

ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BOLOGNA

FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE FISICHE E NATURALI
Corso di laurea magistrale in
ANALISI E GESTIONE DELL'AMBIENTE

**Valutazione del Fattore di Effetto nella metodologia LCA: test sperimentali di
tossicità indotti da nanoparticelle di Diossido di Titanio sull'alga
*Pseudokirchneriella Subcapitata***

Tesi di laurea in: Sistemi di Gestione, Politica ed Economia Ambientale

Relatore:

Prof. Massimo Andretta

Presentata da:

Sophia Tomassini

Correlatore:

Dott.ssa Beatrice Salieri

Correlatore:

Dott.ssa Tiziana Campisi

III SESSIONE

Anno accademico 2011/12

Sommario

INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI	1
CAPITOLO 1. LCA, Life Cycle Assesment	3
1.1 Che cos'è l'LCA.....	3
1.2 Fasi dell' LCA.....	5
1.3 Categorie tossiche nell'LCA	13
1.4 Il modello USEtox.....	14
1.4.1 Fattore di Caratterizzazione per il modello USEtox.....	15
CAPITOLO 2. Nanotecnologia	19
2.1 Cosa si intende per nanotecnologia	19
2.2 Nanoparticelle	20
2.2.1 Nanoparticelle ingegnerizzate (ENPs)	22
2.2.2 Nanoparticelle di Diossido di Titanio (n-TiO ₂)	23
2.2.3 Processi di trasformazione e trasporto delle nanoparticelle in ambiente	25
2.2.4 Valutazione delle concentrazioni ambientali di ENPs: stato dell'arte.....	27
CAPITOLO 3. Tossicologia ed ecotossicologia.....	32
3.1 Definizione e storia	32
3.2 Meccanismi fisiologici di assorbimento, distribuzione ed escrezione.....	33
3.3 Saggi di tossicità'.....	35
3.3.1 Saggi ecotossicologici acquatici.....	36
3.4 Curva di tossicità'	38
CAPITOLO 4. Materiali e metodi.....	40
4.1 Nanoparticelle di Diossido di Titanio (n-TiO ₂)	40
4.2 Ceppo <i>Pseudokirchneriella Subcapitata</i> (o <i>Selenastrum capricornutum</i>)	41
4.2.1 Allevamento e mantenimento subcoltura	41
4.2.2 Curva di crescita	42
4.3 Test di inibizione algale con tossico di riferimento: Bicromato di Potassio (K ₂ Cr ₂ O ₇).....	43
4.4 Test di inibizione algale con nanoparticelle di Diossido di Titanio (n-TiO ₂)	45
4.5 Verica dell'end-point	47
4.6 Elaborazione dei dati con il software "Statistica"	51
4.6.1 Calcolo dei valori di EC ₅₀	51
4.6.2 Test di Significatività tra i valori di EC ₅₀ ottenuti	52

4.7 Apparecchiature e reagenti	52
CAPITOLO 5. Risultati dei saggi ecotossicologici condotti su <i>Pseudokirchneriella Subcapitata</i>	54
5.1 Test di inibizione con tossico di riferimento $K_2Cr_2O_7$: confronto tra i tre metodi di lettura	54
5.2 Test di inibizione con nanoparticelle di Diossido di Titanio (n-TiO ₂): confronto tra i tre metodi.....	55
5.2.1 Elaborazione statistica dei dati e confronto tra i tre metodi di lettura.....	55
5.2.2 Risultati ottenuti dalle letture al microscopio ottico	58
5.2.3 Risultati ottenuti dalle letture al spettrofotometro	60
5.2.4 Risultati ottenuti dalle letture allo spettrofluorimetro	61
5.3 Test di Significatività (T di Student) dei valori di EC ₅₀ ottenuti dalla lettura al microscopio	62
5.4 Confronto tra i risultati ottenuti e altri valori di EC ₅₀ trovati in letteratura	64
CAPITOLO 6. Stima del fattore di effetto per n-TiO ₂	68
6.1 Fattore di Effetto EF.....	68
6.1.1 Review bibliografica: valori eco tossicologici per alghe esposte a n-TiO ₂	68
6.1.2 Review bibliografica: valori eco tossicologici per crostacei esposti a n-TiO ₂	75
6.1.3 Review bibliografica: valori eco tossicologici per pesci esposti a n-TiO ₂	79
6.2 Valutazione del Fattore di Effetto per n-TiO ₂	83
CAPITOLO 7. Applicazione alla metodologia LCA: Fattore di Caratterizzazione per n-TiO ₂	86
7.1 Fattore di Destino	86
7.2 Calcolo del Fattore di Destino	93
7.3 Calcolo del Fattore di Caratterizzazione.....	96
CONCLUSIONI	97
BIBLIOGRAFIA	100

INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI

La nanotecnologia è una scienza innovativa che sviluppa e utilizza materiali di dimensioni nanometriche (< 100 nm). La ragione per cui lo sviluppo e il mercato delle nanoparticelle si stia notevolmente allargando è legata alle interessanti proprietà chimico-fisiche insite alle nano dimensioni. Le nanoparticelle (ENPs) sono dotate di buona resistenza e grande reattività chimica e catalitica, soprattutto se foto attivate; grazie alla capacità di assorbire un ampio spettro di radiazioni, e quindi proteggere dai raggi UV, le NPs vengono impiegate nelle celle solari, nei prodotti cosmetici e in quelli per l'edilizia [Maier et Korting, 2005; Hao et al., 2009]. L'attività foto catalitica delle nanoparticelle consente di adoperarle anche in opere di bonifica ambientale, ad esempio nel trattamento delle acque, perché ottimi degradatori microbici e distruttori di inquinanti di vario tipo [Aitken et al., 2006].

Lo sviluppo tecnologico e sostenibile delle nanoparticelle è accompagnato da una scarsa conoscenza relativa al destino finale e agli effetti tossicologici che questi nano materiali provocano nell'ambiente [Handy et al., 2008]. A differenza della tradizionale forma bulk, le nano particelle destano preoccupazioni dal punto di vista tossicologico; le piccole dimensioni e la reattività dell'area superficiale permettono alle ENPs di penetrare le barriere cellulari ed essere assorbite dalle cellule generando effetti tossici ad un notevole numero di specie [Reeves et al., 2008]. La pericolosità delle ENPs, soprattutto se foto attivate, sta nella capacità di provocare danni ossidativi [Gurr et al., 2005; Reeves et al., 2008, Jiang et al., 2008], effetti citotossici, e instabilità genomica in piante, microorganismi e mammiferi [Hao et al., 2009].

La modalità più comune per questa tipologia di sostanze di raggiungere l'ambiente è attraverso gli scarichi e gli effluenti, generando così un elevato rischio per gli ambienti acquatici [Crane et Handy, 2007]. La metodologia LCA (Life Cycle Assessment – Valutazione del Ciclo di Vita) è riconosciuta come uno strumento ideale per valutare e gestire gli impatti ambientali indotti dalla produzione, dall'uso e dal fine vita delle nanotecnologie.

Finora sono stati condotti pochi studi LCA sui nanomateriali e sulle nanoparticelle. In particolare la categoria d'impatto di ecotossicità è scarsamente investigata, così come i Fattori di Caratterizzazione volti a quantificare la pericolosità della sostanza d'indagine. Nella metodologia LCA gli impatti ecotossicologici sono stimati in termini di Impact Score, calcolato come il prodotto tra la massa di sostanza emessa nell'ambiente e il rispettivo Fattore di Caratterizzazione. Il Fattore di Caratterizzazione è specifico per ogni sostanza e ne rappresenta la pericolosità.

Lo sviluppo dei Fattori di Caratterizzazione CF per categorie d'impatto tossicologiche, richiede la conoscenza dei meccanismi di causa-effetto (rilascio, esposizione, effetto) relativi all'emissione di una sostanza nell'ambiente. Di conseguenza il CF viene calcolato attraverso la moltiplicazione di tre fattori rappresentanti rispettivamente il destino di una sostanza nell'ambiente (Fattore di Destino), l'esposizione (Fattore di Esposizione), e gli effetti tossicologici (Fattore di Effetto).

Ad oggi sono ancora scarse le conoscenze scientifiche sul destino ambientale delle ENPs, sulla loro esposizione e sui loro effetti tossicologici, pertanto in letteratura non si dispone ancora di Fattori di Caratterizzazione per questa nuova categoria di inquinanti.

Il lavoro di questa tesi ha l'obiettivo di stimare il Fattore di Effetto per nanoparticelle di Diossido di Titanio ($n\text{-TiO}_2$). Seguendo il modello concettuale proposto dal modello di caratterizzazione USEtox, il Fattore di Effetto viene calcolato sulla base dei valori tossicologici di EC_{50} relativi agli organismi acquatici rappresentati tre livelli trofici: alghe, crostacei, pesci.

Per ottenere un modesto set di valori tossicologici da utilizzare per il calcolo dell'EF, è stata svolta un'esauriente ricerca bibliografica, avente anche lo scopo di individuare le caratteristiche delle $n\text{-TiO}_2$ maggiormente responsabili degli effetti tossici esercitati sugli organismi saggiati.

Inoltre è stata svolta un'indagine sperimentale per valutare gli effetti tossici indotti da $n\text{-TiO}_2$ sulla specie algale *Pseudokirchneriella Subcapitata*; i test sono stati condotti presso il C.R.S.A (Centro Ricerche e Servizi Ambientali) Med Ingegneria s.r.l a Marina di Ravenna, e presso i laboratori C.I.R.S.A (Centro Interdipartimentale di Ricerca per le Scienze Ambientali) dell'Università di Bologna.

I saggi sono stati eseguiti in accordo con la norme UNI EN ISO 8692:2005 e UNI 11006:2002 e hanno avuto lo scopo di determinare come endpoint la crescita algale alle 72 ore. La lettura dei saggi è stata svolta applicando tre differenti metodi quali la conta cellulare al microscopio ottico, l'assorbanza allo spettrofotometro e l'intensità di fluorescenza allo spettrofluorimetro in modo tale da confrontare i risultati e valutare quale sia la tecnica, in generale, preferibile per lo studio di saggi condotti con $n\text{-TiO}_2$.

Il lavoro sperimentale ha inoltre permesso di ampliare i valori di EC_{50} finora disponibile in letteratura e di affiancare un progetto di ricerca dottorale utilizzando il Fattore di Effetto per $n\text{-TiO}_2$ nel calcolo del Fattore di Caratterizzazione.

CAPITOLO 1. LCA, Life Cycle Assessment

1.1 Che cos'è l'LCA

L'origine della valutazione "Life Cycle Assessment" LCA deriva dalla necessità di ottimizzare l'utilizzo di risorse impiegate nelle attività produttive, in termini di risparmio energetico e salvaguardia dell'ambiente e dell'uomo. A partire dagli anni '70 l'Agenzia americana per la Protezione dell'Ambiente (EPA, Environmental Protection Agency) propose degli studi applicativi aventi lo scopo di confrontare, dal punto di vista ambientale, diversi prodotti ma con stessa funzionalità. Si ricordano gli studi svolti sotto il nome di REPA (Resource and Environmental Profile Analysis) tra i quali merita essere menzionata la ricerca commissionata dalla Coca Cola Company del 1969. L'obiettivo dello studio era quello di identificare il miglior imballaggio (plastica, alluminio, vetro o acciaio) dal punto di vista energetico ed ecologico, in base alla miglior strategia di impiego del contenitore a fine uso [Baldo et al., 2005].

Successivamente, negli anni '80, insorse il concetto di sviluppo sostenibile a seguito dei massicci consumi di risorse non rinnovabili, della crisi energetica e petrolifera, dei preoccupanti livelli di inquinamento ed infine dell'inopportuno smaltimento dei rifiuti. Tali evidenze indussero verso un'ideologia innovativa che potesse correggere la teoria economica classica e garantire l'utilizzo delle risorse naturali alle generazioni attuali e future: nacque il concetto di "teoria dello sviluppo sostenibile" [Baldo et al., 2005].

Nello stesso periodo in Europa fu pubblicato il manuale di analisi energetica, il primo in grado di offrire una descrizione operativa del procedimento analitico interno alla metodologia LCA; seguirono numerose integrazioni e miglioramenti da parte della REPA americana in quanto il suo approccio energetico risultava essere quello che meglio supportava le attività produttive previste dallo sviluppo sostenibile [Baldo et al., 2005].

In realtà il termine LCA fu coniato durante il congresso SETAC (*Society of Environmental Toxicology and Chemistry*), nel 1990 a Vermont durante il quale si propose una prima definizione: *"Un processo oggettivo che descrive gli impatti negativi associati a una determinata attività, prodotto o servizio valutando i carichi energetici e i materiali impiegati e i rifiuti rilasciati nell'ambiente. La valutazione include l'intero ciclo di vita del prodotto, attività o servizio a partire dall'estrazione delle materie prime fino allo smaltimento"* [Baldo et al., 2005].

La definizione proposta dalla SETAC è oggi formalizzata dalla UNI EN ISO 14040:2006 che descrive l' LCA come *"un procedimento oggettivo di valutazione di carichi energetici e ambientali relativi a un processo o un'attività, effettuato attraverso l'identificazione dell'energia e dei materiali usati e*

dei rifiuti rilasciati nell'ambiente. La valutazione include l'intero ciclo di vita del processo o attività, comprendendo l'estrazione e il trattamento delle materie prime, la fabbricazione, il trasporto, la distribuzione, l'uso, il riuso, il riciclo e lo smaltimento finale" (Fig 1.1).



Fig 1.1: Le fasi del ciclo di vita [1]

L' LCA è una metodologia standardizzata dalle norme ISO 14040:2006 "Environmental Management-Lyfe Cycle Assessment-Principles and Framework" e 14044:2006 "Environmental Management-Lyfe Cycle Assessment-Requirements and Guidelines" che descrivono i principi, i criteri generali, le linee guida e i requisiti necessari con i quali condurre lo studio.

Inoltre, la norma ISO 14047:2003 " Environmental Management-Lyfe Cycle Assessment-Example of application of ISO 14042" e ISO 14048:2003 "Environmental Management-Lyfe Cycle Assessment-Data documentation format" riportano, rispettivamente, casi di studio descritti dalla valutazione LCA e il formato di documentazione con cui gli stessi devono essere presentati, garantendone la trasparenza.

La valutazione LCA permette di applicare nel migliore dei modi l'approccio LCT "Life Cycle Thinking". Questo approccio vuole inserire le attività industriali nell'ottica dello sviluppo sostenibile, mirando fondamentalmente alla conservazione delle risorse naturali e alla minimizzazione degli effetti delle attività antropiche sull'ambiente.

L'obiettivo dell'approccio LCT è quello di allargare i confini di indagine garantendo una visione globale del prodotto durante tutto il suo ciclo di vita; in questo modo tutti gli impatti saranno oggetto di giudizio e sarà possibile identificare quali fasi risultano essere quelle più impattate [Fullana P., Betz M., Hischier R., Puig R., 2009].

L' LCA è uno strumento applicativo volto all'eco-innovazione e all' eco-competitività in quanto in grado di dare una valutazione sostenibile all'attività, servizio, prodotto preso in considerazione integrando il pilastro ambientale con quello economico e sociale.

Tale metodologia è applicata sia a numerosi progetti sostenibili come l' "eco design", il quale propone sul mercato prodotti caratterizzati da un ciclo di vita il più ecosostenibile possibile [Fullana P., Betz M., Hischer R. et Puig R., 2009], sia a strumenti amministrativi come il Green Public Procurement (GPP), previsto dalla strategia politica IPP (Politica Integrata dei Prodotti).¹

Life Cycle Assessment trova applicazione anche nel settore delle certificazioni dei processi produttivi di un'azienda (es: etichette EMAS) o dei suoi prodotti (es: etichette ecologiche ECOLABEL)² ["REGOLAMENTO (CE) N. 66/2010 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 25 novembre 2009" relativo al marchio di qualità ecologica dell'Unione europea (Ecolabel UE)].

1.2 Fasi dell' LCA

Come già detto, la valutazione LCA è oggettiva perché segue le linee guida dettate dalle UNI EN ISO 14040-44:2006 in grado di definire le fasi attraverso le quali è possibile condurre uno studio consono ed appropriato sull'attività, prodotto o servizio preso in esame [Baldo et al., 2005].

1. "Goal and scope definition": Definizione dell'obiettivo e del campo di applicazione
2. "Lyfe Cycle Inventory LCI ": Analisi d'inventario
3. "Lyfe Cycle Impact Assesment LCIA": Analisi degli impatti
4. Interpretazione dei risultati

1. "Goal and scope definition": Definire l'obiettivo e il campo di applicazione rappresenta lo step di partenza per lo studio LCA e vengono citati dalla ISO 14040:2006 come segue: *"Gli obiettivi e gli scopi dello studio di una LCA devono essere definiti con chiarezza ed essere coerenti con l'applicazione prevista. L'obiettivo di una LCA deve stabilire senza ambiguità quali siano l'applicazione prevista, le motivazioni che inducono a realizzare lo studio e il tipo di pubblico a cui è destinato, cioè a quali persone si intendono comunicare i risultati dello studio"*. Molteplici possono

¹ Il GPP è uno strumento amministrativo che impone agli enti e agli uffici pubblici l'acquisto di una certa percentuale di "prodotti verdi", ossia prodotti e servizi poco impattanti sulla salute umana e sull'ambiente (es: acquisto di carta riciclata per le fotocopiatrici) [U.S. EPA 1995; DM 11 aprile 08 "Approvazione del Piano d'azione per la sostenibilità ambientale dei consumi nel settore della pubblica amministrazione"].

² EMAS e ECOLABEL sono marchi ecologici volontari ai quali una ditta può aspirare se intenzionata a ridurre i propri impatti sull'ambiente e, successivamente, ottenere ecoincentivi e agevolazioni a livello giuridico-amministrativo.

essere i soggetti che intendano svolgere una valutazione LCA (industrie o imprese commerciali, governi nazionali o locali, associazioni non governative “NGO”, consumatori) così come gli scopi che tale metodica vuole raggiungere:

- supporto nei sistemi di gestione ambientale (identificare la fase più impattata dell'intero ciclo di vita del prodotto, servizio, attività e proporre delle mitigazioni o trovare delle alternative per migliorare il prodotto, servizio, attività; confrontare scenari alternativi di uno stesso prodotto, servizio, attività ed individuare quello più sostenibile o talvolta proporre di nuovi);
- green marketing (ottenere etichette ecologiche o certificazioni ambientali, ecoincentivi o autorizzazioni all'esercizio);
- eco design (progettazione ecocompatibile).

Individuare il campo di applicazione significa principalmente individuare quella che è definita come “unità funzionale”. L'unità funzionale è un'unità di misura di riferimento alla quale tutti i dati dovranno essere normalizzati; il suo scopo è fornire un riferimento a cui associare i flussi in entrata e in uscita, necessario per la comparabilità dei risultati di una LCA [Fullana P., Betz M., Hischer R. et Puig R., 2009].

L'unità funzionale rappresenta la modalità di trattamento ed esposizione dei dati, deve essere lasciata scegliere dal valutatore, ma allo stesso modo deve essere misurabile e legata allo scopo dell'analisi [UNI EN ISO 14040:2006].

Altro aspetto molto importante da definire in questa prima fase sono i “confini di sistema”, intesi come limiti di operatività e definiti grazie alla meticolosa descrizione del sistema attraverso la costruzione del diagramma di flusso del ciclo produttivo; ogni fase del ciclo di vita viene descritta da flussi in entrata e in uscita di materia prima, energia e rifiuti con livello di dettaglio dettato dagli obiettivi fissati (Fig 1.2). La valutazione LCA non sempre considera tutte le fasi del ciclo di vita: è possibile ometterne alcune, sempre e comunque rispettando lo scopo da raggiungere [UNI EN ISO 14040:2006]. Esistono quindi tre tipologie di confini di sistema:

- LCA “from cradle to grave”(dalla culla alla tomba) considera tutte le fasi del ciclo di vita ed identifica come unità funzionale la resa del prodotto, servizio, attività (es: resa di parete dipinte (m²) nel confronto tra due vernici). Tale approccio è utile per confrontare prodotti, servizi, attività aventi la stessa funzione o per migliorarne il ciclo di vita.
- LCA “from cradle to gate”(dalla culla al cancello) considera solo le prime fasi del ciclo, estrazione delle materie prime e produzione, e l'unità funzionale è identificata dall'unità o

dalla massa del prodotto. Tale restrizione dei confini è utile per confrontare processi produttivi che forniscono lo stesso servizio, attività, prodotto ma utilizzano materie prime differenti.

- LCA “gate to gate” (da cancello a cancello) tiene conto solo del processo produttivo e considera come unità funzionale l’unità o la massa del prodotto. In questo caso si mira a confrontare processi produttivi che oltre a produrre lo stesso servizio, attività, prodotto utilizzano anche le stesse materie prime [Fullana P., Betz M., Hischer R., Puig R., 2009].



Fig 1.2 Flussi in entrata e in uscita da un sistema

2. “Lyfe Cycle Inventory LCI”: Con l’analisi di inventario vengono quantificati i flussi materiali ed energetici associati ad ogni fase del ciclo di vita; è necessaria una raccolta dati opportuna in quanto l’ISO 14040:2006 richiede per essi requisiti temporali, geografici e tecnologici oltre a completezza, rappresentatività, coerenza e riproducibilità.

I dati, in base alle caratteristiche suddette, si distinguono in dati primari, secondari e terziari; i dati primari sono dati raccolti “in campo” perché registrati negli elenchi delle aziende e delle ditte che tengono la contabilità delle loro risorse, i dati secondari provengono da specifiche banche dati e sono disponibili ai software LCA ed infine i dati terziari, sono quelli associati a maggior incertezza perché ottenuti da fonti di letteratura.

Una volta raccolti, i dati vengono elaborati attraverso algoritmi di calcolo che simulano i processi industriali in esame e successivamente vengono affiancati all’unità di processo con un appropriato flusso di riferimento (es: 1 kg di materiale o 1 MJ di energia). Dopodiché vengono correlati all’unità funzionale per definire il contributo di un processo rispetto all’unità funzionale di prodotto (es. 175 kWh/1000 kg). Quel che si ottiene per ogni fase è la quantificazione dei flussi in input, sotto forma di consumi energetici e materiali, e in output, intesi come kg di emissioni gassose, solide e liquide e la quantità di prodotti ultimati. Dato che tali flussi si riferiscono al sistema in esame e non sono quindi suddivisibili tra i diversi prodotti generati, a meno che non si amplino i confini, è

necessario intervenire con un processo di allocazione per ripartire correttamente i materiali e l'energia.

Nel caso i prodotti abbiano la stessa funzione, si procede con un'allocazione in peso, ossia i flussi di input e output saranno tanto maggiori quanto maggiore è il peso del prodotto in uscita; in caso contrario si ricorre ad un'allocazione economica in base alla quale saranno i prodotti più costosi ad essere associati a flussi di maggior entità.

3."Lyfe Cycle Impact Assessment (LCIA)": L'analisi degli impatti ha come scopo quello di convertire la tabella d'inventario in impatti ambientali, espressi in unità di riferimento.

All'interno della fase di LCIA è possibile distinguere quattro sottofasi, di cui due obbligatorie e due volontarie quali:

- Identificazione e classificazione delle categorie d'impatto
- Caratterizzazione
- Normalizzazione
- Ponderazione

Identificazione e classificazione delle categorie d'impatto: Durante il primo step l' LCIA individua diverse categorie di impatto, aventi le seguenti caratteristiche:

1. completezza: categorie di impatto a lungo e breve termine
2. indipendenza: categorie di impatto non intersecanti
3. praticità: lista di categorie d'impatto non eccessivamente lunga e complessa

La ISO 14044:2006 propone le seguenti categorie d'impatto:

- *Riscaldamento globale GWP*, determinato dall'emissione dei gas serra in atmosfera;
- *Acidificazione AP*, determinata dall'emissione di SO_x e NO_x, rilasciati da combustibili fossili, i principali responsabili dell'abbassamento del pH nelle matrici ambientali;
- *Esaurimento delle risorse abiotiche ADP*, determinato dall'eccessivo sfruttamento dei depositi non rinnovabili, ovvero risorse non riciclabili o talvolta solo parzialmente;
- *Assottigliamento dell'ozono stratosferico ODP*, determinato dal rilascio di agenti inquinanti alogenati, come i CFC, inducendo maggiore esposizione ai raggi UV;
- *Produzione di ozono troposferico da smog fotochimico POCP*, determinato dai fumi di combustione del petrolio che, reagendo con i raggi solari, originano ozono in troposfera;

- *Eutrofizzazione EP*, determinata dal rilascio di fertilizzanti azotati e fosforati attraverso gli scarichi urbani e industriali;
- *Tossicità umana ed ecologica*, determinata dal rilascio di sostanze tossiche in ambiente;

Esistono diversi modelli ambientali in grado di elaborare i meccanismi causa-effetto di una sostanza emessa in ambiente e quindi capaci di identificare gli impatti in diversi punti della catena DPSIR (Fig 1.3).

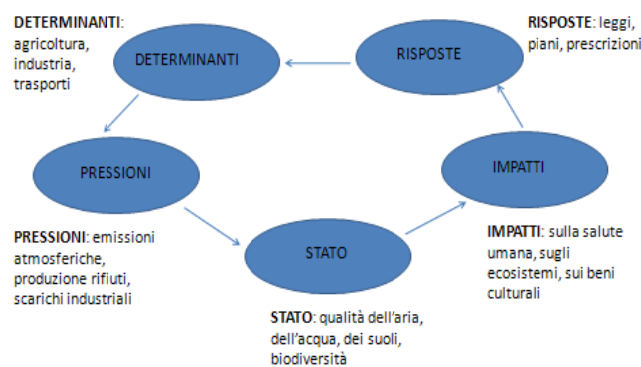


Fig 1.3 Catena DPSIR, Annuario dei dati ambientali, Estratto edizione 2005-2006, APAT p.XVI

Gli effetti ambientali generati da un evento e connessi ad un fenomeno ambientale specifico (acidificazione del suolo, ecotossicità marina-terrestre), sono definiti impatti midpoint; i danni ultimi generati da un determinato fenomeno ambientale su una categoria d'indagine più ampia ed additiva (es: danni alla qualità degli ecosistemi) sono definiti impatti endpoint.

Di seguito un elenco dei metodologie utilizzati nella fase di LCIA:

- CML 92 e 2001 (NL): valutazione degli impatti a midpoint
- EDIP 97 e 2003 (DK): valutazione degli impatti a midpoint e vicino all'endpoint
- TRACI (US): valutazioni degli impatti midpoint
- IMPACT 2001+: valutazione degli impatti a midpoint e endpoint
- RECIPE (NL): valutazione degli impatti a midpoint e endpoint
- LIME (Japan): valutazione degli impatti a endpoint

Durante la classificazione i dati di inventario vengono assegnati a specifiche categorie d'impatto in quanto possono incidere su effetti di diverso tipo (es: kg di SOx emessi in ambiente incidono sulle categorie d'impatto AP e GWP).

Caratterizzazione: Ogni categoria d’impatto è identificata da un indicatore di categoria in modo tale da convertire i dati d’inventario che influiscono sulla specifica categoria in unità comuni di riferimento (es: i dati d’inventario che incidono sulla categoria GWP saranno convertiti in kg equivalenti di CO₂).

In questa maniera è possibile quantificare il contributo ambientale di ogni sostanza ad una specifica categoria d’impatto. Il contributo ambientale è espresso in termini di Impact Score (IS) così definito:

$$IS = \sum m_{ij} \times CF_i \quad (\text{eq.1})$$

Dove:

m_{ij} = massa della sostanza i (es: kg di SO₂) impattante sulla specifica categoria j (es: GWP)

CF_i = fattore di caratterizzazione della sostanza i (es: kg CO₂ equivalenti)

Il Fattore di Caratterizzazione è una rappresentazione quantitativa della pericolosità della sostanza; viene stimato attraverso opportuni modelli di caratterizzazione che permettono di convertire i dati d’inventario in unità comuni di indicatore di riferimento. La determinazione dei Fattori di Caratterizzazione è propria per ogni categoria di impatto (Tab 1.1); per le categorie non tossiche esiste un accordo internazionale tra gli enti scientifici e fornisce gli indicatori e i rispettivi fattori di caratterizzazione [Larsen et al., 2004]. Indipendentemente dalla scelta della metodologia (EDIP 97, CML 201, IMPACT 2001) l’IS ottenuto per ogni categoria d’effetto non tossica sarà approssimativamente lo stesso, ciò non si può dire invece per le categorie tossiche (Fig 1.4) [Hauschild, 2005], come verrà descritto nei successivi paragrafi.

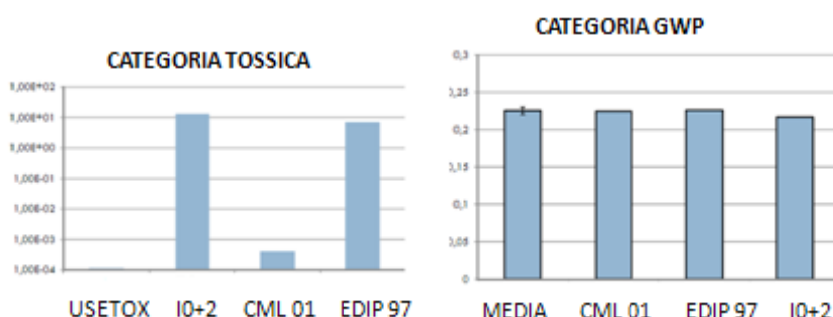


Fig 1.4: Confronto tra categorie tossiche e non tossiche [Salieri, 2013]

CATEGORIA D'IMPATTO	INDICATORE DI CATEGORIA	FATTORE DI CARATTERIZZAZIONE
Riscaldamento globale GWP $GWP = \sum GWP_i \times m_i$	kg CO ₂ equivalenti	$GWP_i = \frac{\int_0^T a_i \times c_i(t) dt}{\int_0^T a_{CO_2} \times c_{CO_2}(t) dt}$ a_i = forzante radioattivo dell'inquinante i c_i = concentrazione dell'inquinante i al tempo t
Acidificazione AP $AP = \sum AP_i \times m_i$	kg SO ₂ equivalenti	$AP_i = \frac{\eta_i}{\eta_{SO_2}}$ η_i = numero di moli dell'inquinante i
Esaurimento risorse abiotiche ADP $ADP = \sum ADP_i \times m_i$	kg Sb equivalenti	$ADP_i = \frac{G_i}{R_i^2} \times \frac{R_{Sb}^2}{G_{Sb}}$ G_i = consumo corrente del minerale i R_i = riserva del minerale i
Assottigliamento ozono troposferico ODP $ODP = \sum ODP_i \times m_i$	kg CFC ₁₁ equivalenti	$ODP_i = \frac{\delta[O_3]_i}{\delta[O_3]_{CFC_{11}}}$ δ_i = ozono consumato per unità di massa i emessa annualmente
Produzione ozono stratosferico POCP $POCP = \sum POCP_i \times m_i$	kg etene equivalenti	$POCP_i = \frac{[O_3]_i}{[O_3]_{etene}}$ O_{3i} = ozono prodotto dalla reazione che coinvolge la sostanza i
Eutrofizzazione EP $EP = \sum EP_i \times m_i$	kg PO ₄ ³⁻ equivalenti	$EP_i = \frac{\frac{\partial i}{\partial M_i}}{\frac{\partial PO_4^{3-}}{\partial M_{PO_4^{3-}}}}$ v = capacità di produrre 1 mole di biomassa M = massa

Tab 1.1 I fattori di caratterizzazione per ogni categoria di impatto non tossica

Grazie alla "Life Cycle Impact Assessment" è possibile valutare i risultati, espressi in kg equivalenti, e visualizzarli nei rispettivi istogrammi (Fig 1.5) in modo tale da rendere il confronto più immediato ed individuare la fase più impattante o lo scenario più sostenibile.

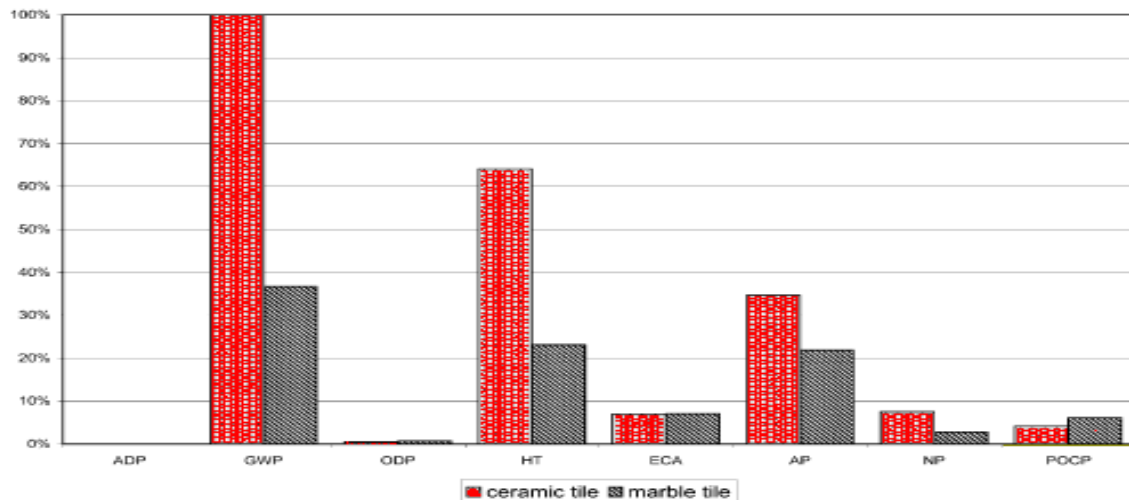


Fig 1.5: Confronto tra diverse tipologie d’impatto generate da piastrelle di marmo e di ceramica [Nicoletti G.M, Notarnicola B., Tassielli G., 2002]

Le due ultime fasi sono la normalizzazione e la ponderazione: non sono obbligatorie come le precedenti perché soggettive e senza un vero e proprio accordo internazionale.

Normalizzazione: la normalizzazione serve a contestualizzare gli impatti, a rendere le categorie adimensionali in modo da poterle confrontare tra loro senza considerare il fattore di scala. I punteggi ottenuti dalla fasi di caratterizzazione vengono divisi per un valore di riferimento solitamente rappresentato da dati medi su scala mondiale, regionale o europea, a seconda del metodo di *Impact Assessment* scelto [ISO 14040:2006]. Con la normalizzazione è possibile quindi stabilire l’entità dell’impatto ambientale del sistema studiato rispetto a quello prodotto nell’area geografica prescelta come riferimento.

$$N_i = \frac{S_i}{A_i} \quad (\text{eq.2})$$

Ad esempio, il metodo degli Ecoindicatori propone per il contributo all’effetto serra, in termini di CO₂, le seguenti variabili:

S_i: quantità di CO₂ emessa per unità di prodotto;

A_i: quantità di CO₂ emessa annualmente nel paese di produzione (divisa per il numero di abitanti).

Ponderazione: la ponderazione ha come obiettivo quello di esprimere, attraverso un indice ambientale finale, l’impatto associato al prodotto nell’arco del suo ciclo di vita. Ad ogni categoria viene attribuito un fattore di peso, spesso riportato in guide tecniche, che tiene conto dell’importanza della categoria; è evidente che si tratti di un giudizio soggettivo in quanto tale peso varia da un area geografica all’altra, con la sensibilità e a seconda delle scuole di pensiero.

La sommatoria dei pesi ponderati determina l'indice ambientale finale [Fullana P., Betz M., Hischer R., Puig R., 2009].

4. Interpretazione dei risultati: La valutazione LCA si conclude con l'interpretazione dei risultati, una fase durante la quale vengono correlati i risultati dell'analisi di inventario e quelli della valutazione d'impatto con l'obiettivo di massimizzare l'eco-efficienza [Baldo et al., 2005]. Attraverso questa fase risulta possibile:

- l'identificazione degli aspetti principali evidenziati dai risultati delle fasi precedenti, esposti in maniera chiara, comprensibile, completa e consistente così da agevolare l'interpretazione ed individuare eventuali elementi di miglioramento;
- il controllo ulteriore tramite analisi di sensitività;
- l'identificazione degli eventuali limiti che porterebbero alla scelta di revisionare il progetto nell'ottica del miglioramento e dell'eco-design, quindi stesura delle raccomandazioni e indicazioni;
- le conclusioni associate al raggiungimento o meno dello scopo prefissato.

1.3 Categorie tossiche nell'LCA

Le categorie tossiche riguardano effetti sulla tossicità umana ed ecologica, acquatica e terrestre. Come per le categorie non tossiche esistono diverse metodologie per studiare gli impatti tossicologici (EDIP 97, CML 201, IMPACT 2001, USEtox). Come è già stato descritto, per le categorie ad effetto tossico vi è un minor consenso sui metodi di caratterizzazione applicati. Inoltre vengono evidenziate differenze significative in termini di IS a seconda della metodologia applicata; la ragione è attribuibile alle differenze esistenti tra le metodologie, ad esempio dai dati geografici applicati (dimensione o numero dei comparti ambientali considerati dallo studio), dalle assunzioni che stimano il destino dell'inquinante in una certa matrice ambientale e dalla diversa modalità di esprimere l'effetto tossico (PNEC, EC₅₀, IC₂₅).

Per predire gli impatti tossici esercitati dalle sostanze chimiche rilasciate in ambiente vengono applicati dei modelli matematici multimediali volti a descrivere e quantificare informazioni relative al destino, all'esposizione e agli effetti della sostanza in esame [Rosenbaum et al., 2007].

Il Fattore di Caratterizzazione CF è calcolato attraverso algoritmi matematici che simulano le relazioni causa-effetto e quantificano l'impatto ambientale. Per calcolare il CF è necessario identificare tre parametri fondamentali inseriti nella seguente formula [Jolliet et al., 2004]:

$$CF = FF \times XF \times EF \quad (\text{eq.3})$$

Dove:

- Il Fattore di Destino FF (day), valuta il destino ambientale di una sostanza emessa nell'ambiente, ed esprime la permanenza della sostanza inquinante in un comparto ambientale [Huijbregts et al., 2001];
- Il Fattore di Esposizione XF, valuta l'esposizione ad una sostanza inquinante attraverso le vie d'esposizione come l'inalazione, l'ingestione e il contatto dermico;
- Il Fattore di Effetto EF ($\text{m}^3/\text{kg PAF}$), valuta gli effetti tossicologici che la sostanza provoca una volta entrata in contatto con l'organismo.

