumociti di tipo II, l'accumulo di macrofagi, l'apoptosi delle cellule epiteliali e l'induzione di lesioni enfisematose (Chen et al., 2006). Negli stessi animali un'esposizione a 5, 20 e 50 mg/kg di NP di TiO_2 ha determinato l'induzione delle citochine proinfiammatorie di tipo Th1 e Th2, proliferazione delle cellule B ed un'aumentata produzione delle IgE. Inoltre, nei polmoni sono state osservate la formazione di lesioni granulomatose e la deposizione di proteine proinfiammatorie (Park et al., 2009). Ratti maschi di tipo CrI:CD(SD), esposti intratrachealmente a 1.5 e 5 mg/kg di particelle di TiO_2 di

diverse dimensioni e stato di aggregazione, hanno manifestato, dopo una settimana e a parità di dose somministrata, una risposta infiammatoria superiore nelle NP rispetto alle particelle di dimensioni maggiori (Kobayashi et al., 2009). Dopo un mese, le risposte infiammatorie osservate nei diversi gruppi di animali sono risultate invece simili. Gli Autori hanno ipotizzato che le risposte infiammatorie possano essere determinate dalle diverse superfici d'area delle particelle impiegate (1.58 m²/kg per le NP e 0.05 m²/kg per le particelle fini).

Gli effetti citotossici delle NP di argento (Ag) sono stati osservati nelle cellule germinali murine, nelle cellule epatiche di ratto, nel glioblastoma umano e nei fibroblasti polmonari umani IMR-90. In quest'ultima linea cellulare il trattamento con queste NP ha provocato una significativa riduzione del contenuto intracellulare di ATP, un importante danno mitocondriale ed un notevole incremento dose dipendente della produzione dei ROS (Asharani et al., 2009). Secondo gli Autori le NP di Ag altererebbero la normale funzionalità della catena respiratoria mitocondriale inducendo conseguentemente un accumulo di ROS e l'arresto della sintesi dell'ATP. Tuttavia, in uno studio su cellule A549, in cui si sono confrontati gli effetti di diverse NP metalliche, quelle di Ag indurrebbero effetti citotossici significativamente inferiori rispetto al Ti e sarebbero dotate di tossicità analoga all'alluminio, allo zinco (Zn) e all'Ag (Park et al., 2007).

Ratti Sprague-Dawley esposti mediante inalazione (per 6 ore al giorno e per 90 giorni) a NP di Ag alle concentrazioni di 0.7×10^6 , 1.4×10^6 e 2.9×10^6 particelle/cm³, hanno mostrato la presenza di piccole lesioni granulomatose e l'insorgenza di un'inflammatione alveolare cronica dose dipendente (Sung et al., 2008). Anche in uno studio analogo degli stessi Autori con simili concentrazioni di NP di Ag (0.6×10^6 , 1.4×10^6 e 3×10^6 particelle/cm³), si è osservato, mediante esame istopatologico del tessuto polmonare, la presenza di un infiltrato infiammatorio cellulare, di un'inflammatione alveolare cronica e di piccole lesioni granulomatose (Sung et al., 2009).

Gli studi in letteratura riportano come le NP di ferro (Fe) siano dotate di scarso potere citotossico. Infatti, concentrazioni di NP di Fe pari a 0.24, 2.4, 24, 240 e 2400 ppb su cellule A549 hanno determinato solo deboli effetti sull'attività mitocondriale, sul contenuto di DNA e sulla produzione del glutatione da parte delle cellule (Cha et al., 2007). Altri studi sulla stessa linea cellulare (A 549) hanno invece riportato l'assenza di effetti citotossici significativi (Karlsson et al., 2009; Karlsson et al., 2008).

Le NP di rame (Cu) sono capaci di indurre in cellule A549 maggiori effetti genotossici, citotossici, una maggiore depolarizzazione della membrana mitocondriale e un importante aumento dello stress ossidativo rispetto alle particelle dello stesso metallo di dimensioni micrometriche (Karlsson et al., 2009; Karlsson et al., 2008). Anche in cellule epiteliali della laringe umana HEP-2 l'esposizione a dosi di NP di Cu comprese

tra 4 - 400 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ha fornito risultati analoghi ai precedenti (Fahmy et al., 2009). Infatti, le cellule esposte hanno mostrato effetti citotossici dose-dipendenti che secondo gli Autori sarebbero correlati alla presenza di un importante stress ossidativo cellulare.

In cellule BEAS-2B esposte a concentrazioni crescenti (5, 10, 20 e 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) di NP di cerio (Ce) (Park et al., 2008b) si è osservato un incremento della morte cellulare, della produzione dei ROS e l'induzione dei geni correlati allo stress ossidativo. L'aumento dei ROS intracellulari sarebbe responsabile dell'attivazione della caspasi-3 e del conseguente innesco dell'apoptosi mediante la quale le NP di Ce realizzerebbero il loro effetto citotossico. Il coinvolgimento dei ROS nella citotossicità delle NP di Ce è stato confermato da uno studio dello stesso gruppo di ricerca condotto su cellule BEAS-2B esposte a 1 mg/l (Eom et al., 2009).

In cellule A549, esposte per 24 ore a diverse concentrazioni di NP di Zn, è stato possibile rilevare un'apoptosi importante ed un notevole incremento dello stress ossidativo intracellulare (Park et al., 2007). In uno studio effettuato esponendo diverse linee cellulari a concentrazioni di NP di Zn comprese tra 0.001 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e 30 mg/ml, le cellule L2 dell'epitelio polmonare di ratto hanno manifestato un maggior danno cellulare (Sayes et al., 2007b). Inoltre, le NP di Zn hanno indotto diversi effetti citotossici. Nello stesso studio è stato eseguito anche un esperimento *in vivo*, con instillazione intratracheale di 1 e 5 mg/kg di NP di Zn a ratti CrI:CD(SD)IGS BR cui è seguita la comparsa di una risposta infiammatoria estremamente cospicua ma reversibile che si è risolta a distanza di un mese dall'esposizione (Sayes et al., 2007b).

In cellule A549, esposte per 24, 48 e 72 ore a dosi crescenti (10, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) di NP di SiO_2 , è stato possibile osservare una riduzione dose e tempo-dipendente della vitalità cellulare, un incremento dei livelli di ROS, della produzione della malondialdeide e della lattato deidrogenasi (LDH) (Lin et al., 2006b). *In vivo*, la somministrazione intravenosa (2 volte la settimana per 4 settimane) di 10 e 30 mg/kg di NP di silice a topi BALB/c non ha provocato alcun danno respiratorio (Nishimori et al., 2009).

5.3.4. Conclusioni

Nel complesso gli studi *in vitro* suggeriscono come le NP ingegnerizzate siano in grado di esercitare sui sistemi biologici analizzati effetti citotossici non trascurabili. Infatti, le cellule dall'apparato respiratorio murino, di ratto, ed umano trattate con SWCNT e MWCNT, con differenti NP metalliche o di silice mostrano una diminuzione della vitalità cellulare, del numero e delle dimensioni delle colonie cellulari, della proliferazione cellulare, un incremento della produzione dei ROS e dello stress ossidativo extra ed intracellulare.

Gli studi in vivo invece evidenziano come l'esposizione alle NP provochi la comparsa di un'importante risposta infiammatoria polmonare acuta, la formazione di lesioni granulomatose ed enfisematose, la deposizione di collagene con conseguente fibrosi interstiziale e l'induzione di un significativo stress ossidativo. Inoltre, per quanto riguarda i MWCNT rimane ancora da accertare la possibilità che queste NP siano in grado di generare lesioni simili a quelle provocate dall'asbesto.

I suddetti effetti sul sistema respiratorio hanno suggerito di limitare l'utilizzo industriale e le possibili applicazioni pratiche delle NP (Svhedova et al., 2009). Tuttavia, i differenti tipi di NP mostrano gradi di tossicità piuttosto variabili, rendendo impossibile generalizzazioni. Ulteriori studi sono pertanto necessari per definire la reale tossicità di questi NM. A tal fine sarà fondamentale prevedere una accurata caratterizzazione chimico-fisica delle NP che saranno oggetto di studio.

5.4. Effetti cutanei

L'esposizione cutanea a NP (NP) può determinare effetti locali sulla cute, sia irritativi che allergici, o essere una via d'ingresso nel circolo sistemico di questi materiali. Pochi sono i dati per ora disponibili sui rischi cutanei di NP ma i primi risultati sperimentali permettono di ipotizzare un loro effetto sulla cute e la loro possibilità di penetrazione negli strati cutanei, anche se ad oggi vi è la necessità di maggiore ricerca su questo argomento con indagini specifiche sulle varie tipologie di NP, perché diversi materiali possono avere diffusione ed effetti diversi sulla cute. È noto, infatti che gli effetti cutanei sono diversi se vi è esposizione a nanotubi di carbonio oppure a NP metalliche, che si comportano diversamente a seconda delle loro dimensioni e del tipo di metallo considerato. Peraltro le informazioni maggiori ci derivano dall'industria farmaceutica che ha studiato molto l'effetto delle NP di ZnO e di TiO₂ utilizzate per la formulazione di creme protettive mentre pochissime informazioni sono disponibili per le altre tipologie di NP.

5.4.1. Assorbimento

La cute, con un'estensione di circa 1,5 m² nell'adulto, costituisce una barriera difficilmente superabile dalle NP (Argyle et al., 2009). Ciò è dovuto alla sostanziale impermeabilità dello strato superficiale della cute (epidermide), mentre lo strato sottostante (derma) ha una ricca irrorazione sanguigna e contiene abbondanti macrofagi tissutali, vasi linfatici, cellule dendritiche, e cinque differenti tipi di terminazioni nervose di tipo sensitivo. Pertanto, qualora le NP ingegnerizzate riuscissero ad avere accesso al derma esse verrebbero trasportate nel circolo ematico e convogliate nel

sistema linfatico e nei linfonodi, potendo, a questo punto, provocare una risposta immunitaria. Kim et al. (2004) hanno dimostrato che NP iniettate nel derma migrano verso i linfonodi regionali, possibilmente tramite macrofagi e cellule del Langerhans. Gli studi riguardanti la penetrazione cutanea delle NP (Alvarez-Roman et al., 2004; Baroli et al., 2007; Bennat et al., 2000; Ryman-Rasmussen et al., 2006; Larese et al., 2009) hanno dato risultati discrepanti, probabilmente a causa dell'impiego di tecniche e metodologie diverse, e specialmente dell'assenza di protocolli standardizzati. Le flessioni meccaniche, detergenti irritanti e sostanze chimiche possono aumentare l'assorbimento cutaneo. Sebbene finora non vi siano prove sperimentali convincenti che le NP ingegnerizzate possano oltrepassare l'epidermide e quindi raggiungere il derma, esistono indizi indiretti a supporto di questa possibilità. È stato dimostrato che i nanotubi di carbonio sono in grado di danneggiare i cheratinociti umani, che sono la componente cellulare dell'epidermide (Shvedova et al., 2003a; Monteiro-Riviere et al., 2005): poiché il passaggio trans-epidermico è molto probabile in caso di danno anatomico, esposizioni ripetute a NP ingegnerizzate potrebbero determinare in una prima fase il danno dell'epidermide e successivamente il passaggio nel derma delle medesime NP. Questa possibilità ha importanti risvolti non solo in ambito occupazionale, ma anche nella popolazione generale se si considera che le NP sono presenti in molti prodotti cosmetici come veicoli per creme o negli shampoo, detergenti o creme solari.

Effetto irritativo

Per alcuni NM è stato evidenziato un effetto di tipo irritativo-infiammatorio (Crosera et al., 2009). In particolare i nanotubi di carbonio possono svolgere un'azione irritativa sulla cute e sulla congiuntiva per il loro effetto meccanico: Kishore et al. (2009) riportano effetti irritativi reversibili di alcuni nanotubi sulla congiuntiva mentre non osservano effetti sulla cute dell'animale. Per quanto riguarda i quantum dot, invece, Ryman-Rasmussen et al. (2007) riportano un loro effetto citotossico ed irritativo in esperimenti *in vitro* su cheratinociti in cui si osserva liberazione di citochine. Anche le NP d'argento possono svolgere un effetto citotossico su colture di cheratinociti *in vitro* ma non vi sono ad oggi dati su soggetti professionalmente esposti o su utilizzatori (Zanette et al., 2009).

Effetto allergico

Attualmente non vi sono dati sulla potenziale allergenicità delle NP ma alcune informazioni possono fare ipotizzare un aumentato rischio nelle condizioni di esposizione a NP metalliche. Visto che le NP possiedono una maggior superficie biodisponibile, è ipotizzabile che esercitino una maggior interazione con i sistemi immunitari cutanei

e l'induzione di una risposta allergica da contatto nel caso di NP contenenti metalli allergenici come cobalto, nichel e cromo. Non vi sono tuttavia ad oggi dati che confermino tale ipotesi e ulteriori studi in questo campo risultano necessari. Presumibilmente non ci dovrebbe essere risposta allergica verso quelle NP contenenti metalli non allergenici (Oro, Argento). Alcuni dati preliminari, invece, suggeriscono che i fullereni possano avere un ruolo nell'inibizione della risposta allergica IgE mediata sia in sistemi *in vitro* che *in vivo* inibendo il rilascio di istamina (Ryan et al., 2007).

5.4.2. Nanomateriali a base di carbonio

Nanotubi di carbonio e fullereni

Vi sono pochi dati sugli effetti cutanei dei nanotubi di carbonio (CNT). Per i fullereni Rouse et al. (2007) hanno dimostrato la capacità di penetrazione attraverso la cute intatta e particolarmente nelle zone di flessione e Ryan et al. nel 2007 hanno ipotizzato un loro ruolo nell'inibizione della risposta allergica IgE mediata.

I dati attualmente disponibili sui possibili effetti cutanei dei CNT si basano essenzialmente su studi *in vitro* effettuati su cheratinociti e fibroblasti. Shvedova et al. (2003a) hanno dimostrato che i nanotubi di carbonio a parete singola (SWCNT) causano stress ossidativo su cheratinociti umani immortalizzati (HaCat) con perdita della vitalità e alterazioni macroscopiche. In uno studio su cheratinociti esposti a dosi crescenti di SWCNT, l'aumento di rilascio dell'interleuchina-8 (IL-8), osservato dopo 24 e 48 ore alla dose più elevata (0.05 mg/ml) suggerisce una reazione irritativa dose-dipendente (Zhang et al., 2007), mentre in uno studio effettuato su fibroblasti umani esposti a SWCNT con diversi gradi di funzionalizzazione si è evidenziata una citotossicità che diminuisce con il grado di funzionalizzazione (Sayes et al., 2006a). Inoltre la superficie esposta risulterebbe essere proporzionale alla loro potenziale tossicità. Altri studi hanno dimostrato un effetto irritativo-infiammatorio dei nanotubi di carbonio multi-parete (MWCNT) sui cheratinociti (Monteiro-Riviere et al., 2005; Witzmann and Monteiro-Riviere et al., 2006) ed effetti citotossici su fibroblasti della pelle (Ding et al., 2005).

5.4.3. Nanoparticelle di metalli ed ossidi metallici

Nanoparticelle metalliche

I prodotti a base di NP d'argento presentano molteplici applicazioni, specialmente per l'attività antimicrobica dell'argento, ben documentata e considerata priva di tossicità. Cheratinociti e fibroblasti in coltura sono stati impiegati per studiare gli eventuali effetti tossici di NP d'argento rilasciate da capi di vestiario contenenti nanoargento (Leaper, 2006). I risultati di questi studi hanno dimostrato che gli estratti di bendaggi

ricoperti con NM d'argento inibiscono la proliferazione di cheratinociti e ne alterano la morfologia (Paddle-Ledinek et al., 2006). Poon and Burd (2004) hanno inoltre dimostrato che cristalli di nanoargento risultano tossici nei confronti sia di cheratinociti sia di fibroblasti. Alcuni Autori hanno suggerito che la penetrazione cutanea di nanoargento sia maggiore nella cute lesa, rispetto alla cute integra (Larese et al., 2009). I meccanismi di eliminazione di NP dopo assorbimento per via transdermica non sono ancora del tutto noti, ma esistono evidenze sulla capacità di NP di distribuirsi per via sistemica attraverso i vasi linfatici sottocutanei (Gopee et al., 2007).

Nanoparticelle d'oro sono utilizzate per applicazioni medicali in quanto ritenute sicure (Connor et al., 2005) ma Wang S. et al. (2008) hanno dimostrato un loro effetto citotossico su cheratinociti umani *in vitro*.

Papageorgiou et al. (2007), paragonando gli effetti citotossici e genotossici di NP e microparticelle di una lega cobalto/cromo in fibroblasti umani in coltura, hanno riportato che le NP inducono un maggior danno al DNA ed esibiscono maggior citotossicità, rispetto alle microparticelle.

Nanoparticelle di ossidi metallici: biossido di titanio (TiO₂) e ossido di zinco (ZnO)

Queste sono le NP più diffuse ed utilizzate nelle creme schermanti solari in quanto bloccano i raggi UV in modo efficiente ma non presentano il colorito biancastro tipico delle creme che utilizzavano particelle in dimensioni micromiche. Tan et al. (1996) hanno valutato le biopsie di soggetti che avevano applicato per 2-6 settimane una crema con TiO₂ confermando la presenza del metallo nella cute esposta. Successivamente, però, altri autori hanno dimostrato che il TiO₂ si localizza solo nello strato corneo e non penetra in profondità (Schulz et al., 2002; Mavon et al., 2007) anche se una piccola quantità si può trovare nei follicoli piliferi (Lademann et al., 1999). Il progetto europeo NANODERM del 2007 ha studiato per esteso l'effetto cutaneo concludendo che il TiO₂ è sicuro, non penetrando negli strati profondi dell'epidermide. Simili i risultati degli studi sull'ossido di zinco, che resta in superficie e penetra solo a livello dello strato corneo (Cross et al., 2007).

A fronte di tali dati, che negano la penetrazione in profondità nella cute di queste NP, ci sono le informazioni più recenti che evidenziano la capacità di alcune NP di penetrare la cute nelle condizioni di flessione (Rouse et al., 2007) o quando la cute è lesa (Larese et al., 2009); ciò rende probabile che, nelle condizioni di ripetute applicazioni di queste creme, nel tempo possa verificarsi una penetrazione di NP. La stessa Newman, nella recente review (2009), suggerisce la necessità di ulteriori studi per capire se nelle condizioni reali vi sia un aumentato assorbimento di tali metalli a livello cutaneo.

La penetrazione di queste NP a livello degli strati profondi dell'epidermide aprirebbe

nuovi quesiti sulla loro sicurezza in quanto le piccole dimensioni e l'elevata superficie potrebbero determinare sulle cellule e sul sistema immunitario effetti diversi rispetto ai materiali con granulometria maggiore. Le piccole dimensioni possono aumentare la capacità di interagire a livello intercellulare e a livello del DNA e l'elevata superficie aumenta la loro capacità di svolgere azione immunitaria e di agire come apteni inducendo reazioni allergiche o autommuni (Newman et al., 2009) ma gli studi attuali sono ancora troppo pochi per dare un giudizio definitivo su tali sostanze.

È noto, però, che in sistemi *in vitro*, le NP di TiO₂ hanno effetti citotossici e infiammatori anche se a concentrazioni relativamente elevate (Cai et al., 1992; Wamer et al., 1997; Dunford et al., 1997; Sayes et al., 2006b). Effetto citotossico *in vitro* è stato dimostrato anche per le NP di ZnO (Huang et al., 2009, Yuan et al., 2009).

L'aspetto più importante è relativo alla capacità del TiO₂ e ZnO di essere fotocatalizzatori, e di essere usati nelle celle fotovoltaiche per produrre elettroni. A livello cellulare, tale capacità porta alla formazione di radicali liberi dell'ossigeno (ROS) e all'effetto lesivo sul DNA. Dunford et al. (1997) hanno dimostrato che le particelle di biossido di titanio, dopo esposizione a raggi ultravioletti UVA e UVB, determinano la rottura della catena del DNA in culture di fibroblasti. Uchino, nel 2002, ha confermato la capacità del TiO₂ di generare radicali idrossilici e Hidaka et al., nel 2006, hanno studiato i danni al DNA indotti da TiO₂ e ZnO dopo esposizione a UV, trovando un aumento di alterazioni nel DNA cellulare. Dati opposti sono stati riportati nello studio di Dufour et al. (2006), nel quale vengono messe a confronto le alterazioni cromosomiche indotte su cellule ovariche di hamster dopo trattamento con UV con o senza NP di ZnO, senza trovare significative differenze fra le due esposizioni. Gli autori concludono che le aberrazioni cromosomiche possano essere correlate all'azione dei raggi UV e non all'esposizione a ZnO.

Un'altra recente review pubblicata da studiosi della L'Oreal (Nohynek et al., 2009) analizza il rischio legato all'uso di NP negli schermi per raggi ultravioletti UV, concludendo che le evidenze scientifiche suggeriscono come i NM usati ad oggi nelle formulazioni cosmetiche e negli schermi solari non presentino rischi per la cute o per la salute mentre svolgono azione protettiva contro gli effetti negativo della radiazione UV, compreso il cancro.

Tuttavia alcuni studi effettuati evidenziano un possibile effetto biologico delle NP diverso da quello studiato per prodotti in dimensioni tradizionali e per tale motivo sono necessari anche studi che simulino le reali condizioni di utilizzo per stabilire con certezza la sicurezza d'uso di questi tipi di NP (Newman et al., 2009).

Oggi si ritiene che tutte le creme con schermi solari contengano anche NP e l'Unione Europea sta predisponendo un'etichettatura specifica per questi prodotti nell'ambito delle nuove direttive sull'uso dei cosmetici, anche se l'orientamento scientifico è quello

di avere maggiori dati a disposizione prima della distribuzione di nuovi prodotti, secondo il concetto “no data, no market” (http://www.framingnano.eu/newsletters/FramingNanoNewsletter5_morenews.htm#nanocosmetics).

La Food and Drug Administration nel 1999 aveva approvato l'immissione in commercio dei cosmetici contenenti NP senza nuova etichettatura ed ora sta rivedendo le sue posizioni e nel 2007 un gruppo di lavoro ha proposto una serie di linee guida per le nuove immissioni in commercio, che prevedano nuovi test per la sicurezza e maggiori informazioni scientifiche da fornire prima di autorizzare la commercializzazione dei nuovi cosmetici contenenti NP.

5.4.4. Quantum dot

Alcuni studi hanno evidenziato risposte citotossiche ed irritative quali rilascio di citochine in colture di cheratinociti esposte a quantum dot (Ryman-Rasmussen et al., 2007; Zhang et al., 2008).

5.4.5. Conclusioni

In conclusione vi sono evidenze in letteratura che le NP possano svolgere un'azione irritativa sui cheratinociti e che possano parzialmente penetrare lo strato corneo della cute e l'epidermide: i dati disponibili sono troppo pochi per poterne trarre conclusioni definitive. Non vi sono dati significativi sull'uomo anche se dal 1997 numerose formulazioni cosmetiche contengono NP, specie quelle con azione di schermo solare. Sono necessarie ulteriori ricerche sistematiche per meglio definire il rischio cutaneo dell'esposizione a NP.

5.5. Effetti sul sistema nervoso centrale

Differenti tipologie di NP ingegnerizzate sono attualmente impiegate per il trasporto selettivo di farmaci o per lo sviluppo di agenti farmacologici, terapeutici e diagnostici correlati a diverse patologie del Sistema Nervoso Centrale (SNC) (Uwatoku et al., 2003; Bianco et al., 2005; Olivier, 2005; Silva, 2006). Tuttavia, in letteratura sono presenti diversi studi, sia *in vitro* sia *in vivo*, che hanno osservato la capacità da parte delle NP (NP) di provocare effetti neurotossici. Di seguito viene riportato lo stato attuale delle conoscenze degli effetti sul SNC correlati all'esposizione ai NM al fine di verificare se l'impiego delle nanotecnologie possa rappresentare un rischio per questo sistema d'organo.

5.5.1. Assorbimento

Le NP, assorbite principalmente attraverso la via inalatoria, hanno la capacità di dislocare dal sito di penetrazione e possono raggiungere il SNC con modalità differenti. L'assorbimento trans-nasale ha una sua peculiare rilevanza, in quanto costituisce l'unica porta di connessione diretta tra l'ambiente esterno ed il sistema nervoso centrale. La possibilità che NP ingegnerizzate possano raggiungere rapidamente il sistema nervoso centrale attraverso questa via di esposizione è suggerita da uno studio *in vivo* eseguito in ratti esposti per via inalatoria a NP carboniose di circa 35 nm di diametro (Oberdöster et al., 2005). Gli autori di questo studio sono stati in grado di reperire il materiale nel sistema nervoso centrale, a livello del bulbo olfattivo, a breve distanza di tempo dall'esposizione. Tale risultato suggerisce indubbiamente l'utilizzazione della via di accesso trans-nasale. In seguito all'esposizione per via inalatoria, le NP viaggiano con un meccanismo di trasporto trans-sinaptico nel SNC, con modalità analoghe a quelle descritte per il polio virus, e possono quindi essere direttamente captate nel SNC attraverso le terminazioni nervose della mucosa nasale (nervo olfattivo e nervo trigemino) e tracheobronchiale (afferenze del nervo vago) (Oberdöster G et al., 2004; Muller et al., 2004, Kreuter et al., 2004)

Le NP inalate inoltre attraversano la barriera respiratoria e tramite il torrente circolatorio possono raggiungere il SNC attraversando la barriera emato-encefalica (BEE) quando questa risulta danneggiata, come nel caso di ipertensione o di encefalomielite.

Di tutte le barriere endoteliali, la BEE è la più serrata al fine di ridurre i trasporti paracellulari. La BEE sana costituisce un meccanismo di difesa che protegge il SNC dall'esposizione a sostanze veicolate dal sangue, ma caratteristiche intrinseche delle NP legate alle cariche di superficie e/o stati morbosi come ipertensione ed encefalomieliti possono alterare l'integrità della BEE e favorirne l'attraversamento da parte delle NP, determinando la loro distribuzione e tossicità nel SNC (Muldoon et al., 1999).

Comunque le NP veicolate dal sangue sembrerebbero avere la capacità intrinseca di alterare le proprietà delle membrane delle cellule endoteliali e/o distruggere le giunzioni occludenti (*tight junctions*) della BEE.

È noto infatti che le NP sono in grado di indurre stress ossidativo e produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che, attaccando le membrane cellulari endoteliali, causerebbero danni e disfunzioni della BEE. Oltre alle proprietà fisiche delle membrane plasmatiche endoteliali e alla dimensione delle NP, le cariche elettrostatiche della superficie delle NP giocano un ruolo importante nel trasporto non endocitosico attraverso la BEE (Hagenbuch e Meier, 2003).

Specifici studi (Lockman et al., 2004) hanno dimostrato che le NP con carica neutra

o bassa concentrazione anionica delle cariche di superficie, non alterano l'integrità della BEE, mentre alte concentrazioni anioniche o cationiche delle cariche di superficie delle NP inducono disfunzione della BEE.

5.5.2. Nanomateriali a base di carbonio

Sebbene la quasi totalità degli studi compiuti per valutare la neurotossicità dei NM, sia *in vitro* sia *in vivo*, abbiano utilizzato le NP metalliche, in letteratura sono presenti alcuni lavori che hanno indagato gli effetti sul SNC derivanti dall'esposizione a NM di origine non metallica.

Chen et al. (2008) hanno indagato la risposta delle cellule endoteliali umane della microvascolatura cerebrale conseguente all'esposizione a dosi crescenti di NP di carbonio. Il trattamento con queste NP ha determinato delle modificazioni del potenziale di membrana mitocondriale, ha indotto lo stress ossidativo ed ha diminuito l'espressione delle proteine delle giunzioni occludenti ma l'entità di questi effetti citotossici è stata decisamente inferiore rispetto all'esposizione delle cellule alle NP di alluminio. Inoltre, a differenza delle NP metalliche, la diminuzione della vitalità cellulare è stata osservata esclusivamente alla dose di esposizione maggiore (10 mM).

Recentemente gli effetti neurotossici dei nanotubi di carbonio (CNT) sono stati indagati su colture cellulari derivate dal midollo spinale e dai gangli spinali di embrioni di pollo esposte a nanotubi di carbonio a parete singola (SWCNT) (Belyanskaya et al., 2009). Il principale effetto citotossico osservato, sia nelle colture neurogliali del SNC che del sistema nervoso periferico (SNP), è stato un'importante diminuzione del contenuto di DNA. Questo effetto è risultato maggiore nelle cellule trattate con SWCNT altamente aggregati rispetto a quelle esposte a SWCNT dispersi. Inoltre, la diminuzione dell'espressione della vimentina, una proteina specifica delle cellule gliali, indica che la diminuzione del contenuto di DNA è dovuta soprattutto all'azione delle NP su questo tipo di cellule. Infine, l'analisi della conduttanza ionica e del potenziale di membrana a riposo dimostra che i SWCNT sono capaci di influenzare questi parametri nei neuroni derivati dal SNP, mentre le proprietà elettrofisiologiche dei neuroni derivati dal SNC non vengono modulate dall'esposizione a questo nanomateriale. Quindi, nel complesso i risultati dimostrano che l'esposizione delle colture neurogliali, sia del SNC sia del SNP, ai SWCNT determina degli importanti effetti citotossici nel tessuto nervoso, in particolare a carico delle cellule gliali.

La somministrazione a pesci della specie persico trota (*Micropterus salmoides*) di 0.5 ppm di fullereni (nC₆₀) ha evidenziato la presenza di un meccanismo di trasporto trans-sinaptico che permette al nanomateriale di raggiungere mediante il nervo olfattorio il SNC (Oberdörster E, 2004). L'analisi del tessuto cerebrale degli animali

trattati con i fullereni ha mostrato un aumento importante dei prodotti della perossidazione lipidica che sarebbe conseguente all'induzione dello stress ossidativo da parte delle NP.

