



RAPPORTI ISTISAN 17|13

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

Convegno

RinnovaReNano: sviluppo responsabile dei nanomateriali e opportunità per il sistema industriale regionale

Istituto Superiore di Sanità
Roma, 18 aprile 2016

ATTI

A cura di F. Barone, I. De Angelis,
A. Pilozi e L. Musmeci



AMBIENTE
E SALUTE

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Convegno
RinnovaReNano: sviluppo responsabile
dei nanomateriali e opportunità
per il sistema industriale regionale**

**Istituto Superiore di Sanità
Roma, 18 aprile 2016**

ATTI

A cura di Flavia Barone, Isabella De Angelis,
Antonella Piloizzi e Loredana Musmeci*

Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria

** in quiescenza da agosto 2016*

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

**Rapporti ISTISAN
17/13**

Istituto Superiore di Sanità

Convegno. RInnovaReNano: sviluppo responsabile dei nanomateriali e opportunità per il sistema industriale regionale. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 18 aprile 2016. Atti.

A cura di Flavia Barone, Isabella De Angelis, Antonella Pilozi e Loredana Musmeci
2017, iv, 38 p. Rapporti ISTISAN 17/13

Questo rapporto raccoglie i contributi al convegno in cui è stato presentato il progetto RInnovaReNano, finanziato dalla regione Lazio allo scopo di favorire la sinergia tra le realtà imprenditoriali regionali e l'ISS per uno sviluppo responsabile e un uso sicuro dei nanomateriali. L'interfaccia tra Istituto Superiore di Sanità e industrie della regione Lazio si avvarrà della collaborazione con Associazione Italiana per la Ricerca Industriale. Le relazioni presentate hanno riguardato principalmente l'approccio da utilizzare per una corretta valutazione del rischio per la salute umana e per l'ambiente alla luce delle normative vigenti, nei differenti ambiti applicativi identificati nel progetto.

Parole chiave: Nanomateriali; Applicazioni industriali dei nanomateriali; Sistema industriale del Lazio; Valutazione del rischio

Istituto Superiore di Sanità

Conference. RInnovaReNano: responsible development of nanomaterials and opportunities for the regional industrial system. Istituto Superiore di Sanità. Rome, April 18, 2016. Proceedings.

Edited by Flavia Barone, Isabella De Angelis, Antonella Pilozi and Loredana Musmeci
2017, iv, 38 p. Rapporti ISTISAN 17/13 (in Italian)

This report gathers the oral communications presented at the Conference in which the RInnovaReNano project – funded by the Latium Region in order to support synergies between the regional enterprises and the Istituto Superiore di Sanità (ISS, the National Institute of Health in Italy) for the responsible development and safe use of nanomaterials – was presented. Some objectives of the project will be realized in collaboration with the Associazione Italiana per la Ricerca Industriale. The communications were focused on the approach for nanomaterial risk assessment in different industrial sectors taking into account the regulatory compliances.

Key words: Nanomaterials; Industrial applications of nanomaterials; Latium industrial system; Risk assessment

Si ringrazia Antonella Maini per il lavoro di supporto nella stesura del documento.

Per informazioni su questo documento scrivere a: flavia.barone@iss.it e isabella.deangelis@iss.it

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it.

Citare questo documento come segue:

Barone F, De Angelis I, Pilozi A, Musmeci L (Ed.). *Convegno. RInnovaReNano: sviluppo responsabile dei nanomateriali e opportunità per il sistema industriale regionale. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 18 aprile 2016. Atti.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2017. (Rapporti ISTISAN 17/13).

Legale rappresentante dell'Istituto Superiore di Sanità: *Gualtiero Ricciardi*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 114 (cartaceo) e n. 115 (online) del 16 maggio 2014

Direttore responsabile della serie: *Paola De Castro*

Redazione: *Paola De Castro* e *Sandra Salinetti*

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori, che dichiarano di non avere conflitti di interesse.



INDICE

Presentazione	iii
Il Progetto RInnovaReNano <i>Loredana Musmeci</i>	1
Scenario tecnologico e fabbisogni del sistema imprenditoriale <i>Sesto Viticoli</i>	3
Approccio normativo a livello europeo sui nanomateriali: stato dell'arte ed evoluzione <i>Maria Alessandrelli, Paola Di Prospero Fanghella, Rosa Draisci</i>	6
Caratterizzazione chimica delle nanoparticelle metalliche per la valutazione dell'esposizione <i>Francesco Petrucci, Beatrice Bocca, Alessandro Alimonti</i>	10
Caratterizzazione <i>in vitro</i> e <i>in silico</i> del potenziale tossicologico dei nanomateriali <i>Andrea Zijno, Cristina Andreoli, Flavia Barone, Cecilia Bossa, Isabella De Angelis, Gabriella Di Felice, Ettore Meccia</i>	16
Aspetti tossicologici nella valutazione di sicurezza delle nanotecnologie nel settore agroalimentare <i>Roberta Tassinari, Laura Narciso, Francesca Maranghi</i>	22
Aspetti regolatori, metodologie di indagine e aspetti tecnico-scientifici per sicurezza ed efficacia dei dispositivi medici nanostrutturati <i>Rossella Bedini, Barbara De Berardis, Mauro Grigioni, Agnese Molinari, Fabiana Superti</i>	26
Aspetti regolatori relativi alla qualità e sicurezza nello sviluppo di nanofarmaci <i>Gabriella Di Felice, Bianca Barletta, Cinzia Butteroni, Silvia Corinti</i>	30
Ruolo delle nanovesicole nel trasporto di farmaci e nanoparticelle di varia natura <i>Stefano Fais, Luana Lugini, Cristina Federici, Mariantonia Logozzi, Tommaso Azzarito, Davide Mizzoni, Rossella Di Raimo, Elisabetta Iessi</i>	34
Conclusioni <i>Flavia Barone, Isabella De Angelis, Antonella Pillozzi, Loredana Musmeci</i>	38