1.4 Il modello USEtox

Il modello ambientale USEtox é stato sviluppato nel 2005 grazie alla collaborazione di un team di ricercatori provenienti da tutto il mondo a seguito della Task Force on Toxic Impacts "UNEP-SETAC Life Cycle Initiative". Come già detto, per quanto riguarda le categorie di impatto tossiche, il valore assunto dal Fattore di Caratterizzazione dipende dal modello ambientale scelto [Jolliet et al., 2006]. Individuando le differenze di calcolo proposte dai modelli, l'obiettivo della Task Force on Toxic Impacts era quello di riuscire ad armonizzare i modelli già esistenti (IMPACT 2002+, EDIP, EcoSense, CalTOX, USES-LCA) in un unico modello ambientale scientificamente rilevante e soprattutto approvato e condiviso a livello internazionale; tale modello deve inoltre essere parsimonioso, ossia semplice per quanto possibile ma complesso per quanto necessario, e trasparente.

Il modello USEtox finora ha individuato il Fattore di Caratterizzazione per 1100 sostanze, per quanto riguarda la tossicità umana, distinguendo la valutazione tra sostanze cancerogene e non cancerogene, e 2519 per quanto riguarda gli impatti eco tossicologici, con particolare attenzione alla matrice "acque dolci". Come precedentemente discusso, dal momento in cui una sostanza potenzialmente tossica viene emessa in ambiente, il suo percorso viene descritto da meccanismi causa-effetto all'interno dei quali la valutazione LCIA mira ad individuare la modalità di trasporto, di esposizione e infine gli effetti tossicologici. In questo trattato di tesi verrà descritta solo la parte inerente agli impatti eco tossicologici in ambiente d'acqua dolce.

1.4.1 Fattore di Caratterizzazione per il modello USEtox

Come descritto in precedenza il Fattore di Caratterizzazione viene quantificato dal prodotto di tre fattori, quello di Destino, di Esposizione e di Effetto. Il modello USEtox esprime ognuno di questi fattori in matrice (eq.4):

$$CF = \overline{FF} \times \overline{XF} \times \overline{EF} \quad (\text{eq.4})$$

Fattore di Destino (Fate Factor) (day): Il Fattore di Destino esprime il tempo di permanenza di una sostanza nel comparto ambientale di interesse [Rosenbaum et al., 2007]; è calcolato grazie ad opportuni modelli matematici di tipo “Fate and Transport” (Fig 1.6) volti a descrivere il comportamento ambientale ed il destino di una sostanza nell’ambiente. Si tratta di modelli multimediali così definiti perché considerano il destino ambientale del contaminante in diversi comparti ambientali e il suo trasporto a più livelli geografici e tra le diverse matrici. In particolare il modello USEtox adotta tre scale geografiche (globale, continentale, urbana) e sei matrici (aria urbana, rurale, suolo agricolo, naturale, acqua dolce, mare). Lo studio del destino di un contaminante nell’ambiente tiene poi considerazione dei processi di advezione, di trasformazione, come la degradazione e l’agglomerazione e di trasporto, come la sedimentazione e la risospensione. Tali processi vengono definiti sulla base delle proprietà chimico-fisiche delle matrici ambientali (es: contenuto di materia organica, altezza e volume dei comparti ambientali, velocità del vento etc..) e della sostanza oggetto di analisi (es: costante di degradabilità, di volatilità, di solubilità, di ripartizione ottanolo-acqua, etc..) [Huijbregts et al., 2001].

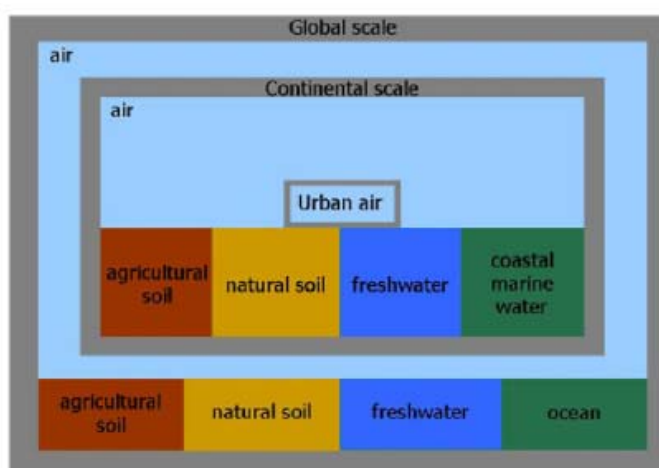


Fig 1.6 Modelli multimediali “Fate and Transport” [Huijbregts et al., 2010]

Fattore di Esposizione (Exposure Factor): Per l'ecotossicità acquatica l'esposizione è valutata come la frazione disciolta della sostanza chimica in acqua ed espressa come segue:

$$XF = FR_{w,w} = \frac{1}{1+(Kp*SUSP+Kdoc*DOC+BCF_{fish}*BIO_{mass})} \quad (\text{eq.5})$$

Dove: K_p = il coefficiente di ripartizione tra acqua e solidi sospesi (L/kg);

SUSP = la concentrazione di sostanza disciolte in acqua dolce (mg/L);

K_{doc} = il coefficiente di ripartizione tra carbonio organico disciolto e acqua;

DOC = la concentrazione di carbonio organico disciolto in acqua dolce (mg/L);

BCF_{fish} = il fattore di bioconcentrazione nei pesci (L/kg);

BIO_{mass} = la concentrazione di biota in acqua(mg/L).

Fattore di Effetto (Effect Factor) (m^3/kg PAF): In ecosistemi d'acqua dolce il Fattore di Effetto EF è calcolato come il rapporto tra 0,5 (PAF) e HC_{50} (eq.6) [Henderson et al., 2011].

$$EF = \frac{0,5}{HC_{50}} = \frac{0,5 (PAF)}{HC_{50}} \quad (\text{eq.6})$$

Il valore HC_{50} è calcolato come media geometrica dei valori di EC_{50} relativi alle specie rappresentative di tre livelli trofici (alghe, crostacei e pesci). HC_{50} corrisponde alla concentrazione alla quale il 50% delle specie risultano esposte ad una concentrazione superiore alla loro EC_{50} .

Il valore 0,5 è individuato e scelto sulla curva del PAF, "*Potentially Affected Fraction*"; il PAF corrisponde alla frazione di specie rappresentative di un ecosistema d'acqua dolce e potenzialmente danneggiate dall'aumento in concentrazione della sostanza (mg/m^3).

Pertanto, il Fattore di Effetto è determinato calcolando la pendenza lineare lungo la curva PAF in corrispondenza del punto in cui la frazione delle specie PAF è 0,5 (Fig 1.7).

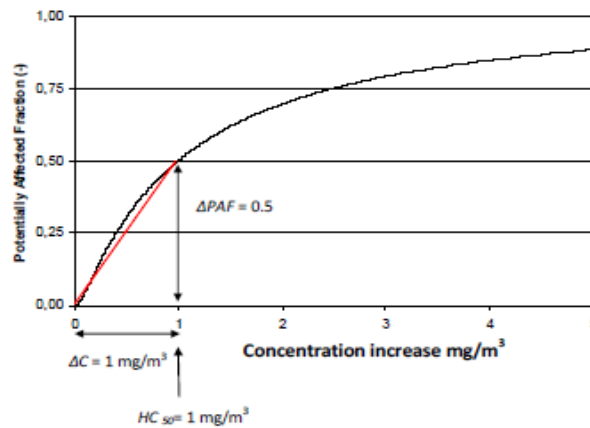


Fig 1.7: Estrapolazione grafica del Fattore d'Effetto [Huijbregts et al., 2010]

Al fine della raccolta dei valori di EC_{50} sui quali calcolare quello di HC_{50} , il modello USEtox suggerisce le specie e i test di riferimento:

1. Produttori primari (alghe):

- tempo di durata del test: 72-120 ore;
- endpoint: inibizione della crescita;
- specie da testare: *Chlorella vulgaris*, *Raphidocelis subcapitata*, *Scenedesmus subspicatus*, *Scenedesmus quadricauda*, *Chlorella vulgaris*, *Anabaena flos-aqua*, *Microcystis aeruginosa*, *Navicula seminulum*, *Navicula pelliculosa*;

2. Consumatori primari (crostacei):

- tempo di durata del test: 24-96 ore;
- endpoint: mortalità o immobilizzazione;
- specie da testare: *Daphnia magna*, *Daphnia pulex*, *Daphnia sp.*, *Ceriodaphnia dubia*, *Neomysis mercedis* e *Brachionus calyciflorus*;

3. Consumatori secondari e terziari (pesci):

- tempo di durata del test: 96-336 ore;
- endpoint: mortalità;
- specie da testare: *Ambassis macleayi*, *Carassius auratus auratus*, *Cyprinus carpio carpio*, *Daniorerio (Brachydanio rerio)*, *Ictalurus punctatus*, *Lepomis cyanellus*, *Lepomis macrochirus*, *Leuciscus idus*, *Melanotaenia splendida inornata*, *Onchorhynchus kisutch*, *Onchorhynchus mykiss (Salmo gairdneri)*, *Oryzias latipes*, *Pimephales promelas*, *Poeciliareticulate* e *Salvelnius fontinalis*.

Per stimare l' HC₅₀ non vi è ancora un consenso univoco; esistono approcci basati sulla media geometrica dei valori di EC₅₀ riferiti a livello di specie, di genere o di livello trofico (Fig 1.8) [Henderson et al., 2011].

Taxa/trophic level	Species	EC50acute (mg/l)	GMspecies	GMgenus	GMTrophic level
Algae (primary producers)	<i>Chlorella vulgaris</i>	10,10	10,10	10,10	3,62
	<i>Selenastrum capricornutum</i>	1,30	1,30	1,30	
Crustacean (primary consumers)	<i>Daphnia galeata mendotae</i>	0,58	0,58	0,31	0,31
	<i>Daphnia magna</i>	0,29	0,17		
	<i>Daphnia magna</i>	0,18			
Fish (secondary consumers)	<i>Daphnia magna</i>	0,09	0,81	0,81	0,47
	<i>Lepomis macrochirus</i>	0,14			
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	0,33			
	<i>Poecilia reticulata</i>	1,09			
	<i>Poecilia reticulata</i>	0,60			
	<i>Oryzias latipes</i>	0,62			
	<i>Pimephales promelas</i>	1,03			
	Geometric mean	0,55	0,68	0,75	0,81
	LoEC50	0,09	0,14	0,14	0,31

Valore HC₅₀ calcolato a livello di specie, come richiesto dallo USEtox

Fig 1.8 Confronto tra diversi metodi di calcolo dell'HC₅₀ [Huijbregts et al., 2010]

Il modello USEtox raccomanda di:

- valutare il valore di HC₅₀ come media geometrica degli EC₅₀ stimati per specie;
- stimare almeno tre valori di EC₅₀ relativi a specie appartenenti a tre diversi livelli trofici.

Sono preferiti EC₅₀ cronici rilevati su endpoint quali mortalità, riproduzione e crescita.

Per ottenere i valori di EC₅₀ possono essere utilizzati dati eco tossicologici registrati nelle principali banche dati (RIVM e-toxBase, ECOTOX, IUCLID, IRIS).

Il modello USEtox definisce il Fattore di Caratterizzazione in termini di CTU "Comparative toxic units" (PAF m³/kg day) che rappresenta la frazione di specie potenzialmente affette, integrate nel tempo e nel volume per unità di massa di inquinante emesso.

CAPITOLO 2. Nanotecnologia

2.1 Cosa si intende per nanotecnologia

La nanotecnologia è una scienza che utilizza materiali e strutture con dimensioni comprese tra 1-100 nm [Reeves et al., 2008, Masciangioli et Zhang, 2003; Roco, 2003]. Le aree scientifiche con interesse nano tecnologico si dicono nano scienze e sono la fisica, la chimica e la biologia; per sviluppare una ricerca consona e mirante allo sviluppo di nuovi nanomateriali è necessario coniugare le conoscenze di tali discipline scientifiche grazie ad un approccio cognitivo completo e interdisciplinare, tipico della nanotecnologia [Pacchioni, 2008].

Secondo il professor Balzani dell'Università di Bologna tutta la chimica potrebbe essere vista in ottica nanometrica dal momento che si manipola la materia a livello atomico e molecolare per progettare e realizzare dispositivi di alta complessità e forte valore aggiunto (sensori, catalizzatori, circuiti elettrici).

Il premio Nobel Richard Feynman, unendo le sue conoscenze sull'elettromagnetismo e sulla meccanica quantistica, fu il primo ad intuire la possibilità di operare a livello nanometrico tenendo conto che con il ridursi delle dimensioni il rapporto tra le forze cambia, precisamente diminuisce il contributo della gravità mentre aumenta quello dovuto alle forze di Van der Waals.

Nella sua conferenza del 1959 intitolata *"There's a plenty of room at the bottom"* (C'è un sacco di spazio là sotto) [Pacchioni, 2008], il fisico statunitense sostenne la potenzialità di riprodurre ogni oggetto e ogni macchinario in scala nanometrica ma senza perdita di risoluzione e funzionalità. Lo studente Thomas Newman riuscì a riprodurre la prima pagina di un racconto di Charles Dickens in un'area di soli 6 millesimi di millimetro rendendo concreta la sfida lanciata da Feynman durante la sua conferenza, ossia la capacità umana di riscrivere l'Enciclopedia Britannica sulla capocchia di uno spillo [Nanotecnologie, Il cammino della scienza, 2010].

In realtà il geniale premio Nobel propose solo una visione profetica che aprì la via alla ricerca ma senza mai parlare di nanotecnologia o nanoscienza; il professor Norio Taniguchi dell'Università di Tokio fu il primo a definire nel suo saggio *"On the Basic Concept of Nanotechnology"* del 1974 [Nanotecnologie, Il cammino della Scienza, 2010] la Nanotecnologia come quel processo di separazione, rafforzamento o deformazione di materiale atomico o molecolare. A seguire il ricercatore Eric Drexler diffuse tali intuizioni e scrisse la pietra miliare delle Nanotecnologie, *"Engines of Creation"*, la base scientifica che guidò alla realizzazione di nuovi dispositivi, come il microscopio ad effetto tunnel (STM), e nuovi materiali nanometrici, primi tra tutti i fullereni e, poco dopo, i nano tubi di carbonio [Nanotecnologie, Il cammino della scienza, 2010].

I nanomateriali sono materiali le cui componenti strutturali hanno una dimensione < 100 nm ed è possibile distinguerli in diverse tipologie [Menard et al., 2011; Chen et al., 2006]:

- Nano-materiali di carbonio: nanotubi di carbonio CNTs (SWCNTs e MWCNTs rispettivamente a parte singola o multipla) e nanosfere di carbonio (fullereni) [Lam et al., 2004; Oberdörster, 2004];
- Nano particelle metalliche o nanoparticelle di ossidi di metalli [Bermudez et al., 2004; Chen et al., 2006];
- Nanocristalli semiconduttori o punti quantici QDs (2-10 nm) [Smith et al., 2006];
- Nanopolimeri (1-10 nm) [Klaine et al., 2008];
- Metalli zero valenti [Li et al., 2009].

Fino ad oggi lo sviluppo della nanotecnologia ha proposto materiali funzionali quali:

- Rivestimenti innovativi;
- Catalizzatori più efficienti;
- Materiali con speciali proprietà ottiche ed elettroniche.

Per realizzare nanomateriali si possono seguire due approcci, "top-down" oppure "bottom-up". Il primo prevede la miniaturizzazione dei materiali partendo da dispositivi di dimensioni più grandi e senza il controllo dell'operazione a livello atomico. Il secondo approccio origina il prodotto desiderato partendo dai suoi componenti molecolari e sfruttando i principi della chimica e i processi di sintesi. Le molecole coinvolte sono infatti in grado di riconoscersi ed auto aggregarsi generando una struttura supramolecolare senza l'intervento di una strumentazione esterna [Nanotecnologie, Il cammino della scienza, 2010; Christian et al., 2008].

Questa seconda metodica, ancora allo stadio embrionale, sembra "rivoluzionare" i processi produttivi attuali in quanto contribuisce sia al risparmio di materie prime sia alla riduzione dell'emissione di sostanze inquinanti durante l'intero ciclo di vita dei nuovi prodotti [Presidenza del consiglio dei ministri - CNB, 2006].

2.2 Nanoparticelle

L'origine delle nano particelle può essere sia naturale che antropica; le prime hanno origine da eruzioni vulcaniche, incendi boschivi e attività microbica mentre le seconde si distinguono a loro volta in non intenzionali ed intenzionali. Processi di combustione (automobili, cottura di cibi, etc),

di fotossidazione atmosferica e attività industriali, soprattutto nel campo minerario e dei cementi, ma anche centrali elettriche e inceneritori, sono associati alla produzione non intenzionale di nano particelle, mentre prodotti ingegnerizzati derivanti da specifici processi di sintesi e quindi intenzionalmente prodotti sono denominati Engineered Nanoparticles (ENPs) [Pacchioni et al., 2008].

Le nano particelle costituiscono materiali innovativi di dimensioni inferiori a 100 nm e stanno creando perplessità e preoccupazione riguardo il loro destino e la loro tossicità in ambiente acquatico [Moore et al., 2006; Nowack et Bucheli, 2007; Handy et al., 2008]. Numerose sono le applicazioni di ossidi di metalli nella nanoscala ma di recente attenzione sono le modalità di rilascio delle nanoparticelle durante la loro produzione, uso, trasporto e fine vita [Zhu et al., 2008]. Le ragioni per cui la nanotecnologia sviluppa e utilizza nanoparticelle sono le differenti proprietà chimico-fisiche insite alle nanodimensioni rispetto a quelle della stessa sostanza in forma bulk [ASTM, American Society for Testing and Materials, 2006]. Una di queste proprietà è la reattività chimica e catalitica associata alla maggior superficie esposta delle ENPs rispetto alla forma bulk; tale caratteristica conferisce alle nanoparticelle una buona resistenza, grande interattività e infine le rende degli ottimi conduttori elettrici. Per queste ragioni le ENPs sono sfruttate in diversi ambiti, quello industriale, scientifico, medico e biologico, e in una notevole varietà di prodotti domestici ed elettronici [Royal Society, 2004]. Un ambito applicativo è quello della produzione di energia pulita dove le nanoparticelle vengono utilizzate nelle celle solari aumentandone l'efficienza rispetto ai normali materiali costruiti con la tecnologia planare del silicio. Altra applicazione delle ENPs in campo ambientale è il loro impiego nel trattamento di acque reflue e bonifica dei terreni come le membrane nanostrutturate che consentono una migliore filtrazione e conseguente rimozione dei contaminanti eventualmente presenti nelle matrici ambientali [Zhang, 2003; Aitken et al., 2006].

Le nano particelle destano preoccupazioni da un punto di vista tossicologico; se nella loro rispettiva forma bulk risultano biologicamente inerti sia per l'uomo che per gli animali, in forma nanometrica, possono penetrare le barriere cellulari ed essere assorbite dalle cellule dimostrandosi tossiche per un notevole numero di specie [Reeves et al., 2008].

La modalità più comune per questa tipologia di sostanze di raggiungere l'ambiente è attraverso gli scarichi e gli effluenti generando così un elevato rischio per gli ambienti acquatici [Crane et al., 2008] e, di conseguenza, per l'uomo esposto ad acque e suoli contaminati da nanoparticelle [Handy et Shaw, 2007].

Come è stato descritto precedentemente, lo sviluppo e il mercato delle ENPs si sta notevolmente allargando in quanto le proprietà di questi specifici nano materiali consentono uno sviluppo tecnologico innovativo e sostenibile, nonostante la scarsa conoscenza del destino finale e degli effetti in ambiente [Handy et al., 2008].

2.2.1 Nanoparticelle ingegnerizzate (ENPs)

Come soprascritto, le nanoparticelle ingegneristiche sono nanomateriali intenzionalmente prodotti da specifici processi industriali con l'intento di sfruttarne le principali proprietà progettando prodotti nuovi ed efficienti.

Secondo i dati riportati da *"The Nanotechnology Consumer Products"* nel 2008, i prodotti più sintetizzati sono quelli di carbonio (fullereni e nanotubi) seguiti dai composti di argento e silice, infine ossidi di titanio, zinco e cerio. Nanoparticelle di ossido di ferro e titanio vengono utilizzate in operazioni di bonifica ambientale [Aitken et al., 2006], nel settore cosmetico ENPs di ossido di titanio e zinco hanno trovato applicazione nei dentifrici, nei prodotti di bellezza e nelle creme solari [Serpone et al., 2007] mentre quelle d'argento sono ottimi additivi antimicrobici nei detersivi, negli imballaggi alimentari, nelle calze e nella biancheria intima [Maynard et al., 2006].

Le caratteristiche fondamentali delle ENPs sono le seguenti:

- area superficiale: è la misura dell'estensione della particella. E' un parametro che influenza la reattività della particella in quanto minore è il diametro, maggiore la percentuale di atomi esposti sulla superficie della particella e maggiore l'interazione.
- area superficiale specifica: è il rapporto tra l'area superficiale e la massa della particella;
- fase cristallina: rappresenta la disposizione degli atomi nel reticolo. E' una proprietà che riguarda soprattutto gli ossidi e che sembra influenzare direttamente o indirettamente alcuni parametri chimici o morfologici della nanoparticella come l'area superficiale, la carica elettrica, la tossicità.
- composizione chimica: è la descrizione degli elementi che costituiscono le ENPs; da informazioni sulla purezza ed eventuale concentrazione di contaminanti;
- degradabilità o persistenza: dipende dalla composizione chimica delle nanoparticelle. Quelle organiche sono biodegradabili;
- carica superficiale: è la misura della propensione delle nanoparticelle a interagire con gli ioni. La carica delle ENPs composte da ossidi è influenzata soprattutto dal pH, per le altre tipologie dal reticolo cristallino o dalla sostituzione atomica. La carica superficiale è una

proprietà strettamente correlata all'idrofobicità quindi un importante fattore che determina il comportamento delle nanoparticelle in ambiente;

- punto isoelettrico (PZC): è il valore di pH al quale una molecola non reca alcuna carica elettrica netta quindi influenza la mobilità delle nanoparticelle nella soluzione.

[Pais et al., 2005]

2.2.2 Nanoparticelle di Diossido di Titanio (n-TiO₂)

L'ossido di titanio è un minerale che si presenta in natura in tre diverse strutture cristalline: rutilo, anatasio e brookite [Reyes-Coronado et al., 2008]. In ogni forma ciascun atomo di titanio è circondato da sei atomi di ossigeno assumendo una configurazione ottaedrica nel rutilo, la forma più comune [Menard et al., 2011], tetragonale nell'anastasio e ortorombica nella brookite.

Tra gli ossidi metallici nanometrici, le nanoparticelle di TiO₂ sono prodotte abbondantemente perché assolutamente stabili, fotocatalitiche e con proprietà anticorrosive [Hao et al., 2009].

L'UNEP (United Nations Environment Programme) ha stimato tra il 2011 e il 2014 una produzione di n-TiO₂ pari a 10000 t/m³ per anno [Menard et al., 2011].

Questa tipologia di nanoparticelle è utilizzata in campo domestico, nelle vernici e nell'edilizia [Hao et al., 2009]; di notevole interesse è la capacità delle nano particelle di ossido di titanio di proteggere da un ampio spettro di radiazioni UV [Gurr et al., 2005; Reeves et al., 2008] quindi sono utilizzate come filtri in diversi prodotti cosmetici, come le creme solari, ma anche nelle celle solari [Maier et Korting, 2005].

Data l'attività foto catalitica innescata dai raggi UV, le n-TiO₂ vengono anche sfruttate nei trattamenti idrici [Chen et al., 2004] e di risanamento ambientale [Aitken et al., 2006]. Sono infatti in grado di degradare microbi (batteri e funghi) e biomolecole ossidanti, distruggere inquinanti (PCB, gas tossici, NO, NO₂, anidride solforosa, monossido di carbonio, benzene, ozono, PM₁₀, PM_{2,5}, etanolo e formaldeide) e infine ridurre l'attività catalitica degli ioni metallici contaminanti (Fig 2.1) [Warheit et al., 2007; Li et al., 2007; Wang et al., 2007].

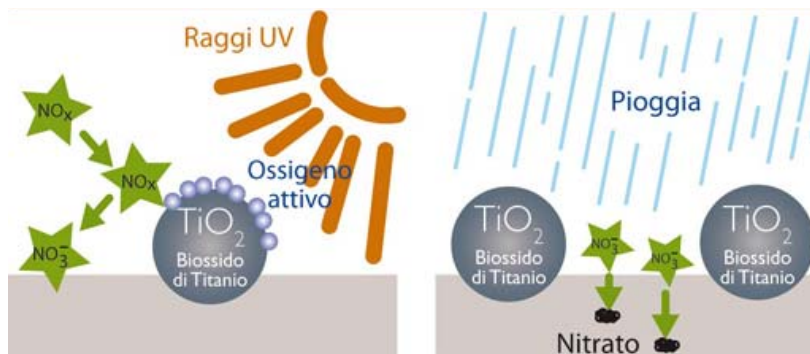


Fig 2.1 Trasformazione degli NOx in nitrati grazie la foto attivazione delle n-TiO₂ [2]

Ulteriori applicazioni sono l'auto-pulizia di rivestimenti superficiali, diodi emettitori di luce, spray disinfettanti e deodoranti ed infine articoli sportivi [EPA, 2009].

La tossicità è ben diversa tra la nanoscala e la microscala, come è stato dimostrato dagli studi sui mammiferi di Bermudez et al., (2002) e Chen et al., (2009), così come la rispettiva forma convenzionale bulk non risulta dannosa per gli organismi [Warheit et al., 1997]. Le dimensioni nanometriche conferiscono alle n-TiO₂ un elevato rapporto area superficiale/volume influenzandone le proprietà fisico-chimiche. La reattività dell'area superficiale e l'abilità nella penetrazione cellulare dovuta alle piccole dimensioni rendono tossiche le ENPs di TiO₂ [Carlson et al., 2008; Ispas et al., 2009; Mironava et al., 2010; Lovern et Klaper, 2006].

Va da sé che queste sostanze stimolino un continuo interesse verso la loro modalità di interazione con il biologico e le risposte tossiche che creano [Wiesner et al., 2006]. La pericolosità delle ENPs sta nella capacità di indurre la produzione di radicali liberi provocando danni ossidativi [Gurr et al., 2005; Reeves et al., 2008], effetti citotossici e instabilità genomica in piante, microorganismi e mammiferi [Hao et al., 2009].

Come descritto nei paragrafi precedenti, in soluzione queste particelle riescono ad aggregarsi; secondo Adams et al., (2006) e Wang et al., (2008), l'aumento delle dimensioni comporta una diminuzione del potenziale tossico rispetto a quello delle nano particelle di ossido di titanio in forma libera.

Secondo altri autori anche la sospensione di aggregati può portare a danni di diverso tipo quali generazione di ROS, soprattutto se fotoattivate [Jiang et al., 2008], distruzione della membrana cellulare [Long et al., 2006] e distruzione di antiossidanti con conseguente danneggiamento di lipidi, carboidrati, proteine e DNA [Kelly et al., 1998; Brown et al., 2004].

2.2.3 Processi di trasformazione e trasporto delle nanoparticelle in ambiente

I processi che descrivono il comportamento di una sostanza in ambiente dipendono dalle costanti associate alle caratteristiche chimico-fisiche fondamentali ed elencate in Tab 2.1 [Huijbregts et al., 2010].

Substance	K_{ow} (-)	K_{oc} (L kg ⁻¹)	K_{aw} (-)	$t_{1/2}$ air (day)	$t_{1/2}$ soil (day)	$t_{1/2}$ water (day)	EF (PAF m ³ kg ⁻¹)
Acephate	1.4E-01	2.0E+00	2.1E-11	0.96	75	38	1.6E+01
TCDD	6.3E+06	3.2E+06	2.1E-03	8.3	360	180	5.6E+06
Toluene	5.4E+02	1.2E+02	2.8E-01	1.8	30	15	1.4E+01
Triethylene glycol	1.8E-02	1.0E+01	1.1E-08	0.29	30	15	2.1E-02
Triflusulfuron methyl	8.7E+03	6.9E+01	1.7E-11	2.8	360	180	4.5E+02

Tab 2.1 Costanti chimico fisiche per alcuni contaminanti ambientali [Huijbregts et al., 2010]

Per inquadrare il comportamento ambientale delle nanoparticelle è necessario conoscere le loro caratteristiche chimico-fisiche (Fig 2.1); quelle più interessanti sembrano essere la dimensione e la composizione in quanto in grado di influenzare la reattività, la solubilità, la conducibilità, la catalisi e la dispersione [Klaine et al., 2008].

La reattività di una nanoparticella dipende anche dalle sue proprietà superficiali. La capacità delle ENPs di interagire è dovuta al numero di atomi presenti sulla superficie, caratteristica denominata "area superficiale"; essa è inversamente proporzionale al raggio, infatti per dimensioni maggiori al micron la percentuale di tali atomi è insignificante rispetto alla quantità totale presente nella massa complessiva e quindi risulta inferiore la capacità della particella di interagire con altre sostanze. E' possibile affermare che l'area superficiale di una nanoparticella è molto grande tanto da prevalere sulla massa del materiale e, di conseguenza, anche il suo rapporto area superficiale/volume è elevato e decisamente maggiore del medesimo rapporto nella forma bulk [Pais et al., 2005].

Il comportamento ambientale delle nanoparticelle (Fig 2.2) è stato associato ai colloidali. Vi sono evidenze scientifiche che il comportamento in acqua delle ENPs segua le leggi fisiche dei colloidali e la teoria DLVO³ ad essi associati [Arvidsson et al., 2011; Klaine et al., 2008]. Pertanto, in sistemi acquosi, le ENPs sono soggette a moto browniano e ortocinetico; la loro permanenza in sospensione fa in modo che le forze di gravità e di sedimentazione possano intervenire e influenzare la deposizione solo a lungo termine [Klaine et al., 2008].

³ La teoria DLVO (Derjaguin et Landau, Verwey et Overbeek) permette di studiare l'interazione tra due particelle colloidali in un liquido e quindi di definire le condizioni di stabilità [Handy et al., 2008].

Inoltre, le ENPs rilasciate nell'ambiente acquatico, possono interagire con la materia organica naturale (NOM), con determinate specie cationiche, se ad elevate concentrazioni, e coi contaminanti [Lead et Wilkinson, 2006].

L'aggregazione tra nanoparticelle in soluzione acquosa è dovuta alle proprietà colloidali insite ai nano materiali; peculiarità delle ENPs artificiali, a differenza di quelle naturali, è essere ricoperte da composti organici o inorganici che le rendono persistenti, stabili in soluzione e incapaci di aggregarsi [Handy et al., 2008]. La dimensione frattale è una proprietà che descrive la forma, la massa e la porosità degli aggregati ed è dipendente sia dalle condizioni al contorno sia dalle caratteristiche delle ENPs [Rizzi et al., 2004]. Secondo gli studi sugli ossidi di ferro condotti da Baalousha et al., (2007), la dimensione frattale aumenta in presenza di acidi umici HA in soluzione, infatti gli aggregati di nanoparticelle di ossidi di ferro risultano più piccoli, più compatti e meno porosi se a contatto con gli HA. Analogamente agli acidi umici, anche la sostanza organica è in grado di legarsi alla superficie dei pori degli aggregati, distruggerli e renderli più reattivi [Henderson et al., 2011].

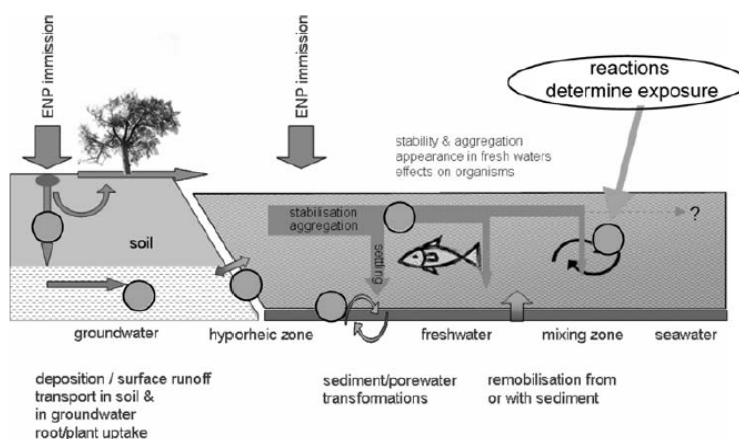


Fig 2.2 Comportamento delle ENPs in ambiente [Christian et al., 2008]

Le indagini condotte da Klaine et al., (2008) evidenziano di nuovo come le dimensioni giochino un ruolo importante anche nella reattività degli aggregati che, se troppo grandi, sono meno interattivi meno catalitici e meno tossici [Velzeboer et al., 2008]. Infine è necessario ricordare la capacità degli aggregati di NPs di interagire con i contaminanti perché in grado di assorbirli, adsorbirli o intrappolarli [Lead et al., 2006]; le nanoparticelle di Diossido di Titanio mostrano particolare affinità con gli inquinanti, soprattutto se composte da un'elevata percentuale di anastasio [Giammar et al., 2007].

2.2.4 Valutazione delle concentrazioni ambientali di ENPs: stato dell'arte

Ad oggi il destino e il comportamento ambientale delle ENPs è ancora poco conosciuto. In letteratura l'esposizione a nanoparticelle, rappresentata dalla loro PEC (Predicted Environmental Concentration - Concentrazione Ambientale Prevista), può essere valutata in due modi. La prima tipologia di valutazione è rappresentata da studi che si basano sull'analisi dei flussi di nanoparticelle emesse dalla tecnosfera, la seconda dallo sviluppo di modelli matematici che considerano i principali processi legati al comportamento delle ENPs nell'ambiente, precedentemente discussi nel paragrafo 2.2.3.

Uno studio appartenente alla prima tipologia è quello di Mueller et Novack, (2008).

In questo studio gli autori valutano l'esposizione ambientale, espressa come concentrazione di ENPs, considerando le seguenti assunzioni:

- i volumi di produzione di n-Ag, n-TiO₂ e CNT riferiti alla Svizzera vengono stimati dai volumi delle ENPs in esame a scala mondiale (per essere poi allocati a diverse categorie di prodotti sulla base di opportuni fattori di peso).
- La tecnosfera è rappresentata dagli impianti di trattamento delle acque reflue, impianti di incenerimento e discarica. Pertanto, gli input del modello, sono rappresentati dal diretto rilascio di ENPs dai prodotti ai comparti e dai flussi tra i comparti.
- Il sistema "ambiente" viene considerato nello stato stazionario, quindi inteso come raggruppamento di comparti ambientali omogenei (aria, acqua, suolo); la stima delle concentrazioni in ogni comparto avviene tramite l'utilizzo di coefficienti di trasferimento delle ENPs da una matrice all'altra. I coefficienti di trasferimento vengono estrapolati da dati di letteratura o da stime di esperti e si basano, ad esempio, sull'efficienza di rimozione degli inquinanti (es. solidi sospesi) dagli impianti di trattamento dei reflui o sull'efficienza dei sistemi di filtrazione degli impianti di incenerimento.

Una rappresentazione grafica del modello concettuale proposto da Mueller et Novack, (2008) è riportata in figura 2.3, dove vengono rappresentati i flussi di trasferimento da un prodotto contenente nano-Ag al sistema ambiente (aria, acqua suolo) e alla tecnosfera.

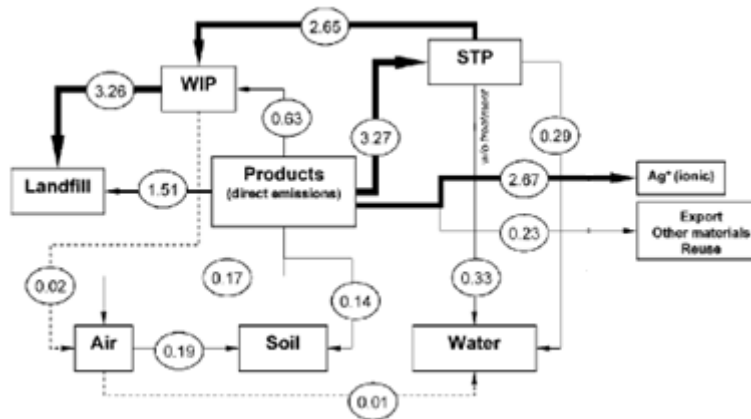


Fig 2.3 Modello a flussi per nanoparticelle di argento [Mueller et Novack, 2008]

Ad oggi vi è una forte incertezza sul comportamento delle ENPs nei comparti ambientali ed è per questo motivo che gli autori riportano come sia stato necessario proporre diverse assunzioni. Oltre a quelle già citate occorre ricordare l'eguale distribuzione delle ENPs nell'ambiente, che potrebbe essere non del tutto realistica. Inoltre i processi chimico-fisici di trasformazione, degradazione e bioaccumulo delle ENPs non sono stati considerati, nonostante giochino un ruolo importante nella valutazione dell'esposizione.

Infine, per ottenere il Quoziente di Rischio (RQ), comunemente calcolato come il rapporto tra il valore PEC e PNEC (Predicted Not Effect Concentration - Concentrazione Ambientale Prevista di Non Effetto):

$$RQ = \frac{PEC}{PNEC} \quad (\text{eq.7})$$

gli autori stimano il valore di PNEC facendo riferimento a dati di letteratura relativi a esperimenti ecotossicologici svolti su colonie batteriche di *E.coli* e *B.subtilis*, in particolare al valore di NOEC (Not Observable Effect Concentration - Concentrazione di non effetto). In realtà, non esistono, in letteratura, dati a sufficienza quindi non sono disponibili i valori di PNEC per ogni tipo di nanoparticella e per ogni comparto ambientale, e di conseguenza neppure il rispettivo Quoziente di Rischio (RQ).