Le stesse identiche modalità di penetrazione all'interno del SNC sono state dimostrate nei ratti esposti a NP di nero di carbone il cui diametro era pari a 36 nm (Oberdörster G, 2004). Infatti, i risultati di questo studio hanno mostrato un significativo accumulo del nanomateriale a livello del bulbo olfattorio.

Studi successivi hanno dimostrato che queste NP non sono solo in grado di raggiungere il SNC mediante il suddetto meccanismo di trasporto ma determinano anche importanti alterazioni della normale funzionalità del tessuto cerebrale. L'esposizione di topi maschi BALB/c a NP di nero di carbone di diverse dimensioni (14 nm e 95 nm) ha comportato una profonda modificazione dell'espressione genica delle citochine proinfiammatorie (IL-1 β e TNF- α) e delle chemochine (CCL2 e CCL3) a livello del bulbo olfattorio (Tin-Tin-Win-Shwe et al., 2006). In particolare, il trattamento con le NP di 14 nm ha indotto un'attivazione delle cellule della microglia, le quali conseguentemente hanno aumentato in maniera rilevante la produzione delle suddette citochine proinfiammatorie e delle chemochine. Questo meccanismo sarebbe alla base della risposta infiammatoria osservata nel bulbo olfattorio.

Lo stesso gruppo di ricerca ha indagato nel medesimo modello animale gli effetti provocati dall'esposizione a questo nanomateriale sui livelli extracellulari dei neurotrasmettitori nel bulbo olfattorio (Tin-Tin-Win-Shwe et al., 2008). Analogamente allo studio precedente, l'instillazione intranasale di NP di nero di carbone (14 nm) ha indotto un aumento dei livelli di IL-1 β e TNF- α . Inoltre, nel bulbo olfattorio sono stati riscontrati livelli extracellulari di glutammato e di glicina significativamente maggiori rispetto ai controlli. In base a questi dati gli Autori hanno ipotizzato che le NP, una volta raggiunto il bulbo olfattorio, causerebbero il rilascio dei neurotrasmettitori nel fluido extracellulare, i quali a loro volta attiverrebbero le cellule immunitarie della microglia innescando di conseguenza la produzione da parte di quest'ultime delle citochine proinfiammatorie che, in ultima analisi, sarebbero responsabili del danno neurotossico.

5.5.3. Nanoparticelle metalliche

La NP di biossido di titanio (TiO₂) sono state oggetto di alcuni studi in vitro che ne hanno indagato i possibili effetti tossici su diverse cellule del SNC. Recentemente è stato dimostrato che l'esposizione delle cellule microgliali murine N9 a dosi di NP di TiO₂ è in grado di indurre effetti citotossici rilevanti (Li et al., 2009). Infatti, è stata osservata un'importante riduzione della vitalità delle cellule N9 e la presenza di alte-

razioni morfologiche che mostrano apoptosi anche a basse dosi di esposizione (16 µg/mL). Questo tipo di risposta cellulare sarebbe uno dei meccanismi responsabili dei potenziali effetti avversi delle NP sul SNC.

Invece, in un esperimento realizzato da Long et al., (2006), l'esposizione della linea cellulare di microglia murina immortalizzata BV2 a dosi non citotossiche di Degussa P25, una miscela di NP di TiO₂, composta per il 70% da anatasio e per il 30% da rutilio, ha determinato un rapido e prolungato rilascio di radicali liberi dell'ossigeno (ROS). Per valutare le possibili conseguenze di questo risultato sulle cellule del SNC, lo stesso gruppo di ricerca (Long et al., 2007) ha esposto alle medesime concentrazioni di Degussa P25 le cellule BV2, i neuroni mesencefalici di ratto N27 ed una coltura primaria di cellule embrionali del corpo striato di ratto Sprague-Dawley. Le NP di TiO₂ hanno indotto nelle cellule della microglia un aumento significativo della produzione del perossido di idrogeno (H₂O₂) ed hanno influenzato i meccanismi molecolari correlati al controllo del ciclo cellulare, dell'infiammazione e dell'apoptosi. Al contrario, l'esposizione al Degussa P25 non ha determinato alcun effetto citotossico nei neuroni dopaminergici isolati di ratto N27, neanche dopo 72 ore di esposizione. Tuttavia, l'analisi della neurotossicità di questo nanomateriale nelle colture cellulari embrionali del corpo striato, che contenevano cellule microgliali, ha evidenziato una significativa diminuzione della vitalità cellulare anche a basse dosi di esposizione (5 ppm). Sulla base di questi risultati gli Autori hanno concluso che i potenti effetti neurotossici delle NP di TiO₂, osservati nelle colture cellulari complesse di tessuto nervoso, sono mediati dalla produzione dei ROS da parte della microglia.

In aggiunta alla citotossicità mediata dai ROS di origine microgliale è stata avanzata l'ipotesi che le NP siano in grado di indurre la morte delle cellule nervose utilizzando un processo di "eccito-tossicità". A questo proposito, in uno studio condotto da Alekseenko et al. (2008), sono stati indagati i meccanismi di captazione e rilascio del glutammato, uno dei principali neurotrasmettitori eccitatori, e la formazione dei ROS all'interno dei sinaptosomi isolati dal cervello di ratti Wistar. L'esposizione dei sinaptosomi a ferritina, che contiene una particella di 7 nm di diametro di fosfato di ossido ferrico, ha indotto un blocco della captazione del glutammato. Inoltre, i risultati di questo lavoro hanno mostrato un incremento dei livelli di ROS nelle colture cellulari. Gli Autori hanno suggerito che l'incremento dello stress ossidativo provocato dall'esposizione alle NP possa inibire la captazione del glutammato da parte dei sinaptosomi. Conseguentemente, l'eccessiva concentrazione extracellulare del glutammato comporta un'esposizione prolungata dei neuroni a questo neurotrasmettitore eccitatorio, che sarebbe alla base del danno cellulare e della morte dei neuroni per "eccito-tossicità".

Un ulteriore meccanismo molecolare in grado di danneggiare la normale funzionalità

del SNC sarebbe rappresentato dalla capacità delle NP di interferire con le correnti neuronali voltaggio-dipendenti del potassio. Infatti, l'esposizione di neuroni ippocampali della regione CA1, isolati da ratti Wistar, a NP di rame ha permesso di osservare nelle cellule trattate un'efficace inibizione della corrente rettificatrice ritardata del potassio (I_k) (Xu et al., 2009).

Un altro aspetto interessante degli effetti citotossici dei nanomateriali sul SNC riguarda il rapporto tra le NP e la barriera emato-encefalica (BEE). Chen et al., (2008) hanno esposto cellule endoteliali umane della microvascolatura cerebrale (HBMEC) a dosi crescenti di NP di ossido di alluminio. I risultati hanno mostrato come il trattamento con le NP determini una significativa riduzione della vitalità cellulare, l'alterazione del potenziale di membrana mitocondriale, l'aumento dello stress ossidativo e la diminuzione dell'espressione delle proteine delle giunzioni occludenti (*tight junctions*). Quindi, secondo gli Autori l'integrità della BEE rappresenta uno dei principali obiettivi delle NP di alluminio che esplicherebbero la loro azione tossica alterando le funzioni mitocondriali.

Gli astrociti sono degli importanti mediatori degli effetti neurotossici e contribuiscono in maniera fondamentale alla modulazione della permeabilità della BEE. Per questo motivo, l'influenza dei NM sulla BEE può essere indagata anche esponendo queste cellule gliali alle NP al fine di verificare se tale trattamento ne modifichi la normale morfologia e funzionalità o le capacità di adesione e crescita cellulare. In un esperimento, condotto su astrociti isolati dalla corteccia cerebrale di ratti Sprague-Dawley, l'esposizione a NP di ossido di ferro (Fe_3O_4 o $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) ha dimostrato che negli astrociti immaturi la somministrazione delle NP inibisce le capacità di adesione e la conseguente crescita cellulare. Al contrario, negli astrociti maturi questo nanomateriale non altera la morfologia o la crescita cellulare, mentre determina un importante aumento dell'attività mitocondriale (Au et al., 2007).

Effetti citotossici ancora più rilevanti sono stati dimostrati nelle cellule di astrocitoma umano U87 esposte a concentrazioni crescenti di NP di TiO_2 (< 25 nm), di ossido di manganese (< 50 nm) e di ossido di zinco (< 100 nm) (Lai et al., 2008). I risultati di questo lavoro hanno evidenziato che NP di TiO_2 sono in grado di indurre una significativa riduzione della sopravvivenza cellulare, che l'incremento della morte cellulare è dose-dipendente e che i maggiori effetti citotossici sono causati dalle NP di ossido di zinco, mentre quelle di ossido di manganese sono risultate le meno tossiche. Per quanto riguarda la risposta cellulare, i dati dello studio mostrano che, in seguito al trattamento con le NP di TiO_2 , le cellule U87 esibiscono tre diverse modalità di morte cellulare: apoptosi, necrosi e apoptosi-necrosi.

Gli effetti delle NP di TiO_2 sul SNC sono stati valutati anche mediante diversi studi *in vivo*. Nei topi BALB/c esposti per 60 giorni, mediante trattamento topico, a NP di

TiO₂ di diverse dimensioni (10 nm, 25 nm, Degussa P25 (21 nm) e 60 nm), l'analisi della tossicità e della distribuzione tissutale ha mostrato che, tra i differenti NM impiegati, il solo Degussa P25 era in grado di raggiungere il tessuto cerebrale (Wu et al., 2009).

Lo studio istopatologico del SNC non ha rivelato la presenza di alterazioni patologiche. Questo risultato conferma in parte i dati presenti in letteratura secondo i quali le NP sarebbero in grado di attraversare la BEE e raggiungere, seppure in quantità modeste, il SNC (Kreyling et al., 2002; Lockman et al., 2004; Oberdörster et al., 2004).

Risultati simili ai precedenti sono stati ottenuti in topi CD 1 (ICR) ai quali è stata somministrata per via orale, in un'unica soluzione, una dose di 5 g/kg di particelle di TiO₂ di diverse dimensioni (25 nm, 80 nm e 155 nm). Nei gruppi esposti alle NP è stato osservato un accumulo delle stesse nel SNC e la presenza, nella regione ippocampale, di deboli lesioni cerebrali consistenti in vacuoli e degenerazione grassa del tessuto nervoso (Wang et al., 2007).

Negli stessi animali di laboratorio sono stati invece rilevati importanti effetti neurotossici in seguito alla somministrazione, mediante iniezione intraperitoneale, di NP di TiO₂ in forma di anatasio (Ma et al., 2010). In particolare, nei gruppi di animali esposti alle dosi maggiori di nanomateriale la produzione degli anioni superossido e del perossido di idrogeno risultava significativamente maggiore. Il conseguente stress ossidativo ha comportato un aumento della perossidazione lipidica, un rilascio di ossido nitrico, una riduzione dell'acido glutammico e dei livelli di attività dell'acetilcolinesterasi e degli enzimi antiossidanti. Inoltre, gli Autori hanno osservato anche delle importanti modificazioni morfologiche delle cellule nervose, che assumevano forme filamentose o si trasformavano in cellule infiammatorie.

In uno studio condotto da Shimizu et al., (2009) è stato dimostrato che l'esposizione materna di topi ICR femmine gravide a NP di TiO₂ provoca nella progenie un'importante modificazione dell'espressione dei geni associati all'apoptosi, allo stress ossidativo ed allo sviluppo del SNC.

Infine, anche il trattamento di topi CD 1 (ICR) con NP di TiO₂ di 80 nm (come rutilio) e di 155 nm (come anatasio), somministrate mediante instillazione intranasale, ha provocato dei significativi effetti avversi sul SNC (Wang JX et al., 2008). Le NP possono raggiungere il SNC mediante un meccanismo di trasporto trans-sinaptico dopo essere state assorbite dalle terminazioni nervose della mucosa nasale e si accumulano particolarmente nel bulbo olfattorio e nell'ippocampo (Bodian e Howe, 1941a; Bodian e Howe, 1941b; Tjälve et al., 1995; Oberdörster et al., 2004). I risultati di questo studio hanno evidenziato che l'esposizione alle NP di TiO₂ determina un aumento dello stress ossidativo, della risposta infiammatoria ed un significativo incremento dei livelli cerebrali del Tumor Necrosis Factor alfa (TNF- α) e dell'interleuchina 1-beta. I

suddetti effetti tossici sono risultati lievemente maggiori nel gruppo di animali esposto all'anatasio suggerendo quindi l'ipotesi che la struttura cristallina del nanomateriale svolga un ruolo di primaria importanza nell'induzione della risposta.

Analogamente allo studio precedente, l'instillazione intranasale in topi CD 1 (ICR) di NP di Fe_2O_3 (21 nm) ha indotto degli effetti neurotossici rilevanti quali l'aumento dello stress ossidativo e la presenza di segni morfologici di danno cellulare in alcune regioni del SNC degli animali trattati (Wang et al., 2009). Infatti, gli Autori hanno osservato degenerazione neurodendritica, alterazioni della membrana cellulare ed incremento dei lisosomi nel bulbo olfattorio e dilatazione del reticolo endoplasmatico rugoso ed incremento dei lisosomi nell'ippocampo.

Il raggiungimento del SNC, attraverso il meccanismo di trasporto trans-sinaptico è stato dimostrato anche per le NP di ossido di manganese (30 nm) somministrate per via inalatoria a ratti Fischer 344 (Elder et al., 2006). Gli Autori hanno rilevato la presenza del nanomateriale in diverse regioni cerebrali ma, analogamente agli studi precedenti, è stato osservato un accumulo preferenziale delle NP nel bulbo olfattorio. Inoltre, nelle regioni in cui si verifica il deposito del nanomateriale, si riscontra un incremento dei livelli di TNF- α e della proteina acida gliofibrillare, la quale è un indicatore specifico di reattività o di danno degli astrociti. L'aumentata espressione genica di queste proteine indicherebbe la presenza di una risposta infiammatoria nei tessuti interessati.

La produzione di ROS sarebbe alla base anche della neurotossicità osservata nei topi maschi C57BL/6N esposti a NP di argento, il cui diametro era di 25 nm (Rahman et al., 2009). Infatti, nelle diverse regioni cerebrali (nucleo caudato, corteccia frontale ed ippocampo) degli animali trattati è stato possibile osservare un'importante induzione dello stress ossidativo e la presenza di un danno ossidativo del DNA. Inoltre, i risultati hanno mostrato che le NP di argento sono capaci di modulare l'espressione di molteplici geni coinvolti sia nello stress ossidativo sia nella produzione di agenti antiossidanti. La produzione dei ROS, associata alla modulazione genica, influenzerebbe in maniera negativa il sistema immunitario causando di conseguenza l'apoptosi cellulare e gli importanti effetti neurotossici rilevati.

In uno studio realizzato su ratti Fischer 344 sono stati indagati gli effetti, sulla BEE e sul sistema vascolare del cervello, conseguenti ad un'esposizione a NP di alluminio (Chen et al., 2008). La somministrazione intravenosa di NP di alluminio, il cui diametro era compreso tra gli 8 e i 12 nm, ha indotto una diminuzione dell'espressione delle proteine di giunzione occludente ed ha causato una marcata frammentazione dell'occludina e della claudina-5 che sono gli elementi fondamentali che regolano la normale integrità della BEE.

Risultati simili sono stati ottenuti in ratti maschi Sprague-Dawley in cui lo stesso tipo

di nanomateriale è stato somministrato attraverso iniezione intraperitoneale (Song et al., 2008). L'analisi ultrastrutturale della BEE ha dimostrato che le NP di alluminio provocano un danneggiamento della membrana cellulare, degli organelli citoplasmatici e delle giunzioni occludenti dell'endotelio capillare cerebrale. Inoltre, analogamente allo studio precedente, è stata osservata un'importante riduzione dell'espressione dell'occludina e della F-actina. Gli Autori hanno suggerito che la neurotossicità delle NP di alluminio è correlata alla capacità di questo nanomateriale di influenzare la permeabilità e di alterare l'integrità della BEE.

È probabile che l'inclusione di NP nei fluidi dei compartimenti corporei alteri le funzioni del SNC in condizioni normali e/o le sue risposte a stress aggiuntivi come ad esempio l'ipertermia. NP contenenti metalli (Cu, Ag, Al con diametro di 50-60 nm) sembrerebbero infatti determinare disfunzioni del SNC in animali normali e aggravare patologie causate dall'ipertermia (Sharma HS e Sharma A, 2007). L'esposizione a NP ha mostrato di produrre anche significative modificazioni delle funzioni motorie, maggiormente evidente nei ratti esposti a NP di Ag rispetto a Cu e Al (Sharma HS e Sharma A, 2007). L'influenza delle NP metalliche sulla BEE è stata investigata anche in ratti Sprague-Dawley esposti a NP di rame, alluminio e argento con diametro compreso tra 50 e 60 nm (Sharma et al., 2010). In questo studio le NP sono state somministrate attraverso iniezione intravenosa, iniezione intraperitoneale e perfusione corticale. I risultati hanno mostrato che l'integrità della BEE è profondamente alterata dall'esposizione ai NM, che gli effetti avversi più rilevanti sono stati ottenuti con il trattamento intravenoso e con la perfusione corticale e che le NP maggiormente tossiche sono state quelle di rame e di argento. Il meccanismo mediante il quale le NP causano una modificazione della permeabilità della BEE consisterebbe nell'induzione dello stress ossidativo che, a sua volta, provocherebbe il rilascio di sostanze neurochimiche, citochine e ROS in grado di danneggiare le cellule endoteliali (Sharma HS e Sharma A, 2007; Sharma et al., 2009). Conseguenza della rottura della BEE ad opera delle NP è il passaggio di macromolecole nel SNC, che spesso si associa con la formazione di edema angiogenico (Sharma 2006a, b; Sharma et al. 2006c). La cronica somministrazione di NP metalliche induce la formazione di edema in misura maggiore a livello cerebrale piuttosto che nel midollo spinale, e l'azione edemigena sembra essere più spiccata da parte di NP di Ag rispetto a Cu o Al.

È probabile che l'edema negli animali trattati con NP determini conseguenze neuropatologiche e modificazioni in senso neurodegenerativo.

Infine il danno alla BEE conseguente all'azione delle NP consente l'ingresso di numerose sostanze tossiche che normalmente non verrebbero in contatto con il microambiente del SNC e che sono in grado di produrre alterazioni cellulari morfologiche e funzionali (Sharma 2004, Sharma 2006a-b).

Nei neuroni di animali esposti alle NP si osservano alterazioni intracellulari come condensazione citoplasmatica e cromatolisi, danno alle membrane nucleari e addensamento del carioplasma con nucleoli eccentrici.

5.5.4. Conclusioni

Nel complesso le NP possono raggiungere il SNC mediante due diversi meccanismi che sono rispettivamente il trasporto trans-sinaptico lungo il nervo olfattorio, conseguente all'esposizione per via inalatoria o per instillazione intranasale, e la captazione attraverso la BEE, che avviene in seguito alla somministrazione dei NM per via intravenosa, intraperitoneale, orale o percutanea (Lai et al., 2000; Borm et al., 2006). La facilità con la quale le NP attraversano la BEE rappresenta il motivo principale per cui, negli ultimi anni, esse sono state impiegate in maniera intensiva nel settore biomedico al fine di realizzare il trasporto selettivo dei farmaci all'interno del SNC o per sviluppare agenti terapeutici e diagnostici nei confronti di alcune patologie neurodegenerative (Uwatoku et al., 2003; Bianco et al., 2005; Olivier, 2005; Silva, 2006). Tuttavia, le attuali conoscenze relative ai possibili effetti tossici dei NM ingegnerizzati sul tessuto nervoso sono ancora estremamente limitate e frammentarie. Ciononostante, in letteratura sono presenti alcuni studi *in vitro* ed *in vivo* che hanno evidenziato la capacità delle NP di provocare, in cellule neuronali e gliali di derivazione animale ed umana ed in diversi modelli animali, dei significativi effetti neurotossici. Il principale meccanismo mediante il quale i NM esibiscono la loro tossicità, anche a livello del SNC, è rappresentato dall'induzione di un importante stress ossidativo. Inoltre, le NP sarebbero in grado di alterare la normale integrità della BEE e modularebbero l'espressione di molteplici geni coinvolti nella risposta infiammatoria e nell'apoptosi.

Pertanto, appare evidente che un utilizzo sicuro delle nanotecnologie richieda una migliore e più approfondita conoscenza dei meccanismi molecolari che sottendono agli effetti neurotossici finora evidenziati.

Infine, sono auspicabili ulteriori studi che verifichino gli eventuali effetti neurotossici provocati dagli altri NM ingegnerizzati, oltre a quelli metallici finora principalmente indagati, quali NP di carbonio e quantum dot.

5.6. Effetti cardiovascolari

L'interesse scientifico rivolto alla valutazione dei possibili effetti cardiovascolari delle NP ingegnerizzate deriva dalla conoscenza della stretta associazione tra elevati livelli del particolato atmosferico di dimensioni nanometriche (particelle ultrafini) ed eventi

cardiovascolari quali l'ictus, l'infarto del miocardio, l'aritmia e la morte improvvisa (Mossman et al., 2007). Al di là del fatto che alcune componenti chimiche delle particelle ultrafini sono analoghe a quelle delle NP ingegnerizzate, la dimensione nanometrica di per sé costituisce un elemento aggiuntivo in termini di tossicità potenziale: è infatti ormai documentato che l'effetto citotossico del medesimo materiale chimico è molto più spiccato se la stessa massa di materiale viene somministrata in forma nanometrica o in particelle di dimensioni maggiori (Donaldson et al., 2001). Molto probabilmente questa peculiare proprietà tossica delle NP deriva dall'elevato rapporto tra la loro superficie totale e la loro massa, che si traduce in una superficie di contatto molto più elevata con il materiale biologico.

I meccanismi potenziali attraverso cui le NP ingegnerizzate potrebbero determinare effetti sfavorevoli sull'apparato cardiovascolare sono essenzialmente due:

- A. Un effetto indiretto secondario alla biopersistenza in ambito polmonare: questo fatto potrebbe determinare l'instaurarsi di un persistente processo infiammatorio cronico locale, con rilascio nella circolazione generale di mediatori quali le citochine, in grado a loro volta di causare una persistente infiammazione sistemica di lieve entità. Numerosi studi hanno consentito di stabilire al di là di ogni dubbio che la presenza di infiammazione cronica è un forte fattore di predisposizione all'aterosclerosi e ai conseguenti eventi acuti (infarto del miocardio ed ictus) correlabili con questo processo degenerativo (Ross, 1999).
- B. Un effetto diretto conseguente alla loro capacità di oltrepassare il parenchima polmonare, giungendo a contatto con cellule (es. cellule endoteliali e piastrine) e prodotti solubili (es. proteine della coagulazione) rilevanti ai fini del possibile instaurarsi del danno cardiovascolare

5.6.1. Nanotubi di carbonio

Le NP ingegnerizzate più studiate ai fini della valutazione del possibile effetto cardiovascolare sono i nanotubi di carbonio. In particolare, sono stati investigati i possibili effetti di questi NM su alcune vie fisiopatologiche di induzione del danno cardiovascolare quali l'ipercoagulabilità, la formazione di ateromi, l'induzione di uno stato infiammatorio sistemico, la disfunzione/danno endoteliale (incluso il danno ossidativo) e le alterazioni dell'attività cardiovascolare regolata dal sistema nervoso autonomo. In questa revisione saranno analizzati separatamente gli effetti sui singoli meccanismi d'azione; alcuni studi che hanno preso in considerazione più di un possibile meccanismo saranno pertanto citati più volte.

Per quel che riguarda le alterazioni della coagulazione, è stato rilevato, in uno studio *in vitro* condotto da Radomski et al. (2005), che sia i nanotubi di carbonio a parete

singola (SWCNT) sia quelli a parete multipla (MWCNT) possono determinare un incremento dell'aggregazione piastrinica: tale situazione costituisce un rischio per l'instaurarsi di un danno di tipo ischemico nell'uomo, come è dimostrato dall'efficacia anti-aterosclerotica di terapie volte ad inibire l'attivazione piastrinica (Ben-Dor et al., 2009). Un dato rilevante è che questo lavoro è stato eseguito su piastrine umane, e pertanto la sua trasferibilità in ambito clinico è maggiore rispetto a quella di altri studi *in vitro* eseguiti su cellule animali. Un punto di debolezza (peraltro comune alla quasi totalità delle sperimentazioni tossicologiche attualmente disponibili sul nanomateriale ingegnerizzato) è costituita dalle alte dosi utilizzate, che sono di vari ordini di grandezza maggiori rispetto a quelle di esposizione umana ipotizzabile in ambito occupazionale o nell'ambiente. Il dato di Radomski è stato solo in parte confermato da un successivo studio in vivo eseguito mediante un'unica esposizione polmonare (somministrazione intratracheale) di MWCNT in topi Swiss (Nemmar et al., 2007): le alterazioni piastriniche, controllate più volte in questi animali nell'arco di 24 ore, sono risultate di lieve entità e tendevano a scomparire nei controlli eseguiti a più di 6 ore dall'esposizione. Va notato, peraltro, che in quest'ultimo studio sono stati indagati solo i MWCNT (che nello studio di Radomski avevano un effetto inferiore a quello dei SWCNT), e che non sono stati valutati i possibili effetti a lungo termine da esposizione cronica. Pertanto, si può concludere che sulla base dei dati disponibili, gli effetti sull'aggregazione piastrinica non sono particolarmente marcati, ma che ulteriori studi sono auspicabili per precisare la presenza e l'entità di questa potenziale via di danno cardiovascolare. È interessante notare come entrambi gli autori degli studi su citati (Ben-Dor et al., 2009; Nemmar et al., 2007) abbiano eseguito, nell'ambito dello stesso lavoro, uno studio parallelo *in vivo* per valutare la trasferibilità del dato ottenuto *in vitro* o *ex vivo* sulla formazione di un trombo arterioso *in vivo*. In particolare, hanno valutato se la somministrazione di nanotubi di carbonio fosse in grado di accelerare ed amplificare la formazione di trombi nell'arteria carotidea di ratto preventivamente sottoposta a danno fisico o chimico: a fronte degli effetti relativamente modesti sull'aggregazione piastrinica, in entrambi i modelli sperimentali è stato riscontrato un indiscutibile effetto dei nanotubi di carbonio sulla formazione acuta di trombi carotidei. Questo dato sembra indicare che altre componenti del complesso processo della coagulazione oltre alle piastrine possano essere coinvolti dopo esposizione a nanotubi di carbonio.

In effetti, questa ipotesi sembra trovare riscontro nei recenti dati di Erdely et al. (2009), che hanno rilevato un marcato aumento del PAI-1 totale e attivo (una proteina che svolge un ruolo chiave nell'inibizione della cascata fibrinolitica) in topi esposti per via polmonare a nanotubi di carbonio. Anche in questo caso, però, gli effetti sono stati valutati in un modello sperimentale acuto (a 4 ore dall'esposizione) e sono

pertanto necessarie conferme su un modello cronico, che è quello più plausibile per quel che riguarda l'esposizione nell'uomo. La formazione di placche aterosclerotiche, indotte da esposizioni polmonari ripetute a SWCNT in topi geneticamente predisposti a danno aterosclerotico, è stata rilevata da Li et al. (2007). Lo studio è importante perché dimostra la possibile instaurazione del danno dopo esposizioni ripetute, che è la condizione più verosimilmente trasferibile all'uomo, e poiché le dosi utilizzate sono relativamente di bassa entità. Va comunque rilevato che i topi oggetto dell'esperimento, oltre ad essere di un ceppo geneticamente predisposto all'aterosclerosi, dovevano essere nutriti con una dieta iperlipidica per potere andare incontro all'aterosclerosi: infatti, nel corso di una dieta standard, l'entità dell'aterosclerosi non differiva tra i topi cimentati con i SWCNT e quelli cimentati con soluzione salina. Appaiono pertanto opportuni ulteriori studi, anche se già sulla base di tali dati potrebbe ipotizzarsi un analogo rischio in lavoratori che abbiano di base un elevato rischio cardiovascolare e che siano cronicamente esposti a SWCNT. Per esempio, lavoratori obesi con forte familiarità per malattia cardiovascolare potrebbero essere riconducibili al modello di predisposizione genetica (forte familiarità) e cofattore ambientale (dieta iperlipidica nel caso del modello sperimentale di ratto e obesità nel modello umano). Per quel che riguarda la possibilità di un'attivazione di uno stato infiammatorio sistemico, Salvador-Morales et al. (2006) hanno riscontrato in uno studio *in vitro* che i nanotubi di carbonio, in particolare i SWCNT, sono in grado di attivare la via classica del complemento (che è coinvolta nella maggior parte dei processi infiammatori nell'uomo), mentre dati parzialmente contraddittori sono stati riportati in due studi *in vivo* già citati (Erdely et al., 2009; Li et al., 2007). Infatti, Erdely et al. (2009) hanno notato un incremento di parametri quali la conta dei neutrofili e varie mediatori solubili di infiammazione (IL-6, CXCL1, IL-5, CCL11, CCL22, CXCL2, S110a8, IL8 β e Mac-1), oltre che l'espressione di geni pro-infiammatori in aorta. Per contro, Li et al. (2007) non hanno notato differenze tra casi e controlli nei livelli ematici di MCP1, IL-12, IL-6, TNF- α e IFN- γ . Va notato comunque, che i due studi avevano un disegno differente: valutazione in un modello acuto nello studio Erdely e in un modello cronico in quello di Li. Sembra pertanto ipotizzabile che l'esposizione a nanotubi di carbonio determini uno stato infiammatorio acuto, che però non viene probabilmente mantenuto nel tempo.

