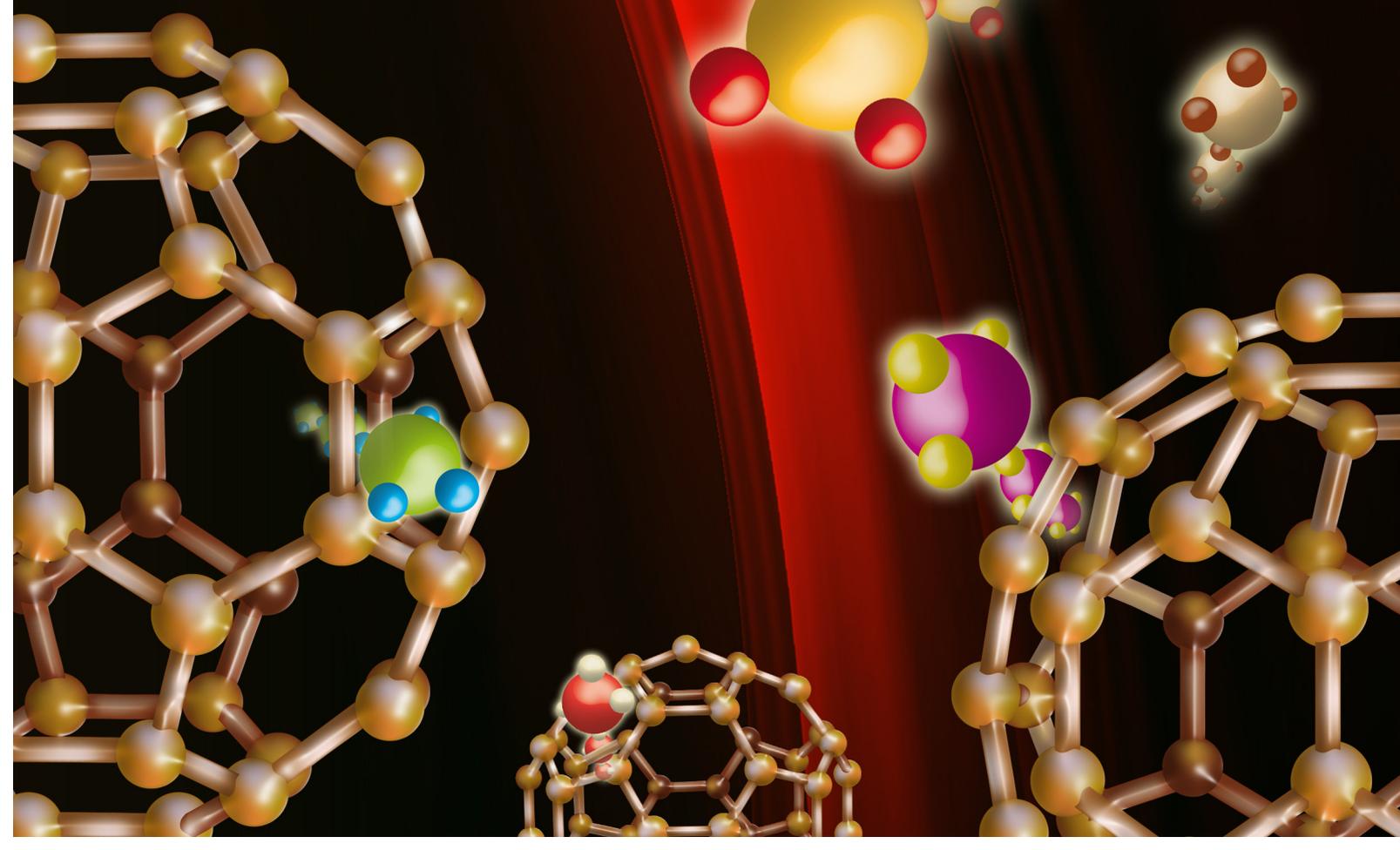


# Nanomateriali e Salute

*Abstracts*

10-11 maggio 2012

*Aula Pocchiari*



**Convegno**

**NANOMATERIALI E SALUTE**

**Organizzato da  
Istituto Superiore di Sanità  
Gruppo di Lavoro “Nanomateriali e salute”**

**10-11 maggio 2012**

**Aula Pocchiari**

***Istituto Superiore di Sanità***

**Roma**



## INDICE

Introduzione	ii
Programma	iii
RELAZIONI	
Sessione I - VALUTAZIONE E PREVENZIONE DEL RISCHIO DA NANOMATERIALI: SALUTE, AMBIENTE E SICUREZZA ALIMENTARE	3
Sessione II - NANOMATERIALI IN MEDICINA: PREVENZIONE, DIAGNOSI E TERAPIA	19
Sessione III - ASPETTI NORMATIVI	33
POSTERS	
Sessione I	43
Sessione II	52
Sessione III	60
Indice degli Autori	63

## **INTRODUZIONE**

Il mondo dei nanomateriali abbraccia molteplici aspetti della realtà scientifica e produttiva. Allo stato attuale è uno dei settori di ricerca e sviluppo con maggior attesa di ricadute importanti per l'innovazione tecnologica. I nanomateriali e le nanotecnologie applicate alla medicina, sia a fini diagnostici che terapeutici, esitano nella nanomedicina, che non è più soltanto una tecnica del futuro, ma ha già iniziato a fornire metodiche importanti per la pratica clinica.

L'ISS, con il gruppo di lavoro "Nanomateriali e Salute", coagula un vasto patrimonio di esperienze, che vanno dalla ricerca pre-clinica e clinica, allo sviluppo di metodologie appropriate per la caratterizzazione dei nanomateriali e la valutazione del rischio ad essi associato, all'attività regolamentatoria per la sicurezza e il controllo di qualità.

Questo convegno, che ha come obiettivo principale la riunione di quanti nel nostro paese si occupano di nanomateriali in relazione alla salute, è stato promosso dall'Istituto Superiore di Sanità anche per presentare le attività interdisciplinari svolte al suo interno in risposta alla sfida che si sta aprendo, per il mondo scientifico ed istituzionale, nella ricerca di un equilibrio tra l'introduzione di materiali e tecnologie innovativi e la necessità di assicurare un alto livello di protezione per l'individuo e l'ambiente.

## **RESPONSABILI SCIENTIFICI**

**Loredana Musmeci**, Direttore Dip.to AMPP, e **Velio Macellari**, Direttore Dip.to TES

## **SEGRETERIA SCIENTIFICA**

**Maria Alessandrelli**, Centro Nazionale Sostanze Chimiche, ISS

**Flavia Barone**, Dip.to di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, ISS

**Francesco Cubadda**, Dip.to di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, ISS

**Barbara De Berardis**, Dip.to di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, ISS

**Gabriella Di Felice**, Dip.to di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, ISS

**Stefano Fais**, Dip.to del Farmaco, ISS

**Stefania Meschini**, Dip.to di Tecnologie e Salute, ISS

**Agnese Molinari**, Dip.to di Tecnologie e Salute, ISS

**Maria Letizia Polci**, Centro Nazionale Sostanze Chimiche, ISS

## **SEGRETERIA TECNICA**

**Tommaso Azzarito**, Dip.to del Farmaco

**Maria Cristina Barea Toscan**, Dip.to Sanità Pubblica e Sicurezza Alimentare

**Monica Brocco**, Dip.to Tecnologie e Salute

**Costanza Majorani**, Dip.to Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria

## PROGRAMMA

### Giovedì 10 maggio

- 09.00** Saluto di benvenuto e introduzione al convegno  
**Enrico Garaci**  
Presidente dell'ISS
- Loredana Musmeci e Velio Macellari**  
Coordinatori del Gruppo di Lavoro "Nanomateriali e salute" dell'ISS
- 09.30** **François Rossi** - Attività del Centro Comune di Ricerca della Commissione Europea sulle nanobiotecnologie e sulla nanotossicologia

#### Sessione I

#### *VALUTAZIONE E PREVENZIONE DEL RISCHIO DA NANOMATERIALI: SALUTE, AMBIENTE E SICUREZZA ALIMENTARE*

#### *Caratterizzazione*

Moderatori: **Alessandro Alimonti, François Rossi**

- 10.00** **Barbara De Berardis**  
Caratteristiche fisico-chimiche delle NPs: cosa caratterizzare e come
- 10.20** **Ivana Fenoglio**  
Ruolo delle reazioni all'interfaccia tra superficie e fluido biologico nella tossicità /biocompatibilità dei nanomateriali
- 10.40** **Francesco Petrucci**  
Monitoraggio dell'esposizione a nanoparticelle: una nuova sfida analitica
- 11.00** *Pausa Caffè*

#### *Effetti sulla salute umana, Aspetti immunologici ed immunotossicologici*

Moderatori: **Andrea Zijno, Diana Boraschi**

- 11.20** **Pier Paolo Pompa**  
Impatto dei nanomateriali su sistemi in vitro e in vivo: il ruolo delle proprietà fisico-chimiche in scala nanometrica in nanotossicologia
- 11.40** **Francesca Larese Filon**  
Esposizione cutanea a nanomateriali ed effetti per la salute
- 12.00** **Flavia Barone**  
Effetti citotossici e genotossici di nanoparticelle di ZnO e TiO<sub>2</sub> in cellule umane del carcinoma del colon (Caco-2)

- 12.20 Diana Boraschi**  
Interazioni fra nanomateriali e sistema immunitario: modelli in vitro per l'analisi funzionale e di sicurezza biologica
- 12.40 Gabriella Di Felice**  
Interazioni fra nanomateriali e sistema immunitario: ruolo degli studi preclinici in vivo
- 13.00** *Pranzo e Sessione Poster*

*Esposizione occupazionale, Life-cycle Assessment, Ecotossicità,  
Nanomateriali negli alimenti*

Moderatori: **Alberto Mantovani, Luciana Sinisi**

- 14.10 Sergio Iavicoli**  
Ruolo della medicina del lavoro nello sviluppo sostenibile delle nanotecnologie
- 14.30 Gaetano Settimo**  
Rilevamento del materiale particellare in sorgenti industriali ed urbane:  
le particelle nanometriche
- 14.50 Paolo Masoni, Simona Scalbi, Grazia Barberio**  
Life Cycle Assessment di nanomateriali
- 15.10 Laura Canesi**  
Dall'ecotossicologia alla nanoecotossicologia: approccio nella valutazione dell'impatto biologico delle nanoparticelle in ambiente acquatico
- 15.30 Francesco Cubadda**  
Identificazione e caratterizzazione di nanomateriali di uso alimentare: l'esperienza del progetto NANOGENOTOX
- 15.50 Francesca Maranghi**  
Valutazione del rischio tossicologico di nanomateriali presenti negli alimenti
- 16.10 Vittorio Silano**  
La valutazione del rischio dei nanomateriali ingegnerizzati da parte del Comitato Scientifico dell'EFSA
- 16.30-17.30** *Sessione Poster*

## Venerdì 11 maggio

### Sessione II

#### *NANOMATERIALI IN MEDICINA: PREVENZIONE, DIAGNOSI E TERAPIA*

**09.00**     **Serena Borgna** - FP7 e Nanomedicina

*Diagnosi, Terapia, Medicina rigenerativa*

Moderatori: **Stefano Fais, Franz H. Kohnke**

**09.30**     **Franz Heinrich Kohnke**

Eterocalixareni contenenti unità pirroliche quali unità strutturali di nuovi farmaci, nanomateriali e sistemi di veicolazione

**09.50**     **Francesca Cavalieri**

Superfici e nanocolloidi per applicazioni diagnostiche e terapeutiche

**10.10**     **Stefano Fais**

Exosomi come prototipo di biomimetismo in nanomedicina

**10.30**     **Giovanna Mancini**

Liposomi cationici come sistemi di veicolazione di farmaci

**10.50**     *Pausa Caffè*

*Diagnosi, Terapia, Medicina rigenerativa*

Moderatori: **Stefania Meschini, Giovanna Mancini**

**11.10**     **Giuseppina Bozzuto**

Liposomi cationici per la terapia fotodinamica del glioblastoma

**11.30**     **Annarita Stringaro**

Microbolle e microcapsule in teranostica

**11.50**     **Magda Marchetti**

Nanoparticelle e infezioni virali

**12.10**     **Paolo Gasco**

Uso delle nanoparticelle lipidiche solide in medicina: applicazioni in oftalmologia

**12.30**     **Rossella Bedini**

La nanostrutturazione della superficie del titanio per un miglioramento delle terapie implantoprotesiche e dell'interazione tessuto umano-superficie implantare

**12.50**     **Antonio Chiesi, Natasa Zarovni**

Esperienza di una SME italiana sull'uso di un test per il rilevamento degli exosomi in varie patologie

**13.10**     *Pranzo e Sessione Poster*



## **Sessione I**

# **VALUTAZIONE E PREVENZIONE DEL RISCHIO DA NANOMATERIALI: SALUTE, AMBIENTE E SICUREZZA ALIMENTARE**



## **In vitro toxicity testing of nanomaterials at the Joint Research Centre**

François Rossi

European Commission Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, Ispra (VA)

[Francois.rossi@jrc.ec.europa.eu](mailto:Francois.rossi@jrc.ec.europa.eu)

Nanotechnology is a new fast emerging field that involves the development, manufacturing and measurement of materials and systems from sub micrometers down to few nanometers (nm). Furthermore, the unique and diverse physicochemical properties of nanoscale materials suggest that toxicological properties may differ from the corresponding bulk materials. Potential occupational and public exposure, through inhalation, oral ingestion, dermal absorption or by injection, of manufactured nanoparticles (mNPs), with particles size  $\leq 100$  nm probably will increase in the near future, although there is still a lack of information about the impact on environment and on human health of mNPs as well as reliable data on risk assessment.

The presented research approach consists in the selection, based on industrial interest, of mNPs, their synthesis, their complete physicochemical characterisation and assessment of their toxicological profile by *in vitro* systems relevant for human exposure. The experimental approach is based on a multidisciplinary strategy involving the use of *in vitro* tests in combination with advanced bioanalytical techniques. In this work, results concerning the study on Au, Ag and SiO<sub>2</sub> nanoparticles and their interaction with cells, cell culture media and proteins are presented. Results show very different types of interactions of NP inducing proteins structural changes. We observe moreover a cell and size dependent cytotoxicity for Au NP; size-dependent cytotoxicity for Ag NP; no cytotoxicity for all SiO<sub>2</sub> NP tested. Emphasis is put on proper NP characterisation and experimental caveat that can make the results of analysis difficult or impossible to interpret.

## **Caratteristiche fisico-chimiche dei nanomateriali: cosa caratterizzare e come**

Barbara De Berardis

Dipartimento Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma  
[barbara.deberardis@iss.it](mailto:barbara.deberardis@iss.it)

Il rapido sviluppo ed il largo impiego di nanomateriali (NM) in diversi prodotti commerciali ed industriali, dovuto alla loro maggiore reattività chimica e a peculiari proprietà ottiche, meccaniche, magnetiche, elettriche, dipendenti dalla loro nanostruttura, crea ampi scenari di esposizione a questa nuova classe di materiali.

La maggiore reattività di superficie dei NM implica una maggiore attività biologica per unità di massa rispetto ai materiali più grossolani che potrebbe rappresentare un rischio per la salute umana. Negli ultimi anni è stata acquisita, per alcuni tipi di NM, una maggiore conoscenza dei potenziali rischi associati all'esposizione a tali materiali, tuttavia i dati disponibili non consentono di identificare quali caratteristiche fisico-chimiche possono causare effetti negativi sulla salute della popolazione e sull'ambiente. L'impiego di metodi di misura standard di riferimento per la determinazione delle proprietà fisico-chimiche dei NM ha un ruolo fondamentale nell'identificazione del rischio e nell'implementazione del processo regolatorio.

A tal fine è stato istituito, nell'ambito dell'OECD, il Working Party on Manufactured Nanomaterial (WPMN) con l'obiettivo di valutare le implicazioni per la salute e per l'ambiente dei NM, seguendo un approccio scientifico standardizzato e condiviso a livello internazionale per la valutazione del rischio.

Nell'intervento saranno illustrate sia le caratteristiche fisico-chimiche, ritenute coinvolte nei processi di interazione con i sistemi biologici, che le metodiche analitiche più idonee per la loro determinazione tra quelle maggiormente diffuse, indicate dal WPMN.

Infine sarà illustrato uno studio di caratterizzazione condotto su due tipi di NM (ZnO e TiO<sub>2</sub>) nell'ambito di un accordo di collaborazione con l'Institute of Health and Consumer Protection, Joint Research Center della Commissione Europea.

I due NM sono stati caratterizzati mediante dynamic light scattering (DLS), microscopia elettronica a scansione e trasmissione (SEM, TEM) e spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS) per determinare dimensione, distribuzione dimensionale, stato di agglomerazione, concentrazione numero di particelle, forma, area di superficie, composizione e solubilità. La misura di tali proprietà ha permesso di valutare e discutere il loro ruolo nello studio dell'attività citotossica e genotossica dei NM di ZnO e TiO<sub>2</sub> su cellule umane del carcinoma del colon (Caco-2).

## **Ruolo delle reazioni all'interfaccia tra superficie e fluido biologico nella tossicità/biocompatibilità dei nanomateriali**

Ivana Fenoglio

Dipartimento di Chimica, Centro Interdipartimentale "G. Scansetti" per lo Studio degli Amianti e di altri Particolati Nocivi e Centro Interdipartimentale NIS, Università degli Studi di Torino  
[ivana.fenoglio@unito.it](mailto:ivana.fenoglio@unito.it)

La progettazione di nanomateriali ingegnerizzati sicuri per la salute umana ha come presupposto una conoscenza approfondita delle proprietà chimico-fisiche che ne determinano la tossicità. Sebbene il numero di studi tossicologici su nanomateriali stia rapidamente crescendo la caratterizzazione non esaustiva dei materiali usati nei test, così come il basso potere predittivo di alcuni modelli, impediscono spesso la definizione di precise relazioni struttura-attività. A questo, si aggiunge un'ancora scarsa conoscenza del ruolo delle interazioni delle nanoparticelle con i fluidi biologici.

La risposta biologica ai materiali solidi è una conseguenza diretta di una serie di processi chimico-fisici che avvengono all'interfaccia tra la loro superficie e i fluidi biologici. Nel campo dei biomateriali è noto come questi processi influenzino largamente la biocompatibilità del materiale [1]. Analogamente, per i materiali in forma nanometrica i processi di interfaccia sono determinanti nel definire il destino delle nanoparticelle nell'organismo ed il loro effetto biologico [2]. Tuttavia, la natura complessa di questi processi rende particolarmente difficile la loro comprensione a livello molecolare rappresentando quindi una delle maggiori sfide per la comunità scientifica che si occupa di nanomateriali e salute.

Tra i vari processi che possono avvenire alla superficie delle nanoparticelle rivestono una particolare importanza l'interazione con proteine [3-5] e le reazioni verso specie chimiche coinvolte nell'omeostasi delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) [2,4]. Una strategia per la comprensione di questi processi è l'utilizzo di sistemi simulanti l'ambiente biologico a complessità crescente. Questa strategia viene utilizzata da tempo nei nostri laboratori per correlare la reattività superficiale dei materiali nanometrici alla loro potenziale tossicità. In questa comunicazione verrà descritta tale strategia applicata alla preparazione di polveri di biossido di titanio (TiO<sub>2</sub>) a bassa reattività per applicazioni cosmetiche.

1. Thevenot P. et al., *Curr. Top. Med. Chem.* **8** (2008) p. 270.
2. Nel A. et al. *Nature Materials*, **8** (2009) p.543
3. Lynch I. et al. *Adv. Coll. Interf. Sci.* **134–135** (2007) p. 167.
4. Fenoglio I. et al. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **63** (2011) p. 1186-1209
5. Pietroiusti A. *Nanoscale*, **4** (2012) p. 1231.

## **Monitoraggio dell'esposizione a nanoparticelle: una nuova sfida analitica**

Francesco Petrucci, Beatrice Bocca e Alessandro Alimonti

Reparto Bioelementi e Salute, Dipartimento Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria,  
Istituto Superiore di Sanità, Roma  
[francesco.petrucci@iss.it](mailto:francesco.petrucci@iss.it)

Su scala nanometrica la materia presenta proprietà a volte molto sorprendenti che l'industria mondiale sta già sfruttando in migliaia di applicazioni e prodotti nanotecnologici di consumo, quali pitture, tessuti, prodotti per l'igiene, creme solari e cosmetici (TiO<sub>2</sub>, ZnO) e alimenti (SiO<sub>2</sub>, Ag, ecc.). Un largo utilizzo ne viene fatto anche in nanomedicina principalmente nel trasporto di farmaci, nelle terapia genica, nella diagnosi e terapia dei tumori (Fe e Ag supermagnetici). In ambito ambientale è da ricordare il rilascio di nanoparticelle di metallo da marmitte catalitiche (Pt su Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CeO<sub>2</sub>).

L'uso sempre più diffuso delle nanoparticelle impone una attività di ricerca tossicologica sui potenziali rischi per la salute umana che, a sua volta, presuppone un indispensabile sviluppo analitico finalizzato alla caratterizzazione chimica delle nanoparticelle in termini di concentrazione, forma, struttura, dimensione e grado di aggregazione in matrici biologiche e ambientali, oltre che nei prodotti di consumo.

A tal fine è indispensabile sviluppare e validare metodi di estrazione, frazionamento e caratterizzazione delle nanoparticelle tramite tecniche analitiche specifiche quali la FFF (field-flow fractionation), il MALS (Multi Angle Light Scattering) usate singolarmente o, spesso, combinate con l'ICP-MS (inductively coupled plasma mass spectrometry).

L'FFF permette di separare particelle con dimensioni che vanno da pochi nm a centinaia di nm, mentre attraverso l'uso del rivelatore MALS è possibile individuare grandezza e distribuzione, grado di aggregazione, struttura e forma delle nanoparticelle. Grazie all'ICP-MS è invece possibile determinare la concentrazione dell'eventuale metallo presente in ciascuna frazione nanoparticellare, in un ampio intervallo di concentrazione (da ppt a ppm). Inoltre, l'ICP-MS utilizzato in modalità "single particle" permette uno screening veloce, anche se di tipo semiquantitativo, del contenuto di nanoparticelle di metallo in campioni biologici (siero, urine), ambientali (acque, particolato atmosferico, suoli e sedimenti) o in prodotti di largo consumo (per es., cosmetici, colori per tatuaggi).