Lo studio proposto da Mueller et Novack, (2008) evidenzia che in ambiente acquatico, le nanoparticelle di TiO_2 risultano essere le più pericolose perché identificate da un valore di RQ prossimo o maggiore di 1, rispettivamente per lo scenario reale RE e per quello ipotetico ad alte emissioni HE (Tab 2.2).

Analogamente a Mueller et Novack, (2008) anche Gottschalk et al., (2009) propone valori di RQ relativi a diversi tipi di nanoparticelle (n-TiO₂, n-ZnO, n-Ag, CNT, fullereni) considerando come comparti ambientali ricettivi l'acqua superficiale e sotterranea, l'aria, il suolo e i sedimenti. Focalizzandosi su specifiche fonti di immissione antropiche (produzione/consumo PMC, liquame derivante dal trattamento degli impianti STP, rifiuti industriali da incenerire WIP, discarica e processi di riciclo) e tenendo conto di opportune assunzioni, gli autori riescono ad inquadrare i flussi in input ed output (ton/anno) che coinvolgono i suddetti comparti e successivamente stimare per ognuno di essi i valori di PEC su tre scale spaziali differenti, tra le quali i territori svizzeri. I dati relativi ai volumi di ENPs sono soggetti a grande variabilità e ad un margine di incertezza molto ampio; ciò nonostante dai risultati di Gottschalk et al., (2009) si evince che i valori più alti riguardano i sedimenti, i suoli e gli effluenti contaminanti soprattutto da n-TiO₂ provenienti dai trattamenti industriali (a conferma dei risultati di Mueller et Novack, (2008)). Di conseguenza, il quoziente di rischio non risulta allarmante per i composti organici (fullereni e CNT), bensì per le particelle inorganiche di titanio, zinco e argento, presenti soprattutto negli effluenti (i valori di RQ sono maggiori di 1 (Tab 2.2).

Non sono poi da sottovalutare i volumi di ENPs di argento nelle acque superficiali e di titanio nei fanghi e nel suolo.

In considerazione della natura dei modelli ambientali adottati nella metodologia LCIA, in questo paragrafo viene posta maggiore attenzione ai modelli ambientali appartenenti al secondo tipo di valutazione. Come già accennato si tratta di modelli matematici di tipo a box volti a definire la PEC tenendo in considerazione i processi ambientali a cui le ENPs sono soggette e le proprietà chimico-fisiche delle matrici analizzate (es. concentrazione dei solidi sospesi).

Di particolare rilevanza è un recente studio proposto da Praetorius et al., (2012) in cui gli autori sottolineano l'importanza di adottare tali modelli per lo studio del destino ambientale di ENPs in ambienti acquatici. In particolare lo studio evidenzia l'applicabilità di tali modelli, normalmente applicati a sostanze organiche, a sostanza inquinanti come le nanoparticelle di Diossido di Titanio. Come riportato da Praetorius et al., (2012), lo studio del destino ambientale di ENPs richiede l'applicazione della teoria delle scienze colloidali al fine di descrivere e quantificare i principali processi ambientali a cui le ENPs sono soggette. Tale applicazione è suggerita anche da altri autori in precedenti studi (Arvidsson et al., (2011); Blaser et al., (2008)).

Nel dettaglio lo studio di Praetorius et al., (2012) condotto sul fiume Reno, considera come comparti ambientali l'aria, il suolo, i sedimenti e l'acqua stagnante o in movimento. Il corso

d'acqua è stato suddiviso in 520 sezioni (box) all'interno dei quali vengono considerati i seguenti processi ambientali (Fig 2.4):

- trasformazione e degradazione;
- omoaggregazione (aggregazione tra ENPs) e eteroaggregazione (interazione con SPM)
- sedimentazione e risospensione
- dissoluzione

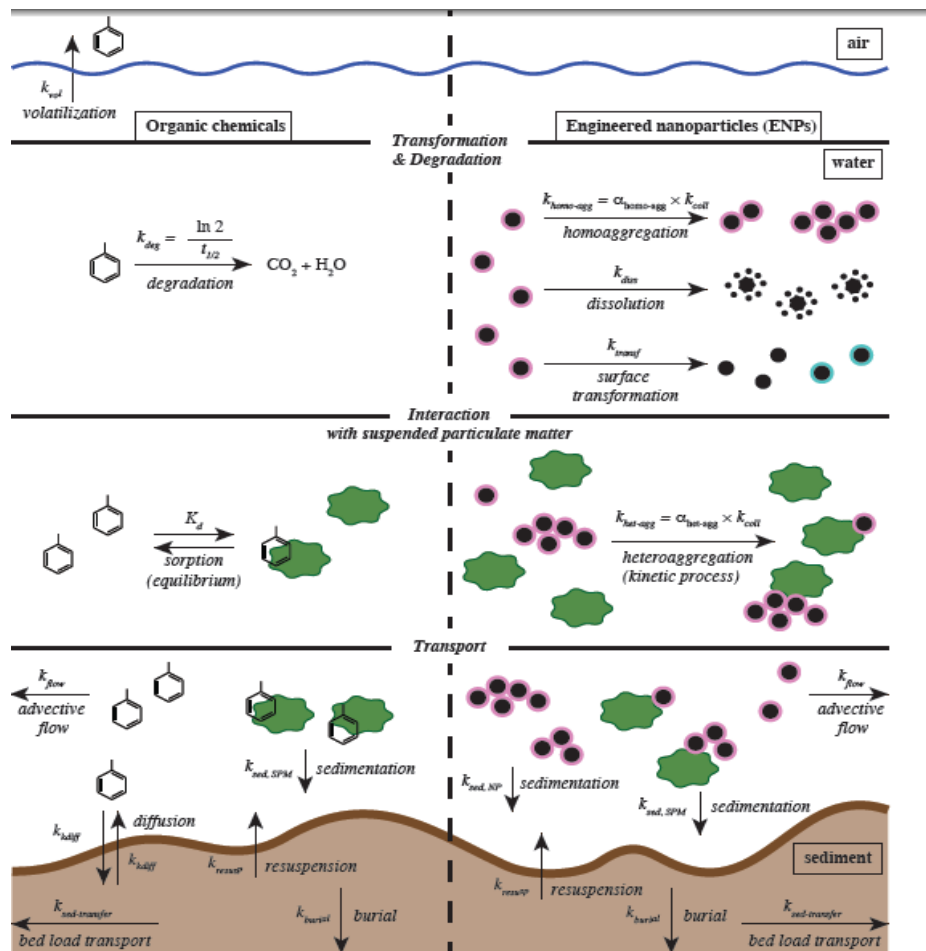


Fig 2.4: Rappresentazione dei processi che coinvolgono le nanoparticelle [Praetorius et al., 2012]

Secondo Praetorius et al., (2012), assumendo che le $n-TiO_2$ generino degli aggregati con diametro di 300 nm ed abbiano forma sferica e superficie non ricoperta, il flusso di massa che viene immesso nella prima sezione del fiume è stato stimato pari a 0,14 ton/anno, ovvero 0,39 kg/giorno. In base a tali assunzioni si evince che le nanoparticelle risultino essere ben diluite nel mezzo e che quindi collidano e di conseguenza aggregano con altro materiale sospeso piuttosto che con altre nanoparticelle; è stata stimata un concentrazione di SPM (diametro da 1,5 a 80 μm)

di due ordini di grandezza maggiore rispetto a quella delle ENPs di Diossido di Titanio, quindi il processo di interazione dominante risulta essere l'eteroaggregazione.

Qualitativamente i risultati indicano che la concentrazione delle n-TiO₂ libere diminuisce mano a mano che ci si allontana dalla sorgente mentre quella delle particelle legate a SPM raggiunge un picco massimo lungo il percorso per poi diminuire drasticamente; nonostante la possibilità di essere trasportate per chilometri e chilometri, il processo prevalente, come già accennato, risulta essere l'eteroaggregazione e la successiva deposizione, a dimostrazione del fatto l'elevata concentrazione di ENPs nei sedimenti, soprattutto vicino la sorgente (valore PEC in acqua = 10⁸/m³ ; valore PEC nei sedimenti = 10¹³/m³) (Tab 2.2).

Fino ad oggi i risultati relativi alla concentrazione di nanoparticelle nell'ambiente risultano essere molto variabili, così come lo sono i valori assunti dai singoli parametri e le modalità di lavoro proposte dai singoli ricercatori; sarebbe opportuna una collaborazione interdisciplinare con lo scopo di progettare un modello flessibile ma adatto alla nanoscala, che integri tutte le proprietà finora discusse e quelle che ancora devono essere accertate (Wiesner et al., 2009).

Di seguito una tabella riassuntiva dei risultati bibliografici di PEC e QR relativi alle ENPs in matrice acquatica:

	PEC	PNEC	RQ
Blaser et al., 2008	40-320 ng/L Ag	10 ⁻⁴ µg/l	
Mueller et al., 2007	0,7-16 µg/l TiO ₂	< 0,001 mg/l TiO ₂	0,7-16 TiO ₂
	0,03-0,08 µg/l Ag	0,04 mg/l Ag	0,0008-0,002 Ag
Gottschalk et al., 2009	21 ng/L TiO ₂		0,02 TiO ₂
	0,7 ng/L Ag		1,03 Ag
	13 ng/L ZnO		0,32 ZnO
Arvidsson et al., 2011	10 ¹² particelle/litro TiO ₂		
Praetorius et al., 2012	10 ⁸ particelle/litro TiO ₂		

Tab 2.2: valori di PEC e RQ di nanoparticelle inorganiche in acqua

CAPITOLO 3. Tossicologia ed ecotossicologia

3.1 Definizione e storia

La valutazione degli effetti di sostanze tossiche è un elemento essenziale per tutelare le risorse e l'integrità dei sistemi naturali. Compito della tossicologia è, una volta conosciuto il livello di esposizione di un determinato sistema biologico, capire la pericolosità del contaminante e quindi il rischio prodotto per i bersagli esposti.

La tossicologia è definita quindi come la scienza che studia le sostanze che danneggiano gravemente o letalmente gli esseri viventi; si tratta di una scienza interdisciplinare in quanto, per individuare il rischio, coinvolge più discipline scientifiche, ognuna con le proprie competenze in materia, tra le quali la fisiologia, la biochimica, la farmacologia, l'istologia e la patologia [Provini, Galassi, Marchetti, 1998].

La tossicologia nacque con Paracelso nel XVI secolo con l'obiettivo di proteggere la salute umana e gli animali domestici o di interesse zootecnico. Col tempo l'approccio si è evoluto, la tossicologia si è affiancata alla farmacologia e mano a mano nacquero diverse sottodiscipline, ognuna col suo ambito di studio, tra cui quella ambientale. Se la tossicologia ambientale ha lo scopo di identificare e quantificare i danni in un sistema biologico, l'ecotossicologia, branca dell'ecologia, studia il destino e gli effetti dei contaminanti in ambiente. Il suo scopo è tutelare i sistemi naturali nella loro complessità senza attribuire particolare importanza alla scomparsa del singolo individuo o della singola specie in quanto potenziale frutto di fenomeni naturali, come le successioni ecologiche (Fig 3.1) [Provini, Galassi, Marchetti, 1998].

	Tossicologia	Ecotossicologia
<u>Strategia</u>	protezione di individui e popolazioni	protezione di popolazioni, comunità e ecosistemi
<u>Obiettivo</u>	mantenimento dello stato di salute	mantenimento delle strutture e delle funzioni del sistema
<u>Saggi di laboratorio</u>	sperimentazione su poche specie standard	sperimentazione su poche specie rappresentative
<u>Finalità</u>	estrapolazione a una singola specie	estrapolazione a ecosistemi e biosfera

Tab 3.1 Confronto tra Tossicologia e Ecotossicologia [Provini, Galassi, Marchetti, 1998]

Una sostanza viene definita tossica qualora vengano misurati i seguenti effetti biologici [Baudo et Perin, 2012]:

- Danni funzionali e/o strutturali, evidenti dall'esterno;
- Alterazioni dell'omeostasi inteso come stato di equilibrio fisiologico tramite, non evidenti ma gravi;
- Incremento di stress biologici dovuto all'allontanamento dai valori fisiologici;
- Insorgenza di patologie particolari (es: cancerogenesi);
- Incremento di suscettibilità ad altre sostanze con effetto:

Addittivo: l'effetto tossico è generato dalla somma dei singoli

Sinergico: l'effetto tossico è maggiore della somma dei singoli

La quantificazione del potenziale tossico nell'ambiente è un'operazione essenziale in un processo che valuta il pericolo relativo all'immissione di una sostanza contaminante in ambiente; una sostanza è tanto più tossica quanto minore è la concentrazione necessaria a generare un qualche tipo di effetto, invece è considerata anche pericolosa se è alta la probabilità con cui l'organismo può venirne a contatto [Vighi et Bacci, 1998]. Lo scopo dei test tossicologici è determinare la risposta biologica espressa come incidenza percentuale di un effetto su un gruppo omogeneo di individui esposto ad una certa concentrazione di una data sostanza. Tale concentrazione, responsabile della dose assunta dall'organismo, è definita livello di esposizione ed, insieme al tempo di esposizione, rappresenta la variabile che più influenza la misura di tossicità [Vighi et Bacci, 1998].

Tre sono le relazioni fondamentali tra le variabili che influenzano la misura di tossicità o risposta biologica:

- L'effetto osservato è causato dalla sostanza a cui l'organismo è esposto;
- La dose assunta è direttamente proporzionale al livello di esposizione (o concentrazione);
- La percentuale di incidenza varia con livello e tempo di esposizione.

3.2 Meccanismi fisiologici di assorbimento, distribuzione ed escrezione

Dal momento in cui un sistema biologico entra in contatto con un contaminante, in base all'affinità che dimostra con esso, può assorbirlo più o meno efficacemente. Il contatto e l'assorbimento producono l'esposizione che può essere continua e di intensità costante o discontinua e di intensità variabile. L'esposizione e la dose assunta dall'organismo, come già accennato, sono

direttamente proporzionali e quindi le relazioni esposizione/risposta sono strettamente paragonabili a quelle dose/risposta.

La misura della risposta biologica, intesa come quantificazione dell'effetto o percentuale di incidenza, avviene solo dopo aver identificato l'effetto dovuto all'esposizione, ossia la tipologia di danno e quindi la funzione biologica compromessa.

I processi che devono essere presi in considerazione per identificare il comportamento di una sostanza dal punto di vista tossicologico sono:

- esposizione;
- assorbimento;
- distribuzione;
- accumulo;
- metabolismo;
- escrezione.

Esposizione: L'esposizione ad un tossico è inteso come il contatto tra la sostanza presa in esame e la superficie esterna (epidermide o parete cellulare) o interna (superficie alveolare o parete intestinale) di un sistema biologico, a sua volta inteso come una singola cellula o un singolo organismo. L'esplicarsi dell'effetto dipende da diversi fattori tra i quali le caratteristiche della sostanza chimica, del sistema biologico e dei fattori ambientali che possono in qualche modo alterare l'attività della sostanza.

Prima che una sostanza manifesti il suo potenziale tossico, è necessario che raggiunga il sito attivo, persista per un tempo ben determinato e sia presente ad una certa dose; per dose si intende la concentrazione che raggiunge l'organo bersaglio e viene quantificata come :

$$dose = \frac{massa\ della\ sostanza\ somministrata}{unità\ di\ massa\ corporea \times tempo} \quad (eq.8)$$

La dose efficace è il quantitativo di composto, relativo alla massa corporea, alla quale si manifesta il danno.

Assorbimento: L'ingresso di una sostanza all'interno di un sistema biologico comporta contatto tra i due, che può avvenire attraverso membrane selettive, tessutali o cellulari. Nonostante la loro funzione-barriera, un composto tossico riesce a bypassare gli strati fosfolipidici attraverso il trasporto passivo, per diffusione semplice o filtrazione, il trasporto attivo, sfruttando gli stessi sistemi previsti per gli amminoacidi, gli zuccheri e gli acidi nucleici, e infine per endocitosi.

Esiste però un limite all'assorbimento: nonostante la tossicità dipenda dalla dose, alte concentrazioni di una determinata sostanza tossica possono provocare reazioni locali che diminuiscono l'efficacia dell'assorbimento e quindi la possibilità che possa raggiungersi la dose efficace.

Distribuzione: Una volta assorbita, la sostanza viene distribuita al sito attivo e agli organi in cui avvengono processi di accumulo, metabolismo, detossificazione ed escrezione. Tutte le vie di distribuzione, sangue e linfa nel dettaglio, contengono acqua ma possono trasportare sia sostanze idrofile sia sostanze lipofile, se legate a lipoproteine.

Accumulo: Le proprietà chimico-fisiche di un contaminante definiscono il suo destino in quanto, in base a queste, esso può accumularsi in differenti comparti, ad esempio nei tessuti adiposi per quanto riguarda le sostanze fortemente idrofobe (DDT, PCB, PCDD). Il processo dell'accumulo può essere considerato un meccanismo di difesa passivo a breve termine in quanto tale "sequestro", seppur reversibile, impedisce al composto tossico di raggiungere il sito attivo come dose efficace.

Metabolismo: Oltre all'accumulo, l'organismo può reagire attivamente ad una sostanza tossica con processi biochimici capaci di modificare la natura chimica della molecola e ridurre le sue proprietà tossiche. Si tratta di un insieme di reazioni di detossificazione più o meno efficienti ma che raramente possono sfociare in meccanismi di bioattivazione, i quali, invece, rendono le molecole più tossiche.

Escrezione: Come ultimo meccanismo di difesa, gli organismi tendono ad eliminare i contaminanti con cui sono venuti a contatto sfruttando la bile epatica secreta dal fegato, ottimo filtratore del sangue, i reni, l'apparato respiratorio o le secrezioni ghiandolari (saliva, sudore, latte).

[Vighi et Bacci, 1998]

3.3 Saggi di tossicità

Per ottenere la concentrazione efficace o concentrazione minima in grado di produrre danni, è necessario mantenere gli organismi target sotto condizioni controllate ed eseguire repliche sperimentali variando la concentrazione della sostanza in esame. La dose è la vera responsabile del danno in quanto rappresenta la quantità di sostanza che entra in contatto con i tessuti biologici [Baudo et Perin, 2012].

Per valutare la tossicità di una sostanza è necessario predisporre in laboratorio le condizioni idonee alla determinazione dell'effetto avverso, in particolare una serie di concentrazioni appartenenti ad una progressione geometrica e uno specifico tempo di esposizione.

In base agli interessi di studio, il grado di tossicità di una sostanza è valutato con test a breve o lunga durata, rispettivamente di tossicità acuta o cronica [Baudo et Perin, 2012].

Saggi di tossicità acuta: la dose corrisponde ad una singola quantità di tale sostanza che può provocare un effetto negativo su una certa percentuale di esposti ed in tempi relativamente brevi; grazie a questi test si può definire il grado di pericolosità della sostanza in esame in quanto la sua tossicità si può manifestare rapidamente dopo l'esposizione. Per tossicità acuta si intende infatti l'insorgenza dell'effetto dopo un'esposizione compresa tra i 15 minuti e le 96 ore [Vighi et Bacci, 1998].

Saggi di tossicità sub cronica: la dose può indurre effetti negativi solo dopo somministrazioni ripetute all'interno di un arco di tempo più o meno duraturo in relazione alla durata di vita della specie in esame; questi test permettono di esplorare la regione della soglia di tossicità [Baudo et Perin, 2012].

Saggi di tossicità cronica: la dose può indurre effetti negativi solo dopo somministrazioni ripetute in un periodo di tempo duraturo (oltre 10 giorni); spesso si tratta di test svolti dopo aver conseguito saggi di tossicità acuta in modo tale da scegliere livelli di esposizione più contenuti così da non compromettere la funzionalità degli organismi, dati i lunghi tempi di esposizione. L'effetto prescelto è solitamente sub letale (velocità di crescita, alterazioni ciclo riproduttivo, modificazioni enzimatiche) in quanto tali danneggiamenti sono reversibili se i meccanismi di riparazione biologica intervengono al di sotto di un determinato livello di esposizione (la soglia).

Questi test permettono anche di valutare l'eventuale tendenza al bioaccumulo della sostanza analizzata [Vighi et Bacci, 1998].

3.3.1 Saggi ecotossicologici acquatici

Il test eco tossicologico vuole garantire una visuale completa sugli effetti che una determinata sostanza può provocare su un determinato ecosistema, quindi devono essere coinvolti gli organismi più rappresentativi dei principali anelli della catena trofica, a seconda del comparto ambientale da analizzare. Inoltre, affinché i risultati sperimentali possano essere considerati accettabili, dovranno essere rispettate rigide norme sperimentali (caratteristiche chimico fisiche, ripetibilità tra i controlli, condizioni di mantenimento degli organismi) dettate dalle normative standardizzate come UNI EN ISO o EPA [Vighi et Bacci, 1998].

Gli studi di tossicità sugli organismi acquatici sono di prima generazione, quindi i più diffusi ancora oggi e quelli più consolidati dal punto di vista procedurale. Una prima stima sui danni biologici può

essere effettuata con saggi acuti (da pochi minuti a 24-96 ore) ottenendo informazioni sugli effetti immediati e successivamente procedere con quelli cronici [Provini, Galassi, Marchetti, 1998].

Nei saggi di tossicità acquatica l'organismo assume il contaminante, che si trova in soluzione nel mezzo di crescita, per respirazione branchiale o attraverso la membrana cellulare; una volta assorbito sarà distribuito, metabolizzato e infine espulso dai complessi meccanismi biologici tipici per ogni specie.

Negli ecosistemi acquatici, per garantire un quadro completo, vengono saggiati i seguenti organismi appartenenti agli anelli fondamentali della catena trofica [Vighi et Bacci, 1998; Baudo et Perin, 2012]:

- Produttori primari = microalghe e macrofite
- Consumatori primari = microcrostacei planctonici
- Consumatori secondari = pesci
- Decompositori = batteri

3.3.1.1 Saggi acuti

Saggi su alghe unicellulari: il metodo si basa sul confronto tra la crescita di una popolazione algale nel loro mezzo di coltura e quella di popolazioni esposte ad un mezzo di coltura arricchito con determinate quantità di tossico in modo da produrre concentrazioni in progressione geometrica. L'effetto del composto tossico è la percentuale di inibizione della crescita ed è valutata dopo 72 o 96 ore in riferimento alla crescita del controllo. Si prediligono condizioni statiche d'esposizione.

Saggi su microcrostacei platonici: gli organismi saggiati sono giovani nati da femmine partenogenetiche entro 24 ore dall'inizio del saggio; sub campioni composti solitamente da 10 individui ed eventualmente su più repliche, vengono esposti a diverse concentrazioni del tossico, in condizioni statiche e non oltre alle 48 ore. L'effetto che viene valutato è la percentuale di immobilizzazione degli individui e si preferiscono condizioni statiche d'esposizione.

Saggi sui pesci: gli organismi saggiati sono i giovani e ne viene valutata la mortalità a diversi tempi sperimentali (24, 48, 72 e 96 ore) dopo averli esposti a diverse concentrazioni della sostanza. Questi test possono essere svolti sia a condizioni statiche, semistatiche e a flusso continuo.

Saggi su batteri: a differenza dei primi tre saggi non sono sempre richiesti dalle normative in vigore per le valutazioni eco tossicologiche in ambiente acquatico. I batteri più comunemente usati sono batteri marini luminescenti, i quali emettono fotoni attraverso l'azione dell'enzima luciferasi.

Viene valutata la percentuale di riduzione di bioluminescenza, proporzionalmente alterata dalla presenza del tossico, e rilevata con un luminometro dopo 15 minuti di esposizione.

[Vighi et Bacci, 1998].

3.4 Curva di tossicità

Le misure di tossicità sono ottenute dall'osservazione e dall'analisi delle risposte biologiche e verranno impiegate per la valutazione degli effetti tossici grazie alla definizione della curva di tossicità (Fig 3.1). Denominata anche come "curva dose-risposta", rappresenta la relazione tra la dose somministrata e l'effetto biologico [Vighi et Bacci, 1998].

Con questo approccio è possibile estrapolare l'EC₅₀ "Effective Concentration 50", ossia la concentrazione che provoca un effetto (es: immobilizzazione o inibizione alla crescita) sul 50% degli esposti; nel caso in cui l'effetto sia la morte si parla di LC₅₀ "Lethal Concentration 50". Analogamente è possibile ottenere le corrispondenti dosi assorbite dagli esposti; in questo caso si parla rispettivamente di ED₅₀ e LD₅₀. Questi parametri sono stime che quantificano la risposta di saggi eco tossicologici acuti, accanto ai quali deve essere sempre riportato il tempo di esposizione che ha determinato l'effetto osservato [Baudo et Perin., 2012].

Nel caso di studi di tossicità cronica, l'obiettivo è il calcolo della soglia di tossicità, ovvero quel livello di esposizione che traccia il confine tra concentrazioni efficaci e non. Nella curva dose-risposta è possibile individuare il NOEC (No Observed Effect Concentration), inteso come la concentrazione o dose più alta al di sotto della quale non si sono manifestati, sperimentalmente, danni entro un tempo stabilito, e il LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) la più bassa concentrazione o dose alla quale invece iniziano a manifestarsi, sperimentalmente, effetti negativi. Occorre specificare che non si tratta di livelli reali ma di livelli sperimentali, limitati alle evidenze mostrate dai saggi effettuati con determinate concentrazioni di tossico. Inoltre è da sottolineare che al di sotto del NOEC alcune sostanze possono svolgere azioni benefiche per l'organismo (basta pensare ad alcuni metalli pesanti che esplicano un ruolo di macronutrienti a bassissime concentrazioni), ma superata tale soglia entrano subito in gioco i meccanismi di difesa e di detossificazione [Vighi et Bacci, 1998; Baudo et Perin., 2012].

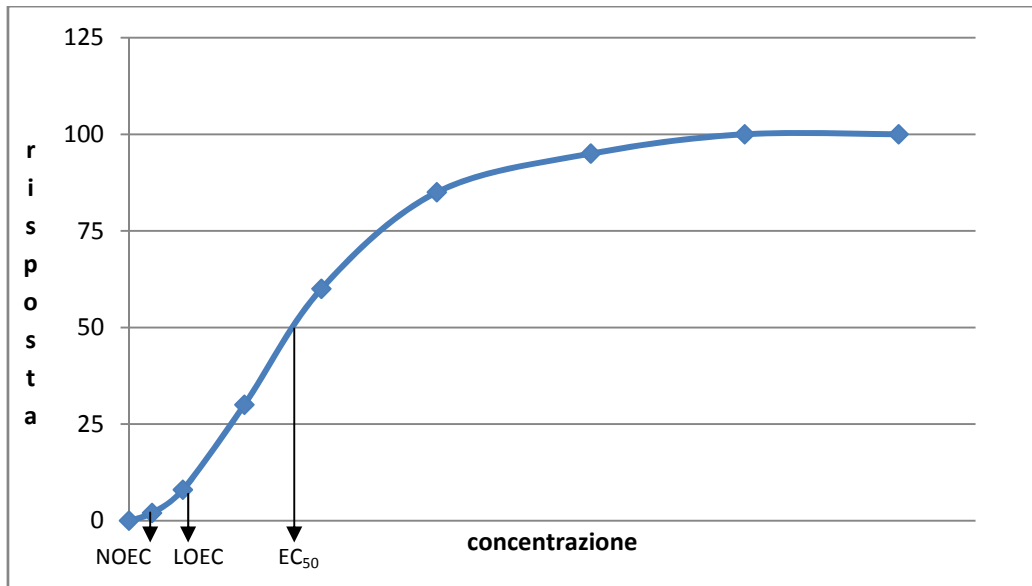


Fig 3.1 Curva concentrazione-risposta

CAPITOLO 4. Materiali e metodi

Le attività di laboratorio sono quasi interamente svolte all'interno del laboratorio di ricerca C.R.S.A (Centro Ricerche Studi Ambientali) a parte le letture allo spettrofluorimetro, messo a disposizione dai laboratori del C.I.R.S.A (Centro Interdipartimentale di Ricerca per le Scienze Ambientali) dell'Università di Bologna, sede a Ravenna.

4.1 Nanoparticelle di Diossido di Titanio ($n\text{-TiO}_2$)

Le nanoparticelle di Diossido di Titanio ($n\text{-TiO}_2$) utilizzate nei saggi sono prodotte da ENEA Frascati tramite pirolisi al laser e presentano le seguenti caratteristiche:

1. Dimensione media: 15 nm
2. Analisi del DLS (Dynamic Light Scattering), dimensione media misurata (DLS): 183 ± 7 nm
3. Lettura al SEM (Scanning Electron Microscope), dimensione e spettro degli aggregati (Fig 4.1):
 - 1° aggregato:
 - larghezza: $13,7 \mu\text{m}$ altezza: $19,4 \mu\text{m}$
 - spettro: O (34,81%) Al (19,09%) Ti (46,11%)
 - 2° aggregato:
 - larghezza: $13,6 \mu\text{m}$ altezza: $23,6 \mu\text{m}$
 - spettro: O (32,35%) Al (26,56%) Ti (41,09%)
4. Fase cristallina: principalmente anastasio (96%)

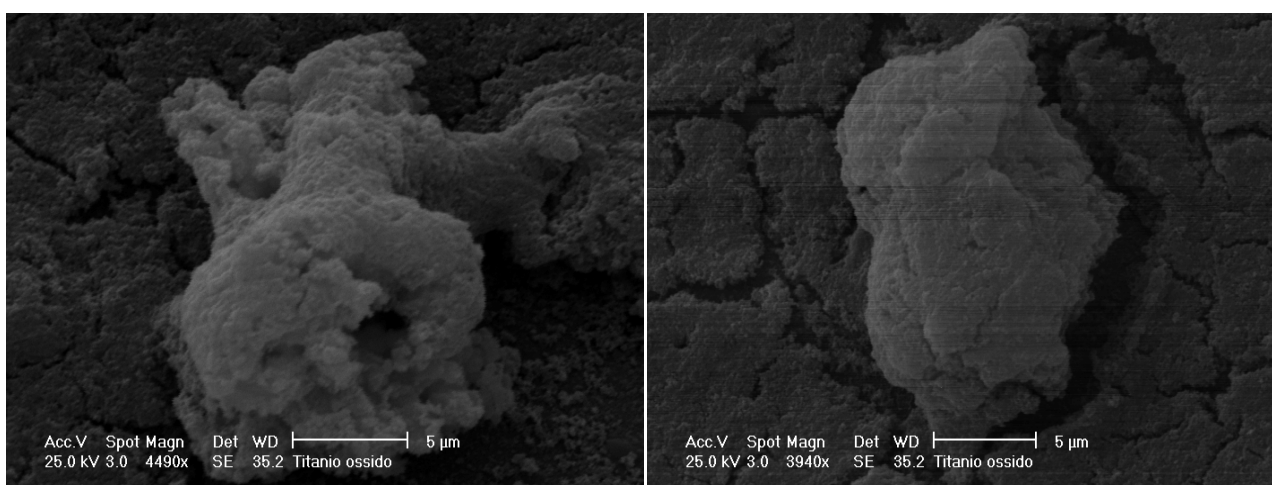


Fig 4.1 Micrografia degli aggregati di nanoparticelle di Diossido di Titanio ottenuta in microscopia elettronica a scansione (SEM Philips XL30). Osservazione a 5000X.

4.2 Ceppo *Pseudokirchneriella Subcapitata* (o *Selenastrum capricornutum*)

Le alghe rappresentano una componente fondamentale degli ecosistemi acquatici. Esse partecipano all'attività auto purificatrice degli ambienti acquatici e rappresentano la base dell'alimentazione degli organismi consumatori che, d'altronde, non sopravviverebbero senza il contributo di ossigeno prodotto mediante fotosintesi algale. Il saggio eseguito con alghe verdi monocellulari, è un valido strumento di monitoraggio ambientale in quanto capace di rilevare eventuali alterazioni della comunità fitoplanctonica dovute a sostanze tossiche e quindi in grado di stravolgere la struttura e il funzionamento di un intero ecosistema [Passarelli P., Sbalchiero A., 2005].

L'alga unicellulare utilizzata è la *Pseudokirchneriella Subcapitata* (o *Selenastrum Capricornutum*), che ha la forma di mezza luna (40 a 70 µm) e appartiene alla famiglia delle *Chlorophyceae*.

Ubiquitaria in molte acque dolci può essere facilmente coltivata in laboratorio. La sua crescita è piuttosto rapida (si può misurare accuratamente già dopo 72-96 ore di incubazione) ed è moderatamente sensibile alle sostanze tossiche; per queste ragioni è una specie adatta all'utilizzo in campo eco tossicologico.

4.2.1 Allevamento e mantenimento subcoltura

Gli organismi test utilizzati nei saggi sono facilmente reperibili in commercio e in banche dati specializzate tra cui *MicroBio Tests Inc, AlgatoxkitTM -freshwater toxicity test with microalgae* (ECOTOX lds) che distribuisce le cellule algali immobilizzate in perle (beads) all'interno di provette. Ogni perla contiene più di un milione di cellule che saranno de-immobilizzate esponendo le perle al mezzo di immobilizzazione *Culturing Medium per Algatoxkit* fornito dal kit; dopodiché le cellule vengono lavate con acqua distillata, infine recuperate per centrifugazione e risospese in uno specifico terreno di coltura. Il terreno di coltura per microalghe di acqua dolce è anch'esso preparato seguendo le istruzioni del kit, conformi al metodo UNI EN ISO 8692:2005, e contiene tutti i nutrienti necessari alla crescita di *Pseudokirchneriella Subcapitata* e quindi al futuro svolgimento dei test di tossicità.

Il mezzo *Culturing Medium per Algatoxkit* è preparato in un pallone da 1 litro versando sequenzialmente 10 mL della boccetta A in dotazione nel kit, 1 mL della boccetta B, 1 mL della C e infine 1 mL della D in 800 mL di acqua deionizzata Milli-Q a temperatura 25°C e conducibilità elettrica 0,0025 µS, infine si porta a volume con la stessa acqua. Il pH del mezzo deve essere pari a 8,1±0,2.

La coltura algale (Fig 4.2) è avviata inoculando 800 µL di microalghe de-immobilizzate e risospese in 50 mL di terreno di coltura così da ottenere una concentrazione iniziale di 10^4 alghe/mL; la subcoltura, contenuta in una beuta da 100 mL, viene mantenuta in una cella termostata a temperatura controllata ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), in agitazione blanda e continua (circa 80 rpm) e con illuminazione costante (4000-10000 lux).

Dato il breve ciclo vitale di circa 7 giorni, la coltura è mantenuta grazie ad un rinfresco settimanale durante il quale si inoculano 800 µL della subcoltura precedente in 50 mL di terreno di coltura fresco.

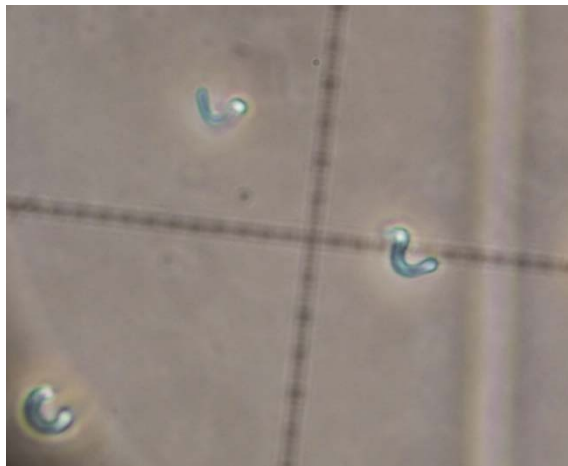


Fig 4.2 Fotografia al microscopio ottico (Nikon Eclipse E600) di *Pseudokirchneriella Subcapitata* fornita da ECOTOX
Ids. Osservazione a 400X.

4.2.2 Curva di crescita

Durante il suo ciclo vitale *Pseudokirchneriella Subcapitata* ha uno sviluppo di crescita esponenziale descritto dalla curva di crescita, la quale rappresenta l'evoluzione della popolazione algale, dal momento dell'inoculo a quello del declino (Fig 4.3). La suddetta curva, ottenuta relazionando il numero di cellule algali con il tempo, permette di ricavare la velocità di crescita della coltura analizzata [UNI EN ISO 8692:2005]:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (\text{eq.9})$$

Dove X = parametro relativo alla densità cellulare espressa in termini di biomassa o conta cellulare

t = tempo

μ = tasso specifico di crescita, influenzato dalle condizioni di mantenimento della coltura

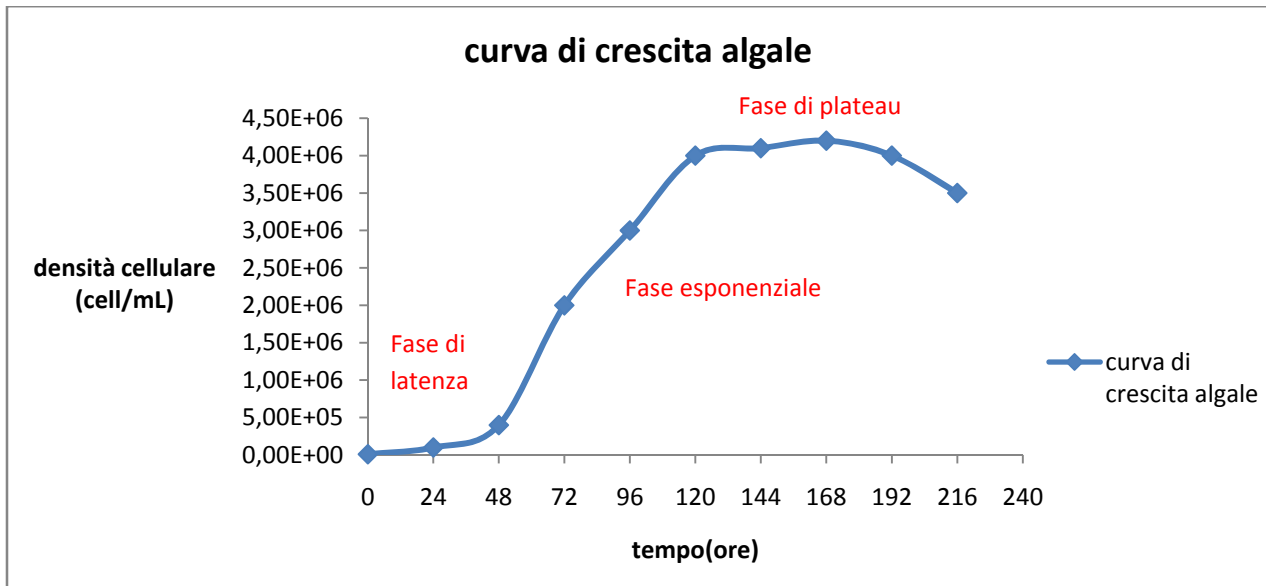


Fig 4.3 Curva di crescita algale

Considerato un monitoraggio di circa 7 giorni, è possibile individuare sulla curva di crescita quattro fasi principali:

- fase di latenza, durante la quale le cellule iniziano ad abituarsi alle condizioni di luce, temperatura e nutrienti (prime 48 ore);
- fase di crescita esponenziale, durante la quale il numero di cellule in crescita è superiore al numero di cellule in declino (tra le 48 e le 96 ore);
- fase stazionaria (o di plateau), durante la quale il numero di cellule in crescita è uguale al numero di cellule in declino (tra le 96 e le 168 ore);
- fase di declino (o morte), durante la quale il numero di cellule in declino è superiore al numero di cellule in crescita (oltre le 168 ore).