L'assenza di citotossicità su colture di cellule endoteliali è stata riportata da Flahaut et al. (2006), che con l'utilizzo di metodiche standard quali il *red neutral assay* e l'MTT test non hanno evidenziato alcun danno dopo 24 ore di esposizione a varie miscele di nanotubi di carbonio. Per contro, nel citato modello *in vivo* di Erdely et al. (2009), è stata rilevata un'attivazione delle cellule endoteliali dell'aorta, documentata da un'aumentata espressione della selectina E, che è una molecola di adesione, espressa

solo sulle cellule endoteliali attivate, e che gioca un ruolo chiave nei processi iniziali dell'instaurarsi del danno aterosclerotico. L'interpretazione dei dati di questi due studi potrebbe essere che, sebbene i nanotubi di carbonio non inducano un danno cellulare evidente sull'endotelio, possano nondimeno causare una disfunzione endoteliale, che è altrettanto importante ai fini della genesi della malattia aterosclerotica. Va considerato, a margine dello studio di Flahaut, che l'MTT test utilizzato nello studio può rivelarsi tecnicamente inadeguato per la valutazione della citotossicità dei nanotubi di carbonio (Wörle-Knirsch et al., 2006).

La possibilità di un danno ossidativo sulle cellule dell'apparato cardiovascolare è suggerita dai dati di uno studio di Simeonova et al. (2007), che ha riscontrato *in vitro* che i SWCNT determinano ossidazione delle LDL nelle cellule endoteliali aortiche. Poiché la fagocitosi da parte dei macrofagi delle particelle ossidate induce la formazione delle cosiddette *foam cells*, rilevabili nelle fasi iniziali della malattia aterosclerotica, questo dato è di enorme interesse ai fini del rapporto esposizione a nanotubi/aterosclerosi. Ulteriore supporto a questo meccanismo fisiopatologico è fornito dai dati dello studio di Li et al. (2007) che ha riscontrato un danno ossidativo al DNA mitocondriale dell'aorta, oltre che una deplezione di sostanze naturali antiossidanti quali il glutathione ridotto dopo esposizione cronica a SWCNT.

Infine, uno studio *in vivo* molto recente di Legramante et al. (2009) ha dimostrato che la somministrazione ripetuta di SWCNT per via intratracheale può determinare alterazioni della regolazione da parte del sistema nervoso autonomo dell'attività cardiaca. In particolare, nello studio sono state riscontrate alterazioni del controllo del sistema baro-riflesso. Questo sistema fisiologico consente un continuo adattamento della frequenza cardiaca a variazioni della pressione arteriosa, in modo da mantenere costante la perfusione degli organi: nell'individuo sano quando, per varie circostanze, la pressione cardiaca tende a scendere si verifica un incremento della frequenza e l'opposto accade in caso di rialzo della pressione. Quando si verifica un'alterazione di questo meccanismo omeostatico ci si trova in una condizione di aumentato rischio cardiovascolare; infatti vari studi hanno dimostrato che soggetti con malfunzionamento del controllo baro-riflesso hanno un aumentato rischio di morte improvvisa da cause cardiache, nonché di recidiva infartuale e di aritmie (La Rovere et al., 1998). I risultati di Legramante et al. sono rilevanti in quanto ottenuti in un modello di somministrazione sub-cronico (il dato è stato valutato a distanza di 2 settimane dalla prima somministrazione di SWCNT) e suggeriscono che la valutazione dell'attività baro-riflessa potrebbe essere inclusa tra i parametri da controllare in soggetti sottoposti ad esposizione cronica di SWCNT.

In conclusione l'insieme delle evidenze sperimentali attualmente disponibili suggerisce che l'esposizione a nanotubi di carbonio può attivare molte delle vie fisiopatologiche

note di danno cardiovascolare. Peraltro i dati vanno interpretati con estrema cautela, sia perché ottenuti in condizioni acute (mentre l'esposizione attesa per l'uomo è generalmente cronica), sia perché sono state utilizzate quantità elevate di materiale (mentre l'esposizione attesa per l'uomo è di quantità molto più modeste). Di particolare rilevanza appare comunque la possibilità che la somministrazione di tali materiali determini, in soggetti predisposti, non solo la formazione di placche aterosclerotiche dopo somministrazione cronica, ma anche la formazione acuta di trombi. È noto infatti che nell'uomo eventi ischemici drammatici quali infarto del miocardio ed ictus si determinano nel contesto di una condizione cronica come la malattia aterosclerotica, sulla quale, in opportune circostanze (ad esempio la presenza di placche aterosclerotiche instabili), si può innescare la formazione acuta di trombi, che causano la completa occlusione del vaso arterioso interessato. Pertanto, la possibilità che l'esposizione a nanotubi di carbonio possa avere un ruolo in entrambi tali processi costituisce un elemento degno di particolare approfondimento. Allo stato attuale delle conoscenze, sembra possibile ipotizzare che le vie fisiopatologiche attraverso cui i nanotubi di carbonio possono indurre la malattia aterosclerotica possano essere ricercate nella disfunzione endoteliale e nel danno ossidativo di elementi chiave delle cellule dei vasi arteriosi quali il DNA mitocondriale, mentre per la formazione della trombosi acuta potrebbe avere maggiore rilevanza l'attivazione di proteine della cascata coagulativa piuttosto che l'effetto diretto sulle piastrine. Più improbabili appaiono altri meccanismi, quali l'induzione di un persistente stato infiammatorio cronico sistemico, dato che gli studi fin qui condotti sembrano indicare un effetto transitorio e di entità relativamente modesta. Non va infine trascurato il possibile coinvolgimento di fini processi di regolazione nervosa, che possono determinare alterazioni irreversibili di importanti meccanismi di controllo neurogeno dell'attività cardiovascolare.

5.6.2. Conclusioni

Appare mandatorio, prima di giungere ad una qualsiasi conclusione sui possibili effetti cardiovascolari delle NP ingegnerizzate, che vengano condotti ulteriori studi in grado di rispecchiare nel modo più fedele le condizioni espositive attese nell'attività lavorativa e nell'ambiente in genere.

5.7. Effetti immunologici

Pochi dati, prevalentemente derivati da studi in vitro, sono attualmente disponibili in letteratura, relativi ad effetti sul sistema immunitario. Tali dati suggeriscono la possi-

bilità che le NP, una volta raggiunta la circolazione sistemica, interagiscono con le proteine circolanti o presenti sulla superficie delle cellule determinando l'esposizione di residui amminoacidici normalmente non esposti (epitopi criptici) con la possibilità di una risposta autoimmune (Labarre et al., 2005). Altro possibile meccanismo di danno è costituito dall'interferenza con i processi di opsonizzazione e quindi con la clearance di materiale estraneo (es. microorganismi) normalmente eliminato in virtù di tale processo (Moghim e Patel 1998).

5.7.1. Nanotubi di carbonio

Studi in vivo hanno mostrato una serie potenziale di effetti sul sistema immunitario dei nanotubi di carbonio. Koyama et al. (2006) hanno valutato la risposta immunitaria in topi nei quali era stato eseguito un impianto sottocutaneo di nanotubi di carbonio a parete singola (SWCNT) o multipla (MWCNT) per un periodo massimo di 3 mesi. Gli autori hanno rilevato che questi materiali sono in grado di attivare il complesso di istocompatibilità maggiore sia di classe 1 sia di classe 2 entro due settimane dall'impianto. Questo tipo di risposta potrebbe essere alla base del peculiare quadro istopatologico (formazione di granulomi), rilevato dopo esposizione polmonare. Mitchell et al. (2007) in uno studio inalatorio condotto su topi hanno riscontrato una soppressione della risposta antigenica dipendente dai linfociti T, associata ad un incremento della proteina interleuchina-10 (IL-10), che è un indicatore di alterata funzione immunitaria. Il significato funzionale di queste alterazioni rimane di incerta interpretazione, stante le complesse inter-relazioni tra le varie componenti del sistema immunitario. Appare tuttavia verosimile la compatibilità di tale reperto con una ridotta abilità a combattere le infezioni, come del resto rilevato in precedenti studi ambientali ed epidemiologici, che hanno mostrato una ridotta capacità di eradicazione spontanea delle infezioni dopo esposizione a particolato ambientale ultrafine.

Un effetto sull'immunità innata, in particolare sulla capacità dei macrofagi polmonari di fagocitare il germe *Lysteria monocytogenes*, è stata riscontrata da Shvedova et al. (2008a) dopo esposizione polmonare a SWCNT in topi successivamente infettati con il suddetto germe. Anche se l'esatto meccanismo attraverso cui i SWCNT possono esercitare questo effetto rimane da chiarire, i risultati di questo studio sono tuttavia di rilievo in termini di possibile aumentata recettività alle infezioni nei lavoratori esposti cronicamente a questo materiale. In contrasto con i dati degli studi precedenti, Dumortier et al. (2006), in uno studio in vitro non hanno riscontrato alcun effetto da parte dei nanotubi di carbonio sui linfociti di classe B e T e sui macrofagi. Va comunque considerato che i nanotubi di carbonio utilizzati in questo studio erano funzionalizzati mediante l'aggiunta di gruppi idrosolubili; tale processo modifica

profondamente le caratteristiche chimico-fisiche di questi NM ed ha in genere un effetto di attenuazione sulle loro caratteristiche di citotossicità.

Una via indiretta per mezzo della quale le NP ingegnerizzate possono interagire con il sistema immunitario è attraverso una loro interazione con la storia naturale di malattie a componente immunitaria quali l'amiloidosi. La forma primaria di questa malattia è determinata da un'alterazione monoclonale delle plasmacellule (cellule coinvolte normalmente nell'immunità di tipo umorale) che producono il deposito fibrillare extracellulare caratteristico della malattia. In un recente esperimento, Linse et al. (2007) hanno rilevato che una tappa cruciale nella formazione delle fibrille, la formazione del nucleo critico, è fortemente incrementata, con modalità dose-dipendente, dalla presenza di MWCNT. Esiste quindi la possibilità che il decorso di alcune patologie autoimmunitarie possa essere slatentizzato o accelerato dall'interazione con NP ingegnerizzate.

5.7.2. Conclusioni

I dati disponibili sono da considerarsi del tutto insufficienti per esprimere un giudizio di tossicità delle NP ingegnerizzate sul sistema immunitario, anche alla luce delle dosi elevate utilizzate. Essi costituiscono però uno stimolo per ulteriori approfondimenti della tematica.

Bibliografia

- Alekseenko AV, Waseem TV, Fedorovich SV. Ferritin, a protein containing iron nanoparticles, induces reactive oxygen species formation and inhibits glutamate uptake in rat brain synaptosomes. *Brain Res.* 2008;1241:193-200.
- Argyle V, Robinson B. Are nanoparticles safe? *Chemistry in New Zealand.* 2006;12-5. Available from url: http://www.nzic.org.nz/CiNZ/articles/Argyle_70_1.pdf
- Asharani PV, Low Kah Mun G, Hande MP, Valiyaveetil S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano.* 2009;3(2):279-90.
- Au C, Mutkus L, Dobson A, Riffle J, Lalli J, Aschner M. Effects of nanoparticles on the adhesion and cell viability on astrocytes. *Biol Trace Elem Res.* 2007;120:248-56.
- Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, Coglianò V. Carcinogenicity of carbon black, titanium dioxide, and talc. *Lancet Oncol.* 2006;7(4):295-329.
- Baker GL, Gupta A, Clark ML, Valenzuela BR, Staska LM, Harbo SJ, et al. Inhalation toxicity and lung toxicokinetics of C60 fullerene nanoparticles and microparticles. *Toxicol Sci* 2008;101(1):122-31.
- Baroli B, Ennas MG, Loffredo F, Isola M, Pinna R and Lopez-Quintela MA. Penetration of Metallic Nanoparticles in Human Full-Thickness Skin. *J Invest Dermatol.* 2007;127(7):1701-12.
- Bellucci S, M Chiaretti, A Cucina, GA Carru, AI Chiaretti. Multiwalled carbon nanotube buckypaper: toxicology and biological effects in vitro and in vivo. *Nanomedicine.* 2009; 4:531-540, ISSN: 1743-5889.
- Belyanskaya L, Weigel S, Hirsch C, Tobler U, Krug HF, Wick P. Effects of carbon nanotubes on primary neurons and glial cells. *Neurotoxicology.* 2009;30:702-11.
- Bellucci S, M Chiaretti, A Cucina, GA Carru, AI Chiaretti. Multiwalled carbon nanotube buckypaper: toxicology and biological effects in vitro and in vivo. *Nanomedicine.* 2009; 4:531-540, ISSN: 1743-5889.
- Ben-Dor I, Kleiman NS, Lev E. Assessment, mechanisms, and clinical implications of variability in platelet response to aspirin and clopidogrel therapy. *Am J Cardiol.* 2009;104: 227-33.
- Bennat C, Müller-Goymann CC. Skin penetration and stabilization of formulations containing microfine titanium dioxide as physical UV filter. *Int J Cosmet Sci.* 2000;22:271-83.
- Berry JP, Arnoux B, Stanislas G, Galle P, Chretien J. A micro analytic study of particles transport across the alveoli: role of blood platelets. *Biomedicine.* 1997;27(9-10):354-7.
- Bianco A, Kostarelos K, Prato M. Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Curr Opin Chem Biol.* 2005;9:674-679.
- Bodian D, Howe HA. Experimental studies on intraneural spread of poliomyelitis virus. *Bull Johns Hopkins Hosp.* 1941a;68:248-267.
- Borm PJ, Robbins D, Haubold S, Kuhlbusch T, Fissan H, Donaldson K, Schins R, Stone V, Kreyling W, Lademann J, Krutmann J, Warheit D, Oberdorster E. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECE-TOC. Part Fibre Toxicol. 2006;3:11-46.
- Bottini M, Bruckner S, Nika K, Bottini N, Bellucci S, Magrini A, Bergamaschi A, Mustelin T. Multi-walled carbon nanotubes induce T lymphocyte apoptosis. *Toxicol Lett.* 2006; 160(2):121-6.
- Braydich-Stolle L, Hussain S, Schlager JJ, Hofmann MC. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicol Sci.* 2005;88:412-9.
- Cai R, Kubota Y, Shuin T, Sakai H, Hashimoto K, Fujishima A. Induction of cytotoxicity by photoexcited TiO₂ particles. *Cancer Res.* 1992;52:2346-8.
- Castranova, V., Koyama, S., Kim, Y-A., Endo, M. and Simeonova, P.P. Cross-talk between lung and systemic circulation during carbon nanotube respiratory exposure. Potential biomarkers. *Nano Letters.* 2009;9(1):36-43.
- Cha KE, Myung H. Cytotoxic effects of nanoparticles assessed in vitro and in vivo. *J Microbiol Biotechnol.* 2007;17(9):1573-8.
- Chen HW, Su SF, Chien CT, Lin WH, Yu SL, Chou CC, et al. Titanium dioxide nanoparticles induce emphysema-like lung injury in mice. *FASEB J.* 2006;20(13):2393-5.
- Chen L, Yokel RA, Hennig B, Toborek M: Manufactured aluminum oxide nanoparticles decrease expression of tight junction proteins

- in brain vasculature. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2008;3(4):286-95. .
- Chiaretti M, Mazzanti G, Bosco S, Bellucci S., Cucina A, Le Foche F, Carru G A, Mastrangelo S, Di Sotto A, Masciangelo R, Chiaretti A M, Balasubramanian C, De Bellis G, Micciulla F, Porta N, Deriu G, Tiberia A. Carbon nanotubes toxicology and effects on metabolism and immunological modification in vitro and in vivo. *Journal of Physics Condensed Matter.* 2008;20:474203.
 - Connor EE, Mwamuka J, Gole A, Murphy CJ, Wyatt MD. Gold Nanoparticles Are Taken Up by Human Cells but Do Not Cause Acute Cytotoxicity. *Small.* 2005;1:325-7.
 - Crosera M., Bovenzi M., Maina G., Adami G., Zanette C., Florio C., Larese Filon F. Nanoparticle dermal absorption and toxicity: a review of the literature. *Inter Arch Occup Environ Health.* 2009;25. [Epub ahead of print] .
 - Cross SE, Innes B, Roberts M, Tsuzuki T, Robertson TA, McCormick P. Human skin penetration of sunscreen nanoparticles: In-vitro assessment of a novel micronized Zinc Oxide formulation. *Skin Pharmacol. Physiol.* 2007;20:148-54.
 - Cui D, Tian F, Ozkan CS, Wang M, Gao H. Effect of single wall carbon nanotubes on human HEK293 cells. *Toxicol. Lett.* 2005; 155:73-85.
 - Davoren M, Herzog E, Casey A, Cottinerau B, Chambers G, Byrne HJ, et al. In vitro toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells. *Toxicol in Vitro.* 2007;21(3):438-48.
 - De Nicola M, Bellucci S, Traversa E, De Bellis G, Micciulla F, Ghibelli L. Carbon nanotubes on Jurkat cells: effects on cell viability and plasma membrane potential. *Journal of Physics Condensed Matter.* 2008;20:474204.
 - Dhawan A, Taurozzi JS, Pandey AK, Shan W, Miller SM, Hashsham SA, Tarabara VV. Stable colloidal dispersions of C60 fullerenes in water: evidence for genotoxicity. *Environ Sci Technol.* 2006;40(23):7394-401.
 - Ding L, Stilwell J, Zhang T, Elboudwarej O, Jiang H, Selegue JP, Cooke PA, Gray JW, Chen FF. Molecular characterization of the cytotoxic mechanism of multiwall carbon nanotubes and nano-onions on human skin fibroblast. *Nano Lett.* 2005;5:2448-64.
 - Donaldson K, Stone V, Clouter A, Renwick L and MacNee W. Ultrafine particles. *Occup Environ Med.* 2001;58:211-6.
 - Dufur EK, Kumaravel T, Nohynek GJ, Kirkland D, Toutain H. Clastogenicity, photoclastogenicity or pseudo-photo-clastogenicity: genotoxic effects of zinc oxide in the dark, in preirradiated or simultaneously irradiated Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res.* 2006;(607) 215-24.
 - Dumortier H, Lacotte S, Pastorin G, Marega R, Wu W, Bonifazi D, Briand J-P, Prato M, Muller S, Bianco A. Functionalized carbon nanotubes are non-cytotoxic and preserve the functionality of primary immune cells. *Nano Lett.* 2006;6(7):1522-8.
 - Dunford R, Salinaro A, Cai L, Serpone N, Horikoshi S, Hidaka H, Knowland J. Chemical oxidation and DNA damage catalysed by inorganic sunscreen ingredients. *FEBS Lett.* 1997;418:87-90.
 - Dutta D, Sundaram SK, Teegarden JG, Riley BJ, Fifield LS, Jacobs JM, et al. Adsorbed proteins influence the biological activity and molecular targeting of nanomaterials. *Toxicol Sci.* 2007;100(1):300-15.
 - Elder A, Gelein R, Silva V, Feikert T, Opanashuk L, Carter J, Potter R, Maynard A, Ito Y, Finkelstein J, Oberdörster G. Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system. *Environ Health Perspect.* 2006; 114:1172-8.
 - Elgrabli D, Abella-Gallart S, Robidel F, Rogerieux F, Boczkowski J, Lacroix G. Induction of apoptosis and absence of inflammation in rat lung after intratracheal instillation of multiwalled carbon nanotubes. *Toxicology.* 2008;253(1-3):131-6.
 - Eom HJ, Choi J. Oxidative stress of CeO2 nanoparticles via p38-Nrf-2 signaling pathway in human bronchial epithelial cell, Beas-2B. *Toxicol Lett.* 2009;187(2):77-83.
 - Erdely A, Hulderman T, Salmen R, Liston A, Zeidler-Erdely PC, Schwegler-Berry D, Castranova V, Koyama S, Kim YA, Endo M, Simeonova PP. Cross-talk between lung and systemic circulation during carbon nanotube respiratory exposure. Potential biomarkers. *Nano Lett.* 2009;9(1):36-43.
 - Fenoglio I, Greco G, Tomatis M, Muller J, Raymundo-Piñero E, Béguin F, et al. Structu-

- ral defects play a major role in the acute lung toxicity of multiwall carbon nanotubes: physicochemical aspects. *Chem Res Toxicol*. 2008;21(9):1690-7.
- Fiorito S, Serafino A, Andreola F, Bernier P. Effects of fullerenes and single-wall carbon nanotubes on murine and human macrophages. *Carbon*. 2006; 44:1100-5.
 - Flahaut E, Durrieu MC, Remy-Zolghadri M, Bareille R, Baquei C. Investigation of CCVD carbon nanotubes towards human umbilical vein endothelial cells. *Carbon*. 2006; 44: 1093-9.
 - Folkmann JK, Risom L, Jacobsen NR, Wallin H, Loft S, Møller P. Oxidatively damaged DNA in rats exposed by oral gavage to C60 fullerenes and single-walled carbon nanotubes. *Environ Health Perspect*. 2009;17(5):703-8.
 - Gopee NV, Roberts DW, Webb P, Cozart CR, Siitonen PH, Warbritton AR, Yu WW, Colvin VL, Walker NJ, Howard PC. Migration of intradermally injected quantum dots to sentinel organs in mice. *Toxicol Sci*. 2007;98(1): 249-57.
 - Hagenbuch B, Meier P J: The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochimica et biophysica acta*. 2003;1609 (1): 1-18
 - Herzog E, Casey A, Lyng FM, Chambers G, Byrne HJ, Davoren M. A new approach to the toxicity testing of carbon-based nanomaterials. The clonogenic assay. *Toxicol Lett*. 2007; 174(1-3):49-60.
 - Hidaka H, Kobayashi H, Kolke T, Sato T, Serpone N. DNA damage photoinduced by cosmetic pigments and sunscreen agents under solar exposure and artificial UV illumination. *J Oleo Sci*. 2006;55:249-61.
 - Hillyer JF, Albrecht RM. Gastrointestinal per-sorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles. *J Pharm Sci*. 2001;90:1927-36.
 - Hoshino A, Fujioka K, Oku T, Suga M, Sasaki YF, Ohta T, Yasuhara M, Suzuki K, Yamamoto K. Physicochemical Properties and Cellular Toxicity of Nanocrystal Quantum Dots Depend on Their Surface Modification. *Nano Lett*. 2004;4:2163-9.
 - Huang CC, Aronstam RS, Chen DR, Huang YW. Oxidative stress, calcium homeostasis, and altered gene expression in human lung epithelial cells exposed to ZnO nanoparticles. *Toxicol In Vitro*. 2010;24(1):45-55.
 - Jacobsen NR, Pojana G, White P, Møller P, Cohn CA, Korsholm KS, Vogel U, Marcomini A, Loft S, Wallin H. Genotoxicity, cytotoxicity, and reactive oxygen species induced by single-walled carbon nanotubes and C(60) fullerenes in the FE1-Mutatrade mark Mouse lung epithelial cells. *Environ Mol Mutagen*. 2008;49(6):476-87.
 - Jacobsen NR, Møller P, Jensen KA, Vogel U, Ladefoged O, Loft S, Wallin H. Lung inflammation and genotoxicity following pulmonary exposure to nanoparticles in ApoE-/- mice. *Part Fibre Toxicol*. 2009;6:2.
 - Jia G, Wang H, Yan L, Wang X, Pei R, Yan T, et al. Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene. *Environ Sci Technol*. 2005; 39(5):1378-83.
 - Kagan VE, Tyurina YY, Tyurin VA, Konduru NV, Potapovich AI, Osipov AN, et al. Direct and indirect effects of single walled carbon nanotubes on RAW 264.7 macrophages: role of iron. *Toxicol Lett*. 2006;165(1):88-100.
 - Karlsson HL, Cronholm P, Gustafsson J, Möller L. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chem Res Toxicol*. 2008;21(9):1726-32.
 - Karlsson HL, Gustafsson J, Cronholm P, Möller L. Size-dependent toxicity of metal oxide particles—a comparison between nano- and micrometer size. *Toxicol Lett*. 2009;188(2): 112-8.
 - Kim S, Lim YT, Soltesz EG, De Grand AM, Lee J, Nakayama A, Parker JA, Mihaljevic T, Lawrence RG, Dor DM, Cohn LH, Bawendi MG, Frangioni JV. Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping. *Nat Biotechnol*. 2004;22:93-7.
 - Kishore AS, Surekha P, Murthy B. Assessment of the dermal and ocular irritation potential of multi-walled carbon nanotubes by using in vitro and in vivo methods. *Toxicol Letters*. 2009;15;191(2-3):268-74.
 - Kisin ER, Murray AR, Keane MJ, Shi XC, Schwegler-Berry D, Gorelik O, Arepalli S, Castranova V, Wallace WE, Kagan VE, Shvedova

- AA. Single-walled carbon nanotubes: genotoxic and cytotoxic effects in lung fibroblast V79 cells. *J Toxicol Environ Health A*. 2007;70(24): 2071-9.
- Kobayashi N, Naya M, Endoh S, Maru J, Yamamoto K, Nakanishi J. Comparative pulmonary toxicity study of nano-TiO₂ particles of different sizes and agglomerations in rats: Different short- and long-term post-instillation results. *Toxicology*. 2009;264(1-2):110-8.
 - Koyama S, Endo M, Kim Y-A, Hayashi T, Yanagisawa T, Osaka K, Koyama H, Haniu H, Kuroiwa N. Role of systemic T-cells and histopathological aspects after subcutaneous implantation of various carbon nanotubes in mice. *Carbon*. 2006;44:1079-92.
 - Kreuter J: Influence of the surface properties on nanoparticle-mediated transport of drugs to the brain. *J Nanosci Nanotechnol*. 2004 ;4:484-8.
 - Kreyling WG, Semmler M, Erbe F, Mayer P, Takenaka S, Schulz H. Translocation of ultra-fine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. *J Toxicol Environ Health Part A*. 2002;65:1513-30.
 - La Rovere MT, Bigger Jr JT, Marcus FI, Mortara A, Schwartz PJ. Baroreflex sensitivity and heart rate variability in the prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. *Lancet*. 1998;351:478-84.
 - Labarre D, Vauthier C, Chauvierre C, Petri B, Muller R, Chehimm MM. Interactions of blood proteins with poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles decorated with a polysaccharidic brush. *Biomaterials*. 2005;26: 5075-81.
 - Lademann J, Weigmann HJ, Rickmeyer C, Barthelmes H, Schaefer H, Mueller G, Sterry W. Penetration of Titanium Dioxide in sunscreen formulation into the horny layer and the follicular orifice. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*. 1999;12:247-56.
 - Lai JC, Minski MJ, Chan AW, Lim L. Interrelations between manganese and other metal ions in health and disease. *Met Ions Biol Syst*. 2000;37:123-56.
 - Lai JC, Lai MB, Jandhyam S, Dukhande VV, Bhushan A, Daniels CK, Leung SW. Exposure to titanium dioxide and other metallic oxide nanoparticles induces cytotoxicity on human neural cells and fibroblasts. *Int J Nanomedicine*. 2008;3:533-45.
 - Lam CW, James JT, McCluskey R, Hunter RL. Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicol Sci*. 2004;77(1): 126-34.
 - Landsiedel R, Kapp MD, Schulz M, Wiench K, Oesch F. Genotoxicity investigations on nanomaterials: methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations—many questions, some answer. *Mutat Res*. 2009;681(2-3):241-8.
 - Lanone S, Rogerieux F, Geys J, Duponta A, Maillot-Marechal E, Boczkowski J, Lacroix G, Hoet P. Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines. *Particle and Fibre Toxicology*. 2009;6:14.
 - Larese Filon F, Boeninger M, Maina G, Adami G, Spinelli P, Damian A. Skin absorption of inorganic lead and the effects of skin cleansers. *J Occup Environ Med*. 2006; 48:692-9.
 - Larese Filon F, D'Agostin F, Crosera M, Adami G, Renzi N, Bovenzi M, Maina G. Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin. *Toxicol*. 2009; 255:33-7.
 - Leaper DJ. Silver dressing: their role in wound management. *Int Wound J*. 2006; 3:282-94.
 - Legramante JM, Valentini F, Magrini A, Paleschi G, Sacco S, Iavicoli I, Pallante M, Moscone D, Galante A, Bergamaschi E, Bergamaschi A, Pietroiusti A. Cardiac autonomic regulation after pulmonary exposure to carbon nanotubes. *Hum Exp Toxicol*. 2009;28:369-75.
 - Li X, Xu S, Zhang Z, Schluesener HJ. Apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured murine microglia N9 cells. *Chinese Sci Bull*. 2009; 54:3830-6.
 - Li Z, Hulderman T, Salmen R, Chapman R, Leonard SS, Young S-H, Shvedova A, Luster MI, Simeonova PP. Cardiovascular effects of pulmonary exposure to single-wall carbon nanotubes. *Environ Health Persp*. 2007; 115:377-82.
 - Lin W, Huang Y, Zhou X, Ma Y. Toxicity of ce-