# **Impatto dei nanomateriali su sistemi in vitro e in vivo: il ruolo delle proprietà fisico-chimiche in scala nanometrica in nanotossicologia**

Pier Paolo Pompa

Center for Bio-Molecular Nanotechnology, Istituto Italiano di Tecnologia, Arnesano, Lecce  
[pierpaolo.pompa@iit.it](mailto:pierpaolo.pompa@iit.it)

In questa presentazione verranno presentate le facilities di nanobiotechnologia di IIT-CBN e le attività di ricerca della piattaforma EHS nel campo della nanotossicologia. Tali studi sono fortemente incentrati sulla comprensione delle interazioni tra sistemi viventi e nanomateriali. L'obiettivo principale della piattaforma EHS è quello di individuare le risposte dei sistemi biologici in seguito ad interazione con materiali su scala nanometrica (nanoparticelle colloidali o substrati solidi nanostrutturati), con una forte enfasi nell'identificazione e classificazione delle risposte biologiche in funzione delle dimensioni, forma, composizione e struttura dei nanomateriali. Numerosi ed approfonditi studi dei meccanismi di interazione sono eseguiti mediante una sistematica applicazione di approcci multidisciplinari, che prevedono l'uso combinato di diverse tecniche che abbracciano la nanochimica, la nano-tossicogenomica, la nano-proteomica, unitamente a strumenti di imaging avanzati. Come modello biologico, sono utilizzati colture cellulari, batteriche e piccoli animali modello al fine di sviluppare strumenti metrologici appropriati ed affidabili in grado di fornire una valutazione generale della potenziale tossicità delle nanoparticelle. In particolare, verranno presentati gli effetti tossici di una vasta gamma di nanomateriali, accuratamente caratterizzati, dimostrando il ruolo chiave di dimensioni, forma, rivestimento superficiale, dose-metrics, e caratteristiche di superficie su nanoscala [1-14]. Inoltre, si discuterà il comportamento peculiare di nanoparticelle “nanorugose” e dalla superficie ingegnerizzata. Si mostrerà, infine, lo sviluppo di nanomateriali innovativi aventi proprietà tunabili su scala nanometrica, che consentono studi di nanotossicità altamente controllati e si evidenzierà il loro potenziale impiego in nanomedicina e drug delivery.

1. Vecchio G et al., PLoS One 7 (2012) e29980.
2. Vecchio G et al., Nanomedicine 8, ( 2012) p. 1(Cover article).
3. Malvindi M A et al., Nanoscale 4 (2012) p. 486.
4. Kshirsagar P et al., Coll. Surf. A 392 (2011) p. 264.
5. Sabella S et al., J. Nanopart. Res. 13 (2011) p. 6821.
6. Pompa P P et al., Nanoscale 3 (2011) P. 2889.
7. Cingolani R et al., Nanomedicine 6 (2011) p. 1483.
8. Sabella S et al., J. Nanosci. Lett. 1 (2011) p. 145.
9. Rizzello L et al., ACS Nano 5 (2011) p. 1865.
10. Maiorano G et al., Nanoscale 3 (2011) p. 2227.
11. Pompa P P et al., Nano Research 4 (2011) 405.
12. Maiorano G et al., ACS Nano 4 (2010) p. 7481.
13. Bardi G et al., Biomaterials 31 (2010) p. 6555.
14. Brunetti V et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107 (2010) p.6264.

## Esposizione cutanea a nanomateriali e impatto per la salute

Francesca Larese Filon

Unità Clinico Operativa di Medicina del Lavoro – Università degli Studi di Trieste  
[larese@units.it](mailto:larese@units.it)

La crescente immissione sul mercato di prodotti che possono contenere nanoparticelle (NP) apre interrogativi in relazione al loro possibile impatto per la salute dei lavoratori che li producono e dei consumatori che li utilizzano. La cute è usualmente vista come una barriera impermeabile attraverso la quale il materiale nanoparticolato non penetra, ma vi sono evidenze sperimentali che dimostrano come alcuni tipi di NP possano penetrare la cute e raggiungere l'epidermide e il derma in misura tanto maggiore quanto più piccola è la loro dimensione [1]. Tickle (2004) ha dimostrato che la flessione della cute permette la penetrazione di NP di destrano e Alvarez-Roman (2004) che NP di polistirene si localizzano a livello dei follicoli piliferi. Lo studio europeo Nanoderm, tuttavia, ha escluso che NP di titanio biossido e di zinco ossido possano penetrare attraverso la cute, definendo sicura l'applicazione cutanea di creme contenenti tali prodotti. Ma uno studio realizzato su volontari ha dimostrato che si possono rilevare tracce di Zn a livello ematico e urinario dopo applicazione cutanea di queste creme ZnO [2]. Il biossido di titanio è un materiale fotoattivo e l'esposizione solare può determinare la liberazione di radicali liberi nella cute esposta con potenziale effetto genotossico. Per prevenire questo fenomeno Livraghi [3] propone di modificare la superficie delle TiO<sub>2</sub>NP con carbonio, bloccando la sua reattività e rendendo il prodotto più sicuro per il suo utilizzo come schermante solare.

E' nota la capacità irritante dei nanotubi di carbonio che causano una dermatite irritativa nei lavoratori esposti [4] ed irritazione congiuntivale su modelli animali. Hirai et al. (2012) hanno dimostrato che NP di silice peggiorano la dermatite atopica indotta in topi con iniezione sottocutanea di *dermatofagoides farinae* e NP.

L'applicazione di fullereni sulla cute del topo può indurre tumori cutanei benigni se viene applicato anche un iniziatore cancerogeno (dimetilbenzoantracene) ma non se usati da soli [5].

Altre NP ampiamente già presenti sul mercato sono quelle con argento: Korani ha studiato la loro tossicità applicandole sulla cute dei porcellini d'India [6] e rilevando anomalie istopatologiche dose-dipendenti nella cute, nel fegato e nella milza. Kim [7] ha riportato un debole sensibilizzante nei porcellini d'India e Zanette [8] ha dimostrato in vitro un effetto antiproliferativo su cellule Hacat.

Vi è la necessità di maggiori studi sia di tipo sperimentale ma anche su lavoratori e consumatori esposti al fine di chiarire quali sono le NP che possono avere un impatto sulla nostra salute attraverso la via cutanea.

1. Crosera M et al., *Int Archiv Occup Environ Med* 82 (2009) p. 1043.
2. Gulson B et al., *Toxicol Sci* 118 (2010) p.140.
3. Livraghi S et al., *Chem Commun (Camb)* 28 (2010) p.8478
4. Eedy DJ et al. *Contact Dermatit* 35 (1996) p. 362.
5. Surekha P et al. *Cutan Ocul Toxicol.* 1 (2012) p.26.
6. Korani et al., *Int J Nanomedicine* 6 (2011) p. 855.
7. Kim JS et al., *Nanotoxicology* Mar 14 (2012) [Epub ahead of print]
8. Zanette C et al., *Toxicology in vitro* 25 (2011) p. 1053.

## **Effetti citotossici e genotossici di nanoparticelle di ZnO e TiO<sub>2</sub> in cellule umane del carcinoma del colon (Caco-2)**

Flavia Barone

Dipartimento Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma  
[barone@iss.it](mailto:barone@iss.it)

Negli ultimi anni lo sviluppo delle nanotecnologie sta crescendo in maniera esponenziale con l'immissione sul mercato di una grande quantità di prodotti che contengono nanomateriali ingegnerizzati (NPs). In particolare, le nanoparticelle di ossidi di metalli vengono già ampiamente utilizzate in numerose applicazioni industriali e mediche, per cui è necessario effettuare una corretta valutazione tossicologica per ridurre i potenziali rischi per la salute umana e per l'ambiente collegati al loro utilizzo.

Nell'ambito di una collaborazione tra l'ISS e l'Institute of Health and Consumer Protection, Joint Research Center della Commissione Europea, è stato svolto uno studio per valutare la citotossicità e genotossicità di nanoparticelle di ZnO e di TiO<sub>2</sub> su una linea cellulare umana del carcinoma del colon (Caco-2). Questa linea cellulare rappresenta un buon modello in vitro per studi di esposizione orale a NPs. Sono state utilizzate due differenti tecniche per determinare la citotossicità in presenza ed in assenza di siero ed entrambe hanno evidenziato un effetto citotossico, dipendente dalla dose e dal tempo, indotto soltanto dalle ZnO NPs. Quest'effetto è maggiormente evidente in assenza di siero. È stata inoltre valutata l'influenza dell'area di superficie e della concentrazione numero di particelle sulla citotossicità osservata. L'uptake delle NPs, determinato tramite ICP-MS, ha indicato una maggiore interazione cellule-NPs in assenza di siero, più evidente per le TiO<sub>2</sub> NPs. La determinazione dei livelli intracellulari di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e del rilascio di mediatori dell'infiammazione hanno rivelato una differente induzione di stress ossidativo da parte delle due NPs testate. Per la valutazione della genotossicità è stato misurato il danno cromosomico tramite la tecnica del Micronucleo che ha evidenziato un'induzione di danno, dipendente dalla dose, soprattutto da parte delle ZnO NPs. È stato infine determinato il danno ossidativo al DNA, misurando i livelli basali di 8-oxodG dopo diversi tempi di trattamento. La maggiore induzione di danno è stata osservata, tramite HPLC/EC, dopo 6 ore di trattamento con entrambe le NPs. Le cinetiche di riparazione del danno ossidativo al DNA hanno rivelato una differente capacità riparativa da parte delle cellule trattate con le NPs testate.

## **Interazioni fra nanomateriali e sistema immunitario: modelli in vitro per l'analisi funzionale e di sicurezza biologica**

Diana Boraschi e Paola Italiani

CNR, Istituto di Tecnologie Biomediche, Pisa

L'immunità innata e l'infiammazione costituiscono un sistema di difesa che reagisce rapidamente agli stimoli estranei, allo scopo di eliminare l'agente pericoloso e ripristinare l'omeostasi del tessuto interessato. In base alla grandezza e alla forma, i materiali micro- e nano-particolati possono essere riconosciuti dalle cellule innate/infiammatorie e stimolare delle reazioni simili a quelle iniziate da microorganismi infettivi (batteri extracellulari e virus intracellulari). L'ampiezza e la durata della reazione determinano l'effetto biologico, o come una reazione fisiologica di difesa che si risolve con il ritorno al livello di base, oppure come un'infiammazione persistente che può degenerare in una condizione patologica. Per riprodurre in maniera rappresentativa l'andamento della reazione infiammatoria nell'uomo, sono stati sviluppati e caratterizzati dei modelli *in vitro* basati su monociti umani primari che riproducono l'intero corso della reazione in risposta a batteri o virus. Un analogo modello cellulare è in corso di ottimizzazione, capace di riprodurre in coltura le condizioni e reazioni di infiammazione cronica caratteristiche dell'artrite reumatoide. Questi modelli della reazione innata/infiammatoria umana normale e patologica sono in corso di utilizzo per valutare gli effetti biologici delle nanoparticelle ingegnerizzate (NP), nell'ambito di studi dedicati alla valutazione del rischio biologico delle NP. Lo scopo è quello di identificare, al di là del più diretto effetto citotossico, la capacità di NP diverse di interferire con il corretto svolgimento della reazione di difesa, alterandone il corso o l'ampiezza e deviandola verso una direzione pre-patologica.

Esperimenti preliminari sono stati condotti sul modello di infiammazione fisiologica con NP di oro, argento e ossido di zinco (sferiche, diametro 20 nm), sintetizzate e caratterizzate da Victor Puentes e Eudald Casals (ICN, Barcelona) in un solvente biocompatibile e trovate libere da contaminazione di LPS. Le NP sono state pre-incubate in siero umano AB per 1 ora a 37°C e poi diluite 10-20 volte in terreno di coltura, per raggiungere una concentrazione finale di 3 µg/ml. I monociti umani in coltura sono stati esposti alle NP in maniera cumulativa (aggiunte alla coltura ai tempi 0, 2, 4, 6, 14 h) e sottoposti alla serie di condizioni (cocktails di citochine, fattori microbici e innalzamento di temperatura) che riproducono l'andamento della reazione innata/infiammatoria. I dati preliminari ottenuti mostrano effetti delle NP su alcuni dei parametri misurati (sia come espressione genica in real-time PCR che come cinetica di produzione di citochine infiammatorie e anti-infiammatorie). In tutti i casi tuttavia gli effetti sono transeunti e l'andamento cinetico della reazione fisiologica non viene alterato. Ciò suggerisce che le NP saggiate, anche se in grado di stimolare una reazione da parte dei monociti, non alterano in maniera significativa l'andamento della reazione stessa e, soprattutto, non ne inducono la cronicizzazione pre-patologica.

I punti salienti di questo studio possono essere riassunti come segue:

1. è necessario utilizzare modelli sperimentali rappresentativi, per poter determinare in maniera realistica il rischio posto dalle NP alla salute umana;
2. nel caso dell'immunità innata e infiammazione, i modelli *in vitro* basati su cellule umane primarie sono preferibili all'uso di linee continue o di saggi sugli animali, che non rappresentano adeguatamente la reattività umana;
3. l'accurata caratterizzazione delle NP, soprattutto per quanto riguarda la contaminazione biologicamente attiva (LPS), è di importanza centrale per la corretta valutazione del rischio posto dalle NP;
4. la valutazione cinetica degli effetti biologici è essenziale per discriminare fra normali variazioni omeostatiche ed effetti pre-patologici;
5. in tali condizioni, nessuna delle NP saggiate è risultata in grado di esercitare effetti biologicamente rilevanti.

## **Interazioni fra nanomateriali e sistema immunitario: ruolo degli studi preclinici in vivo**

Gabriella Di Felice

Dipartimento Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma  
[gabriella.difelice@iss.it](mailto:gabriella.difelice@iss.it)

L'impiego crescente di nanomateriali per applicazioni biomediche, come la veicolazione di farmaci e vaccini o la diagnostica per immagini, pone in evidenza la mancanza di adeguate conoscenze riguardo alle loro interazioni con le diverse componenti del sistema immunitario (SI). Il SI è responsabile del riconoscimento differenziale di segnali esterni all'organismo, provenienti da microorganismi, antigeni estranei, composti organici ed inorganici, attraverso i due compartimenti delle risposte immuni innate ed adattative. Dopo somministrazione sistemica o locale, i nanomateriali incontrano le componenti cellulari del SI nel torrente ematico e nei tessuti. Le conseguenti potenziali interazioni possono influenzare la biodistribuzione dei nanomateriali e l'effettivo raggiungimento dei loro siti bersaglio, contribuendo quindi al differente esito delle risposte biologiche previste. D'altra parte, gli stessi nanomateriali possono influenzare la vitalità e le attività funzionali delle popolazioni cellulari del SI, provocando così effetti collaterali non desiderati. Per queste ragioni, è fondamentale inserire nella fase di progettazione di nanomateriali destinati ad applicazioni cliniche l'adeguata definizione del loro impatto sul SI, la previsione del rischio immunologico e lo sviluppo di specifici saggi per la valutazione dell'immunotossicità e della sicurezza immunologica.

La valutazione preclinica delle interazioni dei nanomateriali con il SI è complicata dalla limitata disponibilità di specifiche procedure e linee-guida armonizzate, a sua volta derivante dalla impossibilità di definire un unico semplice saggio (in vitro o in vivo) in grado di determinare in modo esauriente il potenziale rischio immunologico ed immunotossico associato all'ampia varietà di nanomateriali sino ad oggi identificati ed applicati a scopi biomedici. In questo scenario, sottoporre i nanomateriali in sviluppo ad un pannello di saggi immunologici complementari dovrebbe consentire una valutazione esaustiva, e migliorare contemporaneamente la conoscenza delle proprietà fisico-chimiche coinvolte nei meccanismi di riconoscimento ed impatto sul SI, o nella potenziale immunotossicità.

Un ulteriore livello di complessità è identificabile nella considerazione che gli effetti immunologici dei nanomateriali non coincidono esclusivamente con l'immunotossicità: infatti, essi possono interferire con le attività fisiologiche del SI come la normale risposta protettiva verso infezioni e tumori, o indurre essi stessi risposte difensive, come l'infiammazione e l'attivazione del complemento, che a loro volta risultano in danno tissutale ed esiti patologici.

Gli studi in vivo in opportuni modelli animali consentono una valutazione significativa di questi aspetti, che includono lo studio della antigenicità e immunogenicità dei nanomateriali, della loro capacità di indurre risposte infiammatorie, e delle proprietà immunomodulatorie, adiuvanti o al contrario immunosoppressive verso risposte indotte da classici antigeni impiegati nello studio di risposte anticorpali e cellulo-mediate. Almeno alcune di queste informazioni non possono essere ottenute dall'uso esclusivo di saggi in vitro, per altre è necessaria ed auspicabile una validazione dei risultati ottenuti in vitro con i corrispondenti dati ex vivo ed in vivo per la dimostrazione della loro rilevanza fisiologica, nel rispetto dei principi etici e scientifici che regolano la sperimentazione animale.

## **Ruolo della salute e della sicurezza del lavoro nello sviluppo sostenibile delle nanotecnologie**

Sergio Iavicoli, Fabio Boccuni

INAIL, Settore Ricerca, Dipartimento di Medicina del Lavoro, Roma  
[s.iavicoli@inail.it](mailto:s.iavicoli@inail.it)

Le nanotecnologie offrono grandi opportunità di sviluppo sociale ed economico in vari settori. Esse non rappresentano una singola tecnologia o unica disciplina scientifica [1], bensì una tecnologia che contribuisce a fornire al prodotto un valore aggiunto applicabile in molti settori e che coinvolge numerose discipline scientifiche [2]. Il tasso di crescita nel mondo dei principali indicatori (quali forza-lavoro, pubblicazioni, brevetti, prodotti sul mercato, fondi per la ricerca e sviluppo e “*venture capital*”) dello sviluppo globale delle nanotecnologie e delle opportunità per ricerca formazione, innovazione e implicazioni sociali, è stimato pari al 25% annuo [3,4]. L’esposizione in ambiente di lavoro può avvenire durante ciascuna fase del ciclo di vita dei nanomateriali ingegnerizzati dalla ricerca e sviluppo, alla manifattura, alla produzione, fino al riciclaggio o allo smaltimento dei rifiuti, e riguarda trasversalmente numerosi tipi di nanomateriali in molti settori produttivi [2,5].

Pertanto le nanotecnologie presentano numerose criticità e nuove sfide per la salute e sicurezza del lavoro per cui, come ribadito più volte in ambito di politiche Europee, è necessario combinare il valore aggiunto della competitività scientifica e industriale con le esigenze di prevenzione e protezione della salute, in un approccio integrato, sicuro, responsabile, sostenibile e socialmente accettato [6,7].

In questo quadro l’INAIL ha rafforzato il proprio impegno nell’ambito del Network Nazionale “NanOSH Italia”, nato dall’esperienza dell’ex ISPESL, con le finalità di promuovere la cooperazione e avviare attività integrate di ricerca sugli effetti dell’esposizione lavorativa a nanomateriali, proponendo un approccio multidisciplinare alla valutazione e gestione del rischio. Il Network è composto da ricercatori provenienti da Enti di Ricerca e Università, e da rappresentanti delle Istituzioni e del mondo delle imprese che ricoprono ruoli chiave nei tavoli decisionali per le politiche di salute occupazionale in Italia.

Primo risultato di questa collaborazione è il “Libro Bianco” sull’esposizione a nanomateriali ingegnerizzati e gli effetti sulla salute e sicurezza dei lavoratori, integrato nel 2012 con i risultati del processo di consultazione dei principali stakeholders del settore, in cui si propone una ricognizione dello stato dell’arte sul tema a livello nazionale e si affrontano le questioni chiave per lo sviluppo della ricerca e l’approccio alle politiche di regolamentazione [8].

1. Boccuni F. et al. J Clean Prod 16 (2008) pp. 949-956.
2. Schulte P.A. et al. Ital. J. Occup. Environ. Hyg. 1(2) (2010) pp. 63-68.
3. Roco M.C. et al. J Nanopart Res 13 (2011) pp. 897-919.
4. Roco M.C. J Nanopart Res 13 (2011) pp. 427-445.
5. Iavicoli S. et al. Hum. Exp. Toxicol. 28 (2009) pp. 433-443.
6. Conclusions of the European Council, Doc 12487/04 (24 September 2004).
7. Mattarolo M.G. and Muratorio A. SCRIPTed 7(3) (2010) pp. 515-531.
8. INAIL. (2011) ISBN 978-88-7484-206-3.

## **Rilevamento del materiale particolato in sorgenti industriali ed urbane: le particelle nanometriche**

Gaetano Settimo

Reparto Igiene dell'Aria, Dipartimento Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria,  
Istituto Superiore di Sanità, Roma  
[gaetano.settimo@iss.it](mailto:gaetano.settimo@iss.it)

La grande attenzione che si attribuisce al materiale particolato dipende, dal fatto che sono stati osservati effetti acuti (incremento della mortalità giornaliera, incremento di disturbi respiratori e di ricoveri ospedalieri per tali cause) ed effetti a lungo termine (mortalità e patologie respiratorie), seppure con un numero minore di dati (WHO 2000). L'orientamento della ricerca, si è quindi rivolto verso le particelle PM<sub>10</sub> e PM<sub>2,5</sub>, e, più recentemente alle particelle ultrafini (PUF) con diametro inferiore a 100 nm, presenti in numero ingente anche se con massa irrilevante; e con la capacità di indurre effetti sanitari negativi maggiori di quelli dovuti a particelle similari a maggiori granulometrie originate essenzialmente dai processi di combustione.

In Italia sono ormai numerosi gli studi aventi per oggetto l'inquinamento da particelle PUF sia in aria ambiente che alle emissioni.

Negli ambienti urbani caratterizzati da flussi di traffico continui ed intensi le sorgenti di particelle PUF sono numerosissime e contribuiscono a creare un livello di concentrazione numerica di fondo abbastanza uniforme.

Benché attualmente la misura sistematica di tale parametro sia ancora molto limitata, i dati ad oggi disponibili indicano che essa è molto variabile, e risulta circa 10<sup>3</sup>/cm<sup>3</sup> nel fondo continentale pulito, e può superare 10<sup>5</sup>/cm<sup>3</sup> nell'aria inquinata urbana.

Per quanto riguarda le emissioni prodotte da sorgenti industriali, in alcuni paesi europei sono stati effettuati programmi specifici di studio, al fine di avere una indicazione sui livelli di particelle PUF emessi. I dati prodotti indicano livelli molto variabili ma risultano inferiori a quelli misurati in aria ambiente, soprattutto per gli impianti dotati delle migliori tecniche disponibili (BAT).

Attualmente vale la pena ricordare come siano a lavoro diverse Commissioni e gruppi di lavoro su problematiche che riguardano le particelle PUF, con lo scopo di costituire concreti punti di riferimento per gli operatori sia pubblici che privati (es. industria).