I test di inibizione e i rinnovi della coltura sono eseguiti quando le alghe si trovano nella fase esponenziale (48-72 ore).

4.3 Test di inibizione algale con tossico di riferimento: Bicromato di Potassio ($K_2Cr_2O_7$)

Il test di inibizione valuta l'effetto tossico di una sostanza chimica sulla crescita algale; la norma di riferimento UNI EN ISO 8692:2005 identifica il Bicromato di Potassio $K_2Cr_2O_7$, e in particolar modo il cromo esavalente Cr (IV), quale composto tossico di riferimento per la *Pseudokirchneriella Subcapitata*.

L'esecuzione di un test di inibizione algale con $K_2Cr_2O_7$ permette di verificare se gli organismi cresciuti alle specifiche condizioni di laboratorio presentino una sensibilità paragonabile a quella normalmente manifestata e riconosciuta dalla norma di riferimento con valori di EC_{50} pari a $1,19 \pm 0,27$ mg/L.

Nel caso in cui il saggio riporti un valore compreso nel suddetto intervallo, il ceppo algale è considerato standardizzato e valido allo svolgimento dei test di ecotossicità su un ampio spettro di sostanze tossiche.

Il test standard con Bicromato di Potassio prevede la preparazione di due soluzioni di riferimento aventi concentrazioni note:

Soluzione stockA (1 g/L) = 100 mg di $K_2Cr_2O_7$ in 100 mL di acqua deionizzata Milli-Q

Soluzione stockB (10 mg/L) = 1 mL di Soluzione stockA diluita in 100 mL di acqua deionizzata Milli-Q

A seguire si preparano le soluzioni test (Tab 4.1) a concentrazioni note utilizzando la seguente formula:

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad (\text{eq.10})$$

Dove C_1 = concentrazione della Soluzione stockB

V_1 = volume della Soluzione stockB

C_2 = concentrazione desiderata

V_2 = volume totale della soluzione

Ogni soluzione è preparata in provette Falcon da 50 mL e va portata a volume con il mezzo *Culturing Medium per Algatoxkit*.

Soluzione	Soluzione stockB (mL)	<i>Culturing Medium per Algatoxkit</i> (mL)
C_0	50	0
$C_{0,18}$	49,1	0,9
$C_{0,32}$	48,4	1,6
$C_{0,56}$	47,2	2,8
C_1	45	5
$C_{1,8}$	41	9

Tab 4.1 Volumi di soluzione stock e mezzo di nutrizione necessari a raggiungere la concentrazione stabilita

Infine ogni soluzione test viene divisa in due repliche da 25 mL versate in beute di vetro da 50 mL alle quali è inculato un volume di subcoltura di *Pseudokirchneriella Subcapitata* tale da garantire una densità algale pari a 10^4 alghe/mL e assicurare una crescita esponenziale durante lo svolgimento del test.

Una volta verificato il pH, le soluzioni test vengono inoculate e incubate in cella termostata a $22 \pm 2^\circ\text{C}$, in blanda e continua agitazione e con illuminazione di 4000-10000 lux per 72 ore.

Al termine dell'incubazione, su ciascuna concentrazione e replica, viene eseguita la verifica della crescita algale (end-point) con tre diversi metodi descritti nei successivi paragrafi (conta cellulare al microscopio ottico, assorbanza della clorofilla allo spettrofotometro e intensità di fluorescenza della clorofilla allo spettrofluorimetro).

I criteri di validità del test della norma UNI EN ISO 8692:2005 sono:

- nelle 72 ore della durata del test si deve verificare una crescita di densità algale di un fattore maggiore o uguale a 67;
- il coefficiente di variazione dei tassi di crescita del controllo non deve superare il 5%;
- il pH del controllo non deve aumentare durante il test di un fattore maggiore a 1,5 rispetto al pH del mezzo di coltura.

4.4 Test di inibizione algale con nanoparticelle di Diossido di Titanio (n-TiO₂)

L'esecuzione del test di inibizione è effettuato seguendo la norma di riferimento UNI EN ISO 8692:2005, con le stesse condizioni operative, descritte nel paragrafo precedente.

Per la preparazione della soluzione stock di nanoparticelle di Diossido di Titanio (n-TiO₂), si è seguito il metodo proposto e descritto in letteratura da Meissner et al., (2009) visto la similarità chimico-fisica (dimensione primaria e area superficiale) tra le ENPs utilizzate in questo studio con quelle discusse dall'autore (Tab 4.2) [Salieri et al., 2012].

	Area superficiale (m ² /g)	Dimensione primaria (nm)
ENPs ENEA	67,819	18
ENPs Meissener et al., (2009)	55,9	< 50

Tab 4.2 Confronto tra le ENPs di Meissener et al., 2009 ed ENEA [Salieri et al., 2012]

L'applicazione del metodo proposto da Meissner et al., (2009) permette di riprodurre, ogni qualvolta si esegua un test di ecotossicità, una soluzione stock riproducibile con proprietà chimico-

fisiche simili in termini di dimensioni di n-TiO₂ in soluzione e Z-potential (Tab 4.3) [Salieri et al., 2012].

Sample A pH=3,98		Sample B pH=4		Sample C pH=4,2	
d (nm)	Z-potential	d (nm)	Z-potential	d (nm)	Z-potential
270 ± 5	34,1 ± 0,6	281 ± 34	34,9 ± 0,7	387 ± 57	37,2 ± 1,9

Tab 4.3 Confronto tra tre diverse soluzioni stock [Salieri et al., 2012]

Una volta pesate, le nanoparticelle (30 mg) vengono disperse in acqua Milli-Q (30 mL) e successivamente, con aggiunta di HCl 0,1M (600 µL circa), il pH della soluzione viene portato a 4,0±0,1 così da mantenere le NPs stabili in soluzione. La soluzione viene trattata con ultrasuoni in un bagno di sonicazione per 30 minuti così da ottenere una soluzione omogenea e lattiginosa, da conservare al buio, in cella frigorifera a 4°C; prima di ogni utilizzo in un saggio di tossicità, la soluzione stock viene sonicata per altri 30 minuti. Occorre ricordare che la vetreria utilizzata durante i test sperimentali con nanoparticelle, viene dedicata esclusivamente per questa tipologia di sostanze; soprattutto per alte concentrazioni di n-TiO₂, una volta lavate le beute con acqua, rimane una patina biancastra aderente ai bordi che potrebbe contaminare ed influenzare l'esito di altri saggi condotti con altre sostanze. Per questa ragione, al termine di ogni test, qualsiasi oggetto di vetro venuto a contatto con le nanoparticelle, viene lavato con acqua regia (HNO₃:HCl=1:3) e, dopo 24 ore di posa, sciacquato con Bicarbonato di Sodio prima di essere riutilizzato per altri saggi con n-TiO₂. Questa tipologia di trattamento della vetreria è stata messa a punto all'interno del laboratorio C.R.S.A. in quanto non esiste ancora in letteratura un metodo ufficiale consolidato.

A differenza del test con lo standard di riferimento, il range di concentrazione delle soluzioni test definitive è stato definito in funzione dei risultati ottenuti da alcuni test preliminari (range test), effettuati utilizzando serie geometriche di concentrazione (Tab 4.4).

Saggio	Data del saggio	Concentrazioni testate	Tipo di saggio
1° test n-TiO ₂	12/06/2012	C ₅₀₀ - C ₅₀ - C ₅ - C _{0,5} - C ₀	test preliminare
2° test n-TiO ₂	03/07/2012	C ₅₀₀ - C ₅₀ - C ₅ - C _{0,5} - C ₀	test preliminare
3° test n-TiO ₂	09/07/2012	C ₅₀ - C ₂₅ - C ₁₅ - C ₁₀ - C ₅ - C ₁ -C _{0,5} - C ₀	test preliminare
4° test n-TiO ₂	13/07/2012	C ₁₀ - C ₅ - C _{2,5} - C ₁ - C _{0,5} - C ₀	test preliminare
5° test n-TiO ₂	07/09/2012	C ₆₄ - C ₁₆ - C ₄ - C ₁ - C _{0,25} - C ₀	test definitivo
6° test n-TiO ₂	11/09/2012	C ₁₆ - C ₈ - C ₄ - C ₂ - C ₁ - C ₀	test definitivo
7° test n-TiO ₂	14/09/2012	C ₁₆ - C ₈ - C ₄ - C ₂ - C ₁ - C ₀	test definitivo
8° test n-TiO ₂	17/09/2012	C ₁₆ - C ₈ - C ₄ - C ₂ - C ₁ - C ₀	test definitivo
9° test n-TiO ₂	21/09/2012	C ₁₆ - C ₈ - C ₄ - C ₂ - C ₁ - C ₀	test definitivo

Tab 4.4 Concentrazioni di n-TiO₂ saggiate nei test preliminari (range test) e nei test definitivi

Analogamente a quanto fatto per i test con il Bicromato di Potassio, le soluzioni test a concentrazione nota vengono preparate utilizzando l'equazione sopracitata (eq.10); una volta trascorse le 72 ore di incubazione, la verifica dell'end-point è stata eseguita con tre diversi metodi analitici, come di seguito descritto.

4.5 Verica dell'end-point

La norma UNI EN ISO 8692:2005 prevede la lettura dei saggi di inibizione algale durante la fase esponenziale di crescita cellulare, quindi una volta trascorse 72 ore di incubazione alle condizione operative standardizzate. Il calcolo dell'inibizione percentuale è determinato dal tasso di crescita μ per ogni concentrazione.

Di seguito vengono riportate le formule per i rispettivi calcoli:

$$\mu = \frac{\ln X_L - \ln X_0}{t_L - t_0} \quad (\text{eq.11})$$

Dove:

μ = tasso di crescita medio specifico;

t_0 = è il tempo all'inizio del test;

t_L = è il tempo al termine del test;

X_0 = è la densità cellulare iniziale;

X_L = è la densità cellulare al tempo t_L ;

$$I_{ui} = \frac{\mu_c - \mu_i}{\mu_c} \times 100 \quad (\text{eq.12})$$

Dove:

$I_{\mu i}$ = è la percentuale di inibizione del test a concentrazione i ;

μ_i = è il tasso di crescita medio del test a concentrazione i ;

μ_c = è il tasso di crescita medio del controllo.

Considerata la possibile interferenza a livello strumentale delle $n\text{-TiO}_2$, sono state utilizzate tre differenti metodiche per la lettura dei saggi di tossicità:

1. Conta cellulare al microscopio ottico
2. Concentrazione della clorofilla con determinazione dell'assorbanza allo spettrofotometro
3. Concentrazione della clorofilla alla fluorescenza con spettrofluorimetro

L'individuazione della tecnica più adatta è determinante per il calcolo dell'effettiva EC_{50} delle $n\text{-TiO}_2$, pertanto i tre metodi sono stati comparati sia nella definizione della curva di crescita sia nella lettura dei saggi con lo standard di riferimento $K_2Cr_2O_7$.

Il primo metodo risulta essere quello più pratico e veloce e soprattutto in grado di bypassare il problema del limite di rilevabilità dello strumento; trattandosi però di una metodica qualitativa, quindi poco oggettiva perché dipendente dalla praticità e dalla sensibilità dell'operatore di verificare la presenza della cellula algale, sono stati selezionati due metodi strumentali quantitativi come lo spettrofotometro e lo spettrofluorimetro, così da poter confrontare i risultati ottenuti da tre metodi di lettura differenti.

Conta cellulare al microscopio ottico: Il numero di cellule algali vive è stato determinato mediante conteggio al microscopio ottico (400X) utilizzando la camera di Burker (Fig 4.4).

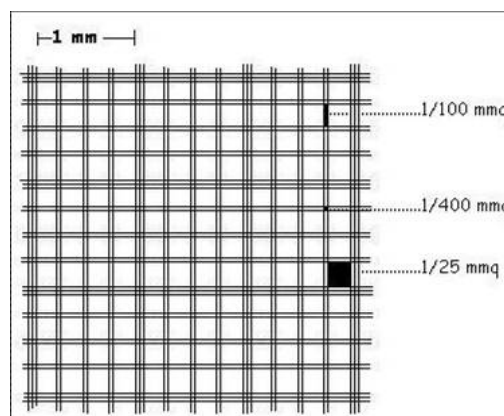


Fig 4.4 Reticolo camera di Burker per la conta cellulare [3]

Una volta riempito per capillarità il sottile spazio fra coprioggetto e camera, si esegue il conteggio delle cellule algali riconoscendole morfologicamente.

Per ogni soluzione test sono state contate le cellule disposte nei dodici quadrati lungo la diagonale del reticolo della camera e successivamente calcolata la media; la media è stata poi riportata alla densità cellulare della coltura tramite una semplice moltiplicazione basata sui volumi utilizzati.

Il valore corrispondente alla densità cellulare va mediato con quello ottenuto dalla sua replica per ottenere la densità cellulare X_L , da utilizzare nel calcolo del tasso di crescita μ e della percentuale di inibizione I_{μ} .

Assorbanza allo spettrofotometro: Per determinare la quantità di clorofilla è stato utilizzato la tecnica spettrofotometrica in modo tale da ricavare l'assorbanza. È stato adottato il metodo UNI 11006:2002 il quale prevede, al termine delle 72 ore di incubazione, la filtrazione di 10 mL di soluzione test su filtri in fibra di vetro Whatman GF6, per mezzo di una pompa da vuoto. Successivamente si prosegue con la macinazione del filtro con pestello di agata in un mortaio e l'aggiunta di 15 mL di acetone al 90% per fissare la clorofilla. I campioni vengono lasciati riposare al buio a 4°C per almeno tre ore prima di essere centrifugati a 3000 giri per 15 minuti; infine si estrae il surnatante e si esegue la lettura.

La misura allo spettrofotometro con cuvette di quarzo con cammino ottico di 5 cm è stata eseguita su:

- il campione tal quale, al fine di determinare il quantitativo di "clorofilla A", pigmento universalmente presente in tutti i gruppi sistematici vegetali, quindi indicatore ideale del contenuto algale. La prima lettura viene effettuata a 663 nm in quanto rappresenta il picco di assorbimento della "clorofilla A", la seconda a 750 nm, lunghezza d'onda necessaria a normalizzare la lettura precedente.
- il campione arricchito di 250 μ L di HCl 0,1M, al fine di stimare il contenuto dei feopigmenti, molecole che si originano una volta che le cellule algali muoiono e la clorofilla si degrada. L'acido cloridrico è in grado di produrre un pH compreso tra 2,6 e 2,8, ottimale per completare la reazione di acidificazione in tempi relativamente brevi e quindi degradare artificialmente la clorofilla.

Poiché l'aggiunta di HCl 0,1M determina un leggero spostamento del picco di assorbimento della "clorofilla A", è bene eseguire le letture a 665 nm e 750 nm.

In tabella 4.5 sono sintetizzate le lunghezze d'onda alla quale vengono svolte le letture in assorbimento dei campioni tal quali e di quelli acidificati:

	Campione tal quale	Campione + 250 µl di HCl 0,1M
λ = 663 nm	lettura	
λ = 750 nm	lettura	lettura
λ = 665 nm		lettura

Tab 4.5: Lunghezze d'onda per le letture in assorbanza allo spettrofotometro

Per ogni concentrazione, è stato predisposto un bianco strumentale di riferimento (contenente le nano particelle ma non l'inoculo algale), applicando la stessa metodica di preparazione dei campioni. Il calcolo della clorofilla (mg/m^3) è eseguito applicando la seguente equazione:

$$\text{Clorofilla A} = (E1 - E2) \times \frac{R}{R-1} \times \left[\frac{v}{l \times V \times \alpha} \right] \times 10^3 \quad (\text{eq.13})$$

Dove:

E1 (campione tal quale) = $E_{663} - E_{750}$

E2 (campione + HCl 0,1 M) = $E_{665} - E_{750}$

R = E1/E2 (per la clorofilla pura è pari a 1,7)

α = coefficiente di assorbanza specifico per la clorofilla A, in acetone 90% (= 91)

v (mL) = volume di acetone

l (cm) = lunghezza della cuvetta

V (L) = volume di campione filtrato

Il valore corrispondente alla concentrazione di "clorofilla A" (X_L) va utilizzato per il calcolo del tasso di crescita μ e di percentuale di inibizione $I_{\mu i}$.

Intensità di fluorescenza allo spettrofluorimetro: La metodica di preparazione del campione è la stessa utilizzata per l'analisi allo spettrofotometro, ossia viene seguito il procedimento proposto dalla UNI 11006:2002. Per quanto riguarda la lettura al fluorimetro, ogni campione viene posto all'interno di cuvette di quarzo con cammino ottico di 1 cm e confrontato con il bianco di riferimento (acqua distillata). Lo strumento viene impostato alle lunghezze d'onda di eccitamento e di emissione della clorofilla pari rispettivamente a 440 nm e 670 nm; il picco di fluorescenza corrispondente a 670 nm rappresenta l'intensità di fluorescenza del campione (X_L) e viene direttamente utilizzato per il calcolo del tasso di crescita μ e di percentuale di inibizione $I_{\mu i}$.

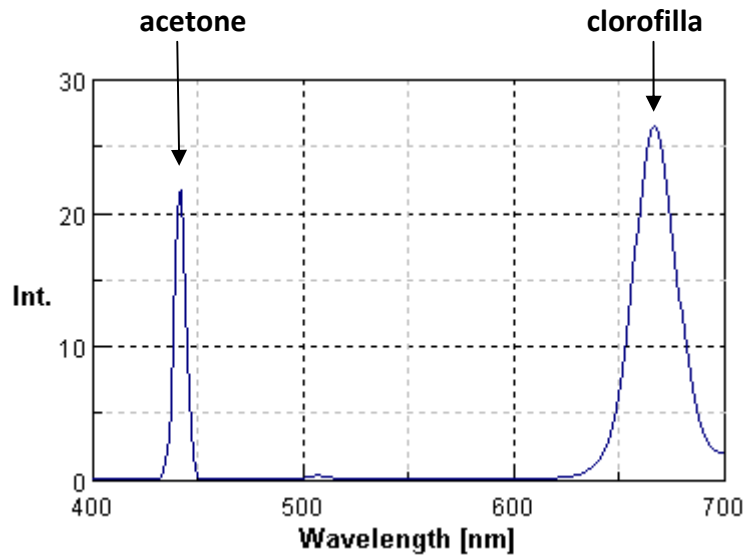


Fig 4.5 Spettro relativo all'intensità di fluorescenza della clorofilla ($\lambda=670$ nm) (sciolta in acetone $\lambda=450$ nm) allo spettrofluorimetro Jasco FP-6200.

4.6 Elaborazione dei dati con il software "Statistica"

4.6.1 Calcolo dei valori di EC_{50}

I valori dell' endpoint, espressi in tasso di crescita cellulare, sono stati elaborati con il software "Statistica 6.0" (StatSoft inc.); una volta caricati nel programma i dati relativi ad ogni test, viene utilizzata una funzione matematica asintotica che permette di stimare la regressione non lineare delle coppie di valori che si distribuiranno lungo la curva.

$$Y = \text{bottom} + (\text{top} - \text{bottom}) / (1 + (X/EC_{50})^{**\text{slope}}) \quad (\text{OBS-PRED})^{**2} \quad (\text{eq.14})$$

Valori in input:

Y = tasso di crescita μ

X = concentrazione espressa in scala logaritmica ($\log_{10}(\mu\text{g/L})$)

Bottom = valore più basso osservato del tasso di crescita

Valori in output:

Slope = pendenza della curva

Top = valore più alto osservato del tasso di crescita

EC_{50} = valore dell' EC_{50} relativo al set di valori elaborato

Si è scelto di riportare i valori di concentrazione in scala $\log_{10}(\mu\text{g/L})$ perché:

- i valori di EC_{50} seguono una distribuzione log-normale [ISO/TS 20281:2006];
- le concentrazioni espresse in $\mu\text{g/L}$ permettono di lavorare con logaritmi di dati positivi.

Inoltre al termine “bottom” viene attribuito il valore 0 in quanto si presuppone che non esistano percentuali di crescita negative e che quindi la densità cellulare non assumerà, compatibilmente agli errori sperimentali, valori inferiori a quelli misurati al tempo $t=0$.

Il metodo utilizzato per stimare i parametri descritti dalla funzione è quello di “Hooke-Jeeves and quasi-Newton” il quale propone in uscita un grafico che rappresenta la distribuzione dei valori su una curva con relativa pendenza (slope) e, di conseguenza, il valore di EC_{50} . Successivamente è stato utilizzato il metodo “Lovenberg-Marquardt” che propone per ogni parametro stimato anche i valori dell’intervallo di confidenza ($\alpha:0,05$) e l’analisi della varianza.

4.6.2 Test di Significatività tra i valori di EC_{50} ottenuti

Una volta calcolati i valori di EC_{50} tramite i metodi di lettura proposti, si prosegue con un’analisi statistica di significatività tramite “Statistica 6.0” (StatSoft inc.) in modo tale da valutare se le serie di dati ottenute sono da considerarsi potenzialmente appartenenti ad un’unica popolazione.

Il test statistico più appropriato a questa tipologia di dati è il “T di Student per dati appaiati” in quanto ogni saggio sperimentale è caratterizzato da più valori di EC_{50} , ognuno ottenuto da una metodica di lettura differente. Tali dati non possono considerarsi indipendenti, bensì accumulati dallo stesso test ecotossicologico.

Come le altre analisi statistiche, anche il test “T di Student” è stato svolto sui valori di EC_{50} espressi in $\log_{10}(\mu\text{g/L})$ in quanto, come già detto:

- i valori di EC_{50} seguono una distribuzione log-normale [ISO/TS 20281:2006];
- le concentrazioni espresse in $\mu\text{g/L}$ permettono di lavorare con logaritmi di dati positivi.

Il valore di probabilità p calcolato dal software descrive quanto le serie di dati possano considerarsi significativamente simili; in particolare per valori del livello di probabilità ($p<0,05$) i dati si devono considerare significativamente diversi [Hall P., Johnson R.A., Wichern D.W., 2002].

4.7 Apparecchiature e reagenti

- Cella termostata ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) TC 875 45 - Agelantoni
- Agitatore orbitale
- Bilancia analitica Basic AB 204S - Mettler Toledo
- Bilancia tecnica BL3100 - Sartorius
- Bagno ad ultrasuoni - Transsonic Digital
- Microscopio ottico - Nikon Eclipse E600

- Microscopio elettronico a scansione (SEM) - Philips XL30
- Camera Burker - Brand
- Filtri in fibra di vetro - Whatman GF6 (47 mm diametro; 20 µm porosità nominale)
- Pompa da vuoto
- PHmetro - Delta Ohm
- Cuvette di quarzo, cammino ottico 5 cm
- Spettrofotometro - Beckman DU650
- Cuvette di quarzo, cammino ottico 1 cm
- Spettrofluorimetro - Jasco FP-6200
- Cappa a flusso laminare - Biohazard, Faster Ultrasafe 48 - Dasit
- Cappa chimica aspirata – Ferraro
- Beute in borosilicato da 50 e 25 mL
- Pallone in borosilicato da 1 L
- Micropipette da 1000, 200, 100, 20 µL
- Pipette da 1, 5, 10, 25 mL
- Pipette in borosilicato da 5 e 25 mL
- Pipettatore Brand - Accujet
- Falcon da 50 e 13 ml
- Cartine tornasole
- Rampa di filtrazione
- Mortaio e pestello in agata
- Pasteur in borosilicato e in plastica
- Mezzo di nutrizione algale *Culturing Medium per Algatoxkit*
- Acqua deionizzata gradiente Milli-Q “Millipore” (conducibilità 0,0025 Ms; filtro 0,22 µm)
- Alga unicellulare *Pseudokirchneriella subcapitata* presso *MicroBio Tests Inc, AlgatoxkitTM - freshwater toxicity test with microalgae*
- Bicromato di Potassio K₂Cr₂O₇
- Nanoparticelle di TiO₂ - ENEA, Frascati
- Acido cloridrico 0,1 M
- Acetone
- Bicarbonato di sodio
- Acqua regia

CAPITOLO 5. Risultati dei saggi ecotossicologici condotti su *Pseudokirchneriella Subcapitata*

5.1 Test di inibizione con tossico di riferimento $K_2Cr_2O_7$: confronto tra i tre metodi di lettura

La lettura dei saggi condotti con il Bicromato di Potassio $K_2Cr_2O_7$ su *Pseudokirchneriella Subcapitata*, è stata svolta utilizzando il microscopio ottico, lo spettrofotometro e lo spettrofluorimetro.

I risultati ottenuti rispettano i requisiti previsti dalla UNI EN ISO 8692:2005:

- il pH di ogni singolo campione, durante lo svolgimento del test, non varia più di un fattore pari all'unità mentre, quello del controllo, non supera mai quello del mezzo di cultura per più di un fattore pari a 1,5;
- il tasso di crescita dei controlli aumenta di un fattore superiore a 67 durante le ore di incubazione previste dal saggio e la variabilità tra le repliche rispetta i criteri stabiliti, ovvero la differenza tra le densità cellulari si mantiene sempre $< 5\%$;

Il confronto tra i risultati ottenuti dai diversi metodi di lettura è stato eseguito per valutare quale sia il più opportuno tra i tre proposti.

Saggio	Modalità lettura
1° test $K_2Cr_2O_7$	microscopio ottico
2° test $K_2Cr_2O_7$	microscopio ottico; spettrofotometro
3° test $K_2Cr_2O_7$	microscopio ottico; spettrofluorimetro

Tab 5.1: Modalità di lettura dei saggi condotti con $K_2Cr_2O_7$

Come si può notare dalla tabella 5.2, i valori di EC_{50} relativi ai saggi condotti con il Bicromato di Potassio e letti con la conta al microscopio ottico e con lo spettrofotometro (2° test $K_2Cr_2O_7$), sono simili; lo stesso si può dire dei valori ottenuti dalla conta cellulare e dallo spettrofluorimetro (3° test $K_2Cr_2O_7$).

Saggio	EC_{50} (mg/L) microscopio ottico	EC_{50} (mg/L) spettrofotometro	EC_{50} (mg/L) spettrofluorimetro
1° test $K_2Cr_2O_7$	0,81	-	-
2° test $K_2Cr_2O_7$	0,92	1,04	-
3° test $K_2Cr_2O_7$	1,10	-	0,86

Tab 5.2: Risultati relativi ai saggi condotti con $K_2Cr_2O_7$

Considerato l'intervallo di valori di EC₅₀ previsto dalla norma UNI EN ISO 8692:2005 (1,19 ± 0,27 mg/L, con lettura al microscopio ottico) e che alcuni dei valori di EC₅₀ ottenuti cadono leggermente al di fuori di esso, i risultati riportati in tabella 5.2 risultano paragonabili tra loro e quindi i tre metodi di lettura sono da considerare attendibili ed utilizzabili per la lettura dei saggi con il Bicromato di Potassio.

5.2 Test di inibizione con nanoparticelle di Diossido di Titanio (n-TiO₂): confronto tra i tre metodi di lettura

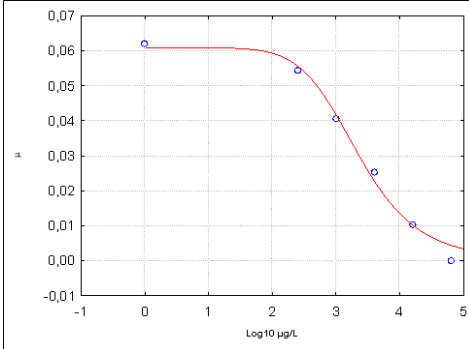
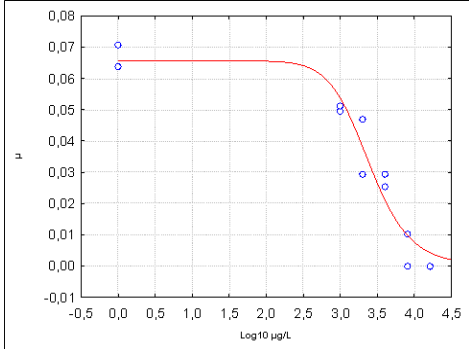
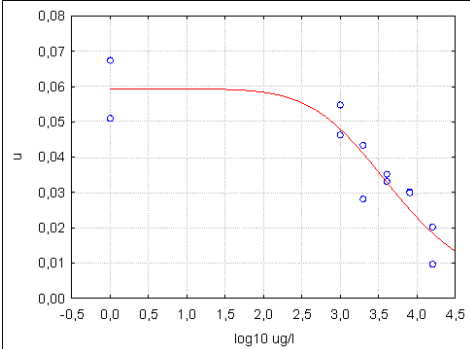
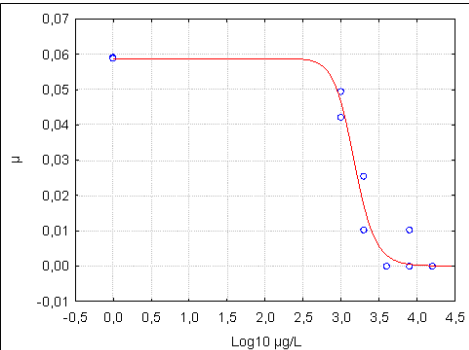
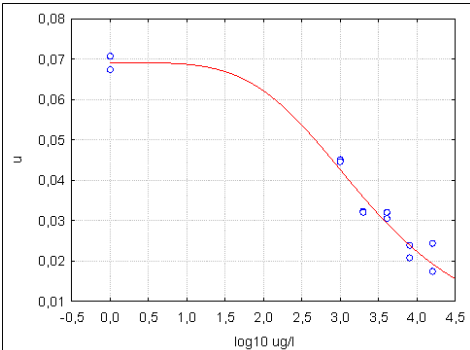
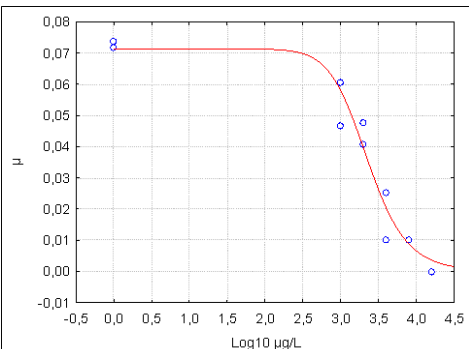
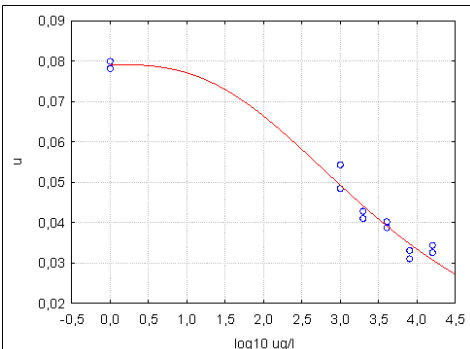
Analogamente ai test condotti con K₂Cr₂O₇, i saggi su *Pseudokirchneriella Subcapitata* esposta a n-TiO₂ sono stati letti al microscopio ottico, allo spettrofotometro e allo spettrofluorimetro in modo tale da poter confrontare i risultati ottenuti e definire quale metodica sia quella più idonea alla definizione dell'EC₅₀ per nanoparticelle di Diossido di Titanio.

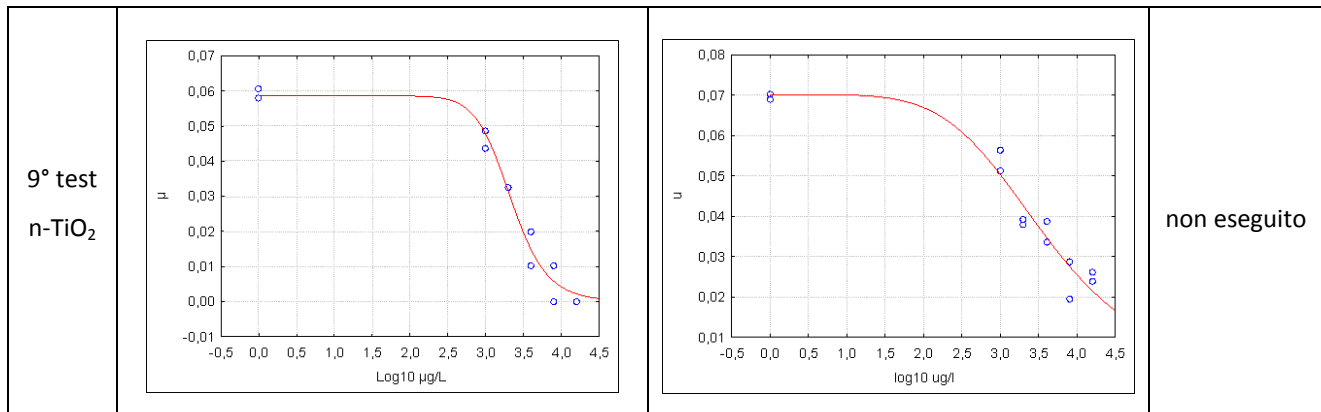
5.2.1 Elaborazione statistica dei dati e confronto tra i tre metodi di lettura

I risultati ottenuti dai saggi sperimentali condotti con n-TiO₂, sia per quanto riguarda i test preliminari (range test) sia per quelli definitivi, sono stati elaborati tramite il software "Statistica 6.0" (StatSoft inc.) ottenendo i seguenti grafici riportati in tabella 5.3 e 5.4:

Saggio	MICROSCOPIO OTTICO	SPETTROFLUORIMETRO	SPETTRO FOTOMETRO
1° test n-TiO ₂		non eseguito	non eseguito
2° test n-TiO ₂		non eseguito	non eseguito
3° test n-TiO ₂		non eseguito	non eseguito
4° test n-TiO ₂		non eseguito	non eseguito

Tab 5.3 Grafici relativi ai test preliminari (range test) condotti con n-TiO₂

Saggio	MICROSCOPIO OTTICO	SPETTROFLUORIMETRO	SPETTRO FOTOMETRO
5° test n-TiO ₂		non eseguito	non eseguito
6° test n-TiO ₂			non eseguito
7° test n-TiO ₂			non eseguito
8° test n-TiO ₂			non eseguito



Tab 5.4 Grafici relativi ai test definitivi condotti con n-TiO₂

I grafici rappresentano la distribuzione delle osservazioni sperimentali (punti blu) sul modello di regressione non lineare descritto dalla curva sigmoide in rosso. I punti sperimentali descrivono l'andamento della curva dose risposta; dai grafici riportati in tabella 5.3 e 5.4 è possibile osservare come le coppie di valori si distribuiscano prevalentemente lungo la "slope", a parte i punti relativi ai controlli i quali risultano posizionati al top della curva.

Le curve di Tab 5.4, relative ai risultati dei test definitivi forniti dal microscopio ottico, mostrano un andamento simile con valori di slope compresi tra 7,1 e 23,1. La stessa somiglianza vale per le curve che riportano i risultati ottenuti dallo spettrofluorimetro, nonostante la loro pendenza sia meno marcata (valori di slope da 2,8 a 6,6). Questo può essere attribuito al diverso fattore di scala, inferiore quello dello spettrofluorimetro rispetto a quello del microscopio ottico; grazie alla conta cellulare, è stato possibile contare fino a 98 cellule lungo la diagonale della camera di Burker (scala 0-100, ad 1 unità di formato), mentre con lo spettrofluorimetro è stato rilevato al massimo un'intensità di fluorescenza pari a 58,4 (unità arbitraria) (scala 0-60, a 0,1 unità di formato).

I valori di EC₅₀ ottenuti grazie all'elaborazione tramite il software "Statistica 6.0" (StatSoft inc.) sono riportati nei paragrafi successivi; occorre anticipare che i valori di assorbanza della clorofilla non risultavano adatti all'elaborazione statistica e per questo non sono state riportate né le curve né i valori tossicologici ottenuti dalle letture allo spettrofotometro.

5.2.2 Risultati ottenuti dalle letture al microscopio ottico

Durante la lettura dei saggi al microscopio ottico (400X), oltre al riconoscimento delle cellule algali necessario per il conteggio, sono state identificate anche le nanoparticelle di Diossido di Titanio sia in forma libera (piccoli puntini neri sullo sfondo), sia in forma aggregata (ammassi grigiastri) (Fig 5.1).