- rium oxide nanoparticles in human lung cancer cells. *Int J Toxicol*. 2006;25:451-7.
- Lin W, Huang YW, Zhou XD, Ma Y. In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2006;217(3):252-9.
 - Lindberg HK, Falck GC, Suhonen S, Vippola M, Vanhala E, Catalán J, Savolainen K, Norppa H. Genotoxicity of nanomaterials: DNA damage and micronuclei induced by carbon nanotubes and graphite nanofibres in human bronchial epithelial cells in vitro. *Toxicol Lett*. 2009;186(3):166-73.
 - Linse S, Cabaleiro-Lago C, Xue W-F, Lynch I, Lindman S, Thulin E, Radford SE, Dawson KA. Nucleation of protein fibrillation by nanoparticles. *PNAS*. 2007;8691-7.
 - Lockman PR, Koziara JM, Mumper RJ, Allen DD. Nanoparticle surface charges alter blood-brain barrier integrity and permeability. *J Drug Target*. 2004;12:635-41.
 - Long TC, Saleh N, Tilton RD, Lowry GV, Veronesi B. Titanium dioxide (P25) produces reactive oxygen species in immortalized brain microglia (BV2): implications for nanoparticle neurotoxicity. *Environ Sci Technol*. 2006;40:4346-52.
 - Long TC, Tajuba J, Sama P, Saleh N, Swartz C, Parker J, Hester S, Lowry GV, Veronesi B. Nanosized titanium dioxide stimulates reactive oxygen species in brain microglia and damages neurons in vitro. *Environ Health Perspect*. 2007;115:1631-7.
 - Lovric J, Cho SJ, Winnik FM, Maysinger D. Unmodified cadmium telluride quantum dots induce reactive oxygen species formation leading to multiple organelle damage and cell death. *Chem Biol*. 2005;12:1227-34.
 - Ma L, Liu J, Li N, Wang J, Duan Y, Yan J, Liu H, Wang H, Hong F. Oxidative stress in the brain of mice caused by translocated nanoparticulate TiO₂ delivered to the abdominal cavity. *Biomaterials*. 2010;31:99-105.
 - Manna S, Sarkar S, Barr J, Wise K, Barrera E, Jejelowo O, Rice-Ficht A, Ramesh G. Single-Walled Carbon Nanotube Induces Oxidative Stress and Activates Nuclear Transcription Factor-KB in Human Keratinocytes. *Nano Lett*. 2005;5:1676-84.
 - Mavon A, Miquel C, Lejeune O, Payre B, Moretto P. In vitro percutaneous absorption and in vivo stratum corneum distribution of an organic and mineral sunscreen. *Skin Pharmacol. Physiol*. 2007;20:10-20.
 - Maynard AD, Baron PA, Foley M, Shvedova AA, Kissin ER, Castranova V. Exposure to carbon nanotube material: aerosol release during the handling of unrefined single-walled carbon nanotubes. *J Toxicol Environ Health A*. 2004;67:87-107.
 - Migliore L, Saracino D, Bonelli A, Colognato R, D'Errico MR, Magrini A, Bergamaschi A, Bergamaschi E. Carbon nanotubes induce oxidative DNA damage in RAW 264.7 cells. *Environ Mol Mutagen* 2010; 51(4):294-303.
 - Mitchell LA, Gao J, Wal RV, Gigliotti A, Burchiel SW, McDonald JD. Pulmonary and systemic immune response to inhaled multiwalled carbon nanotubes. *Toxicol Sci*. 2007;100(1):203-14.
- Moghim SM, Patel HM. Serum-mediated recognition of liposomes by phagocytic cells of the reticuloendothelial system. The concept of tissue specificity. *Adv Drug Delivery Rev*. 1998; 32:45-61.
- Monteiro-Riviere NA, Nemanich RJ, Inman AO, Wang YY, Riviere JE. Multi-walled carbon nanotubes interactions with human epidermal keratinocytes. *Toxicology Letters* 2005; 155:377-84.
 - Monteiro-Riviere NA, Inman AO. Challenges for assessing carbon nanomaterial toxicity to skin. *Carbon*. 2006;44(6):1070-8.
 - Mossman BT, Borm PJ, Castranova V, Costa DL, Donaldson K, Kleeberger SR. Mechanisms of action of inhaled fibers, particles and nanoparticles in lung and cardiovascular disease. *Particle and Fibre Toxicology*. 2007;4:1-6.
 - Muldoon LL, Pagel MA, Kroll RA, Roman-Goldstein S, Jones RS, Neuwelt EA. A physiological barrier distal to the anatomic bloodbrain barrier in a model of transvascular delivery. *Am J Neuroradiol*. 1999;20:217-22.
 - Muller RH, Keck CM: Drug delivery to the brain – realization by novel drug carriers. *J Nanosci Nanotechnol*. 2004;4:471-83.
 - Muller J, Huaux F, Moreau N, Misson P, Heilier JF, Delos M, Arras M, Fonseca A, Nagy JB,

- Lison D. Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005; 207:221-31.
- Muller J, Decordier I, Hoet PH, Lombaert N, Thomassen L, Huaux F, Lison D, Kirsch-Volders M. Clastogenic and aneugenic effects of multi-wall carbon nanotubes in epithelial cells. *Carcinogenesis.* 2008a;29(2):427-33.
 - Muller J, Huaux F, Fonseca A, Nagy JB, Moreau N, Delos M, et al. Structural defects play a major role in the acute lung toxicity of multi-wall carbon nanotubes: toxicological aspects. *Chem Res Toxicol.* 2008b;21(9):1698-1705.
 - Murr LE, Garza KM, Soto KF, Carrasco A, Powell JG, Ramirez DA, et al. Cytotoxicity assessment of some carbon nanotubes and related carbon nanoparticle aggregates and the implication for anthropogenic carbon nanotube aggregates in the environment. *Int J Environ Res Publ Health.* 2005;2(1):31-42.
 - NANODERM. Quality of skin as a barrier to ultra-fine particles. Final Report. 2007. (Project Number: QLK4-CT-2002-02678) Available from url:<http://www.uni-leipzig.de/~nanoderm/>
 - Nemmar A, Hoet PHM, Vandervoort P, Dinsdale D, Nemery B, Hoylaers MF. Enhanced peripheral thrombogenicity after lung inflammation is mediated by platelet-leukocyte activation: role of P-selectin. *J Thromb Haemost.* 2007;5:1217-26.
 - Newman MD, Stotland M and Ellis JI. The safety of nanosized particles in titanium dioxide – and zinc oxide – based sunscreens. *J Am Acad Dermatol.* 2009;61:685-692.
 - Nishimori H, Kondoh M, Isoda K, Tsunoda S, Tsutsumi Y, Yagi K. Histological analysis of 70-nm silica particles-induced chronic toxicity in mice. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009;72(3):626-9.
 - Nohynek GJ, Antignac E, Re T and Toutain H. Safety assessment of personal care products/cosmetics and their ingredients. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009;doi: 10.1016/j.taap.2009.12.001.
 - Oberdörster E. Manufactured nanomaterials (fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. *Environmental Health Perspectives.* 2004, 112(10):1058-62.
 - Oberdörster G, Sharp Z, Elder AP, Gelein R, Kreyling W, Cox C: Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol.* 2004;16:437-45.
 - Oberdörster G, Oberdorster E, Oberdorster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 2005;113:823-839.
 - Oberdörster G. Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. *J Internal Med* 2010;267:89-105.
 - Olivier JC. Drug transport to brain with targeted nanoparticles. *NeuroRX.* 2005; 2:108-19.
 - Pacurari M, Yin XJ, Zhao J, Ding M, Leonard SS, Schwegler-Berry D, Ducatman BS, Sbarra D, Hoover MD, Castranova V, Vallyathan V. Raw single-wall carbon nanotubes induce oxidative stress and activate MAPKs, AP-1, NF-kappaB, and Akt in normal and malignant human mesothelial cells. *Environ Health Perspect.* 2008;116(9):1211.
 - Paddle-Ledinek JE, Nasa Z, Cleland HJ. Effect of different wound dressings on cell viability and proliferation. *Plast Reconstr Surg.* 2006;117:110S-8S.
 - Papageorgiou I, Brown C, Schins R, Singh S, Newson R, Davis S, Fisher J, Ingham E, Case CP. The effect of nano- and micron-sized particles of cobalt-chromium alloy on human fibroblasts in vitro. *Biomaterials.* 2007;28:2946-58.
 - Park EJ, Yi J, Chung KH, Ryu DY, Choi J, Park K. Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicol Lett.* 2008a;180(3):222-9.
 - Park EJ, Choi J, Park YK, Park K. Oxidative stress induced by cerium oxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicology.* 2008b; 245(1-2):90-100.
 - Park EJ, Yoon J, Choi K, Yi J, Park K. Induction of chronic inflammation in mice treated with titanium dioxide nanoparticles by intratracheal instillation. *Toxicology.* 2009;260(1-3):37-46.
 - Park S, Lee YK, Jung M, Kim KH, Chung N, Ahn EK, et al. Cellular toxicity of various inhalable metal nanoparticles on human alveolar epithelial cells. *Inhal Toxicol.* 2007;19 Suppl 1:59-65.

- Poland CA, Duffin R, Kinloch I, Maynard A, Wallace WA, Seaton A, et al. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nat Nanotechnol.* 2008;3(7):423-8.
- Poon VK and Burd A. In vitro cytotoxicity of silver: implication for clinical wound care. *Burns.* 2004;30:140-7.
- Porter A, Muller K, Skepper J, Midgley P, Weland M. Uptake of C60 by human monocyte macrophages, its localization and implications for toxicity: Studied by high resolution electron microscopy and electron tomography. *Acta Biomaterialia.* 2006;2:409-19.
- Pott F and Roller M. Carcinogenicity study with nineteen granular dusts in rats. *Eur J Oncol.* 2005;10:249-81.
- Pulskamp K, Diabaté S, Krug HF. Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants. *Toxicol Lett.* 2007; 10;168(1):58-74.
- Radomski A, Jurasz P, Alonso-Escolano D, Drews M, Morandi M, Malinski T, Radomski MD. Nanoparticle-induced platelet aggregation and vascular thrombosis. *Br J Pharmacol.* 2005; 146:882-93.
- Rahman MF, Wang J, Patterson TA, Saini UT, Robinson BL, Newport GD, Murdock RC, Schlager JJ, Hussain SM, Ali SF. Expression of genes related to oxidative stress in the mouse brain after exposure to silver-25 nanoparticles. *Toxicol Lett.* 2009;187:15-21.
- Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340:115-26.
- Rouse JG, Yang J, Barron AR, Monteiro-Riviere NA. Fullerene-based amino acid nanoparticle interactions with human epidermal keratinocytes. *Toxicol in Vitro.* 2006; 20:1313-20.
- Rouse JG, Yang J, Ryman-Rasmussen JP, Barron AR, Monteiro-Riviere NA. Effects of mechanical flexion on the penetration of fullerene amino acid-derivatized peptide nanoparticles through skin. *Nano Lett.* 2007;7:155-60.
- Ryan JJ, Bateman HR, Gomez G, Norton SK et al. Fullerene nanomaterials inhibit the allergic response. *J Immunol.* 2007;1;665-72.
- Ryman-Rasmussen JP, Riviere JE, Monteiro-Riviere NA. Penetration of intact skin by quantum dots with diverse physicochemical properties. *Toxicol. Sci.* 2006;91:159-65.
- Ryman-Rasmussen JP, Riviere JE, Monteiro-Riviere NA. Surface coatings determine cytotoxicity and irritation potential of quantum dot nanoparticles in epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2007;127:143-53.
- Sakamoto Y, Nakae D, Fukumori N, Tayama K, Maekawa A, Imai K, Hirose A, Nishimura T, Ohashi N, Ogata A. Induction of mesothelioma by a single intrascrotal administration of multi-wall carbon nanotube in intact male Fischer 344 rats. *J Toxicol Sci.* 2009; 34(1):65-76.
- Salvador-Morales C, Flahaut E, Sim E, Sloan J, Green MLH, Sim RB. Complement activation and protein adsorption by carbon nanotubes. *Mol Imm.* 2006;43:193-201.
- Sato Y, Yokoyama A, Shibata KI, Akimoto Y, Ogino S, Nodasaka Y, et al. Influence of length on cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes against human acute monocytic leukemia cell line THP-1 in vitro and subcutaneous tissue of rats in vivo. *Mol BioSyst.* 2005; 1:176-82.
- Sayes C, Fortner J, Guo W, Lyon D, Boyd A, Ausman K, Tao Y, Sitharaman B, Wilson J, Hughes J, West J, Colvin V. The differential cytotoxicity of water-soluble fullerenes. *Nano Letters.* 2004; 4(10):1881-7.
- Sayes C, Gobin A, Ausman K, Mendez J, West J, Colvin V. Nano-C60 cytotoxicity is due to lipid peroxidation. *Biomaterials.* 2005;26(36):7587-95.
- Sayes CM, Liang F, Hudson JL, Mendez J, Guo W, Beach JM, MooreVC, Doyle CD, West JL, Billups WE, Ausman KD, Colvin VL. Functionalization density dependence of single-walled carbon nanotubes cytotoxicity in vitro. *Toxicol Lett.* 2006a;161:135-42.
- Sayes CM, Wahi R, Preetha AK, Liu Y, Jennifer LW, Kevin DA, David BW, Vicki LC. Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *Toxicol Sci.* 2006b;92:174-85.
- Sayes CM, Marchione AA, Reed KL, Warheit DB. Comparative pulmonary toxicity assessments of C60 water suspensions in rats:

- few differences in fullerene toxicity in vivo in contrast to in vitro profiles. *Nano Lett.* 2007a;7(8):2399-406.
- Sayes CM, Reed KL, Warheit DB. Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles. *Toxicol Sci.* 2007b;97(1):163-80.
 - Schulz J, Hohenberg H, Pflücker F, Gartner E, Will, T, Pfeifer S, Wepf R, Wendel V, Gers-Barlag H, Wittern KP. Distribution of sunscreens on skin. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002;54 (Suppl 1):S157-63.
 - Sharma CS, Sarkar S, Periyakaruppan A, Barr J, Wise K, Thomas R, Wilson BL, Ramesh GT. Single-walled carbon nanotubes induces oxidative stress in rat lung epithelial cells. *J Nanosci Nanotechnol.* 2007;7(7):2466-72.
 - Sharma HS: Pathophysiology of the blood-spinal cord barrier in traumatic injury. In Sharma HS and Westman J (Eds.), *The Blood-Spinal Cord and Brain Barriers in Health and Disease.* Elsevier Academic Press, San Diego, Ca. 2004;437-518.
 - Sharma HS: Hyperthermia influences excitatory and inhibitory amino acid neurotransmitters in the central nervous system. An experimental study in the rat using behavioural, biochemical, pharmacological, and morphological approaches. *Journal of Neural Transmission.* 2006a;113(4):497-519.
 - Sharma HS: Hyperthermia induced brain oedema: current status and future perspectives. *Indian J Med Res.* 2006b;123(5):629-52.
 - Sharma HS, Ali SF, Schalger J, Hussain S: Effects of nanoparticles on the blood brain barrier. *Int J Neuroprotec Neuroregen.* 2006c;2(3):78.
 - Sharma HS and Sharma Aruna: Nanoparticles aggravate heat stress induced cognitive deficits, blood-brain barrier disruption, edema formation and brain pathology. *Progress in Brain Research.* 2007;162:245-73.
 - Sharma HS, Ali SF, Hussain SM, Schlager JJ, Sharma A. Influence of engineered nanoparticles from metals on the blood-brain barrier permeability, cerebral blood flow, brain edema and neurotoxicity. An experimental study in rat and mice using biochemical and morphological approaches. *J Nanosci Nanotechnol.* 2009; 9:5055-72.
 - Sharma HS, Hussain S, Schlager J, Ali SF, Sharma A. Influence of nanoparticles on blood-brain barrier permeability and brain edema formation in rats. *Acta Neurochir Suppl.* 2010;106:359-64.
 - Sharma V, Shukla RK, Saxena N, Parmar D, Das M, Dhawan A. DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicol Lett.* 2009;185(3):211-8.
 - Shi Kam NW, Jessop TC, Wender PA, Dai H. Nanotube molecular transporters: internalization of carbon nanotube-protein conjugates into Mammalian cells. *J Am Chem Soc.* 2004;126:6850.
 - Shimizu M, Tainaka H, Oba T, Mizuo K, Umezawa M, Takeda K. Maternal exposure to nanoparticulate titanium dioxide during the prenatal period alters gene expression related to brain development in the mouse. *Part Fibre Toxicol.* 2009; 6:20-7.
 - Shiohara A, Hoshino A, Hanaki K, Suzuki K, Yamamoto K. On the cytotoxicity of quantum dots. *Microbiol Immunol.* 2004;48 (9):669-75.
 - Shvedova AA, Castranova V, Kisin ER, Schwegler-Berry D, Murray AR, Gandelsman VZ, Maynard A, Baron P. Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. *J Toxicol Environ Health A.* 2003a;24;66(20): 1909-26.
 - Shvedova AA, Kisin ER, Murray AR, Schwegler-Berry D, Gandelsman VZ, Baron P. Exposure of human bronchial epithelial cells to carbon nanotubes caused oxidative stress and cytotoxicity. *Proceedings of the Society for Free Radical Research Meeting, European Section.* 2003 Jun 26–29; Ioannina, Greece; 2004.
 - Shvedova AA, Kisin ER, Mercer R, Murray AR, Johnson VJ, Potapovich AI, et al. Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice. *Am J Physiol.* 2005;289 (5):L698-L708.
 - Shvedova AA, Kisin ER, Murray AR, Gorelik O, Arepalli S, Castranova V, et al. Vitamin E deficiency enhances pulmonary inflammatory response and oxidative stress induced by single-walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007a;221(3): 339-48.

- Shvedova AA, Sager T, Murray A, Kisin E, Porter DW, Leonard SS. Critical issues in the evaluation of possible effects resulting from airborne nanoparticles. Philadelphia: Informa Healthcare. In N. Monteiro-Riviere & L. Train (Eds.), *Nanotechnology: Characterization, Dosing and Health Effects*. 2007b, pp. 221-32.
- Shvedova AA, Fabisiak JP, Kisin ER, Murray AR, Roberts JR, Tyurina YY, Antonini JM, Feng WH, Kommineni C, Reynolds J, Barchowsky A, Castranova V, Kagan VE. Sequential exposure to carbon nanotubes and bacteria enhances pulmonary inflammation and infectivity. *Am J Resp Cell Mol Biol*. 2008a;38:579-90.
- Shvedova AA, Kisin E, Murray AR, Johnson VJ, Gorelik O, Arepalli S, et al. Inhalation versus aspiration of single walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice: inflammation, fibrosis, oxidative stress and mutagenesis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008b;295:L552-65.
- Shvedova AA, Kisin ER, Murray AR, Kommineni C, Castranova V, Fadeel B, et al. Increased accumulation of neutrophils and decreased fibrosis in the lung of NADPH oxidase-deficient C57BL/6 mice exposed to carbon nanotubes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008c;231(2):235-240.
- Shvedova AA, Kisin ER, Porter D, Schulte P, Kagan VE, Fadeel B, et al. Mechanisms of pulmonary toxicity and medical applications of carbon nanotubes: Two faces of Janus? *Pharmacol Ther*. 2009;121(2):192-204.
- Silva GA. Neuroscience nanotechnology: progress, opportunities and challenges. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7:65-74.
- Simeonova P. Nanoparticle exposure and systemic-cardiovascular effects. Experimental data. In: *Nanotechnology-toxicological issues and environmental safety*. Springer Netherlands Editor. 2007;53-64
- Simon-Deckers A, Gouget B, Mayne-L'hermite M, Herlin-Boime N, Reynaud C, Carrière M. In vitro investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in A549 human pneumocytes. *Toxicology*. 2008;253(1-3):137-46.
- Singh N, Manshian B, Jenkins GJS, Griffith SM, Williams PM, Maffei TGG, Wright CJ, Doak SH. NanoGenotoxicology: the DNA damage potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*. 2009;1-24.
- Singh R, Pantarotto D, Lacerda L, Pastorin G, Klumpp C, Prato M, Bianco A, Kostarelos K. Tissue distribution and blood clearance rates of intravenously administered carbon nanotube radiotracers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:3357-62.
- Singh S, Shi T, Duffin R, Albrecht C, Van Berlo D, Höhr D, et al. Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO₂: role of the specific surface area and of surface methylation of the particles. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007;222(2):141-151.
- Song Y, Xue Y, Liu X, Wang P, Liu L. Effects of acute exposure to aluminum on blood-brain barrier and the protection of zinc. *Neurosci Lett*. 2008; 445:42-6.
- Soto K, Garza KM, Murr LE. Cytotoxic effects of aggregated nanomaterials. *Acta Biomaterialia*. 2007;3(3):351-8.
- Sriram K, Porter D, Tsuruoka S, Endo M, Jefferson A, Wolfarth W. Neuroinflammatory responses following exposure to engineered nanomaterials. *Toxicologist* 2007; A1390.
- Sung JH, Ji JH, Park JD, Yoon JU, Kim DS, Jeon KS, et al. Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles. *Toxicol Sci*. 2009; 108(2):452-61.
- Takagi A, Hirose A, Nishimura T, Fukumori N, Ogata A, Ohashi N, et al. Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. *J Toxicol Sci*. 2008;33(1):105-16.
- Tan MH, Commens CA, Burnett L, Snitch PJ. A pilot study on the percutaneous absorption of microfine titanium dioxide from sunscreens. *Australas. J Dermatol*. 1996;37:185-7.
- Tian FR, Cui DX, Schwarz H, Estrada GG, Kobayashi H. Cytotoxicity of single-wall carbon nanotubes on human fibroblasts. *Toxicol In Vitro*. 2007;20(7):1202-12.
- Tin-Tin-Win-Shwe, Yamamoto S, Ahmed S, Kakeyama M, Kobayashi T, Fujimaki H. Brain cytokine and chemokine mRNA expression in mice induced by intranasal instillation with ultrafine carbon black. *Toxicol Lett*. 2006; 163:153-160.
- Tin-Tin-Win-Shwe, Mitsushima D. Yamamoto

- S, Fukushima A, Funabashi T, Kobayashi T, Fujimaki H. Changes in neurotransmitter levels and proinflammatory cytokine mRNA expressions in the mice olfactory bulb following nanoparticle exposure. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008;226:192-8.
- Tjälve H, Menare C, Borg-Neczak K. Uptake and transport of manganese in primary and secondary olfactory neurons in pike. *Pharmacol Toxicol*. 1995;77:23-31.
 - Totsuka Y, Higuchi T, Imai T, Nishikawa A, Nohmi T, Kato T, Masuda S, Kinai N, Hiyoshi K, Ogo S, Kawanishi M, Yagi T, Ichinose T, Fukumori N, Watanabe M, Sugimura T, Wakabayashi K. Genotoxicity of nano/microparticles in in vitro micronuclei, in vivo comet and mutation assay systems. *Part Fibre Toxicol*. 2009;6(1):23.
 - Trouiller B, Reliene R, Westbrook A, Solaimani P, Schiestl RH. Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability in vivo in mice. *Cancer Res*. 2009;69(22):8784-9.
 - Uchino H, Minamikawa-Tachino R, Kristian T, Perkins G, Narazaki M, Siesjo BK, Shibasaki F. Differential neuroprotection by cyclosporin A and FK506 following ischemia corresponds with differing abilities to inhibit calcineurin and the mitochondrial permeability transition. *Neurobiol Dis*. 2002;10:219-233.
 - Uwatoku T, Shimokawa H, Abe K, Matsu-moto Y, Hattori T, Oi K. Application of nanoparticle technology for the prevention of restenosis after balloon injury in rats. *Circ Res*. 2003;92:e62-9.
 - Voura EB, Jaiswal JK, Mattoussi H, Simon SM. Tracking metastatic tumor cell extravasation with quantum dot nanocrystals and fluorescence emission-scanning microscopy. *Nat Med*. 2004;10:993-8.
 - Wamer WG, Yin JJ, Wei RR. Oxidative damage to nucleic acids photosensitized by titanium dioxide. *Free Radic Biol Med*. 1997;23:851-8.
 - Wang JX, Zhou G, Chen C, Yu H, Wang T, Ma Y, Jia G, Gao Y, Li B, Sun J, Li Y, Jiao F, Zhao Y, Chai Z. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicol Lett*. 2007;168:176-85.
 - Wang L, Castranova V, Rojanasakul Y, Lu Y, Scabilloni J, Mercer RR. Direct fibrogenic effects of dispersed single walled carbon nanotubes on human lung fibroblasts. *Toxicologist*. 2008;102:A1499.
 - Wang JX, Liu Y, Jiao F, Lao F, Li W, Gu Y, Li Y, Ge C, Zhou G, Li B, Zhao Y, Chai Z, Chen C. Time-dependent translocation and potential impairment on central nervous system by intranasally instilled TiO₂ nanoparticles. *Toxicology*. 2008;254:82-90.
 - Wang S, Lu W, Tovmachenko O, Rai US, Yu H, Ray PC. Challenge in understanding size and shape dependent toxicity of gold nanomaterials in human skin keratinocytes. *Chem Phys Lett*. 2008;463:145-9.
 - Wamer WG, Yin JJ, Wei RR. Oxidative damage to nucleic acids photosensitized by titanium dioxide. *Free Radic Biol Med*. 1997;23:851-8.
 - Wang B, Feng WY, Zhu MT, Wang Y, Wang M, Gu YQ, Ouyang H, Wang H, Li M, Zhao Y, Chai Z, Wang H. Neurotoxicity of low-dose repeatedly intranasal instillation of nano- and submicron-sized ferric oxide particles in mice. *J Nanoparticle Res*. 2009;11:41-53.
 - Warheit DB, Laurence BR, Reed KL, Roach DH, Reynolds GA, Webb TR. Comparative pulmonary toxicity assessment of single wall carbon nanotubes in rats. *Toxicol Sci*. 2004;77(1):117-25.
 - Warheit DB, Borm PJ, Hennes C, Lademann J. Testing strategies to establish the safety of nanomaterials: conclusions of an ECETOC workshop. *Inhal Toxicol*. 2007;19(8):631-43.
 - Weiss CK, Kohnle MV, Landfester K, Hauk T, Fischer D, Schmitz-Wienke J, Mailänder V. The first step into the brain: uptake of NiO-PBCA nanoparticles by endothelial cells in vitro and in vivo, and direct evidence for their blood-brain barrier permeation. *Chem Med Chem*. 2008;3(9):1395-403.
 - Wick P, Manser P, Spohn P, Bruinink A. In vitro evaluation of possible adverse effects of nanosized materials. *Phys Status Solidi*. 2006;243(13):3556-60.
 - Wick P, Manser P, Limbach LK, Dettlaff-Weglikowska U, Krumeich F, Roth S, Stark WJ, Bruinink A. The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity. *Toxicol Lett*. 2007;168:121-31.

- Wurnitzer U, Herbold B, Voetz M, Ragot J. Studies on the in vitro genotoxicity of baytubes, agglomerates of engineered multi-walled carbon-nanotubes (MWCNT). *Toxicol Lett.* 2009; 186(3):160-5.
- Witzmann FA and Monteiro-Riviere NA. Multi-walled carbon nanotube exposure alters protein expression in human keratinocytes. *Nanomedicine.* 2006;2:158-68.
- Worle-Knirsch JM, Pulskamp K, Krug HF. Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays. *Nano Lett.* 2006;6(6):1261-8.
- Wu J, Liu W, Xue CB, Zhou SC., Lan FL, Bi L, Xu H, Yang X, Zeng FD. Toxicity and penetration of TiO₂ nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure. *Toxicol Lett.* 2009;191:1-8.
- Xu LJ, Zhao JX, Zhang T, Ren GG, Yang Z. In vitro study on influence of nano particles of CuO on CA1 pyramidal neurons of rat hippocampus potassium currents. *Environ Toxicol.* 2009; 24:211-7.
- Yang H, Liu C, Yang D, Zhang H, Xi Z. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition. *J Appl Toxicol.* 2009;29(1): 69-78.
- Yuan JH, Chen Y, Zha HX, Song LJ, Li CY, Li JQ, Xia XH. Determination, characterization and cytotoxicity on HELF cells of ZnO nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2009;Oct 27. [Epub ahead of print]
- Zanette C, Florio C, Crosera M, Adami G, Bovenzi M, Filon Larese F. Cytotoxicity of silver nanoparticles on human HaCat keratinocytes OEESC2009, Occupational and Environmental Exposure of the Skin to Chemicals. 2009 Jun 14 – 17; Edimburg, UK.
- Zeni O, Palumbo R, Bernini R, Zeni L, Sarti M, Scarfi MR. Cytotoxicity investigation on cultured human blood cells treated with single-wall carbon nanotubes. *Sensors.* 2008;8:488-99.
- Zhang LW, Zeng L, Barron AR, Monteiro-Riviere NA. Biological interactions of functionalized single-wall carbon nanotubes in human epidermal keratinocytes. *Int J Toxicol.* 2007;26:103-13.
- Zhang LW, Yu WW, Colvin VL, Monteiro-Riviere NA. Biological interactions of quantum dot nanoparticles in skin and in human epidermal keratinocytes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008;228:200-11.
- Zhu L, Chang DW, Dai L, Hong Y DNA damage induced by multiwalled carbon nanotubes in mouse embryonic stem cells *Nano Lett.* 2007;7(12):3592-7.

capitolo 6

Valutazione e Gestione del Rischio

Luigi Monica (coordinatore), *INAIL, Dipartimento di Tecnologie di Sicurezza - ex ISPESL*
Fabio Boccuni, *INAIL, Dipartimento di Medicina del Lavoro - ex ISPESL*

6.1. Principio di precauzione

In sede decisionale in materia ambientale e sanitaria in genere, laddove esistano opinioni contrastanti sulle linee guida da adottare ed i dati scientifici a disposizione siano scarsi o non sufficientemente chiari, può essere richiamato il cosiddetto “Principio di precauzione”.

Il principio di precauzione può essere invocato, quando si renda necessario un intervento urgente di fronte a un possibile pericolo per la salute umana, animale o vegetale, ovvero per la protezione dell’ambiente nel caso in cui i dati scientifici non consentano una valutazione completa del rischio. Tale principio viene soprattutto applicato nei casi di pericolo per la salute delle persone.