A tal proposito vanno ricordati anche i documenti di riferimento europeo, elaborati dagli organismi di normazione come il Comitato Normativo Europeo (CEN) e l'*International Organization for Standardization* (ISO), che da tempo sono impegnati nello studio delle migliori indicazioni tecniche che riguardano i tempi e i modi per effettuare i controlli (metodologie di campionamento, di analisi e di valutazione dei livelli misurati).

L'Istituto Superiore di Sanità, ha attivato dal 2001 due stazioni di rilevamento (Stazione Orto Botanico e Stazione ISS) dove vengono misurate oltre alle concentrazioni in termini ponderali del materiale particolato PM<sub>10</sub> e PM<sub>2,5</sub>, anche le particelle PUF con strumenti a cella di condensazione *Condensation Particle Counter* (CPC).

## Life Cycle Assessment dei nanomateriali

Paolo Masoni<sup>1</sup>, Grazia Barberio<sup>2</sup>, Simona Scalbi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unità Tecnica Modelli, Metodi e Tecnologie per le Valutazioni Ambientali, ENEA, Bologna

<sup>2</sup>Unità Tecnica Tecnologie Ambientali, ENEA, Roma

[paolo.masoni@enea.it](mailto:paolo.masoni@enea.it)

La dimensione “nano” conferisce ai nanomateriali (NM) caratteristiche uniche e proprietà ottiche, meccaniche, elettriche, catalitiche innovative che ne hanno reso vantaggioso e promettente l'utilizzo in moltissimi settori. Le proprietà emergenti a livello nano comportano però anche caratteristiche non convenzionali in termini di tossicità ed ecotossicità, pertanto vi sono dubbi sul fatto che la maggiore mobilità e reattività delle nanoparticelle possano generare potenziali danni per la salute umana e dell'ambiente. Pertanto risulta necessario studiare e quantificare gli effetti sull'ambiente e sulla salute umana dei NM e dei prodotti che li utilizzano, per un corretto sviluppo dell'intera filiera fin dalla fase di progettazione, usando un approccio di ciclo di vita, dalla loro produzione all'uso, fino allo smaltimento.

Lo strumento più diffuso e standard è la Valutazione del Ciclo di Vita, Life Cycle Assessment (LCA). Essa permette di quantificare un profilo ambientale per differenti indicatori di impatto (effetto serra, acidificazione, utilizzo di risorse, eutrofizzazione, tossicità umana, ecotossicità, ecc.), e di effettuare analisi di comparazione con prodotti tradizionali (non nano) aventi le stesse funzioni, al fine di identificarne le criticità, evitare lo spostamento di carichi ambientali e suggerire interventi di miglioramento. Le applicazioni dell'LCA ai NM sono sinora scarse ed ancora affette da limiti e lacune, riguardanti in particolare le categorie di impatto sulla salute umana ed ecologica, oltre altri aspetti metodologici e di disponibilità dei dati. In particolare, spesso i NM sono utilizzati in prodotti che svolgono o integrano le funzioni tradizionali altre innovative, per le quali non è sempre facile specificare alternative convenzionali. Ciò comporta difficoltà e criticità nella definizione dell'unità funzionale, ossia la misura della prestazione del flusso in uscita funzionale del sistema prodotto, a cui vengono rapportati tutti gli impatti calcolati. Per quanto riguarda i dati, occorre segnalare la scarsità di dati specifici relativi ai processi di produzione industriale dei NM e al loro rilascio nell'ambiente durante l'uso e il fine vita dei prodotti che gli utilizzano. Attraverso una diffusione degli studi di LCA di NM si potrà ovviare all'attuale carenza di dati, rendendo i successivi studi più semplici ed agevoli da condurre. Il tema della corretta valutazione degli impatti di (eco)tossicità, oltre alla generale scarsità di dati, risulta ulteriormente complicato a causa dell'oggettiva complessità dei fenomeni tossicologici e degli scenari di esposizione, influenzati da numerosi fattori che travalicano la semplice specie chimica. Per questo motivo i fattori di caratterizzazione risultano di complessa quantificazione.

Il superamento degli attuali limiti può derivare sia da una maggiore diffusione degli studi di LCA con la raccolta di dati sperimentali, sia, per le categorie di (eco)tossicità, dall'utilizzo combinato del Risk Assessment (RA). LCA e RA infatti si complimentano e supportano a vicenda: l'LCA conferisce prospettiva olistica identificando i punti significativi nel ciclo di vita in cui intervenire con un'analisi più completa di RA, il quale a sua volta fornisce il metodo per indagare in maniera specifica gli effetti sulla salute umana e degli ecosistemi dei NM.

## **Dall'ecotossicologia alla nanoecotossicologia: approccio nella valutazione dell'impatto biologico delle nanoparticelle in ambiente acquatico**

Laura Canesi

DIPTERIS - Dipartimento per lo Studio del Territorio e delle sue Risorse, Università di Genova  
[Laura.Canesi@unige.it](mailto:Laura.Canesi@unige.it)

La continua produzione e immissione nell'ambiente di nanomateriali ha accelerato l'esigenza di determinare la tossicità di diversi tipi di nano particelle (NP). La valutazione dell'impatto biologico delle NP in diversi tipi di ambienti si è inizialmente avvalsa dell'utilizzazione di test standard di ecotossicità. Tali test sono stati condotti prevalentemente su organismi modello viventi nell'ambiente acquatico, che rappresenta il naturale bacino di deposizione di tutti gli inquinanti, incluse le NP. In quest'ottica, la nanoecotossicologia è ancora ai suoi inizi, in quanto la messa a punto di test di specifici per le NP è limitata attualmente da diversi fattori, che rendono difficoltosa la possibilità di stabilire una precisa relazione tra le caratteristiche fisico-chimiche delle NP e gli effetti tossici osservati. Tra questi, le variabili sia di tipo chimico fisico, che influenzano il comportamento delle NP nell'ambiente ricevente e la loro biodisponibilità, che quelle di tipo biologico, che coinvolgono i processi di assunzione, eliminazione ed eventuale accumulo delle NP da parte di diversi tipi di organismi.

I risultati dei test di ecotossicità, se da un lato hanno permesso di evidenziare il rischio di esposizione alle NP per organismi che vivono nella colonna d'acqua o a contatto col sedimento, indicano una tossicità delle NP per gli organismi acquatici generalmente bassa. I Biomarker di stress ambientale, che forniscono indicazioni sugli effetti sub-letali degli agenti stressanti e dei meccanismi coinvolti, rappresentano indicatori molto più precoci e sensibili delle alterazioni della fisiologia a livello di individuo, che possono risultare in effetti nocivi a livelli superiori di organizzazione biologica (riproduttivi e di popolazione). L'applicazione dei biomarker in organismi sentinella, insieme ad una accurata caratterizzazione chimico-fisica delle NP, costituisce un approccio più efficace nella valutazione dell'impatto biologico di diversi tipi di NP nell'ambiente acquatico. Inoltre, l'introduzione dell'approccio tossicogenomico può fornire un potente strumento per ottenere informazioni sui bersagli molecolari delle NP in modelli animali rilevanti dal punto di vista ecologico.

## **Identificazione e caratterizzazione di nanomateriali di uso alimentare: l'esperienza del progetto NANOGENOTOX**

Francesco Cubadda, Federica Aureli, Marilena D'Amato, Gabriele Moracci, Andrea Raggi

Dipartimento Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma  
[francesco.cubadda@iss.it](mailto:francesco.cubadda@iss.it)

L'esposizione a nanomateriali attraverso la dieta può avvenire come risultato di scenari diversi. Particelle nel range dimensionale 'nano', di origine sia antropogenica che naturale, possono fare ingresso come contaminanti a vari livelli della catena alimentare. Uno scenario diverso è rappresentato dall'uso intenzionale che origina dall'applicazione delle nanoscienze e delle nanotecnologie al settore agroalimentare, con la produzione di nanomateriali ingegnerizzati (ENM) per 'contenitori intelligenti' e altri materiali a contatto con gli alimenti, nano-Ag con funzione antimicrobica, nano-SiO<sub>2</sub> per influenzare la consistenza dei prodotti alimentari, etc. Infine, alcuni additivi alimentari autorizzati contengono una frazione in nanoforma. I diversi scenari si possono combinare dando luogo a pattern di esposizione complessi. Gli studi *in vitro* e *in vivo* concernenti la tossicità orale non sono molto numerosi e riguardano prevalentemente ENM inorganici (iENM), quali metalli o loro ossidi. Questi studi hanno evidenziato una varietà di effetti potenziali ma presentano limitazioni importanti, quali una caratterizzazione insufficiente degli ENM somministrati e l'uso di dosi irrealisticamente elevate con potenziale diminuzione della biodisponibilità e tossicità a seguito di fenomeni di agglomerazione/aggregazione; vi è inoltre carenza di studi *in vivo* di dose ripetuta e in particolare di tossicità (sub)cronica.

Il progetto europeo NANOGENOTOX [1] ha affrontato alcune di queste criticità al fine di conseguire risultati trasferibili in termini di valutazione e gestione del rischio genotossico di ENM. Ciò ha comportato, fra l'altro, lo sviluppo di approcci idonei all'identificazione e caratterizzazione degli ENM oggetto di indagine non solo allo stato primitivo, ma anche nelle condizioni e alle concentrazioni reali di impiego/presenza nei veicoli per la sperimentazione tossicologica e nei tessuti e fluidi biologici. In questo contesto, il nostro gruppo di lavoro ha individuato soluzioni originali che hanno consentito di superare le difficoltà analitiche poste dallo studio della nano-silice utilizzando l'ICP-MS quale detector atomico per la determinazione del Si. L'esperienza maturata viene discussa alla luce dei problemi analitici posti dalla recente raccomandazione della CE per la definizione di nanomateriale e delle problematiche connesse all'estrazione, separazione e caratterizzazione di iENM in matrici alimentari e in campioni derivanti dalla sperimentazione tossicologica. Particolare enfasi viene posta sulla determinazione di iENM mediante ICP-MS, incluso lo sviluppo di piattaforme analitiche che combinano on-line *field-flow fractionation* (FFF), *dynamic light scattering* (DLS), *multi angle light scattering* (MALS). In questo contesto vengono discusse le potenzialità connesse all'impiego dell'ICP-MS in *time resolved mode* e illustrate le prospettive della modalità *single particle* (sp-ICP-MS).

1. [www.nanogenotox.eu](http://www.nanogenotox.eu)

Questa ricerca è stata in parte finanziata dall'Executive Agency for Health and Consumers (NANOGENOTOX Joint Action, Grant Agreement 2009 21 01).

## Valutazione del rischio tossicologico di nanomateriali presenti negli alimenti

Francesca Maranghi, Roberta Tassinari

Reparto di Tossicologia Alimentare e Veterinaria,  
Dipartimento Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma  
[francesca.maranghi@iss.it](mailto:francesca.maranghi@iss.it)

Le caratteristiche fisico-chimiche dei nanomateriali (NM) come l'aumentata resistenza, reattività chimica e conducibilità rispetto al composto chimico in macroscale sono alla base della grande diffusione, sollevando interrogativi sulla sicurezza per il consumatore. A livello dell'Authority Europea per la Sicurezza Alimentare è emersa la necessità di generare nuovi dati che tengano conto delle caratteristiche dei NM in grado di modularne l'attività biologica con meccanismi ed effetti non ancora chiariti [1]. All'interno dell'ISS si è creata una "task force" di diverse competenze scientifiche - testing *in vivo*, *in vitro*, chemical detection, microscopia elettronica - identificate come chiave per la caratterizzazione e valutazione del rischio tossicologico dei NM presenti negli alimenti e nell'ambiente. È stato effettuato uno studio pilota con biossido di titanio (TiO<sub>2</sub>) in nanoforma somministrato per via orale a dosi ripetute nel ratto a livelli di dose - 0 (controllo), 1 e 2 mg/kg peso corporeo/die - coerenti con la potenziale esposizione umana attraverso gli alimenti. Focus dello studio gli effetti a carico del sistema riproduttivo-endocrino-immunitario mediante l'analisi istologica/istomorfometria e di biomarcatori biochimici su siero (testosterone [T], estradiolo [E], triiodotironina [T3]). Le nanoparticelle di TiO<sub>2</sub> sono state disciolte in acqua distillata, la forma nano è stata mantenuta con adeguata procedura di sonicazione. Le soluzioni ottenute sono state caratterizzate mediante microscopia elettronica TEM. Il bioaccumulo del TiO<sub>2</sub> nella milza di ratto è stato misurato mediante analisi ICP-MS. Effetti statisticamente significativi nelle femmine trattate: **gonadi** (aumento di apoptosi nella granulosa ovarica - alta e bassa dose); **tiroide**, aumento dell'altezza dell'epitelio follicolare (alta e bassa dose); **surreni**, aumento dei nuclei picnotici sia nella corticale che nella midollare con diminuzione del rapporto area corticale/area midollare per un aumento significativo della midollare (alta dose); **milza**, aumento significativo del rapporto tra polpa bianca e polpa rossa (alta dose). Nei maschi trattati: **tiroide**, aumento della desquamazione nel lume follicolare (alta e bassa dose) e di follicoli a forma irregolare (alta dose); **surrene**, aumento dei nuclei picnotici nella midollare (alta dose). I biomarcatori sierici hanno mostrato un aumento significativo dei livelli di T nei maschi ed una diminuzione significativa nelle femmine ad alta dose. Il T3 risulta diminuito in maniera significativa nei maschi ad alta e bassa dose e nelle femmine a dose bassa. Non si è osservato bioaccumulo di TiO<sub>2</sub> nella milza degli animali trattati rispetto al gruppo di controllo. In conclusione, i dati ottenuti evidenziano come le nanoparticelle di TiO<sub>2</sub> somministrate i) per via orale, ii) ad animali adulti, iii) ai livelli di dose più bassi finora riscontrati, causino effetti evidenti su tessuti/organi bersaglio in assenza di tossicità generale e di evidenziabile bioaccumulo. Inoltre, si osserva una suscettibilità sesso-specifica con le femmine maggiormente colpite per quanto riguarda il sistema riproduttivo-endocrino ed immunitario.

Ulteriori studi sono in corso con differenti NM per chiarire effetti e meccanismi d'azione.

1. EFSA Journal 2011;9(5):2140

Questa ricerca è stata condotta in collaborazione con Nanogenotox Joint Action (<http://www.nanogenotox.eu/>). Si ringraziano la Dr.ssa Candida I. Gisoldi per la collaborazione durante le fasi di sperimentazione ed elaborazione dei risultati.

## Valutazione del rischio dei nanomateriali ingegnerizzati negli alimenti e nei mangimi

Vittorio Silano

EFSA - Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare, Parma, Italia  
[vittorio.silano@alice.it](mailto:vittorio.silano@alice.it)

Il Comitato Scientifico dell'EFSA ha recentemente adottato l'opinione su "Guida alla valutazione del rischio sull'applicazione della nanoscienza e delle nanotecnologie nella catena degli alimenti e dei mangimi (EFSA Journal (2011) 9(5):2140) sulla base di una richiesta della Commissione Europea. Essa tratta di nanomateriali ingegnerizzati:

- destinati ad usi che comportano un'ingestione diretta da parte degli uomini o degli animali (ad es. additivi degli alimenti o dei mangimi, enzimi o aromi);
- da utilizzarsi come composti agro-chimici per la protezione delle piante (ad es. pesticidi);
- da incorporarsi in materiali destinati a venire a contatto con gli alimenti.

I principi generali adottati in questo documento si basano sul fatto che: (i) il paradigma generale della valutazione del rischio (cioè identificazione e caratterizzazione del pericolo, valutazione dell'esposizione e caratterizzazione del rischio) si applica anche alle nanoparticelle ingegnerizzate (ENM); e che (ii) i dati richiesti e le intere procedure elaborate dall'EFSA o dalla Commissione Europea per la valutazione del rischio in diversi settori restano valide anche per le ENM in relazione agli usi ai quali sono destinati.

Tuttavia, evidenti peculiarità delle ENM sono state identificate come dipendenti, fra l'altro, dal fatto che: (i) le ENM tendono, in generale, ad interagire con altre molecole quali proteine, lipidi, carboidrati, acidi nucleici, ioni, minerali ed acqua, presenti nella matrice alimentare o mangimistica e/o nel fluido biologico nel quale sono disperse; e (ii) le ENM libere (anche dette "ENM primarie") tendono ad agglomerarsi o aggregarsi, formando delle particelle più grandi (cosiddette "ENM secondarie") che possono o meno preservare alcune proprietà della dimensione "nano" quale elevata superficie e reattività o può acquisire proprietà diverse. Di conseguenza le ENM possono cambiare le loro strutture e proprietà a seconda della natura dell'ambiente circostante. Queste considerazioni spiegano perché la caratterizzazione chimico-fisica delle ENM dovrebbe essere considerata, quando possibile, in cinque diversi stadi: (i) come prodotta (stato primitivo); (ii) come presente nella preparazione destinata all'uso nel prodotto alimentare/mangime, tenendo conto anche dell'effetto della conservazione; (iii) come presente nell'alimento/mangime; come presente nel veicolo per la sperimentazione di tossicità e come presente nei fluidi biologici umani e animali; e perché la valutazione dell'esposizione sia alle specifiche ENM di interesse che alle nuove strutture o prodotti di degradazione/aggregazione formatesi nella matrice alimentare o nel tratto gastro-intestinale rimane uno stadio fondamentale nella valutazione del rischio in quanto da esse può dipendere la strategia di saggio.

Il documento del Comitato Scientifico tratta essenzialmente le metodologie per la sperimentazione tossicologica e le relative strategie. Fornisce altresì chiare indicazioni su come effettuare specifici saggi di tossicità quali saggi di genotossicità *in vitro* ed *in vivo*, ADME e tossicità subcronica; e su alcune condizioni che, ove dimostrate, richiederebbero un approccio facilitato o completo alla sperimentazione di tossicità.

Infine, sono esaminate alcune complicazioni per la valutazione del rischio derivanti dalla definizione adottata per le ENM.

## **Sessione II**

### **NANOMATERIALI IN MEDICINA: PREVENZIONE, DIAGNOSI E TERAPIA**



## FP7 e Nanomedicina

Serena Borgna

APRE - Agenzia per la Promozione della Ricerca Europea  
[borgna@apre.it](mailto:borgna@apre.it)

Le nanotecnologie e la nanomedicina rappresentano una delle priorità strategiche della Commissione Europea in termini di crescita economica, di sviluppo del benessere pubblico e di competitività del sistema sanitario. Considerando la nanomedicina come l'applicazione delle nanotecnologie al fine di ottenere progressi nel settore sanitario, essa sfrutta le proprietà fisiche, chimiche e biologiche dei materiali a scala nanometrica [1] al fine di migliorare la diagnosi e la terapia medica per la rigenerazione di tessuti ed organi.

La portata strategica e scientifica delle nanotecnologie ha favorito il finanziamento a livello europeo di programmi e progetti in ricerca e lo sviluppo tecnologico - 7° Programma Quadro - e di una piattaforma tecnologica europea – ETP European Technology Platform - sul tema.

L'ETP Nanomedice [2] nasce infatti quale elemento di sviluppo, pianificazione e strategia in tema di nanomedicina coinvolgendo gli stakeholder industriali europei attivi. A questo fine l'ETP sostiene i suoi membri nel coordinare azioni congiunte in attività di ricerca, migliorare la comunicazione tra gli stessi e facilitare il confronto con la Commissione europea e gli Stati membri dell'Unione europea. Nell'ottica di stabilire una chiara visione strategica di lungo periodo, la Piattaforma insieme alla Commissione Europea e ad attori accademici ha identificato una serie di aree di ricerca di interesse e le ha inserite nella cosiddetta "Strategic Research Agenda"[3], fornendo sia input a livello di priorità sia consigli sulla politica dell'innovazione nel campo della nanomedicina.

Relativamente al Settimo Programma Quadro in Ricerca e Sviluppo Tecnologico, le aree tematiche interessante dalla nanomedicina e coperte dal programma specifico Cooperazione sono principalmente tre: NMP – Nanoscienze, Nanotecnologie, Nanomateriali e Nuove Produzioni -, Salute e ICT – Information and Communication Technologies. Attraverso il tema NMP la Commissione Europea ha investito fortemente in nanomedicina nelle scorse call; tra il 2007 e il 2010 circa 265 milioni di euro sono state messi a bando per finanziare progetti di ricerca connessi alla nano farmaceutica, nano diagnostica, biomateriali per trapianti e medicina rigenerativa, sviluppo di protesi intelligenti.

Oltre ai temi Cooperazione, nei quali è la stessa Commissione ad identificare le aree di interesse, il 7°PQ mette ha disposizione dei ricercatori individuali altri due programmi specifici: People, per la mobilità dei ricercatori, e Ideas, che va invece a premiare l'eccellenza.

1. <http://cordis.europa.eu/nanotechnology/nanomedicine.htm>
2. <http://www.etp-nanomedicine.eu>
3. [http://www.etp-nanomedicine.eu/public/press-documents/publications/etpn-publications/strategic-research-agenda/at\\_download/file](http://www.etp-nanomedicine.eu/public/press-documents/publications/etpn-publications/strategic-research-agenda/at_download/file)

## **Eterocalixareni contenenti unità pirroliche quali unità strutturali di nuovi farmaci, nanomateriali e sistemi di veicolazione**

Franz Heinrich Kohnke

Dipartimento di Chimica Organica e Biologica, Università di Messina  
[franz@unime.it](mailto:franz@unime.it)

I calixareni, nei quali unità benzeniche sono connesse da ponti di un solo atomo di carbonio a formare sistemi macrociclici sono stati oggetto di numerose applicazioni in campo nanotecnologico, nel design di nuovi materiali [1,2] e per applicazioni in campo biomedico [3]. L'estensione di questi studi a sistemi analoghi, ma contenenti unità eterocicliche, offre nuove opportunità.

Gli eterocalixareni contenenti unità pirroliche (ad esempio i calix[4]pirroli) sono oggetto di notevole attuale interesse per le loro capacità di complessare anioni, coppie ioniche (comportandosi da recettori ditopici) e molecole neutre [4]. Questi composti sono anche in grado di generare aggregati capsulari [5,6]. Queste proprietà costituiscono le basi per il loro impiego nella costruzione di nuovi materiali capaci di veicolare molecole di interesse biologico, tra cui complessi del platino con attività anti-tumorale e farmaci quali il Tamoxifene [6].