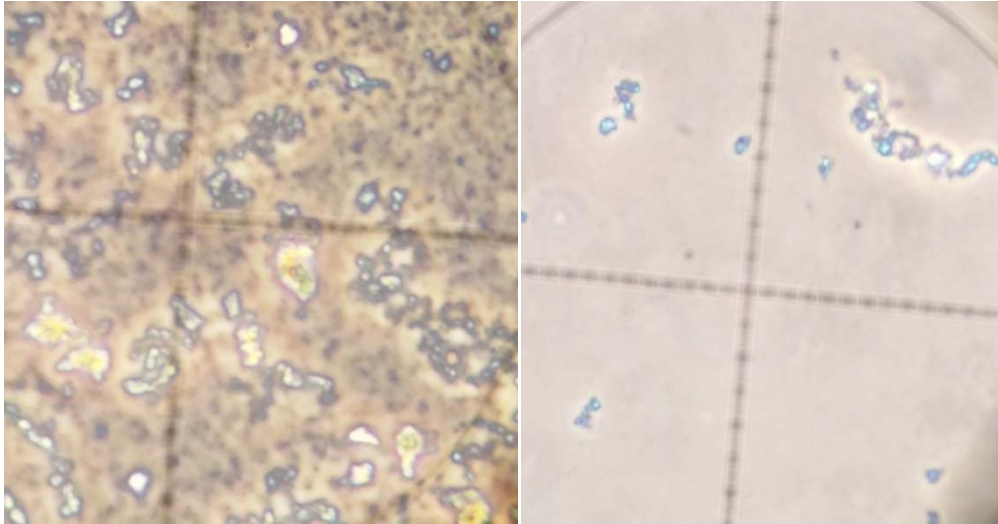


Fig 5.1 Fotografia al microscopio ottico (Nikon Eclipse E600) di n-TiO₂ in forma libera e aggregata. Osservazione 400X

Con l'aumentare della concentrazione di n-TiO₂ nel campione da analizzare, oltre ad aumentare il numero degli ammassi grigiastri e di conseguenza diminuire quello delle cellule algali, si denota la comparsa di piccoli frammenti cellulari (Fig 5.2). Questo potrebbe indicare una possibile adesione delle n-TiO₂ alla superficie della membrana cellulare (ammasso grigiastro dotato di fluorescenza) per poi penetrarla ed infine frantumarla (piccoli frammenti fluorescenti che hanno perso la specifica forma a mezza luna) [Hartmann et al., 2010, Sadiq et al., 2011, Ji et al., 2010].

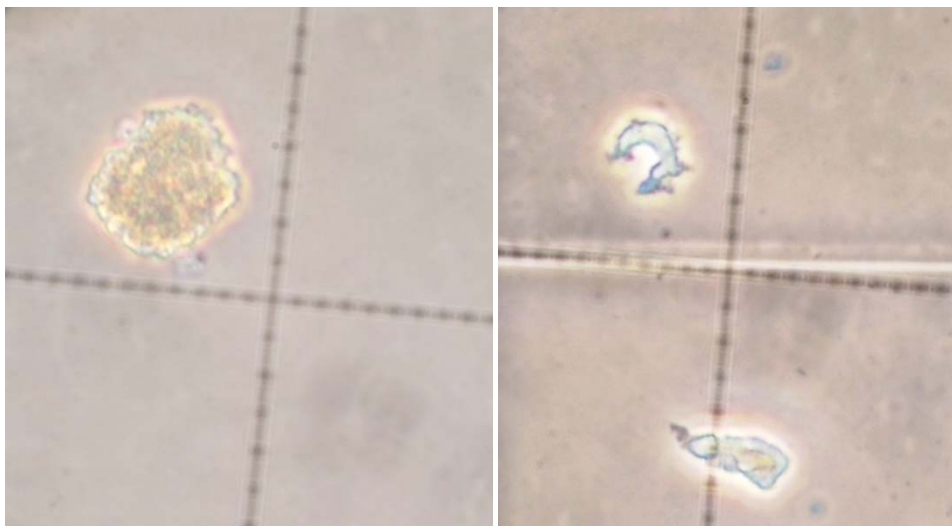


Fig 5.2 Fotografia al microscopio ottico (Nikon Eclipse E600) di n-TiO₂ aggregate sulla membrana cellulare e possibili frammenti cellulari. Osservazione a 400X

Di seguito vengono riportati i valori di EC₅₀ relativi ai test preliminari (range test) ottenuti tramite il software "Statistica 6.0" (StatSoft inc.).

Saggio	Modalità lettura	Concentrazioni testate	EC ₅₀ mg/L
1° test n-TiO ₂	microscopio ottico	C ₅₀₀ - C ₅₀ - C ₅ - C _{0,5} - C ₀	11,49
2° test n-TiO ₂	microscopio ottico	C ₅₀₀ - C ₅₀ - C ₅ - C _{0,5} - C ₀	6,62
3° test n-TiO ₂	microscopio ottico	C ₅₀ - C ₂₅ - C ₁₅ - C ₁₀ - C ₅ - C ₁ - C _{0,5} - C ₀	3,57
4° test n-TiO ₂	microscopio ottico	C ₁₀ - C ₅ - C _{2,5} - C ₁ - C _{0,5} - C ₀	2,67

Tab 5.5: Valori di EC₅₀ dei test preliminari (range test) letti al microscopio ottico

Sulla base dei valori di EC₅₀ ottenuti dai range tests (Tab 5.5) è stato determinato l'intervallo di concentrazioni su cui effettuare i test di tossicità con n-TiO₂ (Tab 5.6).

Saggio	Modalità lettura	Concentrazioni testate	EC ₅₀ mg/L
5° test n-TiO ₂	microscopio ottico	C ₆₄ - C ₁₆ - C ₄ - C ₁ - C _{0,25} - C ₀	2,24 (I.C.95% 1,13-4,44)
6° test n-TiO ₂	microscopio ottico	C ₁₆ - C ₈ - C ₄ - C ₂ - C ₁ - C ₀	2,45 (I.C.95% 1,67-3,60)
7° test n-TiO ₂	microscopio ottico	C ₁₆ - C ₈ - C ₄ - C ₂ - C ₁ - C ₀	1,49 (I.C.95% 1,20-1,85)
8° test n-TiO ₂	microscopio ottico	C ₁₆ - C ₈ - C ₄ - C ₂ - C ₁ - C ₀	2,27 (I.C.95% 1,66-3,10)
9° test n-TiO ₂	microscopio ottico	C ₁₆ - C ₈ - C ₄ - C ₂ - C ₁ - C ₀	2,15 (I.C.95% 1,73-2,67)
media geometrica			2,09 (I.C.95% 1,45-2,99)

Tab 5.6: Valori di EC₅₀ dei test definitivi letti al microscopio ottico

5.2.3 Risultati ottenuti dalle letture al spettrofotometro

A differenza del test con il tossico di riferimento, la lettura dei saggi con n-TiO₂ allo spettrofotometro evidenzia alcune peculiarità:

- all'interno dei singoli test e a parità di concentrazioni saggate, la variabilità delle repliche è marcata, soprattutto all'aumentare della concentrazione di n-TiO₂;
- i risultati ottenuti non sono confrontabili con quelli della conta cellulare al microscopio ottico.

A fronte dei risultati ottenuti allo spettrofotometro, sembra che tale metodo analitico non sia idoneo per saggi con nanoparticelle e per questa ragione non vengono riportati i risultati ottenuti. La lettura dello strumento sembra essere influenzata dalla presenza in soluzione delle nanoparticelle che assorbono la radiazione luminosa e quindi interferiscono con il raggio monocromatico dello spettrofotometro [Gurr et al., 2005; Reeves et al., 2008]. Nella soluzione da analizzare sono presenti, oltre alle molecole di clorofilla da quantificare, anche gli aggregati di nanoparticelle con dimensioni > 2µm trattenute dal filtro di microfibra durante la procedura di

filtrazione. Ad una elevata concentrazione di nanoparticelle in soluzione, di norma corrisponde una ridotta crescita algale dimostrata da una scarsa assorbanza da parte della clorofilla. Data l'interferenza da parte degli aggregati di n-TiO₂, capita spesso che durante la lettura di un campione allo spettrofotometro, il tasso di assorbanza assuma valori talmente elevati da superare quello dei controlli. Allo stesso modo le nanoparticelle possono assorbire il raggio luminoso durante la lettura del bianco, e in tal caso il quantitativo di clorofilla nel campione risulterebbe negativo.

5.2.4 Risultati ottenuti dalle letture allo spettrofluorimetro

Lo spettrofluorimetro rappresenta il secondo metodo da affiancare alla conta cellulare e, a differenza dello spettrofotometro, è in grado di ottenere risultati confrontabili tra loro e con quelli ottenuti al microscopio ottico. Il fluorimetro riesce a rilevare la fluorescenza emessa dalle molecole di clorofilla senza che le nanoparticelle in soluzione interferiscano con le lunghezze d'onda di eccitazione ($\lambda=460$ nm) ed emissione ($\lambda=670$ nm) su cui è settato lo strumento (Fig 5.3). Di conseguenza, analizzando alle stesse condizioni campioni di bianco contenenti concentrazioni in serie crescente di NPs, lo spettro non mostra nessun segnale in uscita a $\lambda=670$ nm (Fig 5.4); quanto detto dimostrerebbe che gli ossidi di metalli in sospensione non emettono fluorescenza a tali valori di settaggio in quanto al di sotto del limite di detenzione [Aruoja et al., 2009].

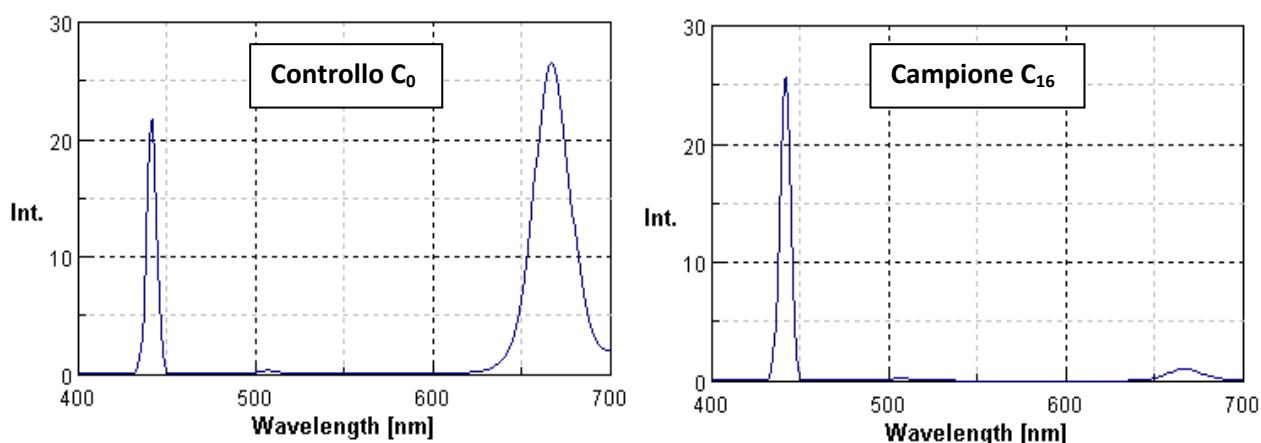


Fig 5.3 Confronto tra diversi spettri relativi all'intensità di fluorescenza della clorofilla ($\lambda=670$) di un controllo C₀ e un campione C₁₆ (Jasco FP-6200).

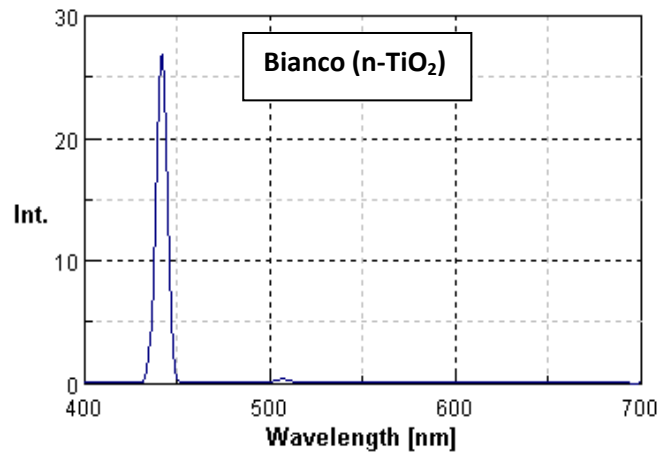


Fig 5.4 Spettro relativo al bianco sperimentale contenente acetone e n-TiO₂ a dimostrazione che le nanoparticelle non emettono fluorescenza a $\lambda=670$ nm.

Di seguito vengono riportati i valori di EC₅₀ relativi ai test definitivi ottenuti tramite il software “Statistica 6.0” (StatSoft inc.).

Saggio	Modalità lettura	Concentrazioni testate	EC ₅₀ mg/L
6° test n-TiO ₂	spettrofluorimetro	C ₁₆ - C ₈ - C ₄ - C ₂ - C ₁ - C ₀	5,36 (I.C.95% 2,45-11,71)
7° test n-TiO ₂	spettrofluorimetro	C ₁₆ - C ₈ - C ₄ - C ₂ - C ₁ - C ₀	2,28 (I.C.95% 1,53-3,40)
8° test n-TiO ₂	spettrofluorimetro	C ₁₆ - C ₈ - C ₄ - C ₂ - C ₁ - C ₀	3,81 (I.C.95% 2,40-6,03)
9° test n-TiO ₂	spettrofluorimetro	C ₁₆ - C ₈ - C ₄ - C ₂ - C ₁ - C ₀	3,91 (I.C.95% 2,41-6,33)
media geometrica			3,67 mg/L (I.C.95% 2,16-6,24)

Tab 5.7: Valori di EC₅₀ dei test definitivi letti allo spettrofluorimetro

5.3 Test di Significatività (T di Student) dei valori di EC₅₀ ottenuti dalla lettura al microscopio ottico e allo spettrofluorimetro

A fronte degli ultimi quattro valori di EC₅₀ ottenuti dalle letture al microscopio ottico (Tab 5.6), il valore della media geometrica degli EC₅₀ risulta pari a 2,05 mg/L (I.C.95% 1,55-2,71), comparabile con la media geometrica calcolata sugli EC₅₀ degli stessi test ma letti allo spettrofluorimetro (Tab 5.7) e pari a 3,67 mg/L (I.C.95% 2,16-6,24).

Il test statistico del “T di Student per dati appaiati” viene svolto sulle serie di valori di EC₅₀ proposte l’una dal microscopio l’altra dallo spettrofluorimetro (Tab 5.8); come già argomentato, non vengono riportati i risultati ottenuti con lo spettrofotometro in quanto non risulta essere uno strumento adatto alla lettura di saggi condotti con nanoparticelle.

Saggio	Concentrazioni testate	EC ₅₀ microscopio ottico	EC ₅₀ spettrofluorimetro
6° test n-TiO ₂	C ₁₆ - C ₈ - C ₄ - C ₂ - C ₁ - C ₀	2,45 (I.C.95% 1,67-3,60)	5,36 (I.C.95% 2,45-11,71)
7° test n-TiO ₂	C ₁₆ - C ₈ - C ₄ - C ₂ - C ₁ - C ₀	1,49 (I.C.95% 1,20-1,85)	2,28 (I.C.95% 1,53-3,40)
8° test n-TiO ₂	C ₁₆ - C ₈ - C ₄ - C ₂ - C ₁ - C ₀	2,27 (I.C.95% 1,66-3,10)	3,81 (I.C.95% 2,40-6,03)
9° test n-TiO ₂	C ₁₆ - C ₈ - C ₄ - C ₂ - C ₁ - C ₀	2,15 (I.C.95% 1,73-2,67)	3,91 (I.C.95% 2,41-6,33)
media geometrica		2,05 (I.C.95% 1,55-2,71)	3,67 (I.C.95% 2,16-6,24)

Tab 5.8 Confronto tra i valori di EC₅₀ ottenuti dal microscopio ottico e dallo spettrofluorimetro

I risultati dell'analisi (Tab 5.9) dimostrano che le due serie di dati sono significativamente diverse (p-level<0,05) e che quindi bisogna considerarle appartenenti a due popolazioni distinte.

Come è possibile notare già da Fig 5.5, le medie delle due serie di EC₅₀ (log₁₀(µg/L)) e i relativi errori standard ES, sono differenti.

	Media (log ₁₀ (µg/l))	Dev.St	N	Media diff.	Dev.St diff	t	df	p-level
ottico	3,31	0,09						
spettrofluorimetro	3,56	0,15	4	-0,251338	0,066326	-7,57885	3	0,004765

Tab 5.9 Risultati del test di significatività T di Student

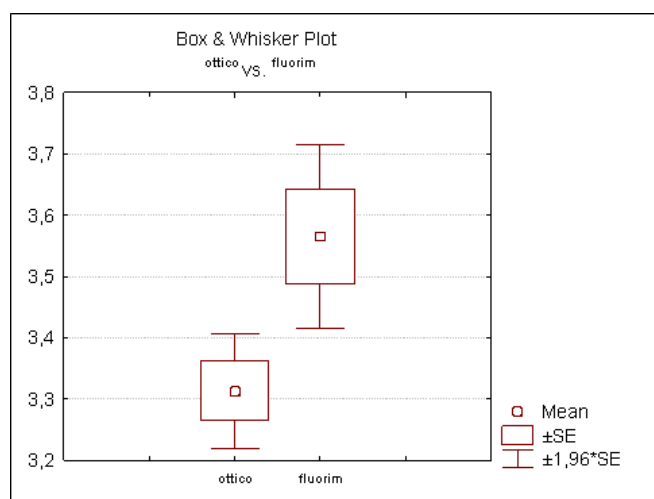


Fig 5.5 Rappresentazione grafica delle medie degli EC₅₀ (log₁₀(µg/L))

Per un'interpretazione più immediata dei risultati, vengono riportati i valori di EC₅₀ nell'unità di misura originale (mg/L) in modo tale da rappresentare nel grafico i valori delle medie e rispettivi intervalli di confidenza (Fig 5.6).

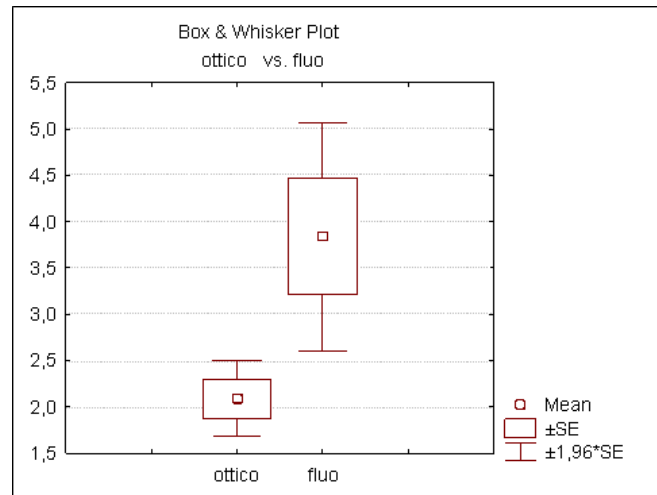


Fig 5.6 Rappresentazione grafica delle medie degli EC₅₀ (mg/L)

I risultati ottenuti dal software indicano che le letture svolte con i due metodi (microscopio ottico e spettrofluorimetro), seppur confrontabili, sono statisticamente differenti (p-level = 0,004765). Ciò può essere attribuito alla diversa sensibilità degli strumenti; nonostante lo spettrofluorimetro sia caratterizzato da limiti strumentali, è sempre riuscito a rilevare picchi di fluorescenza proporzionali alle concentrazioni di n-TiO₂, comprese quelle più elevate (C₁₆). Anche la conta cellulare al microscopio ottico risulta proporzionale alle concentrazioni testate ma attribuisce ai campioni C₁₆ un numero di cellule algali pari a 0. Questa differenza tra i risultati forniti dai due metodi può essere influenzata dal volume necessario alla lettura stessa, più rappresentativo quello richiesto per definire l'intensità di fluorescenza al fluorimetro (10 mL su 25 mL di campione) rispetto quello necessario alla conta cellulare al microscopio ottico (10 µL su 25 mL di campione).

5.4 Confronto tra i risultati ottenuti e altri valori di EC₅₀ trovati in letteratura

Osservando i risultati riportati in letteratura e discussi nei paragrafi successivi (Tab 6.1), è possibile individuare una relazione tra i risultati di questo studio e quelli proposti da Aruoja et al., (2009) sull'alga *Pseudokirchneriella Subcapitata*.

Come già detto, il valore medio di EC₅₀ ottenuti dai saggi sperimentali svolti vale 3,67 mg/L (I.C.95% 2,16-6,24), con la lettura dell'endpoint effettuata allo spettrofluorimetro, e 2,09 mg/L (I.C.95% 1,45-2,99) se invece viene utilizzato il microscopio ottico.

I valori medi di EC₅₀ sono compatibili tra loro e con il valore di EC₅₀ ottenuto da Aruoja et al., (2009) perché pari a 5,83 mg/L (I.C. 3,75-7,58 mg/L).

	Aruoja et al., 2009	Saggi al C.R.S.A.
Alga saggiata	Pseudokirchneriella Subcapitata	Pseudokirchneriella Subcapitata
Durata del saggio	72 ore	72 ore
Condizioni di incubazione	24°C, costantemente illuminati e mantenuti in agitazione	24°C, costantemente illuminati e mantenuti in agitazione
Metodo di lettura dei saggi	fluorimetro a fluorescenza $\lambda_{eccitazione}$:440 nm $\lambda_{emissione}$:670nm	spettrofluorimetro $\lambda_{eccitazione}$:440 nm $\lambda_{emissione}$:670nm
Valore di EC₅₀	5,83 mg/L	3,67 mg/L
Dimensioni n-TiO₂	25-70 nm	15 nm
Fase cristallina n-TiO₂	99,5% anastasio	96% anastasio
Preparazione soluzione stock	per ogni saggio:disperdere le n-TiO ₂ nel mezzo di nutrizione; sonicare per 30 minuti.	disperdere le n-TiO ₂ in acqua Milli-Q, sonicare per 30 minuti. Conservare la soluzione per 1 mese (4°C al buio) e riutilizzare previa sonicazione per 30 minuti.
Preparazione alla lettura	50 µL di campione nelle piastre multi pozzetto, aggiungere 200 µL di etanolo. Lasciare riposare per 3 ore al buio prima di effettuare la lettura.	filtrare 10 mL di campione, macinare il filtro, aggiungere 15 mL di acetone. Lasciare a riposo per 3 ore in frigorifero, centrifugare ed estrarre il surnatante per la lettura.

Tab 5.10 Confronto tra i saggi condotti al CRSA e quelli di Aruoja et al., 2009

Aruoja et al., (2009) svolgono le letture dei saggi con il fluorimetro a fluorescenza; lo strumento, analogamente a quanto fatto per la lettura dei nostri test sperimentali, è settato su specifiche lunghezze d'onda di eccitazione ed emissione, pari rispettivamente a 440 e 670 nm.

Gli autori utilizzano nanoparticelle di Diossido di Titanio molto simili a quelle utilizzate nei saggi descritti in questo elaborato di tesi, sia per quanto riguarda le dimensioni (25-70 nm quelle di Aruoja et al., 2009, 15 nm quelle fornite da ENEA Frascati) sia per la fase cristallina (99,5% anastasio quelle di Aruoja et al., 2009, 96% anastasio quelle fornite da ENEA Frascati).

Differente è il trattamento della soluzione stock in quanto in Aruoja et al., (2009) viene preparata ogni qualvolta venga effettuato un saggio e prevede la dispersione delle nanoparticelle nel mezzo di nutrizione algale e successiva sonicazione per 30 minuti. La soluzione stock preparata per i nostri studi prevede la dispersione delle nanoparticelle in acqua Milli-Q e sonicazione in bagno a ultrasuoni per 30 minuti, poi viene conservata per un mese in frigorifero (4°C al buio) in modo tale da poterla riutilizzare per lo svolgimento di 4 o 5 test, previa sonicazione per 30 minuti.

La specie algale utilizzata da Aruoja et al., (2009) è la stessa utilizzata nei nostri studi e lo stesso si può dire delle condizioni di mantenimento della subcoltura una volta che i campioni sono lasciati incubare per 72h (24°C, costantemente illuminati e mantenuti in agitazione); quello che distingue le due metodiche sperimentali è la preparazione dei campioni alla lettura strumentale.

Una volta trascorso il tempo di incubazione, Aruoja et al., (2009) trasferiscono 50 µL di campione nelle piastre multi pozzetto, aggiungono 200 µL di etanolo e lasciano riposare per 3 ore al buio prima di procedere con la lettura al fluorimetro a micropiastre; il metodo UNI 11006:2002 da noi applicato prevede invece la filtrazione di 10 mL di campione seguita da macinazione del filtro e aggiunta di 15 mL di acetone, prima di lasciare a riposo per 3 ore in frigorifero, dopodiché segue la centrifugazione e l'estrazione del surnatante per la lettura.

Nonostante queste differenze legate alla preparazione della soluzione stock e del campione prima della lettura della fluorescenza, i risultati dei due studi finora esaminati mostrerebbero come le nanoparticelle di dimensioni e composizione simile inducano sullo stesso organismo effetti negativi analoghi. Inoltre, i risultati ottenuti dai nostri test ecotossicologici, dimostrerebbero che il riutilizzo della soluzione stock, opportunamente sonicata e utilizzata in un arco di tempo non eccessivamente prolungato, possa garantire dei risultati soddisfacenti, se così si considerano quelli ottenuti da Aruoja et al., (2009).

I risultati ottenuti dai test sperimentali sono di un ordine di grandezza inferiore a quelli proposti da Warheit et al., (2007), i quali hanno effettuato saggi eco tossicologici su *Pseudokirchneriella Subcapitata* ottenendo due valori di EC₅₀ pari a 16 e 21 mg/L.

	Warheit et al., 2007	Saggi al C.R.S.A.
Alga saggiata	Pseudokirchneriella Subcapitata	Pseudokirchneriella Subcapitata
Durata del saggio	72 ore	72 ore
Condizioni di incubazione	24°C, costantemente illuminati e mantenuti in agitazione	24°C, costantemente illuminati e mantenuti in agitazione
Metodo di lettura dei saggi	conta cellulare	conta cellulare
Valore di EC₅₀	ENPs fini: 16 mg/L ENPs ultrafini: 21 mg/L	2,09 mg/L
DLS	ENPs fini: 380 nm ENPs ultrafini: 140 nm	180 nm
Fase cristallina n-TiO₂	ENPs fini: 99% anastasio ENPs ultrafini: 21% anastasio	96% anastasio

Preparazione soluzione stock	per ogni saggio: disperdere le n-TiO ₂ in acqua a 12°C senza	disperdere le n-TiO ₂ in acqua
	procedere con la sonicazione.	Milli-Q, sonicare per 30 minuti. Conservare la soluzione per 1 mese (4°C al buio) e riutilizzare previa sonicazione per 30 minuti.

Tab 5.11 Confronto tra i saggi condotti al CRSA e quelli di Warheit et al., 2007

Il primo valore di EC₅₀ si riferisce agli effetti indotti da nanoparticelle fini di Diossido di Titanio (dimensione media delle particelle disperse in acqua, DLS: 380 nm) con elevata percentuale di anastasio (99 %), il secondo da n-TiO₂ ultrafini (DLS: 140 nm) ma con solo il 21% di anastasio nella fase cristallina. Le nanoparticelle utilizzate nei nostri saggi sono affini alle ENPs fini di Warheit et al., (2007) per quanto riguarda la fase cristallina (96% anastasio), e a quelle ultrafini se si considerano le dimensioni (DLS: 180 nm). Probabilmente, il valore di EC₅₀ più tossico è attribuito alle nanoparticelle di dimensioni maggiori (ENPs fini) perché la loro composizione presenta una percentuale di anastasio molto più elevata (99 %) rispetto quella delle ENPs ultrafini (21 %) [Hartmann et al., 2010; Warheit et al., 2007; Aruoja et al., 2009].

Inoltre Warheit et al., (2007), durante la procedura di preparazione della soluzione stock, disperde le n-TiO₂ in acqua a 12°C senza procedere con la sonicazione; in base a quanto descritto da Aruoja et al., (2009), una volta sonicata, la sospensione diventa omogenea, torbida e senza particelle sedimentate sul fondo. Il bagno ad ultrasuoni risulterebbe quindi una metodica efficace per rompere gli aggregati di nanoparticelle, nonostante non si abbia conferma strumentale [Zhang et Sun et al., 2006]. L'eventuale formazione di aggregati nella soluzione stock preparata da Warheit et al., (2007), aumenterebbe le dimensioni delle n-TiO₂ in soluzione (ordine dei micron) e quindi ridurrebbe la superficie esposta e, di conseguenza, la reattività chimica delle ENPs sulle cellule algali [Wang et al., 2008]; questa potrebbe essere la ragione per cui i valori di EC₅₀ riportati sono più elevati rispetto a quelli ottenuti dai nostri studi e da quelli di Aruoja et al., (2009).

Ad ogni modo, confrontando le nostre tecniche di preparazione e il mantenimento della cultura algale con quelle proposte da Warheit et al., (2007), non sono state individuate altre differenze evidenti; gli autori seguono la procedura descritta dal metodo OECD 201 che, analogamente alla norma UNI EN ISO 8692:2005, prevede la crescita della subcultura in un idoneo mezzo di nutrizione mantenendo costanti i parametri di incubazione quali temperatura, luce e agitazione. Una volta trascorse le 72 ore, l'endpoint viene letto attraverso la conta cellulare, la stessa metodica svolta al termine dei nostri saggi.

CAPITOLO 6. Stima del fattore di effetto per n-TiO₂

6.1 Fattore di Effetto EF

Il Fattore di Effetto per le nanoparticelle di Diossido di Titanio viene calcolato sulla base dei valori tossicologici sulle specie appartenenti ai tre livelli trofici di un ecosistema acquatico: alghe, crostacei e pesci. I valori di tossicità (es: EC₅₀ e LC₅₀) sono stati ricavati attraverso un'ampia ricerca bibliografica sulle specie richieste dal modello USEtox. Di seguito vengono riportate le reviews bibliografiche relative ad alghe, crostacei e pesci.

6.1.1 Review bibliografica: valori eco tossicologici per alghe esposte a n-TiO₂

Gli effetti tossici indotti da n-TiO₂ sull'alga unicellulare *Pseudokirchneriella Subcapitata* riportati in letteratura sono molto variabili (Tab 6.1). Inoltre la review bibliografica evidenzia condizioni sperimentali eterogenee sia in termini di tempi di incubazione sia di trattamento del materiale. Ad oggi non è chiara la relazione tra le dimensioni, l'area superficiale e la composizione delle nano particelle di Diossido di Titanio e gli effetti indotti sulle colture algali [Menard et al., 2011]. Secondo gli studi sperimentali condotti da Warheit et al., (2007) le particelle fini (dimensione media delle particelle disperse in acqua, DLS: 380 nm) ma pure al 99% inducono una EC₅₀ pari a 16 mg/L, valore simile a quello ottenuto con particelle ultrafini (DLS: 140 nm) e composizione differente (79% rutilio e 21% anastasio), pari a 21 mg/L. Dai dati ottenuti da queste analisi è possibile ipotizzare l'importanza, in termini di tossicità, della fase cristallina (in termini di % di anastasio); per quanto riguarda il rutilio vi sono evidenze che la sua potenziale tossicità sia inferiore e paragonabile a quella della corrispettiva forma bulk [Ji et al., 2010].

Analoghe conclusioni sono tratte dalle esperienze di Hartmann et al., (2010); i suoi studi sono condotti su *Pseudokirchneriella Subcapitata* testando nanoparticelle di Diossido di Titanio di tre differenti dimensioni (10, 30 e 300 nm) e composizioni (% anastasio pari rispettivamente a 67,2%, 72,6%, N.R.). Comparando i risultati ottenuti si evince che le piccole dimensioni delle n-TiO₂ non influenzino la tossicità in quanto l'EC₅₀ di ENPs < 10 nm (pari a 241 mg/L) è maggiore di quella riscontrata da ENPs di 300 nm (pari a 145 mg/L). Diversamente le nanoparticelle di dimensione intermedia e con la percentuale in anastasio più elevata (72,6%) sembrano rappresentare la tipologia di ENPs più tossica, in quanto il valore di EC₅₀ è pari a 71 mg/L. Anche i risultati di Aruoja et al., (2009) mostrano che le nanoparticelle di Diossido di Titanio testate (25-70 nm) e composte al 99,5% da anastasio, determinano un valore di tossicità elevata, precisamente una EC₅₀ pari a 5,83 mg/L.

Dagli studi di Hartmann et al., (2010) e Warheit et al., (2007) è possibile individuare una relazione anche tra l'area superficiale delle n-TiO₂ e il valore di EC₅₀; infatti alle ENPs con area superficiale più piccola corrisponde il valore di tossicità più basso (Tab 6.1).

La tossicità delle ENPs potrebbe essere determinata anche dalla combinazione di più fattori, come ipotizzato da Hund-Rinke et al., (2010). Gli autori confrontano due nanoparticelle di Diossido di Titanio di analoga composizione (purezza > 90%) ma l'una di dimensioni pari a 150 nm e area superficiale 8 m²/g, l'altra di 8 nm e 250 m²/g. I valori di EC₅₀ riportati sono differenti, rispettivamente la prima risulta non essere tossica la seconda invece induce su *Pseudokirchneriella Subcapitata* una EC₅₀ pari a 65,8 mg/L. In un precedente studio con *Desmodesmus Subpicatatus*, gli stessi autori riportano un valore di tossicità di EC₅₀ pari a 44 mg/L, per ENPs di TiO₂ con dimensioni di 25 nm, mentre con quelle di dimensione primaria di 100 nm il valore di EC₅₀ risulta incalcolabile [Hund-Rinke et Simon, 2006]. Analogamente, i risultati di IC₂₅ ottenuti da Blaise et al., (2008) e Hall et al., (2009), sembrano individuare una proporzionalità inversa tra la grandezza delle ENPs e la loro tossicità. Test eco tossicologici condotti con ENPs pure al 99% e con dimensioni < 100 nm inducono una inibizione alla crescita del 25% a concentrazioni > 100 mg/L [Blaise et al., 2008], mentre ENPs di composizione analoga ma di dimensioni pari a 10 nm determinano un valore di IC₂₅ decisamente più basso e pari a 1-2 mg/L [Hall et al., 2009].

Gli studi di Ji et al., (2010) su *Chlorella Sp.* mettono in evidenza l'importanza delle dimensioni e della fase cristallina; gli effetti eco-tossicologici sembrano associati alle nanoparticelle più piccole (5-10 nm) e composte prevalentemente da anastasio piuttosto che a nanoparticelle di diametro pari a 50 nm e caratterizzate da un'alta percentuale di rutilio; nonostante le condizioni di preparazione e incubazione (144 ore) siano le stesse, è stato possibile calcolare il valore di EC₅₀ solo per le prime e con risultato pari a 120 mg/L.

Anche Sadiq et al., (2011) utilizza *Chlorella Sp.* in saggi con ENPs di composizione non nota ma diametro inferiore ai 25 nm ed ottiene, una volta trascorse le 72 ore previste dal saggio, un EC₅₀ molto più bassa e pari a 16,1 mg/L: probabilmente anche il fattore tempo non è del tutto trascurabile. L'altra alga unicellulare saggiata da Sadiq et al., (2011) è la *Scenedesmus Sp.*; gli autori mantengono le stesse condizioni di trattamento e utilizzano le stesse nanoparticelle ottenendo un analogo valore di EC₅₀ (21,2 mg/L) che dimostra una sensibilità affine a quella della *Chlorella Sp.*

Più sensibile, nonostante i dati non siano sufficienti a dimostrarlo, sembrerebbe l'alga *Chlamydomonas reinhardtii* testata da Wang et al., (2008): gli autori utilizzano ENPs con dimensioni simili a quelle utilizzate da Sadiq et al., (2011) (diametro pari a 21 nm) e composte

prevalentemente da rutilio (79%) quindi, secondo le citazioni precedenti [Hartmann et al., 2010, Warheit et al., 2007; Aruoja et al., 2009], meno tossico dell'anastasio. Il valore di EC₅₀ dopo un saggio di 72 ore è pari a 10 mg/L, inferiore a quello sulla *Chlorella Sp.* e sulla *Scenedesmus Sp.* testate da Sadiq et al., (2011).

Alcuni articoli bibliografici riportano interessanti notazioni su una proprietà insita alle nano particelle, ossia la tendenza a formare aggregati in soluzione acquosa; il loro comportamento risulta poi governato sia dalle loro proprietà di superficie sia dalle proprietà chimiche della soluzione [Ottofueling et al., 2011].

Oltre alla dimensione primaria, all'area superficiale e alla composizione, anche la formazione di aggregati potrebbe essere un parametro di influenza per la tossicità delle n-TiO₂.

Ad esempio la formazione di tali aggregati potrebbe determinare un "effetto ombra" in quanto il fascio di luce non riesce a oltrepassare la soluzione perché resa torbida dalle ENPs addensate e quindi l'attività fotosintetica diminuisce e conseguentemente la crescita cellulare [Aruoja et al., 2009; Ji et al., 2010]. Contrariamente Hund-Rinke et Simon, (2006), disignando un test ad hoc, hanno dimostrato che in realtà gli aggregati di TiO₂ non inibiscono la crescita cellulare.

Un ulteriore effetto connesso alla formazione di aggregati è l'adesione, più comunemente detta "entrapping", attraverso la quale tali accumuli di ENPs aderiscono alla superficie delle cellule riducendone la crescita [Hartmann et al., 2010; Sadiq et al., 2011, Ji et al., 2010] e talvolta provocando effetti fisici come la rottura della membrana cellulare [Sadiq et al., 2011].

In contrasto Wang et al., (2008) dimostrano nei loro studi che la formazione di aggregati, oltre ad aumentare la dimensione delle ENPs, riduce la superficie esposta e di conseguenza la reattività chimica delle ENPs sulle cellule algali.

Non viene esclusa da questa discussione l'analisi delle varie modalità di preparazione della soluzione stock di ENPs proposte dai vari autori finora discussi; essa infatti potrebbe rappresentare un punto focale riguardante la manifestazione degli effetti tossici.