Il Trattato della Commissione Europea contiene un solo riferimento esplicito al principio di precauzione, e più precisamente, nel titolo consacrato alla protezione ambientale. Tuttavia, nella pratica, il campo d’applicazione del principio è molto più vasto e si estende anche alla politica dei consumatori e alla salute umana, animale o vegetale.

In assenza di una definizione del principio di precauzione nel Trattato o in altri testi comunitari, il Consiglio Europeo, nella sua risoluzione del 13 aprile 1999, ha chiesto alla Commissione di elaborare degli orientamenti chiari ed efficaci al fine dell’applicazione di detto principio. In risposta, nel febbraio del 2000, la Commissione ha adottato una Comunicazione sul principio di precauzione, con l’obiettivo di giungere ad una comprensione comune dei modi in cui è opportuno valutare, gestire e comunicare i rischi che la scienza non è ancora in grado di valutare pienamente (Comunicazione della Commissione Europea, 2000). La Comunicazione della Commissione costituisce una risposta a questa domanda: la Commissione analizza rispettivamente i fattori che provocano il ricorso al principio di precauzione e le misure risultanti da tale ricorso. Essa propone anche orientamenti per l’applicazione del principio stesso.

Secondo la Commissione, il principio di precauzione può essere invocato nel caso in cui gli effetti potenzialmente pericolosi di un fenomeno, di un prodotto o di un processo siano stati identificati tramite una valutazione scientifica e obiettiva, che però non consente di determinare il rischio con sufficiente certezza. Il ricorso al principio si iscrive pertanto nel quadro generale dell'analisi del rischio (che comprende la valutazione del rischio) e più particolarmente nel quadro della gestione del rischio che corrisponde alla presa di decisione.

Il ricorso al principio di precauzione è pertanto giustificato solo quando riunisce tre condizioni, ossia:

1. L'identificazione degli effetti potenzialmente negativi.
2. La valutazione dei dati scientifici disponibili.
3. L'ampiezza dell'incertezza scientifica.

Per quanto riguarda le misure risultanti dal ricorso al principio di precauzione, esse possono prendere la forma di una decisione di agire o di non agire. La risposta scelta dipende da una decisione politica, che è funzione del livello di rischio considerato come "accettabile" dalla società che deve sostenerlo.

Tre principi specifici dovrebbero sottendere il ricorso al principio di precauzione:

1. L'attuazione del principio dovrebbe fondarsi su una valutazione scientifica la più completa possibile. Detta valutazione dovrebbe, nella misura del possibile, determinare in ogni istante il grado d'incertezza scientifica.
2. Qualsiasi decisione di agire o di non agire in virtù del principio di precauzione dovrebbe essere preceduta da una valutazione del rischio e delle conseguenze potenziali dell'assenza di azione.
3. Non appena i risultati dalla valutazione scientifica e/o della valutazione del rischio sono disponibili, tutte le parti in causa dovrebbero avere la possibilità di partecipare allo studio delle varie azioni prevedibili nella maggiore trasparenza possibile.

Oltre a questi principi specifici, i principi generali di una buona gestione dei rischi restano applicabili allorché il principio di precauzione viene invocato. Si tratta dei cinque seguenti principi:

- La proporzionalità tra le misure prese e il livello di protezione ricercato.
- La non discriminazione nell'applicazione delle misure.
- La coerenza delle misure con quelle già prese in situazioni analoghe o che fanno uso di approcci analoghi.
- L'esame dei vantaggi e degli oneri risultanti dall'azione o dall'assenza di azione.
- Il riesame delle misure alla luce dell'evoluzione scientifica.

I nanomateriali (NM) possiedono caratteristiche particolari e il loro utilizzo industriale crea nuove opportunità, ma anche nuovi rischi e incertezze. La loro crescente produ-

zione e il successivo uso espongono a questi materiali un numero crescente di lavoratori e di consumatori. Ciò porta ad una maggiore necessità di informazioni sui possibili effetti ambientali e sanitari legati all'impiego dei NM.

Infatti, la conoscenza dell'esposizione professionale a nuovi nanomateriali è molto limitata. Inoltre, le tecniche di misura per determinarne l'esposizione non sono completamente sviluppate. Sono attualmente in fase di discussione e di definizione diversi metodi sia *in vivo* sia *in vitro* per indagare i possibili effetti dei NM sulla salute, oltre ai metodi per determinarne le proprietà chimico-fisiche (Satterstorm FK et al, 2008).

La strategia comunitaria sulla salute e sicurezza del lavoro per il periodo 2007-2012 include le nanotecnologie come argomento su cui lavorare nel contesto dell'identificazione dei rischi nuovi ed emergenti. Inoltre, è stata pubblicata una comunicazione della Commissione Europea in cui si è sviluppato un Piano di azione per implementare un approccio sicuro, integrato e responsabile alle nanotecnologie, approvato successivamente dal Parlamento Europeo (Comunicazione della Commissione Europea, 2005; Parlamento Europeo, 2006; Comunicazione della Commissione Europea, 2007). Inoltre per assicurare uno sviluppo etico e sicuro delle nanotecnologie la Commissione Europea ha stabilito un Codice di Comportamento (Comunicazione della Commissione Europea, 2004). Vi sono al momento, infatti, numerose iniziative/attività in corso, la cui finalità è quella di assicurare la ricerca e lo sviluppo sicuro e responsabile di questa nuova tecnologia.

Infine, nel 2008, la Commissione Europea ha definito che lo sviluppo delle attività sulle nanotecnologie dovranno essere gestite e strutturate attraverso un approccio responsabile. (Raccomandazione della Commissione Europea, 2008). Anche il Comitato economico e sociale europeo ha sottolineato l'esigenza di uno sviluppo delle nanotecnologie, trattando gli aspetti etici in stretto parallelismo con quelli ambientali e quelli inerenti alla salute e alla sicurezza, lungo tutto il ciclo di vita delle loro applicazioni scientifiche (Parere del Comitato economico e sociale europeo, 2008).

6.2. Approccio alla valutazione del rischio

Come precedentemente analizzato la strategia europea prevede un approccio responsabile per lo sviluppo delle attività correlate ai NM. In attesa di ulteriori sviluppi circa gli effetti tossicologici collegati all'esposizione ai NM, è opportuno operare con il massimo della cautela.

Sono stati messi in campo numerosi strumenti per garantire un elevato livello di sicurezza dei lavoratori, che possono essere ricondotti alla gestione in sicurezza dei

NM. Il quadro legislativo di riferimento è la direttiva 89/391/EEC, recepita oggi in Italia dal D.Lgs. 81/08 e s.m.i. Per quanto riguarda la sicurezza chimica si fa riferimento alla Direttiva sulla protezione della salute e sicurezza dei lavoratori dal rischio dovuto alla manipolazione delle sostanze chimiche (Direttiva 98/24/EEC).

Infine il Regolamento REACH (*Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*) entrato in vigore l' 1 giugno 2007 in Europa dovrebbe garantire una maggior protezione sia dei lavoratori sia dei consumatori dal rischio derivante dalle sostanze chimiche, tra cui i NM.

Quindi, anche per i NM è possibile seguire un approccio alla valutazione del rischio che riprenda quello già in uso per le sostanze che espongono i lavoratori al rischio chimico. Infatti, anche la Commissione Europea ritiene in linea di massima che l'attuale legislazione copra i possibili rischi per la salute, la sicurezza e l'ambiente connessi ai NM (Comunicazione della Commissione al Parlamento Europeo, 2008).

In particolare la "Valutazione del rischio", anche nel caso specifico, va intesa come l'insieme di tutte quelle operazioni, conoscitive ed operative, che devono essere attuate per addivenire ad una "Stima del Rischio di esposizione" ai NM per la sicurezza e la salute del personale, in relazione allo svolgimento delle lavorazioni.

La valutazione del rischio è pertanto un'operazione complessa ed iterativa che necessariamente richiede, per ogni ambiente o posto di lavoro considerato, una serie di operazioni, successive e conseguenti tra loro, che devono prevedere:

1. l'identificazione delle sorgenti di rischio di esposizione a NM presenti nel ciclo lavorativo;
2. l'individuazione dei conseguenti potenziali rischi di esposizione a NM in relazione allo svolgimento delle lavorazioni;
3. la stima dell'entità dei rischi di esposizione a NM connessi con le situazioni di interesse prevenzionistico individuate.

Tale processo di valutazione può portare, per ogni ambiente o posto di lavoro considerato, ai seguenti risultati:

- assenza di rischio di esposizione;
- presenza di esposizione controllata;
- presenza di un rischio di esposizione.

Nel primo caso non sussistono problemi connessi con lo svolgimento delle lavorazioni. Nel secondo caso la situazione deve essere mantenuta sotto controllo periodico. Nel terzo caso si dovranno attuare i necessari interventi di prevenzione e protezione secondo la scala di priorità prevista.

Al riguardo, vengono di seguito riportati gli *step* logici da seguire per l'esecuzione delle varie fasi operative di valutazione del rischio da esposizione a NM.

1. **I fase.** Identificazione delle Sorgenti di Rischio di esposizione a NM.

Tale fase viene eseguita attraverso una breve, ma accurata, descrizione del ciclo lavorativo che viene condotto nell'ambiente di lavoro preso in esame. A supporto della descrizione dell'attività lavorativa svolta, dovranno essere riportate:

- la finalità della lavorazione o dell'operazione, con la descrizione del processo tecnologico, delle macchine, impianti e apparecchiature utilizzate, delle sostanze impiegate e/o prodotte e di eventuali intermedi;
- la descrizione del ciclo tecnologico delle lavorazioni (devono essere considerate le operazioni di pulizia, manutenzione, trattamento e smaltimento rifiuti ed eventuali lavorazioni concomitanti);
- la destinazione dell'ambiente di lavoro (reparto di lavoro, laboratorio, ecc.);
- le caratteristiche strutturali dell'ambiente di lavoro (superficie, volume, porte, finestre, ecc.);
- il numero degli operatori addetti alle lavorazioni e/o operazioni svolte in quell'ambiente di lavoro;
- la presenza di movimentazione di NM all'interno dell'ambiente di lavoro.

La descrizione del ciclo lavorativo o dell'attività operativa permetterà di avere una visione d'insieme delle lavorazioni e delle operazioni svolte nell'ambiente di lavoro preso in esame e, di conseguenza, di poter eseguire un esame analitico per la ricerca della presenza di eventuali sorgenti di rischio di esposizione a NM per la sicurezza e la salute del personale. In tale fase riveste particolare importanza la partecipazione dei lavoratori ed il loro coinvolgimento nella ricerca di tutte le potenziali sorgenti di rischio eventualmente presenti nell'intero ciclo lavorativo.

Al termine della I fase dovranno essere identificate le sorgenti di rischio che nel loro impiego possono provocare, obiettivamente (valutandone l'entità, le modalità di funzionamento, ecc.) un potenziale rischio di esposizione sia esso di tipo infortunistico che igienico-ambientale, non prendendo quindi in considerazione quelle sorgenti di rischio che per loro natura o per modalità di struttura, impianto ed impiego non danno rischio di esposizione.

2. Il fase. Individuazione dei Rischi di esposizione a NM.

Questa fase costituisce una operazione, generalmente non semplice, che deve portare a definire se la presenza di sorgenti di rischio e/o di pericolo, identificate nella fase precedente, possa comportare nello svolgimento della specifica attività un reale rischio di esposizione a NM per quanto attiene la sicurezza e la salute del personale addetto. Al riguardo si dovranno esaminare:

- le modalità operative seguite nell'espletamento dell'attività (manuale, automatica, strumentale) ovvero dell'operazione (a ciclo chiuso, in modo segregato o comunque protetto);

- l'entità delle lavorazioni in funzione dei tempi impiegati e delle quantità di materiali utilizzati nell'arco della giornata lavorativa;
- l'organizzazione dell'attività (tempi di permanenza nell'ambiente di lavoro, contemporanea presenza di altre lavorazioni);
- la presenza di misure di sicurezza e/o di sistemi di prevenzione/protezione, previste per lo svolgimento delle lavorazioni.

Si sottolinea il concetto che devono essere individuati i rischi che derivano non tanto dalle intrinseche potenzialità di rischio delle sorgenti (macchine, impianti, sostanze chimiche, ecc.), quanto i potenziali rischi residui che permangono tenuto conto delle modalità operative seguite, delle caratteristiche dell'esposizione, delle protezioni e misure di sicurezza esistenti (schermatura, segregazione, protezioni intrinseche, cappe di aspirazione, ventilazione, isolamento, segnaletica di pericolo) nonché dagli ulteriori interventi di protezione.

3. III fase. Stima dei Rischi di Esposizione a NM.

Questa fase si basa su decisioni di tipo valutativo. Tali decisioni devono appoggiarsi su metodi qualitativi, per quanto possibile integrati da metodi quantitativi. I metodi quantitativi sono particolarmente appropriati quando la gravità e l'entità prevedibili del danno sono elevate. I metodi qualitativi sono utili per valutare misure di sicurezza alternative, e per determinare quale tra queste fornisca la migliore protezione. In dettaglio questa fase dovrebbe prevedere:

- una verifica del rispetto dell'applicazione delle norme di sicurezza alle macchine, impianti e apparecchiature durante il loro funzionamento;
- una verifica dell'accettabilità delle condizioni di lavoro, in relazione all'esame oggettivo della entità dei rischi e della durata delle lavorazioni, delle modalità operative svolte e di tutti i fattori che influenzano le modalità e l'entità dell'esposizione, in analogia con i dati di condizioni di esposizione similari riscontrati nello stesso settore operativo, in considerazione di consolidate esperienze. Va sottolineato che, laddove esistano situazioni lavorative omogenee sarà possibile definire un elenco orientativo "unitario" dei fattori di rischio da considerare e, quindi, procedere su tali valutazioni, ai relativi interventi integrati secondo specifiche misure di tutela connesse con le diversificazioni eventualmente riscontrabili caso per caso;
- una verifica delle condizioni di sicurezza ed igiene anche mediante acquisizione di documentazioni e certificazioni (es. schede di sicurezza dei NM);
- una misura dei parametri di rischio che porti ad una loro quantificazione oggettiva ed alla conseguente valutazione attraverso il confronto con indici di riferimento (si precisa che questa fase ad oggi è ancora di difficile sviluppo

poiché le tecniche di misura per determinarne l'esposizione specifica a NM non sono ancora completamente definite).

Al termine di questa III fase si potrà procedere alla definizione delle misure di prevenzione e protezione più idonee da implementare, descritte nel paragrafo successivo. La procedura di valutazione del rischio dovrà essere condotta nuovamente una volta individuate le misure, per verificare che si sia raggiunto un rischio residuo accettabile.

Infine, la valutazione dei rischi deve essere effettuata in modo che sia possibile documentare la procedura seguita ed i risultati ottenuti.

6.3. Possibili misure di prevenzione e protezione

In virtù del principio di precauzione è necessario ridurre al minimo l'esposizione ai NM. Questo è possibile sia riducendo la durata di esposizione e/o il numero delle persone esposte, sia la concentrazione dei NM stessi.

Il controllo dell'esposizione a NM può essere, ad oggi, compiuto usando un'ampia varietà di tecniche di controllo di ingegneria simili a quelle usate nella riduzione delle esposizioni agli aerosol generali (Ratherman S, 1996; Burton J, 1997). Inoltre, dovrebbero essere previste procedure per la corretta installazione e mantenimento in efficienza dei comandi di ingegneria (es. impianti di ventilazione) su quelle postazioni di lavoro dove è prevedibile l'esposizione ai NM.

È necessario anche prevedere un appropriato programma di informazione e formazione dei lavoratori per la manipolazione dei NM ed il corretto uso dei Dispositivi di Protezione Individuale (DPI).

Un primo strumento preventivo d'informazione è costituito dalle schede di sicurezza che accompagnano i NM e riportano le informazioni ed rischi per la sicurezza e l'ambiente connessi al loro uso e manipolazione.

Le possibili misure di prevenzione e protezione dovrebbero seguire la seguente scala di priorità (British Standards Institute, 2008):

1. Eliminazione del nanomateriale.
2. Sostituzione del nanomateriale.
3. Isolamento/confinamento o segregazione della fonte.
4. Protezione dell'ambiente (misure tecniche per captare, limitare ed espellere nanomateriale).
5. Organizzazione del lavoro.
6. Protezione personale (utilizzo di DPI come integrazione alle misure tecniche).

A seguire l'elenco delle possibili misure di prevenzione e protezione ad oggi disponibili:

a. Sostituzione:

- sostituire i preparati pulviscolari con altri che contengano nanoparticelle in matrice legata e quindi ne impediscano la diffusione (dispersioni, paste, granulati, *compound*, ecc.);
- sostituire le applicazioni a spruzzo con altre con scarsa formazione di aerosol (applicazione a pennello, immersione).

b. Segregazione della fonte:

- utilizzare apparecchiature a ciclo chiuso;
- automazione – robot.

c. Interventi di protezione dell'ambiente:

- cappe aspiranti;
- ventilazione degli ambienti di lavoro;
- aspirazioni localizzate;
- sistemi di allarme;
- corretto impiego di sistemi di produzione;
- filtrazione dell'aria di scarico (filtro HEPA in caso di ricircolo dell'aria nel locale di lavoro);
- separazione eventuale del locale di lavoro e adeguamento dell'impianto di ventilazione (leggera depressione).

d. Misure di sicurezza e organizzazione del lavoro

- ridurre al minimo la durata di esposizione;
- ridurre al minimo il numero delle persone esposte;
- limitare gli accessi all'ambiente di lavoro;
- divieto di fumare;
- operazioni lontano da fiamme, da sorgenti di calore e da scintille;
- formazione/informazione sui pericoli e sulle misure di protezione;
- etichettatura;
- schede di sicurezza;
- segnaletica di sicurezza;
- servizi di sicurezza (docce di emergenza, lava-occhi, note di intervento di primo soccorso per le sostanze adoperate).

e. Interventi di protezione personale e igiene:

- guanti;
- maschere e respiratori;
- corretto impiego delle apparecchiature e strumentazioni di laboratorio;
- propipette;
- pipettatrici automatiche;
- materiali a perdere;
- disponibilità di recipienti per deposito provvisorio dei rifiuti.

6.4 Esempi di buone pratiche

6.4.1 Stima del rischio

Si riporta di seguito un esempio di corretto approccio alla stima del rischio, basato sull'approccio di "control banding" (Giacobbe F et al, 2009).

L'esempio, valido sia nel caso di attività di ricerca in laboratorio che di produzione industriale, una volta che siano state condotte le propedeutiche fasi di identificazione delle sorgenti di rischio e dei rischi di esposizione a NM, è caratterizzato dai seguenti dieci parametri:

- A. Numerosità dei lavoratori esposti.
- B. Frequenza di esposizione.
- C. Frequenza di manipolazione diretta.
- D. Dimensioni dei NM.
- E. Comportamento dei NM (es. dispersione o agglomerazione).
- F. Efficacia dei DPI usati.
- G. Organizzazione e procedure di lavoro.
- H. Caratteristiche tossicologiche delle sostanze.
- I. Rischio di incendio ed esplosione.
- J. Idoneità degli spazi di lavoro e delle attrezzature.

I suddetti parametri sono di seguito denominati "parametri di rischio". Ogni "parametro di rischio" può assumere tre diversi valori crescenti: 1 (basso), 2 (medio) e 3 (alto). Questi vengono denominati "livello di rischio".

Per tenere conto del livello di conoscenza scientifica degli effetti dei NM può essere definito un "fattore correttivo". Tale indice presume un valore all'interno dell'intervallo compreso tra 0,5 e 2,0. In particolare assume i valori seguenti in funzione del livello della conoscenza scientifica: 0,5 – buon livello; 1,0 – sufficiente livello; 2,0 – insufficiente livello.

L'algoritmo utilizzato per la valutazione del rischio è:

$$\text{Valutazione del Rischio} = \sum_{i=1}^J (\text{Parametri di rischio})_i * (\text{Fattore correttivo})$$

L'algoritmo di valutazione può essere utilizzato in tutte le possibili condizioni di lavoro, tenendo conto delle eventuali condizioni anormali (es. malfunzionamento dell'impianto di trattamento aria) e situazioni di emergenza (es. rottura della confezione e dispersione incontrollata del prodotto).

In funzione del risultato della valutazione del rischio è possibile classificare tre diversi livelli crescenti ("basso", "medio" e "alto"). In figura 6.1 è visibile la suddivisione in tre livelli crescenti di rischio.

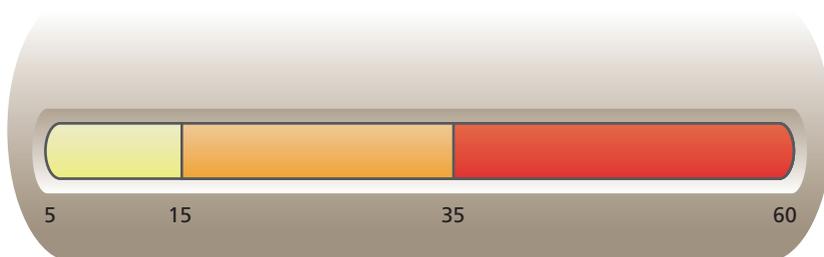


Figura 6.1 – I possibili esiti della valutazione del rischio vengono suddivisi su tre livelli: “basso” (5 ÷ 15); “medio” (16 ÷ 35); “alto” (36 ÷ 60).

Se si ottengono livelli di rischio “alto” è necessaria l’attivazione di interventi immediati per fare in modo di ridurre il livello di rischio al grado “medio”.

Per il parametro di rischio G (organizzazione e procedure di lavoro), fondamentali sono ad esempio: formazione del personale di laboratorio che deve essere informato circa i rischi associati alla manipolazione dei NM; procedure per la manutenzione e la pulizia delle attrezzature in uso; procedure per l’impiego dei DPI.

Il presente modello di valutazione è stato sperimentato presso laboratori di ricerca che stanno usando NM per la realizzazione di celle fotovoltaiche. I NM utilizzati, per le loro proprietà elettriche, sono i nanotubi di carbonio a parete singola (SWCNT) e il diossido di titanio (TiO_2).

Per la conduzione di questa attività di ricerca non sono necessari quantitativi eccessivi, nel caso specifico le confezioni contengono massimo 10 g di prodotto.

I singoli NM sono accompagnati dalle schede di sicurezza, che riportano le informazioni sul materiale ed i rischi per la sicurezza e l’ambiente connessi all’uso e la manipolazione.

La realizzazione di celle di fotovoltaiche non comporta la manipolazione diretta dei NM da parte del ricercatore (lavoratore). I NM sono dispersi inizialmente in acqua per ridurne e controllare la densità (un SWCNT ha una densità uguale ad approssimativamente 1 g/cm^3). Le nanopolveri di TiO_2 sono lavorate con solventi in modo tale da ottenere una pasta allo stato cremoso. Ogni singola fase del processo è strutturata in modo tale da evitare il contatto diretto con la pelle e/o l’eventuale respirazione delle polveri aereodisperse. I ricercatori lavorano indossando i DPI (guanti e maschere) ed eseguono le operazioni di manipolazione usando il *dry box*.

Non sono state però definite apposite e specifiche procedure per regolamentare l’accesso ai locali e per la gestione delle possibili situazioni di emergenza (es. rovesciamento di una confezione aperta con conseguente aereodispersione incontrollata del nanomateriale).

Tavola 6.1 – Criteri per associare i diversi “fattori livello di rischio” ai diversi “parametri di rischio” (A ÷ J)

	Livello rischio Parametri di rischio	Basso 1	Medio 2	Alto 3
A	la numerosità dei lavoratori esposti	1 ÷ 2 persone	3 ÷ 5 persone	> di 6 persone
B	frequenza di esposizione	< 2 ore/giorno	> 2 ore/giorno e < 6 ore/giorno	> 6 ore/giorno
C	frequenza di manipolazione diretta	> 70 nm	> 10 nm e < 70 nm	< 10 nm
D	dimensioni dei NM	alta tendenza ad agglomerarsi	media tendenza ad agglomerarsi	alta tendenza ad aereodispersione
E	comportamento dei NM (es. dispersione o agglomerazione)	< 2 ore/giorno	> 2 ore/giorno e < 4 ore/giorno	> 4 ore/giorno
F	efficacia dei DPI usati	uso dei seguenti DPI: guanti di gomma (mani), occhiali o schermi (occhi), tuta (pelle), maschera con filtro HEPA (vie respiratorie)	parziale uso dei DPI	nessun DPI utilizzato
G	organizzazione e procedure di lavoro	impiego di buone pratiche di lavoro	semplici e limitate procedure	nessuna procedura o nessuna limitazione per accedere ai locali di lavoro
H	caratteristiche tossicologiche delle sostanze	consiglio di sicurezza che concerne sostanze pericolose e preparazioni: S28 (dopo contatto con pelle, immediatamente lavi con acqua (essere specificato dal fabbricante) S38 (in caso di ventilazione insufficiente, porti attrezzatura respiratoria ed appropriata)	consiglio di sicurezza che concerne sostanze pericolose e preparazioni: S22 (non respirare la polvere) S26 (in caso di contatto con occhi, immediatamente sciacquare con molta acqua e cercare il consiglio di un medico) S36 (indossare abbigliamento protettivo ed appropriato) S37 (indossare guanti appropriati) S39 (indossare protezioni per occhi e viso)	frasi di rischio: R36 (irrita gli occhi) R37 (irrita il sistema respiratorio) R40 (effetto cancerogeno)
I	rischio di incendio ed esplosione	non considerato	Improbabile	probabile
J	idoneità degli spazi di lavoro e delle attrezzature	<i>clean room</i> ≤ di classe 100 stanza uso di cappa (se i NM sono in fase di gas o aerosol) uso di <i>dry box</i> (se i NM sono in polvere)	1000 ≤ <i>clean room</i> ≤ 10000	<i>clean room</i> con classe ≥ 100000

Nella tavola 6.2 sono riportate quattro possibili condizioni; nella tavola 6.3 sono riportate le quantificazioni relative alla valutazione del rischio.

Tavola 6.2					
Evento	Nanomateriale	Stato delle particelle	Condizione (*)	Esposizione	Attività lavorativa e/o evento
a	SWCNT	Polvere secca e sospensione liquida	N	<ul style="list-style-type: none"> inalazione epidermide 	Dispersione in acqua
b	SWCNT	Sospensione liquida	N	<ul style="list-style-type: none"> epidermide 	Deposito e fissaggio su piastra
c	TiO ₂	Polvere secca	A	<ul style="list-style-type: none"> inalazione epidermide 	Avaria del dry box o del sistema di trattamento dell'aria
d	TiO ₂	Polvere secca aereodispersa	E	<ul style="list-style-type: none"> inalazione epidermide 	Dispersione incontrollata per rovesciamento della confezione

(*) N - normale • A - anormale • E - emergenza

Tavola 6.3														
Evento	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	Σ (A÷J)	Fattore Correttivo (**)	Valutazione del rischio	Livello di Rischio (***)
a	1	2	2	3	1	1	2	3	1	1	17	2	34	medio
b	1	2	2	3	1	1	2	3	1	1	17	2	34	medio
c	1	1	2	2	1	1	2	2	1	3	16	2	32	medio
d	1	1	3	2	1	1	3	2	1	3	18	2	36	alto

(**) 0,5 – buona conoscenza scientifica • 1 - sufficiente conoscenza scientifica • 2 - insufficiente conoscenza scientifica

(***) 5 ÷ 15 – "basso" livello di rischio • 16 ÷ 35 – "medio" livello di rischio • 36 ÷ 60 – "alto" livello di rischio

6.4.2 Misure di ingegneria

Se il potenziale pericolo non può essere eliminato o la sostanza non può essere sostituita con una meno rischiosa (cosa difficile nel caso di NM con caratteristiche particolari) è necessario intervenire utilizzando appropriate misure di ingegneria. Se si è in presenza di NM non dispersi in matrice fluida, generalmente, le tecniche di controllo quale il confinamento alla fonte (cioè, isolare la fonte di generazione dal lavoratore) ed i sistemi locali di ventilazione dovrebbero essere efficaci per bloccare i NM dispersi nell'aria, purché essi siano progettati, installati e mantenuti correttamente secondo le istruzioni fornite dal fabbricante. Inoltre per quanto attiene il dimensionamento dei sistemi di ventilazione, si dovranno applicare le norme di buona tecnica basate sulla conoscenza scientifica per quanto riguarda la generazione, il trasporto ed il bloccaggio degli aerosol (ACGIH, 2001). Queste tecniche così implementate dovrebbero essere efficaci per il con-

trollo delle esposizioni nell'aria (Seinfeld JA e Pandis SN, 1998). È da tenere in considerazione che alcune tipologie di NM durante il ciclo di lavorazione possono formare agglomerati che si disperdono difficilmente nell'ambiente di lavoro. In questo caso l'esposizione e la scelta della misura di protezione dovranno riguardare la fase di prelievo del nanomateriale e di pulizia e manutenzione delle attrezzature di lavoro. Materiali come il nero di carbone (*carbon black*), l'ossido di titanio ultrafine, i nanotubi di carbonio e le nanoparticelle di ossidi metallici richiedono condizioni di contenimento totale.

6.4.3 Efficienza dei filtri per l'accumulo delle polveri

Le conoscenze attuali indicano che un sistema ben progettato di ventilazione con un filtro ad alta efficienza (HEPA) dovrebbe rimuovere efficacemente i NM (Hinds, 1999). L'uso di un filtro HEPA deve anche essere accoppiato ad una custodia del filtro ben progettata. Un filtro usato impropriamente è caratterizzato da efficienze molto meno alte di quanto progettato. Una semplice recinzione non ventilata, efficace nel controllo dell'emissione di particelle di dimensioni macro, non può essere efficace per i NM a causa della loro maggiore capacità di penetrazione.