Inoltre, studi recentissimi di modelling hanno messo in evidenza che alcuni derivati calixpirrolici possono essere riconosciuti dal recettore estrogenico GPER [7], e questi risultati computazionali sono stati verificati in via preliminare dai risultati di saggi in vitro.

1. Wei, A. *Chem. Commun.* (2006) p. 1581.
2. Soheila S.; Jeunesse C.; Matta, D.; Harrowfield, J. *Chem. Soc. Rev.*, **38** (2009) p. 2117.
3. Perret, F.; Coleman, A. W. *Chem. Commun.* **47** (2011) 7303.
4. Caltagirone, C.; Bill, N. L.; Gross, D. E.; Light, M. E.; Sessler, J. L.; Gale, P. A. *Org. Biomol. Chem.* **8** (2010) p.96 e riferimenti citati.
5. Cafeo, G.; Kohnke, F. H.; Valenti, L.; White, A. J. P. *Chem. Eur. J.* **14** (2008) p. 11593.
6. Barattucci, A.; Bonaccorsi, P.; Cafeo, G.; Kohnke, F. H.; Papalia, T. *Tetrahedron* **67** (2011) p.7548.
7. Kohnke, F. H. et. al. pubblicazioni in preparazione.

Si ringraziano la 'Compagnia di San Paolo di Torino' e l'Università di Messina per aver finanziato il lavoro qui descritto.

## **Nanocolloidi e superfici nano strutturate per applicazioni diagnostiche e terapeutiche**

Francesca Cavalieri

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, Università di Roma Tor Vergata, Roma.  
School of Chemistry, The University of Melbourne, Parkville, Victoria, Melbourne, Australia.  
[francesca.cavalieri@uniroma2.it](mailto:francesca.cavalieri@uniroma2.it)

La funzionalità dei nanocolloidi e delle superfici nanostrutturate utilizzati in applicazioni biomediche, richiede un fine controllo dei parametri chimici e fisici de nanodispositivi.

La progettazione e il controllo delle proprietà dei materiali finalizzata all'ottenimento di una specifica risposta biologica, sono essenzialmente correlati alla geometria, forma, proprietà meccaniche, compartimentalizzazione, composizione chimica del dispositivo. In questo intervento verranno illustrati alcuni esempi di nanocolloidi e di superficie nanostrutturate recentemente sviluppati nei nostri laboratori per la veicolazione controllata e selettiva di agenti terapeutici.

La tecnica di deposizione Layer-by-Layer di polimeri biocompatibili è stata utilizzata non solo per la preparazione di nanocapsule e surperfici nanostrutturate ma anche per la loro funzionalizzazione con biomolecole e farmaci. In particolare verrà discussa la possibilità di sviluppare un nuovo microchip impiantabile in cui il farmaco sia coniugato a polimeri e nanocapsule chemisorbiti su una superficie d'oro, tale che il loro rilascio sia controllato attraverso l'applicazione di un determinato impulso elettrico.

## **Exosomi come prototipo di biomimetismo in nano-medicina**

Stefano Fais, Luana Lugini, Cristina Federici, Francesco Lozupone, Giulietta Venturi, Andrea Canitano, Martina Borghi, Tommaso Azzarito, Mariantonia Logozzi.

Reparto Farmaci Anti-tumorali, Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma  
[stefano.fais@iss.it](mailto:stefano.fais@iss.it)

Il biomimetismo rappresenta un tema di importanza centrale in nano medicina. Il termine biomimetismo è stato stabilito per definire il processo del “simulare ciò che avviene in natura”. Sebbene quindi la definizione sia piuttosto chiara, l’applicazione di tale concetto nella medicina che si serve di nano strutture (nano medicina) è piuttosto lontana.

Una possibile soluzione per questo problema è stata fornita dalla crescente importanza che nano vescicole chiamate exosomi stanno assumendo in ogni ambito della ricerca biomedica. Gli exosomi sono nano vescicole di 50-100 nm che vengono rilasciate da la gran parte delle cellule che costituiscono l’organismo. L’impressionante quantità di notizie che si stanno accumulando sugli exosomi fa pensare che queste nano vescicole possano rappresentare una delle più importanti fonti di informazione sia sulla funzione normale del nostro organismo sia sulla patogenesi ed il mantenimento delle malattie. Nel mare di queste novità sembra di grandissimo rilievo la dimostrazione che gli exosomi rappresentano un sistema di trasporto naturale per una gran quantità di molecole, compresi proteine, lipidi ed acidi nucleici. Inoltre, gli exosomi sono in grado di interagire con cellule bersaglio (praticamente tutte) inducendo in vario modo modificazioni funzionali.

Ad oggi si conoscono almeno due meccanismi di interazione: (1) interazione ligando (espresso sugli exosomi)/recettore (sulla cellula); (2) Fusione fra l’exosoma e la cellula bersaglio. Nel primo caso è stato dimostrato che gli exosomi sono in grado di indurre una serie di funzioni legate all’interazione ligando/recettore (per es. apoptosi Fas o TRAIL-mediata). Nel secondo caso, a seguito della fusione gli exosomi riversano il loro contenuto (proteine, acidi nucleici) nella cellula bersaglio.

Nel nostro reparto sono stati eseguiti studi pionieristici sugli exosomi che hanno dimostrato che queste nano vescicole rilasciate dalle cellule tumorali possono interagire con il sistema immunitario inducendo la morte dei linfociti che dovrebbero invece uccidere le cellule tumorali. Inoltre, abbiamo dimostrato come exosomi rilasciati da cellule NK sono in grado anche a distanza di svolgere la funzione NK sia su cellule normali che tumorali. Gli exosomi circolano nel nostro corpo svolgendo funzioni sia al livello paracrino che sistemico.

Nel nostro reparto abbiamo messo a punto un test che è in grado di caratterizzare e quantificare exosomi in vari fluidi corporei, compresi plasma ed urine. Di grande interesse è la dimostrazione che gli exosomi isolati dal plasma umano rimangono perfettamente funzionali. Abbiamo inoltre dimostrato che gli exosomi partecipano attivamente al fenomeno della farmaco resistenza perché sono in grado di trasportare eliminare attivamente farmaci, come il cisplatino, che rimangono nella loro forma attiva all’interno degli exosomi, sia all’interno del microambiente sia in circolo.

Da altri gruppi è stato dimostrato inoltre che exosomi possono essere caricati con farmaci normalmente usati in terapia e che sembrano avere effetti biologici maggiori contenuti negli exosomi.

Esperimenti preliminari del nostro gruppo supportano fortemente l’uso degli exosomi come mezzo di trasporto naturale per vari tipi di farmaci, ma anche come biomarkers di malattia.

## Liposomi cationici come sistemi di veicolazione di farmaci

Giovanna Mancini

CNR, Istituto di Metodologie Chimiche, c/o Dipartimento di Chimica “La Sapienza”, Roma  
[giovanna.mancini@uniroma1.it](mailto:giovanna.mancini@uniroma1.it)

I liposomi cationici, oltre ad essere studiati come alternativa ai vettori virali in protocolli di terapia genica, sono emersi come promettenti sistemi di veicolazione di farmaci, poiché hanno una selettività intrinseca per alcuni tessuti come l'endotelio vascolare dei tumori, il fegato e i polmoni. Tuttavia, venti anni di ricerca sui liposomi cationici hanno dimostrato che la carica positiva non è sufficiente a garantire specificità ed efficienza nella complessazione e veicolazione di acidi nucleici e di farmaci e che la progettazione di questi sistemi si deve basare su studi sistematici volti a correlare le caratteristiche biologiche dei liposomi cationici alle loro caratteristiche chimico-fisiche.

Sono state studiate su diverse linee cellulari la complessazione e la trasfezione di un plasmide e la veicolazione di un fotosensibilizzatore da parte di liposomi cationici formulati con 1,2-dimiristoil-*sn*-glicerolo-3-fosfolina, DMPC, e uno di due tensioattivi cationici diastereomerici di tipo gemini. È stato osservato che la stereochimica del tensioattivo cationico della formulazione liposomica controlla sia l'efficienza di trasfezione del DNA [1], che l'up-take e la distribuzione intracellulare del farmaco [2]. Saranno discussi i risultati delle indagini volte allo studio del meccanismo di internalizzazione e all'interazione di liposomi e lipolezzi con modelli di membrana.

1. Bombelli C et al. J. Med. Chem. **48** (2005) p.5378.
2. Bombelli C et al Mol. Pharm. **7** (2010) p.130.

## Liposomi cationici per la terapia fotodinamica del glioblastoma

Giuseppina Bozzuto

Dipartimento Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma  
[giuseppina.bozzuto@iss.it](mailto:giuseppina.bozzuto@iss.it)

Il glioblastoma multiforme (GBM) è il tumore più comune e più maligno tra le neoplasie di pertinenza della glia. Nonostante i moderni trattamenti con la chirurgia, la radioterapia e la chemioterapia, meno del 3% dei pazienti diagnosticati sopravvivono più di 5 anni. Sono attualmente in studio diverse terapie adiuvanti: tra queste una delle più promettenti appare la terapia fotodinamica (PDT, PhotoDynamic Therapy) associata all'impiego del Temoporfin (*meta*-tetraidrossifenilclorina, *m*-THPC) un agente fotosensibilizzante utilizzato nei trials clinici finalizzati al trattamento delle neoplasie della testa e del collo.

In questo studio è stata valutata la capacità di transfezione dei liposomi cationici formulati con *m*-THPC, dimiristoil-sn-glicero-fosfatidilcolina (DMPC) e tensioattivo (S, S) -2,3-dimetossi-1,4-bis (N-hexadecil-N, N-dimetilammonio) butano bromuro (Gemini **1a**) (*m*-THPC/DMPC/G**1a**).

Lo studio condotto mediante citofluorimetria a flusso e microscopia confocale a scansione laser su linee cellulari di GBM umano (LN229) e murino (C6), ha evidenziato come il fotosensibilizzante caricato nei liposomi *m*-THPC/DMPC/G**1a** veniva trasferito all'interno delle cellule molto più efficientemente della formulazione farmacologia (Foscan®). I test di cloning efficiency hanno dimostrato che né l' *m*-THPC né le diverse formulazioni liposomiche hanno attività citotossica. Dopo irraggiamento con luce laser a 652 nm nelle colture di glioblastoma umano e murino trattate con Foscan® la frazione sopravvissuta si riduceva del 30%, in quelle trattate con Temoporfin veicolato nei liposomi, in assenza di tensioattivo, di circa il 60%. La presenza del tensioattivo determinava, invece, un completo abbattimento dei valori di sopravvivenza delle cellule trattate.

Infine, l'impiego del *freeze-fracturing* e della microscopia elettronica a trasmissione hanno permesso di studiare l'interazione liposoma/membrana e i processi di internalizzazione nelle cellule di glioblastoma.

## Microbolle e microcapsule in teranostica

Marisa Colone<sup>1</sup>, Mariarosaria Tortora<sup>2</sup>, Elisa Schiavi<sup>3</sup>, Gabriella Di Felice<sup>3</sup>,  
Annarica Calcabrini<sup>1</sup>, Meifang Zhou<sup>4</sup>, Muthupandian Ashokkumar<sup>4</sup>,  
Francesca Cavalieri<sup>2</sup> e Annarita Stringaro<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, Università di Tor Vergata, Roma

<sup>3</sup> Dipartimento Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma,

<sup>4</sup> School of Chemistry, University of Melbourne, Australia.

[annarita.stringaro@iss.it](mailto:annarita.stringaro@iss.it)

Il termine "teranostica" è stato coniato per definire tutti quegli studi in corso allo scopo di sviluppare delle specifiche terapie personalizzate per varie malattie e di combinare insieme le capacità diagnostiche e terapeutiche [1]. La logica è nata dal fatto che le malattie, come i tumori, sono estremamente eterogenee, e tutti i trattamenti esistenti sono efficaci solo per un numero limitato di pazienti in relazione ai diversi stati della malattia. La speranza alla base di queste ricerche è quella di stabilire uno strettissimo legame tra la diagnosi e la terapia in modo da ottenere protocolli terapeutici più specifici per gli individui e, quindi migliorare la prognosi.

L'emergere delle nanotecnologie ha offerto l'opportunità di avvicinare la diagnosi e la terapia. La micro-nanoteranostica è una piattaforma dove possono confluire le funzioni terapeutiche con quelle di imaging allo scopo di consentire che quest'ultima possa essere eseguita non solo prima o dopo, ma anche durante un regime di trattamento.

Recentemente, le microsfele proteiche stanno ricevendo interesse nel campo sia degli ultrasuoni sia per il trasporto dei farmaci (drug-delivery). Le microsfele sono considerate un versatile sistema di trasporto dei farmaci. Tuttavia, a causa della loro superficie ampia, potrebbero, una volta iniettate nell'organismo, entrare in contatto con le cellule del sistema immunitario provocando reazioni indesiderate. Ovviamente sarà di fondamentale importanza assicurare sia la biocompatibilità sia l'efficienza di assorbimento del dispositivo da parte non solo delle cellule bersaglio tumorali ma anche del sistema immune.

Nei nostri recenti studi, in collaborazione con il gruppo della Dott.ssa Francesca Cavalieri del Dipartimento di Scienze Chimiche e Tecnologiche dell'Università di Tor Vergata e della Dott.ssa Gabriella Di Felice del Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate del nostro Istituto, abbiamo studiato il meccanismo di formazione delle microsfele ottenute da lisozima denaturato che, in base al trattamento agli ultrasuoni ad alta intensità, permette di ottenere microbolle riempite d'aria (MB) o, in presenza di perfluoroesano, microcapsule riempite di olio (MC) [2, 3]. Inoltre, abbiamo valutato sia il grado di biocompatibilità di queste microsfele sia la potenzialità di indurre la maturazione di cellule dendritiche derivate dal midollo osseo murino (MBDC).

1. Fernandez-Fernandez A et al., Appl Biochem Biotechnol **165** (2011) p. 1628.
2. F. Cavalieri, et al. Langmuir **24** (2008) p. 10078.
3. M. Zhou, et al. Ultrason. Sonochem. **17** (2010) p. 333.

## Nanoparticelle e infezioni virali

Magda Marchetti, Fabiana Superti

Dipartimento Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma  
[magda.marchetti@iss.it](mailto:magda.marchetti@iss.it)

L'uso dei nanomateriali ha aperto nuove strade per la lotta alle malattie virali dal punto di vista sia profilattico, sia terapeutico, sia diagnostico.

Diversi tipi di nanoparticelle (Np), costituite da poliesteri, poliortoesteri, polianidridi e policarbonati, si sono dimostrate particolarmente promettenti per la formulazione di vaccini.

Sistemi basati su Np possono cambiare la cinetica di rilascio di farmaci antivirali, aumentare la loro biodisponibilità, migliorare la loro efficacia, limitare gli effetti collaterali e facilitare il rilascio mirato nei siti bersaglio. Queste caratteristiche sono particolarmente importanti nelle malattie, come l'AIDS, per le quali sono richieste alte dosi di farmaci. Per migliorare il trasporto e il rilascio di farmaci antiretrovirali sono quindi stati studiati diversi tipi di nanovettori, come Np (polimeriche, inorganiche e lipidiche), liposomi, micelle polimeriche, dendrimeri e ciclodestrine.

Una nuova area di ricerca è costituita dall'uso di Np direttamente come agenti antivirali. Studi *in vitro* hanno dimostrato che Np d'argento sono in grado di inibire l'infezione da HIV impedendo l'interazione gp120-recettore [1] e la produzione di RNA e virioni di HBV tramite l'interazione diretta tra Np e il virus o il suo DNA [2]. Altri studi hanno preso in esame Np d'argento funzionalizzate con polimeri idrosolubili come promettenti virucidi per prevenire la trasmissione di HIV [3] o con gruppi solfonati che competono con uno dei recettori di HSV-1, l'eparan solfato, bloccando l'attaccamento del virus alle cellule [4]. Per quanto concerne i dendrimeri, anch'essi sono dotati di un potenziale profilattico e terapeutico che va dal loro uso nei vaccini anti-influenzali e anti-HIV al loro impiego come agenti antivirali specifici come ad esempio il dendrimero SPL7013, principio attivo di un gel virucida progettato specificamente per la prevenzione delle infezioni sessualmente trasmesse (HIV e HSV-2) [5].

Recentemente sono state sviluppate diverse tecniche sensibili e poco costose per la diagnosi di infezioni virali basate sull'uso di Np. Ad esempio, Np d'oro possono essere funzionalizzate con anticorpi o oligonucleotidi virus-specifici sfruttando le loro peculiari proprietà chimico-fisiche che le rendono facilmente coniugabili con molecole biologiche e conferiscono loro la capacità di agire come "quencher" di fluorescenza. Infine anche i quantum dot vengono utilizzati per il rilevamento di virus tramite la coniugazione diretta con anticorpi o tramite il sistema streptavidina-biotina.

L'applicazione delle nanotecnologie in campo virologico ha già prodotto risultati incoraggianti ma molti studi devono ancora essere intrapresi prima che queste nuove tecnologie possano essere tradotte in strategie antivirali sicure ed efficaci per uso clinico.

1. Lara HH et al., J. Nanobiotechnology **8** (2010) p. 1.
2. Lu L et al., Antivir. Ther. **13** (2008) p. 253.
3. Lara HH et al., J. Nanobiotechnology **8** (2010) p. 15.
4. Baram-Pinto D et al., Bioconjugate Chem. **20** (2009) p. 1497.
5. Rupp R et al., Int. J. Nanomedicine **2** (2007) p. 561

## Uso delle nanoparticelle lipidiche solide in medicina: applicazioni in oftalmologia

Claudia Gargini<sup>1</sup>, Paolo Gasco<sup>2</sup>, Riccardo Ghidoni<sup>3</sup>, Enrica Stretto<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Dip Psichiatria, Farmacologia, Neurobiologia e Biotecnologie, Università di Pisa

<sup>2</sup>Nanovector srl, Torino Italia

<sup>3</sup>Lab Biochimica e Biologia Molecolare, San Paolo Medical School, Università di Milano

<sup>4</sup>Istituto di Neuroscienze CNR, Pisa

[paolo.gasco@nanovector.it](mailto:paolo.gasco@nanovector.it)

Le Nanoparticelle Lipidiche Solide (Solid Lipid Nanoparticles – SLN) sono state proposte all'inizio degli anni '90 come vettori colloidali per il trasporto di farmaci. Tali carriers da allora sono stati oggetto di innumerevoli pubblicazioni scientifiche e numerosi sono i brevetti di formulazione e d'uso depositati. Le SLN sono state caricate con molte tipologie di farmaci e sono state testate per tutte le principali vie di somministrazione.

Tra i vantaggi maggiori riconosciuti a tali sistemi si riporta in primis la bassa o nulla tossicità derivante dall'utilizzo di lipidi fisiologici, la stabilità chimica e dimensionale e la capacità di protezione del farmaco trasportato derivante dalla loro natura solida, la capacità di superamento delle barriere e di modificare i parametri farmacocinetici (slow release system).

Uno dei maggiori limiti di questi nanovettori risiede nel caricamento del farmaco relativamente basso, e la sua possibile espulsione per la cristallizzazione stessa del lipide.

Tra le varie tipologie produttive, le SLN ottenute da microemulsioni a caldo hanno dimostrato versatili possibilità di applicazione: oltre ad una rapida sintesi dei maggiori risultati ottenuti per le diverse vie di somministrazione ed un accenno a più recenti risultati in campo oncologico, l'intervento descriverà in maggior dettaglio lo stato di avanzamento dell'applicazione di questa tecnologia nel campo oftalmico, in particolare per il trattamento della Retinite Pigmentosa.

Tale patologia è caratterizzata da un eterogeneo insieme di difetti genetici che comportano la degenerazione dei fotorecettori, normalmente associata a mutazioni di specifici geni dei bastoncelli: negli stadi più avanzati però anche i coni, i cui geni non sono implicati, cominciano e degenerare.

L'idea a base del progetto è stata quella di utilizzare il Myriocin quale inibitore della sintesi *denovo* della ceramide per ridurre la degenerazione apoptotica dei bastoncelli. La lipofilia del principio attivo ha reso necessaria la ricerca di una opportuna formulazione: il suo inglobamento in SLN ha permesso la sua somministrazione come collirio ed attraverso questa scelta si è potuto dimostrarne l'efficacia nello studio in modello animale (rd10 mutant mice), dove si è evidenziata una diminuzione della degenerazione dei bastoncelli ed il mantenimento della funzione retinica [1]. La stessa formulazione è poi stata oggetto di nuovi ulteriori studi, con tempo di somministrazione prolungato a 60 giorni, per meglio valutare come la sopravvivenza indotta nei bastoncelli possa ritardare anche la degenerazione dei coni: negli animali trattati si è evidenziato l'effetto protettivo sui coni, presenti fino al 70% in più, ed un corrispondente mantenimento sia delle risposte ERG che della capacità visiva.

1. Stretto E et al., Proc Natl Acad Sci (2010) 107(43):18706-11 Irrep. Res. 5 (1998) p. 252

## **Nanostrutturazione della superficie del Titanio per un miglioramento delle terapie implantoprotesiche e dell'interazione tessuto umano/superficie implantare**

Rossella Bedini<sup>1</sup>, Francesca Zuppante<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma

<sup>2</sup> Dipartimento di Ingegneria Meccanica e Aerospaziale, Università "Sapienza" di Roma

[rossella.bedini@iss.it](mailto:rossella.bedini@iss.it)

Il fallimento implantare legato a perdita ossea e tissutale può svilupparsi a livello atomico ed in particolari situazioni all'interfaccia impianto-tessuto biologico. I primi impianti protesici prevedevano l'utilizzo di acciaio chirurgico, il quale però non garantiva il successo dell'impianto a causa dell'elevata tensione richiesta per il processo di passivazione. Le leghe di titanio (Ti) sono state ampiamente utilizzate sia in impianti chirurgici sia in dispositivi biomedici protesici sin dal 1960, per il loro elevato rapporto resistenza meccanica/peso e alla loro capacità di passivazione spontanea nei fluidi biologici. La principale caratteristica di questi materiali consiste nella proprietà di formare sulla loro superficie uno strato di ossido resistente alla corrosione. Ciò che li rende adatti a questo scopo è oltre che un'elevata resistenza alla corrosione, essendo il corpo umano un ambiente notevolmente corrosivo, anche un'ottima biocompatibilità [1]. La resistenza alla corrosione e la biocompatibilità delle leghe di Ti sono fortemente influenzate dall'ossidazione del film di ricopertura, per questo negli ultimi anni la ricerca in questo campo si è notevolmente concentrata sul miglioramento e sull'analisi delle diverse tecniche di ossidazione. In un ambiente corrosivo come può essere il corpo umano è importante ad esempio che l'ossidazione non provochi alterazioni nelle proprietà di massa del materiale e che non vari la microstruttura e la composizione della lega [2]. Una resistenza alla corrosione viene richiesta per gli impianti protesici al fine di ottenere una elevata bioattività dell'interfaccia che è il risultato di un ridotto trasferimento ionico. Questa caratteristica è importante per l'osseointegrazione e può essere migliorata tramite trattamenti termici ed elettrochimici; queste procedure migliorano la stabilità dell'interfaccia in un mezzo elettrolitico come il corpo umano.