La sonicazione in bagno ad ultrasuoni fa in modo che le particelle, una volta disperse in acqua o mezzo di nutrizione algale, rimangono sospese in soluzione senza generare da subito aggregati che tendono a depositarsi sul fondo; grazie al bagno ad ultrasuoni la soluzione risulta omogenea e lattiginosa [Aruoja et al., 2009].

Hartmann et al., (2010) e Aruoja et al., (2009), disperdono le particelle nel mezzo di nutrizione e sonicano la soluzione, l'uno per 10 l'altro per 30 minuti, immediatamente prima di ogni

esperimento; i risultati ottenuti sono decisamente variabili e molto probabilmente influenzati da una o più delle caratteristiche precedentemente discusse, quali la dimensione e la composizione. Rispetto alla preparazione della soluzione stock proposta da Aruoja et al., (2009), disperdere in acqua distillata e aggiungere solventi stabilizzanti, a parità di dimensioni e composizione, sembrerebbe diminuire la tossicità delle ENPs di Diossido di Titanio [Xiong et al., 2011]. Contrariamente alla maggior parte degli autori citati in questa review, Warheit et al., (2007) disperde le particelle in acqua a 12°C senza procedere con il bagno ad ultrasuoni ma ottenendo valori di EC₅₀ relativamente simili a quelli di Aruoja et al., (2009).

Autore	Specie	NPs	Composizione	Dimensione (nm)	DLS (nm)	Area superficiale (m ² /g)	Zeta	Preparazione stocksolution	Metodo	Test	EC50
Warheit et al., 2007	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	TiO ₂	Puro al 99%	fini	380	5,8		diluire le nanoparticelle in acqua a 12,2 ± 0,1 °C	OECD 201	Acuto 72h	16 (12-22)mg/l
Warheit et al., 2007	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	TiO ₂	79% rutilio 21% anastasio	ultafini	140 ± 44	38,5		diluire le nanoparticelle in acqua a 12,2 ± 0,1 °C	OECD 201	Acuto 72h	21 (16-26)mg/l
Aruoja et al., 2009	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	TiO ₂	99,5% anastasio	25 - 70				disperdere nel mezzo di nutrizione algale e ultrasonicare per 30 minuti immediatamente prima di ogni esperimento	OECD 201	Acuto 72h	5,83 (3,75-7,58) mg/l
Hartmann et al., 2010	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	TiO ₂	67,2% anastasio, 32,8% amorfa	< 10	1261	288	-23	disperdere nel mezzo di nutrizione algale e sonicare per 10 minuti. Mantenere le sospensioni a 5°C al buio e risonicare immediatamente prima di ogni esperimento.	ISO 8692	Acuto 72h	241 (95,6-609) mg/l
Hartmann et al., 2010	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	TiO ₂	72,6% anastasio, 18,4% rutilio, 9% amorfa	30	416	47	-21	disperdere nel mezzo di nutrizione algale e sonicare per 10 minuti. Mantenere le sospensioni a 5°C al buio e risonicare immediatamente prima di ogni esperimento.	ISO 8692	Acuto 72h	71,1 (59,4-85,1) mg/l
Hartmann et al., 2010	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	TiO ₂	anastasio + amorfa	300	492	11,5	-25	disperdere nel mezzo di nutrizione algale e sonicare per 10 minuti. Mantenere le sospensioni a 5°C al buio e risonicare immediatamente prima di ogni esperimento.	ISO 8692	Acuto 72h	145 (112-188) mg/l
Hund-Rinke et al., 2010	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	TiO ₂	purezza > 90%	150		8		disperdere tramite agitazione e/o bagno ad ultrasuoni e filtrare	OECD 201	Acuto 72h	N.R.
Hund-Rinke et al., 2010	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	TiO ₂	purezza > 90%	8		250		disperdere tramite agitazione e/o bagno ad ultrasuoni e filtrare	OECD 201	Acuto 72h	65,8 mg/l
Griffitt et al., 2008	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	TiO ₂		20,5± 6,7	687,5		-25,1	disperdere in acqua Milli-Q e sonicare la soluzione con un sonicatore-sonda	ASTM	Acuto 96 h	N.R.
Blaise et al., 2008	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	TiO ₂	Puro al 99,9%	< 100					USEPA	Acuto 72 h	IC25 > 100 mg/l
Hall et al., 2009	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	TiO ₂	Puro al 99%	10				disperdere in acqua dura USEPA 2002a, agitare la soluzione con una barretta magnetica per 30	USEPA	Acuto 96 h	IC25 = 1-2 mg/l
Hund-Rinke et al., 2006	<i>Desmodesmus subspicatus</i>	TiO ₂	Anastasio	25				disperdere nel mezzo e sonicare con ultrasuoni; mantenere la soluzione in agitazione con una barretta magnetica e un agitatore durante l'incubazione.	ISO 6341, OECD	Acuto 72 h	44 mg/l (30-94)
Hund-Rinke et al., 2006	<i>Desmodesmus subspicatus</i>	TiO ₂	Anastasio	100				disperdere nel mezzo e sonicare con ultrasuoni; mantenere la soluzione in agitazione con una barretta magnetica e un agitatore drante l'incubazione.	202, DIN 38412-30.	Acuto 72 h	Non calcolabile
Wang et al., 2008	<i>C. reinhardtii</i>	TiO ₂	79% rutilio; 21% anastasio	21		50				Acuto 72 h	10 mg/l
Sadiq et al., 2011	<i>Scenedesmus sp.</i>	TiO ₂		<25	517	200-220		prima di ogni esperimento disperdere nel mezzo e sonicare per 30 minuti	OECD 1984	Acuto 72 h	21,2 mg/l
Sadiq et al., 2011	<i>Chlorella sp.</i>	TiO ₂		< 25		200-220		prima di ogni esperimento disperdere nel mezzo e sonicare per 30 minuti	OECD 1984	Acuto 72 h	16,1 mg/l
Jing Ji et al., 2010	<i>Chlorella sp.</i>	TiO ₂	Anastasio	05-ott	260	324	-21,6	sonicare per 30 minuti		Acuto 144 h	120 mg/l
Jing Ji et al., 2010	<i>Chlorella sp.</i>	TiO ₂	Rutilio	50	280	167	-33,8	sonicare per 30 minuti		Acuto 144 h	N.R.

Tab 6.1 Valori eco tossicologici per alghe esposte a n-TiO2

6.1.1.1 Elaborazione statistica dei risultati relativi a *Pseudokirchneriella Subcapitata*

Al fine di individuare quali variabili chimico-fisiche, tra quelle finora discusse, risultino influenzare maggiormente il valore di tossicità, è stata svolta una elaborazione statistica tramite il software Matlab [The MathWorks, Inc.2007] considerando i dati bibliografici relativi alla specie algale *Pseudokirchneriella Subcapitata* e che riportano il valore di tossicità espresso in EC₅₀.

Autore	Specie	NPs	Composizione	Dimensioni (nm)	Area superficiale (m ² /Kg)	DLS (nm)	Sonicazione (minuti)	EC50
Warheit et al., 2007	<i>Pseudokirchneriella Subcapitata</i>	TiO ₂	Puro al 99%	fini	5,8	380	0	16
Warheit et al., 2007	<i>Pseudokirchneriella Subcapitata</i>	TiO ₂	79% rutilio 21% anastasio	ultrafini	38,5	140	0	21
Aruoja et al., 2009	<i>Pseudokirchneriella Subcapitata</i>	TiO ₂	99,5% anastasio	25 - 70			30	5,83
Hartmann et al., 2010	<i>Pseudokirchneriella Subcapitata</i>	TiO ₂	67,2% anastasio, 32,8% amorfa	<10	288	1261	10	241
Hartmann et al., 2010	<i>Pseudokirchneriella Subcapitata</i>	TiO ₂	72,6% anastasio, 18,4% rutilio, 9% amorfa	30	47	416	10	71,1
Hartmann et al., 2010	<i>Pseudokirchneriella Subcapitata</i>	TiO ₂	anastasio + amorfa	300	11,5	492	10	145
Hund-Rinke et al., 2010	<i>Pseudokirchneriella Subcapitata</i>	TiO ₂	purezza > 90%	150	8		si	N.R.
Hund-Rinke et al., 2010	<i>Pseudokirchneriella Subcapitata</i>	TiO ₂	purezza > 90%	8	250		si	65,8
Griffitt et al., 2008	<i>Pseudokirchneriella Subcapitata</i>	TiO ₂		20,5		687,5	si	N.R.
Blaise et al., 2008	<i>Pseudokirchneriella Subcapitata</i>	TiO ₂	Puro al 99,9%	< 100				IC25 > 100 mg/l
Hall et al., 2009	<i>Pseudokirchneriella Subcapitata</i>	TiO ₂	Puro al 99%	10			0	IC25 = 1-2 mg/l

Tab 6.2 Dati bibliografici relativi a *Pseudokirchnerella Subcapitata* per l'elaborazione statistica

Come si può notare dalla tabella 6.2, gli autori non riportano nei loro articoli scientifici tutte le caratteristiche necessarie per delineare un quadro completo della specifica nano particella di Diossido di Titanio utilizzata nei loro saggi. Inoltre, dato lo scarso numero di osservazioni (casi studio), non è stato possibile colmare le informazioni mancanti con il valore mediato dai dati forniti dagli altri studi, perché statisticamente scorretto e per nulla significativo.

Pertanto l'analisi è stata condotta scegliendo due combinazioni di variabili (Tab 6.3), eliminando mano a mano gli studi che non riportavano le misure relative ai suddetti parametri.

	Variabile 1	Variabile 2	Variabile 3	Analisi di correlazione	Analisi di regressione
1°combinazione	% anastasio	dimensioni	minuti di sonicazione	v	v
2°combinazione	% anastasio	area superficiale	DLS	v	

Tab 6.3: Combinazioni di variabili per l'analisi statistica

Inizialmente è utile avere un'idea della relazione che esiste tra le variabili attraverso il calcolo del coefficiente di correlazione; in tabella 6.4 e 6.5 sono riportati i valori dei coefficienti di correlazione tra le variabili predittrici e il valore tossicologico Y.

1°combinazione	% anastasio	dimensioni	minuti di sonicazione	Y
% anastasio	1	0.73	0.92	0.00
dimensioni	0.73	1	0.43	-0.59
minuti di sonicazione	0.92	0.43	1	-0.24
Y	0.00	-0.59	-0.24	1

Tab 6.4 Coefficienti di correlazione tra le variabili della 1° combinazione

2°combinazione	% anastasio	area superficiale	DLS	Y
% anastasio	1	-0.04	0.27	0.07
area superficiale	-0.04	1	0.95	0.98
DLS	0.27	0.95	1	0.97
Y	0.07	0.98	0.97	1

Tab 6.5 Coefficienti di correlazione tra le variabili della 2° combinazione

I valori dei coefficienti mostrano che le correlazioni più forti sono quelle tra le variabili “area superficiale” e “DLS” (Tab 6.5) seguite da “minuti di sonicazione” e “% anastasio” (Tab 6.4). Allo stesso modo è evidente l’influenza che le variabili predittrici “area superficiale” e “DLS” esercitano sulla variabile Y (Tab 6.5).

Per quanto riguarda l’analisi di regressione lineare, è stata considerata solo la 1° combinazione di variabili in quanto l’unica ad avere osservazioni sufficienti per svolgere uno studio di regressione.

Inizialmente, per evidenziare il rapporto tra le variabili predittrici e la variabile risposta, si procede con la rappresentazione su grafico cartesiano delle osservazioni, così da risalire alla relazione matematica più evidente (es: l’andamento parabolico delle osservazioni descrive una proporzionalità quadratica).

Dopodichè si prosegue con l’analisi di regressione, tenendo conto della dipendenza quadratica di alcune delle variabili. Il modello considerato è quindi:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1^2 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3^2 \quad (\text{eq.15})$$

La stima dei coefficienti $\beta_0, \beta_1, \beta_2$ e β_3 si ottiene mediante la risoluzione di un problema ai minimi quadrati lineari [Hall P., Johnson R.A., Wichern D.W., 2002]. Mediante il software Matlab si ottengono le seguenti stime:

- Vettore Beta: è la stima corretta di ogni parametro β del modello (eq.15) e descrive quanto ogni variabile predittrice influenzi la variabile risposta.
- Intervalli di confidenza per ciascuna variabile.
- R^2 : coefficiente di determinazione (descrive la bontà del modello e assume valori tra 0 e 1).

Di seguito si riportano i parametri in uscita dalla funzione di regressione lineare svolta sulle variabili della 1° combinazione.

<u>Coeff.determinazione R^2</u>	Stima	Intervallo di confidenza inf.	Intervallo di confidenza sup.
<u>9.582649E-001</u>			
β_0	6.3482E+002	-4.2245E+003	5.4942E+003
β_1	-8.9283E-002	-1.0396E+000	8.6107E-001
β_2	-5.6544E+000	-5.0646E+001	3.9337E+001
β_3	5.7087E-001	-7.1150E+000	8.2568E+000

Tab 6.6 Valori dei parametri di regressione

Il coefficiente di determinazione R^2 è pari circa a 0,96 (Tab 6.6) dal quale è possibile affermare che il modello risulta decisamente accettabile e che, nonostante si tratti di un'analisi statistica svolta su un numero esiguo di osservazioni, le tre variabili "percentuale di anastasio", "dimensioni" e "minuti di sonicazione" influenzano significativamente l'esito dell'EC₅₀.

6.1.2 Review bibliografica: valori eco tossicologici per crostacei esposti a n-TiO₂

Come già accennato per le alghe unicellulari, anche per i crostacei non è stata ancora individuata una chiara relazione tra le caratteristiche delle nano particelle di Diossido di Titanio e gli effetti eco tossicologici (Tab 6.7) [Menard et al., 2011].

Salieri et al., (2011) propone in letteratura tre differenti saggi eco tossicologici su *Daphnia Magna* utilizzando nanoparticelle di Diossido di Titanio di dimensioni pari 18 nm e composte per il 96% da anastasio. Nonostante vengano mantenute le stesse condizioni, sia di laboratorio sia di operatore, dopo 96 ore di incubazione, i risultati ottenuti dai primi due saggi sono molto simili in quanto

descritti da valori di EC₅₀ pari a 32 e 33 mg/L, ma il terzo si discosta notevolmente dai precedenti in quanto mostra un valore di EC₅₀ pari a 82 mg/L.

I risultati ottenuti da Salieri et al., (2011) nei primi due saggi sono in accordo con quelli ricavati da Zhu et al., (2009), i quali utilizzano n-TiO₂ molto simili in termini di composizione (99,5% anastasio) e dimensioni (< 20 nm) ed ottengono per *Daphnia Magna* un valore di EC₅₀ pari a 35,3 mg/L. Utilizzando un'altra tipologia di nanoparticelle (composizione: 80% anastasio; dimensioni: 21 nm), dopo 72 ore di incubazione, i risultati di Zhu et al., (2010) sono decisamente differenti in quanto l'EC₅₀ ottenuta vale 1,62 mg/L.

A mio avviso la diversità nei risultati tra Zhu et al., (2009) e Zhu et al., (2010) potrebbe essere attribuita alle diverse pratiche di laboratorio dato che gli studi svolti nel 2009, a differenza di quelli del 2010, non prevedono la sonicazione della soluzione stock. Una volta sonicata, la sospensione diventa omogenea, torbida e senza particelle sedimentate sul fondo; il bagno ad ultrasuoni risulterebbe quindi una metodica efficace per rompere gli aggregati di nanoparticelle e mantenere le ENPs in forma libera e più reattiva [Aruoja et al., 2009].

Altri valori di EC₅₀ trovati in letteratura e relativi a *Daphnia Magna*, sono quelli proposti da Dabrunz et al., (2011) i quali utilizzano n-TiO₂ molto piccole (6 nm) e composte al 100% da anastasio. Gli autori propongono un' EC₅₀ pari a 3,8 mg/L dopo un'esposizione di 72 ore, e un' EC₅₀ pari a 0,73 mg/L dopo 96 ore. Viste le considerazioni fatte nel paragrafo precedente relativo ai valori tossicologici riscontrati nelle alghe unicellulari esposte a ENPs di Diossido di Titanio (6.1.1), le piccole dimensioni [Blaise et al., 2008; Hall et al., 2009; Hund-Rinke et Simon, 2006] e l'elevata percentuale di anastasio [Warheit et al., 2007; Aruoja et al., 2009; Hartmann et al., 2010] sembrerebbero delle caratteristiche influenti sull'entità degli effetti tossici. A mio parere, dato che la sonicazione non è prevista da questi saggi, le dimensioni e la composizione delle ENPs utilizzate da Dabrunz et al., (2011) potrebbero essere le vere responsabili dei valori di EC₅₀ ottenuti.

In letteratura non sono presenti altri valori tossicologici espressi in EC₅₀, se non i risultati ottenuti da Warheit et al., (2007) e Wiench et al., (2009) che ottengono valori superiori alla loro maggior concentrazione testata (EC₅₀ > 100 mg/L). Sebbene i risultati siano li stessi, le caratteristiche delle n-TiO₂ saggiate sono differenti; i saggi di Warheit et al., (2007) non prevedono la sonicazione durante la preparazione della stock ed utilizzano ENPs fini (99% anastasio) e ultrafini (21% anastasio), mentre Wiench et al., (2009) adopera ENPs da 20-30 nm, composte per il 70% da anastasio e sonicate ogni qualvolta venga preparata la soluzione stock.

Un altro valore indefinito perchè maggiore della massima concentrazione testata è quello di Heinlaan et al., (2008), i quali propongono un'EC₅₀ pari a 20000 mg/L. Lee et al., (2009), Hund-Rinke et Simon., (2006) e Strigul et al., (2009), trascorse le 48 ore di incubazione, non riescono a determinare nessun valore tossicologico.

Altri effetti tossici riscontrati in *Daphnia Magna* sono quantificati in termini di LC₅₀. Gli studi condotti da Zhu et al., (2010), utilizzando nanoparticelle composte per l'80% da anastasio e di dimensioni pari a 21 nm, mostrano un valore di LC₅₀ pari a 2 mg/L dopo 72 ore di incubazione, > 100 mg/L dopo 48 ore. Dopo 48 ore di incubazione, i saggi condotti con n-TiO₂ da 7,5 nm e composizione non nota, determinano un valore di LC₅₀ pari a 16 mg/L [Garcia et al., 2010], mentre con n-TiO₂ composte per il 70% da anastasio e di dimensioni < 40 nm, non è possibile definire una LC₅₀ [Kim et al., 2010]. Infine Zhu et al., (2009), utilizzando nanoparticelle composte per il 99,5% da anastasio e di dimensioni < 20 nm, propongono un valore di LC₅₀ pari a 143,4 mg/L.

Dai valori di LC₅₀ ed EC₅₀ elencati sopra, sembrerebbe che la durata dei saggi incida sui risultati; spesso dopo saggi condotti alle 48 ore il valore di tossicità non viene determinato [Strigul et al., 2009; Hund-Rinkie et Simon, 2006; Kim et al., 2010] oppure, se confrontato con saggi condotti alle stesse condizioni ma con tempi di incubazione più lunghi, risulta decisamente maggiore [Zhu et al., 2010; Dabrunz et al., 2011]. Analoghe conclusioni sono tratte dai risultati di Griffitt et al., (2008) dopo test ecotossicologici condotti alle 48 ore su *Daphnia Pulex* e *Ceriodaphnia dubia*; gli autori utilizzano n-TiO₂ da 20 nm e costituite per l'80% da anastasio ma non ottengono risultati definiti (LC₅₀ > 10 mg/L).

La ragione di tale apparente dipendenza dal tempo potrebbe essere che, in tempi relativamente brevi, le n-TiO₂ non riescono a manifestare il loro vero potenziale tossico ma, vista la scarsità e la variabilità dei risultati, i dati non sono sufficienti per dimostrarlo. Contrariamente ai risultati di Griffitt et al., (2008), Strigul et al., (2009), Hund-Rinkie et Simon, (2006), Kim et al., (2010), Zhu et al., (2010) e Dabrunz et al., (2011), i test eco tossicologici condotti da Hall et al., (2009) su *Daphnia Pulex* e *Ceriodaphnia dubia* esposte per 48 ore a n-TiO₂ (composizione: 99% anastasio; dimensioni: 10 nm) propongono valori di LC₅₀ pari a 7,6 mg/L e 9,2 mg/L.

Autore	Specie	NPs	Composizione	Dimensioni (nm)	Area superficiale (m ² /g)	Dimensione DLS (nm)	Preparazione soluzione stock	Metodo	Test	Valore ecotossicologico
Lavern et al., 2006	<i>Daphnia magna</i>	TiO ₂		10_20			sonicare con aggiunta di THF solventi + filtrare		test acuto 48-h endpoint:mortalità	Filtrato: LC ₅₀ 5,5 ppm. Sonicato: LC50 N.R.
Hund-Rinke et al., 2006	<i>Daphnia magna</i>	TiO ₂	100% Anastasio	25 - 100			disperdere nel mezzo attraverso bagno ad ultrasuoni e miscelare continuamente con barretta magnetica illuminare con luce solare artificiale (300-800 nm).	ISO 6341, OECD 202, DIN 38412-30.	test acuto 48-h endpoint:immobilizzazione	N.R.
Heinlaan et al., 2008	<i>Daphnia magna</i>	TiO ₂		25-70			Diserdere in acqua-Milliq e sonicare	Daphtoxkit(1996)	Acute test 48-h Endpoint: immobilizzazione	EC ₅₀ > 20000 mg/l
Lee et al., 2009	<i>Daphnia magna</i>	TiO ₂		7 -20	300,81 - 66.604		preparare e poi disperdere nel mezzo per 15 min con un sonicatore	(OECD, 1984, 1998)	test non acuto; Endpoint:Mortalità, inibizione alla crescita	EC50 N.R.
Stigul et al., 2009	<i>Daphnia magna</i>	TiO ₂		6			N.R.	Daphtoxkit OECD 202	test acuto 48-h Endpoint: mortalità	LD ₅₀ non raggiunto
Wiench et al., 2009	<i>Daphnia magna</i>	TiO ₂	70% anastasio 30%rutilio	20-30	48,6		disperdere nel mezzo, sonicare.	Acute test:OECD 202.	Acuto 48 h Endpoint: immobilizzazione	EC ₅₀ > 100 mg/l
Zhu et al., 2009	<i>Daphnia magna</i>	TiO ₂	99,5% anastasio	< 20			disperdere in acqua ricostituita (OECD 202) e mantenere in agitazione	Acute test:OECD 202.	Endpoint: immobilizzazione, mortalità	EC ₅₀ = 35.306 mg/l (95%CI: 25.627-48.928), LC50=143.387 mg/l
Garcia et al., 2010	<i>Daphnia magna</i>	TiO ₂		7,5	\		Decomposizione di (TiCl ₄) a pH=5. La cristallizzazione avviene a 70 °C e la purificazione tramite	OECD 202	Acute test 48-h; Endpoint: immobilizzazione	LC ₅₀ = 16 mg/l
Kim et al., 2010	<i>Daphnia magna</i>	TiO ₂	anastasio 70%, rutilio 30%	<40			disperdere in acqua (pH=2). La soluzione va moderatamente diluita in acqua dura	U.S. EPA method (US EPA, 1993)	Test acuto 48-h; Endpoint: mortality Test cronico 21-gg. Endpoint riproduzione	LC ₅₀ impossibile da calcolare
Zhu et al., 2010	<i>Daphnia magna</i>	TiO ₂ (P25)	20% rutilio 80%anastasio	21	50		disperdere in acqua Millipore e sonicare per 30 min; la soluzione stock va preparata immediatamente prima dell'uso e diluita con il mezzo	OECD 202	test acuto:72-h. Endpoint: immobilizzazione e mortalità test cronico (OECD 204) :21-gg. Endpoint: sopravvissuti	Acuto: LC50(48-h) >100 mg/l; EC50 (72-h)= 1,62 mg/L. LC50 (72-h)= 2,02 mg/L. Cronico: EC50 0,46 mg/l LC50 2,62 mg/l
Dabrunz et al., 2011	<i>Daphnia magna</i>	TiO ₂	anastasio puro	6	230		sospendere grazie a stirred media milling	OECD 202	test acuto Endpoint: immobilizzazione	Acuto 72-h EC50 =3,8 mg/L; Acuto 96-h EC50= 0.73 mg/L
Salieri et al., 2011	<i>Daphnia magna</i>	TiO ₂	96% anastasio 4%rutilio	18	68,81			OECD 202	test acuto (96-h) Endpoint immobilizzazione	EC50 = 32 mg/L
Salieri et al., 2011	<i>Daphnia magna</i>	TiO ₂	96% anastasio 4%rutilio	18	68,81			OECD 202	test acuto (96-h) Endpoint immobilizzazione	EC50= 33 mg/L
Salieri et al., 2011	<i>Daphnia magna</i>	TiO ₂	96% anastasio 4%rutilio	18	68,81			OECD 202	test acuto (96-h) Endpoint immobilizzazione	EC50= 82 mg/L
Warheit et al., 2007	<i>Daphnia magna</i>	TiO ₂	99% anastasio	fini	5,8	380	diluire le nanoparticelle in acqua a 12,2 ± 0,1 °C	OECD 201	test acuto (48-h); Endpoint immobilizzazione	EC50 >100 mg/L
Warheit et al., 2007	<i>Daphnia magna</i>	TiO ₂	21% anastasio 79% rutilio	ultrafini	38,5	140	diluire le nanoparticelle in acqua a 12,2 ± 0,1 °C	OECD 201	test acuto (48-h); Endpoint immobilizzazione	EC50 >100 mg/L
Hall et al., 2009	<i>Daphnia pulex</i>	TiO ₂	99% anastasio	10			disperdere in acqua dura USEPA 2002a, agitare la soluzione con una barretta magnetica per 30 minuti e mantenere poi l'omogeneità grazie ad un agitatore.	U.S. EPA (2002 a,b)	test acute(48-h) Endpoint:Mortalità	LC50= 6.5 mg/l and 13.0 mg/l Media geometrica 7.6 mg/l
Hall et al., 2009	<i>C. dubia</i>	TiO ₂	99% anastasio	10			disperdere in acqua dura USEPA 2002a, agitare la soluzione con una barretta magnetica per 30 minuti e mantenere poi l'omogeneità grazie ad un agitatore.	U.S. EPA (2002 a,b)	test acuto (48-h) e cronico (96-h); Endpoint riproduzione	LC50 (acuto) 3.0-13.4-11.0-3.6-15.9 (3.0-16 mg/l) Media geometrica 9.2; IC25 (cronico)=2.5-9.4-26.4 mg/l
Griffitt et al., 2008	<i>C. dubia</i>	TiO ₂	80% anastasio 20%rutilio	20	45,41	687,5	sospendere in acqua Milli-Q e sonicare con un sonicatore sonda	ASTM	test statico(48-h); Endpoint:mortalità e immobilizzazione	LC50 > 10
Griffitt et al., 2008	<i>Daphnia pulex</i>	TiO ₂	80% anastasio 20%rutilio	20	45,41	687,5	sospendere in acqua Milli-Q e sonicare con un sonicatore sonda	ASTM	test statico(48-h); Endpoint:mortalità	LC50 > 10

Tab 6.7: Valori eco tossicologici per crostacei esposti a n-TiO₂

6.1.3 Review bibliografica: valori eco tossicologici per pesci esposti a n-TiO₂

E' necessario segnalare che, a differenza dei test di tossicità svolti sui produttori primari (alghe) e sui consumatori primari (crostacei), gli studi di ecotossicità sui pesci sono maggiormente volti a individuare effetti subletali indotti da n-TiO₂, come ad esempio stress ossidativo e fisiologico, bioaccumulo e patologie (Tab 6.9). In questa review, per garantire una certa uniformità dei dati e per soddisfare i criteri proposti dal modello USEtox, vengono inizialmente presi in considerazione solo i saggi che riportano i valori di LC₅₀, gli unici necessari al calcolo del Fattore di Effetto (Tab 6.8).

Allo stato attuale sembra valido affermare che gli endpoint di mortalità, così come quelli di inibizione alla crescita, siano dipendenti dalla dose e dal tempo [Chen et al., 2011].

L'assorbimento di nanoparticelle e nanomateriali da parte dei pesci avviene tramite endocitosi delle cellule epiteliali oppure adsorbimento branchiale; la distribuzione interessa soprattutto i tessuti delle branchie, dell'intestino, del fegato e del cervello e l'escrezione avviene attraverso la bile epatica [Handy et al., 2008].

Zhu et al., (2008) e Xiong et al., (2011) conducono studi di tossicità acuta a 96 ore su *Danio Rerio*; le nanoparticelle utilizzate hanno le stesse caratteristiche (pure al 99% ; dimensioni 10-20 nm) ma le differenze tra i risultati ottenuti sono notevoli in quanto il primo studio dichiara la non tossicità del composto, mentre il secondo attribuisce alle n-TiO₂ una LC₅₀ pari a 124,5 mg/L. Ciò può essere associato alla grande variabilità che contraddistingue la risposta biologica a questa specifica tipologia di materiale, ma i dati sono insufficienti per dimostrarlo.

Studi analoghi condotti da Griffitt et al., (2008), ma con tempo di esposizione pari a 48 ore, confermano che la tossicità delle ENPs di TiO₂ non sia particolarmente elevata perché induce su *Danio Rerio* una LC₅₀ maggiore della massima concentrazione testata nel saggio (LC₅₀ > 10 mg/L). Tale studio è in accordo con Warheit et al., (2007) e Hall et al., (2009) i quali riportano valori di LC₅₀ acuta a 96 ore maggiori della concentrazione più alta testata dai loro esperimenti condotti rispettivamente con *Pimephales Promelas* (LC₅₀ > 1000 mg/L) e *Onchorhynchus mykiss* (LC₅₀ > 100 mg/L). A fronte di tali risultati si può solo affermare che non ci sono ancora dati confrontabili a sufficienza per poter individuare quali caratteristiche delle ENPs di TiO₂ risultino essere potenziali fattori di tossicità.

Come già detto la letteratura propone una elevata variabilità di endpoint biologici diversi dalla mortalità, ad esempio il potenziale tossico delle nanoparticelle di Diossido di Titanio viene studiato analizzando gli effetti citotossici e genotossici. I test di tossicità acuta condotti da Vevers et al.,

(2008) e Reeves et al., (2008), rispettivamente su *Onchorhynchus mykiss* e *Carassius auratus*, individuano una proporzionalità diretta tra la concentrazione testata e la risposta ma una relazione inversa tra la durata dell'esposizione e la risposta. Particolare attenzione è posta all'effetto della luce UV, noto attivatore di agenti ossidanti quindi foto attivatore di nanoparticelle: i danni ossidativi sui campioni biologici esposti a luce ultravioletta sono decisamente significativi e di entità maggiore rispetto ai campioni non esposti [Vevers et al., 2008; Reeves et al., 2008].

Altri studi descrivono saggi di tossicità cronica svolti con lo scopo di individuare eventuali anomalie da stress ossidativo e/o fisiologico evidenziate dall'attività alterata di specifici enzimi (es: Na⁺K⁺ATPasi, GSH, T-BARS).

Federici et al., (2007) valutano sulla specie *Onchorhynchus mykiss* i valori di Na⁺K⁺ATPasi; lo studio evidenzia un'inibizione della sua attività nei tessuti delle branchie, del cervello e dell'intestino esposti a ENPs di TiO₂. Altri autori riportano un' inibizione del 50% ma solo nei tessuti cerebrali [Ramsden et al., 2009]. Per quanto riguarda la valutazione del potenziale ossidante, Federici et al., (2007) e Ramsden et al., (2009) analizzano il quantitativo di enzimi, come il glutathione GSH, e le T-BARS (sostanze reattive dell'acido tiobarbiturico), sottoprodotti della perossidazione lipidica quindi associate alla produzione di ROS. I risultati mostrano che la concentrazione delle T-BARS tende a diminuire o rimanere inalterata, quella del GSH aumenta [Federici et al., 2007; Ramsden et al., 2009]. Anche l'alterazione della concentrazione di elementi come Zn e Cu rappresenta una variazione dell'equilibrio fisiologico, riscontrata soprattutto nei tessuti del cervello, mentre l'analisi dell'ematocrito non ha mai riportato effetti significativi per nessun tipo di tessuto [Federici et al., 2007; Ramsden et al., 2009; Smith et al., 2007]. Finora sono stati descritti effetti sub letali associati ad un tempo di esposizione di 14 o 10 giorni; secondo Federici et al., (2007) dopo otto settimane tali effetti negativi tendono a diminuire lasciando spazio all'insorgere di patologie.

Le patologie rappresentano uno degli effetti da monitorare nel lungo periodo; sia nanoparticelle di Diossido di Titanio sia SWCNT sembrano indurre patologie più o meno evidenti nel cervello, nel fegato e nell'intestino e ben più marcate nelle branchie (es: endema e inspessimento lamellare). I tessuti brachiali risultano essere quelli più sensibili per quanto riguarda la formazione di lesioni e l'insorgere di patologie a seguito di esposizione cronica o sub cronica di nanoparticelle di Diossido di Titanio [Chen et al., 2011; Hao et al., 2009].

L'accumulo di ENPs nell'organismo è un altro effetto valutabile con test di tossicità cronica in tempi relativamente lunghi. L'accumulo interessa i tessuti dell'intestino, del cervello, delle branchie e del fegato, per i quali sembra esser individuata una relazione dose dipendente

[Ramsden et al., 2009]; solo per le branchie il tempo incide proporzionalmente sull'accumulo in quanto, in caso di esposizione troppo prolungata, posso subentrare lesioni [Chen et al., 2011].

Gli effetti ossidanti sono stati analizzati anche in altre specie ittiche quali *Cyprinus carpio* e *Danio Rerio*, rispettivamente vengono presi in considerazione enzimi quali SOD, CAT, POD e LPO. I primi tre inibiscono la loro attività nei tessuti branchiali, epatici, cerebrali e intestinali proporzionalmente alla concentrazione di nanoparticelle in soluzione, al contrario l'enzima LPO tende ad aumentare [Hao et al., 2009]. Versione contrastante del comportamento del SOD è data dagli studi condotti da Xiong et al., (2011) che individuano alterazioni enzimatiche significative solo nei tessuti epatici, dove diminuisce, e intestinali, dove invece aumenta; gli stessi autori individuano 50 mg/L come la concentrazione minima necessaria alla formazione di radicali ossidril.

Sulla specie *Pimephales Promelas*, invece, Xiong et al., (2011) hanno svolto un test di tossicità cronico di durata 7 giorni determinando come endpoint l'inibizione alla crescita al 25% (IC₂₅) pari a 342 -597 mg/L. Un altro endpoint senza possibilità di confronto in letteratura è il valore di TEC (NOEC*LOEC^½) su *Onchorhynchus mykiss* ottenuto dai test di tossicità acuta a 48h e pari a 1-10 mg/L [Blaise et al., 2008].