6.4.4 Pratiche di lavoro

L'implementazione di buone pratiche di lavoro in un programma di gestione del rischio può contribuire a minimizzare l'esposizione dei lavoratori ai NM. Esempi di buone pratiche includono quanto segue:

- pulire le zone di lavoro alla fine di ogni turno lavorativo con raccolta dei filtri HEPA. Attrezzature a mandata d'aria (es. scope elettriche, macchinette ad aria compressa) non dovrebbero essere utilizzate per pulire le zone di lavoro. La pulizia e l'eliminazione dovrebbero essere condotte in un modo da impedire il contatto con il lavoratore.
- impedire l'immagazzinamento ed il consumo di alimenti o di bevande sui posti di lavoro in cui i NM sono maneggiati.
- fornire prodotti per la pulizia e il lavaggio consigliando ai lavoratori di usarli prima di lasciare il posto di lavoro.
- fornire vestiti di ricambio per impedire la contaminazione eventuale di altre zone (compresa casa propria) causate dal trasferimento dei NM sui vestiti e sulla pelle.

6.4.5 Pulizia delle superfici contaminate da NM sparsi

Attualmente non sono disponibili guide specifiche sulla pulizia e bonifica dei NM depositati nell'ambiente di lavoro; tuttavia, le raccomandazioni sviluppate nel-

l'industria farmaceutica per il trattamento e la pulizia dei residui farmaceutici potrebbero essere applicabili agli ambienti di lavoro che utilizzano NM (Wood JP, 2001).

Finché non saranno quindi disponibili maggiori informazioni, sarà bene considerare le classiche pratiche di pulizia attuali, insieme alle informazioni disponibili sui diversi rischi dovuti all'esposizione (schede di sicurezza).

Procedure standard di pulizia delle polveri e dei liquidi sparsi includono l'uso di filtri HEPA, lo spargimento di acqua sopra le polveri, l'uso di panni inumiditi per togliere la polvere e l'applicazione di materiali assorbenti per liquidi.

Quando si sviluppano procedure per la pulizia dei NM sparsi dovrebbe essere preso in considerazione il potenziale rischio dell'esposizione durante la pulizia. L'inalazione e il contatto con la pelle probabilmente rappresenteranno un rischio elevato. Bisognerà quindi prendere in considerazione l'adozione di misure di protezione per evitare l'inalazione dei NM durante le operazioni di pulizia e l'impiego di indumenti di protezione personale.

6.4.6 Indumenti di protezione personale

Allo stato attuale, non c'è nessuna guida di riferimento disponibile sulla selezione di indumenti o di altri articoli di vestiario per la protezione all'esposizione cutanea di NM (tute, guanti ed altri articoli di vestiario per la protezione). Attualmente sono state testate le efficienze di penetrazione per 8 tessuti differenti che variano dallo 0.0% a 31%, con una media del 12% (Shalev I et al, 2000). Pur essendo ancora lacunoso lo studio sulle capacità di barriera ai NM degli indumenti di protezione personale, vista la piccola mole di dati disponibili in merito, si precisa che anche se i NM possono penetrare l'epidermide, ci sono stati ad oggi pochi lavori scientifici che abbiano dimostrato gli effetti dannosi per la salute dovuti alla loro penetrazione.

Recenti studi sull'argomento hanno evidenziato che l'84% dei datori di lavoro, prendendo a riferimento le convenzionali pratiche di igiene del lavoro, raccomanda ai lavoratori esposti l'utilizzo di indumenti di protezione (ICON, 2006). Questa pratica è particolarmente raccomandata nei laboratori di ricerca (US DOE, 2007) e da guide normative (ASTM, 2007).

Tuttavia, anche per le polveri di dimensioni macro, è riconosciuto che l'indumento protettivo della pelle ha efficacia molto limitata nel ridurre o controllare l'esposizione cutanea (Schneider T et al, 1999).

Comunque alcuni indumenti di protezione già comprendono un test di penetrazione a particelle di dimensione nanometrica e quindi forniscono una certa indicazione dell'efficacia di protezione riguardo ai NM. Questo è il caso ad esempio dello standard

ASTM F1671-03, specifico per test di penetrazione degli agenti patogeni del sangue (batteriofago da 27 nm) (ASTM, 2003).

6.4.7 Respiratori

I respiratori possono essere necessari quando l'esposizione del lavoratore ad un agente inquinante disperso nell'aria è superiore ad un certo limite a causa della bassa efficacia delle misure di protezione tecniche e organizzative. Attualmente, i limiti specifici di esposizione a NM non sono stati determinati, anche se le dosi massime ammissibili per l'esposizione lavorativa (per esempio OSHA PELs - *Permissible Exposure Limits*; NIOSH RELs - *Recommended Exposure Limits*; ACGIH TLVs - *Threshold Limit Values*) sono già definite per la maggior parte delle particelle di composizione chimica simile. È da precisare però che la letteratura scientifica in materia evidenzia la maggiore pericolosità per la salute dei NM inalati rispetto a particelle di dimensione maggiore vista la loro maggiore reattività biologica.

La decisione di utilizzare respiratori durante il lavoro deve essere presa a seguito dei risultati della valutazione del rischio e della successiva fase d'implementazione delle misure di prevenzione e protezione. Quindi l'utilizzo di respiratori è consigliata nel caso in cui, a valle degli interventi di mitigazione del rischio, si ritenga ancora elevata l'esposizione del lavoratore.

Ad oggi esistono varie guide alla scelta corretta del respiratore da utilizzare (NIOSH, 2004).

Un respiratore comunque non deve ostacolare il lavoratore nelle proprie mansioni e non deve creare situazioni di pericolo di esposizione. Di conseguenza la scelta di utilizzare dei respiratori negli ambienti di lavoro dovrebbe essere comunque presa considerando:

1. Se il lavoratore riesce a svolgere il proprio compito indossando il respiratore.
2. Una formazione adeguata all'uso del respiratore da parte del lavoratore.
3. Un monitoraggio periodico dell'ambiente di lavoro.
4. Un test di prova periodici del respiratore.
5. Un programma di controllo, pulizia e manutenzione del respiratore.

Bibliografia

- ACGIH. Industrial ventilation: a manual of recommended practice. Cincinnati, OH: American Conference of Governmental Industrial Hygienists. 2001.
- ASTM Committee E2535–07. Standard guide for handling unbound engineered nanoscale particles in occupational settings. West Conshohocken, PA: ASTM International. 2007.
- ASTM Subcommittee F23.40. Standard test method for resistance of materials used in protective clothing to penetration by blood-borne pathogens using Phi-X174 bacteriophage penetration as a test system. West Conshohocken, PA: American Society for Testing and Materials, ASTM F1671–03. 2003.
- British Standards Institute. Nanotechnologies, Part 2: Guide to safe handling and disposal of manufactured nanomaterials. 2008.
- Burton J. General methods for the control of airborne hazards. In: DiNardi SR, ed. The occupational environment—its evaluation and control. Fairfax, VA: American Industrial Hygiene Association. 1998
- Commissione Europea. Towards European strategy for nanotechnologies, Brussels, 2004:17.
- Comunicazione della Commissione Europea sul principio di precauzione. COM(2000) 1 del 2.2.2000.
- Comunicazione della Commissione Europea al Parlamento Europeo, al Consiglio e al Comitato economico e sociale Europeo. Aspetti normativi in tema di nanomateriali. [SEC(2008) 2036].
- Comunicazione della Commissione Europea. Nanoscienze e nanotecnologie: un piano d'azione per l'Europa 2005-2009. Prima relazione sull'attuazione, 2005-2007, 6 Settembre 2007.
- Comunicazione della Commissione Europea. Nanoscienze e nanotecnologie: un piano d'azione per l'Europa 2005-2009, Bruxelles, 7.6.2005; Parlamento Europeo (PE), Risoluzione del PE su nanoscienze e nanotecnologie: un piano d'azione per l'Europa 2005-2009, 28.9.2006.
- Giacobbe F, Monica L e Geraci D. Risk assessment model of occupational exposure to nanomaterials. Hum Exp Toxicol. 2009;28: 401–6.
- Hinds. Aerosol Technology: Properties, behaviour, and measurement of airborne particles 2nded. New York, NY: Wiley-Interscience. 1999.
- International Council on Nanotechnology (ICON). A survey of current practices in the nanotechnology workplace. 2006.
- NIOSH respirator selection logic. Cincinnati, OH: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Institute for Occupational Safety and Health, DHHS (NIOSH) Publication 2004;2005:100.
- Parere del Comitato economico e sociale europeo in merito alla Comunicazione della Commissione al Parlamento europeo, al Consiglio e al Comitato economico e sociale europeo — Aspetti normativi in tema di nanomateriali. COM(2008) 366 def. [(2009/C 218/04).
- Raccomandazione della Commissione Europea del 7 febbraio 2008 sul codice di condotta per una ricerca responsabile nel settore delle nanoscienze e delle nanotecnologie - notificata con il numero C(2008) 424.
- Ratherman S. Methods of control. In: Plog B, ed. Fundamentals of industrial hygiene. Itasca, IL: National Safety Council. 1996.
- Satterstorm, FK et al. Consideration for implementation of manufactured nanomaterial policy and governance. Nanomaterials Risks and Benefits, NATO, Series C, Springer. 2008. P 334.
- Schneider T et al. Conceptual model for assessment of dermal exposure. J Occup Environ Med. 1999;56:765–73.
- Seinfeld JA e Pandis SN. Atmospheric chemistry and physics. New York: John Wiley and Sons. 1998.
- Shalev I et al. Protective textile particulate penetration screening. Performance of protective clothing: 7th Symposium, ASTM STP 1386, West Conshohocken, PA: - American Society for Testing and Materials, ASTM. 2000. P 155–61.
- US DOE. Approach to Nanomaterial ES&H, U.S. Department of Energy's Nanoscale Science Research Centers. Washington, DC: U.S. Department of Energy. 2007.
- Wood JP. Containment in the pharmaceutical industry. New York: Marcel Dekker, Inc. 2001.

capitolo 7

Prospettive di policy e strategie di comunicazione

Enrico Bergamaschi, *Università di Parma*

Pier Alberto Bertazzi (coordinatore), *Clinica del Lavoro di Milano*

Giuseppe Bonifaci, *INAIL, Sovrintendenza Medica Generale*

Giuseppe Castellet y Ballarà, *INAIL, CONTARP*

Flaminio Galli, *INAIL, Direzione Centrale Prevenzione*

Angela Goggiamani, *INAIL, Sovrintendenza Medica Generale*

Elvio Mantovani, *AIRI-Nanotec IT*

Marco Mirabile, *INAIL, Dipartimento di Medicina del Lavoro - ex ISPESL*

Andrea Porcari, *AIRI-Nanotec IT*

7.1 La regolamentazione nello sviluppo delle nanotecnologie

7.1.1 Introduzione

La rilevanza strategica delle nanotecnologie è oramai ampiamente riconosciuta e l'impegno in questo campo è negli ultimi anni costantemente aumentato, coinvolgendo sia i paesi più industrializzati sia quelli emergenti. Le aspettative circa i benefici derivanti dall'uso di queste tecnologie sono molto grandi, ma è anche largamente condivisa l'opinione che questi benefici potranno realizzarsi appieno soltanto se il loro sviluppo avverrà in maniera responsabile, riducendo al minimo gli eventuali rischi ad essi associati.

Le preoccupazioni riguardano sia gli effetti su salute, sicurezza ed ambiente (EHS-*Environment, Health and Safety*), sia le implicazioni etiche, legali e sociali (ELSI-*Ethical, Legal, Social Issues*) che le nanotecnologie e le loro applicazioni (N&N¹) potrebbero avere. Il livello di attenzione nei confronti di queste problematiche è in costante aumento anche perché cresce costantemente il numero di prodotti derivanti dalle nanotecnologie che raggiungono il mercato. A livello della Commissione Europea, dei governi nazionali e delle agenzie e strutture preposte a stabilire legislazioni e normative, la definizione di un sistema di regolamenti che ne assicuri uno sviluppo sicuro e responsabile è ormai considerata una esigenza prioritaria. Attualmente l'attenzione riguarda essenzialmente i cosiddetti nanomateriali ingegnerizzati ("*Engineered NanoMaterials*" – ENM), cioè nanomateriali prodotti intenzionalmente, nella loro forma

¹ Con N&N ci si riferisce in questo documento a nanoscienze e nanotecnologie nel senso più ampio del termine, comprendendo nanomateriali e prodotti derivati/realizzati usando le nanotecnologie.

libera (“free engineered nanomaterials”) e gli effetti che essi possono avere sulla salute dell’uomo e sull’ambiente (EHS)².

I risvolti etico sociali (ELSI), ancorché importanti, sono al momento considerati meno pressanti. Tuttavia, nel medio-lungo periodo, quando si prevede che le applicazioni più rivoluzionarie delle nanotecnologie diventino realtà, tali problematiche potranno assumere grande rilevanza e sarà perciò indispensabile una adeguata attenzione per affrontarle con efficacia.

Ad oggi le N&N sono, nella maggior parte dei casi, regolamentate secondo le norme e legislazioni correnti. L’adeguatezza di tale approccio è fonte di un intenso dibattito a livello istituzionale e tra i diversi portatori di interesse, a causa di numerosi fattori:

- grande varietà di materiali e applicazioni;
- comportamento e caratteristiche uniche dei nanomateriali alla nanoscala;
- carenza di dati di caratterizzazione sui nanomateriali;
- mancanza di normative tecniche per nomenclatura, metrologia e materiali;
- natura proprietaria delle informazioni;
- multidisciplinarietà, difficoltà di comunicazione tra discipline diverse.

Diversi sono gli strumenti individuati per superare queste difficoltà, tra loro strettamente interconnessi e che coinvolgono tutti i portatori di interesse delle N&N. Tali strumenti sono:

- **Sviluppo della conoscenza.**

Vi è un crescente impegno in diverse nazioni per la ricerca circa i rischi per l’uomo e l’ambiente (EHS) e, a livello minore, riguardo alle implicazioni sociali (ELSI) legate alle nanotecnologie (su questo tema ulteriori dettagli sono stati dati nel Capitolo 3).

- **Legislazione (“hard regulation”).**

Autorità ed istituzioni a livello nazionale ed internazionale, in particolare in Europa, ma anche negli Stati Uniti ed in paesi come Australia o Canada, hanno iniziato a promuovere studi dedicati, creare gruppi di lavoro e sviluppare capacità tecniche per accertare l’applicabilità della legislazione vigente ai nanomateriali.

- **Misure volontarie (“self regulation”).**

Istituzioni governative, industrie ed altri portatori di interesse, al fine di supportare e agevolare l’applicazione della regolamentazione vigente in un’ottica di minimizzazione del rischio, hanno sviluppato diversi tipi di misure volontarie, quali codici di condotta (CoC), buone pratiche e metodi per la gestione del rischio, indagini sui nanomateriali (*reporting schemes/stewardship programs*).

² Nanoparticelle e nanomateriali prodotti da processi naturali vengono generalmente trattati nell’ambito delle analisi delle particelle ultrafini, materia allo studio da diversi anni. I nanomateriali ingegnerizzati non in forma libera, quindi inclusi all’interno, o facenti parte, di materiali di dimensione macroscopica, non hanno generalmente la possibilità di interagire in maniera diretta con i sistemi biologici, almeno durante il loro utilizzo, e per questo sollevano minori preoccupazioni.

- **Standard (norme tecniche) e cooperazione internazionale.**

Le principali organizzazioni di standardizzazione a livello internazionale/regionale/nazionale hanno avviato iniziative specifiche relative alle N&N. Alcune istituzioni sovra-nazionali (in particolare l'OCSE) promuovono con attività specifiche l'armonizzazione, la condivisione delle conoscenze ed il coordinamento a livello internazionale sui temi della sicurezza e regolamentazione delle N&N.

La mancanza di standard e metodi specifici per la misura, la caratterizzazione dei nanomateriali e la valutazione del rischio e dei livelli di esposizione associati al loro utilizzo, sono certamente il principale fattore di incertezza dal punto di vista regolamentatorio. Tali lacune rendono (in alcuni casi) difficili l'implementazione e il miglioramento della regolamentazione esistente e nello stesso tempo ostacolano l'eventuale definizione di nuovi meccanismi di regolamentazione/controllo. Notevole è l'impegno profuso in questo ambito negli ultimi anni, ma la complessità e multidisciplinarietà di queste tecnologie non possono che richiedere tempi lunghi per sviluppare metodologie universalmente accettate e condivise.

Il primo obiettivo, ad oggi, è la definizione di alcuni elementi di riferimento per la valutazione del rischio dei ENM ("*building blocks for risk assessment*") che forniscano una classificazione in termini di tipologia di nanomateriali, proprietà e parametri rilevanti per la loro caratterizzazione, rischio potenziale in relazione (almeno) ai ENM maggiormente usati (o per i quali si valutano livelli di esposizione potenzialmente non trascurabili).

Un panorama sintetico della situazione riguardo alla regolamentazione, alle misure volontarie, alle norme tecniche ed alla cooperazione internazionale è riportato nei paragrafi seguenti.

7.1.2 Legislazione ("*hard regulation*")

Come appena anticipato, la maggior parte delle nazioni impegnate nelle N&N ha avviato studi ed analisi volti a verificare la applicabilità della legislazione vigente a queste tecnologie. Tali analisi hanno permesso di identificare alcune priorità ed azioni da intraprendere per migliorarne l'efficacia e nella maggior parte dei casi hanno rimarcato l'importanza di accrescere l'impegno dedicato alla ricerca relativa agli aspetti EHS e superare gli attuali limiti scientifici nella conoscenza e caratterizzazione delle N&N.

In alcuni casi questo ha portato ad introdurre misure specifiche per la loro regolamentazione, in genere sotto forma di emendamenti o modifica di specifiche tecniche della legislazione esistente.

È utile sottolineare che tale attività è molto complessa e richiede tempi relativamente lunghi, se si considera che, data la multidisciplinarietà delle nanotecnologie, le legi-

slazioni/direttive interessate dalle diverse applicazioni delle N&N, nelle diverse fasi del ciclo di vita dei prodotti, sono in numero molto elevato (è stato valutato siano più di 90 le *community legislative, regulatory instruments* con una rilevanza per le N&N) (European Economic and Social Committee, 2008).

In Europa diversi comitati tecnici ed agenzie della Commissione Europea (CE) sono impegnati in questo campo. I risultati delle varie iniziative sono stati raccolti nel rapporto "*Regulatory Aspects of Nanomaterials*" (Commissione Europea, 2008a), pubblicato a giugno 2008.

La principale conclusione del documento è che le regolamentazioni attuali sono applicabili alle N&N, ma che è necessario migliorare gli strumenti di supporto alla regolamentazioni (quali specifiche tecniche, linee guida, ecc.) al fine di garantire la loro effettiva implementazione e applicabilità.

In seguito ad un rapporto pubblicato dal "Commissione per l'ambiente, la sanità pubblica e la sicurezza alimentare", il Parlamento Europeo (Aprile 2009) (Schlyter C, 2009) ha approvato una risoluzione in parziale contrasto con questa posizione.

Il documento (non vincolante) richiede alla CE una revisione della regolamentazione esistente (entro il 2011) che garantisca l'applicazione del principio della "*commercializzazione solo previa disponibilità dei dati*" ("*no data, no market*"). È ancora presto per comprendere appieno quali modifiche seguiranno a questa risoluzione, anche considerato che in alcuni casi tale principio è sostanzialmente già incluso nella legislazione esistente. Tra le azioni richieste vi sono, ad esempio, la revisione degli attuali metodi di registrazione ed identificazione delle sostanze per alcune legislazioni (tra cui REACH ed alcune direttive su ambiente e sicurezza dei lavoratori) e la compilazione, sempre entro il giugno 2011, di un inventario dei diversi tipi e impieghi dei nanomateriali sul mercato europeo.

È quindi immaginabile una intensificazione delle iniziative di monitoraggio sull'uso degli ENM (descritte in dettaglio in seguito), inclusa l'attivazione di misure a carattere obbligatorio.

Anche se dal punto di vista della regolamentazione gli stati membri tendono in generale a seguire le indicazioni dalla CE, alcuni paesi hanno attivato iniziative specifiche in questo ambito.

Nazioni quali **Francia, Germania, Olanda, Inghilterra, Austria**, alcune **regioni scandinave**, la **Svizzera**, hanno un preciso impegno a livello istituzionale per approfondire gli aspetti EHS e assicurare una attenzione specifica alle N&N da parte delle agenzie di regolamentazione e degli organi di controllo relativi ai diversi settori applicativi di queste tecnologie. A livello internazionale, **Stati Uniti, Canada e Australia** sono tra i paesi più impegnati in questo ambito. In queste nazioni, EHS e regolamentazione sono inclusi in maniera chiara all'interno della strategie e politiche

di sviluppo per le nanotecnologie a livello nazionale e vi è un approccio proattivo (inclusa la creazione di specifici gruppi di lavoro) da parte dei diversi organi istituzionali interessati.

Canada ed **Australia** sono i due paesi che hanno esplicitamente dichiarato l'esigenza di adottare un approccio precauzionale (sia pure in modo non totalmente restrittivo) nella produzione ed uso dei nanomateriali. È importante notare che il principio di precauzione è parte integrante anche della regolamentazione europea REACH sulle sostanze chimiche, anche se la sua effettiva implementazione è ampiamente dibattuta. Al momento, l'attenzione si concentra in primo luogo sulle regolamentazioni relative ai seguenti settori applicativi delle nanotecnologie:

- Chimica e Materiali;
- Cosmetica;
- Cibo;
- Salute e Sicurezza dei Lavoratori;
- Sicurezza Ambientale;
- Strumentazione Medica e Farmaceutica.

Per alcuni settori, come ad esempio quello farmaceutico e medico, la legislazione esistente viene ritenuta sufficientemente adeguata, mentre per altri, in particolare quelli dei cosmetici e alimenti, la situazione è ritenuta meno soddisfacente.

Le **regolamentazioni delle sostanze chimiche e dei materiali** sono al momento quelle che hanno ricevuto la maggiore attenzione in relazione all'uso delle N&N. Diverse agenzie (in particolare in Europa, Stati Uniti, Canada e Australia) hanno inserito all'interno delle specifiche tecniche di supporto alla legislazione esistente indicazioni relative ai nanomateriali, con il principale obiettivo di assicurare il controllo dell'inserimento nel mercato di queste sostanze.

Proprio la legislazione REACH (*"Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals"*), che regola in Europa la produzione, l'uso e la commercializzazione di sostanze chimiche, è considerata attualmente una delle legislazioni più adeguate e stringenti in relazione ai nanomateriali, anche se diverse questioni rimangono aperte, quali per esempio l'uso di livelli di soglia basati sulla massa e l'esenzione di alcune categorie di materiali (che implica l'esenzione anche della medesima sostanza in forma nano) (Commissione Europea, 2008b).

In particolare, sono già state introdotte misure specifiche per i nanomateriali. Al fine (anche) di controllare in maniera appropriata l'uso dei nanotubi di carbonio, per esempio, i materiali a base di carbone e grafite sono stati rimossi dagli elenchi di sostanze esenti dall'obbligo di registrazione in REACH³.

Inoltre, nel marzo 2008, la *European Chemicals Agency* (ECHA) ha costituito un gruppo

³ <http://chemicalwatch.com/788>

di lavoro specifico dedicato allo studio ed al miglioramento dell'applicazione del REACH ai nanomateriali (*Competent Authorities Sub Group on Nanomaterials - CASG Nano*⁴). Negli Stati Uniti, i nanomateriali sono regolamentati mediante uno dei principali strumenti legislativi della *Environmental Protection Agency* (EPA), il *Toxic Substances Control Act* (TSCA). Tale statuto è l'equivalente del REACH in Europa (EPA, 2007; EPA, 2008), ma è opportuno sottolineare che vi sono differenze sostanziali tra i due strumenti. In Europa (REACH) spetta al produttore l'onere di dimostrare che una sostanza chimica è sicura, prima che essa venga introdotta sul mercato, mentre negli Stati Uniti (EPA-TSCA) è responsabilità del regolamentatore dimostrare che una sostanza chimica è dannosa, prima di poterne limitare l'utilizzo o rimuoverla dal mercato. La ricerca di un approccio comune, o comunque di chiari accordi in materia, è importante per evitare la creazione di ostacoli e incomprensioni relative alla commercializzazione dei nanomateriali (l'argomento in realtà è valido, e fonte di dibattito, anche per le sostanze chimiche in generale)⁵.

I limiti riscontrati nella attuale regolamentazione relativa ai **cosmetici** ed agli **alimenti** hanno recentemente indotto ad introdurre delle modifiche nelle direttive Europee relative a questi settori^{6,7}. In ambedue i casi, infatti, nella legislazione sono state introdotte una definizione di nanomateriali ingegnerizzati (insolubili) e richieste specifiche relative alle procedure di valutazione del rischio per tutti i prodotti contenenti questo tipo di nanomateriali.

Riguardo agli aspetti di **sicurezza in ambito lavorativo**, l'impegno è stato diretto principalmente alla valutazione ed adattamento delle attuali procedure di gestione del rischio, ed allo sviluppo di appropriate linee guida per la manipolazione e lo smaltimento di ENM. Tra le istituzioni che hanno pubblicato rilevanti contributi su questo tema si possono citare (NIOSH, 2009a; BAuA, 2007; FIOH, 2008; Ostiguy C et al, 2009; AFFSET, 2008):

- *National Institute for Occupational Safety and Health* (NIOSH), Stati Uniti;
- *Federal Institute for Occupational Health and Safety* (BAuA), Germania;
- *Federal Office of Public Health* (FOPH), Svizzera;
- *Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail* (IRSST), Canada;
- *Agence Française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail* (AFFSET), Francia.

⁴ <http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/index.htm>

⁵ Lo sviluppo di una regolamentazione coerente e condivisa a livello europeo e statunitense è stata oggetto di un recente progetto congiunto UE/USA, del quale è ora disponibile il rapporto conclusivo (Breggin L et al, 2009).

⁶ http://www.europarl.europa.eu/news/expert/infopress_page/067-52498-082-03-13-911-20090324IPR52497-23-03-2009-2009-false/default_en.htm e <http://www.euractiv.com/en/science/meps-back-tougher-rules-nanotechnology/article-181695>

⁷ http://www.europarl.europa.eu/news/expert/infopress_page/066-52333-082-03-13-911-20090323IPR52331-23-03-2009-2009-true/default_en.htm

Recentemente un primo studio di analisi della problematica è stato reso pubblico anche dalla *European Agency for Safety and Health at Work* (EU-OSHA, 2008).

È evidente come la mancanza di adeguati strumenti di misura e monitoraggio degli ENM e di informazioni dettagliate sul rischio e sui livelli di esposizione renda complesso fornire indicazioni esaustive in questo ambito.

Come anticipato, le regolamentazioni relative ai **dispositivi medici** ed ai **prodotti farmaceutici** vengono generalmente considerate adeguate anche nel caso in cui essi utilizzino nanotecnologie, in quanto si ritiene che le approfondite procedure di autorizzazione previste in questo campo assicurino un controllo sufficiente. Tuttavia, molte delle analisi tecniche pubblicate suggeriscono comunque di utilizzare un approccio “*caso per caso*” nella valutazione delle procedure di autorizzazione di tali prodotti, al fine di tenere conto delle caratteristiche peculiari associate ai nanomateriali.

Un punto particolarmente critico, comune a diverse legislazioni nazionali, riguarda la classificazione di alcuni dei dispositivi medici realizzati con le nanotecnologie, che combinano funzioni e caratteristiche di dispositivi medici, farmaci e biomateriali. In tali casi si riscontra una sovrapposizione legislativa che può rendere difficile decidere a quale tipo di regolamentazione debba essere soggetto il dispositivo considerato.

In conclusione, come emerge dai dati appena riportati, la situazione relativa al controllo e regolamentazione delle N&N lungo il loro ciclo di vita è ancora sostanzialmente indefinita ed è utile fornire un ulteriore dettaglio in relazione alle difficoltà principali emerse a riguardo. Su di esse si dovrebbero infatti focalizzare le azioni volte a migliorare la situazione esistente. In particolare:

La mancanza di **metodologie e strumenti validati e standardizzati per la misura, il monitoraggio e la valutazione della potenziale (eco) tossicità dei ENM** rende difficile sia determinare gli effettivi livelli di esposizione sia definire eventuali livelli di soglia, quali per esempio NOEL (no observed effects levels) e OEL (occupational exposure limits). Questo ostacola la definizione di opportune specifiche tecniche a livello legislativo.

Nella gran parte delle legislazioni che ne fanno uso, i **livelli di soglia sono espressi in termini di massa (o concentrazione)**, parametro considerato da diversi studi inadeguato per una corretta identificazione e valutazione degli ENM. Tale problematica ostacola in particolare la registrazione, il controllo e l'attivazione di specifiche procedure in relazione al materiale o prodotto regolamentato.

La definizione di una sostanza o prodotto data da una specifica regolamentazione può non essere sufficientemente dettagliata per **distinguere in maniera efficace il nanomateriale dallo stesso materiale in forma macroscopica**. Il ENM risulta quindi soggetto alle medesime specifiche del macromateriale (nonostante le differenti caratteristiche e proprietà). Questo può, in particolare, influenzare la capacità di valutare e controllare l'introduzione e l'utilizzo di ENM sul mercato.