Lo studio prevede l'analisi comparativa di campioni di lega di Ti (grado V medicale) ricoperti superficialmente da film di ossido di Titanio nanostrutturato realizzati con tre differenti tecniche di ossidazione elettrochimica, ottenute con bassa densità di corrente [3], tramite le osservazioni eseguite con un microscopio a forza atomica (AFM) e un microscopio a scansione elettronica (SEM) al fine di evidenziare le differenze strutturali causate dall'utilizzo delle diverse tecniche di fabbricazione e per valutare quale conformazione superficiale sia più adeguata/affidabile per un possibile miglioramento dell'integrazione tissutale. Dalle ricerche fin'ora condotte film ossidici nanoporosi possono migliorare l'osseointegrazione degli impianti [4].

1. M. Niinomi. Materials Science and Engineering. A243(1998) p231-236.
2. G. Zorn et al., Surface & Coatings Technology (2005).
3. C. Fratila et al., Scientific Journal of the Timisoara Romanian Academy, Ed.BREN Bucharest. 2(2006) p61-68.
4. S. Lavenus et al., Nanomedicine. Mar 6(2012). [Epub ahead of print] PubMed PMID:22394187.

Questa ricerca è stata supportata dal dott. I. Roman, METAV-AMCSIT Universitatea Politehnica din Bucuresti. Si ringraziano inoltre per l'aiuto nelle analisi all'AFM i dott. Giovanni Longo e Marco Girasole dell'Istituto di Struttura della Materia del CNR, INAF – TorVergata di Roma.

## **Esperienza di una SME italiana sull'uso di un test per il rilevamento degli esosomi in varie patologie**

Antonio Chiesi e Natasa Zarovni

Exosomics Siena S.p.A, Siena, Italia

[nzarovni@exosomics.eu](mailto:nzarovni@exosomics.eu)

Le soluzioni nanobiotecnologiche mirate all'utilizzo delle nanoparticelle naturali presenti in biofluidi umani e quindi reperibili nei campioni clinici accessibili per lo screening, diagnostica e monitoraggio, sono all'avanguardia dello sviluppo dei metodi diagnostici, con il potenziale di rivoluzionare la ricerca e la gestione clinica delle patologie umane di maggior impatto, quali cancro, neurodegenerazione, malattie cardiovascolari, malattie croniche infiammatorie. Gli esosomi sono nanoparticelle lipidiche (50-120 nm), rilasciate da tutti i tipi cellulari. Esse derivano dai corpi multivescicolari che maturano nel compartimento endosomico della cellula, incorporando la varietà delle componenti molecolari cellulari, destinate ad essere scartate o trasmesse ad altre cellule. Attualmente è riconosciuto il ruolo di esosomi come vettori per il trasferimento intercellulare di proteine, lipidi e materiale genetico. Questo trasferimento è di natura mirata, avviene sia nel microambiente della cellula madre, sia a distanza tramite il traffico degli esosomi attraverso il sistema linfatico e circolatorio. Rilascio degli esosomi è un processo dinamico, regolato e funzionalmente rilevante. La quantità di esosomi, la quantità e composizione molecolare del loro cargo, dipende dal tipo e dalla condizione della cellula madre, distinguendo in tal modo l'origine delle vescicole, nonché la cellula a riposo da quella attiva, sana da quella malata. Questa è la premessa principale dell'impiego degli esosomi per scopi diagnostici. Lo sfruttamento pratico di queste premesse necessita ancora lo sviluppo di soluzioni tecnologiche e la definizione del profilo molecolare di sottopopolazioni associate alle patologie di interesse.

Il team di Exosomics Siena S.p.A. ha sviluppato, e ha acquisito i diritti di proprietà su una piattaforma ELISA che consente l'isolamento e la quantificazione di esosomi di origine specifica, o rilasciati in una condizione (salute vs. malattia) nei campioni biologici complessi, prima di determinare il loro "bio-signature". Il test permette l'arricchimento della frazione di campione d'interesse, favorendo la rilevazione dei bersagli poco abbondanti, e permette un'ulteriore caratterizzazione proteomica e genomica. La validazione del saggio è in corso in diversi tipi di tumore, utilizzando i pannelli di anticorpi che riconoscono sia i comuni antigeni esosomiali che le proteine specifiche associate agli esosomi provenienti dal tumore. EXOTEST è non invasivo, richiede piccole quantità di campione, ha le letture multiple e quantitative. Inoltre, la sua versatilità lo rende facilmente estendibile ad altri marker/condizioni e permette l'integrazione a monte o a valle dei passaggi che possano aumentare la sensibilità e specificità del test ed estendere le sue applicazioni (ad esempio per il profiling proteomico e genomico e identificazione dei nuovi biomarcatori). Lo sviluppo strategico avviato prevede un ulteriore perfezionamento della piattaforma e sviluppo di alternativi test immunometrici mirati all'analisi di esosomi, tramite implementazione e validazione dell'utilizzo delle particelle e/o superfici nanostrutturate e multifunzionali ingegnerizzate, ed implementazione dei nuovi sistemi di rilevazione basati sulle proprietà uniche ottiche e biofisiche dei materiali impiegati. Il nostro obiettivo è sviluppo di nuova generazione dei dispositivi diagnostici che combina dei vantaggi delle nanoparticelle naturali e sintetiche con elevata sensibilità e potere di diagnostica multiplex, contenuta nelle soluzioni adatte e realisticamente trasferibili nei laboratori di ricerca e di clinica.



## **Sessione III**

### **ASPETTI NORMATIVI**



## Il contesto regolatorio REACH e CLP

Maria Alessandrelli

Centro Nazionale Sostanze Chimiche, Istituto Superiore di Sanità, Roma  
[maria.alessandrelli@iss.it](mailto:maria.alessandrelli@iss.it)

Nella legislazione UE non esistono attualmente disposizioni *ad hoc* per i nanomateriali o per le tecnologie atte a produrli, ma la normativa vigente in materia di sostanze chimiche, di tutela dei lavoratori e dell'ambiente, nonché la normativa specifica concernente i dispositivi medici, i prodotti medicinali, gli alimenti per animali, i prodotti cosmetici, i fitofarmaci, i biocidi, gli aerosol, le automobili, coprono in linea di massima i rischi potenziali in materia di salute, sicurezza ed ambiente legati ai nanomateriali.

Il regolamento (CE) n. 1907/2006 relativo alla registrazione, valutazione, autorizzazione e restrizione delle sostanze chimiche (REACH) ed il regolamento (CE) 1272/2008 riguardante la classificazione, l'etichettatura e l'imballaggio delle sostanze e delle miscele (CLP) si applicano a tutte le sostanze in qualsiasi dimensione, forma e stato fisico. Tali regolamenti non riportano specifiche clausole per i nanomateriali ma essi ricadono nella loro sfera di applicazione in quanto sostanze chimiche (articolo 3(1) del REACH e articolo 2(7) del CLP).

Gli obblighi del regolamento REACH devono essere ottemperati anche per i nanomateriali: i produttori e gli importatori sono tenuti a presentare un fascicolo di registrazione per le sostanze fabbricate o importate in quantitativi pari o superiori a 1 tonnellata all'anno e a registrarle presso l'European Chemicals Agency (ECHA), che gioca un ruolo centrale nella raccolta e nella diffusione di informazioni su sostanze chimiche e miscele.

I nanomateriali devono essere classificati ed etichettati conformemente ai criteri che soddisfano la classificazione di pericolo secondo il regolamento CLP. Quanto prescritto dal CLP, incluse le schede di sicurezza, va applicato indipendentemente dal tonnellaggio al quale le sostanze sono prodotte od importate ed il fabbricante (o l'importatore) è tenuto a notificare all'Inventario delle classificazioni e delle etichettature, presso l'ECHA, le informazioni relative alla classificazione ed etichettatura dei nanomateriali che intende immettere sul mercato. Le registrazioni REACH e le notifiche CLP rappresenteranno una fonte di notizie sui volumi prodotti ed importati, sui pericoli e sulle categorie d'uso in grado di assicurare maggiori dettagli sui potenziali effetti legati alla salute umana e all'ambiente.

Ai fini della valutazione dei dossier tecnici nell'ambito dei due regolamenti, le informazioni da fornire sui nanomateriali devono soddisfare i requisiti di REACH e CLP. Uno dei maggiori problemi evidenziati riguarda la tipologia di informazioni che devono essere presenti nei dossier tecnici o che i registranti sono obbligati ad inviare su eventuale richiesta dell'ECHA. Un passo importante nell'armonizzazione di un efficace approccio di riferimento è rappresentato dalla "Recommendation on the definition of nanomaterial" adottata dalla Commissione Europea nell'Ottobre 2011 e basata sull'attività del Joint Research Centre (JRC) e sugli input del Scientific Committee for Emerging or Newly Identified Health Risks (SCENIHR). La Commissione Europea ha lavorato per predisporre una definizione, basata su evidenze scientifiche, da utilizzare in ambito regolatorio in modo da promuovere ed incentivare una maggiore coerenza laddove uno stesso nanomateriale risulti usato in contesti differenti.

## Attività e sfide nella *governance* in ambito nazionale ed europeo

Maria Letizia Polci

Centro Nazionale Sostanze Chimiche, Istituto Superiore di Sanità, Roma; Ministero della salute, Roma  
[ml.polci-esterno@sanita.it](mailto:ml.polci-esterno@sanita.it)

A tre anni dalla comunicazione della Commissione Europea sugli aspetti regolatori dei nanomateriali sono ancora numerose le criticità nella legislazione europea vigente in relazione alla gestione dei nanomateriali. Il regolamento (CE) n. 1907/2006 (REACH) è considerato l'elemento chiave della normativa sulle sostanze chimiche per assicurare una corretta gestione dei rischi che i nanomateriali potrebbero presentare per la salute e per l'ambiente. In particolare, la registrazione delle sostanze chimiche secondo REACH rappresenta uno strumento potenzialmente ideale per colmare le lacune conoscitive sulle sostanze in nanoforma. Tuttavia, le scarse informazioni raccolte nella prima fase di detta registrazione e, parallelamente, dalla notifica della classificazione di pericolo delle sostanze in nanoforma all'inventario dell'European Chemicals Agency (ECHA) ai sensi del regolamento (CE) n. 1272/2008 (CLP), dimostrano che gli attuali strumenti normativi sulle sostanze chimiche non è all'altezza delle aspettative relativamente ai nanomateriali.

Tra le principali criticità della suddetta normativa si evidenziano la mancanza di criteri per l'identificazione dei nanomateriali, per la definizione dello *status* delle sostanze in forma nanometrica che ne determina la tempistica con la quale le aziende produttrici e importatrici devono presentare dati all'ECHA circa le loro proprietà tossicologiche ed eco-tossicologiche e, infine, l'assenza di disposizioni specifiche sulla valutazione del rischio di tali sostanze.

Tenendo conto delle citate difficoltà nell'applicazione del regolamento REACH ai nanomateriali, i REACH Implementation Projects on Nanomaterials (RIPoN 1, 2 and 3), condotti da esperti degli Stati Membri europei insieme al Joint Research Centre, hanno avuto come obiettivo la stesura di rapporti tecnici per effettuare la revisione delle linee guida dell'ECHA ma senza modificarne il testo normativo.

Nello scenario comunitario si assiste al vivace dibattito tra il Parlamento Europeo, il quale chiede di sanare l'inadeguatezza delle disposizioni legislative sui nanomateriali, e la Commissione, impegnata a rivedere e modificare l'attuale legislazione trasversale sulle sostanze chimiche, insieme alle normative di settore che conterranno disposizioni specifiche per i nanomateriali.

Tra le proposte di adeguamento della regolamentazione, una possibile alternativa è quella di sviluppare una normativa a sé stante che stabilisca come gli strumenti e le disposizioni del REACH si applicano ai nanomateriali.

Alla luce dei limiti identificati ad oggi per quanto concerne la gestione dei nano materiali, risulta inoltre evidente una mancanza di strumenti per la tracciabilità del mercato europeo dei nanomateriali con conseguente violazione del diritto alla trasparenza da parte dei consumatori e impossibilità a risalire alla fonte in caso di emergenze. A tale proposito sono state avviate iniziative nazionali per raccogliere informazioni sui nanomateriali immessi sul mercato, comprese le quantità e gli usi previsti e, ove disponibili, stime dell'esposizione umana e ambientale.

## **Il Working Party on Manufactured Nanomaterials dell'OECD: obiettivi ed attività**

Isabella De Angelis

Dipartimento Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma  
[isabella.deangelis@iss.it](mailto:isabella.deangelis@iss.it)

Il recente ed esponenziale sviluppo del settore delle nanotecnologie, basato sull'impiego di nanomateriali costruiti artificialmente (NM), ha portato la comunità scientifica e le istituzioni nazionali e internazionali ad affrontare in maniera coordinata il problema dei potenziali effetti sanitari determinati dall'esposizione a questo tipo di materiali, vista la peculiarità delle loro caratteristiche fisico-chimiche.

Un ruolo importante nell'opera di coordinamento di queste attività è svolto dal Working Party on Manufactured Nanomaterials (WPMN), istituito a partire dal 2006 nell'ambito del Comitato Chimico dell'OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development). Obiettivo prioritario del WPMN è la promozione della cooperazione internazionale sui temi relativi alla salute e alla sicurezza ambientale dei nanomateriali, al fine di contribuire al loro sviluppo e impiego responsabile. Le attività del WPMN mirano ad assicurare che gli approcci al potenziale pericolo, all'esposizione e alla valutazione del rischio, siano caratterizzati da un elevato livello scientifico e armonizzati dal punto di vista internazionale. Il programma OCSE per i NM si distingue, inoltre, per la sua flessibilità e rapidità di intervento, che lo rendono adatto a reagire in maniera veloce ed efficiente ai continui stimoli provenienti dal settore tecnologico.

Al WPMN afferiscono non solo i paesi membri dell'OECD (cioè i maggiori paesi industrializzati) ma anche alcune economie emergenti, come Cina, Sud Africa, Federazione Russa, e diverse realtà della società civile quali industria, organizzazioni internazionali, associazioni ambientaliste, che complessivamente assicurano un dibattito articolato e una pluralità di "input".

Nell'ambito delle attività del WPMN, l'OECD ha identificato alcune aree prioritarie di intervento tra cui sono da segnalare per rilevanza:

- lo sviluppo di un data base comprendente tutti i progetti di ricerca relativi ad ambiente, salute umana e sicurezza correlati all'utilizzo dei NM, che identifichi, nel contempo, le aree di ricerca, sperimentali, regolatorie e di comunicazione, che necessitano di maggiore sviluppo;
- l'identificazione di un gruppo rappresentativo di NM con lo scopo di caratterizzarli e determinarne la pericolosità per l'uomo e per l'ambiente attraverso appropriate, e se necessario specifiche, metodologie di saggio (*in vivo* e *in vitro*) promuovendo, inoltre, lo sviluppo di metodi alternativi;
- la cooperazione tra gli stati membri sugli aspetti regolatori, facilitando la mutua accettazione dei dati e la messa a punto di strategie comuni per la valutazione del rischio;
- lo sviluppo di linee guida per la misura dell'esposizione umana ed ambientale e la riduzione dell'esposizione professionale;
- la promozione dell'uso sostenibile delle nanotecnologie attraverso l'acquisizione di nuove conoscenze di base dei principali aspetti del "life cycle" dei NM.

Proiettandosi in un futuro prossimo, l'auspicio del programma OECD sui NM è che l'attiva collaborazione tra i diversi stati instauratasi all'interno del WPMN coniugata con la sua flessibilità e pluralità di approcci, contribuisca a tutelare la sicurezza dell'uomo e dell'ambiente con sempre più consapevolezza e rigore valorizzando, allo stesso tempo, le indubbe potenzialità innovative che le nanotecnologie offrono.

## Verso uno standard comune di definizione dei rischi e benefici dei nano materiali

Domenico De Martinis<sup>1</sup>, Grazia Barberio<sup>2</sup>, Simona Scalbi<sup>3</sup>

ENEA Agenzia nazionale per le nuove tecnologie, l'energia e lo sviluppo economico sostenibile

1 Unità Tecnica Fusione, supporto tecnico gestionale -UTFUS-STG-CR Frascati

2 Unità Tecnica Tecnologie Ambientali -UTTAMB-CR Casaccia

3 Unità Tecnica Modelli, Metodi e Tecnologie per le Valutazioni Ambientali, Laboratorio LCA ed Eco-design -  
UTVALAMB-LCA-CR Bologna  
[domenico.demartinis@enea.it](mailto:domenico.demartinis@enea.it)

Il progetto "SG9" dell' OECD WPMN [1] "on the Environmentally Sustainable Use of Manufactured Nanomaterials" ha come obiettivo aumentare la conoscenza di base sugli aspetti del ciclo di vita dei nano materiali. Rispetto agli altri gruppi di lavoro l'SG9 si propone di valutare i rischi-benefici dei nano materiali su una scala olistica, che comprenda sia gli aspetti eco-tossicologici (environmental and health safety EHS), che ambientali (effetto serra, acidificazione, etc.). Questo per permettere di dare un supporto al processo decisionale sia dei legislatori/regolatori, che nelle varie fasi dello sviluppo tecnologico di un prodotto, dalla fase di R&D, alla fase produttiva, al marketing, al fine vita del prodotto. Nella riunione SG9 svoltasi a Roma [2] nel Settembre 2011 e nella successiva riunione plenaria di Parigi è stato deciso di utilizzare il *Life Cycle Assessment* [3] come approccio per valutare tutti gli aspetti dell'impatto dei nano materiali o di prodotti "nano-enabled". Mentre però questo approccio è già consolidato in vari processi e prodotti tradizionali, esistono pochi casi di studi approfonditi nel campo dei nano materiali. Per questo SG9 ha come primo obiettivo la stesura di un "Illustrative Guidance Manual" (IGM) basato su casi studio ritenuti rilevanti che possano permettere di identificare gli elementi di criticità della metodologia e i passaggi significativi in modo da formulare delle linee guida sull'uso dell'LCA dei nano materiali. Inoltre è emersa la necessità di integrare l'approccio LCA a considerazioni di *Risk Assessment* nel campo (SG6) per considerare in maniera appropriata le problematiche di tossicità, ecotossicità e sicurezza sul posto di lavoro. Si prevede che questo approccio possa superare gli scopi specifici del progetto in sé e raggiungere lo scopo ambizioso di aiutare in maniera ampia la comprensione delle conseguenze dell'introduzione nell'ambiente e in un sistema economico di nuove tecnologie e prodotti che ne derivano.

1. Isabella De Angelis. Il Working Party on Manufactured Nanomaterials dell'OCSE: obiettivi ed attività. Convegno "Nanomateriali e Salute", Roma, 10-11 maggio 2012

2. [http://www.enea.it/it/enea\\_informa/events/eventi-2011/OECD14092011/Manufactured-nanomaterials](http://www.enea.it/it/enea_informa/events/eventi-2011/OECD14092011/Manufactured-nanomaterials)

3. Paolo Masoni, Simona Scalbi, Grazia Barberio. Life Cycle Assessment di nanomateriali. Convegno "Nanomateriali e Salute", Roma, 10-11 maggio 2012

## **Nanotecnologie e nanomateriali nel settore dei dispositivi medici, dei servizi farmaceutici e della sicurezza delle cure**

Sara Angelone

Ministero della Salute

Direzione Generale dei dispositivi medici, del servizio farmaceutico e della sicurezza delle cure

[s.angelone@sanita.it](mailto:s.angelone@sanita.it)

Si rappresenta lo stato dell'arte della normativa vigente specifica e traslazione in materia di nanotecnologie e nanomateriali, con riferimento anche alle norme tecniche, alle iniziative dei gruppi di lavoro della Commissione Europea istituiti ad hoc con particolare riguardo al settore dei dispositivi medici, del servizio farmaceutico e della sicurezza delle cure. Si coglie l'occasione per effettuare brevi riflessioni sulla necessità di cambiamenti del diritto di fronte all'evoluzione della scienza, sottolineando l'utilità del diritto per l'operatore stesso tecnico - amministrativo che per utilizzatore finale. Si sostiene la necessità che l'impianto giuridico debba essere in grado di coprire i claims scientifici emergenti dello specifico settore delle nanotecnologie e dei nanomateriali, seppur a fronte di una spendibilità scientifica non sempre chiara, certa e condivisa dalla comunità scientifica stessa. A tal scopo si delineano criticità, esigenze e politiche della Direzione Generale dei dispositivi medici, del servizio farmaceutico e della sicurezza delle cure, miranti al superamento dei problemi correlati in generale alla sostenibilità, alla tutela della sicurezza e della salute dell'utilizzatore finale (operatori sanitari) e del paziente, garantendo parimenti qualità e libero mercato, nel rispetto sempre della diffusione di una cultura tecno-etica e di "nuovo approccio" dell'armonizzazione tecnica europea per la libera circolazione delle merci.

<http://www.salute.gov.it/>

<http://www.circa.europa.eu/>

[http://ec.europa.eu/health/index\\_it.htm](http://ec.europa.eu/health/index_it.htm)



## **POSTERS**



## **Valutazione del rischio di nanoparticelle negli alimenti: interazione tra nanoparticelle di TiO<sub>2</sub> e cellule intestinali**

Ammendolia M G<sup>1</sup>, Iosi F<sup>1</sup>, Superti F<sup>1</sup>, De Berardis B<sup>2</sup>

1.Dipartimento Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma

2.Dipartimento Ambiente e Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

[maria.ammendolia@iss.it](mailto:maria.ammendolia@iss.it)

Il tratto gastrointestinale è continuamente esposto a una considerevole quantità di microparticelle inorganiche tra cui anche nanoparticelle (NP). In particolare, le nanoparticelle di biossido di titanio (TiO<sub>2</sub>) costituiscono un potenziale rischio per la salute umana dal momento che vengono utilizzate come additivo alimentare in diversi prodotti. E' stata infatti riportata l'interazione delle NP di TiO<sub>2</sub> introdotte con la dieta con prodotti batterici endogeni e con le secrezioni mucosali del tratto gastrointestinale. Questo legame sembra favorire il loro passaggio nei fagociti intestinali che porterebbe all'esacerbazione dell'infiammazione, soprattutto nell'intestino di soggetti iperresponsivi con malattie infiammatorie croniche intestinali [1].

