

Lo sviluppo e l'implementazione di metodi validati e/o alternativi per la determinazione delle caratteristiche fisico-chimiche, delle dimensioni, della distribuzione, dell'agglomerazione e della potenziale attività geno/tossicologica di nanomateriali rilevanti per diversi settori industriali

Numerosi studi dimostrano che le nanoforme di sostanze e miscele possono avere caratteristiche diverse rispetto allo stesso materiale non in nanoforma (forma *bulk*); di conseguenza, le proprietà fisico-chimiche dei nanomateriali possono presentare effetti nei confronti dell'uomo e dell'ambiente diversi da quelli di sostanze "*bulk*" o di particelle con dimensioni maggiori, risulta, quindi, necessario sviluppare criteri specifici di valutazione del rischio in funzione della tipologia e dell'uso dei nanomateriali.

Le peculiari e specifiche proprietà fisico-chimiche delle nano particelle (NP), attribuibili alle loro piccole dimensioni (<100nm), come struttura e area di superficie, solubilità, forma ed aggregazione, carica e reattività superficiale rendono complesso lo studio della loro interazione con i sistemi biologici. Conseguentemente, per un'adeguata valutazione del potenziale rischio per l'uomo e per l'ambiente associato all'esposizione a nanomateriali, diviene indispensabile sia studiare la relazione tra composizione fisico-chimica e tossicità sia verificare se i saggi di tossicità comunemente richiesti per la valutazione del rischio delle sostanze, siano sufficientemente predittivi anche per i nanomateriali (NM) o se richiedano lo sviluppo di nuove strategie e/o metodologie di saggio.

Utilizzando particelle di TiO₂(biossido di titanio), e SiO₂ (biossido di silicio), sono stati raggiunti i seguenti obiettivi:

- determinazione delle caratteristiche fisico-chimiche delle particelle di TiO₂(biossido di titanio), e SiO₂ (biossido di silicio) nelle dimensioni micro e nano, mediante tecniche di microscopia elettronica analitica, quali microscopia elettronica a scansione (SEM) e a trasmissione (TEM) munite di spettrometria a raggi X a dispersione di energia (EDX).
- studio della citotossicità valutando tutti i processi cellulari che possono indurre effetti negativi al DNA quali:
 - progressione del ciclo cellulare;
 - stress ossidativo;
 - danno ossidativo al DNA;
 - integrità cromosomica; tale test consente la misurazione di parametri di danno cromosomico (micronuclei, ponti citoplasmatici, malsegregazione cromosomica) nonché di proliferazione e morte cellulare;
 - mutazione genica: test *in vitro* su linee cellulari di mammifero.

La valutazione dei dati ottenuti con i metodi sopra descritti mira a:

- definire metodi di misura adeguati per consentire l'applicabilità dei saggi tossicologici ai nanomateriali;
- verificare, adottando i metodi di misura definiti, l'applicabilità dei saggi tossicologici esistenti ai nanomateriali;
- supportare la classificazione e conseguente etichettatura dei nanomateriali, per i quali la classificazione di pericolosità è basata sulle proprietà intrinseche riferite alla forma o allo stato fisico nel quale vengono posti sul mercato o nel quale si prevede vengano ragionevolmente utilizzati;
- dare un contributo alla messa a punto di linee guida specifiche per i nanomateriali da sottoporre come proposta nell'ambito del *Working Party on Manufactured*

Nanomaterials (WPMN) dell'OECD, del *Nanomaterials Expert Group (NMEG)* dell'ECHA e del *Competent Authorities Subgroup on Nanomaterials (CASG-Nano)* del CARACAL.

Dalle prove effettuate per valutare le caratteristiche chimico-fisiche delle nanoparticelle si può evincere che non esiste un metodo univoco per caratterizzare tutte le nanoparticelle considerate. Si conferma quindi quanto evidenziato dall'ECHA che suggerisce di applicare più tecniche analitiche per sopperire alle limitazioni riscontrate nell'approccio sperimentale e per facilitare l'implementazione normativa. La sola microscopia elettronica, infatti, non è in grado di fornire informazioni univoche sull'aggregazione e il comportamento idrodinamico delle nanoparticelle nei mezzi di coltura utilizzati nei test tossicologici.

Per quanto riguarda la tossicità, considerando che il principale effetto delle nanoforme è indurre un'anomalia o un'alterazione nella struttura di un cromosoma attraverso l'induzione di specie reattive dell'ossigeno, la valutazione del danno ossidativo a carico del DNA ha portato a risultati più sensibili in corrispondenza all'esposizione a TiO_2 . Per quanto riguarda i protocolli sperimentali utilizzati per la determinazione di citotossicità del SiO_2 , le nanoparticelle esaminate non hanno presentato problemi tecnici di esecuzione dimostrandosi adatte allo scopo.

I risultati conseguiti attraverso i menzionati progetti sono confluiti nell'attività di supporto svolta dall'Italia sinergicamente con gli altri Stati Membri, l'ECHA e la Commissione Europea per l'adeguamento ai nanomateriali della normativa sulle sostanze chimiche e delle relative linee guida.