Autore	Specie	Composizione	Dimensione (nm)	DLS (nm)	Area superficiale (m ² /g)	Zeta	Preparazione stocksolution	Metodo	Test	LC50
Hall et al., 2009	<i>Pimephales Promelas</i>	Puro al 99%	10				disperdere in acqua dura USEPA 2002a, agitare la soluzione con una barretta magnetica per 30 minuti e mantenere poi l'omogeneità grazie ad un agitatore.	USEPA	Acuto 96h	> 1000mg/l
Warheit et al., 2007	<i>Onchorhynchus mykiss</i>	99% anastasio	fini	380	5,8		diluire le nanoparticelle in acqua a 12,2 ± 0,1 °C	OECD 201	Acuto 96h	> 100mg/l
Warheit et al., 2007	<i>Onchorhynchus mykiss</i>	21% anastasio 79% rutilio	ultrafini	140	38,5		diluire le nanoparticelle in acqua a 12,2 ± 0,1 °C	OECD 201	Acuto 96h	> 100mg/l
Zhu et al., 2008	Larve di <i>Danio Rerio</i>	99,5% anastasio	20	100-550			disperdere in acqua MilliQ (a temperature di 26±1 °C) e ultrasonicare la soluzione per almeno mezz'ora		Acuto 96h	No tossico
Griffitt et al., 2008	<i>Danio Rerio</i>		20,5± 6,7	687,5		-25,1	disperdere in acqua MilliQ e sonicare la soluzione con un sonicatore-sonda	ASTM	Acuto 48 h	> 10 mg/l
Xiong et al., 2011	<i>Danio Rerio</i>	99,% anastasio	20-70	16-157		-13,1	disperdere in acqua distillata e sonicare la soluzione per 20 minuti aggiungendo solventi stabilizzanti		Acuto 96h	124,5 mg/l

Tab 6.8: Valori eco tossicologici (LC₅₀) per pesci esposti a n-TiO₂

Autore	Specie	NPs	Composizione	Dimensione (nm)	DLS (nm)	Area superficiale (m ² /g)	Zeta	Preparazione soluzione/stock	Metodo	Test	Effetti	Endpoint					
Reeves et al., 2007	<i>Carassius auratus</i>	TiO ₂		< 100						Acuto 2-24h	Cito e genotossici	Effetti genotossici: Test cometa FPG (ossidazione basi) ESR (formazione radicali OH) Effetti citotossici: NBE (integrità lisosomiale)	senza UV danni indotti dipendente significativi	con UV danni dipendente significativi	senza UV danni indotti dipendente significativi	con UV danni dipendente significativi	
Vevers et al., 2008	<i>Onchorhynchus mykiss</i>	TiO ₂	75% rutilio 25% anastasio	1-100				dispersere in acqua distillata e sonificare per 12 ore, infine centrifugare		Acuto 4-24-48 h	Cito e genotossici	Effetti genotossici: Test cometa FPG (ossidazione basi) Test MN (danno citogenetico) Elettroforesi SCGt Effetti citotossici: NBE (integrità lisosomiale)	senza UV danni non significativi e nulli oltre le ore del test oltre le ore del test dose dipendente	con UV danni maggiore e significativa oltre le ore del test dose dipendente	senza UV danni non significativi e nulli oltre le ore del test oltre le ore del test dose dipendente	con UV danni maggiore e significativa oltre le ore del test dose dipendente	
Blaise et al., 2008	<i>Onchorhynchus mykiss</i>	TiO ₂	99,9% anastasio	< 100					USEPA	Acuto 48 h	TEC: 1-10 mg/l						
Federici et al., 2007	<i>Onchorhynchus mykiss</i>	TiO ₂	75% rutilio, 25% anastasio	21 (24,1 ± 2,8)	160±24	50 ± 15		dispersere in acqua Millipore e sonicare la soluzione per 6 ore		Cronico 14 gg	Subletali	Effetti subletali: Effetti fisiologici (Na+K-ATPasi) Stress ossidativo (TBARS) Stress ossidativo (glutazione GSH) Analisi ioni (Cu e Zn) Patologie	branchie <	cervello <	intestino <	fegato <	
Smith et al., 2007	<i>Onchorhynchus mykiss</i>	TiO ₂	96,3% carbonio	1,1 diametro				dispersere in una soluzione di solventi SDS e sonicare per 2 ore		Cronico 10 gg	Subletali	Effetti subletali: Effetti fisiologici (Na+K-ATPasi) Stress ossidativo (TBARS) Stress ossidativo (glutazione GSH) Analisi ioni (Cu e Zn) Patologie	branchie >	cervello <	intestino >	fegato >	
Hao et al., 2009	<i>Cyprinus carpio</i>	TiO ₂	Rutilio 98%	50		30 ± 10		bagno di sonicazione per mezz'ora		Cronico 8 gg	Subletali	Inzimi antiossidanti: SOD CAT POD LPO lesioni	branchie <	cervello <	fegato <	< il più < sensibile < >	
Xiong et al., 2011	<i>Danio Rerio</i>	TiO ₂	99,9% anastasio	20-70			-13,1	dispersere in acqua distillata e sonificare la soluzione per 20 minuti aggiungendo solventi stabilizzanti		Cronico	Subletali (50 mg/l)	Effetti subletali: Generazione OH Stress ossidativo (SOD)	50 mg/l TiO ₂ → 1,77 mmol/l OH	> intestino < fegato			
Hall et al., 2009	<i>Pimephales Promelas</i>	TiO ₂	Puro al 99%	10				dispersere in acqua dura USEPA 2002a, agitare la	USEPA	Cronico 7 gg	IC25%: 342 -597 mg/l						
Ramsden et al., 2009	<i>Onchorhynchus mykiss</i>	TiO ₂	75% anastasio 25% rutilio	21 (24,1 ± 2,8)		50 ± 15		dispersere in acqua Millipore e sonificare per 6 ore		Cronico	Accumulo	Effetti subletali: Effetti fisiologici (Na+K-ATPasi) Stress ossidativo (TBARS) Accumulo Analisi ioni (Cu e Zn)	branchie <	cervello inibizione 50%	intestino <	fegato <	
Chen et al., 2010		TiO ₂								Cronico e acuto	Vari	Mortalità Inibizione alla crescita Accumulo lesioni	Dose e tempo dipendente dose e tempo dipendente nelle branchie, dose dipendente nel fegato branchie, meno significative in fegato cuore e cervello				
Shaw et al.,		TiO ₂									Subletali	Effetti subletali: Effetti fisiologici (Na+K-ATPasi) Stress ossidativo (glutazione GSH) Analisi ioni Effetti acuti	branchie cervello intestino fegato effetti subletali più significativi rispetto quelli da metalli disciolti da metalli disciolti effetti acuti non significativi rispetto quelli da metalli disciolti				

Tab 6.9 Valori eco tossicologici (effetti subletali) per pesci esposti a n-TiO

6.2 Valutazione del Fattore di Effetto per n-TiO₂

Come già descritto nei paragrafi precedenti, il valore del Fattore di Effetto è calcolato come rapporto tra 0,5 e la media geometrica tra i valori di EC₅₀ stimati sulle specie rappresentative dei tre livelli trofici (alghe, crostacei, pesci):

$$EF = \frac{0,5 (PAF)}{HC_{50}} \quad (\text{eq.6})$$

La ricerca bibliografica ha dimostrato che i valori eco tossicologici relativi agli effetti indotti da nanoparticelle di Diossido di Titanio non siano facilmente confrontabili perché soggetti ad elevata variabilità, sia per quanto riguarda la scelta dell'endpoint sia per la modalità con cui viene condotto il saggio.

In questo studio l'HC₅₀ viene calcolato utilizzando alcuni dei valori presenti nelle tabelle riassuntive Tab 6.1, 6.7, 6.8 escludendo i risultati espressi come "valori EC₅₀ o LC₅₀ > concentrazione più alta saggiata" perché trattasi di valori non precisati. Come richiesto dal modello USEtox la media geometrica è condotta a livello di specie; in questa tesi, oltre alle specie richieste dallo USEtox, vengono considerate anche *Pseudokirchneriella Subcapitata*, *C.Reinhardtii*, *Chlorella Sp.* e *Scenedesmus Sp.*

Come mostrato in tabella 6.10, oltre ai valori trovati in letteratura, sono inseriti nei calcoli anche i risultati ottenuti dai nostri saggi eco tossicologici su *Pseudokirchneriella Subcapitata*.

Autore	Specie	Valore tossicologico	Valore	Media Geometrica	HC50- acuto
Warheit et al., 2007	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	EC50 = 16 (12-22)mg/L	16	23,8	20,36
Warheit et al., 2007	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	EC50 = 21 (16-26)mg/L	21		
Aruoja et al., 2009	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	EC50 = 5,83 (3,75-7,58) mg/L	5,83		
Hartmann et al., 2010	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	EC50 = 241 (95,6-609) mg/L	241		
Hartmann et al., 2010	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	EC50 = 71,1 (59,4-85,1) mg/L	71,1		
Hartmann et al., 2010	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	EC50 = 145 (112-188) mg/L	145		
Hund-Rinke et al., 2010	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	EC50 = 65,8 mg/L	65,8		
TOMASSINI ET AL., 2013	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	EC50 = 3,67 mg/L (I.C.95% 2,16-6,24).	3,67		

TOMASSINI ET AL., 2013	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	EC50 = 2,09 mg/L (I.C.95% 1,45-2,99)	2,09		
Hund-Rinke et al., 2006	<i>Desmodesmus subspicatus</i>	EC50 = 44 mg/L	44	44	
Wang et al., 2008	<i>C. reinhardtii</i>	EC50 = 10 mg/L	10	10	
Sadiq et al., 2011	<i>Scenedesmus sp.</i>	EC50 = 21,2 mg/L	21,2	21,2	
Sadiq et al., 2011	<i>Chlorella sp.</i>	EC50 = 16,1 mg/L	16,1	44,0	
Jing Ji 2010	<i>Chlorella sp.</i>	EC50 = 120 mg/L	120		
Heinlaan et al., 2008	<i>Daphnia magna</i>	EC ₅₀ > 20000 mg/L	-	7,1	
Wiench et al., 2009	<i>Daphnia magna</i>	EC ₅₀ > 100 mg/l	-		
Zhu et al., 2009	<i>Daphnia magna</i>	EC ₅₀ = 35.306 mg/L	35,3		
Zhu et al., 2010	<i>Daphnia magna</i>	EC50 = 1.62 mg/L	1,62		
Zhu et al., 2010	<i>Daphnia magna</i>	EC50 = 0.46 mg/L	0,46		
Dabrunz et al., 2011	<i>Daphnia magna</i>	EC50 = 3,8 mg/L	3,8		
Dabrunz et al., 2011	<i>Daphnia magna</i>	EC50 = 0.73 mg/L	0,73		
Salieri et al., 2011	<i>Daphnia magna</i>	EC50 = 32 mg/L	32		
Salieri et al., 2011	<i>Daphnia magna</i>	EC50 = 33 mg/L	33		
Warheit et al 2007	<i>Daphnia magna</i>	EC50 > 100mg/L	-		
Warheit et al 2008	<i>Daphnia magna</i>	EC50 > 100mg/L	-		
Salieri et al., 2011	<i>Daphnia magna</i>	EC50 = 82 mg/L	82		
Hall et al., 2009	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	LC50 = 7,6 mg/L	7,6		7,6
Griffitt et al., 2008	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	LC50 > 10 mg/L	-		
Hall et al., 2009	<i>Daphnia pulex</i>	LC50 = 9,2 mg/L	9,2	9,2	
Griffitt et al., 2008	<i>Daphnia pulex</i>	LC50 > 10 mg/L	-		
Hall et al., 2009	<i>Pimephales Promelas</i>	LC50 > 1000mg/L	-	-	
Warheit et al., 2007	<i>Onchorhynchus mykiss</i>	LC50 > 100mg/L	-	-	
Warheit et al., 2008	<i>Onchorhynchus mykiss</i>	LC50 > 100mg/L	-		

Griffit et al., 2008	<i>Danio Rerio</i>	LC50 > 10 mg/L	-	124,5	
Xiong et al., 2011	<i>Danio Rerio</i>	LC50= 124,5 mg/L	124,5		

Tab 6.10 Calcolo dell' $HC_{50-acuto}$

Il valore di $HC_{50-acuto}$ è pari a 20,36 ed è stato calcolato utilizzando i valori di EC_{50} ed LC_{50} relativi ad endpoint di mortalità o inibizione alla crescita ottenuti da saggi di tossicità acuti. Dato che il modello USEtox predilige test cronici, l' $HC_{50-acuto}$ ottenuto sopra viene convenzionalmente diviso per il valore di "Assessment Factor" pari a 2.

$$HC_{50-cronico} = \frac{HC_{50-acuto}}{Assessment\ Factor} = \frac{20,36\ mg/l}{2} = 10,18\ mg/L \quad (eq.16)$$

Si procede con il calcolo dell'Effect Factor utilizzando la formula citata sopra:

$$EF = \frac{0,5\ (PAF)}{HC_{50-cronico}} = \frac{0,5\ (PAF)}{10,18\ (mg/L)} = 49,11\ \frac{m^3}{Kg}\ PAF \quad (eq.6)$$

Il valore di EF proposto nell'ambito di questa tesi è stato calcolato su valori di EC_{50} e LC_{50} a livello di specie. E' bene notare che a fronte dell'alta variabilità dei valori riportati in letteratura, la scelta obbligata di escludere i valori di EC_{50} che risultavano maggiori della più alta concentrazione testata, può di fatto sottostimare il valore di EF calcolato per n-TiO₂.

Ad oggi, in letteratura, non sono proposti Fattori di Effetto per nanoparticelle di Diossido di Titanio o nanoparticelle appartenenti alla classe degli ossidi di metallo. Pertanto, è stato possibile confrontare l'EF ottenuto con quello relativo al Titanio in forma libera, riportato nella banca dati dello USEtox, il quale risulterebbe meno tossico (EF pari a 356 PAF m³/Kg) delle n-TiO₂ (EF pari a 49,11 m³/Kg). Anche dal confronto con uno studio condotto da Eckelman et al., (2012) è possibile attribuire maggior tossicità alle n-TiO₂ rispetto ai CNT (Carbon Nano Tubes); gli autori hanno calcolato il Fattore di Effetto per i CNT considerando valori tossicologici calcolati anche su generi non richiesti dal modello USEtox (batteri, protozoi, copepoda, hydra) ottenendo un valore EF pari a 200 PAF m³/Kg.

CAPITOLO 7. Applicazione alla metodologia LCA: Fattore di Caratterizzazione per n-TiO₂

Il lavoro di tesi è stato ampliato collaborando alla ricerca dottorale di Beatrice Salieri condotta presso il C.I.R.S.A (Centro Interdipartimentale di Ricerca per le Scienze Ambientali) per il calcolo del Fattore di Destino, utilizzato per la valutazione del Fattore di Caratterizzazione.

Ad oggi il modello USEtox non presenta un Fattore di Caratterizzazione per le nanoparticelle, quindi in questo capitolo si proporrà un CF tenendo conto sia del valore di Fattore di Effetto calcolato nel paragrafo 6.2 sia del Fattore di Destino trattato nei successivi capitoli.

7.1 Fattore di Destino

Nell'ambito della ricerca dottorale il Fattore di Destino FF (Fate Factor) è stato calcolato seguendo il modello concettuale proposto dallo USEtox, il quale definisce il FF per una sostanza come la sua persistenza nell' ambiente, espressa in giorni (day). Il Fattore di Destino è stimato attraverso opportuni modelli matematici multimedia in cui vengono considerati i processi ambientali a cui una sostanza è soggetta una volta emessa nell'ambiente.

Seguendo un approccio matriciale, il FF corrisponde alla matrice inversa e negativa delle costanti cinetiche di reazione K (s^{-1}) relative ai processi ambientali che avvengono nelle matrici dell'ecosistema analizzato.

$$\overline{FF}_i = \overline{-K}^{-1} \quad (\text{eq.17})$$

Il progetto dottorale propone per il calcolo del Fattore di Destino una matrice (2x2) i cui elementi corrispondono a costanti cinetiche di reazioni di primo ordine, volte a descrivere il comportamento ambientale delle ENPs negli ecosistemi d'acqua dolce.

I processi valutati in questo studio tengono in considerazione sia delle proprietà chimico-fisiche delle ENPs (paragrafo 2.2.3) sia delle teorie delle scienze colloidali, data la loro similitudine con i colloidali [Arvidsson et al., 2011; Klaine et al., 2008]; in particolare vengono trattati i processi di dissoluzione e aggregazione, advezione, sedimentazione, seppellimento e risospensione (Fig 7.1).

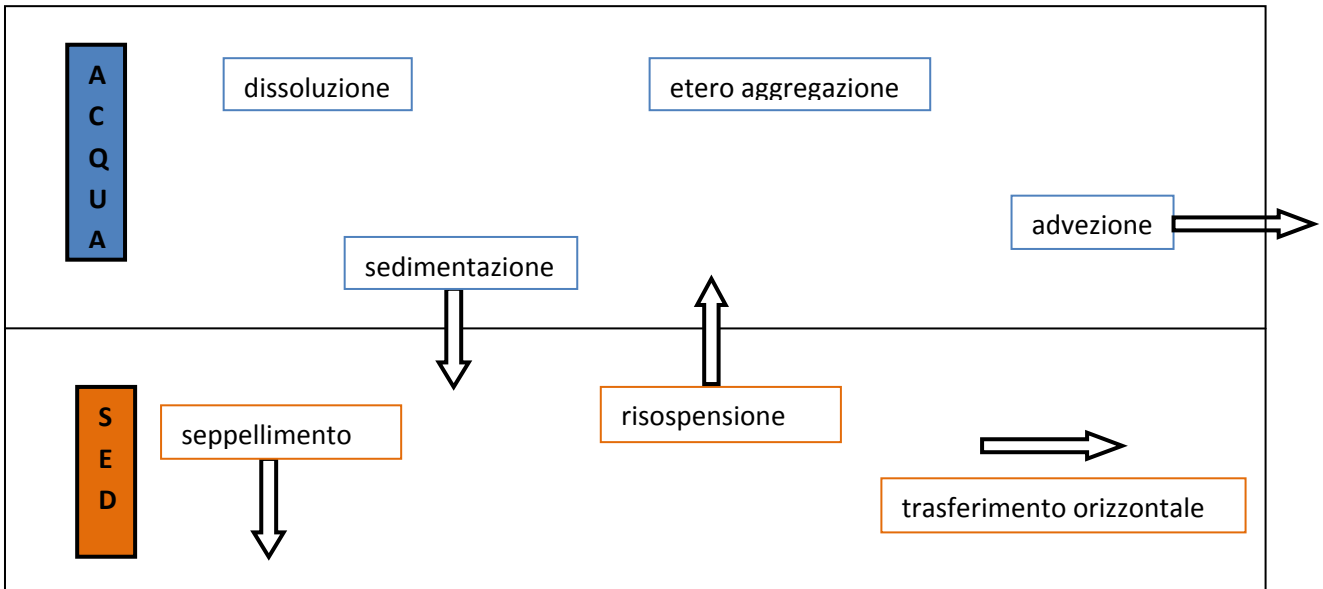


Fig 7.1: Processi che interessano le ENPs in ambiente acquatico

Nell'ambito del progetto dottorale, la matrice per il calcolo del FF è stata così definita:

$$\bar{K} = \begin{pmatrix} K_{w,w} & K_{w,sed} \\ K_{sed,w} & K_{sed,sed} \end{pmatrix} \quad (\text{eq.18})$$

Dove:

- $K_{w,w} (s^{-1})$: rappresenta il tempo di residenza delle nanoparticelle in acqua. E' calcolata considerando tutti i processi di rimozione delle ENPs dalla matrice acquatica (advezione, sedimentazione, dissoluzione e etero aggregazione) e per questo assumerà un valore negativo.

$$K_{w,w,i} = -(K_{adv,i} + K_{sed,i} + K_{dis} + K_{eteroag}) \text{ dove } i = 1 \dots, n_{size}^{ENPs} \quad (\text{eq.19})$$

- $K_{w,sed} (s^{-1})$: rappresenta il tempo impiegato dalle nanoparticelle per trasferirsi dalla matrice acquatica a quella sedimentaria, quindi tiene conto solo del processo di sedimentazione.

$$K_{w,sed,i} = K_{sed,i} \text{ dove } i = 1 \dots, n_{size}^{ENPs} \quad (\text{eq.20})$$

- $K_{sed,w} (s^{-1})$: rappresenta il tempo impiegato dalle nanoparticelle per trasferirsi dalla matrice sedimentaria a quella acquatica, quindi tiene conto solo del processo di risospensione.

$$K_{sed,w} = K_{resusp,i} \quad (\text{eq.21})$$

- $K_{sed, sed}$ (s^{-1}): rappresenta il tempo di residenza delle nanoparticelle nei sedimenti. E' calcolata considerando tutti i processi di rimozione delle ENPs dai sedimenti (seppellimento, risospensione e trasferimento orizzontale) e per questo assumerà un valore negativo.

$$K_{sed, sed, i} = -(K_{burial} + K_{resusp} + K_{sed, transf}) \text{ dove } i = 1 \dots, n_{size}^{ENPs} \quad (\text{eq.22})$$

Le costanti cinetiche di primo ordine sono state calcolate sulla base dei lavori proposti da Arvidsson et al., (2011) e Praetorius et al., (2012). Quest'ultimo considera come area d'indagine il fiume Reno e, pertanto, svolge una valutazione ambientale della PEC di n-TiO₂ sito-specifica. Diversamente, secondo il modello USEtox, il Fattore di Destino viene stimato su scala continentale quindi, per quanto possibile, i valori da attribuire ai parametri ambientali sono stati selezionati dalle banche dati USEtox (Tab 7.2). Per quanto riguarda invece i valori assunti dai parametri relativi alle nanoparticelle di Diossido di Titanio e al materiale sospeso SPM, si fa riferimento a quelli proposti da Praetorius et al., (2012) (Tab 7.3).

Stima della costante di etero aggregazione $K_{eteroagg, i}$

Con etero aggregazione si intende il processo di aggregazione tra le nanoparticelle e il materiale sospeso SPM, l'omo aggregazione invece tiene conto dell'interazione tra le sole nanoparticelle; considerando che la concentrazione delle ENPs è inferiore di due ordini di grandezza rispetto quella delle SPM, l'omo aggregazione è trascurabile e viene esclusa dai calcoli [Praetorius et al., 2012].

La costante di etero aggregazione (eq.23) tiene conto sia dell'efficienza di collisione α che della frequenza di collisione $k_{coll, i, j}$, moltiplicate per la concentrazione delle particelle sospese.

$$K_{eteroagg, i} = \alpha \times k_{coll, i, j} \times C_{SPM}^{particle} \quad (\text{eq.23})$$

Di seguito vengono descritti i fattori per il calcolo del $K_{eteroagg, i}$:

- L'efficienza di collisione α può assumere valori compresi tra 1 e 0,001 [Arvidsson et al., 2011] e per questo motivo saranno proposti due scenari, uno in cui α vale 1, l'altro in cui α vale 0,001.
- La frequenza di collisione (constant rate) $k_{coll, i, j}$ (m^3/s) tra le ENPs e la SPM, dipende dalla cinetica del moto browniano, orto cinetico e dalla sedimentazione differenziale (eq.24).

$$k_{coll,i,j} = \alpha * \frac{2TK_B}{3\mu} * \frac{(r_{TiO_2,i} + r_{SPM})^2}{r_{TiO_2,i} r_{SPM}} + \frac{4}{3} G * (r_{TiO_2,i} + r_{SPM})^3 + \pi * (r_{TiO_2,i} + r_{SPM})^2 * |v_{sed}^{TiO_2,i} - v_{sed}^{SPM}|$$

dove $i = 1 \dots, n_{size}^{ENPs}$ (eq.24)

Il primo termine dell'equazione descrive la collisione di ENPs con SPM causata dal moto browniano; il raggio delle particelle sospese (SPM) viene considerato costante e pari a 0,8 μm perché, dallo studio di Praetorius et al., (2012), a parità di concentrazione (50 mg/L) e densità (2 g/m^3), si evince sia la classe dimensionale più abbondante. Diversamente l'eteroaggregazione è calcolata considerando 5 classi dimensionali di ENPs, come proposto da Praetorius et al., (2012) (raggio pari a 8, 106, 204, 302, 400 nm).

Le stesse condizioni sono state assunte per il moto ortocinetico (secondo termine dell'equazione). Infine la sedimentazione differenziale è calcolata come il valore assoluto della differenza tra la velocità di sedimentazione delle ENPs e quella delle SPM. La velocità di sedimentazione è stimata tenendo conto della densità delle nanoparticelle in forma aggregata $\rho_{TiO_2,i}$ e del raggio delle ENPs, per ognuna delle 5 classi dimensionali. Diversamente, la velocità di sedimentazione delle SPM, è stata calcolata assumendo costante sia la dimensione ($r_{SPM} = 0,8 \mu\text{m}$) sia la densità ($\rho_{SPM} = 2 \text{g}/\text{m}^3$). Le equazioni per il calcolo delle velocità di sedimentazione sono riportate di seguito (eq.25 e 26). Per maggiori informazioni sul calcolo della densità delle ENPs in forma aggregata $\rho_{TiO_2,i}$ si rimanda allo studio di Praetorius et al., (2012).

$$v_{sed,TiO_2,i} = \frac{2}{9} * \frac{\rho_{TiO_2,i} - \rho_w}{9\mu} * g * r_{TiO_2,i}^2 \text{ dove } i = 1 \dots, n_{size}^{ENPs} \quad (\text{eq.25})$$

$$v_{sed,SPM} = \frac{2}{9} * \frac{\rho_{SPM} - \rho_w}{9\mu} * g * r_{SPM}^2 \quad (\text{eq.26})$$

Con $C_{particle}^{SPM}$ (m^{-3}) si intende la concentrazione delle particelle sospese, assunta costante.

In questo lavoro sono individuati due scenari: uno associato ad una concentrazione pari a $3,7\text{E}+10$ particelle/ m^3 , l'altro considerando una concentrazione di $1\text{E}+10$ particelle/ m^3 .

Il primo valore corrisponde ad una concentrazione di particolato sospeso C_{SPM}^{mass} pari a 50 mg/L e con densità media ρ_{SPM} pari a 2 g/m^3 : questi due dati descrivono uno degli scenari proposti da Praetorius et al., (2012) e relativi al fiume Reno. E' stato scelto proprio questo scenario perché sulla concentrazione di $3,7\text{E}+10$ particelle/ m^3 l'autore ha svolto uno studio di distribuzione relativo alle dimensioni del particolato sospeso individuando la classe dimensionale da 1,6 μm di diametro (raggio 0,8 μm) quella più abbondante.

Il modello USEtox invece propone a scala continentale una concentrazione C_{SPM}^{mass} pari a 15 mg/L; considerando lo stesso valore di densità proposto da Praetorius et al., (2012) ($\rho_{SPM} = 2 \text{ g/m}^3$) e le diverse concentrazioni ad esso associate (Tab 7.1), è possibile estrapolare la $C_{particle}^{SPM}$ corrispondente alla concentrazione in massa C_{SPM}^{mass} di 15 mg/L.

C_{SPM}^{mass} (mg/L)	$C_{particle}^{SPM}$ (particelle/m ³)	ρ_{SPM} (g/m ³) costante
15	da determinare	2
30	2E+10	2
50	3,4E+10	2
70	4,8E+10	2
90	6,1E+10	2

Tab 7.1 Valori di C_{SPM}^{mass} (mg/L) e $C_{particle}^{SPM}$ (particelle/m³) corrispondenti ad una densità ρ_{SPM} pari a 2 g/m³ [Praetorius et al., 2012]

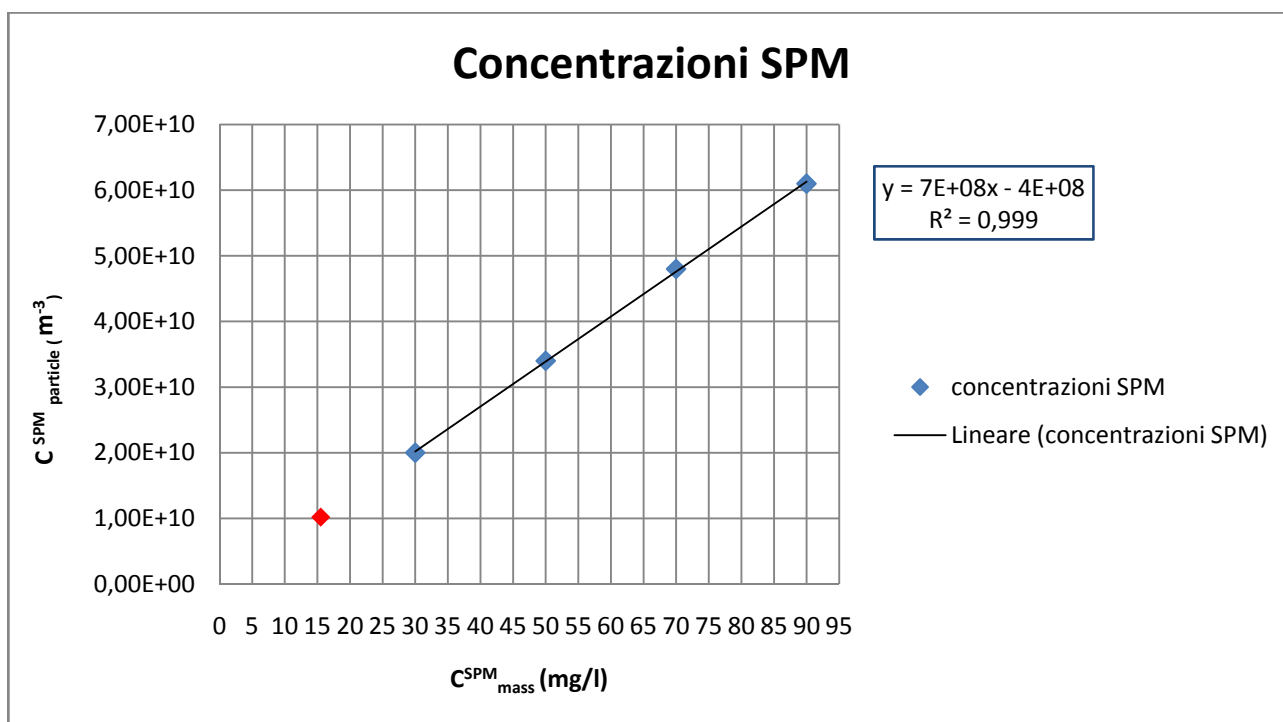


Fig 7.2 Estrapolazione $C_{particle}^{SPM}$ particelle/m³ corrispondente a C_{SPM}^{mass} pari a 15 mg/L

Il grafico in figura 7.2 individua un rapporto lineare tra le due variabili, già osservabile dalla tabella 7.1 sovrastante; utilizzando l'equazione della retta $Y=7E+08-4E+08$, si ottiene un valore di $C_{particle}^{SPM}$ pari a 1E+10, corrispondente al numero di particelle sospese in un metro cubo su scala continentale.

La costante di dissoluzione K_{diss}

La dissoluzione delle nanoparticelle riflette le proprietà superficiali delle ENPs e le caratteristiche di solubilità. Ad oggi la costante di dissoluzione per le nanoparticelle di ossidi metallici può essere estrapolata solo da dati sperimentali; Quik et al., (2011), nei suoi recenti studi, attribuisce a tale costante un valore compreso tra 0 e 10^{-5} (s^{-1}).

$$K_{diss} = 1E - 05 \quad (\text{eq.27}) \quad [\text{Quik et al.,2011}]$$

La costante di sedimentazione K_{sed}

La costante di sedimentazione delle ENPs è stimata come il rapporto tra la velocità di sedimentazione delle ENPs, calcolato come descritto nelle equazione 26, e l'altezza del comparto "acqua".

$$K_{sed} = \frac{v_{sed,i}}{h_w} \quad (\text{eq.28})$$

La costante di advezione K_{adv}

L'advezione è il processo secondo il quale le nanoparticelle vengono trasportate passivamente dal flusso dell'acqua in cui sono sospese. Il valore del flusso di advezione è stimato a scala continentale e riportato nelle banche dati dello USEtox (Tab 7.2); tale valore viene diviso per il volume del comparto acquatico, ottenuto dalla medesima fonte.

$$K_{adv} = \frac{adv,flow}{V_w} \quad (\text{eq.29})$$

La costante di risospensione K_{resusp}

La risospensione è un processo secondo il quale, una volta depositate, le particelle si distaccano dal letto di sedimenti e tornano in sospensione. Il valore del flusso di risospensione è fornito dal modello USEtox a scala continentale (Tab 7.2), così come il volume del comparto sedimentario per cui deve essere diviso.

$$K_{resusp} = \frac{resusp,flow}{V_{sed}} \quad (\text{eq.30})$$

La costante di seppellimento K_{burial}

Il seppellimento è il processo successivo alla sedimentazione in quanto una volta depositate sul letto del fiume, le particelle possono ritrovarsi in condizioni tali da provocarne lo stoccaggio negli strati sedimentari più profondi. Di nuovo si parla di una costante ottenuta dal rapporto tra il flusso e il volume del comparto ambientale, entrambi riportati nella raccolta dati a scala continentale dello USEtox (Tab 7.2).

$$K_{burial} = \frac{burial,flow}{V_{sed}} \quad (\text{eq.31})$$

La costante di trasferimento dei sedimenti $K_{sed,transf}$

Infine con trasferimento dei sedimenti si intende il processo relativo allo spostamento orizzontale lungo il letto del fiume, fenomeno a cui le nanoparticelle sedimentate possono essere soggette. La costante di trasferimento dei sedimenti (eq.29) si ottiene dal rapporto tra il flusso di sedimenti e la massa (eq.30), entrambi ricavati dagli studi condotti da Praetorius et al., (2012) (Tab 7.2) in quanto tali informazioni non sono presenti all'interno delle banche dati USEtox .

$$K_{sed,transf} = \frac{V_{sed,transf}}{m_{sed}} \quad (eq.32)$$

$$m_{sed} = (1 - \varphi) * V_{sed} * \rho_{sed} \quad (eq.33)$$

Di seguito vengo riportati i valori assunti dai parametri ambientali applicati nelle equazioni finora descritte (Tab 7.2 e Tab 7.3).

Parametri	Simbolo	Unità di misura	Valore/Formula	Fonte
Costante di Boltzmann	K_B	J/K	1,38E-23	USEtox 2008 (scala geografica continentale)
Accelerazione di gravità	g	m/s ²	9,8	
Coefficiente di collisione	α		1	Praetorius et al., 2012
Coefficiente di collisione	α		1E-03	Praetorius et al., 2012
Volume comparto acqua	V_w	m ³	6,76E+11	USEtox 2008 (scala geografica continentale)
Volume comparto sedimenti	V_{sed}	m ³	8,11E+09	USEtox 2008 (scala geografica continentale)
Densità comparto acqua	ρ_w	g/m ³	1	Praetorius et al., 2012
Viscosità comparto acqua	μ	Pas	1E-03	Praetorius et al., 2012
Altezza comparto acqua	h_w	m	2,5	USEtox 2008 (scala geografica continentale)
Altezza comparto sedimenti	h_{sed}	cm	3	USEtox 2008 (scala geografica continentale)
Concentrazione SPM in acqua	C_{SPM}^{mass}	mg/L	1,5	USEtox 2008 (scala geografica continentale)
Flusso di risospensione dei sedimenti	resusp,flow	m ³ /s	7,19E+01	USEtox 2008 (scala geografica continentale)

Flusso di seppellimento dei sedimenti	burial,flow	m ³ /s	2,33E+01	USEtox 2008 (scala geografica continentale)
Flusso di advezione acqua dolce-mare	adv,flow	m ³ /s	5,45E+04	USEtox 2008 (scala geografica continentale)
Porosità sedimenti	φ		0,85	Praetorius et al., 2012
Vsed,trasf	Vsed,trasf	Kg/s	3	Praetorius et al., 2012

Tab 7.2 valori assunti dai parametri relativi ai comparti ambientali "acqua" e "sedimenti" [USEtox 2008; Praetorius et al., 2012]

Parametri	Simbolo	Unità di misura	Valore/Formula	Fonte
Numero di classi dimensionali di ENPs	n_{size}^{ENP}	$i=1...5$		Praetorius et al., 2012
Diametro primario ENPs	$d_{TiO_2,p}$	nm	15	Praetorius et al., 2012
Diametro classe dimensionale ENPs $i=1...n$	$d_{TiO_2,i}$	nm	[16; 212; 408;604;800]	Praetorius et al., 2012
Raggio classe dimensionale ENPs $i=1...n$	$r_{TiO_2,i}$	nm	[8;106;204;302;400]	Praetorius et al., 2012
Concentrazione SPM	$C_{SPM}^{particle}$	1/m ³	3,70E+10	Praetorius et al., 2012
Concentrazione SPM	$C_{SPM}^{particle}$	1/m ³	1,00E+10	USEtox 2008 (scala geografica continentale)
Densità SPM	ρ_{SPM}	g/cm ³	2	Praetorius et al., 2012
Diametro SPM	d_{SPM}	μm	1,6	Praetorius et al., 2012
Raggio SPM	r_{SPM}	μm	0,8	Praetorius et al., 2012

Tab 7.3 valori assunti dai parametri relativi alle ENPs e al SPM [Praetorius et al., 2012]

7.2 Calcolo del Fattore di Destino

Nell'ambito di questo lavoro, il Fattore di Destino, è stato calcolato applicando quattro scenari differenti, in base ai valori assunti da α (1 e 0,001) e da $C_{particle}^{SPM}$ (1E+10 e 3,4E+10); inoltre vengono prese in considerazione tutte e cinque le classi dimensionali di nanoparticelle proposte da

Praetorius et al., (2012) così da ottenere per ognuno degli scenari cinque corrispondenti valori di FF.

Una volta costruita la matrice dei \bar{K} utilizzando le costanti descritte nel paragrafo precedente, si procede con il calcolo della matrice inversa e negativa corrispondente alla matrice del Fattore di Destino (day).

$$\overline{FF}_i = -\overline{K}^{-1} \quad (\text{eq.17})$$

$$\bar{K} = \begin{pmatrix} Kw,w & Kw,sed \\ Ksed,w & Ksed,sed \end{pmatrix} \rightarrow \begin{pmatrix} \frac{Ksed,sed}{det} & -\frac{Ksed,w}{det} \\ -\frac{Kw,sed}{det} & \frac{Kw,w}{det} \end{pmatrix} \rightarrow \overline{FF} = \begin{pmatrix} FFw,w & FFw,sed \\ FFsed,w & FFsed,sed \end{pmatrix} \quad (\text{eq.34})$$

Tra gli scenari proposti non sono emerse differenze significative in termini di permanenza (day) delle nanoparticelle nei due comparti ambientali analizzati. In tutti e quattro gli scenari è possibile individuare una proporzionalità tra i tempi di residenza e il raggio della nano particella; comparando n-TiO₂ di dimensioni differenti, si osserva che all'aumentare delle dimensioni della particella, il tempo di permanenza nel comparto acquatico diminuisce mentre aumenta quello nella matrice sedimentaria. Inoltre, in tutti gli scenari proposti, i tempi di permanenza risultano confrontabili. Analogamente accade per i tempi di trasferimento dalla matrice acquatica a quella sedimentaria e viceversa; le ENPs più piccole tendono a risospendere più velocemente rispetto a quelle più grandi (e quindi più pesanti), che invece impiegano meno tempo per sedimentare. Come i tempi di residenza, anche quelli di trasferimento tra un comparto e l'altro sono simili tra i quattro scenari.

Per, questa ragione, vengono riportati in Tab 7.4 e utilizzati per i calcoli successivi i risultati ottenuti da un solo scenario, quello in cui $\alpha=1$ e $C_{particle}^{NPs}=1E+10$.

raggio (nm)	8	106	204	302	400
FFw,w	8,99E-01	6,59E-01	5,62E-02	7,88E-03	1,85E-03
FFw,sed	6,79E-01	4,98E-01	4,24E-02	5,95E-03	1,40E-03
FFsed,w	1,21E-02	1,30E+03	2,89E+03	2,88E+03	2,75E+03
FFsed,sed	9,86E+02	1,97E+03	3,17E+03	3,16E+03	3,06E+03

Tab 7.4: Valori FF relativi allo scenario $\alpha=1$ e $C_{particle}^{NPs}=1E+10$

Al fine di calcolare il Fattore di Caratterizzazione volto a stimare i potenziali impatti esercitati dalle nanoparticelle di Diossido di Titanio in acqua dolce, risulta di maggior interesse il fattore FF_{w,w}.

Tale valore verrà successivamente moltiplicato per il Fattore EF, calcolato nell'ambito del lavoro di tesi e discusso nei capitoli precedenti. Come descritto in precedenza, la stima del FF è stato condotta considerando che le n-TiO₂ si distribuiscano nell'ambiente distinte in cinque classi dimensionali (raggio 8, 106, 204, 302, 400 nm), come proposto da Praetorius et al., 2012.

Dallo studio di Praetorius et al., (2012) è possibile individuare per ciascuna di queste classi di ENPs un peso, proporzionale all'abbondanza nella rispettiva classe dimensionale. Al fine di ottenere un FF_{w,w} rappresentativo della distribuzione totale delle ENPs, si è proceduto al calcolo di un FF_{w,w} pesato.