Dal momento che esistono pochi dati sulle proprietà tossicologiche delle NP di TiO<sub>2</sub> sul tratto gastrointestinale, abbiamo voluto investigare gli effetti *in vitro* dell'esposizione di cellule intestinali a NP di TiO<sub>2</sub>. Le NP di TiO<sub>2</sub> sono state innanzitutto caratterizzate mediante microscopia elettronica (SEM e TEM) associata a un sistema EDAX di micranalisi a raggi X. I dati di microscopia hanno evidenziato la presenza di due morfologie maggiori: sferule e particelle di forma irregolare. Erano inoltre presenti agglomerati di grandi dimensioni e catene di sferule. Solo 11% delle particelle analizzate possedeva dimensioni inferiori ai 100nm ed il diametro medio della distribuzione era di 289nm. Per valutare il possibile effetto tossico delle NP di TiO<sub>2</sub> sulle cellule intestinali, sono stati eseguiti test di citotossicità su HT-29 (cellule di carcinoma del colon umano) trattando le cellule con differenti concentrazioni di NP per diversi intervalli di tempo. I risultati non hanno evidenziato alcuna citotossicità a tutte le concentrazioni testate. Contemporaneamente, è stata valutata la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) su cellule trattate con NP. In questo caso, si è evidenziata la comparsa di stress ossidativo con valori crescenti in base alla concentrazione di NP; inoltre lo stress era maggiore a tempi brevi di trattamento per poi diminuire a tempi più lunghi. A causa dell'induzione di stress ossidativo, le cellule trattate sono state osservate in microscopia elettronica a trasmissione per la valutazione dello stato subcellulare. A tempi brevi di trattamento non si osservavano alterazioni ultrastrutturali evidenti a carico dei diversi organelli; nel citoplasma erano però presenti diverse forme aggregate di NP, alcune con specifica localizzazione nei mitocondri. A tempi più lunghi le cellule presentavano alterazioni mitocondriali e comparsa di corpi multivescicolari.

I nostri risultati preliminari confermano dati già riportati in letteratura su diverse linee cellulari [2] [3] riguardo l'induzione di stress ossidativo da parte di NP di TiO<sub>2</sub>, che potrebbero quindi rappresentare un fattore di rischio per la compromissione della funzionalità intestinale. Ulteriori studi sono in corso per valutare il coinvolgimento dei mitocondri e della funzionalità mitocondriale nell'interazione delle NP di TiO<sub>2</sub> con le cellule intestinali.

1. Powell JJ et al., *Autoimmun.* **14** (2000) p. 99.
2. Barone F et al., *Nanosafe 2010: International conference on safe production and use of nanomaterials* **304** (2011) p. 12047.
3. Iavicoli I et al., *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* **15** (2011) p. 481.

## **Ruolo della dimensione e della fase cristallina nel potenziale ossidativo delle polveri di TiO<sub>2</sub>**

Carella E, Fenoglio I, e Fubini B

Dipartimento di Chimica, Laboratorio TBM e Centro Interdipartimentale “G. Scansetti”  
per lo Studio degli Amianti e di altri Particolati Nocivi, Torino  
[emanuele.carella@unito.it](mailto:emanuele.carella@unito.it)

Il TiO<sub>2</sub> è un noto materiale fotocatalizzatore che se irradiato da radiazioni U.V. in ambiente acquoso genera specie reattive dell'ossigeno (ROS) quali radicali ossidrilici (HO<sup>•</sup>), radicali superossido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) e ossigeno singoletto (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>). L'attività fotocatalitica è modulata dalle dimensioni e dalla fase cristallina: il rutilo presenta una minor efficienza fotocatalitica rispetto all'anatasio. Tra le polveri commerciali, la polvere Aeroxide P<sub>25</sub> presenta una reattività particolarmente elevata. Questa polvere è costituita dalle due fasi rutilo e anatasio.

Il biossido di titanio è stato considerato a lungo un materiale biologicamente inerte [4]. Tuttavia esistono molti studi che evidenziano una possibile tossicità del TiO<sub>2</sub> in forma nanometrica. Inoltre, il TiO<sub>2</sub> è stato recentemente classificato come possibile cancerogeno dall'agenzia internazionale sulla ricerca sul cancro [5].

Alcuni studi riportano una maggior tossicità dell'anatasio e del P<sub>25</sub> rispetto al rutilo in sistemi in vivo [1] e in vitro [2,3]. Tuttavia non è chiaro se questa tossicità sia correlabile ad un maggior potenziale ossidativo delle polveri.

In questo studio è stata analizzata l'effetto della dimensione e della fase cristallina sul potenziale ossidativo del biossido di titanio. Sono stati selezionati cinque campioni nanometrici a diversa fase cristallina ma con simile area specifica, dimensione delle particelle primarie e purezza e due campioni micrometrici di confronto. Il potenziale ossidativo è stato valutato attraverso test spin trapping o spin probing/ESR, che hanno permesso di ottenere informazioni quantitative e qualitative sui ROS che queste nano polveri possono generare. Inoltre, la reattività nei confronti di membrane cellulari e acidi nucleici è stata valutata tramite saggi colorimetrici utilizzando l'acido linoleico e D-desossiribosio come molecole modello. Lo studio della reattività è stato effettuato sia in assenza che in presenza di illuminazione allo scopo di evidenziare una possibile generazione di ROS anche in assenza di luce.

I risultati ottenuti indicano un significativo differente potenziale ossidativo delle polveri a seconda della loro fase cristallina mentre non è stata riscontrata una significativa differenza di reattività specifica tra i campioni micro e nanometrici. Infine, per alcuni campioni, è stata osservata una residua attività anche al buio.

1. Warheit D.B. et al., *Toxicology* **230** (2007) p 90.
2. Sayes C.M. et al., *Toxicol. Sci.* **92** (2006) p 174.
3. Reeves J.F. et al., *Mutat. Res.* **640** (2008) p 113.
4. Kuoto et al., *Ann. Occup. Hyg.* **41** (1997) p 37.
5. IARC monograph on the evaluation of the carcinogenic risk to humans, Volume 93 (2010)

Questa ricerca è stata finanziata dall'INAIL Piemonte in collaborazione con il centro interdipartimentale “Giovanni Scansetti” dell'Università degli Studi di Torino.

## **Tossicità *in vitro* delle nanoparticelle di Ossido di Zinco**

Condello M<sup>1</sup>, Lista P<sup>2</sup>, Arancia G<sup>1</sup>, De Berardis B<sup>3</sup> e Meschini S<sup>1</sup>

1. Dipartimento Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma

2. Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma

3. Dipartimento Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

[maria.condello@iss.it](mailto:maria.condello@iss.it)

Nella comunità scientifica si stanno affrontando notevoli sforzi, per ottenere maggiori informazioni sulla composizione e proprietà delle nanoparticelle (NPs) ingegnerizzate utilizzate in prodotti commerciali e sanitari. A tale proposito è sorto da tempo un acceso dibattito scientifico riguardante l'opportunità di studiare e standardizzare le proprietà fisico-chimiche delle NPs. La conoscenza di tali parametri consentirà di regolamentarne l'utilizzo, come del resto è indispensabile fare per ogni nuova sostanza, prima della immissione sul mercato, nella comunità e nell'ambiente. La patogenicità delle NPs cresce in modo quasi esponenziale con il diminuire del loro diametro; più le NPs sono piccole e più aumenta la loro capacità di penetrare nei tessuti fino ad indurre attivazioni di segnali intracellulari tali da modificare il delicato equilibrio tra proliferazione e morte cellulare. Esse possiedono caratteristiche chimico-fisiche tali da poter essere utilizzate come importanti nanomateriali nel settore commerciale, industriale, ambientale, medico-diagnostico. Sulla base della loro crescente applicazione nei settori più disparati, diventa sempre più importante studiare gli eventuali effetti sulla salute umana e valutare il rischio associato al loro impiego.

Poiché una delle principali vie di ingresso delle NPs è rappresentata dal tratto gastro-intestinale, abbiamo avviato uno studio sugli effetti biologici di nanoparticelle di ZnO prendendo come modello sperimentale una linea cellulare di adenocarcinoma del colon (LoVo), facilmente coltivabile in laboratorio. Tali effetti sono stati confrontati con quelli indotti da particelle di biossido di titanio (TiO<sub>2</sub>), scelto come controllo negativo. L'attività biologica delle particelle è stata correlata alle caratteristiche chimico-fisiche valutate mediante tecniche microscopiche analitiche. È stato osservato che il trattamento con 5 µg/cm<sup>2</sup> di nanoparticelle di ZnO per 24 ore induceva una significativa diminuzione della vitalità cellulare ed un aumento delle specie reattive dell'ossigeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/OH<sup>•</sup>) con conseguente diminuzione dei livelli di glutatione e depolarizzazione della membrana mitocondriale interna. Le osservazioni delle modificazioni morfologiche e nucleari, accompagnate dalla valutazione di parametri biochimici, hanno dimostrato che le NPs inducevano morte cellulare per apoptosi. Si deve tener presente che le linee cellulari tumorali sono più resistenti all'induzione di morte cellulare per apoptosi rispetto alle linee normali, il che rende ancora più interessante il risultato.

Vista la pericolosità nell'ingestione di tali composti attraverso diverse fonti, ulteriori studi verranno effettuati per dimostrare, nel tratto gastro-intestinale, eventualmente l'uptake e la clearance a livello cellulare nonché il rilascio degli ioni Zinco.

## Internalizzazione di nanoparticelle di ZnO e TiO<sub>2</sub> in un modello in vitro di barriera intestinale

De Angelis I<sup>1</sup>, Bizzarri L<sup>1</sup>, Superti F<sup>2</sup>, Tinari A<sup>2</sup>, Giudetti G<sup>3</sup>, Rossi F<sup>3</sup>,  
De Berardis B<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento Ambiente e connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

<sup>2</sup> Dipartimento Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma

<sup>3</sup> European Commission, Joint Research Centre (JRC), Institute for Health and Consumer Protection,  
Nanobiosciences Unit, Ispra (Varese)

[isabella.deangelis@iss.it](mailto:isabella.deangelis@iss.it)

L'interazione delle nanoparticelle (NP) con le barriere epiteliali è considerato uno degli aspetti più rilevanti nello studio dei possibili effetti sulla salute umana, in quanto è attraverso di esse che le NP penetrano all'interno dell'organismo. D'altra parte è generalmente riconosciuto che alcune delle peculiari caratteristiche delle NP, come dimensioni, forma e carica superficiale, influenzano fortemente il loro comportamento e la loro reattività verso le strutture biologiche. In questo ambito, la barriera intestinale svolge un ruolo chiave per l'ingresso delle NP nell'organismo, in quanto rappresenta la principale "porta" di ingresso per le sostanze ingerite; è noto che l'assorbimento gastro-intestinale delle NP è maggiore (fino a 250 volte) rispetto alle particelle di dimensioni più grandi.

Scopo del presente lavoro è lo studio dell'interazione tra NP di ossido di Zinco (ZnO) e diossido di Titanio (TiO<sub>2</sub>) con cellule Caco-2 differenziate, coltivate per 21 giorni su inserti semi permeabili. Questa linea cellulare, derivante da un colon carcinoma umano, rappresenta un modello *in vitro* assai conosciuto e ben caratterizzato di barriera intestinale.

Prima dei trattamenti entrambe le NP sono state caratterizzate e definite dal punto di vista morfologico e dimensionale tramite microscopia elettronica a scansione e a trasmissione (SEM e TEM). Le NP di ZnO e TiO<sub>2</sub> presentano morfologie differenti: quelle di ZnO sono sferiche o a forma di rods, mentre quelle di TiO<sub>2</sub> solo sferiche. Entrambe le NP formano agglomerati con dimensioni fino a 1 µm. I diametri medi degli spettri granulometrici delle particelle sono 128 nm e 220 nm per ZnO NP e TiO<sub>2</sub> NP.

E' stata inoltre determinata la carica di superficie delle NP e lo Z-potential è risultato negativo per entrambe le particelle e pari a  $-15.6 \pm 2.4$  mV e  $-9.2 \pm 0.5$  mV per ZnO NP e TiO<sub>2</sub> NP rispettivamente.

Risultati preliminari, ottenuti attraverso l'analisi al TEM, hanno evidenziato che entrambe le NP attraversano velocemente i microvilli e la membrana cellulare, localizzandosi in forma libera nel citoplasma delle Caco-2. L'ingresso delle due NP sembra avvenire in maniera diretta, non mediato da processi di endocitosi.

I trattamenti sono stati effettuati con concentrazioni sub-tossiche di NP (2.5 µg/cm<sup>2</sup> ZnO e 5 µg/cm<sup>2</sup> TiO<sub>2</sub>), per un tempo massimo di esposizione di 24 ore, in mezzo di coltura privo di siero fetale.

L'internalizzazione delle NP non sembra, inoltre, essere correlata ad una alterazione dell'integrità di barriera in quanto non si osserva variazione nei valori di TEER tra trattati e controlli.

Lavoro effettuato nell'ambito dell'accordo di collaborazione n° CCR.IHCP.CA31557 tra l'Istituto Superiore di Sanità e l'European Joint Research Centre (JRC) Institute for Health and Consumer Protection.

## Life Cycle Assessment per i Nanomateriali nell'implementazione del REACH

Esposito D<sup>1</sup>, Pace E<sup>1</sup>

ISPRA - Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale, Roma, Italia  
[danial.esposito@isprambiente.it](mailto:danial.esposito@isprambiente.it)

La valutazione della sicurezza chimica (CSA-Chemical Safety Assessment) è lo strumento previsto dal regolamento REACH [1] per stabilire le condizioni di sicurezza delle sostanze chimiche attraverso la valutazione del rischio per tutte le sostanze soggette a registrazione in quantità  $\geq 10$  t/a. Ogni produttore/importatore ha infatti l'obbligo di valutare e documentare che i rischi delle sostanze siano adeguatamente controllati in fase di fabbricazione e da parte di tutti i soggetti che intervengono nel ciclo di vita della sostanza, fornendo tutte le informazioni pertinenti.

Nel caso dei nanomateriali (NM), già da tempo la Commissione Europea ha espresso una chiara esigenza di stabilire una piena comprensione dei benefici per l'ambiente e di individuare gli svantaggi delle nanotecnologie e dei nanomateriali rispetto a quelli di tecnologie e prodotti convenzionali lungo il loro ciclo di vita completo. Considera, inoltre, indispensabile riesaminare e adeguare i metodi di valutazione del rischio: *“Concretamente, affrontare i rischi potenziali delle nanotecnologie implica che la valutazione del rischio sia integrata in ogni fase del ciclo di vita dei prodotti derivati dalle nanotecnologie...”*[2]. La Life Cycle Assessment (LCA) è uno strumento utile per raggiungere questo obiettivo.

Attualmente, le conoscenze delle vie di esposizione e dei potenziali impatti ambientali dei NM è limitata. Inoltre, altri parametri quali la dimensione e la superficie delle nanoparticelle giocano un ruolo significativo nell'influenzare la salute umana e ambientale, più che i tradizionali parametri basati sulla concentrazione.

Tutte le informazioni ottenute in una LCA possono fornire input ulteriori rilevanti per la valutazione dei rischi umani e ambientali fondamentali per la creazione di scenari di esposizione completi.

La valutazione del rischio e la Life Cycle Assessment sono due differenti metodologie che si trovano di fronte a sfide simili in termini di lacune nei dati e incertezze relative agli effetti dei NM sulla salute e l'ambiente (carenza di dati sui processi produttivi, carenza di risultati dei test (eco-)tossicologici, etc.). Vi è la necessità di trovare il modo di integrare i due approcci per un reciproco vantaggio nella valutazione della sicurezza dei NM: il processo della valutazione del rischio potrebbe prendere in considerazione concetti relativi alla strategia di valutazione del ciclo di vita e viceversa al fine di mitigare le lacune conoscitive sui potenziali rischi derivanti dai NM. A tal fine è estremamente importante affrontare preliminarmente specifiche problematiche, quali ad esempio la coerenza nella terminologia, nei dati e flusso di informazioni.

1. Regolamento REACH (CE) N. 1907/2006.
2. COM(2004) 338: “Verso una strategia europea a favore delle nanotecnologie”

## Effetti di nano ZnO sull'intestino di embrioni di *Xenopus laevis*

Mantecca P<sup>1</sup>, Moschini E<sup>1</sup>, Colombo A<sup>1</sup>, Camatini M<sup>1</sup>, Fascio U<sup>2</sup>, Santo N<sup>2</sup>,  
Tremolada P<sup>3</sup>, Bacchetta R<sup>3</sup>

1. Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e del Territorio, Centro di Ricerca POLARIS, Università degli Studi di Milano Bicocca, Milano
2. Centro Interdipartimentale di Microscopia Avanzata (CIMA), Università degli Studi di Milano
3. Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Milano  
[paride.mantecca@unimib.it](mailto:paride.mantecca@unimib.it)

L'impatto di nanoparticelle (NP) di ossidi di metallo sulla salute dell'ambiente e dell'uomo merita di essere tenuto in considerazione dato il crescente utilizzo di questi materiali in svariate applicazioni tecnologiche. Recentemente l'ossido di zinco nanostrutturato (nZnO) ha invaso il mercato grazie alle sue proprietà antibatteriche e di filtro UV, che lo rendono particolarmente adatto nelle formulazioni di agenti di copertura per legno, plastica, vetro, tessuti. È inoltre molto utilizzato come agente stabilizzante nei cibi, nei prodotti cosmetici e in molti altri prodotti di consumo.

È stato dimostrato che nZnO è in grado di provocare effetti tossici in diversi sistemi biologici. Alcuni autori indicano che questi effetti sono principalmente dovuti agli ioni Zn<sup>2+</sup> rilasciati in soluzione dalle NP, altri sostengono la tesi che il contatto tra le NP e le cellule sia necessario per determinarne la tossicità [1].

In questo lavoro, mediante il test FETAX (Frog Embryo Teratogenesis Assay – *Xenopus*), sono stati studiati gli effetti di diversi nZnO sullo sviluppo embrionale dell'anfibio *Xenopus laevis*, e, in particolare, sono state caratterizzate le interazioni e le lesioni a livello di barriera intestinale. Risultati ottenuti in precedenza avevano infatti dimostrato l'embriotossicità di nZnO e l'induzione di malformazioni a carico dell'intestino [2].

Gli embrioni, dallo stadio di blastula fino al termine dell'organogenesi primaria, sono stati esposti a concentrazioni crescenti di nZnO (1-500 mg/L) e alla fine del test sono stati verificati i parametri di mortalità, malformazioni e ritardo di sviluppo. Sono stati misurati parametri di danno ossidativo e sono state condotte analisi istologiche e in microscopia confocale e elettronica per caratterizzare le interazioni delle NP con la mucosa intestinale, nonché la loro eventuale traslocazione.

I diversi nZnO hanno provocato effetti molto simili: mortalità trascurabile, ritardo di sviluppo concentrazione-dipendente e malformazioni caratteristiche a carico dell'epitelio intestinale, che nei casi più gravi presentava marcate modificazioni ultrastrutturali degli enterociti e una caratteristica presenza di nZnO in corrispondenza degli spazi paracellulari. Parallelamente si registrava un aumento del danno ossidativo a carico dei tessuti embrionali.

I dati ottenuti dimostrano che nZnO ha un'elevata tossicità durante lo sviluppo di *X. laevis* e che il rischio maggiore deriva dall'ingestione di materiale nanostrutturato, in grado di produrre lesioni alla mucosa intestinale, ma anche di attraversarla, raggiungendo altri organi non-bersaglio.

1. Moos PJ et al., Chem. Res. Toxicol. 23 (2010) p.733.

2. Bacchetta R et al., Nanotoxicology (2011) early on line, DOI:10.3109/17435390.2011.579634.

## Interazione del fibrinogeno con nanoparticelle di silice biossido di titanio e carbone

Marucco A<sup>1</sup>, Fenoglio I<sup>1</sup>, Turci F<sup>1</sup>, Byrne H J<sup>2</sup>, O'Neill L<sup>2</sup>, Fubini B<sup>1</sup>

1.Dipartimento di Chimica, Laboratorio TBM e Centro Interdipartimentale "G. Scansetti" per lo studio degli amianti e di altri particolati nocivi, Università degli Studi di Torino

2.Focas Research Institute, Dublin Institute of Technology, Dublin, Ireland.

[ariannamaria.marucco@unito.it](mailto:ariannamaria.marucco@unito.it)

Le polveri nanometriche di silice (SiO<sub>2</sub>), titania (TiO<sub>2</sub>) e carbonio trovano applicazione in un vasto numero di applicazioni industriali ad esempio come additivi in plastiche, gomma e pigmenti e come eccipienti in farmaci, cosmetici, e alimenti. Questi materiali sono inoltre studiati per applicazioni in nanomedicina come possibili carriers per uso terapeutico e diagnostico [1]. L'esposizione a questi materiali, sia accidentale che voluta, può avere degli effetti nocivi sulla salute umana. Le nano particelle sono infatti in grado di penetrare e distribuirsi nell'organismo attraversando le barriere biologiche e entrando nel circolo sanguigno.

Il primo evento che si verifica quando un solido viene in contatto con i fluidi biologici è l'adsorbimento di proteine sulla sua superficie. Il destino delle particelle nell'organismo così come la loro tossicità/biocompatibilità dipende da questa prima interazione [2,3]. I meccanismi molecolari alla base dell'interazione con proteine sono tuttavia ancora largamente sconosciuti.

Il fibrinogeno è delle proteine plasmatiche più abbondanti. Esso è coinvolto nella coagulazione, nell'aggregazione piastrinica e nella regolazione dei processi infiammatori. Il fibrinogeno ha una forte affinità per le superfici. Il suo adsorbimento può portare a modificazioni conformazionali che ne modulano l'attività. Nel campo dei biomateriali è noto come le proprietà chimico-fisiche delle superfici possano modulare l'adsorbimento di questa proteina [4]. Tuttavia, si sa ancora poco sui meccanismi di interazione del fibrinogeno con i materiali nanometrici.

