



## **Nanoparticelle negli alimenti ed effetti sulla salute umana**

Revisione critica della letteratura scientifica pubblicata al Novembre 2007

Milano, febbraio 2008

## **1. Introduzione**

### **1.1. Definizione di nanoparticelle**

Con il termine “nanoparticelle” (NP) si identificano nanostrutture particolate, che possono avere varia forma, ma che hanno almeno una dimensione nella scala “nano”, ossia inferiore a 100 nanometri (nm) (tabella 1). Le NP possono assumere forma sferica oppure tubulare, filamentosa o essere di forma irregolare, possono essere formate da vari materiali, e possono esistere allo stato disperso o in forma fusa, aggregata e agglomerata.

Caratteristica comune delle NP è quella, a causa delle loro dimensioni, di possedere proprietà e caratteristiche differenti da quelle della specie chimica parentale. Le NP hanno infatti superficie esposta molto maggiore a parità di massa rispetto allo stesso materiale in forma di macroparticella e questo aumenta in modo esponenziale la loro reattività chimica e biologica.

Le NP possono avere origine naturale, ed essere prodotte ad esempio dai processi di combustione naturali (vulcani, incendi spontanei) oppure avere origine antropogenica (originano dal traffico veicolare in particolare dai motori diesel, inceneritori, industrie, riscaldamento domestico). Esistono poi NP artificiali, o ingegnerizzate, ossia appositamente prodotte dalle nanotecnologie a livello industriale per svolgere scopi tecnologici a vari livelli e in vari campi scientifici e industriali (con il termine “nanotecnologie” si intende lo sviluppo, la fabbricazione, la misurazione e lo studio di materiali e di sistemi di dimensioni dell’ordine dei nm).

Tabella 1: dimensioni di alcune strutture atomiche, molecolari, cellulari, viventi

Struttura	Dimensioni
atomo:	0.1 nm (raggio covalente atomico dei metalli)
elica DNA:	1 nm
virus, piccole proteine:	10 nm
cromosoma, grosse proteine:	100 nm
batteri, eritrociti, cellule:	1000 nm (1 $\mu$ m)
acari:	10.000 nm (10 $\mu$ m)

## 1.2 Nanotecnologie e NP artificiali

Le NP artificiali, o “ingegnerizzate” trovano già attualmente impiego nella fabbricazione di prodotti di largo consumo. Ad esempio NP di  $\text{TiO}_2$  sono impiegate nelle vernici, mentre NP di  $\text{ZnO}$  e di  $\text{TiO}_2$  sono impiegate nella produzione di creme protettive solari. Molte altre applicazioni sono in fase di sviluppo, nella farmacologia (per la somministrazione mirata di farmaci, o “*targeted drug delivery*”), cosmetici, ricoperture autopulenti, lubrificanti industriali, pneumatici speciali, bicchieri autopulenti, semiconduttori, computer, industria elettronica e nelle procedure di decontaminazione dell’ambiente inquinato.

Lo sviluppo delle nanotecnologie nell’industria *high-tech* rappresenta e rappresenterà sempre di più un’altra e importante fonte di esposizione dell’uomo alle NP. Nel 2005 negli USA sono state censite 1645 compagnie commerciali nel ramo delle nanotecnologie, con una produzione di nanomateriali stimata nell’ordine delle migliaia di tonnellate/anno e con una tendenza esponenziale alla crescita della produzione (Powell, 2006).

Le NP artificiali possono avere varie forme. Principalmente si distinguono nanopolveri, nanotubi e fullereni. Nanopolveri di silice e di allumina trovano impiego negli abrasivi per la lucidatura e la pulizia dei dischi rigidi dei PC, mentre nanopolveri di ossido di zinco o di biossido di titanio sono disperse nelle creme protettive solari migliorando l’azione schermante ai raggi UV. Le nanopolveri a base di ossido di ferro o di biossido di titanio conferiscono alle vernici ed alle tinture nelle quali vengono disperse miglior resistenza al graffio, maggiore facilità di pulizia e maggiore resistenza ai solventi organici.

I fullereni sono delle gabbie sferiche formate da un arrangiamento ordinato di strutture esagonali e pentagonali di atomi di carbonio. La quantità di poligoni presenti e la loro relativa proporzione determinano le dimensioni e la forma del fullereni. I fullereni maggiormente utilizzati, costituiti da 60 atomi di carbonio, hanno ad esempio forma sferica (Singh and Nalwa, 2007).

I nanotubi possono avere parete singola o multipla. Quelli a parete singola possono essere descritti come un tubo costituito da uno strato di carbonio arrotolato su se stesso e racchiuso alle due estremità da due calotte emisferiche. Il loro diametro generalmente non supera i 10 nm e per lo più è al di sotto dei 2 nm. I nanotubi a parete multipla sono costituiti da più nanotubi a parete singola concentrici. Nanotubi e fullereni trovano impiego come nano-dispersori. Le potenzialità innovative offerte da queste nanoparticelle sono ancora in gran parte ignote, essendo attualmente oggetto di studio e di ricerca applicata. Attualmente sono impiegati nell’industria cosmetica (creme protettive solari), elettronica (transistor), metallurgica (leghe e metalli leggeri e resistenti), automobilistica

(additivi di vernici antigraffio e nelle mescole dei pneumatici) e negli attrezzi sportivi (nelle scioline per sci, nelle mazze da golf e nelle racchette e palle da tennis).

L'avvento delle nanotecnologie è considerato da alcuni la maggior innovazione ingegneristica dalla rivoluzione industriale (Gwinn MR et al., 2006). I proponenti di questa visione promettono nel prossimo futuro di riformare ogni branca della tecnologia, e di rendere disponibile un'infinità di nuovi prodotti commerciali in grado di rivoluzionare ogni aspetto della vita umana. Si stima che il mercato mondiale delle nanotecnologie possa raggiungere un giro d'affari pari a 1 trilione di \$ annui entro il 2015. In molti campi, ad esempio, in medicina le potenzialità delle NP sono considerate infinite, ma questo presuppone anche un aumento dell'esposizione umana alle NP e offre possibili scenari di rischio per la salute dell'uomo (Editorial, Consumer Report, 2007). Lo sviluppo esponenziale e l'utilizzo incontrollato delle nanotecnologie implica anche la teorica possibilità che le NP possano diventare "l'asbesto" del 21° secolo, ossia sottendere rischi per la salute umana che verranno identificati solo tardivamente. E' quindi indispensabile che le NP vengano considerate da entrambi i punti di vista, per i vantaggi che possono produrre, ma anche per i rischi che teoricamente possono comportare.

### Punti Chiave 1.

*Le NP sono particelle o strutture, di varia forma e di diversa composizione, con dimensioni nella scala nano (<100 nm) che in natura corrisponde alla dimensione di proteine e virus. Le NP si distinguono in NP naturali (vulcani), NP antropogeniche (motori diesel), e NP artificiali (prodotte attraverso le nanotecnologie).*

*Mentre l'uomo è da lungo tempo esposto alle NP naturali e antropogeniche, le NP artificiali sono invece agenti nuovi, a cui l'uomo inizia ora ad essere esposto e a cui sarà probabilmente esposto in misura sempre crescente nel prossimo futuro.*

*Se le nanotecnologie sono considerate un passo importante nello sviluppo scientifico e tecnologico, sono anche viste come un nuovo potenziale pericolo per la salute umana, tuttora impossibile da valutare a causa della mancanza di dati. Sono però attualmente in corso molti studi specifici, che si prevede produrranno in pochi anni una massa di risultati sufficiente ad una efficace attività regolatoria e a una politica normativa delle nanotecnologie. Questi dati renderanno probabilmente possibile anche una valutazione del rischio delle NP naturali e antropogeniche, tuttora largamente impossibile.*

## **2. NP e alimenti**

Alcune delle “nanoparticelle” o “nanostrutture” che si ritrovano negli alimenti sono composti endogeni molto comuni. Ad esempio le proteine sono strutture globulari di dimensioni dell’ordine dei 10-100 nm , ossia vere e proprie NP (tabella 1). La ferritina è una proteina di circa 10 nm di diametro costituita da un core di atomi di ferro incapsulati in un rivestimento proteico. La maggior parte dei polisaccaridi e dei lipidi sono polimeri lineari di spessore <1 nm, e quindi sono esempi di nanostrutture mono-dimensionali. Nelle schiume e emulsioni si formano nanostrutture bidimensionali, di spessore mono-molecolare a livello dell’interfaccia aria-acqua o olio-acqua. Oltre a queste NP endogene a livello degli alimenti si ritrovano anche NP esogene, che possono essere classificate in intenzionali ed accidentali. Quelle intenzionali sono NP artificiali, appositamente prodotte per svolgere uno scopo tecnologico e possono comparire negli alimenti o perché appositamente aggiunte per svolgere la particolare funzione, oppure perché disperse nell’ambiente e quindi rientrate come contaminanti indiretti degli alimenti (nel considerare i rischi connessi alla presenza di NP negli alimenti, occorre quindi considerare anche questo utilizzo intenzionale delle NP). Le NP accidentali si possono a loro volta distinguere in contaminanti primari, presenti nell’alimento primario (contaminano l’alimento in natura provenendo o dall’ambiente o dall’atmosfera. Ad esempio le radici dei vegetali di cui si nutrono uomini o animali da carne, possono assorbire NP disperse nell’ambiente che entrano così nella catena alimentare, mentre NP metalliche di origine industriale possono depositarsi e contaminare frutta e verdura) e in contaminanti secondari, ossia NP aggiunte involontariamente o accidentalmente all’alimento durante la lavorazione (esempio NP metalliche derivate dalla frammentazione delle lame di taglio o di altre apparecchiature utilizzate nelle varie fasi di processazione).

Le NP sono per lo più costituite da silicio, carbonio e metalli. In termini di valutazione del rischio, le maggiori preoccupazioni per la salute umana derivano dalle NP composte da metalli. Queste possono accedere all’organismo umano tramite l’alimentazione, ma la via respiratoria rimane la via principale di esposizione per l’uomo e il particolato atmosferico urbano rimane la fonte principale di origine, mentre i pochi studi a disposizione mostrano che la via cutanea non sembra contribuire in maniera significativa all’esposizione. Questa affermazione rimane però presuntiva dato che non esistono studi sufficienti a caratterizzare l’assorbimento di NP né per ingestione né attraverso la cute (Warheit DB et al, 2007).