7.1.3 Misure volontarie (“Self-regulation”)

La mancanza di regolamentazione specifica e la necessità di gestire le attuali lacune di conoscenza hanno portato allo sviluppo di misure volontarie, che forniscano riferimenti, principi e linee guida e contribuiscano a stabilire un certo livello di fiducia e confidenza tra i diversi portatori di interesse. Si possono distinguere tre diversi livelli di intervento per i quali sono indicati anche alcuni esempi di riferimento (Mantovani E et al, 2009):

- **Sistemi di monitoraggio / banche dati (crescita della conoscenza)**
 - Nanoscale Materials Stewardship Program (NMSP)- EPA, USA (primo periodo: 2007-2010, secondo periodo: in corso)
 - Voluntary Stewardship Programs (VRS) – DEFRA, UK (2006-2008)
- **Codici di Condotta (crescita del livello di fiducia)**
 - CoC sulla ricerca responsabile della Commissione Europea (febbraio 2008, in revisione ogni 2 anni)
 - CoC di imprese e di associazioni di imprese: BASF Europa, IG-DHS - Associazione “retailers”, Svizzera (2007-2008)
- **Sistemi di Gestione del Rischio (crescita del livello di sicurezza)**
 - NanoRisk Framework - DuPont, Environmental Defense, USA, BUHLER, Svizzera (2007-2009)
 - CENARIOS - TUV SUD, Innovation Society, Svizzera (2008)
 - Responsible Production and Use of Nanomaterials - German Chemical Industry Association-VCI, Germania (2008)

I **sistemi di monitoraggio dei ENM**, avviati in diversi Paesi e rivolti ad industrie ed altri soggetti che utilizzano, producono, processano o importano tali materiali, hanno l’obiettivo di accrescere il livello di conoscenza dei regolamentatori circa l’entità e la diffusione dell’uso dei nanomateriali e sulle tipologie e le modalità di produzione del loro utilizzo, in particolare a livello industriale, in modo da facilitare la messa a punto di un qualsiasi tipo di azione regolamentatoria che assicuri uno sviluppo responsabile delle nanotecnologie.

Tali indagini sono state avviate principalmente in relazione alle legislazioni relative a materiali e sostanze chimiche, richiedendo dati ed informazioni sulle specifiche e caratteristiche dei materiali usati, i volumi di produzione, la valutazione e gestione del rischio, ecc. Avviate a partire dal 2007, ad oggi (2009) hanno visto una scarsa partecipazione che ne ha ridotto l’utilità tanto che in alcuni paesi (in particolare Canada e Francia) si sta valutando l’opportunità di rendere obbligatoria la partecipazione a tali indagini.

I **Codici di Condotta**, invece, hanno l’obiettivo di definire valori, principi e linee guida che possano favorire uno sviluppo sicuro e responsabile del nanotecnologie. Il loro scopo principale è fornire un riferimento comune e accrescere il livello di fiducia e confidenza tra i diversi portatori di interesse delle N&N. Pur non avendo valore le-

gislativo, se sottoscritti possono diventare documenti di supporto (in quanto affermazioni di responsabilità) in sede di confronto legale tra più parti.

Il Codice di Condotta Europeo (febbraio 2008) (Commissione Europea, 2008c) è basato su sette principi guida, tra i quali *precaution, inclusiveness and sustainability* e fornisce una serie di linee guida ed azioni da intraprendere, priorità, restrizioni e limitazioni, necessarie per favorire, appunto, uno sviluppo responsabile delle N&N. La CE ha esplicitamente richiesto a tutti gli stati membri di adottare a livello nazionale il CoC e di riportare alla Commissione (ogni due anni) lo stato di implementazione del Codice ed ogni eventuale proposta di aggiornamento/modifica.

I **Sistemi di Gestione del Rischio** (*Risk management systems*), accreditamento o certificazione, infine, sono generalmente sviluppati a livello industriale, al fine di accrescere il livello di sicurezza nella gestione, manipolazione e utilizzo dei ENM.

Tali sistemi forniscono linee guida e buone pratiche per la gestione del rischio in ambito lavorativo e, più in generale, riguardo agli aspetti di salute, sicurezza dell'uomo e protezione dell'ambiente. Non hanno valore legislativo, ma in alcuni casi possono agire in maniera simile ai sistemi di certificazione di qualità (anche se con valore minore, a causa della mancanza di standard universalmente accettati e riconosciuti).

Di particolare interesse per la sicurezza in ambito lavorativo sono i risultati di alcuni studi pubblicati in Germania e Svizzera.

In Germania, infatti, a seguito di una attenta indagine svolta presso l'industria chimica tedesca, l'associazione VCI (che rappresenta il 90% della industria chimica tedesca) ed il "*German Federal Institute for Occupational Safety and Health*" hanno pubblicato i due documenti "*Guidance for Handling and Use of Nanomaterials at the Workplace*" (BAuA, 2007) e nel marzo 2008 il rapporto più generale "*Responsible Production and Use of Nanomaterials*" (VCI, 2008), i quali fanno il punto sull'argomento.

In Svizzera, analogamente, una recente iniziativa, che ha coinvolto istituzioni, imprese e centri di ricerca, ha condotto alla pubblicazione, nel 2009, di una prima versione della "*Precautionary Matrix for Synthetic Nanomaterials*" (Schweizerische Eidgenossenschaft, 2008), uno schema molto pratico ed interessante per effettuare una prima valutazione di rischi dei ENM utilizzati a livello industriale (il documento è disponibile anche in versione italiana).

In questa fase di incertezza riguardo alla regolamentazione delle N&N le misure volontarie possono avere un ruolo significativo. Tuttavia, soprattutto quando si tratta di iniziative promosse a livello istituzionale, uno degli aspetti critici è proprio il loro carattere volontario che sovente è accompagnato da una scarsa partecipazione che ne limita quindi l'efficacia. Nel caso dei sistemi di monitoraggio promossi dalle varie agenzie di controllo, oltre alla possibilità di renderli obbligatori, si stanno anche valutando strumenti di incentivazione o disincentivazione che ne stimolino l'adozione.

7.1.4 Normative tecniche (standard) ed impegno internazionale

È già stato detto più volte che la disponibilità di normative tecniche adeguate per definire, descrivere, specificare, misurare, caratterizzare i nanomateriali ed i nano-prodotti è fondamentale al fine di garantire l'effettiva implementazione di una regolamentazione delle nanotecnologie.

L'istituzione di riferimento a livello internazionale per lo sviluppo di norme tecniche è l'International Standards Organisation (ISO) che ha istituito il Comitato Tecnico (TC) "ISO TC 229: Nanotechnologies" in collegamento con il corrispondente TC dell'International Electrotechnical Commission, "IEC TC 113 - Nanotechnology for electrical and electronic products and systems".

Fanno riferimento a questi due Comitati Tecnici le attività degli enti normativi nazionali di più di 32 paesi, nella gran parte dei quali sono stati creati TC specifici per le N&N. Tra gli enti nazionali più attivi nel settore, sono da ricordare il BSI/NT1 nel Regno Unito, SAC/TC279 in Cina, ANSI-NSP negli Stati Uniti.

Numerosi sono inoltre gli accordi di collaborazione ufficiali ("liasons") stabiliti con altri Comitati Tecnici ISO, aventi attività affini al settore delle N&N. A titolo di esempio si possono citare: ISO TC 201 (*surface and chemical analysis*), ISO TC 202 (*micro-beam analysis*), ISO TC 94 (*personal safety, protective clothing and equipments*), ISO TC 213 (*biological evaluation of medical devices*)⁸.

In Europa CEN, CENELEC ed ESTI, hanno ricevuto uno specifico mandato dalla CE riguardo alle N&N (Commissione Europea, 2007a). In particolare, il Comitato CEN TC 352, in accordo con ISO TC 229, ha in carico lo sviluppo di diversi documenti normativi dedicati a questo settore.

A livello internazionale sono, infine, particolarmente attive nel settore alcune *Standard Developing Organisations*, quali per esempio ASTM (con il TC ASTM E56) ed IEEE (*International Electrical and Electronics Engineers*).

L'attività di ISO TC 229 è organizzata attorno a 4 gruppi di lavoro dedicati ad alcuni temi fondamentali per lo sviluppo di una effettiva regolamentazione per le N&N. In particolare (ISO, 2007):

- J-WG1: Terminology and nomenclature (terminologia e nomenclatura)
- J-WG2: Measurement and characterization (misure e caratterizzazione)
- WG3: Health, safety and environmental aspects of nanotechnologies (salute, sicurezza e aspetti ambientali della nanotecnologie)
- WG4: Material specifications (specifiche dei materiali)

I primi due gruppi di lavoro sono congiunti ISO TC 229 – IEC TC 113 (da qui la sigla

⁸ Per una lista completa delle liasons attivate da ISO TC 229 si veda http://www.iso.org/iso/standards_development/technical_committees/list_of_iso_technical_committees/iso_technical_committee.htm?commid=381983

“Joint”). È opportuno sottolineare che nell’ambito IEC TC 113 vi è inoltre un terzo gruppo di lavoro (non legato alle attività ISO) dedicato alle prestazioni dei nanomateriali per componenti e sistemi elettrici. Ad ISO TC 229 si riferisce il Comitato Tecnico costituito in ambito UNI (Ente Nazionale Italiano di Unificazione) che ha obiettivi analoghi, mentre in ambito CEI (Comitato Elettrotecnico Italiano) è attivo il comitato CT CEI 113 omologo di quello IEC.

L’attività è intensa ed ha portato già ad alcuni risultati concreti. Nel 2008 sono stati infatti prodotti due documenti:

- ISO/TS 27687: Terminology and definitions for nano-objects - Nanoparticle, nanofibre and nanoplat. (*specifica tecnica che fornisce una lista di termini e definizioni riguardanti le nanoparticelle*);
- ISO/TR 12885: Health and safety practices in occupational settings relevant to nanotechnologies. (*rapporto tecnico che ha lo scopo di aiutare a prevenire conseguenze avverse per la salute e per la sicurezza dell’uomo durante la produzione, la manipolazione, l’uso e lo smaltimento di particelle nanofabbricate*)

Sono attualmente più di 30 i documenti normativi, legati ai gruppi di lavoro indicati, in fase di sviluppo⁹. Tuttavia, come noto, la definizione degli standard è un processo lento e quindi prima che tutte le questioni legate alle nanotecnologie siano definite adeguatamente ci vorrà ancora tempo.

A livello internazionale, notevole importanza riveste anche l’attività di coordinamento svolta dall’OCSE/OECD, che (dal 2006) ha creato due gruppi di lavoro dedicati alle nanotecnologie con l’obiettivo di promuovere la cooperazione internazionale nei seguenti ambiti¹⁰:

- Ricerca, sviluppo e commercializzazione “responsabili” delle nanotecnologie (*Working Party on Nanotechnology - OECD WPN*)
- Implicazioni dei ENM per salute, sicurezza dell’uomo e protezione dell’ambiente, sviluppo di sistemi rigorosi per la valutazione della sicurezza dei ENM (*Working Party on Manufactured Nanomaterials – OECD-WPMN*)

Alle attività di questi due gruppi di lavoro partecipano 30 stati membri OECD, la Commissione Europea, alcuni paesi non membri (Brasile, Cina, Singapore, Thailandia, Russia), ISO, WHO, UNEP ed altri portatori di interesse.

Tra le iniziative più rilevanti, l’organizzazione da parte di OECD WPMN di uno “sponsorship programme”, nel quale diversi paesi membri sono coinvolti in una attività comune di valutazione e test di una serie (rappresentativa) di ENM.

Il programma è stato avviato nel 2007, in seguito alla definizione di una lista di 14

⁹ I riferimenti ai documenti normativi pubblicati ed in sviluppo sono disponibile alla pagina http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_tc_browse.htm?commid=381983&development=on

¹⁰ http://www.oecd.org/departement/0,3355,en_2649_37015404_1_1_1_1_1,00.html

nanomateriali (basata su materiali in commercio o con un forte potenziale applicativo) associata ad una lista di 61 *endpoints* rispetto ai quali tali nanomateriali dovranno essere testati¹¹. I risultati di queste attività non sono ancora stati pubblicati.

Di notevole rilevanza è infine la pubblicazione (nel marzo 2009) di un database sulle attività ed i progetti di ricerca a livello mondiale sugli aspetti EHS, accessibile liberamente dal sito OECD¹².

7.1.5 Conclusioni

Come suffragato dai dati riportati, l'attenzione e l'impegno per uno sviluppo responsabile delle nanotecnologie è forte e coinvolge i vari paesi che nel mondo sono impegnati in questo campo, nella convinzione che questa sia una condizione essenziale per il loro successo. Questa esigenza è condivisa da tutti i portatori di interesse di questo settore, l'industria compresa, consapevoli che i grandi benefici derivanti dalle nanotecnologie, così come il successo commerciale loro associato, possono essere perseguiti solo minimizzando i possibili rischi eventualmente associati al loro utilizzo.

La disponibilità di una regolamentazione adeguata, che rassicuri circa la sicurezza ed il corretto utilizzo dei prodotti derivanti dalle nanotecnologie e/o contenenti nanomateriali, senza ostacolarne però lo sviluppo, è fondamentale.

L'utilizzo della regolamentazione esistente e l'adozione di misure volontarie, accompagnati da un atteggiamento vigile e proattivo, possono essere una soluzione transitoria, ma la domanda per una regolamentazione specifica che superi i limiti attuali è diffusa. Il percorso è lungo, ma soprattutto bisogna essere consapevoli che, per adattarsi all'evoluzione delle conoscenze scientifiche e al diffondersi delle applicazioni, la "nanoregolamentazione" richiede un approccio dinamico che tenga conto delle preoccupazioni e dell'atteggiamento della gente. Un impegno di ricerca continuo, la collaborazione e il dialogo sono elementi essenziali del processo regolatorio.

7.2 La nanotecnologia da un punto di vista assicurativo

Le nanotecnologie, ormai parte integrante della nostra vita quotidiana, offrono formidabili opportunità di sviluppo, in molti settori industriali. Il problema dei rischi legati alle nanoparticelle continua però a destare preoccupazione. Già alcune società private di assicurazioni e gestione del rischio hanno cominciato a sviluppare misure concrete

¹¹ Nanomaterials indicated by OECD WPMN are: Silver nanoparticles, Iron nanoparticles, Carbon black, Titanium dioxide, Aluminium oxide, Cerium oxide, Zinc oxide, Silicon dioxide, Polystyrene, Dendrimers, Nanoclays (OECD, 2007)

¹² <http://webnet.oecd.org/NanoMaterials/Pagelet/Front/Default.aspx>

per dare una risposta a queste preoccupazioni: dalla valutazione e gestione del rischio alla sottoscrizione di pacchetti “nanorisks” per il settore delle nanotecnologie. Una società di Zurigo ha sviluppato un prodotto software *web-based* che assiste gli utilizzatori delle nanotecnologie nella determinazione dei potenziali livelli di rischio. Un'altra società, la Lexington Assicurazioni, ha realizzato una politica integrata di copertura assicurativa appositamente per i clienti “nano”, in particolare quelli che possono avere bisogno di una speciale assistenza nella misurazione e gestione del livello di rischio nel settore delle nanotecnologie. Altre invece, come la Lloyd's potrebbero escludere totalmente la copertura assicurativa per quelle imprese che utilizzano le nanotecnologie. La ragione principale sembra essere legata ai recenti lavori scientifici che paragonano gli effetti sanitari dei nanotubi di carbonio con quelli causati dall'amianto (Kim H, 2010).

Dal punto di vista economico, la posta in gioco è enorme. Come già ampiamente riportato nei capitoli precedenti, un recente studio pubblicato dalla società americana di consulenza Lux Research, realizzato mediante una dettagliata indagine presso le industrie che nel mondo si occupano di nanotecnologie, stima che il mercato dei prodotti basati sulle nanotecnologie raggiungerà nel 2015 i 3.100 miliardi di dollari con la creazione di circa 10 milioni di nuovi posti di lavoro. Secondo la Commissione Europea il mercato mondiale delle nanotecnologie, oggi valutato in 100 miliardi di euro, dal 2010 dovrebbe generare complessivamente un fatturato di 1.000 miliardi di euro all'anno e occupare circa 2 milioni di persone (Castellet y Ballarà G e Marconi A, 2008; Castellet y Ballarà G, 2009).

7.2.1 Il ruolo dell'assicurazione pubblica

Da oltre un decennio l'Istituto Nazionale per l'Assicurazione contro gli Infortuni sul Lavoro (INAIL), in tema di tutela della salute dei lavoratori, ha rafforzato il suo ruolo sociale di garante della tutela contro gli infortuni e le malattie professionali, affiancando alle “funzioni storiche” di tipo indennitario, quelle relative alla realizzazione di un sistema di tutela globale. Emblematico di questa evoluzione il piano sanitario INAIL 1999-2001 che nel definirne e delinearne gli sviluppi, accanto alla funzione medico-legale, illustrava le funzioni di prevenzione, cura, riabilitazione, protesizzazione e reinserimento professionale. Anche in tema di funzione della medicina del lavoro, alla luce delle valutazioni espresse nella relazione del Senatore Smuraglia, il piano sanitario INAIL poneva l'accento sull'aspetto conoscitivo delle malattie professionali tutelate dall'assicurazione obbligatoria, sia ai fini dell'indennizzo che ai fini preventivi, rafforzando l'osservazione epidemiologica in particolare delle malattie professionali “perdute”.

Il D.Lgs. 38/2000¹³, il D.Lgs. 9 aprile 2008 n. 81, modificato dal D.Lgs 3 agosto 2009 n.106, e dalle legge 30 luglio 2010, n. 122¹⁴, hanno ulteriormente ampliato la sfera delle attribuzioni dell'INAIL.

In un panorama di così importante modifica dell'assetto normativo e istituzionale si vogliono fare alcune considerazioni in tema di malattie professionali.

L'inquadramento dottrinario ricomprende nelle malattie professionali "...qualsiasi stato morboso che possa essere posto in rapporto causale con lo svolgimento di una qualsiasi attività lavorativa" (A.Fiori): l'attuale tutela assicurativo-sociale gestita dall'Inail è basata sul cosiddetto "sistema misto", il quale, seppur con diverso onere della prova, ammette a tutela ogni quadro morboso riconducibile al lavoro svolto; il comma 4° dell'art 10 del D.Lgs. 38/2000, riprendendo il dettato della sentenza della Corte Costituzionale n. 179 del 1988 ha specificato che "... sono considerate malattie professionali anche quelle non comprese nelle tabelle di cui al comma 3 delle quali il lavoratore dimostri l'origine professionale...".

Il già citato articolo 10 del D.Lgs. 38/2000 confermando la vigenza dell'articolo 139 del DPR n.1124/1965¹⁵, concernente l'obbligatorietà della denuncia per ogni medico che rilevi l'esistenza delle malattie professionali contenute in apposito elenco, ha disposto che tale elenco "conterrà anche liste di probabile e di possibile origine lavorativa" e ha istituito presso la banca dati INAIL il Registro nazionale delle malattie causate dal lavoro ovvero ad esso correlate. Tale registro, con la cui attivazione l'INAIL viene a svolgere un ruolo di servizio rispetto a tutti i soggetti pubblici ai quali sono attribuiti compiti in materia di protezione della salute e di sicurezza sui luoghi di lavoro è un Osservatorio nazionale nel quale confluiscono le principali informazioni concernenti le malattie di cui all'elenco previsto dall'articolo 139 del DPR n.1124/1965. L'ultimo aggiornamento di tale elenco, contenente 3 liste, la LISTA I (malattie la cui origine lavorativa è di elevata probabilità), la LISTA II (malattie la cui origine lavorativa è di limitata probabilità, per le quali non sussistono ancora conoscenze sufficientemente approfondite perché siano incluse nel primo gruppo), la LISTA III (malattie la cui origine lavorativa è possibile, per le quali non è definibile il grado di probabilità per le sporadiche e ancora non precisabili evidenze scientifiche) è stato approvato con Decreto Ministeriale dell'11 dicembre 2009.

E' evidente che il registro nazionale delle malattie causate dal lavoro ovvero ad esso correlate rappresenta un potente strumento di raccolta ed analisi di informazioni da utilizzare a fini prevenzionali, di vigilanza, epidemiologici ed assicurativi. Peraltro, pro-

¹³ D.LGS 38/2000. Disposizioni in materia di assicurazione contro gli infortuni sul lavoro e le malattie professionali, a norma dell'art.55, comma 1, della legge 17 maggio 1999, n.144.

¹⁴ D.Lgs. 81/2008 e s.m.i. Testo Unico in materia di tutela della salute e della sicurezza nei luoghi di lavoro

¹⁵ DPR n.1124/1965. Testo unico delle disposizioni per l'assicurazione obbligatoria contro gli infortuni sul lavoro e le malattie professionali

prio in relazione alla valenza scientifica ed epidemiologica, l'INAIL ha attivato una quarta lista dove sono raccolte anche le denunce/segnalazioni di malattie non espressamente indicate nell'elenco delle malattie, per le quali il medico ha ritenuto, comunque, opportuno effettuare la segnalazione ai sensi dell'articolo 139 del DPR n.1124/1965.

La ricorrenza di siffatta casistica potrà rilevare l'evidenza di patologie "perdute".

Il D.Lgs. 9 Aprile 2008 n. 81, modificato dal D.Lgs. 3 agosto 2009 n. 106, all'articolo 9, nel definire gli Enti pubblici aventi compiti in materia di salute e sicurezza nei luoghi di lavoro, esplicita che l'INAIL - cui viene attribuita, tra l'altro, all'articolo 8, la gestione tecnica ed informatica del Sistema informativo nazionale per la prevenzione nei luoghi di lavoro (SINP) - ad integrazione delle proprie competenze, "concorre alla realizzazione di studi e ricerche sugli infortuni e sulle malattie correlate al lavoro, coordinandosi con il Ministero del lavoro, della salute e delle politiche sociali e con l'ISPESL".

Il processo di incorporazione di Enti ed Organismi pubblici, determinato dalla Legge 30 luglio 2010, n. 122, non potrà che portare ad una valorizzazione di quelle competenze, anche in termini di programmi di studio e di ricerca scientifica nel campo della prevenzione degli infortuni e delle malattie professionali, già attribuite all'ISPESL dal citato articolo 9.

Entrando nello specifico diversi sono i punti di base che definiscono i possibili scenari di rischio da esposizione a nanoparticelle:

- un numero sempre più elevato di persone sarà esposto;
- l'esposizione professionale è una delle preoccupazioni principali;
- gli eventuali effetti dannosi si prevedono possano manifestarsi dopo molti anni, con tutte le problematiche relative alla precisa ricostruzione della esposizione lavorativa anche ai fini della valutazione dell'efficienza causale degli agenti patogeni, e alla complessa interazione di fattori di rischio diversi.

In mancanza di ulteriori informazioni, fermo restando la particolare attenzione che dovrà essere posta ai dati della letteratura scientifica anche al fine di un corretto orientamento giuridico, tutte le parti coinvolte dovrebbero adottare, idonee misure per la gestione del rischio (Allianz - OECD, 2007).

Dagli elementi a disposizione emerge la necessità di porre particolare attenzione alla gestione di tale rischio sia dal punto di vista preventivo che assicurativo.

Per una efficace gestione del rischio delle nanotecnologie è opportuno che vi sia:

- un Piano Nazionale governativo che metta a disposizione sufficienti finanziamenti per una ricerca indipendente sui rischi connessi con le nanotecnologie;
- la trasparenza per un libero accesso ai risultati delle attività di ricerca;

- un dialogo continuo tra accertatori del rischio e industria;
- lo sviluppo della nomenclatura e delle norme internazionali;
- una adeguata regolamentazione delle problematiche di rischio;
- un approccio globale di *governance* del rischio.

7.2.2 Conclusioni

Possiamo affermare che allo stato attuale esistono condizioni e strumenti normativi, per cui, a fronte di una produzione ed un uso sempre maggiore di nano materiali, con una platea di lavoratori potenzialmente esposti sempre crescente, i soggetti che operano nel *Welfare*, possano farsi carico di una puntuale e rigorosa valutazione degli effetti sulla salute degli esposti alle nano particelle.

Le applicazioni della nanotecnologia hanno ormai “superato” gli aspetti della sicurezza e della ricerca sanitaria costituendo un rischio emergente che necessita un approccio di tipo prevenzionale. La grande sfida è cercare di definire una tabella di marcia per la gestione del rischio considerando pienamente i potenziali rischi per i lavoratori, per i consumatori e per l'ambiente.

Individuare e applicare ora strategie di controllo può avere implicazioni future di vasta portata per una reale tutela dei lavoratori.

7.3 Necessità di sviluppo della Comunicazione del Rischio

La comunicazione del rischio va intesa come un processo interattivo di scambio di informazioni tra individui, gruppi ed istituzioni che implica il trasferimento di messaggi multipli relativi alla valutazione ed alla gestione del rischio. Solamente una attenta e completa stima del rischio, ed ancor più, una sua caratterizzazione nel contesto opportuno, consentono quindi la comunicazione dello stesso ai soggetti coinvolti.

L'accettazione di un rischio dipende più dalla fiducia nelle capacità di gestirlo che dalla sua stessa stima quantitativa. Lo studio di situazioni concrete, meglio note rispetto a quella rappresentata dalle nanotecnologie, indica che i problemi nella comunicazione del rischio possono riguardare elementi relativi al messaggio, alla fonte di informazione, al canale di comunicazione, ai destinatari del messaggio.

I problemi di messaggio riguardano incertezze nella stima del rischio (per carenza di informazioni scientificamente attendibili) e di analisi del rischio eccessivamente tecniche, incomprensibili per i non addetti ai lavori. I problemi connessi alla fonte di informazione possono riguardare la mancanza di fiducia nei confronti della fonte (scarsa credibilità), il disaccordo tra gli esperti o tra i tecnici (confusione), i limiti oggettivi di autorevolezza o di risorse, la mancanza di dati rassicuranti (conoscenze in-

sufficienti), l'incapacità di spiegare i limiti della stima del rischio e le conseguenti incertezze, ed infine i limiti nella comprensione degli interessi, timori, valori, priorità e preferenze dei singoli e dei gruppi organizzati (lavoratori, consumatori, ambientalisti, ecc.) anche a causa di un uso di un linguaggio burocratico, legalistico e tecnico.

I canali di informazione, come articoli e servizi televisivi distorti, che enfatizzano la drammaticità, le inefficienze, i disaccordi, i conflitti di interesse o l'enfasi prematura su conoscenze ancora da verificare, pubblicare e discutere, e persino l'eccessiva semplificazione, distorsione ed inaccuratezza nell'interpretazione di rapporti tecnici concorrono a determinare problemi di canale di informazione.

I problemi dei destinatari del messaggio insorgono qualora vi siano percezioni inaccurate dei reali livelli di rischio (sovrastima delle possibilità di evitare il pericolo), o per mancanza di interesse al problema ed alle sue complessità tecniche (es. valutazione probabilistica), per eccessiva fiducia nella validità e nell'efficacia della regolamentazione e nella vigilanza, oppure per riluttanza ad operare opportune distinzioni tra i diversi tipi di rischio o tra rischi, costi e benefici.

Almeno nel campo delle nanotecnologie, allo stato attuale può sembrare prematuro formulare apposite strategie per la comunicazione del rischio. Le carenze che ancora permangono nelle nostre conoscenze, sia sulla caratterizzazione della pericolosità sia sulla misura dell'esposizione a nanomateriali, non consentono attualmente una chiara definizione del rischio in campo occupazionale, tanto meno in quello ambientale, mentre potrebbero essere maturi i tempi per un trasferimento delle conoscenze dal livello scientifico a quello della gestione della sicurezza basate sulla pericolosità/tossicità di alcune classi di nanomateriali.

In termini generali, la comunicazione del rischio, intesa come trasferimento di conoscenze acquisite, si basa sull'analisi della percezione da parte del pubblico del rischio associato con queste tecnologie emergenti. Per le persone non coinvolte in qualità di scienziati risulta spesso incomprensibile cosa realmente sia la nanotecnologia, quali qualità rendano i nanomateriali così speciali, e quali siano i possibili rischi. I processi produttivi ed i meccanismi operanti nel campo nanotecnologico rimangono sconosciuti per la maggior parte degli osservatori, degli utilizzatori e dei consumatori. Questo può ingenerare scetticismo, diffidenza nella società, specialmente qualora i vari aspetti del rischio divengano materia di dibattito pubblico, come sta accadendo anche nel nostro paese. Di conseguenza, un dialogo pubblico ed aperto con i cittadini ed i consumatori appare quanto mai necessario, come base per giudicare con obiettività le nanotecnologie e per evitare paure ingiustificate.

Questo dialogo dovrebbe dunque essere bi-direzionale. Gli scienziati, gli imprenditori, coloro che operano nel settore pubblico devono comprendere la legittimità delle preoccupazioni che si originano in diverse categorie della popolazione, inclusi i lavoratori.

Allo stesso tempo, il pubblico dovrebbe imparare di più sulle nanotecnologie e partecipare attivamente nel conferire una giusta dimensione alle nanotecnologie. Il dialogo con le industrie coinvolte dovrebbe essere basato su un forte legame. Ugualmente, si dovrebbe permettere ai soggetti coinvolti di avvalersi della loro esperienza per scambiare informazioni scientifiche, comprendenti dati tossicologici ed ecotossicologici prodotti all'interno delle strutture di ricerca.

L'identificazione dei gruppi dovrebbe essere effettuata tenendo conto dei rispettivi interessi, della conoscenza e della relazione che hanno nei confronti delle nanotecnologie. Le modalità potrebbero consistere nel finanziare studi mirati sul campo, attività che abbiano il fine di familiarizzare l'audience con punti di vista dall'interno del problema, sollecitare le domande, svelare le preoccupazioni, sondare le necessità di approfondimento. Naturalmente, tali modalità seguono i criteri più generali della scienza della comunicazione.