In questo lavoro è stata studiata l'influenza della composizione chimica, dell'idrofilicità di superficie e della fase cristallina sull'interazione del fibrinogeno con nanoparticelle di silice titania e carbonio. Le caratteristiche di questi campioni sono state verificate attraverso tecniche FTIR, BET e XRD. Il grado di ricoprimento del fibrinogeno è stato monitorato con la costruzione di isoterme di adsorbimento (metodo dell'acido bicinconinico) e l'irreversibilità del processo di adsorbimento è stata valutata con la misura dei valori del potenziale  $\zeta$  al variare del pH (DLS). Sono inoltre state preparate particelle di silice a diversa idrofilicità e la conformazione del fibrinogeno ad esse adsorbito valutata attraverso spettroscopia Raman e microscopia a forza atomica (AFM). I dati ottenuti indicano come le proprietà di superficie delle nanoparticelle modulino l'interazione con il fibrinogeno.

1. Prokop A et al., Journal of Pharmaceutical Sciences **97** (2008) p. 3518-3590
2. Lynch I et al., Advances in Colloid and Interface Science **134-135** (2007) p.167-174
3. Fenoglio I et al., Advance Drug Delivery Review **63** (2011) p.1186-1209
4. Thevenot P et al., Current topics in medicinal chemistry **8** (2008) p. 270-280

Questa ricerca è stata in parte finanziata dalla European Science Foundation all'interno del progetto Epitope Map.

## Physiological and genotoxic impacts of nanomaterial exposure on plants

White J<sup>1</sup>, Marmiroli M<sup>2</sup>, Pagano L, Savo Sardaro M L, Marmiroli N

1. Department of Analytical Chemistry, Connecticut Agricultural Experiment Station, New Haven CT USA
2. Department of Environmental Sciences, University of Parma, Parma, Italy.  
[luca.pagano@nemo.unipr.it](mailto:luca.pagano@nemo.unipr.it)

Nanotechnologies are a rapidly growing industry that is expected to become a 2.6 trillion dollar market by 2015. Manufactured nanomaterials (MNMs) are currently used in areas such as electronics, biomedicine, pharmaceuticals, and cosmetics. Little is known about MNM mechanisms of biological uptake and interaction with cells, biological compartmentalization and chemical behaviour in the environment. The aim of our research is to use both common agricultural crops and model systems to gain a mechanistic understanding of the effects of nanomaterial exposure on plant species. In physiological studies, we are assessing the acute toxicity and bioaccumulation of 11 different nanomaterials (carbon nanotubes [CNT]/fullerenes, Ag, Cu, Au, Si, ZnO, CeO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) to a dozen agricultural crop species. Nanomaterial exposures, as well as corresponding bulk material and ion controls, are being conducted under hydroponic and soil-based conditions. Results to date show numerous instances of particle size-specific phytotoxicity, as well as concentration-dependent and species-specific response to MNM exposure. For example, nanoparticle Ag, Si, and MWCNTs reduced plant biomass and transpiration by 30-91% compared to equivalent bulk materials; element accumulation in plant shoots was inversely related to particle size. Fullerenes, Au, and SWCNTs had no impact on plant growth. Separately, the effect of fullerenes on the accumulation of co-contaminants (p,p'-DDE) by zucchini, tomato, and soybean was determined. For all species, fullerenes promoted p,p'-DDE accumulation in the plants, potentially through the enhanced uptake of a fullerene-pollutant complex. In parallel genetic studies with a model plant system, we isolated two mutant lines of *Arabidopsis thaliana* (*atnp01* and *atnp02*) tolerant to lethal concentrations of CdS NPs, mutagenized with Ac/Ds maize transposon. The tolerant phenotypes were characterized at physiological and molecular level. The profile analysis was performed using Affymetrix GeneChip Arabidopsis ATH1 Genome Array. Microarray analysis showed two different expression profiles for the two mutants, results suggest two different behaviours in the CdS NPs tolerance. Through our approach we tried to merge the two classical Top-down and Bottom-up approaches to find the genes directly involved in the CdS NPs tolerance and define pathways and networks of genes interactions relating the CdS NPs tolerance mechanisms. Plants are a useful instrument to determine and analyze the risk assessment of toxicity and genotoxicity of many types of MNMs. By integrating the results obtained on model plants and on crop plants it is feasible to augment the knowledge about the effects of MNMs on animals and human health.

## **Analisi LCA di un processo di sintesi bottom-up per la realizzazione di nanoparticelle di TiO<sub>2</sub>**

Anna Maria Ferrari, Martina Pini<sup>1</sup>

Università di Modena e Reggio Emilia, Dipartimento di Scienze e Metodi dell'Ingegneria, Reggio Emilia  
<sup>1</sup>En&Tech – Laboratorio di Ricerca Industriale, Reggio Emilia  
[martina.pini@unimore.it](mailto:martina.pini@unimore.it)

In questi ultimi anni, la titania nanodimensionale ha attirato considerevole attenzione come materiale potenziale nell'impiego di cosmetici, vernici, tessuti, ceramica, fotocalizzatore per la depurazione dell'ambiente, supporto catalitico e materiale dielettrico, grazie alle sue uniche proprietà fisicochimiche [1]. In generale, le procedure sintetiche utilizzate per la realizzazione di questo materiale, possono generare differenti forme cristalline come anatasio, rutilo, o un solido amorfo, a seconda del percorso di preparazione e alle condizioni sperimentali. Molti approcci sono stati usati per nanopolveri sintetizzate di biossido di titanio come la condensazione di gas inerte [2], il metodo sol-gel [3], la sintesi idrotermale [4] e così via.

In questo studio è stata analizzata una tecnica di sintesi in fase liquida, in particolare per la produzione di nanoTiO<sub>2</sub> in soluzione acquosa avente dimensioni comprese tra i 20 e 90 nm. Il processo prevede una fase di idrolisi del precursore titanio isopropossido e una successiva fase di condensazione della soluzione in gel. Tale tecnica permette di mantenere basse le temperature di processo, ottenere nanoparticelle aventi forma e dimensioni omogenee ed eliminare i problemi caratteristici delle sintesi top-down, legati alle emissioni in aria di nanopolveri, poiché la sintesi studiata avviene in fase liquida e in un sistema chiuso.

Lo studio LCA svolto, ha analizzato un processo di sintesi in fase liquida di una soluzione di nanoTiO<sub>2</sub>, con l'obiettivo di identificare quelli che sono gli aspetti più critici del metodo di sintesi. L'unità funzionale scelta è stata 0,717 kg di nanoTiO<sub>2</sub> in soluzione acquosa, valore che tiene in considerazione la resa della reazione partendo da 1 kg complessivo di materiale. Lo studio LCA è stato eseguito utilizzando il software SimaPro 7.3.3 e quattro metodi di valutazione d'impatto: Eco-Indicator'99, IMPACT 2002 +, ReCiPe e EPS 2000. I confini del sistema vanno dall'estrazione delle materie prime al confezionamento del prodotto finito, ("*dalla culla al cancello*"). In questa prima fase dello studio non è stata valutata la tossicità potenziale delle nanoparticelle, in quanto, al momento, non sono ancora chiaramente noti i meccanismi d'interazione delle nanoparticelle ingegnerizzate sulla salute umana.

L'analisi LCA ha mostrato che il consumo di energia elettrica per il funzionamento del reattore utilizzato per il processo di sintesi e l'utilizzo di titanio isopropossido costituiscono complessivamente il 77.75% del danno ambientale prodotto dai processi di sintesi oggetto dello studio.

1. Chen Y. F. et al., (2003) J. Cryst. Growth 274:363–370
2. Rubio J., et al., (1997) J. Mater. Sci. 32:643-652
3. Bokhimi A. Morales et al. (1995) J. Mater. Res.,10:2788-2796. doi:10.1557/JMR.1995.2788.
4. Corradi A.B., Bondioli F., Focher B., Ferrari A.M., Grippo C., Mariani E., Villa C. (2005) Conventional and microwave-hydrothermal synthesis of TiO<sub>2</sub> nanopowders. J. Am. Ceram. Soc. 88:2639–2641.

Il presente studio nasce dal lavoro svolto all'interno del progetto ARACNE ([www.aracne.emr.it](http://www.aracne.emr.it)).  
Si ringrazia Colorobbia Italia per il loro supporto nella compilazione dell'analisi d'inventario.

## Meccanismi di internalizzazione dei liposomi cationici

Bombelli C<sup>1</sup>, Bozzuto G<sup>2</sup>, Giuliani C<sup>1</sup>, Giansanti L.<sup>1</sup>, Stringaro A<sup>2</sup>, Colone M<sup>2</sup>,  
Toccaciel L<sup>2</sup>, Formisano G<sup>2</sup>, Mancini G<sup>1</sup>, Molinari A<sup>2</sup>

1. Istituto di Metodologie Chimiche, CNR e Dipartimento di Chimica, Università di Roma "Sapienza", Roma.

2. Dipartimento Tecnologie e salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma.

[agnese.molinari@iss.it](mailto:agnese.molinari@iss.it)

In un precedente lavoro abbiamo dimostrato come l'uso di liposomi cationici formulati con dimiristoil-*sn*-glicero-fosfatidilcolina (DMPC), e il tensioattivo cationico gemini (S, S) -2,3-dimetossi-1,4-bis (N-esadecil-N, N-dimetilammonio) butano bromuro (Gemini**1a**), migliorava l'efficienza del rilascio dell'agente fotosensibilizzante *m*-tetraidrossifenilclorina (*m*-THPC), in cellule umane di adenocarcinoma del colon [1] e in cellule di glioblastoma (GBM) umano e di ratto [2]. In tali lavori, in particolare, è stato dimostrato come la presenza di tensioattivo Gemini **1** nelle formulazioni liposomiali aumentava sia l'assorbimento cellulare della clorina [1, 2], sia il suo effetto citotossico dopo irradiazione con luce laser a 652 nm [2].

Allo scopo di studiare l'influenza della stereochimica del tensioattivo Gemini **1** sull'efficienza di delivery dell' *m*-THPC nelle cellule di GBM, i liposomi sono stati formulati con DMPC, e tensioattivo cationico Gemini **1a** (DMPC/1a), o Gemini **1b** (S, R) -2,3-dimetossi-1,4-bis (N-esadecil-N, N-dimetilammonio) bromuro butano (**1b**) (DMPC/1b).

L'efficienza di delivery delle formulazioni liposomiali DMPC/**1a** e DMPC/**1b** è stata valutata sulla linea cellulare C6 di GBM di ratto, e sulla linea cellulare LN229 di GBM umano, mediante citometria a flusso e microscopia confocale a scansione laser (LSCM). E' stato osservato che la stereochimica del surfactante influenzava fortemente l'efficienza di delivery e la distribuzione intracellulare dell' *m*-THPC.

Per studiare l'influenza della stereochimica del tensioattivo sull'interazione con la membrana cellulare e sul percorso di internalizzazione dei liposomi, sono stati impiegati due diversi approcci sperimentali. Nel primo è stata utilizzata una combinazione di diversi inibitori per bloccare selettivamente i diversi pathways di internalizzazione, valutandone gli effetti sia mediante citometria a flusso che LSCM. Per le osservazioni in LSCM le cellule di GBM sono state trasfettate utilizzando un reagente contenente un baculovirus in grado di dirigere l'espressione di proteine autofluorescenti in specifici compartimenti subcellulari come la membrana plasmatica o gli endosomi. Nel secondo approccio, sono stati impiegati diversi anticorpi specifici per gli organelli coinvolti nei percorsi endocitici, allo scopo di studiare la localizzazione dei liposomi durante il processo di internalizzazione. Gli esperimenti sono stati condotti sulle cellule preventivamente incubate con i liposomi marcati con una sonda fluorescente, e i risultati sono stati valutati mediante LSCM. I dati preliminari suggeriscono che le cellule di glioblastoma utilizzano diversi percorsi endocitici per internalizzare le diverse formulazioni liposomiali.

1. C. Bombelli et al., J. Med. Chem. **48** (2005) p4882.

2. A. Molinari et al., Int. J. Cancer **121** (2007) p1149.

## Interazioni tra nanotubi di carbonio funzionalizzati e macromolecole biologiche

Bomboi F<sup>1,2</sup>, Tardani F<sup>3</sup>, La Mesa C<sup>3,4</sup> e Bonincontro A<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Fisica, Sapienza Università di Roma

<sup>2</sup>CNISM

<sup>3</sup>Dipartimento di Chimica Sapienza Università di Roma

<sup>4</sup>SOFT-INFM-CNR Research Centre, Roma

[francesca.bomboi@gmail.com](mailto:francesca.bomboi@gmail.com)

I nanotubi di carbonio a parete singola (SWNTs) sono dotati di singolari proprietà fisico-chimiche che li rendono uno dei materiali più promettenti per la ricerca in campo biomedico [1,2,3]. Molte recenti studi sono, infatti, connessi con l'utilizzo dei nanotubi in ambito sanitario e con la loro possibile introduzione all'interno di sistemi biologici. Sebbene questi studi aprano nuove possibilità per la costruzione di sistemi nano-bio-ibridi, molti interrogativi sono aperti sulla natura dell'interazione nanotubi-biopolimeri e sui possibili effetti di questa interazione. Di conseguenza, si rende necessario uno studio sistematico del tipo e della entità delle interazioni che si manifestano.

Nel presente lavoro è stato analizzato il comportamento di un sistema modello, costituito da SWNTs in interazione con molecole di lisozima (LYS). In particolare, utilizzando un protocollo di funzionalizzazione covalente [4], sono state realizzate delle dispersioni stabili di nanotubi carichi negativamente. Le dispersioni sono state successivamente mescolate con soluzioni di lisozima. In questo modo è stato possibile seguire l'instaurarsi di interazioni elettrostatiche tra la carica netta esposta dalla proteina e la superficie dei SWNTs. La formazione dei complessi SWNT-proteina è stata investigata studiando parallelamente gli effetti della concentrazione di lisozima e delle variazioni di pH sui sistemi in esame. Misure di mobilità elettroforetica, spettroscopia dielettrica e scattering dinamico della luce hanno permesso il monitoraggio delle interazioni elettrostatiche, rendendo possibile l'identificazione delle condizioni di saturazione dei legami SWNT-LYS in differenti condizioni di pH.

E' stato riscontrato che tramite l'alterazione del pH delle soluzioni diventa possibile modulare le interazioni nanotubi-proteine. In particolare, a valori di pH inferiori al punto isoelettrico della proteina, la mobilità elettroforetica mostra la presenza di una zona critica in cui le molecole di lisozima adsorbite neutralizzano le cariche superficiali esposte dai SWNTs, promuovendo l'aggregazione. Tuttavia, un ulteriore adsorbimento proteico, sembra stabilizzare elettrostaticamente il sistema. Misure di dicroismo circolare indicano che la struttura secondaria del lisozima viene preservata nel corso dell'interazione.

La possibilità di comprensione delle proprietà chimico-fisiche di questi sistemi, quali le dimensioni degli aggregati, la natura del legame che si instaura e la conformazione della proteina nel corso dell'interazione apre la strada ad un possibile impiego in campo biologico, medico e farmaceutico. In particolare, la considerevole capacità di adsorbimento di proteina nello stato nativo lascia intravedere possibili applicazioni nel campo della drug delivery.

1. R. H. Baughman et al., *Science*, 284, 1340, (1999).
2. M. P. Mattson, et al., *J. Mol. Neurosci.*, 14, 175, (2000).
3. N. W. S. Kam et al. *PNAS*, 102 (33), 11600, (2005).
4. J. Liu et al., *Science*, 280, 1253, (1998).

Questa ricerca è stata finanziata da: Sapienza Università di Roma.

## **Microsfere di lisozima e cellule di adenocarcinoma mammario: studio di sintesi e biocompatibilità**

Colone M<sup>1</sup>, Tortora M<sup>2</sup>, Calcabrini A<sup>1</sup>, Zhou M<sup>3</sup>, Ashokkumar M<sup>3</sup>, Cavalieri F<sup>2</sup>  
e Stringaro A<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, Università di Tor Vergata, Roma

<sup>3</sup> School of Chemistry, University of Melbourne, Australia.

[marisa.colone@iss.it](mailto:marisa.colone@iss.it)

Recentemente, lo studio di microbolle (MB) e microcapsule (MC) reattive ha trovato una vasta applicazione multifunzionale sia per l'imaging a scopo diagnostico sia per il drug-delivery. Le proprietà strutturali e funzionali delle MB e delle MC sono state valutate utilizzando il dicroismo circolare. La biodegradabilità è stata valutata usando la proteolisi con proteinasi K tramite una nuova tecnica che utilizza l'alta frequenza (355 kHz) [1, 2]. I tests *in vitro* di biocompatibilità delle MB e delle MC sono stati condotti su una linea di adenocarcinoma mammario (SKBR3) utilizzando il test di vitalità cellulare MTT. I risultati ottenuti ci hanno permesso di valutare l'alto grado di biocompatibilità di queste microsfeere che non sono risultate tossiche. Inoltre, sono stati eseguiti anche degli esperimenti per verificare l'internalizzazione delle MB-FITC e delle MC-FITC da parte delle cellule SKBR3 mediante microscopia a fluorescenza. Le immagini ottenute hanno mostrato che entrambe le microsfeere sono in grado di penetrare nelle cellule tumorali. Le osservazioni da noi eseguite hanno rivelato che le MB subiscono delle significative alterazioni della loro morfologia diversamente dalle MC che conservano intatte sia la forma (sferica) sia le dimensioni.

Attualmente sono in corso degli studi per comprendere gli effetti dell'interazione di queste microsfeere su colture tridimensionali (3D) di cellule SKBR3. E' noto che questi sistemi costituiscono un approccio alternativo e/o parallelo alle colture cellulari bidimensionali 2D essendo il punto di legame tra la coltura cellulare tradizionale e i modelli *in vivo*.

Inoltre, stiamo programmando la nostra attività sperimentale al fine di validare l'impiego delle MB e MC nella medicina teranostica. Allo scopo di modificare e migliorare le interazioni delle microsfeere con le cellule tumorali sia dal punto di vista dell'adesione che della capacità di internalizzazione (uptake) verranno utilizzati diversi rivestimenti quali: latteferina, destrano e doxorubicina.

1. Cavalieri F, et al., *Small*, **7** (2011) p. 101.

2. Zhou M, et al., *Soft Mat.*, **7** (2011) p. 623.

## **Impiego di cristalli lamellari in polilattide adsorbiti con l'antigene tumorale HPV16 E7 nello sviluppo del vaccino HPV terapeutico**

Di Bonito P<sup>1</sup>, Petrone L, Casini G, Francolini I<sup>2</sup>, Accardi L<sup>1</sup>, C Gidaro, D'Ilario L<sup>2</sup>,  
Cesolini A<sup>1</sup>, Piozzi A<sup>2</sup> and Martinelli A<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departmento Malattie Infettive Parassitarie ed Immunomediate Istituto Superiore di Sanità Roma Italia.

<sup>2</sup>Departmento di Chimica, Sapienza, Università di Roma, Italia.

[paola.dibonito@iss.it](mailto:paola.dibonito@iss.it)

Il Poli-L-lattide (PLLA) è un polimero biodegradabile derivato dall'acido lattico utilizzato nella produzione di nano-e microparticelle per il rilascio controllato di farmaci. Particelle di PLLA sono state utilizzate anche nel delivery di antigeni per lo sviluppo di vaccini. Su cristalli singoli lamellari tal quali (PLLA) ed aminolizzati (APLLA) è stato adsorbito l'antigene tumorale E7 del Papillomavirus umano di tipo 16 (HPV16). Tali complessi E7-PLLA ed E7-APLLA sono stati utilizzati come vaccino nel modello tumorale murino di HPV16. I cristalli singoli di PLLA ( $M_w \approx 152 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ ) sono stati accresciuti a 90 °C da una soluzione in p-xilene (0, 25% w/v). Gruppi amminici liberi sono stati introdotti sulla superficie dei cristalli lamellari di PLLA mediante una amminolisi controllata con tetraetilenpentammina (APLLA). Le caratteristiche morfologiche di entrambi i tipi di particelle sono state studiate al microscopio elettronico a scansione (SEM). Entrambi i cristalli mostrano di possedere una forma esagonale, con una dimensione laterale di circa 15-20  $\mu\text{m}$  ed uno spessore di 11-12 nm. La proteina HPV16-E7 è stata adsorbita su entrambi i cristalli. I due tipi di supporto adsorbono simili quantità di proteina come valutato in SDS-PAGE (Casini et al 2010). Particelle E7-PLLA e E7-APLLA sono state utilizzate nel modello tumorale di HPV16. Gruppi di 10 topi C57BL/6 sono stati immunizzati mediante iniezione sottocutanea con 3 dosi da 10  $\mu\text{g}$ /topo con E7-PLLA o E7-APLLA. Ciascuna dose conteneva circa 26 mg/topo di polimero biodegradabile. Le dosi sono state somministrate a distanza di 2 settimane l'una dall'altra. Come controllo positivo, un gruppo di animali è stato immunizzato con la proteina E7 in forma di oligomeri (Petrone et al. 2011), mentre un quarto gruppo (naive) ha ricevuto soltanto una soluzione fisiologica. Una settimana dopo l'ultima immunizzazione una parte degli animali è stata processata per l'analisi della risposta immunitaria mentre la restante parte è stata sfidata con cellule tumorali TC-1 esprimenti i geni E6 ed E7 di HPV16. La crescita del tumore è stata controllata per 2 mesi. I risultati dimostrano che il campione E7-APLLA induce una risposta immunitaria E7-specifica superiore rispetto al campione E7-PLLA. La risposta immunitaria è sia umorale che cellulo-mediata. L'analisi degli isotipi IgG anti-E7 e delle cellule E7-specifiche produttrici  $\gamma$ -IFN suggeriscono l'induzione di una risposta mista Th1/Th2. Gli animali immunizzati con E7-APLLA sono risultati protetti rispetto alla crescita del tumore mentre tutti gli animali che hanno ricevuto E7-PLLA hanno sviluppato un tumore dopo 2, 3 settimane.

In conclusione E7-PLLA e E7-APLLA mostrano una diversa immunogenicità nel topo C57BL/6, le particelle aminolizzate usate come sistema di delivery potrebbero migliorare l'efficacia del vaccino HPV terapeutico basato sulla proteina E7 di HPV16.

Casini et al. Functionalized poly(l-lactide) single crystals coated with antigens in development of vaccines. *J Control Release*. 2010;148(1):e106-8.

Petrone L et al. Recombinant HPV16 E7 assembled into particles induces an immune response and specific tumour protection administered without adjuvant in an animal model. *J Transl Med*. 2011;9:69.