Negli UK è stato comunque calcolato un *intake* medio per via orale di NP di varia natura superiore a  $10^{12}$  NP/giorno per persona (M Lomer, 2002). Circa  $10^{12}$  NP/giorno sarebbero per i soli additivi

alimentari. Secondo gli Autori, si tratta in genere di particelle (sia NP che microparticelle) gastroresistenti che arrivano a livello intestinale, dove possono essere assorbite. In base a quanto visto studiando il destino ambientale delle NP è però anche possibile che molte di queste, in fase di dispersione liquida a livello enterico, agglomerino in formazioni di dimensioni superiori, che riduce le potenzialità di assorbimento da parte della mucosa intestinale.

A livello del lume gastro-intestinale, oltre alle NP ingerite, si possono inoltre identificare anche NP endogene, in forma di cristalli formati dalla precipitazione in loco di sali parzialmente solubili ad esempio sali di Ca e P (idrossiapatite).

### 2.1 Nanotecnologie e alimenti

Le nanotecnologie hanno potenzialmente un grande interesse a livello dell'industria alimentare. Comprendere la natura delle nanostrutture negli alimenti permette una miglior selezione degli ingredienti e consente di migliorare la qualità dei cibi attraverso una processazione più razionale. Senza informazioni dettagliate selezione e lavorazione degli ingredienti sono empiriche. I metodi microscopici sviluppati per studiare le nanostrutture, come gli *atomic force microscope* (AFM) permettono invece di guardare a questi complessi sistemi. Un buon esempio delle possibilità delle nanotecnologie in alimentazione è in come hanno migliorato il modo di controllare la qualità di schiume e emulsioni. La struttura di schiume e emulsioni si basa su bollicine di gas o goccioline di grassi o oli in un medium liquido. Questo implica la produzione di una interfaccia aria-acqua o olio-acqua, e le molecole presenti a questa interfaccia determineranno la stabilità. Queste strutture hanno lo spessore di una molecola e sono esempi di nanostrutture bidimensionali. In molti cibi la presenza contemporanea di proteine e di surfattanti all'interfaccia rappresenta una fonte di instabilità che può causare collasso delle schiume e emulsioni. Proteine e surfattanti tendono infatti a stabilizzare l'interfaccia ma con meccanismi che sono mutuamente incompatibili. Lo studio mediante AFM delle relazioni tra ingredienti, surfattanti e *network* proteici è in grado di identificare strategie specifiche per stabilizzare schiume ed emulsioni negli alimenti. L'utilizzo di ingredienti a livello dimensionale delle NP può permettere inoltre applicazioni altrimenti impossibili. NP di carotenoidi possono essere disperse in acqua permettendo così la loro aggiunta a bevande e succhi di frutta con elevata biodisponibilità. Un licopene sintetico in forma di NP prodotto dalla BASF è stato recentemente sottoposto a test tossicologici dalla US FDA ed è stato dichiarato GRAS (*generally recognized as safe*) (Sealy, 2006). Questo stato di "GRAS" implica che per la salute umana

l'assorbimento delle NP di questo licopene sintetico è considerato alla stessa stregua dell'assorbimento dei carotenoidi derivati da vegetali naturali (IFST Information Statement, 2006). Un altro possibile problema riguardo all'interazione tra NP e cibo è la potenziale e involontaria introduzione negli alimenti di NP provenienti da involucri e confezioni. L'esempio è dato dal  $\text{TiO}_2$ . Il  $\text{TiO}_2$  è un colorante alimentare autorizzato (E 171) con un ADI (*Acceptable Daily Intake*) "non specificato". Questo significa che non esistono ragioni tossicologiche per regolamentare e restringere da un punto di vista quantitativo il suo impiego in alimentazione. La valutazione della sicurezza di questo materiale si basa sul fatto che il  $\text{TiO}_2$  viene considerato non assorbibile e quindi non accumulabile nei tessuti di molte specie animali, tra cui l'uomo. A causa delle sue proprietà di bianchezza e brillantezza e il suo elevato indice di rifrazione, il  $\text{TiO}_2$  è ampiamente utilizzato nella fabbricazione della carta e, a causa della sua resistenza alle radiazioni UV, nelle plastiche utilizzate negli imballaggi alimentari. Il  $\text{TiO}_2$  è anche usato direttamente nei cibi ad esempio nelle glassature dei prodotti dolciari, dove è usato per costituire una base bianca su cui poi aggiungere altri componenti colorati, di cui ne aumenterà la brillantezza, e anche come chiarificante (*clouding agent*) in miscele disidratate per bevande. Mentre il  $\text{TiO}_2$  in forma convenzionale (costituito da microparticelle di 200 nm di diametro) è bianco, lo stesso materiale in forma di NP (10-100 nm) è invece trasparente ma conserva la resistenza agli UV. L'utilizzo di NP di  $\text{TiO}_2$  ha portato allo sviluppo di creme e lozioni solari trasparenti. Attualmente NP di  $\text{TiO}_2$  sono vendute da molte compagnie che promuovono il loro utilizzo anche in imballaggi e contenitori per alimenti. La trasparenza delle NP permette il loro utilizzo come filler nei film trasparenti e nei contenitori di plastica. Questi materiali sono considerati "*food approved*" sebbene gli studi di sicurezza siano antecedenti alla formulazione di questo materiale in NP e si riferiscano quindi al  $\text{TiO}_2$  in forma di macro-particelle. E' probabile che il  $\text{TiO}_2$  in forma di NP abbia maggior possibilità di penetrare tessuti e cellule e quindi di essere maggiormente assorbito rispetto al  $\text{TiO}_2$  in forma convenzionale.

## 2.2. Regolamentazione delle NP artificiali negli alimenti

Casi come il precedente, assieme alle previsioni di un sempre più ampio utilizzo delle NP nell'industria alimentare hanno stimolato una discussione sul se, per un materiale in forma di NP, sia sufficiente estendere la valutazione del rischio effettuata con dati di tossicità ottenuti dal materiale in forma *bulk*. L'orientamento prevalente è quello di considerare il materiale in forma di NP come un materiale nuovo, e in caso se ne prevedano utilizzi alimentari, di considerarlo come un

nuovo alimento che richiede quindi una nuova valutazione completa di tipo tossicologico. In Europa e NP rientreranno quindi nell'ambito della valutazione REACH per i nuovi materiali, oppure in quella dei "Novel Food" qualora utilizzate in ambito alimentare. Un problema importante è quello relativo ai metodi che verranno utilizzati per la valutazione di rischio delle NP. I metodi tradizionali utilizzati per il risk assessment dei materiali o degli alimenti in forma *bulk* o di macroparticolato non sembrano adeguati per lo studio delle NP. Molte agenzie nazionali e internazionali hanno quindi commissionato studi di valutazione, chiedendo a commissioni e gruppi di esperti l'elaborazione di strategie per la definizione del rischio comportato dall'utilizzo industriale delle NP sia in alimentazione che in altri ambiti industriali che possono portare alla contaminazione ambientale (Tra le altre SCENIHR della Commissione Europea, US EPA, UK DEFRA, Institute of Occupational Medicine e altre agenzie). Per ora la maggior parte degli studi ha semplicemente identificato le informazioni mancanti per la definizione del rischio delle NP, ed ha indicato una serie di goal che devono essere raggiunti nei prossimi anni. Se ne desume che attualmente le informazioni disponibili sono così scarse che non esistono neppure i presupposti per una corretta definizione del rischio connesso alle NP artificiali.

Studi di laboratorio indicano che le NP ingegnerizzate e disperse nell'ambiente possono essere captate da organismi ambientali e quindi possano costituire dei contaminanti involontari degli alimenti (Boxall et al, 2007). Anche per questo aspetto della valutazione del rischio i dati disponibili sono considerati insufficienti e per valutare la trasferibilità all'uomo attraverso la catena alimentare e l'importanza per la salute di questa via di esposizione è necessaria una più approfondita valutazione della possibilità di passaggio di NP dall'acqua ai pesci e dal suolo ai prodotti vegetali e da questi agli animali da carne o da latte.

### Punti Chiave 2.

*Negli alimenti si ritrovano comunemente NP, sia NP endogene (proteine, come la ferritina) che NP esogene, volontarie (NP artificiali, ad esempio coloranti come TiO<sub>2</sub>) o accidentali (contaminanti primari o secondari, derivati dalla processazione dell'alimento). L'uomo, oltre che con gli alimenti, può ingerire NP che arrivano dalla clearance muco-ciliare delle NP inalate. Nel lume gastro-intestinale, oltre alle NP ingerite, si possono inoltre incontrare NP endogene, in forma di nano-cristalli originati dalla precipitazione intra-luminale di sali parzialmente solubili.*

*L'apparato gastro-intestinale umano è quindi continuamente esposto a numerose NP, di varia origine, forma, dimensione e composizione. Negli UK è stata stimata una ingestione giornaliera tra  $10^{12}$  e  $10^{13}$  NP per persona.*

*Queste quantità sono probabilmente destinate ad aumentare nel prossimo futuro, a causa degli utilizzi previsti delle NP artificiali, sia in alimentazione che in altri campi correlati a una possibile ingestione (dentifrici, cosmetici, vernici) che si stanno diffondendo, o sono stati proposti. Dal punto di vista normativo, l'orientamento prevalente è quello di considerare le NP come nuovi materiali, differenti dalla specie chimica parentale, da sottoporre ad esame tossicologico completo, nell'ambito del REACH o della regolamentazione relativa ai "Novel Food".*

### **3. Farmacocinetica delle NP.**

Questo capitolo raccoglie i dati pubblicati in letteratura relativi ad assorbimento distribuzione, metabolismo, ed escrezione delle NP nell'animale da esperimento e nell'uomo.

#### **3.1. Assorbimento delle NP**

Le potenziali vie di ingresso delle NP nel corpo umano sono almeno quattro: la via respiratoria, la cute, l'apparato gastro-intestinale e l'epitelio nasale con successivo trasporto da parte dell'innervazione olfattiva. Oltre a queste è possibile un assorbimento parenterale per iniezione di farmaci a base di, o contenenti, NP ingegnerizzate.

##### **3.1.1 Assorbimento per via respiratoria.**

Nel polmone i siti e le percentuali di deposizione delle NP inalate dipendono dal loro diametro e dalle caratteristiche aerodinamiche. Dimensioni e forma sono importanti per determinare quale compartimento del sistema respiratorio risulterà prevalentemente esposto, vie aeree superiori, vie aeree inferiori o alveoli. Le NP di piccole dimensioni avranno la possibilità di procedere più profondamente a livello dell'albero respiratorio, di depositarsi e di essere assorbite dall'epitelio polmonare entrando in circolo, mentre particelle di diametro superiore verranno più facilmente fermate a livello dell'albero respiratorio superiore e successivamente espulse mediante meccanismi di *clearance* muco-ciliare (Nel et al, 2006).