I soggetti coinvolti possono comunicare contenuti differenti ed agire in modo differente. L'industria può comunicare che la stima del rischio è adeguata e che tutto è sotto controllo perché sono state implementate linee guida e procedure operative. Le piccole imprese, notoriamente riluttanti ad affrontare certe tematiche di sicurezza, potrebbero concludere che stimare il rischio sia troppo dispendioso e quindi non agire in attesa della pubblicazione di leggi o decreti. Gli enti governativi solitamente si focalizzano sugli aspetti di regolamentazione e gestione del rischio e chiedono maggiori tutele legislative. Le compagnie assicurative hanno interesse nell'incrementare il dialogo sul rischio e nel mettere sull'avviso la collettività. I mezzi di comunicazione vanno a caccia di notizie sensazionalistiche e disorientano la collettività che, spesso oscilla fra magia e demonizzazione della (nano)tecnologia.

Infine, i ricercatori, che dovrebbero mantenere un atteggiamento lucido ed indipendente, chiedono nel contempo maggiori opportunità di finanziamento per approfondire tematiche che appaiono comunque ancora incerte.

7.3.1 La comunicazione del rischio nella policy dell'Unione Europea

La comunicazione del rischio legato allo sviluppo delle nanotecnologie costituisce parte integrante della politica dell'Unione Europea finalizzata a promuovere un approccio integrato, sicuro, responsabile e socialmente accettabile nello sviluppo e nell'impiego della nanoscienza e nanotecnologia. L'obiettivo principale risulta l'appropriatezza del messaggio, indirizzato ad incidere sui comportamenti ed a stimolare il dialogo ed il coinvolgimento della società civile, identificando le modalità più appropriate.

La Comunità Europea ha messo a punto una propria strategia per far fronte alle pro-

blematiche relative alla salute e alla sicurezza nei luoghi di lavoro (Commissione Europea, 2007b), consapevole che il campo di sviluppo può comportare la comparsa di nuovi rischi. Le comunicazioni da parte della Commissione stabiliscono la necessità di integrare lo sviluppo tecnologico con attività di ricerca (Commissione Europea, 2004). In particolare è stata sottolineata la necessità di identificare ed affrontare i problemi relativi alla sicurezza, reale o percepita, ad uno stadio il più precoce possibile; favorire le attività di integrazione fra salute, ambiente, rischio ed altri aspetti correlati nelle attività di ricerca e sviluppo; sostenere la produzione di dati tossicologici ed ecotossicologici, meglio se basati sulla definizione di relazioni dose-risposta o di relazioni quantitative fra struttura ed attività (QSAR), quest'ultima più consona alla valutazione dell'impatto delle nanotecnologie sulla salute dell'uomo e dell'ambiente.

In tale scenario non mancano gli elementi documentali, sotto forma di documenti di consenso, rapporti, manuali tecnici o *review* riguardanti i vari aspetti della sicurezza dei nanomateriali¹⁶ (OECD, 2007).

La comunicazione rappresenta per l'UE un elemento chiave nell'ambito di una politica di sviluppo: sostenibilità, sicurezza, salute resterebbero parole vuote senza che venga messa in atto la comunicazione del rischio ai soggetti coinvolti nei potenziali scenari di esposizione. In questa fase, caratterizzata da informazioni ancora lacunose sul rischio e la sua valutazione, l'elemento comunicativo è diffusamente utilizzato dai media per forzature in senso sensazionalistico e scarsamente scientifico; questo denota altresì la necessità che venga al più presto messa in atto una adeguata strategia di comunicazione.

Già nel 2005, la Commissione Europea adottò la risoluzione "Nanosciences and nanotechnologies: an Action Plan for Europe 2005-2009" (Commissione Europea, 2005). Questo "Piano d'Azione" definisce una serie di azioni articolate ed interconnesse per l'implementazione immediata di un approccio sicuro, integrato e responsabile della nanoscienza e nanotecnologia. Elemento centrale di tale piano operativo è la stima del rischio per l'uomo, l'ambiente, i consumatori, i lavoratori, integrabile in qualunque momento del ciclo vitale delle tecnologie, a partire dall'ideazione, ricerca e sviluppo, produzione, distribuzione, utilizzazione e smaltimento o riciclo (Commissione Europea, 2008d).

La Commissione Europea ha reso noto un codice di condotta per assicurare uno sviluppo sicuro ed eticamente accettabile nell'uso delle nanotecnologie. Tale approccio dovrà essere ispirato a sette principi (Commissione Europea, 2008e):

- a) Significato (*meaning*): ribadisce che le attività di ricerca debbono essere comprensibili al pubblico; esse dovrebbero rispettare i diritti fondamentali ed essere condotte nell'interesse del benessere degli individui e della società per quanto ri-

¹⁶ oecd.org/env/nanosafety.

guarda la progettazione, l'implementazione, la diffusione e l'utilizzazione.

- b) Sostenibilità (*sustainability*): significa che le attività di ricerca dovrebbero di per se stesse essere sicure, eticamente accettabili e contribuire allo sviluppo sostenibile. Pertanto non dovrebbero essere nocive o porre rischi per le persone, gli animali, le piante o l'ambiente, sia nel presente sia nel futuro.
- c) Precauzione (*precaution*): indica la necessità che le attività di ricerca siano condotte in accordo con il principio di precauzione, anticipando il potenziale impatto sull'ambiente, sulla salute, sulla sicurezza, adottando un livello di precauzione proporzionale al livello di protezione, incoraggiando allo stesso tempo il progresso a beneficio della società e dell'ambiente.
- d) Inclusione (*inclusiveness*): il processo di "governance" delle attività di ricerca dovrebbe essere guidato dai principi di apertura a tutti i soggetti coinvolti, trasparenza e rispetto dei legittimi diritti di accesso all'informazione; esso dovrebbe consentire la partecipazione nei processi decisionali di tutti i soggetti interessati o coinvolti nelle attività di ricerca.
- e) Eccellenza (*excellence*): indica che le attività di ricerca dovrebbero raggiungere i migliori standard scientifici, compresa l'indipendenza della ricerca e le buone pratiche di laboratorio.
- f) Innovazione (*innovation*): il governo delle attività di ricerca dovrebbe incoraggiare la massima creatività, flessibilità e capacità di pianificazione per l'innovazione e lo sviluppo.
- g) Responsabilità (*accountability*): i ricercatori e le organizzazioni di ricerca dovrebbero mantenere la responsabilità, per l'impatto sociale, ambientale e sanitario della loro attività.

Questi documenti di policy sono stati riassunti ed assemblati da parte della Commissione (Commissione Europea, 2008f).

Analogamente, un consorzio inglese (ResponsibleNanoCode, 2008) ed una multinazionale (BASF, 2008) hanno sviluppato codici di condotta, come anche alcune nazioni (NNI, 2008; BMBF, 2008; Schweizerische Eidgenossenschaft, 2008; IRGC, 2008) ed organizzazioni sindacali (ETUC, 2008), sottolineando gli aspetti relativi alla salute e sicurezza.

Le attività di policy implementate dall'OECD e dagli stati membri (OECD, 2007) sono state sintetizzate in un documento che include, fra l'altro, le seguenti azioni: i) programmi di ricerca e sviluppo e relative strategie; ii) studio degli aspetti regolatori; iii) fondazione di un comitato di garanti e di gruppi di lavoro; iv) programmi volontari di tutela ("stewardship"); v) documenti di buona pratica; vi) programmi di informazione e consultazione dei soggetti interessati.

7.3.2 Contenuti e strategie di comunicazione del rischio

Una comunicazione può dirsi appropriata quando assicura la disponibilità di informazioni affidabili per aumentare il livello di consapevolezza in specifiche categorie della società. In pratica, risponde alle seguenti domande: i) A chi? identificando i destinatari della comunicazione; ii) Che cosa? identificando l'oggetto della comunicazione; iii) Come? identificando i mezzi più appropriati per trattare le problematiche in modo efficace.

L'informazione è "appropriata" quando viene fornita in modo trasparente, non passivo, coinvolgendo direttamente i lavoratori e le loro rappresentanze o gli ispettorati del lavoro. La richiesta di una maggiore trasparenza da parte delle imprese circa la pericolosità ed i possibili rischi associati ai prodotti delle nanotecnologie è stata recentemente sollecitata dalla Confederazione europea dei sindacati - ETUC (ETUC, 2008).

I contenuti della comunicazione, le strategie più appropriate, i destinatari, i differenti livelli di approfondimento in rapporto all'audience sono stati evidenziati nell'ambito del Workshop "*Communication Outreach in Nanotechnology: from recommendations to action*", svoltosi a Brussel, il 24 e 25 Ottobre del 2007.

Il processo di comunicazione dei risultati delle ricerche al pubblico, o a specifici gruppi potenzialmente a rischio dovrebbe svilupparsi assecondando un preciso percorso logico, partendo da domande specifiche che tengano conto della situazione attuale, ad esempio, di quanto percepito dall'opinione pubblica o dai media – entusiasti circa le opportunità offerte dallo sviluppo tecnologico, ma altrettanto preoccupati circa i possibili rischi – oppure della differente attitudine dei soggetti coinvolti, con atteggiamento che spazia dalla curiosità alla preoccupazione, dalla prudenza alla fiducia incondizionata. Per questo un importante pre-requisito è la conoscenza approfondita dei destinatari del messaggio, ai quali fornire nel contempo fonti informative accurate e facilmente accessibili.

Non sembra banale, tuttavia, individuare anche modalità innovative di comunicazione, adottando un approccio trasparente, aprendo diversi canali comunicativi, rivolgendosi alle giovani generazioni, coinvolgendo i cittadini e le categorie, ad es. i lavoratori e le loro rappresentanze in accordo con i principi etici che guidano la società ed i valori umani, rispondendo ai bisogni reali.

Il termine "nanotecnologia" riguarda un campo di applicazione molto vasto, a carattere multidisciplinare, che include un'ampia gamma di applicazioni e di prodotti. È chiaro che semplificare il messaggio mediante assunti come "tutto ciò che è *nano* è pericoloso/rischioso" sarebbe fuorviante e controproducente, mentre è importante sottolineare che la ricerca e lo sviluppo di nanomateriali potrebbe avere un impatto

positivo sulla vita di tutti i giorni e che molti di essi presentano molti vantaggi ed alcuni problemi che vanno affrontati e risolti.

Ciò che dovrebbe essere comunicato è che tutto ciò che è “nano” non è magico, che la nanotecnologia rappresenta una nuova fase della tecnologia che potenzia gli effetti su scala nanodimensionale e che questa opportunità deve essere gestita in modo consapevole e controllato. Tutto ciò rappresenta il campo della “sostenibilità”. I temi della sicurezza, della gestione del rischio e della gestione controllata dell'intero ciclo vitale dei nanomateriali non possono, pertanto, essere disgiunti da possibili implicazioni di tipo etico, legislativo, considerando infine il possibile impatto sul sistema sanitario e sulla gestione del rischio nelle aziende di produzione ed utilizzazione.

7.3.3 Modalità della comunicazione

Chiaramente, le strategie, i mezzi che possono essere impiegati per raggiungere gli obiettivi della comunicazione dipendono dai bisogni e dalle attese dei soggetti destinatari. Non vi sono precise regole per la scelta degli strumenti più idonei con cui conseguire gli obiettivi, ma sembra utile tenere presenti le caratteristiche rilevanti dei soggetti coinvolti o dei gruppi del pubblico, al fine di raggiungere tutti in modo efficace.

Le modalità suggerite dalla Commissione, trattate in diversi *Workshop* prima ricordati, sono sintetizzabili nei seguenti approcci principali: i) partecipazione attiva; ii) collaborazioni fra scuola-scienza e museo-laboratorio; iii) sviluppo di modi fantasiosi per far sperimentare il mondo delle nanotecnologie ai cittadini; iv) accesso ad esperimenti; v) apertura dei centri di ricerca al pubblico; vi) favorire la comunicazione a partire dalle applicazioni, poi sottolinearne i benefici ed infine i potenziali rischi.

In termini pratici, si potrà far ricorso a materiali audiovisivi, comunicazioni elettroniche (bollettini, siti Web - ad esempio, *ICON Good Practices Wiki*, International Council on Nanotechnology, 2006 -, informative mediante posta elettronica a liste specifiche, ecc.), presentazioni personalizzate ed organizzazione di meeting, ad esempio “nano forum” (luogo fisico di incontro fra scienza ed Industria; Nano&Nano, “Nanoweeek” organizzata da Veneto Nanotech, ecc.), creazione di network fra soggetti maggiormente coinvolti nella produzione di dati scientifici (ad esempio, NanoImpactNet, network di eccellenza, ecc.), ed infine corsi di formazione avanzata (ad esempio, il “*Advanced Training Course on the Risks relating to Occupational Exposure to Nanoparticles*” - Institut National de Recherche et de Sécurité - Parigi 11-14 aprile 2006), comunicazione tramite stampa e quotidiani, conferenze stampa pubbliche, ecc.

Un altro particolare aspetto della comunicazione è il coinvolgimento delle persone nel campo della nanotecnologia, rendendole consapevoli dello sviluppo scientifico e

tecnologico, unitamente al possibile impatto sulla società e sulla vita quotidiana, sia in termini di benefici sia di possibili rischi. La partecipazione va stimolata attraverso il dialogo, al fine di creare un consenso fra pubblico e privato, fra scienza, industria e consumatori. L'obiettivo è chiaramente quello di rendere la scienza e la tecnologia "più democratiche".

Il dialogo prevede che preliminarmente vengano identificati gli elementi che destano preoccupazione nei potenziali destinatari della comunicazione (ad es., il grado di attesa, le perplessità sul modo di agire dell'industria o dei legislatori, la formulazione di suggerimenti per gli scienziati od i politici, il recepimento di possibili suggerimenti), che necessariamente possono essere differenti da quelle dei comunicatori, e che si tenga conto della percezione dei soggetti (stato delle conoscenze dei destinatari; quali sono i rischi ed i benefici che vengono percepiti); ciò ridurrebbe la frustrazione (reciproca) ed aumenterebbe l'efficacia della comunicazione.

7.3.4 Comunicazione del rischio in campo occupazionale

Nonostante lo stato attuale delle conoscenze non consenta una appropriata valutazione dei possibili rischi per la Salute e la Sicurezza del Lavoro legati allo sviluppo delle nanotecnologie tale da rappresentare una guida nella scelta di appropriati livelli di controllo, molti sono gli sforzi e le iniziative in atto per superare il principio di precauzione ed arrivare ad un atteggiamento proattivo nella gestione del rischio, vero elemento chiave per una politica di sviluppo responsabile.

Diverse Istituzioni attive nel campo della *Occupational Safety and Health*, sia negli Stati Uniti sia in Europa o Giappone, hanno intrapreso attività di ricerca multidisciplinare finalizzate a definire il rischio derivante dai materiali nanotecnologici in fase di produzione ed utilizzazione (ad esempio, progetti finanziati dall'UE, come Nanosafe, Impart, Nanotox, Nanoderm, Nanohealth, Nanocare, NanoImpactNet – vedi Capitoli 3).

Il livello di consapevolezza crescente fra le professionalità coinvolte, riguardo alle peculiari caratteristiche dei nanomateriali e circa la particolarità dei vari scenari espositivi che potrebbero configurarsi, stanno guidando lo sviluppo di un quadro concettuale e di linee guida per la gestione del rischio (NIOSH, 2007; Renn O and Roco MC, 2006; Schulte PA and Salamanca-Buentello F, 2007).

Ragionevolmente, come proposto in maniera autorevole dal NIOSH (NIOSH, 2009b), non è necessario uno stravolgimento dell'approccio tradizionale alla valutazione del rischio o degli aspetti legislativi (esiste già un quadro di riferimento sancito nel REACH), ma semmai un adeguamento, uno sviluppo metodologico di questo approccio. In tal senso vanno interpretate le attività di ricerca scientifica di Istituzioni e di Agenzie Governative, finalizzate a chiarire la natura e l'entità dei potenziali rischi

nella manipolazione dei materiali nanostrutturati ed a fornire una solida piattaforma scientifica per la gestione del rischio per la salute e sicurezza secondo i diversi scenari espositivi, che tenga conto dell'intero ciclo vitale dei nanomateriali (Thomas K et al, 2009; Commissione Europea, 2008g).

7.3.5 Conclusioni

Gli scienziati sono soltanto all'inizio del processo di valutazione dei possibili rischi per la salute pubblica e per l'ambiente legati allo sviluppo delle nanotecnologie e pertanto la nostra comprensione su cosa e su come debba essere comunicato, appare piuttosto primitiva. Lo studio della percezione del rischio insegna che la trasmissione dei rischi ad un pubblico di non addetti ai lavori, con scarsa informazione scientifica, è un percorso costellato di fraintendimenti e di reazioni emozionali. Allo stato attuale, pochi sono gli studi che hanno esplorato in modo sistematico la percezione del rischio legato alle nanotecnologie e come sia possibile guidare in modo costruttivo la percezione collettiva attraverso un dialogo partecipato. Il crescente divario fra le conoscenze scientifiche circa il possibile rischio e la nostra capacità di comunicare tali acquisizioni potrebbe riflettersi negativamente sullo sviluppo di tecnologie dall'impatto benefico per tutta la società. Si ritiene che uno dei principali problemi posti dalla comunicazione dei rischi sia legato al fatto che il pubblico tende ad assumere opinioni contrapposte circa i rischi di tipo ambientale o tecnologico a seconda dell'orientamento culturale (Kahan DM and Braman D, 2006). In altre parole, è probabile che l'incapacità a comunicare efficacemente i potenziali rischi associati con le nanotecnologie possa creare un ambiente in cui gli sforzi di messa a punto di un sistema di regolamentazione e di investimento di settori privati potrebbero essere vanificati. In tal senso, la nanotecnologia potrebbe subire lo stesso destino riservato ad altre tecnologie, incluso l'impiego pacifico dell'energia nucleare o l'introduzione di organismi geneticamente modificati, il cui sviluppo è stato in buona parte soffocato da contenziosi politici e sociali, processo definito "polarizzazione culturale" (Kahan DM et al, 2008).

Nel tentativo di evitare un approccio emozionale ad una problematica certamente complessa, sono stati effettuati alcuni studi congiunti da parte del "Cultural Cognition Project" (CCP) presso la "Yale Law School" e il "Projection on Emerging Nanotechnologies" (PEN) coordinato dal "Woodrow Wilson International Center for Scholars" (Kahan DM and Rejeski D, 2009).

I risultati di questi studi hanno suggerito alcune riflessioni e consentono di prospettare alcune raccomandazioni nell'approccio alla comunicazione. Appare fuorviante supporre che l'avanzamento delle conoscenze scientifiche nel campo delle N&N possa

permeare l'opinione pubblica e la politica; i valori individuali influenzano la percezione dei rischi e nemmeno le nanotecnologie sono immuni da questo aspetto cognitivo. Tuttavia, ciò non fa che rendere ancor più necessario un livello di comunicazione accessibile a persone di differente estrazione socio-culturale. Persone con differenti valori sembrano inclini ad orientarsi in modo relativamente univoco nei confronti dei rischi di natura ambientale ("polarizzazione culturale"); questo atteggiamento sembrerebbe inevitabile, a meno che le strategie di comunicazione non vengano attentamente calibrate e l'identità dei comunicatori tenuta in considerazione. Infatti, gli "esperti" dovrebbero riflettere il pluralismo presente nella società, in modo tale che chi riceve l'informazione possa, almeno in parte, identificarsi e contenere le differenze culturali. Infine, lo studio CCP/PEN ha messo in evidenza quanto la scienza sperimentale sia ancora lontana dal consentire una corretta comunicazione del rischio legato alle nanotecnologie. Le raccomandazioni che ci sentiamo di condividere riguardano: (i) la necessità urgente che le iniziative in campo scientifico da parte di enti ed istituzioni di ricerca includano anche la componente di comunicazione del rischio; (ii) la necessità di focalizzarsi sul "*message framing*", quale strategia per promuovere una maggior recettività del pubblico ad una corretta informazione scientifica; (iii) la necessità di contestualizzare il messaggio adattandolo al reale impiego delle nanotecnologie e non a situazioni di ricerca di laboratorio estremamente specialistiche.

Bibliografia

- AFFSET. Les nanomatériaux: Sécurité au travail, Agence Française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (AFFSET), Luglio 2008
- Allianz - OECD. Opportunities and risks of Nanotechnologies 2007.
- BASF, Code of Conduct Nanotechnology, 2007, accessed on 13 November 2008. <http://www.corporate.basf.com/en/sustainability/dialog/politik/nanotechnologie/verhaltenskodex.htm?id=V00-62j1ICFSDbcp-5R>
- BAuA. Guidance for Handling and Use of Nanomaterials at the Workplace, Federal Institute for Occupational Health and Safety (BAuA) e VCI, Agosto 2007. - <http://www.baua.de/nanotechnologie>
- BMBF. Bundesministerium für Bildung und Forschung. Nano-Initiative - Action Plan 2010, 2006, accessed on 13 November 2008. http://www.bmbf.de/pub/nano_initiative_action_plan_2010.pdf
- Breggin L, Falkner R, Jaspers N, Pendergrass J and Porter R. Securing the Promise of Nanotechnologies Towards Transatlantic Regulatory Cooperation, Royal Institute of International Affairs, Settembre 2009.
- Castellet y Ballarà G, Marconi A. Strumenti e tecniche per la misura dell'esposizione a particelle nanometriche negli ambienti di lavoro; *Giornale degli Igienisti Industriali* – Vol. 33 n. 1 Gennaio 2008; pp. 23 – 35.
- Castellet y Ballarà G. Nanotechnologie e sviluppo di standard in tema di salute, sicurezza e ambiente. *UNI - Rivista Unificazione & Certificazione* vol.5 Giugno 2009.
- Commissione Europea. Communication from the Commission - Towards a European strategy for nanotechnology, Brussels, Commission of the European Communities, 2004.
- Commissione Europea. Communication from the Commission to the European Parliament, the Council, the European Economic and Social Committee, Nanosciences and nanotechnologies: An action plan for Europe 2005-2009, Brussels, Commission of the European Communities, 2005.
- Commissione Europea. Mandate addressed to CEN, CENELEC and ETSI for the elaboration of a programme of standards to take into account the specific properties of nanotechnology and nanomaterials - M/409 EN. European Commission, Maggio 2007a. http://www.etsi.org/WebSite/document/about/ETSI/EC_Mandates/m409.pdf
- Commissione Europea. European Commission, Communication from the Commission to the European Parliament, the Council, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions - Improving quality and productivity at work: Community strategy 2007-2012 on health and safety at work, Brussels, Commission of the European Communities, 2007b.
- Commissione Europea. Regulatory Aspects of Nanomaterials, Summary of legislation in relation to health, safety and environment aspects of nanomaterials, regulatory research needs and related measures. European Commission, Giugno 2008a. http://ec.europa.eu/nanotechnology/pdf/eu_nano_policy_2004-08.pdf
- Commissione Europea. Nanomaterials in REACH, Follow-up to the 6th Meeting of the REACH Competent Authorities for the implementation of Regulation (EC) 1907/2006 (REACH), European Commission, Enterprise And Industry Directorate-General, 15-16/12/2008b,
- Commissione Europea. Commission Recommendation of 07/02/2008 on a code of conduct for responsible nanosciences and nanotechnologies research, European Commission, Febbraio 2008c. http://ec.europa.eu/nanotechnology/pdf/eu_nano_policy_2004-08.pdf
- Commissione Europea. Communication from the Commission to the European Parliament, the Council, the European Economic and Social Committee, Nanosciences and Nanotechnologies: An action plan for Europe 2005-2009. First Implementation Report 2005-2007, 2005, accessed on 13 November 2008d. http://ec.europa.eu/nanotechnology/pdf/comm_2007_0505_en.pdf
- Commissione Europea. European Commission adopts code of conduct for responsible nanosciences and nanotechnologies research, accessed on 22 September 2008e. <http://www.europa.eu/rapid/pressReleasesAction.do?reference=IP/08/193&format=HTML&aged=0&language=EN&guiLanguage=en>

- Commissione Europea. EU policy for nanosciences and nanotechnologies, 2008, accessed on 13 November 2008f. http://www.cordis.europa.eu/pub/nanotechnology/docs/eu_nano_policy_2004-07.pdf
- Commissione Europea. Workshop on research projects on the safety of nanomaterials: reviewing the knowledge gaps. Brussels, 17-18 April 2008g. http://cordis.europa.eu/nanotechnology/src/publication_events.htm
- EPA. Nanotechnology White Paper, US Environmental Protection Agency, Office of the Science Advisor, Febbraio 2007.
- EPA. Draft Nanomaterial Research Strategy (NRS), US Environmental Protection Agency (EPA), Gennaio 2008
- ETUC. European Trade Union Confederation, ETUC resolution on nanotechnologies and nanomaterials, accessed on 30 September 2008. http://www.etuc.org/IMG/pdf_ETUC_resolution_on_nano_-_EN_-_25_June_08.pdf
- European Economic and Social Committee. Opinion of the European Economic and Social Committee on the Communication from the Commission to the European Parliament, the Council and the European Economic and Social Committee, Regulatory aspects of nanomaterials. Official Journal of the European Union, Settembre 2009.
- EU-OSHA. Workplace exposure to nanoparticles – literature review, European Agency for Safety and Health at Work, 2008
- FIOH. Guidelines on the Precautionary Matrix for Synthetic Nanomaterials, Federal Office of Public Health FOPH, 2008 - <http://www.bag.admin.ch/themen/chemikalien/00228/00510/05626/index.html?lang=en>
- International Council on Nanotechnology. A Survey of Current Practices in the Nanotechnology Workplace, 2006. <http://cohesion.rice.edu/CentersAndInst/ICON/emplibrary/ICONNanotechSurveyAbridgedReduced.pdf>
- IRGC. International Risk Governance Council. Nanotechnology risk governance, accessed on 22 September 2008. <http://www.irgc.org/Nanotechnology.html>
- ISO. Business Plan ISO/TC 229 Nanotechnologies. ISO, April 2007. http://www.iso.org/iso/standards_development/technical_committees/list_of_iso_technical_committees/iso_technical_committee.htm?comid=381983
- Kahan DM and Braman D. Cultural Cognition of Public Policy. *Yale Journal of Law & Public Policy*, 24, 147-170, 2006.
- Kahan DM, Braman D, Slovic P, Cohen G and Gastil, J. (2008). Cultural Cognition of the Risks and Benefits of Nanotechnology. *Nature Nanotechnology*, December 7 online edition.
- Kahan DM and Rejeski D. Toward a Comprehensive Strategy for Nanotechnology Risk Communication. PEN BRIEF No. 5 April 2009 - Woodrow Wilson International Center for Scholars - www.nanotechproject.org
- Kim H. Company develop solutions to managing nanotechnology risks. www.nanolawreport.com. 2010
- Mantovani E, Porcari A, Meili C, Widmer M. Mapping study on regulation and governance of nanotechnologies, rapporto pubblicato nell'ambito del progetto europeo FP7 FramingNano, Gennaio 2009. <http://www.framingnano.eu/images/stories/FramingNanoMappingStudyFinal.pdf>
- NIOSH. Approaches to Safe Nanotechnology Managing the Health and Safety Concerns Associated with Engineered Nanomaterials, National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH), Marzo 2009a. <http://www.cdc.gov/niosh/docs/2009-125/pdfs/2009-125.pdf>
- NIOSH. Approaches to Safe Nanotechnology Managing the Health and Safety Concerns Associated with Engineered Nanomaterials, National Institute for Occupational Safety and Health, Marzo 2009b. <http://www.cdc.gov/niosh/docs/2009-125/pdfs/2009-125.pdf>
- NIOSH. Progress Toward Safe Nanotechnology in the Workplace. No. 2007-123, National Institute for Occupational Safety and Health, 2007. Cincinnati, USA. <http://www.cdc.gov/niosh/docs/2007-123/pdfs/2007-123.pdf>
- NNI. President's Council of Advisors on Science and Technology, The national nanotechnology initiative, 2008, accessed on 13 November 2008. http://www.ostp.gov/galleries/PCAST/PCAST_NNAN_NNI_Assessment_2008.pdf

- OECD - Organisation for Economic Co-Operation and Development. "Tour de Table at the 3rd Meeting of the Working Party on Manufactured Nanomaterials", Current Developments/Activities on the Safety of Manufactured Nanomaterials/Nanotechnologies, Paris, France, 28-30 November 2007.
- Ostiguy C, Roberge B, Ménard L, Endo CA. Best Practices Guide to Synthetic Nanoparticle Risk Management, Report R-599, IRSST, CCST, NanoQuebec, Gennaio 2009, www.irsst.qc.ca
- Renn O and Roco MC. Nanotechnology and the need for risk governance. *J Nanoparticle Res* 8:153–191, 2006.
- ResponsibleNanoCode, Responsible NanoCode, accessed on 22 September 2008. <http://www.responsiblenanocode.org/index.html>
- Schlyter C. Relazione sugli aspetti normativi in tema di nanomateriali. Commissione per l'ambiente, la sanità pubblica e la sicurezza alimentare (2008/2208(INI)), 7/4/2009.
- Schweizerische Eidgenossenschaft. Action plan: Synthetic nanomaterials, accessed on 30 September 2008. www.environment-switzerland.ch/div-4002-e
- Schulte PA and Salamanca-Buentello F. Ethical and scientific issues of nanotechnology in the workplace. *Environ Health Perspect* 115(1): 5-12, 2007
- Thomas K, Aguar P, Kawasaki H, Morris J, Nakanishi J, Savage N. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part VIII: International efforts to develop risk-based safety evaluations for nanomaterials. *Toxicol Sci* 92(1):23-32, 2006.
- VCI. Responsible Production and Use of Nanomaterials, VCI, Marzo 2008. http://www.vci.de/Default2~cmd~get_dwnld~docnr~122306~file~Nano_Responsible_Production.pdf.htm