## Sintesi e caratterizzazione di nanoparticelle idrofiliche a base di oro o argento per applicazioni in biomedicina

Fontana L, Fratoddi I, Venditti I, Russo MV

Dipartimento di Chimica, Università “ La Sapienza” di Roma  
[laura3fontana@yahoo.it](mailto:laura3fontana@yahoo.it)

L'obiettivo di questo lavoro è stato lo studio sistematico del comportamento di diversi tioli nella preparazione di nanoparticelle d'oro (AuNPs) o di argento (AgNPs). I tioli impiegati, per la funzionalizzazione delle NPs sono stati scelti in funzione delle loro peculiari caratteristiche: il 3-mercapto-1-propansolfonato di sodio, (3MPS) in cui la presenza del gruppo solfonato può indurre una buona solubilità in acqua e in solventi polari; il 3-mercaptopropil-trimetossisilano, (3MPT) che oltre ad essere solubile in acqua, grazie alla presenza del gruppo terminale trimetossisilano è adatto a successive reazioni di reticolazione o ancoraggio su superfici. Per la sintesi delle AuNPs e delle AgNPs è stata seguita la metodologia di Schiffrin-Brust che prevede la riduzione di ioni  $\text{AuCl}_4^-$  o  $\text{Ag}^+$ , rispettivamente, ad opera di un forte riducente come il sodioboroidruro, in presenza dei tioli in esame [1]. Le indagini effettuate sulle NPs così ottenute, hanno consentito di verificare l'avvenuta funzionalizzazione della superficie metallica mediante i leganti tiolici, (spettroscopie Uv-vis, IR e NMR), e di ottenere informazioni sulle dimensioni medie e sulla carica delle NPs (misure DLS, Z-scan e TEM). Attraverso accurate procedure di purificazione è stato possibile ottenere una modulazione delle dimensioni delle nanoparticelle che presentano diametri compresi tra 15 nm e 180 nm per l'oro e tra 2 nm e 200 nm per l'argento. Inoltre è stata osservata la banda plasmonica a circa 520 nm per le AuNPs e 420 nm per AgNPs. In entrambi i casi le nanoparticelle risultano essere solubili in acqua e stabili. Le nanoparticelle presentano inoltre una carica superficiale che è stata sistematicamente variata variando la stechiometria della reazione. Introducendo in opportuni rapporti stechiometrici il tiolo 3MPT è stato possibile indurre reazioni di reticolazione che possono portare all'ottenimento di sistemi a network. I nanomateriali così ottenuti possono trovare impiego nelle applicazioni biomediche, in particolar modo le nanoparticelle solubili in acqua possono essere sfruttate per la veicolazione di farmaci mediante ad esempio interazione superficiale con specie bioattive che possono essere rilasciate in opportune condizioni [2,3].

1. C. Cametti, I. Fratoddi, I. Venditti, M.V. Russo, *Langmuir*, 27 (2011) 7084–7090
2. A. Laganà, I. Venditti, I. Fratoddi, A. L. Capriotti, G. Caruso, C. Battocchio, G. Polzonetti, F. Acconcia, M. Marino, M. V. Russo, *J. Coll. Interf. Sci.* 361 (2011) 465–471
3. I. Fratoddi, I. Venditti, C. Cametti, C. Palocci, L. Chronopoulou, M. Marino, F. Acconcia, M. V. Russo, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 93 (2012) 59– 66

Questa ricerca è stata finanziata con fondi Ateneo Sapienza (2011, prot. C26A11PKS2)

## **Caratterizzazione e attività biologica degli Exosomi prodotti dalle cellule Natural Killer umane**

Lugini L<sup>1</sup>, Cecchetti S<sup>2</sup>, Huber V<sup>5</sup>, Luciani F<sup>3</sup>, Macchia G<sup>2</sup>, Spadaro F<sup>2</sup>, Paris L<sup>2</sup>, Abalsamo L<sup>2</sup>, Colone M<sup>4</sup>, Molinari A<sup>4</sup>, Podo F<sup>2</sup>, Rivoltini L<sup>5</sup>, Ramoni C<sup>2</sup> e Fais S<sup>1</sup>

1. Dipartimento del Farmaco, Reparto Farmaci Antitumorali, Istituto Superiore di Sanità, Roma
2. Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma
3. Centro per la Ricerca e la Valutazione dei Prodotti Immunobiologici, Istituto Superiore di Sanità, Roma
4. Dipartimento Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma;
5. Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milano, Italia.

[luana.lugini@iss.it](mailto:luana.lugini@iss.it)

Gli esosomi sono delle nanovesicole bioattive secrete sia da cellule normali che tumorali nel soprannatante di coltura cellulare e in diversi liquidi biologici umani, tra cui il plasma. Negli ultimi anni grande attenzione è stata rivolta alle vescicole prodotte dalla maggior parte delle cellule ematopoietiche. Ad oggi però nulla è noto sugli esosomi prodotti dalle cellule Natural Killer (NKEXO) nonostante si conosca il ruolo rilevante che le vescicole intracellulari rivestono nella biologia delle NK e nell'immunosorveglianza in generale.

In questo studio ci siamo proposti di purificare e caratterizzare gli esosomi rilasciati dalle cellule NK umane, *in vitro* nel soprannatante di coltura cellulare ed *ex vivo*, nel plasma umano.

La caratterizzazione morfologica e fenotipica degli NKEXO *in vitro* ha dimostrato che gli esosomi sono prodotti costitutivamente in quantità paragonabili dalle cellule NK resting rispetto alle NK attivate, che esprimono sia marcatori esosomiali (Rab5B and CD63), che marcatori tipici delle cellule di origine (CD56, NKG2D, NKp30, NKp46, NKp44) e proteine killer funzionalmente attive (i.e. FasL e perforina).

Gli NKEXO sono in grado di indurre citotossicità verso diversi istotipi tumorali, in particolare a tempi brevi verso tumori di origine ematopoietica e a tempi più lunghi verso tumori solidi e linfociti attivati.

Inoltre abbiamo evidenziato che anche gli esosomi isolati dal plasma di donatori sani esprimono i marcatori delle cellule NK, compreso il CD56, e proteine killer biologicamente attive, tra cui la perforina, in grado di indurre la morte cellulare di diversi target tumorali, così come di cellule immunitarie attivate.

Questo studio dimostra pertanto che gli esosomi secreti dalle cellule NK umane possono avere un ruolo attivo sia nel sistema di immunosorveglianza che nel controllo omeostatico cellulare e quindi rappresentare un perfetto esempio di nanovesicole bio-mimetiche, funzionalmente attive, utili nei futuri e innovativi approcci terapeutici contro diverse malattie, inclusi i tumori.

## L'efficienza di delivery dei liposomi è influenzata dalla stereochimica del componente tensioattivo Gemini

Molinari A<sup>1</sup>, Bombelli C<sup>2</sup>, Stringaro A<sup>1</sup>, Borocci S<sup>3</sup>, Bozzuto G<sup>1</sup>, Colone M<sup>1</sup>, Giansanti L<sup>2</sup>, Sgambato S<sup>2</sup>, Toccaceli L<sup>1</sup>, Mancini G<sup>2</sup>

1. Dipartimento Tecnologie e salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma
2. Istituto di Metodologie Chimiche, CNR e Università degli Studi di Roma "Sapienza", Roma
3. Dipartimento di Scienze Ambientali, Università della Tuscia, Viterbo  
[giovanna.mancini@uniroma1.it](mailto:giovanna.mancini@uniroma1.it)

I liposomi formulati con dimiristoil-*sn*-glicero-fosfatidilcolina (DMPC) e con i due stereoisomeri del tensioattivo Gemini, (S, S) -2,3-dimetossi-1,4-bis (N-hexadecil-N, N-dimetilammonio) butano bromuro (Gemini **1a**) e (S, R) -2,3-dimetossi-1,4-bis (N-hexadecil-N, N-dimetilammonio) butano bromuro (Gemini **1b**) (DMPC/**1b**) sono stati studiati come vettori dell'agente fotosensibilizzante Temoporfina (*meta*-tetraidrossifenilclorina, *m*-THPC), già utilizzato nei trials clinici finalizzati al trattamento fotodinamico delle neoplasie della testa e del collo.

L'efficienza di delivery delle formulazioni liposomiali DMPC/**1a** e DMPC/**1b** è stata valutata su linee cellulari di glioblastoma umano (LN229) e murino (C6), mediante citofluorimetria a flusso e microscopia confocale a scansione laser (MCLS).

I risultati ottenuti indicano che la stereochimica del surfactante Gemini **1** influenza fortemente l'efficienza di trasferimento dell' *m*-THPC alle cellule, la modalità di interazione con la membrana cellulare, e la distribuzione intracellulare del fotosensibilizzante. Allo scopo di identificare i parametri che controllano il diverso comportamento biologico dei nanovettori sintetizzati, è stato condotto uno studio sulle loro caratteristiche chimico-fisiche. I risultati ottenuti suggeriscono che la diversa attività biologica delle due formulazioni viene influenzata sia dai valori di potenziale di superficie che dall'ambiente dell'*m*-THPC all'interfaccia acqua/liposomi [1].

1. C. Bombelli et al., Mol. Pharm. **7** (2010) p130.

## **Studio delle interazioni tra proteine e vescicole catanioniche per applicazioni nella terapia genica non virale**

Pucci C, Scipioni A e La Mesa C

Dipartimento di Chimica, Università “La Sapienza”, Roma, Italia.  
[carlotta.pucci@uniroma1.it](mailto:carlotta.pucci@uniroma1.it)

Negli ultimi anni, grande attenzione è stata rivolta allo studio di sistemi modello in grado di simulare i processi di interazione fra biopolimeri e cellule. Sistemi modello di un certo interesse sono le vescicole catanioniche, aggregati formati da una miscela non stechiometrica di due tensioattivi di carica opposta [1,2]. Avendo una struttura simile a quella delle membrane cellulari, potrebbero essere utilizzate come vettori di molecole biologicamente attive in tecnologie di drug delivery e transfezione, in particolar modo nella terapia genica non virale [3]. Per questo motivo è fondamentale studiare le interazioni che esplicano nei confronti delle macromolecole biologiche.

Le vescicole sintetiche da noi studiate sono formate da una miscela di didodecildimetilammonio bromuro e sodio dodecilsolfato in condizioni in cui è nota l'esistenza di una dispersione vescicolare stabile [4], con carica netta positiva. E' stata utilizzata come proteina modello l'albumina di siero bovino (BSA), la cui carica, al suo pH spontaneo, è negativa. Le interazioni proteina-vescicola sono state studiate mediante misure di mobilità elettroforetica, DLS, conducibilità e dicroismo circolare.

I risultati mostrano che in seguito al binding della proteina sulla superficie, le vescicole subiscono variazioni strutturali, all'aumentare della concentrazione di BSA. Le aggiunte successive di proteina determinano un aumento delle dimensioni degli aggregati. Contemporaneamente, la densità di carica superficiale diminuisce fino alla saturazione delle cariche presenti sulle vescicole, stato in cui il potenziale  $\zeta$  misurato è pari a zero e si osservano fenomeni di flocculazione o clustering. Aggiungendo albumina oltre il limite di saturazione, la proteina in eccesso rimane principalmente libera in soluzione, come mostrano le misure di conducibilità. In accordo con le misure di dicroismo circolare, il binding dell'albumina sulla superficie delle vescicole non determina una significativa variazione della sua struttura secondaria e terziaria.

Le stesse misure sono state ripetute in condizioni differenti dal pH spontaneo per valutare l'effetto della variazione della carica efficace della BSA sull'efficienza del binding. A pH 10, in cui la carica netta negativa della BSA aumenta, l'interazione è più forte e il limite di saturazione si ha per concentrazioni di albumina inferiori. A pH 4, invece, l'albumina ha carica netta positiva e l'interazione sembrerebbe trascurabile.

I risultati ottenuti in questo lavoro dimostrano l'esistenza di interazioni elettrostatiche tra proteina e vescicole che determinano la rapida formazione di complessi stabili in cui la proteina mantiene la sua struttura nativa e mettono in luce le enormi potenzialità delle vescicole catanioniche per un loro possibile impiego in nanomedicina.

1. Kaler E. W. et al., Science 245 (1989) p. 1374.
2. Yacilla M. T. et al., J. Phys. Chem. 100 (1996) p. 5879.
3. Ulrich A. S., Biosci. Rep. 22 (2002) p. 129.
4. Marques E. F. et al., J. Phys. Chem. B 102 (1998) p. 6746.

Questa ricerca è stata finanziata con fondi Ateneo 2011 La Sapienza di Roma.

## **Dispersioni di nanotubi di carbonio in matrici biocompatibili per applicazioni in nanomedicina**

Tardani F, Scipioni A e La Mesa C

Dipartimento di Chimica, Università "La Sapienza", Roma  
[franco.tardani@uniroma1.it](mailto:franco.tardani@uniroma1.it)

I nanotubi di carbonio (CNT) possiedono notevoli proprietà meccaniche, termiche ed elettroniche. L'introduzione di CNT in materiali compositi polimerici ha avuto crescente interesse ed è rilevante la produzione di bio-nanocompositi che combinino le proprietà dei CNT con la biocompatibilità della matrice. Inconveniente di non poco conto risulta essere, però, la scarsa disperdibilità dei nanotubi, in particolare in matrici a base acquosa. L'adsorbimento superficiale di biopolimeri (DNA, lisozima, albumina) è un metodo comune per aumentare l'idrofilicità del nanotubo e stabilizzarne la dispersione. Tuttavia, è fino ad oggi complicato ottenere buone dispersioni in sistemi organizzati ad alta concentrazione.

Nel presente lavoro sono state studiate, quindi, dispersioni di nanotubi in gel di DNA e/o lisozima. In primo luogo, sono stati proposti e indagati nuovi metodi di dispersione. Misure reologiche, light scattering, microscopia ottica e spettroscopia CD sono state utilizzate per la caratterizzazione delle dispersioni. Nel caso del DNA una separazione di fase segregativa è stata prodotta, tramite impiego di un altro polimero non-compatibile (sodio destransolfato). In particolare, le misure reologiche hanno rivelato variazioni considerevoli nelle proprietà meccaniche del gel per effetto dei CNT. Nessun effetto denaturante di rilievo è osservabile tramite spettroscopia CD.

Nelle matrici di lisozima, la formazione del gel è stata prodotta tramite denaturazione in soluzioni concentrate. Difficoltà nella dispersione di differenti quantità di CNT hanno impedito una valutazione degli effetti della concentrazione delle nanoparticelle. E' stato, però, osservato come la presenza di CNT e lo stato di aggregazione modifichino il processo di gelificazione.

In entrambi i sistemi l'applicazione di uno *shear* induce l'orientazione preferenziale nel verso della deformazione. Tale effetto è di particolare interesse per lo sfruttamento dell'anisotropia nelle proprietà ottiche e elettroniche dei nanotubi.

Lo studio di metodologie per l'introduzione di nanotubi di carbonio in gel biocompatibili può essere di importanza rilevante nelle future applicazioni di tali compositi [1,2]. L'elevato contenuto di acqua e la struttura a network con buone proprietà meccaniche rende il materiale adatto ad applicazioni biotecnologiche e biomediche.

- 1 Ballerini L. et al., J Nanoneurosci **1** (2008) p.1
- 2 Barron V. et al., Macromol Biosci **11** (2011) p. 1272

Questa ricerca è finanziata con i fondi Ateneo 2011 dell'Università degli Studi di Roma "La Sapienza".

## **Indagine sull'adeguatezza della normativa ambientale europea rispetto ai nanomateriali**

Esposito D, Pace E

ISPRA - Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale, Roma  
[danial.esposito@isprambiente.it](mailto:danial.esposito@isprambiente.it)

Data la rapida crescita nel numero e nelle diverse tipologie delle applicazioni dei nanomateriali (NM) nei prodotti, ci si aspetta che le emissioni nell'ambiente aumenteranno attraverso molteplici vie di esposizione. La Direzione Generale Ambiente della Commissione Europea ha commissionato uno studio al "Milieu and AMEC Environment & Infrastructure UK Ltd", finalizzato alla valutazione dell'adeguatezza della normativa ambientale dell'Unione europea rispetto ai nanomateriali [1]. Lo studio è in risposta alla risoluzione del Parlamento europeo del 24 aprile 2009, che chiede esplicitamente alla Commissione di valutare la necessità di effettuare una revisione della normativa ambientale [2].

Durante lo sviluppo di tale studio si è tenuto un incontro con i rappresentanti degli Stati Membri, a cui ha partecipato anche l'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA), e con i servizi della Commissione che ha offerto l'opportunità per un confronto e aggiornamento delle informazioni sulle attività degli Stati membri in materia di nanomateriali e dei loro potenziali impatti ambientali. I commenti ricevuti sono stati integrati nella relazione finale del progetto.

In linea generale, il rapporto si è posto i seguenti obiettivi:

-Sviluppare una metodologia per una valutazione della copertura dei nanomateriali attraverso i diversi atti legislativi.

-Passare in rassegna tutte le normative del settore ambiente, (rifiuti, emissioni, qualità ambientale per l'aria e per l'acqua, etc.) in relazione alla applicabilità ai NM.

-Identificare e descrivere le lacune della legislazione ambientale nell'attuazione, per quanto riguarda la copertura dei NM.

In particolare, la relazione identifica se le lacune sono dovute, tra l'altro, al fatto che i nanomateriali non rientrano nell'obiettivo generale della normativa, o al fatto che i NM sono compresi negli obiettivi generali, ma esplicitamente esclusi dal campo di applicazione (ad esempio non presenti nell'elenco degli inquinanti regolamentati); oppure sono compresi in linea di principio, ma non affrontati in modo adeguato (ad es. aspetti critici dei metodi di misura, criteri di monitoraggio, etc.); oppure i nanomateriali sono compresi, ma in modo non efficace a causa di lacune nell'attuazione o per riferimenti inadeguati ad altre normative.

Questo studio contiene informazioni preziose per la risposta della Commissione al Parlamento sugli aspetti regolamentari dei nanomateriali.

1. Milieu Ltd. and Entec UK Ltd. "Review of Environmental Legislation for the Regulatory Control of Nanomaterials". Interim Report. June 2011
2. European Parliament resolution on "Regulatory aspects of nanomaterials," (2008/2208(INI)).



## INDICE DEGLI AUTORI

### A

ABALSAMO L. - 57  
ACCARDI L. - 55  
ALESSANDRELLI M. - 35  
ALIMONTI A. - 6  
ANGELONE S. - 39  
AMMENDOLIA M.G. - 43  
ARANCIA G. - 45  
ASHOKKUMAR M. - 27; 54  
AURELI F. - 16  
AZZARITO T. - 24

### B

BACCHETTA R. - 48  
BARBERIO G. - 14; 38  
BARONE F. - 9  
BEDINI R. - 30  
BIZZARRI L. - 46  
BOCCA B. - 6  
BOCCUNI F. - 12  
BOMBELLI C. - 52; 58  
BOMBOI F. - 53  
BONINCONTRO A. - 53  
BORASCHI D. - 10  
BORGHI M. - 24  
BOROCCI S. - 58  
BORGNA S. - 21  
BOZZUTO G. - 26; 52; 58  
BYRNE H. J. - 49

### C

CALCABRINI A. - 27; 54  
CAMATINI M. - 48  
CANESI L. - 15  
CANITANO A. - 24  
CARELLA E. - 44  
CASINI G. - 55  
CAVALIERI F. - 23; 27; 54  
CECCHETTI S. - 57  
CESOLINI A. - 55  
CHIESI A. - 31  
COLOMBO A. - 48  
COLONE M. - 27; 52; 54; 57; 58  
CONDELLO M. - 45  
CUBADDA F. - 16

### D

D'AMATO M. - 16  
D'ILARIO L. - 55  
DE ANGELIS I. - 37; 46  
DE BERARDIS B. - 4; 43; 45; 46  
DE MARTINIS D. - 38  
DI BONITO P. - 55  
DI FELICE G. - 11; 27

### E

ESPOSITO D. - 47; 61

### F

FAIS S. - 24; 57  
FASCIO U. - 48  
FEDERICI C. - 24  
FENOGLIO I. - 5; 44; 49  
FERRARI A. M. - 51  
FONTANA L. - 56  
FORMISANO G. - 52  
FRANCOLINI I. - 55  
FRATODDI I. - 56  
FUBINI B. - 44; 49

### G

GARGINI C. - 29  
GASCO P. - 29  
GHIDONI R. - 29  
GIANSANTI L. - 52; 58  
GIDARO C. - 55  
GIUDETTI G. - 46  
GIULIANI C. - 52

### H

HUBER V. - 57

### I

IAVICOLI S. - 12  
IOSI F. - 43  
ITALIANI P. - 10

### K

KOHNKE F. H. - 22

### L

LA MESA C. - 53; 59; 60  
LARESE FILON F. - 8  
LISTA P. - 45  
LOGOZZI M. - 24  
LOZUPONE F. - 24

LUCIANI F. - 57  
LUGINI L. - 24; 57

## **M**

MACCHIA G. - 57  
MANCINI G. - 25; 52; 58  
MANTECCA P. - 48  
MARANGHI F. - 17  
MARCHETTI M. - 28  
MARMIROLI M. - 50  
MARMIROLI N. - 50  
MARTINELLI A. - 55  
MARUCCO A. - 49  
MASONI P. - 14  
MESCHINI S. - 45  
MOLINARI A. - 52; 57; 58  
MORACCI G. - 16  
MOSCHINI E. - 48

## **O**

O'NEILL L. - 49

## **P**

PACE E. - 47; 61  
PAGANO L. - 50  
PARIS L. - 57  
PETRONE L. - 55  
PETRUCCI F. - 6  
PINI M. - 51  
PIOZZI A. - 55  
PODO F. - 57  
POLCI M.L. - 36  
POMPA P.P. - 7  
PUCCI C. - 59

## **R**

RAGGI A. - 16  
RAMONI C. - 57

RIVOLTINI L. - 57

ROSSI F. - 3; 46

RUSSO M.V. - 56

## **S**

SANTO N. - 48  
SAVO SARDARO M. L. - 50  
SCALBI S. - 14; 38  
SCHIAVI E. - 27  
SCIPIONI A. - 59; 60  
SETTIMO G. - 13  
SGAMBATO S. - 58  
SILANO V. - 18  
SPADARO F. - 57  
STRETTOI E. - 29  
STRINGARO A. - 27; 52; 54; 58  
SUPERTI F. - 28; 43; 46

## **T**

TARDANI F. - 53; 60  
TASSINARI R. - 17  
TINARI A. - 46  
TOCCACIELI L. - 52; 58  
TORTORA M. - 27; 54  
TREMOLADA P. - 48  
TURCI F. - 49

## **V**

VENDITTI I. - 56  
VENTURI G. - 24

## **W**

WHITE J. - 50

## **Z**

ZAROVNI N. - 31  
ZHOU M. - 27; 54  
ZUPPANTE F. - 30