Recentemente, alcuni studi sull'animale e sull'uomo hanno mostrato che è possibile la traslocazione di NP inalate a siti extrapolmonari, come l'albero circolatorio, cuore, fegato e cervello (Gwinn MR et al., 2006). Sebbene il meccanismo attraverso cui avviene la traslocazione sia ancora incerto, questi studi danno sostegno all'ipotesi che le NP possano effettivamente esercitare effetti patologici diretti a livello degli organi extrapolmonari. Una volta giunte agli alveoli, le NP penetrano più profondamente delle particelle più grosse a livello dell'interstizio polmonare e questo aumenta il tempo di ritenzione nell'interstizio e le probabilità di captazione. Le NP, una volta traslocate possono poi essere in parte fagocitate dalle cellule fagocitiche e rimanere a livello polmonare, oppure possono evitare la fagocitosi ed entrare in circolo (Gwinn MR et al., 2006).

In uno studio di inalazione del ratto con NP marcate con  $C^{13}$  è stato visto un accumulo di  $C^{13}$  nel fegato che iniziava 30 minuti dopo l'inizio dell'inalazione e si completava nel giro di 24 ore.

Secondo alcuni autori (Hoet et al., 2004) la fagocitosi da parte dei macrofagi alveolari e l'endocitosi da parte delle cellule epiteliali ed endoteliali, rappresentano le maggiori vie di traslocazione delle NP dal polmone alla circolazione e agli organi extrapolmonari.

Inoltre, le NP inalate possono raggiungere il cervello, oltre che attraverso la circolazione, anche attraverso i nervi olfattivi dopo loro assorbimento a livello della mucosa olfattiva. In questo caso è stato calcolato che il trasporto delle NP nel nervo olfattivo del ratto proceda alla velocità di 2.5 mm/ora.

### 3.1.2 Assorbimento cutaneo

Le possibilità di trasporto delle NP attraverso la cute indenne sono tuttora controverse, soprattutto per particelle di dimensioni superiori a 1  $\mu\text{m}$ , mentre vi è accordo che esiste la possibilità di trasporto trans-dermico in caso di cute lesionata. Uno studio recente ha però evidenziato che NP molto piccole, ad esempio i “*quantum dots*” di circa 7 nm di diametro possono superare l'epidermide e accedere direttamente al derma (Ryman-Rasmussen et al. 2006). Dimostrata è anche la penetrazione di NP di  $\text{TiO}_2$  dalle creme solari attraverso lo stato corneo e l'orifizio dei follicoli piliferi (Gwinn MR et al., 2006). Forma, dimensione e carica di superficie delle NP sembrano essere le principali variabili fisiche che determinano le possibilità di penetrazione delle NP attraverso la cute.

Una volta penetrate nel derma le NP possono raggiungere i vasi linfatici, trasportate dai macrofagi e dalle cellule dendritiche. Dal circolo linfatico si suppone poi che le NP possano accedere al circolo sanguigno ed essere distribuite a tutto il corpo (Gwinn MR et al., 2006).

### 3.1.3 Assorbimento gastro-intestinale

NP e microparticelle (100-3000 nm) sono ingerite in quantitativi stimati tra  $10^{12}$  e  $10^{14}$  particelle al giorno per persona (stime negli UK). Principalmente si tratta di NP di silicati e di biossido di titanio ( $\text{TiO}_2$ ) incluse negli alimenti, in altri prodotti come dentifrici e cosmetici, oppure nelle vernici (Lomer et al. 2002). In base ad uno studio di market basket negli UK, si considera che il solo  $\text{TiO}_2$  possa incidere per  $10^{12}$  -  $10^{13}$  particelle al giorno, di diametro medio 200 nm (complessivamente 200 mg/giorno a persona) (Lomer et al., 2000).

Una volta ingerite le NP vengono veicolate allo stomaco e sottoposte ai normali processi digestivi che potrebbero essere in grado di attaccarle. Uno studio recente ha mostrato che NP di rame di 23.5 nm vengono degradate a livello dello stomaco di ratto, *in vivo*, originando rame in forma ionica ( $\text{CuCl}$ ) (Chen Z et al. 2006). Nel tratto enterico la cinetica dell'assorbimento delle NP è complessa e

avviene mediante diffusione attraverso lo strato di muco, contatto con gli enterociti, “trafficking” cellulare, traslocazione e eventi post traslocazione. Minore è il diametro della NP e più veloce sarà il processo complessivo di assorbimento. Dopo l'*uptake* le NP possono traslocare al circolo e distribuirsi in tutto il corpo (Jani et al., 1990). Le NP, se sopravvivono alla digestione gastrica, possono essere quindi assorbite a livello enterico attraverso meccanismi di ingresso che coinvolgono le cellule M delle placche del Peyer e i follicoli linfatici. Esiste inoltre anche una possibilità di assorbimento diretto attraverso le cellule epiteliali intestinali.

La traslocazione delle particelle ingerite da lume intestinale a sangue e circolo sistemico può essere influenzata da proprietà chimico-fisiche delle NP come dimensione, forma, composizione e carica. Che la traslocazione possa effettivamente avvenire è suggerito da studi sia sul ratto che sull'uomo, che hanno mostrato che NP di  $\text{TiO}_2$  di dimensione 150-500 nm una volta ingerite possono traslocare al circolo sistemico e accumularsi a livello di fegato e milza (Jani et al., 1994). Studi precedenti mostravano che anche particelle di dimensioni superiori potevano essere assorbite con meccanismi di “persorption”, entro vacuoli, e attraversare così l'epitelio intestinale per localizzarsi a livello di fegato e altri organi (Volkheimer, 1974; Hillery and Albrecht, 2001).

Le evidenze non sono però univoche. Altri studi mostrano infatti che NP metalliche ultrafini non sembrano essere soggette a questo fenomeno e che, una volta ingerite, non sono traslocate in maniera significativa al circolo sistemico e da qui agli organi. Ad esempio, uno studio mostra che la somministrazione intra-esofagea nel ratto di una sospensione di particelle di  $^{192}\text{Ir}$  di diametro 18 nm, risultava nell'eliminazione fecale completa delle NP di iridio nel corso di 2-3 giorni, senza evidenze di eliminazione di  $^{192}\text{Ir}$  nelle urine e senza nessun rilevabile accumulo di NP o di radioattività in alcun organo degli animali sperimentali (Semmler et al. 2004). Questo studio suggerisce quindi che NP di  $^{192}\text{Ir}$  di 30 nm non vengono assorbite in misura apprezzabile dal lume intestinale del ratto e non traslocano alla circolazione sistemica e agli organi.

Lo stesso hanno mostrato Kanapilly e Diel e Kreyling et al : NP metalliche radioattive non sembrano traslocare in maniera significativa dal lume gastroenterico al circolo e agli organi del ratto una volta ingerite (Vedi Referenze 84 e 53 di Borm et al., 2006).

### 3.2 Distribuzione delle NP

Le NP inalate, una volta assorbite dall'albero respiratorio, possono traslocare all'encefalo attraverso la circolazione sistemica (Oberdorster 2004). Un'altra possibilità per raggiungere l'encefalo è il passaggio delle NP attraverso l'epitelio sensitivo o attraverso l'epitelio olfattivo, seguendo i neuroni

olfattivi, fino ai lobi olfattivi dell'encefalo. Le NP possono quindi raggiungere lobi olfattivi e cervelletto o attraverso queste vie nervose o attraverso la circolazione sistemica. Dopo inalazione, l'uptake di NP di iridio di 18 nm e la loro distribuzione al cervello tramite la circolazione sistemica è stata dimostrata da Semmler e collaboratori. Nel ratto, le NP inalate possono inoltre traslocare dal polmone a fegato, rene, milza, cuore e cervello e rimanere per circa 6 mesi dopo una singola esposizione, probabilmente captati dai macrofagi o dalle altre cellule del sistema reticolo-endoteliale di questi organi (Semmler et al. 2004).

### 3.3. Metabolismo ed escrezione delle NP.

In generale, sostanze nella forma fisica di particelle solide non vengono efficientemente metabolizzate nel corpo umano. Non esistono però studi che abbiano effettivamente valutato il destino metabolico delle NP. Alcune NP, quali i nanotubi di carbonio una volta assorbiti possono essere escreti direttamente come tali o subire biotrasformazione. I nanotubi di carbonio, a causa di difetti strutturali possono infatti esporre gruppi idrossilici o carbossilici sulla loro superficie, che li espone a possibili attacchi chimico-enzimatici e a degradazione metabolica.

A causa della loro dimensione è possibile che molte NP entrate in circolo possano venire semplicemente filtrate a livello glomerulare ed essere direttamente eliminate con le urine (Choi et al., 2007). NP più persistenti potrebbero invece essere trattenute a livello epatico e secrete con la bile, ed essere eliminate con le feci oppure essere sempre filtrate a livello glomerulare ed eliminate con le urine. Come già detto, non esistono però studi specifici a riguardo. Alcuni studi mostrano però che alcune NP come i nanotubi di carbonio possono essere derivatizzati e divenire idrosolubili. In questa forma, se iniettati per via endovenosa nel ratto, non vengono captate dal sistema reticolo-endoteliale degli organi ma vengono eliminati con le urine (Singh et al. 2006).

Un altro studio recente mostra che NP d'oro di 2 nm iniettate per via endovenosa, venivano escrete per via fecale. Questo implica che le NP venissero captate a livello epatico ed escrete nell'intestino con la bile (Vedi Kreyling et al., citato nel Research Report di Tran et al, Institute of Occupational Medicine).