Il calcolo del FF_{w,w} pesato si ottiene moltiplicando il FF_{w,w} associato ad ogni classe di ENPs per il rispettivo peso in modo tale da tener conto della diversa abbondanza di n-TiO₂ in acqua. Infine i risultati ottenuti vengono sommati e poi divisi per il numero delle classi (la classe di ENPs più piccola non viene tenuta in considerazione perché dagli studi di Praetorius et al., (2012) risulta trascurabile) ottenendo infine il FF_{w,w} totale (eq.35).

Raggio (nm)	Peso	FF _{w,w}	FF _{w,w} pesato = peso * FF _{w,w}
8	0	8,99E-01	0
106	0,372	6,59E-01	2,45E-01
204	0,465	5,62E-02	2,61E-02
302	0,140	7,88E-03	1,10E-03
400	0,023	1,85E-03	4,30E-05

Tab 7.5 pesi e rispettivi FF_{w,w} pesati per ogni classe dimensionale di n-TiO₂ relativi allo scenario α=1 e

$$C_{particle}^{NPs} = 1E+10$$

$$FF_{w,w} totale = \frac{\sum_{i=1}^5 FF_{w,w} pesato}{n_{size}^{ENPs}} \text{ dove } i = 1 \dots, n_{size}^{ENPs} \quad (\text{eq.35})$$

$$FF_{w,w} totale = \frac{(0+2,45E-01+2,61E-02+1,10E-03+4,30E-05)}{4} = 6,81E - 02 \text{ (day}^{-1}\text{)}$$

Dai risultati si evince che il tempo di permanenza delle n-TiO₂ in acqua è pari a circa a 0,07 giorni, che corrispondono sommariamente ad un'ora e mezza (scenario α=1 e C_{particle}^{NPs}=1E+10).

7.3 Calcolo del Fattore di Caratterizzazione

Tenendo conto dei risultati ottenuti dal paragrafo 6.2 e 7.2 è possibile calcolare il Fattore di Caratterizzazione utilizzando la formula proposta dalla LCA per le categorie tossiche:

$$CF = FF \times XF \times EF \quad (\text{eq.3})$$

Il Fattore di Effetto è assunto pari a 49,14 PAF m³/Kg mentre il Fattore di Destino pari a 6,81E-2 (day⁻¹).

Per quanto riguarda il Fattore di Esposizione XF, nel modello USEtox viene rappresentato come la frazione disciolta e biodisponibile che viene a contatto con gli organismi acquatici; la bibliografia non presenta ad oggi informazioni relative alla biodisponibilità delle n-TiO₂, ma soltanto la loro capacità di attraversare la membrana cellulare per diffusione [Lin et Xing, 2007], per endocitosi o per adesione [Moore et al., 2006]. Pertanto non è stato possibile calcolare il Fattore di Esposizione. Per il calcolo del Fattore di Caratterizzazione (eq.36) in questo lavoro di tesi, la biodisponibilità delle n-TiO₂ viene assunta pari a 1.

$$CF = FF \times XF \times EF = 6,81E - 2 (\text{day}) \times 1 \times 49,11 \text{ PAF} \frac{\text{m}^3}{\text{Kg}} = 3,34 \text{ PAF} \frac{\text{m}^3}{\text{Kg}} \text{ day} \quad (\text{eq.36})$$

CONCLUSIONI

Il Fattore di Effetto per nanoparticelle di Diossido di Titanio ottenuto in questo elaborato di tesi ha considerato sia i valori di EC_{50} o LC_{50} relativi ad alghe, crostacei e pesci riportati in letteratura, sia i valori ottenuti dai saggi sperimentali condotti al C.R.S.A..

Il risultato ottenuto è pari a $49,11 \text{ PAF m}^3/\text{kg}$ ma non ci sono dati per il confronto in letteratura; ad oggi è possibile affermare solo che le nanoparticelle di Diossido di Titanio sono più tossiche del Titanio (IV) in forma libera (EF pari a $356 \text{ PAF m}^3/\text{kg}$, riportato nelle banche dati dello USEtox), e dei CNT (EF pari a $200 \text{ PAF m}^3/\text{kg}$, valore ottenuto da Eckelman et al., (2012)).

Nell'ambito di questa tesi, i test sperimentali condotti su *Pseudokirchneriella Subcapitata*, prevedono la lettura dell'endpoint (inibizione alla crescita) con tre strumenti: il microscopio ottico, lo spettrofluorimetro e lo spettrofotometro. E' possibile notare come i valori di EC_{50} ottenuti da due di queste metodiche risultino essere quelli più bassi ($EC_{50}=2,09 \text{ mg/L}$ al microscopio ottico; $EC_{50}=3,67 \text{ mg/L}$ allo spettrofluorimetro), se confrontati con i dati riportati in letteratura. Tuttavia, la variabilità dei risultati e delle procedure sperimentali finora esposte dagli studi di ricerca, fanno sì che il nostro valore possa ritenersi valido e in grado di arricchire l'archivio dati già citato.

In particolare, i nostri risultati risultano comparabili con quelli ottenuti da Aruoja et al., (2009) sia perché appartenenti allo stesso ordine di grandezza sia perché le modalità di svolgimento dei saggi sperimentali sono simili. Una differenza rilevante con il metodo proposto da Aruoja et al., (2009) è l'utilizzo della soluzione stock in quanto preparata ogni qualvolta venisse condotto un saggio sperimentale. L'analogia dei risultati ottenuti dai nostri test eco tossicologici, condotti utilizzando la stessa soluzione di ENPs, permette di affermare che il riutilizzo della soluzione stock in un arco di tempo pari a un mese è sperimentalmente accettabile. La ripetibilità dei risultati espressi in valori di EC_{50} è verificabile sia dalle letture effettuate con il microscopio ottico (media geometrica $EC_{50}=2,09 \text{ mg/L}$ (I.C.95% 1,45-2,99)) sia da quelle con lo spettrofluorimetro (media geometrica $EC_{50}=3,67 \text{ mg/L}$ (I.C.95% 2,16-6,24)).

Nonostante le medie delle EC_{50} siano molto simili, le due serie di dati ottenute con i due strumenti, per il test statistico "T di Student per dati appaiati", risultano significativamente differenti.

Questo può essere associato alle variazioni sistematiche indotte dalla diversa sensibilità degli strumenti. La conta cellulare al microscopio ottico è sicuramente un metodo pratico, perché in grado di superare il problema del limite di rilevabilità strumentale, nonché molto utile, perché fornisce una visione immediata dello stato di salute della cultura algale. Inoltre, durante la lettura dei test, è possibile osservare il comportamento delle nanoparticelle; alle alte concentrazioni si

nota la capacità delle ENPs di Titanio di aderire alla membrana cellulare e di frantumarla, così come affermato da Hartmann et al., (2010), Sadiq et al., (2011) e Ji et al., (2010).

Tuttavia, il microscopio risulta essere un metodo di lettura soggettivo, in quanto dipendente dalla sensibilità dell'operatore, e poco rappresentativo, dato il volume di lettura pari a 10 μ L su 25 mL di campione. Lo spettrofluorimetro invece, analizza un volume di campione più rappresentativo (10 mL su 25 mL di campione) e, nonostante i limiti di rilevabilità strumentali, riesce sempre a rilevare un picco di fluorescenza anche per le concentrazioni di n-TiO₂ più elevate (C₁₆), alle quali il microscopio non riesce a individuare nessuna cellula.

Lo spettrofluorimetro sembrerebbe lo strumento migliore per la lettura dei saggi di inibizione algale con nanoparticelle di Diossido di Titanio sia per la sua oggettività sia perché non subisce l'interferenza delle n-TiO₂, incapaci di emettere fluorescenza alla lunghezze d'onda della clorofilla. Al contrario, lo spettrofotometro, non risulta adatto alla lettura di saggi con n-TiO₂ in quanto le nanoparticelle sono in grado di interferire con il raggio luminoso; lo strumento fornisce risultati soggetti ad elevata variabilità e che non dipendono dalla concentrazione di ENPs saggiata, come invece accade per le letture allo spettrofluorimetro e al microscopio ottico.

In merito alle revisioni bibliografiche svolte in quest'elaborato di tesi, si evidenzia una forte variabilità tra i valori di EC₅₀ ottenuti dai saggi condotti sulle specie dei tre livelli trofici analizzati.

Per gli organismi appartenenti al livello trofico delle alghe è stata svolta un'analisi di regressione lineare tra i valori di tossicità e le caratteristiche delle n-TiO₂ più rilevanti dagli studi bibliografici (fase cristallina, dimensioni e procedura di sonicazione). Dalla letteratura sembrerebbe infatti che l'elevata percentuale di anastasio sia associata a valori eco tossicologici più bassi [Hartmann et al., 2010; Warheit et al., 2007; Aruoja et al., 2009], soprattutto se combinata ad altre proprietà come le piccole dimensioni [Hall et al., 2009] e l'area superficiale [Hund-Rinke et al., 2010]. Analogamente l'analisi di regressione dimostra che le dimensioni, la percentuale di anastasio e i minuti di sonicazione risultano una combinazione di variabili influente sulla tossicità (coefficiente di determinazione R²=0,96). Per quanto riguarda gli organismi degli altri livelli trofici, anche gli effetti tossici indotti da n-TiO₂ sui crostacei sembrano essere associati alle piccole dimensioni e all'elevata percentuale di anastasio [Dabrunz et al., 2011]. Di interessante rilevanza sembra essere anche il fattore temporale in quanto, molti dei valori tossicologici indeterminati, sono riconducibili a saggi di tossicità condotti alle 48 ore [Griffitt et al., 2008; Strigul et al., 2009; Hund-Rinkie et Simon, 2006; Kim et al., 2010; Zhu et al., 2010; Dabrunz et al., 2011]: probabilmente si tratta di un

periodo di incubazione non sufficiente alla manifestazione del vero potenziale tossico delle nanoparticelle di Diossido di Titanio.

Infine, dai risultati relativi ai saggi condotti sui pesci, si evince che la tossicità sia dose dipendente [Chen et al., 2010] ma non che le dimensioni e la fase cristallina delle n-TiO₂ siano le caratteristiche maggiormente associate all'insorgere di effetti tossici [Zhu et al., 2008; Xiong et al., 2011]. Inoltre, a differenza delle alghe e dei crostacei, per questo livello trofico vengono studiati prevalentemente gli effetti subletali, in particolare quelli ossidativi e citotossici. Dagli studi presenti in letteratura si deduce che i danni di maggior entità siano quelli indotti da n-TiO₂ attivate da luce UV [Vevers et al., 2008; Reeves et al., 2007] e quelli che riguardano i tessuti branchiali, sia per quanto riguarda il malfunzionamento di specifici enzimi antiossidanti come il GSH e le TBARS [Federici et al., 2007; Ramsden et al., 2009], sia per l'insorgere di patologie [Chen et al., 2010; Hao et al., 2009].

Come ulteriore applicazione all'LCA, nell'ambito di questa tesi si è affiancato un lavoro di ricerca dottorale condotto presso il CIRSA e volto a valutare il Fattore di Caratterizzazione per nanoparticelle di Diossido di Titanio. Il Fattore di Destino è stato calcolato sulla base di modelli matematici proposti dallo USEtox e di processi ambientali tipici delle particelle colloidali. Il lavoro di ricerca ha permesso di stimare il Fattore di Destino per n-TiO₂ (pari a circa un'ora e mezza) e, assumendo il Fattore di Esposizione pari a 1, calcolare il Fattore di Caratterizzazione (CF pari a 3,34 PAF m³/kg day).

BIBLIOGRAFIA

- “Nanotecnologie. Il cammino della scienza” Ed. Script, Bologna (2010).
- Adams L.K., Lyon D., Alvarez P.J.J. (2006) “Comparative ecotoxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂ and ZnO in water suspensions”. *Water Research* 40:3527-3532
- Aitken R., Chaudhry M., Boxall A., Hull M. (2006) “Manufacture and use of nanomaterials: current status in the UK and global trends”. *Occupational Medicine* 56:300-306
- ALGALTOXKIT F Freshwater Toxicity Test with Microalgae “Standard Operational Procedure”.
- APAT, Annuario dei dati ambientali, Estratto edizione 2005-2006, p.XVI
- Aruoja V., Dubourguier H.C., Kasemets K., Kahru A. (2009) “Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*”. *Science of the total environment* 407:1461-1468
- Arvidsson R., Molander S., Sandén B.A., Hassellöv M. (2011) “Challenges in Exposure Modeling of Nanoparticles in Aquatic Environments”. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 17(1):245-262
- ASTM- American Society for Testing and Materials (2006) “Standard terminology relating to nanotechnology”. ASTM E 2456-06, Philadelphia, Pennsylvania
- Baalousha M., Lead J.R. (2007) Characterization of natural aquatic colloids (5 nm) by flow-field flow fractionation and atomic force microscopy”. *Environmental Science & Technology* 41:1111–1117

- Baldo G.L. “Analisi del ciclo di vita LCA. Materiali, prodotti e processi”, Edizioni Ambiente (2005)
- Baudo R., Perin G. “Ecotossicologia quantitative applicata”, Aracne (2012)
- Bermudez E., Mangum J.B., Asgharian B., Wong B.A., Reverdy E.E., Janszen D.B., Hext P.M., Warheit D.B., Everitt J.I. (2002) “Long term pulmonary responses of three laboratory rodent species to subchronic inhalation of pigmentary titanium dioxide particles”. *Toxicological Sciences* 70:86-97
- Bermudez E., Mangum J.B., Wong B.A., Asgharian B., Hext P.M., Warheit D.B. (2004) “Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles”. *Toxicological Sciences* 77:347-357
- Bhatt I., Tripathi B.N. (2011) “Interaction of engineered nanoparticles with various components of the environment and possible strategies for their risk assessment”. *Chemosphere* 82:308–317
- Blaise C., Gagné F., Férard J.F., Eullaffroy P. (2008) “Ecotoxicity of selected nano-materials to aquatic organisms”. *Environmental Toxicology* 23:591-598
- Blaser S.A., Scheringer M., MacLeod M., Hungerbühler K. (2008) “Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to silver: contribution of nano-functionalized plastics and textiles”. *Science of the total environment* 390:396-409
- Brown D., Donaldson K., Borm P., Schins R., Dehnhardt M., Gilmour P., (2004) “Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF- α cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles”. *American journal of physiology-lung cellular and molecular physiology* Impact Factor 286:344-353

- Carlson C., Hussain S.M., Schrand A.M., Braydich-Stolle L.K., Hess K.L., Jones R.L. (2008) "Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species". *Physical Chemistry* 112:13608-13619
- Chen J., Dong X., Xin Y., Zhao M. (2011) "Effects of titanium dioxide nano-particles on growth and some histological parameters of zebrafish (*Danio rerio*) after a long-term exposure". *Aquatic toxicology* 101:493-499
- Chen J., Liu M., Zhang J., Ying L. (2004) "Photocatalytic degradation of organic wastes by electrochemically assisted TiO₂ photocatalytic system". *Environmental Manage* 70:43-47
- Chen J., Meng H., Xing., Chen C., Zhao Y., Jia G. (2006) "Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo." *Toxicology Letters* 163:109-120
- Chen J.Y., Dong X., Zhao J., Tang G. (2009) "In vivo acute toxicity of titanium dioxide nanoparticles to mice after intraperitoneal injection". *Journal of Applied Toxicology* 29:330-337
- Christian P., Von der Kammer F., Baalousha M., Hofmann T. (2008) "Nanoparticles: structure, properties, preparation and behavior in environmental media". *Ecotoxicology* 17:326-343
- Crane M., Handy R.D. (2007) "An assessment of regulatory testing strategies and methods for characterizing the ecotoxicological hazards of nanomaterials". Report for Defra, London, UK
- Crane M., Handy R.D., Garrod J., Owen R. (2008) "Ecotoxicity test methods and environmental hazard assessment for engineered nanoparticles". *Ecotoxicology* 17:421-437

- Dabrunz A., Duester L., Prasse C., Seitz F., Rosenfeldt R., Schilde C., Schaumann G.E., Schulz R. (2011) "Biological surface coating and molting inhibition as mechanisms of TiO₂ nanoparticle toxicity in *Daphnia Magna*". PLoS One 6(5) e20112
- Eckelman M.J., Mauter M.S., Isaacs J.A., Elimelech M. (2012) "New perspectives on nanomaterial aquatic ecotoxicity: production impacts exceed direct exposure impacts for carbon nanotubes". Environmental Science & Technology 46(5):2902-10
- EPA, External review draft, "Nanomaterial case studies: nanoscale dioxide in water treatment and in topical sunscreen" (2009) United States Environmental Protection Agency
- Federici G., Shaw B.J., Handy R.D. (2007) "Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects". Aquatic Toxicology 84:415-430
- Fullana P., Betz M., Hischer R., Puig R. "Life cycle, Assessment applications: results from COST action 530", AENOR (2009)
- Garcia A., Espinoza R., Delgado L., Casals E., González E., Puentes V., Barata C., Font X., Sánchez A. (2010) "Acute toxicity of cerium oxide, titanium oxide and iron oxide nanoparticles using standardized tests". Desalination 1-6
- Giammar D.E., Maus C.J., Xie L. (2007) "Effects of particle size and crystalline phase on lead adsorption to titanium dioxide nanoparticles". Environmental Engineering Science 24:85–95
- Gottschalk F., Sonderer T., Scholz R.W., Nowack B. (2009) "Modeled Environmental Concentrations of Engineered Nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for Different Regions". Environmental Science & Technology 43:9216–9222

- Griffitt R.J., Luo J., Gao J., Bonzongo J.C., Barber D.S. (2008) "Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms". *Environmental Toxicology and Chemistry* 27:1972-1978.
- Gurr J.R., Wang A.S.S., Chen C.H., Jan K.Y. (2005) " Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells". *Toxicology* 213:66-73
- Hall P., Johnson R.A., Wichern D.W. "Applied Multivariate Statistical Analysis" V edizione (2002)
- Hall S., Bradley T., Moore J.T., Kuykindall T., Minella L. (2009) "Acute and chronic toxicity of nano-scale TiO₂ particles to freshwater fish, cladocerans, and green algae, and effects of organic and inorganic substrate on TiO₂ toxicity". *Nanotoxicology* 3(2):91-97
- Handy R., Shaw B. (2007) "Toxic effects of nanoparticles and nanomaterials: implication for public health, risk assessment and the public perception of nanotechnology". *Health Risk Society* 9:125-144
- Handy R.D., Henry T.B., Scown T.M., Johnston B.D., Tyler C.R. (2008) "Manufactured nanoparticles: their uptakes and effects on a fish - a mechanistic analysis". *Ecotoxicology* 17:396-409
- Handy R.D., Von der Kammer F., Lead J.R., Hassellöv M., Owen R., Cran M. (2008) "The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles". *Ecotoxicology* 17:287–314
- Hao L., Wang Z., Xing B. (2009) "Effects of subacute exposure to TiO₂ nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in Juvenile Carp (*Cyprinus Carpio*)". *Journal of environmental sciences* 21:1459-1466

- Hartmann N.B., Von der Kammer F., Hofmann T. , Baalousha M., Ottofuelling S., Baun A. (2010) “Algal testing of titanium dioxide nanoparticles- Testing considerations, inhibitory effects and modification of cadmium bioavailability”. *Toxicology* 269:190-197
- Hauschild M., (2005) “Assessing environmental impacts in a life cycle perspective”. *Environmental Science & Technology* 39(4):81a-88a
- Heinlaan M., Ivask A., Blinova I., Dubourguier H.C., Kahru A. (2008). Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio Fischeri* and crustaceans *Daphnia Magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere* 71, 1308–1316
- Henderson A.D., Hauschild M.Z., Van de Meent D., Huijbregts M.A.J., Larsen H.F., Margni M., McKone T.E., Payet J., Rosenbaum R.K., Jolliet O. (2011) “USEtox fate and ecotoxicity factors for comparative assessment of toxic emissions in life cycle analysis: sensitivity to key chemical properties”. *International Journal of Life Cycle Assessment* 16:701–709
- Hoffman D.J., Rattner B.A., Burton G.A., Cairns J. “Handbook of Ecotoxicology”, Lewis Publishers (1995)
- Huijbregts M.A.J., Guinée J.B., Reijnders L. (2001). “Priority assessment of toxic substances in life cycle assessment. Export of potential impact overtime and space”. *Chemosphere* 44:59-659
- Huijbregts M.A.J., Hauschild M., Jolliet O., Margni M., Mc Kone T., Rosenbaum R.K., Van de Meent D. (2010). USEtoxTM User manual.
- Hund-Rinke K., Schlich K., Wenzel A. (2010) “TiO₂ nanoparticles-Relationship between dispersion preparation method and ecotoxicity in the algal growth test”. *Nanomaterials* 22:517-528

- Hund-Rinke K., Simon M. (2006) “Ecotoxic effect of photocatalytic active nanoparticles (TiO₂) on algae and daphnids”. Environmental Science and Pollution Research 13: 1-8.
- ISO 10253:2006 International Standard. “Water quality-Marine algal growth inhibition test with Skeletonema Costatum and Phaeodactylum tricornutum”.
- ISO 14040:2006 International Standard. “Environmental Management- Life Cycle Assessment- Principles and framework”.
- ISO 14044:2006 International Standard. “Environmental Management- Life Cycle Assessment- Requirements and Guidelines”.
- ISO 14047:2003 International Standard. “Environmental Management-Lyfe Cycle Assessment-Example of application of ISO 14042”.
- ISO 14048:2003 International Standard. “Environmental Management-Lyfe Cycle Assessment-Data documentation format”.
- ISO/TS 20281 International Standard. First edition 2006-04-01 “Water quality — Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data”.
- Ispas C., Andreescu D., Patel A., Goia D.V., Adreescu S., Wallace K.N. (2009) “Toxicity and developmental defects of different sizes and shape nickel nanoparticles in zebrafish”. Environmental Science & Technology 43:6349-6356
- Jamie R., Lead A.C., Kevin J., Wilkinson B. (2006) “Aquatic Colloids and Nanoparticles: Current Knowledge and Future Trends”. Environmental Chemistry 3:159–171
- Ji J., Longa Z., Lin D. (2010) “ Toxicity of oxide nanoparticles to the green algae *Chlorella sp*”. Chemical Engineering Journal 170: 525-530

- Jiang J., Oberdorster G., Elder A., Gelein R., Mercer P., Biswas P. (2008) "Does nanoparticle activity depend upon size and crystal phase?" *Nanotoxicology* 2:33-42
- Jolliet O., Miiller-Wenk R., Bare J., Brent A., Goedkoop M., Heijungs R., Itsubo N., Pefia C., Pennington D., Potting J., Rebitzer G., Stewart M., Udo de Haes H., Weidema B. (2004) "The LCIA Midpoint-damage Framework of the UNEP/SETAC Life Cycle Initiative". *The International Journal of Life Cycle Assessment* 9(6):394-404.
- Jolliet O., Rosenbaum R., Chapman P.M., McKone T., Margni M., Scheringer M., Van Straalen N., Wania F., (2006) "Establishing a Framework for Life Cycle Toxicity Assessment. Findings of the Lausanne Review Workshop". *The International Journal of Life Cycle Assessment* 11(3):209-212
- Kelly K., Havrilla C., Brady T., Abramo K., Levin E. (1998) "Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems" *Environmental Health Perspectives* 106:375-384
- Kim K.T., Klaine S.J., Cho J., Kim S.H., Kim S.D. (2010) "Oxidative stress responses of *Daphnia magna* exposed to TiO₂ nanoparticles according to size fraction". *Science Total Environment* 408(10):2268-2272
- Kim, B., and W.M. Sigmund. 2004. "Functionalized multiwall carbon nanotube/gold nanoparticle composites". *Langmuir* 20:8239–8242.
- Klaine S.J., Alvarez P.J.J., Batley G.E., Fernandes T.F., Handy R.D., Lyon D.Y., Mahendra S., McLaughlin M.J., Lead J.R. (2008) "Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects". *Environmental Toxicology & Chemistry* 27:1825-1851
- Klaine S.J., Alvarez P.J.J., Batley G.E., Fernandes T.F., Handy R.D., Lyon D.Y., Mahendra S., McLaughlin M.J., Lead J.R. (2008) "Nanomaterials in the environment: Fate, bioavailability and effects". *Environmental Toxicology and Chemistry* 27(9): 1825-1851

- Lam C.W., James J.T., McCluskey R., Hunter R.L. (2004) "Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation". *Toxicology Science* 77:126-134
- Larsen H.F., Birkved M., Hauschild M., Pennington D.W., Guinée J.B. (2004). "Evaluation of selection methods for toxicological impacts in LCA". *International Journal Life Cycle Assessment* 9(5):307-319.
- Larsen H.F., Hauschild M.Z. (2007) "Evaluation of ecotoxicity effect indicators for use in LCIA". *International Journal Life Cycle Assessment* 12(1):24-33.
- Lead J.R., Wilkinson K.J. (2006) "Aquatic colloids and nanoparticles: current knowledge and future trends". *Environmental Chemistry* 3:159-171
- Lee S.W., Kim S.M., Choi J. (2009) "Genotoxicity and ecotoxicity assays using the freshwater crustacean *Daphnia Magna* and the larva of aquatic midge *Chironomus Riparius* to screen the ecological risks of nanoparticle exposure". *Environmental Toxicology and Pharmacology* 28:86-91
- Li H., Zhou Q., Wu Y., Fu J., Wang T., Jiang G. (2009) "Effects of waterborne nano-iron on medaka (*Oryzias Latipes*): antioxidant enzymatic activity, lipid peroxidation and histopathology". *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72:684-692
- Li J.G., Li Q.N., Xu G.Y., Li J., Cai X.Q., Liu R.L. (2007) "Comparative study on the acute pulmonary toxicity induced by 3 and 20 nm TiO₂ primary particles in mice". *Environmental Toxicity and Pharmacology* 24:239-244
- Lin D.H., Xing B.S. (2007) "Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition on seed germination and root growth". *Environmental Pollution* 150:243-250

- Long T.C., Saleh N., Tilton R.D., Lowry G.V., Veronesi B. (2006) "Titanium dioxide (P25) produces reactive oxygen species in immortalized brain microglia (BV2): implication for nanoparticle neurotoxicity" *Environmental Science & Technology* 40:4346-4352
- Lovern S.B., Klaper R. (2006) "*Daphnia Magna* mortality when exposed to titanium dioxide and fullerene (C60) nanoparticles". *Environmental Toxicology and Chemistry* 25(4):1132-1137
- Mackay D. (2002) "Multimedia environmental models: the fugacity approach". CRC Press, Boca Raton
- Maier T., Korting H. (2005) "Sunscreens wick and what for?" *Skin Pharmacology Application Skin Physiology* 18:253-62
- Masciangioli T., Zhang W.X. (2003) "Environmental technologies at the nanoscale" *Environmental Science & Technology* 102-108
- Maynard A.D., Aitken R.K., Butz T. (2006) "Safe handling of nanotechnology". *Nature* 444:267-269
- Meissner T., Potthoff A., Richter V. (2009). Suspension characterization as important key for toxicological investigations. *Journal of Physics: Conference Series* 170:1-6
- Menard A., Drobne D., Jemec A. (2011) "Ecotoxicity of nanosized TiO₂. Review of in vivo data". *Environmental pollution* 159:677-684
- Mironava T., Hadjiargyrou M., Simon M., Yurukovski V., Rafailovich M.H. (2010) "Gold nanoparticles cellular toxicity and recovery: effects of size, concentration and exposure time". *Nanotoxicology* 4:120-137

- Moore M.N. (2006) "Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment?" *Environmental International* 32:967-976
- Mueller N.C., Nowack B. (2008) "Exposure Modeling of Engineered Nanoparticles in the Environment". *Environmental Science & Technology* 42:4447-4453
- Nicoletti G.M., Notarnicola B., Tassielli G. (2002) "Comparative Life Cycle Assessment of flooring materials: ceramic vs. marble tiles". *Journal of Cleaner production*, 10(3), 283-296
- Novack B., Bucheli T.D. (2007) "Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment". *Environment Pollution* 150:5-22
- Oberdörster E. (2004) "Manufactured nanomaterials (Fullerenes C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass". *Environmental Health Perspect* 112:1058-1062
- OECD 201:1984 Guideline for testing of Chemicals: "Alga, Growth Inhibition Test".
- Ottofuelling S., Von Der Kammer F., Hofmann T. (2011) "Commercial titanium dioxide nanoparticles in both natural and synthetic water: comprehensive multidimensional testing and prediction of aggregation behavior". *Environmental Science & Technology* 45:10045–10052
- Pacchioni G. "Quanto è piccolo il mondo. Sorprese e speranze dalle nanotecnologie", Chiavi di lettura Zanichelli, Bologna (2008)
- Pais, A. "Subtle is the Lord: The Science and the Life of Albert Einstein". Oxford University Press (2005)
- Passarelli P., Sbalchiero A. Istituto di ricerca sulle acque "Notiziario dei metodi analitici: Test di inibizione algale con *Selenastrum Capricornutum* o *Pseudokirchneriella Subcapitata*"(2005)

- Praetorius A., Scheringer M., Hungerbühler K. (2012) "Development of environmental fate models for engineered nanoparticles-a case study of TiO₂ nanoparticles in the Rhine River". *Environmental Science & Technology* 46(12):6705-13
- Provini A., Galassi S., Marchetti R. "Ecologia Applicata" CittàStudiEdizioni, UTET, (1998)
- Quik J.T.K., Vonk J.A., Hansen S.F., Baun A., Van de Meent D. (2011) "How to assess exposure of aquatic organisms to manufactured nanoparticles?" *Environment International* 37:1068-1077
- Ramsden C.S., Smith T.J., Shaw B.J., Handy D.H. (2009) "Dietary exposure to titanium dioxide nanoparticles in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effect on growth, but subtle biochemical disturbances in the brain". *Ecotoxicology* 18:939-951
- Reeves J.F., Davies S.J, Dodd N.J.F., Jha A.N. (2008) "Hydroxyl radicals (OH) are associated with titanium dioxide (TiO₂) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells". *Mutation Research* 640:113-122
- REGOLAMENTO (CE) N. 66/2010 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 25 novembre 2009
- Reyes-Coronado D., Rodriguez-Gattorno G., Espinosa-Pesqueira M.E., Cab C., de Coss R., Oskam G. (2008) "Phase-Pure TiO₂ nanoparticles: anatase, brookite and rutile". *Nanotechnology* 19:10-19
- Rizzi F.R., Stoll S., Senesi N., Buffle J. (2004) "A transmission electron microscopy study of the fractal properties and aggregation processes of humic acids". *Soil Sciences* 169:765–775
- Roco M.C. (2003) "Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine". *Current Opinion in Biotechnology* 14:337-346

- Rosenbaum R.K., Margni M., Jolliet O. (2007) "A flexible matrix algebra framework for the multimedia multipathway modeling of emission to impacts". *Environment International* 33:624–634
- Royal Society (2004) "Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties". Report by the Royal Society and the Royal Academy of Engineering
- Sadiq I.M., Dalai S., Chandrasekaran N., Mukherjee A. (2011) "Ecotoxicity study of titania(TiO₂) NPs on two microalgae species: *Scenedesmus sp.* and *Chlorella sp.*". *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74:1180–1187
- Salieri B., Bauman J., Filser J., Koser J., D'amato R., Righi S. (2011) "Acute test on *Daphnia magna* with nano-TiO₂: the exposure influences the test results". 6th International Conference on the "Environmental Effects on nanoparticles and nanomaterials", Book of Abstract Nano 2011, N1.123, Royal Society, 19-22 September 2011, London
- Salieri B., Bauman J., Pasteris A., Koser J., D'amato R., Righi S., Filser J. (2012) "The influence of exposure mode in the hazard identification of metallic nanoparticles: the case of TiO₂ and *Daphnia magna*". 6th SETAC World Congress 2012, Securing a sustainable future: Integrating science policy and people. Edit by SCIENTIFIC COMMITTEE OF SETAC EUROPE. SETAC Europe 22st Annual Meeting Abstract Bok Part5, pag. 425
- Salieri B. "The challenges and the limitations in Life Cycle Impact Assessment for metal dioxide nanoparticles: a case study with n-TiO₂". Tesi di dottorato
- Serpone N., Dondi D., Albini A. (2007) "Inorganic and organic UV filters: their role and efficacy in sunscreens and suncare products". *Inorganica Chimica Acta* 360:794-802
- Shaw B.J, Handy R.D. (2011) "Physiological effects of nanoparticles on fish: A comparison of nanomaterials versus metal ions". *Environmental International* 37:1083-1097

- Smith A.M., Duan H., Rhyner M.N, Ruan G., Nie S. (2006) "A systematic examination of surface coatings on the optical and chemical properties of semiconductor Quantum Dots". *Physical Chemistry Chemical Physics* 8:3895-3903
- Smith C.J., Shaw B.J., Handy R.D. (2007) "Toxicity of single walled carbon nanotube to rainbows trout (*Oncorhynchus mykiss*): Respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects". *Aquatic toxicology* 82:94-109
- Strigul N., Vaccaria L., Galduna C., Waznea M., Liua X., Christodoulatos C., Jasinkiewicz K. (2009). "Acute toxicity of boron, titanium dioxide, and aluminum nanoparticles to *Daphnia Magna* and *Vibrio Fischeri*". *Desalination* 248, 771–782
- UNI 11006:2002 "Acqua destinata al consumo umano: Ricerca della clorofilla A"
- UNI EN ISO 8692:2005 "Prova d'inibizione della crescita di alghe d'acqua dolce per mezzo di alghe verdi unicellulari"
- Velzeboer I., Hendriks A.J., Ragas M.J., Ven de Meent D. (2008) "Aquatic ecotoxicity tests of some nanomaterials". *Environmental Toxicology and Chemistry* 27:1942-1947
- Vevers W.F., Jha A.N. (2008) "Genotoxic and cytotoxic potential of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles on fish cells in vitro". *Ecotoxicology* 17:410-420
- Vighi M., Bacci E. "Ecotossicologia", Edizione UTET (1998)
- Von der Kammer F., Ottofuelling S., Hofmann T. (2010) "Assessment of the physico-chemical behavior of titanium dioxide nanoparticles in aquatic environments using multi-dimensional parameter testing". *Environmental Pollution* 158:3472-3481
- Walker C.H., Hopkin S.P., Sibly R.M., Peakall D.B. "Principles of Ecotoxicology", Taylor & Francis (2006)

- Wang J., Zhang X., Chen Y., Sommerfeld M., Hu Q. (2008) "Toxicity assessment of manufactured nanomaterials using the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*". *Chemosphere* 73:1121-1128
- Wang J.J., Sanderson B.J.S., Wang H. (2007) "Cyto and genotoxicity of ultrafine TiO₂ particles in cultured human lymphoblastoid cells". *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental* 628:99-106
- Wang., Jing L., Zhao J., Baoshan X. (2011) "Toxicity and Internalization of CuO Nanoparticles to Prokaryotic Alga *Microcystis Aeruginosa* as Affected by Dissolved Organic Matter". *Environmental Science & Technology* 45:6032–6040
- Warheit D.B., Hansen J.F., Yuen I.S., Kelly D.P., Snajdr S., Hartsky M.A. (1997) "Inhalation of high concentration of low toxicity dusts in rats results in pulmonary and macrophage clearance impairments". *Toxicology Applied Pharmacology* 145:10-22
- Warheit D.B., Hoke R.A., Finlay C., Donner E.M., Reed K.L., Christie M.Sayes (2007) "Development of a base set of toxicity test using ultrafine TiO₂ particles as a component of nanoparticle risk management". *Science Direct- DuPont Haskell Laboratory for Health and Environmental Sciences* 171:99-110
- Warheit D.B., Webb T.R., Reed K.L., Frerichs S., Sayes C.M. (2007) " Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO₂ particles: differential responses related to surface properties". *Toxicology* 230:90-104
- Wiench K., Wohlleben W., Hisgen V., Radke K., Salinas E., Zok S., Landsiedel R. (2009). "Acute and chronic effects of nano- and non-nano-scale TiO₂ and ZnO particles on mobility and reproduction of the freshwater invertebrate *Daphnia magna*". *Chemosphere* 76, 1356-1365
- Wiesner M.R., Lowry G.V., Alvarez P., Dionysiou D., Biswas P. (2006) "Assessing the risks of manufactured nanomaterials". *Environmental Science & Technology* 40:4336-4345

- Wiesner M.R., Lowry G.V., Jones K.L. (2009) “Decreasing uncertainties in assessing environmental exposure, risk, and ecological implications of nanomaterials”. *Environmental Sciences & Technology* 40:4336–4345
- Xiong D., Fang T., Yu L., Sima X., Zhu W. (2011) “Effects of nano-scale TiO₂, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: Acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage”. *Science of the Total Environment* 409:1444-1452
- Zhang W.S. (2003) “Nanoscale iron particles for environmental remediation: an overview”. *Journal Nanoparticle Research* 5:323–332
- Zhang X.Z., Sun H.W. (2006) “Determination of TiO₂ nanoparticles with spectrometer”. *Journal of Safety and Environment* 6(2): 36-38
- Zhu X., Chang Y., Chen Y. (2010). “Toxicity and bioaccumulation of TiO₂ nanoparticle aggregates in *Daphnia magna*”. *Chemosphere* 78, 209-215
- Zhu X., Zhu L., Chen Y., Tian S. (2009). “Acute toxicities of six manufactured nanomaterial suspensions to *Daphnia magna*”. *Journal of Nanoparticle Research* 11, 67-75
- Zhu X., Zhu L., Duan Z., Qi R., Li Y., Lang Y. (2008) “Comparative toxicity of several metal oxide nanoparticle aqueous suspensions to Zebrafish (*Danio rerio*) early developmental stage”. *Journal of environmental science and health. Part A: toxic/hazardous substances ; Environmental engineering* 43(3):278-284

SITOGRAFIA

[1] www.greenactions.it

[2] <http://blogtecnologie.altervista.org/>

[3] www.biogenerica.it