### *Punti Chiave 3.*

*Le potenziali porte di ingresso delle NP nel corpo umano sono almeno quattro: polmone, cute, apparato gastro-intestinale e epitelio nasale. I dati disponibili non sono in genere univoci, e per lo*

*più ottenuti nell'animale da esperimento e non confermati nell'uomo, ma sembra accettata l'ipotesi che si possa verificare assorbimento e traslocazione al circolo sistemico e agli organi, sia dopo inalazione che ingestione, mentre i dati relativi all'assorbimento cutaneo sono controversi. Particolare è la possibilità, sempre dimostrata esclusivamente nell'animale, che in seguito a inalazione le NP possano essere captate dall'epitelio nasale e raggiungere l'encefalo seguendo l'innervazione olfattiva. I dati disponibili non sono però univoci ed alcune NP non sembrano assorbite, probabilmente in relazione a differenze di forma, dimensione e composizione. Inoltre a livello gastrico alcune NP possono essere ionizzate, portando quindi all'eliminazione della struttura fisica della NP stessa (esempio per le NP di CuO).*

*Non esistono invece dati sufficienti a descrivere il destino delle NP dopo assorbimento e traslocazione. Secondo alcuni studi NP potrebbero localizzarsi ad organi, come fegato, milza, o apparato cardiovascolare, ed entrare nelle cellule, oppure essere captate dalle cellule macrofagiche del sistema reticolo-endoteliale, e permanere anche per lunghi periodi di tempo. Questi studi sono generalmente fatti nell'animale da esperimento, ma alcuni studi mostrano anche l'occasionale riscontro di NP a livello di tessuti patologici umani. Altri studi mostrano però che le NP possono anche essere efficientemente eliminate per via renale o per via biliare. I dati sono però spesso controversi e insufficienti a descrivere il destino metabolico delle NP dopo traslocazione.*

#### **4. Tossicità delle NP.**

Gli studi di tossicità delle NP reperibili in letteratura sono in genere di due tipi: studi epidemiologici degli effetti sull'uomo del particolato atmosferico urbano, e studi sperimentali *in vivo* nell'animale e *in vitro* su colture cellulari condotti con NP artificiali. Un elemento che appare subito evidente nell'analisi della letteratura è l'impossibilità di generalizzare il profilo tossicologico delle NP. NP differenti per forma dimensioni e composizione hanno in genere caratteristiche tossicologiche diverse (Geo Year Book 2007). Secondo il gruppo di esperti sui rischi emergenti, della Commissione Europea (SCENIRH) le NP hanno proprietà tossicologiche diverse dalle sostanze di origine e vi è quindi la necessità di valutare i rischi "caso per caso". Inoltre, alcuni studi mostrano che non sempre le NP hanno tossicità maggiore delle sostanze di origine (SCENIRH, European Commission, 2007).

##### **4.1. NP e particolato urbano**

L'uomo è sempre stato esposto a NP in qualunque momento storico, dato che molte di esse sono di produzione naturale. L'esposizione a NP è però notevolmente cresciuta nell'ultimo secolo a causa dello sviluppo industriale. Oggigiorno, le NP costituiscono una parte importante del particolato atmosferico urbano, che è una miscela complessa di particelle con diametro tra pochi nm e 100µm. Solo la frazione con diametro < 2.5 µm è però in grado di accedere alle vie respiratorie inferiori e di depositarsi a livello alveolare (Borm et al., 2006). Molte delle particelle originate dalla combustione di combustibili fossili o formate dalla reazione dei gas che originano da tale combustione, hanno diametro inferiore al µm. Una tipica atmosfera urbana contiene circa  $10^7$  particelle /cm<sup>3</sup> con diametro < 300nm (Medina et al., 2007). Il carbonio è l'elemento maggiormente rappresentato in tali NP e la dimensione è una determinante della loro capacità di causare effetti respiratori e cardiovascolari. Numerosi studi epidemiologici mostrano che l'inquinamento urbano e il particolato atmosferico derivato dalla combustione, ad esempio proveniente dai veicoli a motore, dal riscaldamento e dalle fonti industriali, contribuisce in misura importante alla morbilità e mortalità respiratoria e cardiovascolare (Peters and Pope, 2001; Brook et al., 2004). Soprattutto il particolato fine e ultrafine (da 0.1 a 2.5 µm) che dal sistema respiratorio può più facilmente traslocare all'albero circolatorio, contribuisce allo sviluppo di patologia respiratoria e cardiovascolare nell'uomo, in particolar modo nei soggetti con preesistenti patologie di questa natura.

La maggior parte dei dati sulla tossicità delle NP origina dagli studi sul PM<sub>10</sub>. Complessivamente le evidenze epidemiologiche mostrano che le NP originate dai processi di combustione potrebbero avere parte importante negli effetti complessivi del particolato atmosferico urbano sulla salute (Borm et al., 2006). L'infiammazione pare essere il fattore comune che lega assieme questi effetti, e le NP, indipendentemente dalla loro composizione, sembrano in grado di indurre infiammazione con un meccanismo comune. L'infiammazione potrebbe inoltre indurre alterazioni della permeabilità di membrana a livello polmonare, che a sua volta potrebbe facilitare assorbimento e distribuzione sistemica delle NP. La traslocazione di NP dall'interstizio polmonare potrebbe quindi consentire il passaggio a sangue e cervello ed essere quindi direttamente responsabile dei processi patologici. I dati a riguardo sono però scarsi e controversi dato che, mentre secondo alcuni studi, i sistemi respiratorio, gastrointestinale e la cute sono direttamente esposti alle NP, che hanno la potenzialità di essere assorbite attraverso queste vie, passare al sangue e localizzarsi a cervello, sistema cardiovascolare, fegato, milza e rene (Donaldson, 2005), in altri studi non si evidenzia affatto traslocazione tra polmone e sangue.

Oltre agli studi umani esistono inoltre studi sugli animali che suggeriscono che le NP oltre ad effetti polmonari acuti e cronici, possono anche indurre effetti genotossici e carcinogenici nel ratto. Gli effetti tumorali sono stati però osservati esclusivamente in questa specie animale ed a dosi molto elevate, mentre non sono stati confermati nelle altre specie animali studiate, come il topo e l'hamster (Borm et al., 2006). Anche i dati epidemiologici relativi a gruppi di lavoratori professionalmente esposti a NP di TiO<sub>2</sub> non sembrano evidenziare eccessi di incidenza di tumori polmonari.

### 4.2 Tossicità polmonare

Il sistema respiratorio rappresenta la principale via di ingresso ed è un organo target per le NP. Come descritto in precedenza, il polmone è facilmente esposto all'inquinamento atmosferico, al particolato atmosferico urbano e ai prodotti della combustione. Le NP derivate dalla combustione in particolare sono state ampiamente studiate come possibili fattori eziologici di numerosi effetti avversi di natura respiratoria. Il meccanismo della patologia polmonare da NP è probabilmente mediato dallo stress ossidativo, che induce attivazione di numerosi fattori trascrizionali con *up-regulation* della sintesi di proteine pro-infiammatorie (Nel et al., 2006). Infatti, l'attivazione delle *protein-kinasi* mitogeno-attivate e del *signal pathway* del fattore nucleare K da parte delle NP

derivate dai processi di combustione, può culminare nella trascrizione di geni proinfiammatori con sintesi di IL-8, IL-6 e TNF $\alpha$  (Nel et al., 2006).

Nell'uomo le NP hanno maggior potenzialità di causare patologia polmonare di particelle di uguale composizione ma di maggiori dimensioni e l'inalazione di *carbon black*, TiO<sub>2</sub> e NP di lattice <100 nm nell'animale da esperimento induce stimoli infiammatori 10 volte superiori a quelli originati dalle stessa massa di NP di dimensioni >200 nm (Oberdorster et al, 2005). Il parametro che sembra maggiormente correlato all'effetto tossico è l'area di superficie delle NP. NP di vario diametro possono infatti indurre reazioni infiammatorie nel polmone di animali sperimentali, ed è stata descritta una correlazione significativa tra area di superficie delle NP, ed entità dello stress ossidativo e dell'infiammazione (Brown et al, 2001).

Molti tipi di NP sono stati studiati per la loro capacità di indurre reazioni infiammatorie. Alcuni studi hanno riportato che i nanotubi di carbonio cosiddetti “*single walled*” sono più tossici di altri tipi di NP per la loro maggior capacità di indurre granulomi epiteliali e infiammazione interstiziale nel polmone, in maniera dose-dipendente (Lam et al. 2004). Anche la composizione chimica delle NP potrebbe influenzare il grado di induzione delle proteine infiammatorie e la citotossicità, ma questo aspetto è stato poco studiato. La presenza di metalli di transizione solubili, ad esempio, potrebbe facilmente indurre stress ossidativo a livello sub-cellulare attraverso reazioni redox e formazione di radicali liberi (Utsunomiya S et al, 2004). Un altro studio *in vivo* che ha utilizzato particelle di elementi non tossici e parzialmente solubili (Mg-, Ca- e Ba-solfato) contraddice invece questa ipotesi e suggerisce che è la struttura fisica delle NP ad essere importante per l'infiammazione e non la composizione chimica, dato che queste sostanze inducono infiammazione iniziando da concentrazioni prossime al loro limite di solubilità nel medium cellulare. I metalli presenti nel particolato urbano considerati maggiormente tossici sono As, Be, Cd, Cr<sup>6+</sup>, Co, Pb, Mn, Hg, Ni, Se (*Clean Air Act Amendments*, 1990) e la maggior parte dei metalli che si ritrovano nell'atmosfera è in forma di particolato (Human health risk assessment for metals, US EPA). Gli ossidi di questi metalli rappresentano circa il 14% del particolato ultrafine (nanoparticolato) della California (Utsunomiya S et al, 2004). Se questi elementi fossero omogeneamente dispersi come impurità su particelle insolubili di grosse dimensioni i rischi per la salute sarebbero minori, maggiori invece se fossero i costituenti principali di particelle di nano dimensioni. La dimensione della particella influenza infatti reattività, tossicità e destino ambientale della NP stessa. Le NP hanno maggior solubilità delle particelle di uguale composizione ma di dimensioni maggiori, a fronte di un più elevato rapporto superficie/massa.

Reazioni pro-infiammatorie delle NP sono state inoltre osservate anche in alcuni modelli *in vitro* di infiammazione (Brown et al, 2001). Questi studi indicano che le NP in condizioni sperimentali possono indurre reazioni infiammatorie e granulomatose a livello polmonare.

#### 4.3 Tossicità sui sistemi cardiovascolare e nervoso centrale.

Secondo alcuni studi, le NP inalate si depositano profondamente a livello dell'epitelio polmonare e possono poi traslocare a siti extrapolmonari e raggiungere organi target, probabilmente mediante meccanismi diversi. Il primo meccanismo prevede il passaggio attraverso l'epitelio dell'albero respiratorio all'interstizio polmonare e da qui al torrente circolatorio o direttamente, o mediato attraverso le vie linfatiche. Le NP una volta traslocate sembrano in grado di superare le normali difese assicurate dalle cellule fagocitiche a livello polmonare e possono quindi accedere al sistema circolatorio. Ad esempio, successivamente ad instillazione intra-tracheale nel ratto di NP di oro colloidale di 30 nm, si riconosce la presenza delle stesse NP a livello delle piastrine circolanti nell'animale da esperimento. Particelle <100 nm di carbonio marcate con Tc<sup>99</sup> vengono rilevate nel torrente circolatorio a partire da 1 minuto dopo l'instillazione intra-tracheale. L'osservazione del fegato non evidenzia però alcun tipo di accumulo delle stesse NP in quest'organo.

Una volta in circolo le NP potrebbero essere in grado di indurre effetti biologici. NP sferiche e nanotubi di carbonio, possono indurre aggregazione piastrinica *in vitro* e sono in grado di accelerare la formazione di trombi vascolari in modelli di trombosi nel ratto. In colture cellulari, NP e nanotubi sono in grado di indurre effetti di tipo citotossico, risposte di tipo pro-infiammatorio, inibizione della crescita cellulare e riduzione della sintesi di NO in cellule endoteliali umane, inibizione della funzione cellulare e induzione dell'apoptosi in cellule renali.

La traslocazione delle NP al SNC potrebbe avvenire a seguito della distribuzione sistemica delle NP, ma sono stati descritti altri possibili meccanismi che coinvolgono l'uptake diretto da parte delle terminazioni nervose sensitive dell'albero respiratorio, seguita da traslocazione assonica prima alle strutture gangliari e poi al SNC. Un ulteriore meccanismo suggerisce che le NP potrebbero essere captate dalle terminazioni nervose del bulbo olfattivo e traslocate direttamente al SNC. In condizioni sperimentali è stato osservato che fullerene C<sub>60</sub> possono indurre stress ossidativo nel cervello di pesce dopo traslocazione attraverso il bulbo olfattivo. In un altro studio, l'inalazione di NP di 35 nm marcate con C<sup>13</sup> per 6 ore, risultava in significativi aumenti della presenza di C<sup>13</sup> nel bulbo olfattivo nel ratto. Questa via sembra essere selettiva e operativa solo per le nanoparticelle. Particelle di maggiori dimensioni (1.3-18 µm) di MnO<sub>2</sub> non sembrano infatti essere captate

mediante questo meccanismo. Il trasferimento di questi risultati all'uomo richiede però cautela, soprattutto in considerazione delle differenze anatomiche tra uomo e ratto: nel ratto la mucosa olfattiva rappresenta il 50% della mucosa nasale totale, nell'uomo solo il 5%.

Le ipotesi circa il possibile *uptake* di NP da parte del cervello durante l'inalazione richiederebbero quindi studi appropriati per la conferma e la valutazione di possibili effetti sulla salute umana, soprattutto in vista dell'utilizzo di NP ingegnerizzate in grado di attraversare la barriera emato-encefalica, come effetto voluto nella “*drug delivery*” di farmaci psicotropi. Anche gli effetti cardiovascolari potrebbero essere legati sia all'*uptake* cerebrale che all'effetto diretto delle NP.

#### 4.4. Tossicità sul sistema gastroenterico e sugli organi interni

L'apparato digestivo rappresenta una possibile via di ingresso delle NP naturali e artificiali nel corpo umano. L'ingestione di NP può avvenire attraverso gli alimenti e l'acqua, tramite l'assunzione di farmaci e l'utilizzo di cosmetici, o tramite l'ingestione di NP inalate e eliminate dall'albero respiratorio in esofago mediante *clearance* muco ciliare (Chau et al., 2007; Nel et al, 2006). Una volta ingerite le NP vengono veicolate allo stomaco e sottoposte ai normali processi digestivi che possono essere in grado di attaccarle e degradarle. Uno studio recente mostra ad esempio che NP di rame di 23.5 nm vengono degradate a livello dello stomaco di ratto, *in vivo*, originando rame in forma ionica (CuCl) (Chen Z et al. 2006). Nel tratto enterico la cinetica dell'assorbimento delle NP è complessa e si verifica mediante diffusione attraverso lo strato di muco, contatto con gli enterociti, “*trafficking*” cellulare, traslocazione e eventi post-traslocazionali. Minore è il diametro della NP e più veloce sarà il processo complessivo di assorbimento ma anche altri parametri, come forma e carica di superficie condizionano l'assorbimento. Dopo l'eventuale *uptake* le NP possono traslocare al circolo e distribuirsi in tutto il corpo (Jani, 1990).

Uno studio recente ha valutato la tossicità a livello di rene, fegato e milza del rame somministrato per via orale al ratto, in forma di NP (23.5 nm), microparticelle (MP, 17 µm) o in forma ionica (CuCl, 0.072 nm). La tossicità esercitata dalle NP risultava superiore a quella esercitata dalle MP e paragonabile a quella esercitata dal rame in forma ionica. Lo studio suggeriva che le NP venivano attaccate e degradate dall'HCl gastrico, perdendo quindi la struttura fisica di NP e originando ioni di rame. Le MP, esponendo poca area di superficie, non venivano attaccate in maniera sufficiente a produrre ioni di rame in misura significativa. Nel caso delle NP invece la superficie era notevole e la ionizzazione praticamente completa. Non si aveva quindi alcuna traslocazione e localizzazione

delle NP a livello degli organi interni ma una tossicità attribuibile al sovraccarico di sali di rame (Chen Z et al., 2006).

Alcune ipotesi collegano inoltre le malattie infiammatorie intestinali croniche (IBD), in particolare il morbo di Crohn, alle NP. Alcuni studi suggeriscono che le IBD possono risultare dall'interazione tra fattori genetici e fattori ambientali. Il coinvolgimento delle NP come fattore ambientale, è stato ipotizzato perché una dieta povera di calcio e di microparticelle esogene è stata dimostrata in grado di alleviare i sintomi del Crohn con un miglioramento dell'indice di attività della malattia (Lomer et al, 2002).

Altri studi riportano segnalazioni sporadiche della presenza in tessuti patologici umani di NP di porcellana (Balestri et al, 2001) o di metalli in focus patologici di soggetti operati, quali granulomi epatici o renali (Gatti e Rivasi, 2002), trombi o valvole venose (Gatti et al, 2004), aree di colon neoplastico (Gatti, 2004). Gli autori di questi studi ipotizzano che tali NP derivano da ingestione e abbiano parte nella eziopatogenesi della condizione patologica. Si tratta però di segnalazioni sporadiche, relative a uno o pochi pazienti studiati, e manca ogni dimostrazione di una relazione causa effetto. Ad oggi, non esistono ancora studi che dimostrano in maniera convincente un qualunque effetto tossico diretto delle NP a livello del tratto gastroenterico (Medina C et al., 2007).

#### 4.5. Tossicità ambientale (rilevanti per gli effetti umani)

Esistono molti studi sperimentali che mostrano che le NP artificiali disperse nell'ambiente possono avere effetti tossici sugli organismi ambientali (Moore, 2006; Friedrichs and Sculte, 2006). Questi studi sono però stati effettuati in condizioni di laboratorio spinte, a concentrazioni molto superiori a quelle effettivamente previste (PEC) in base alle produzioni attuali di NP dalle nanotecnologie. In condizioni "effettive", non di laboratorio, il rischio ambientale delle NP ingegnerizzate viene invece considerato "minimo" (Boxall, 2007). Per le NP naturali non esistono dati certi se non generiche indicazioni di "minore pericolosità" per l'ambiente rispetto a quelle artificiali, (Boxall, 2007).

#### *Punti Chiave 4.*

*Gli studi di tossicità delle NP disponibili riguardano gli effetti del particolato atmosferico urbano sull'uomo e gli effetti di NP artificiali sull'animale da esperimento o su colture cellulari.*

*Sembra esistere un meccanismo tossico comune delle NP che si basa sulla genesi di radicali liberi e di infiammazione, indipendentemente da dimensioni e composizione, anche se la presenza di metalli di transizione potrebbe potenziare il fenomeno mediante reazioni redox e sviluppo di radicali liberi.*

*Dati epidemiologici mostrano una relazione tra esposizione a particolato urbano ultrafine, peraltro ricco di metalli di transizione, e sviluppo di patologia polmonare o cardiovascolare nell'uomo. Non è però chiaro se gli effetti siano ascrivibili alla traslocazione delle NP inalate oppure all'estendersi degli effetti infiammatori esercitati dalle NP sull'epitelio polmonare. Altri studi sull'uomo, puramente speculativi, ipotizzano un effetto non provato delle NP sulla genesi del morbo di Crohn.*

*Dati di laboratorio, nell'animale da esperimento e in vitro, mostrano possibili effetti delle NP inalate sull'aggregazione piastrinica e sulla formazione di trombi vascolari, mentre altri studi evidenziano effetti tossici di NP di CuO ingerite su rene fegato e milza del ratto, che però erano più da ascrivere agli effetti tossici dei sali di rame che alla forma fisica in NP.*

*I dati complessivamente disponibili, al di là degli effetti del particolato urbano ultrafine inalato, sono assolutamente insufficienti a provare o anche solo a ipotizzare un qualunque altro effetto delle NP, qualunque sia la via di esposizione, inalatoria, per ingestione o per via trans-cutanea.*

## **5. Valutazione del rischio delle NP**

Una corretta valutazione del rischio delle NP sulla salute umana richiederebbe un set completo e robusto di dati qualitativi e quantitativi sull'esposizione, assorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione e sugli effetti tossici delle NP. Gli studi dovrebbero inoltre chiarire l'importanza relativa delle differenti vie di esposizione, i meccanismi degli eventuali effetti tossici, il rapporto tra tossicità della sostanza in *bulk* e in NP, e dovrebbe definire se esiste un effetto tossicologico delle NP come classe o se sia possibile identificare effetti solo "caso per caso".

Ad oggi è possibile valutare grossolanamente solo i rischi relativi all'esposizione umana per via inalatoria al particolato atmosferico urbano. All'interno del particolato urbano, molti studi mostrano l'importanza tossicologica del particolato fine e ultrafine per cui l'esposizione sembra essere correlata a patologie respiratorie e cardiovascolari in modo dose-dipendente. Anche in questo caso esistono però margini di incertezza. Non è chiaro, ad esempio, quale sia l'esatto meccanismo degli effetti tossici. L'inalazione di NP promuove la formazione di radicali liberi e l'infiammazione a livello dei sistemi respiratorio e cardiovascolare (Ruckerl et al., 2007), ma non è chiaro se lo stimolo infiammatorio sia causato direttamente dalla traslocazione delle NP inalate, oppure sia innescato da stimoli esercitati dalle NP a livello esterno.

Non esistono invece dati sufficienti a valutare i rischi connessi all'ingestione delle NP. Vista l'assoluta carenza di dati, impossibile quindi allo stato attuale delle conoscenze accertare, ma anche escludere, un eventuale rischio tossicologico per la salute umana legato all'ingestione di NP, siano esse naturali, antropogeniche o artificiali. E' comunque possibile sostenere che, almeno dal punto di vista quantitativo, la via di esposizione principale per l'uomo alle NP naturali sia quella respiratoria, in particolare per NP contenenti sostanze ritenute particolarmente tossiche, come i metalli di transizione. Dato che una tipica atmosfera urbana può contenere  $10^7$  NP per  $\text{cm}^3$ , il 14% delle quali costituite da metalli di transizione (Utsunomiya et al., 2004), è possibile calcolare che un abitante medio sia esposto a circa  $10^{14}$  NP al giorno per via inalatoria, delle quali più di  $10^{13}$  NP sono costituite da, o contengono, metalli di transizione. L'esposizione a NP per ingestione è quantitativamente comparabile ( $10^{12}$ - $10^{14}$  NP giorno) ma riguarda per lo più NP naturali composte da silicati e, in parte, NP artificiali di  $\text{TiO}_2$ . Impossibile allo stato attuale quantificare l'ingestione di NP contenenti altri metalli e differenziare, tra quelle che derivano dagli alimenti, le NP contaminanti primarie da quelle secondarie, che derivano da una contaminazione accidentale durante le fasi di lavorazione. Occorre comunque considerare che un numero elevato di NP metalliche ingerite derivano verosimilmente dal particolato inalato. Soprattutto le NP di maggiori

dimensioni, arrivano in quantitativi rilevanti all'esofago mediante i meccanismi di clearance mucociliare dell'albero respiratorio superiore (Nel et al, 2006). Inoltre, la dimostrazione di un eventuale effetto tossico di un dato tipo di NP sarebbe difficilmente generalizzabile visto che la valutazione del rischio per le NP dovrebbe essere fatta "caso per caso" (European Commission, 2007).

Inoltre, a rendere difficile la valutazione di una possibile correlazione causa/effetto, esistono ancora grossi problemi metodologici, per aspetti sia di tipo quantitativo che qualitativo. Ad esempio, per definire l'esposizione alle NP non è ancora chiaro quale sia il parametro maggiormente rappresentativo (numero delle NP, massa, area di superficie, forma o una combinazione di più parametri). In laboratorio si osserva una correlazione dose dipendente tra effetti tossici e area totale di esposizione delle NP, ma solo ad alte dosi, che probabilmente non sono mai raggiunte in natura.. Per quanto riguarda gli aspetti qualitativi, le NP maggiormente considerate in fase di valutazione del rischio sono quelle composte da metalli. Esiste comunque un concorso tra composizione e forma a determinare l'effetto tossicologico. Ad esempio le fibre di amianto hanno una tossicità più legata alla forma aghiforme che al materiale di composizione, lo stesso potrebbe essere per alcune NP particolari, quali ad esempio i nanotubi.

Comunque, caratteristica comune delle NP è quella, a causa delle loro dimensioni, di possedere proprietà e caratteristiche differenti da quelle della specie chimica parentale. Viene generalmente accettato che avendo superficie esposta molto maggiore a parità di massa rispetto allo stesso materiale in forma di macroparticella, le NP abbiano anche una aumentata reattività chimica e biologica. Questo però non sempre è vero: la tossicità di alcune sostanze, come ad esempio il selenio, viene invece ridotta diminuendo la dimensione delle particelle a livello nano-molecolare (Chau C-F et al, 2007; Zhang et al, 2003 J Occup Health 45, 23-30).

## 5.1 Studi in corso

Partendo dalle NP artificiali, prodotte dalle nanotecnologie, che iniziano ad affacciarsi sul mercato globale e che presumibilmente rappresenteranno sempre di più una fonte di esposizione importante per l'uomo alle NP, enti ed agenzie deputate alla valutazione del rischio (in particolar modo il gruppo di esperti SCENIHR della Commissione Europea, US EPA, e le agenzie inglesi DEFRA, e Institute of Occupational Medicine) stanno promuovendo studi di valutazione di tutti questi aspetti, chiedendo a commissioni e gruppi di esperti l'elaborazione di strategie per la definizione del rischio correlato dall'utilizzo industriale delle NP sia in alimentazione che in altri ambiti industriali che possono causare contaminazione ambientale.

In primo luogo esiste una discussione incorsa se un materiale in forma di NP possa essere considerato alla stregua del materiale di origine e se per esso sia quindi sufficiente estendere la valutazione del rischio effettuata con dati di tossicità ottenuti dal materiale in forma *bulk*. L'orientamento prevalente è quello di considerare il materiale in forma di NP come un materiale nuovo che deve quindi essere sottoposto a una nuova valutazione completa di tipo tossicologico. Le NP rientreranno quindi probabilmente nell'ambito della valutazione REACH per i nuovi materiali, oppure in quella dei “*Novel Food*” qualora utilizzate in ambito alimentare.

Studi di laboratorio indicano inoltre che le NP ingegnerizzate e disperse nell'ambiente possono essere captate da organismi ambientali e costituire quindi un contaminante accidentale degli alimenti (Boxall et al., 2007). Lo stesso può essere vero per le NP naturali, che ad esempio possono essere captate dall'apparato radicale dei vegetali. Anche per valutare questo aspetto i dati disponibili sono però considerati insufficienti. Per valutare la trasferibilità all'uomo delle NP attraverso la catena alimentare e l'importanza per l'uomo di questa via è necessaria una più approfondita valutazione della possibilità del passaggio delle NP dall'acqua ai pesci e dal suolo ai prodotti vegetali e da questi agli animali da carne o da latte.

Un problema importante è quello relativo ai metodi che verranno utilizzati per la valutazione di rischio. I metodi tradizionali utilizzati per il risk assessment dei materiali o degli alimenti in forma *bulk* o di macroparticolato non sembrano adeguati per lo studio delle NP. Le agenzie nazionali e internazionali hanno quindi promosso studi anche per definire le strategie da adottare per la definizione del rischio delle NP, ossia quali metodi utilizzare per studiare la loro tossicologia. Per ora la maggior parte degli studi ha semplicemente identificato le informazioni mancanti per la definizione del rischio, ed ha indicato una serie di goal che devono essere raggiunti nei prossimi anni.

Un gruppo di esperti (Maynard, 2006) ha sviluppato un programma definito “*five grand challenges, developing safe nanotechnologies through sound science*” che rappresenta una *roadmap* per (1) sviluppare nei prossimi 12 mesi progetti strategici per una ricerca focalizzata sui rischi; (2) sviluppare nei prossimi 3-10 anni gli strumenti per valutare l'esposizione a NP artificiali in aria e acqua; (3) sviluppare e validare nei prossimi 5-15 anni metodi utili a studiare la tossicità dei nanomateriali artificiali; (4) sviluppare nei prossimi 10 anni modelli per predire l'impatto delle NP artificiali su ambiente e salute umana; (5) sviluppare nei prossimi 5 anni sistemi per valutare l'impatto del ciclo produttivo delle NP artificiali su ambiente e salute umana. Se ne desume che attualmente le informazioni disponibili sono così scarse che non esistono neppure i presupposti per una corretta definizione del rischio connesso alle NP.

Teoricamente, la riduzione dei contaminanti alimentari, sia in forma di NP che in qualunque altra forma, è certamente una misura raccomandabile in linea di principio. L'assoluta mancanza di dati quantitativi specificatamente riguardanti le NP viste come contaminanti accidentali, primari e secondari, rende però impossibile una definizione dell'impatto che una tale misura avrebbe sulla salute umana. La mancanza di dati precisi sulla farmacocinetica e sulla tossicologia delle NP rende impossibile una valutazione del rischio verosimile delle NP per la salute umana.

Comunque, la letteratura scientifica epidemiologica non attribuisce ai contaminanti alimentari in generale una grande rilevanza in termine di salute umana. Ad esempio i tumori alimentari rappresentano una parte importante di tutti i tumori umani, ma solo una minima parte di questi viene attribuita alla presenza di contaminanti.

### Punti Chiave 5.

*L'affacciarsi sul mercato globale delle nanotecnologie, che presumibilmente aumenteranno in misura sostanziale l'esposizione umana alle NP, ha stimolato una serie importante di iniziative da parte delle agenzie regolatorie di Commissione Europea, USA e Inghilterra e la promozione di una solida serie di studi sull'argomento che presumibilmente porterà chiarezza nei prossimi anni.*

*Attualmente, se si eccettuano gli studi sul particolato ultrafino urbano, esiste una sostanziale carenza di dati atti a valutare i rischi connessi all'esposizione alle NP, siano esse naturali, antropogeniche o artificiali.*

*Facendo il punto, ad oggi sono stati parzialmente caratterizzati solo i rischi connessi all'esposizione al particolato urbano ultrafine, che è correlato a patologie respiratorie e cardiovascolari. Non è però chiaro se il meccanismo patogenetico prevede la traslocazione delle NP inalate al sistema circolatorio e poi respiratorio e cardiovascolare, oppure sia legato ad altri meccanismi. Non esistono inoltre chiare evidenze di una eventuale traslocazione di NP del particolato urbano inalate in altri organi, come fegato e milza.*

*Per le NP artificiali ad oggi, come detto, non si hanno ancora conoscenze ma sono previsti studi per valutare gli effetti dell'esposizione professionale dei lavoratori esposti per via inalatoria, e per caratterizzare gli effetti dell'esposizione del consumatore per ingestione.*

*Per quanto concerne l'esposizione per ingestione, e in particolare per via alimentare, a NP naturali o antropogeniche e a contaminanti accidentali primari o secondari degli alimenti, sono attualmente reperibili solo studi sperimentali sull'animale o su cellule che mostrano risultati contrastanti, ed alcune segnalazioni sporadiche della presenza in tessuti patologici umani di NP, che alcuni ipotizzano essere derivate dall'ingestione.*

*Oltre a questi dati, insufficienti e non conclusivi, in letteratura esiste una sostanziale carenza di evidenze, che rende impossibile ogni ragionevole valutazione del rischio.*

*Teoricamente, la riduzione dei contaminanti alimentari, sia in forma di NP che in altra forma, qualunque ne sia la composizione, è certamente raccomandabile in linea di principio.*

*L'assoluta mancanza di dati quantitativi specificatamente riguardanti i contaminanti accidentali, primari e secondari, rende però impossibile una definizione dell'impatto che una tale misura avrebbe sulla salute umana. La letteratura scientifica non attribuisce ai contaminanti alimentari in generale una grande rilevanza in termine di salute umana, anche se è ignoto quale sia l'effetto relativo dei contaminanti in forma bulk e in forma di NP. I tumori alimentari rappresentano una parte importante di tutti i tumori, ma solo una minima parte di questi viene attribuita alla presenza di contaminanti.*

*Inoltre, vista la molteplicità delle fonti possibili e i pochi aspetti quantitativi noti, pare inverosimile che la riduzione dei contaminanti negli alimenti risulti in una effettiva diminuzione dell'esposizione umana alle NP.*

*In ogni caso, si ribadisce che la mancanza di dati rende impossibile al momento ogni conclusione che sia poco più che speculativa.*

## **6. Riassunto e conclusioni**

### Introduzione

Le NP sono particelle o strutture, di varia forma e di diversa composizione, con dimensioni nella scala nano (<100 nm) che in natura corrisponde alla dimensione di proteine e virus. Le NP si distinguono in NP naturali (ad esempio quelle prodotte dai vulcani), NP antropogeniche (ad esempio prodotte da motori diesel), e NP artificiali (prodotte attraverso le nanotecnologie). Mentre l'uomo è da lungo tempo esposto alle NP naturali e antropogeniche, le NP artificiali sono invece agenti nuovi, a cui l'uomo inizia ora ad essere esposto e a cui sarà probabilmente esposto in misura sempre crescente nel prossimo futuro. Se le nanotecnologie sono considerate un passo importante nello sviluppo scientifico e tecnologico, sono anche viste come un nuovo potenziale pericolo per la salute umana, tuttora impossibile da valutare a causa della mancanza di dati. Sono però attualmente in corso molti studi specifici, che si prevede produrranno in pochi anni una massa di risultati sufficiente ad una efficace attività regolatoria e a una politica normativa delle nanotecnologie. Questi dati faciliteranno anche la valutazione del rischio delle NP naturali e antropogeniche, tuttora largamente impossibile.

### NP e alimenti

Negli alimenti si ritrovano comunemente NP, sia NP endogene (proteine, come la ferritina) che NP esogene, volontarie (NP artificiali, ad esempio coloranti come  $\text{TiO}_2$ ) o accidentali (contaminanti primari o secondari). L'uomo, oltre che con gli alimenti, può ingerire NP che arrivano dalla clearance muco-ciliare delle NP inalate (Nel et al, 2006). Inoltre, nel lume gastro-intestinale, oltre alle NP ingerite, si possono ritrovare NP endogene, in forma di nano-cristalli originati dalla precipitazione intra-luminale di sali parzialmente solubili. L'apparato gastro-intestinale umano è quindi continuamente esposto a numerose NP di varia origine, forma, dimensione e composizione. Negli UK è stata stimata una ingestione giornaliera tra  $10^{12}$  e  $10^{13}$  NP per persona.

Queste quantità sono probabilmente destinate ad aumentare nel prossimo futuro, a causa degli utilizzi previsti delle NP artificiali, sia in alimentazione che in altri campi correlati a una possibile ingestione (dentifrici, cosmetici, vernici) che si stanno diffondendo, o sono stati proposti. Dal punto di vista normativo, l'orientamento prevalente è quello di considerare le NP come nuovi materiali,

differenti dalla specie chimica parentale, da sottoporre ad esame tossicologico completo, nell'ambito del REACH o della regolamentazione relativa ai "Novel Food".

### Farmacocinetica delle NP.

Le potenziali porte di ingresso delle NP nel corpo umano sono almeno quattro: polmone, cute, apparato gastro-intestinale e epitelio nasale. I dati disponibili non sono in genere univoci, e per lo più ottenuti nell'animale da esperimento e non confermati nell'uomo, ma sembra accettata l'ipotesi che si possa verificare assorbimento e traslocazione al circolo sistemico e agli organi, sia dopo inalazione che ingestione, mentre i dati relativi all'assorbimento cutaneo sono più controversi. Particolare è la possibilità, sempre dimostrata solo nell'animale, che in seguito a inalazione le NP possano essere captate dall'epitelio nasale e raggiungere l'encefalo seguendo l'innervazione olfattiva. I dati disponibili non sono però univoci ed alcune NP non sembrano assorbite, probabilmente in relazione a differenze di forma, dimensione e composizione. Inoltre a livello gastrico alcune NP possono essere ionizzate, portando quindi all'eliminazione della struttura fisica della NP stessa (esempio per le NP di CuO).

Non esistono invece dati sufficienti a descrivere il destino delle NP all'interno dell'organismo dopo assorbimento e traslocazione. Secondo alcuni studi sperimentali le NP potrebbero localizzarsi ad organi, come fegato, milza, o apparato cardiovascolare, ed entrare nelle cellule somatiche dove verrebbero captate dalle strutture lisosomiali, oppure essere captate dalle cellule macrofagiche del sistema reticolo-endoteliale, e permanere in loco anche per lunghi periodi di tempo. Ulteriori studi mostrano però che le NP possono essere rapidamente eliminate per via renale o per via biliare. Questi lavori scientifici sono generalmente fatti nell'animale da esperimento, ma altri studi mostrano l'occasionale riscontro di NP anche a livello di tessuti patologici umani. I dati sono però controversi e complessivamente insufficienti a descrivere il destino metabolico delle NP dopo traslocazione.

### Tossicità delle NP.

Gli studi di tossicità delle NP disponibili riguardano gli effetti del particolato atmosferico urbano sull'uomo e gli effetti di NP artificiali sull'animale da esperimento o su colture cellulari.

Sembra esistere un meccanismo tossico comune delle NP che si basa sulla genesi di radicali liberi e di infiammazione, indipendentemente da dimensioni e composizione, anche se la presenza di metalli di transizione potrebbe potenziare il fenomeno mediante reazioni redox e sviluppo di radicali liberi.

Dati epidemiologici mostrano una relazione tra esposizione a particolato urbano ultrafine, peraltro ricco di metalli di transizione, e sviluppo di patologia polmonare o cardiovascolare nell'uomo. Non è però chiaro se gli effetti siano ascrivibili alla traslocazione delle NP inalate oppure all'estendersi degli effetti infiammatori esercitati dalle NP sull'epitelio polmonare. Altri studi sull'uomo, puramente speculativi, ipotizzano un effetto non provato delle NP sulla genesi del morbo di Crohn. Dati di laboratorio, nell'animale da esperimento e in vitro, mostrano possibili effetti delle NP inalate sull'aggregazione piastrinica e sulla formazione di trombi vascolari, mentre altri studi evidenziano effetti tossici di NP di CuO ingerite su rene fegato e milza del ratto, che però sembrano più da ascrivere agli effetti tossici dei sali di rame che alla struttura fisica delle NP.

I dati complessivamente disponibili, al di là degli effetti del particolato urbano ultrafine inalato, sono assolutamente insufficienti a provare o anche solo a ipotizzare un qualunque altro effetto delle NP, qualunque sia la via di esposizione, inalatoria, per ingestione o per via trans-cutanea.

### Valutazione del rischio delle NP

Attualmente, se si eccettuano gli studi sul particolato ultrafino urbano, esiste una sostanziale carenza di dati atti a valutare i rischi connessi all'esposizione alle NP, siano esse naturali, antropogeniche o artificiali.

L'affacciarsi sul mercato globale delle nanotecnologie, che presumibilmente aumenteranno in misura sostanziale l'esposizione umana alle NP, ha stimolato una serie importante di iniziative da parte delle agenzie regolatorie di Commissione Europea, USA e Inghilterra e la promozione di una ampia serie di studi sull'argomento che presumibilmente porterà chiarezza nei prossimi anni, non solo per le NP artificiali, ma verosimilmente anche per quelle naturali e antropogeniche.

Facendo il punto, ad oggi sono stati parzialmente caratterizzati solo i rischi connessi all'esposizione al particolato urbano ultrafine, che è correlato a patologie respiratorie e cardiovascolari. Non è però chiaro se il meccanismo patogenetico prevede la traslocazione delle NP inalate al sistema circolatorio e poi respiratorio e cardiovascolare, oppure sia legato ad altri meccanismi. Non esistono inoltre chiare evidenze di una eventuale traslocazione di NP del particolato urbano inalate in altri organi, come fegato e milza.

Per le NP artificiali ad oggi, come detto, non si hanno ancora conoscenze ma sono previsti studi per valutare gli effetti dell'esposizione professionale dei lavoratori esposti per via inalatoria, e per caratterizzare gli effetti dell'esposizione del consumatore per ingestione.

Per quanto concerne l'esposizione per ingestione, e in particolare per via alimentare a NP naturali o antropogeniche e a contaminanti accidentali primari o secondari degli alimenti, sono attualmente reperibili solo studi sperimentali sull'animale o su cellule che mostrano risultati contrastanti, ed alcune segnalazioni sporadiche della presenza in tessuti patologici umani di NP, che alcuni ipotizzano essere derivate dall'ingestione.

Oltre a questi dati, insufficienti e non conclusivi, in letteratura esiste una sostanziale carenza di evidenze, che rende impossibile ogni ragionevole valutazione del rischio.

Teoricamente, la riduzione dei contaminanti alimentari, sia in forma di NP che in altra forma, qualunque ne sia la composizione, è certamente raccomandabile in linea di principio.

L'assoluta mancanza di dati quantitativi specificatamente riguardanti i contaminanti accidentali, primari e secondari, rende però impossibile una definizione dell'impatto che una tale misura avrebbe sulla salute umana. La letteratura scientifica non attribuisce ai contaminanti alimentari in generale una grande rilevanza in termine di salute umana, anche se è ignoto quale sia l'effetto relativo dei contaminanti in forma bulk e in forma di NP. Viene detto ad esempio che i tumori alimentari rappresentano una parte importante di tutti i tumori, ma solo una minima parte di questi viene attribuita dagli epidemiologi alla presenza di contaminanti.

Inoltre, vista la molteplicità delle fonti possibili e in base ai pochi aspetti quantitativi noti dell'esposizione umana a NP per inalazione e per ingestione, pare poco verosimile che la riduzione dei contaminanti accidentali negli alimenti risulti in una effettiva diminuzione dell'esposizione umana alle NP che possa avere rilevanza clinica. In ogni caso, si ribadisce, che la mancanza di dati specifici rende impossibile al momento ogni conclusione che sia più che speculativa.

## **7. Bibliografia consultata**

### **7.1 Articoli**

Ballestri M, Baraldi A, Gatti AM et al. Liver and kidney foreign bodies granulomatosis in a patient with malocclusion, bruxism and worn dental prostheses. *Gastroenterology* 2001, 121(5): 1234-1238.

Borm PJA et al. The potential risks of nanomaterials : a review carried out for ECETOC. *Particle and Fibre Toxicology* 2006, 3: 11.

Bouwmeester H, Sips A. Safety for consumers of application of nanotechnologies and nanoparticles in food production. Abstract. *Toxicology letters* 2007, 172S: S191.

Boxall ABA et al. Engineered nanomaterials in soils and water : how do they behave and could they pose a risk to human health ? *Nanomedicine* 2007, 2(6): 919-927.

Brauner EV. Exposure to ultrafine particles from ambient air and oxidative stress–induced DNA damage. *Environmental Health Perspectives* 2007, 115(8): 1177-1182.

Brumfield G et al. A little knowledge. *Nature* 2003, 424: 246-248.

Chang J-S et al. In vitro cytotoxicity of silica nanoparticles at high concentrations strongly depends on the metabolic activity type of the cell line. *Environ Sci Technol* 2007, 41: 2064-2068.

Chau C-F et al. The development of regulation for food nanotechnology. *Trends in Food Science & Technology* 2007, 18: 269-280.

Chow JC et al. Introduction to the A&WMA 2005 critical review. Nanoparticles and the environment. *Journal of the Air & Waste Management Association* 2005, 55: 706-707.

Dreher K. Health and environmental impact of nanotechnology: toxicological assessment of manufactured nanoparticles. *Toxicological sciences* 2004, 77: 3-5.

Editorial. A little regulation. *Nature* 2006, 444: 520.

Editorial. Food in the 21<sup>st</sup> century. *Environmental Health Journal* 2005, August: 8-10.

Editorial. Nanotechnology. Untold promise, unknown risk. *Consumers Report* 2007, July: 40-45.

Editorial. Enough talk already. Governments should act on researchers' attempts to engage the public over nanotechnology. *Nature* 2007, 448(7149): 1-2.

Friedrichs S, Schulte J. Environmental, health and safety aspects of nanotechnology – implications for the R&D in (small) companies. *Science and Technology of Advanced Materials* 2007, 8: 12-18.

Gatti AM, Rivasi F. Biocompatibility of micro- and nano-particles. Part I: in liver and kidney. *Biomaterials* 2002, 23: 2381-2387.

Gatti AM. Biocompatibility of micro- and nano-particles in the colon. Part II. *Biomaterials* 2004, 25(3): 385-92.

Gatti AM et al. Detection of micro- and nano-sized biocompatible particles in the blood. *J Mater Sci Mater Med* 2004, 15(4): 469-472.

Giles J. What is there to fear from something so small? *Nature* 2003, 426: 750.

Grotheer H-H et al. Mass spectrometry up to 1 million mass units for the simultaneous detection of primary soot and of soot precursors (nanoparticles) in flames. *Chemosphere* 2004, 57: 1335-1342.

Hillie T, Hlophe M. Nanotechnology and the challenge of clean water. *Nature Nanotechnology* 2007, 2: 663-664.

Hoet PHM et al. Nanoparticles – known and unknown health risks. *Journal of Nanobiotechnology* 2004, 2: 12.

Holsapple MP et al. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part II: toxicological and safety evaluation of nanomaterials, current challenges and data needs. *Toxicol Sci* 2005, 88(1): 12-17.

Kanarek MS. Nanomaterial health effects – Part 3: conclusion – hazardous issues and the precautionary principle. *WMJ* 2007, 106(1): 16-19.

Kooter IM et al. Response of spontaneously hypertensive rats to inhalation of fine and ultrafine particles from traffic: experimental controlled study. *Particle and Fibre Toxicology* 2006, 3:7

Kurath M, Maasen S. Toxicology as a nanoscience? Disciplinary identities reconsidered. *Particle and Fibre Toxicology* 2006, 3: 6.

Larison JR et al. Cadmium toxicity among wildlife in the Colorado Rocky Mountains. *Nature* 2000, 406: 181-183.

Lomer MCE et al. Fine and ultrafine particles in the diet: influence on the mucosal immune response and association with Crohn's disease. *Proceedings of the Nutrition Society* 2002, 61: 123-130.

Lomer MCE et al. Determination of titanium dioxide in foods using inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Analyst* 2000, 125: 2339-2343.

Lovern SB et al. Behavioral and physiological changes in daphnia magna when exposed to nanoparticle suspensions. *Environ Sci Technol* 2007, 41: 4465-4470.

Lynch I et al. The nanoparticle-protein complex as a biological entity; a complex fluids and surface science challenge for the 21<sup>st</sup> century. *Advances in Colloid and Interface Science*. in press.

Maynard AD et al. Safe handling of nanotechnology. *Nature* 2006, 444: 267-269.

- Maynard AD, Pui DYH. Nanotechnology and occupational health: new technologies – new challenges. *Journal of Nanoparticles Research* 2007, 9: 1-3.
- Medina C et al. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. *British J Pharmacol* 2007, 150: 552-558.
- Moore MN. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environmental International* 2006, 32: 967-976.
- Mossman BT et al. Mechanisms of action of inhaled fibers, particles and nanoparticles in lung and cardiovascular diseases. *Particle and Fibre Toxicology* 2007, 4: 4.
- Nel A et al. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 2006, 311: 622-627.
- Oberdoster G et al. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 2005, 113(7): 823-839.
- Oberdoster G et al. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Particle and Fibre Toxicology* 2005, 2: 8.
- Peters A et al. Translocation and potential neurological effects of fine and ultrafine particles a critical update. *Particle and Fibre Toxicology* 2006, 3: 13.
- Porter A et al. Direct imaging of single-walled carbon nanotubes in cells. *Nature Nanotechnology* 2007, 2: 713-717.
- Powell MC, Kanarek MS. Nanomaterial health effects – Part 1: background and current knowledge. *WMJ* 2006, 105(2): 16-20.
- Powell MC, Kanarek MS. Nanomaterial health effects – Part 2: uncertainties and recommendations for the future. *WMJ* 2006, 105(3): 18-23.
- Rickerby DG, Morrison M. Nanotechnology and the environment: a European perspective. *Science and Technology of Advanced Materials* 2007, 8: 19-24.
- Ruckerl R et al. Ultrafine particles and platelet activation in patients with coronary heart disease – results from a prospective panel study. *Particle and Fibre Toxicology* 2007, 4: 1.
- Salata OV. Applications of nanoparticles in biology and medicine. *Journal of Nanobiotechnology* 2004, 2: 3.
- Scheufele DA et al. Scientists worry about some risks more than public. *Nature Nanotechnology* 2007, 2: 732-734.
- Schneider JC. Can microparticles contribute to inflammatory bowel disease: innocuous or inflammatory? *Experimental Biology and Medicine* 2007: 1-2.
- Sealy C. Nanotechnology on your plate. *Nanotoday* 2006, 1(2): 20.
- Service RF. EPA ponders voluntary nanotechnology regulations. *Science* 2005, 309: 36.

- Sgro LA et al. Detection of combustion formed nanoparticles: Chemosphere 2003, 51: 1079-1090.
- Singh S, Nalwa HS. Nanotechnology and health safety – Toxicity and risk assessment of nanostructured materials on human health. J Nanosci Nanotechnol 2007, 7(9): 3048-3070.
- Singh S et al. Tissue biodistribution and blood clearance rates of intravenously administered carbon nanotube radiotracers. PNAS 2006, 103(9): 3357-3362.
- Stoeger T. Instillation of six different ultrafine carbon particles indicates a surface area threshold dose for acute lung inflammation in mice. Environ Health Perspect 2006, 114(3): 328-333.
- Tsuji JS et al. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part IV: risk assessment of nanoparticles. Toxicol Sci 2006, 89(1): 42-50.
- Utsunomiya S et al. Direct identification of trace metals in fine and ultrafine particles in the Detroit urban atmosphere. Environ Sci Technol 2004, 38(8): 2289- 2297.
- Warheit DB et al. Testing strategies to establish the safety of nanomaterials: conclusions of an ECETOC workshop. Inhalation Toxicology 2007, 19: 631-643.
- Wickson F. Public engagement means listening as well as talking. Nature 2007, 448: 644.
- Witmaack K. In search of the most relevant parameter for quantifying lung inflammatory response to nanoparticle exposure: particle number, surface area or what? Environ Health Perspect 2007, 115(2): 187-194.

## 7.2 Manuali, libri, rapporti

- Anonymous. Emerging challenges – Nanotechnology and the environment. Geo Year Book 2007: 61-70.
- Committees on Toxicity, Mutagenicity and Carcinogenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment. Joint Statement on nanomaterial toxicology. COT Statement 2007/01. March 2007.
- Department for Environment, Food and Rural Affairs (DEFRA). Characterizing the potential risks posed by engineered nanoparticles. A second UK Government Research Report, December 2007.
- Department of Health and Human Service. Nanotechnology. A report of the U.S. Food and Drug Administration Nanotechnology Task Force. July 25, 2007.
- European Commission. Health & Consumer Protection Directorate-General, Scientific Committee on Emerging and Newly-Identified Health Risks (SCENIHR). Opinion on the appropriateness of the risk assessment methodology in accordance with the technical guidance documents for new and existing substances for assessing the risks of nanomaterials. Brussels 2007.

European Parliament. Policy Department, Economic and Scientific Policy. Nanomaterials in consumer products. Brussels 2007.

Federal Institute for Risk Assessment (BfR). BfR consumer conference on nanotechnology in foods, cosmetics and textiles. 20 November 2006.

Institute of Food Science & Technology Trust Fund. Nanotechnology. IFST, London 2006.

Institute of Occupational Medicine. Nanoparticles: an occupational hygiene review. Research Report 274. Health and Safety Executive 2004.

International Technology Research Institute. R&D status and trends in nanoparticles, nanostructured materials, and nanodevices in the United States. Proceedings of the May 8-9, 1997 Workshop. January 1998.

Presidenza del Consiglio dei Ministri. Comitato Nazionale per la Bioetica. Nanoscienze e Nanotecnologie. Roma 2006.

Schweizerische Eidgenossenschaft. Synthetische Nanomaterialien (Riassunto esteso in Italiano). Bern 2007.

Tran CL et al, A scoping study to identify hazard data needs for addressing the risks presented by nanoparticles and nanotubes. Research Report. Institute of Occupational Medicine, December 2005.

UK Novel Foods, Additives and Supplement Division. Draft FSA regulatory review on nanotechnology in food: issue for comment. 7 April 2006.

Watts and Crane Associates. An assessment of regulatory testing strategies and methods for characterizing the ecotoxicological hazards of nanomaterials. Final Report, August 2007.