PRESENTAZIONE

Le nanotecnologie sono una delle sei tecnologie abilitanti (*Key Enabling Technologies*) considerate fondamentali per lo sviluppo industriale europeo nel breve-medio termine. Ad oggi, svariati prodotti di consumo sono interessati all'applicazione di nanomateriali (NM) e/o nanotecnologie, tra cui cosmetici e prodotti per la cura della persona, prodotti del tessile e dell'abbigliamento, elettrodomestici, prodotti per il confezionamento degli alimenti. Ne consegue che settori di sicuro rilievo per le imprese manifatturiere regionali (come biomedicale, cosmetico, alimentare e la chimica dei materiali) possono trarre grandi benefici e aumentare la competitività attraverso l'utilizzo delle nanotecnologie.

Il tema delle nanotecnologie e del loro sviluppo sicuro e responsabile rappresenta un ambito ideale di collaborazione, dove le infrastrutture di ricerca possono fornire strumenti e risorse che non sempre le imprese, in particolare le piccole e le medie imprese, sono in grado di sviluppare al proprio interno.

La produzione e l'utilizzo degli NM sono però strettamente collegati all'analisi della loro sicurezza e a una corretta valutazione del rischio per l'uomo e per l'ambiente. A tale riguardo, notevole è l'impegno di organismi nazionali e internazionali per individuare le procedure adeguate a garantire uno sviluppo sicuro e responsabile degli NM. La Commissione Europea (CE), ad esempio, auspica un'implementazione delle conoscenze ottenute dai progetti sviluppati in ambito comunitario, sia al fine di garantire una corretta valutazione della sicurezza degli NM sia per la revisione delle normative vigenti. L'integrazione di differenti esperienze e competenze scientifiche e regolatorie è considerata essenziale per il raggiungimento di tale obiettivo.

Per venire incontro alle richieste nazionali e internazionali sugli NM, l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) ha attivato il Gruppo di Lavoro (GdL) "Nanomateriali e salute" per condividere competenze e tecnologie nel settore della nanomedicina e della nanotossicologia. Caratteristica principale del GdL è il suo approccio multidisciplinare, derivante dal coinvolgimento di cinque Dipartimenti (Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria; Tecnologie e Salute; Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare; Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate; Farmaco) e il Centro Nazionale Sostanze Chimiche.

Le variegate competenze presenti all'interno del GdL hanno dato vita al progetto RInnovaReNano, che mira a realizzare strumenti e attività di supporto per il trasferimento tecnologico per la valutazione del rischio degli NM alle realtà industriali del Lazio, coinvolte nella ricerca e innovazione in questo settore.

Allo scopo di presentare le linee di indirizzo del progetto RInnovaReNano, illustrare le attività e competenze sulle nanotecnologie e sulla valutazione del rischio associato agli NM presenti in ISS e offrire una prima occasione di confronto con la realtà industriale regionale e tutti gli altri soggetti interessati a queste tematiche, il 18 aprile 2016 si è svolto presso l'ISS il convegno "RInnovaReNano: sviluppo responsabile dei nanomateriali e opportunità per il sistema industriale regionale".

Il convegno prevedeva una serie di comunicazioni frontali, tenute dagli esperti ISS e AIRI (Associazione Italiana per la Ricerca Industriale), focalizzate sui diversi settori applicativi industriali; durante la sessione pomeridiana a numero chiuso, si è invece svolto un confronto tra la realtà industriale regionale e i referenti del progetto.

Il convegno, che ha registrato la presenza di numerosi iscritti, è stato seguito con interesse e partecipazione da parte dei convenuti. Inoltre, nella sessione riservata, l'articolata e vivace discussione con gli stakeholder presenti ha generato spunti di riflessione rilevanti per le successive fasi del progetto.

Questo rapporto raccoglie le relazioni presentate nel corso della prima parte del convegno. Esse hanno riguardato i principali approcci di tipo normativo e tecnico-scientifico da utilizzare per una corretta valutazione del rischio per la salute umana e per l'ambiente, nei differenti ambiti applicativi identificati nel progetto.

IL PROGETTO RINNOVARENANO

Loredana Musmeci*

Dipartimento di Ambiente e connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Allo scopo di favorire la sinergia tra le realtà imprenditoriali regionali e l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) per uno sviluppo responsabile e un uso sicuro dei nanomateriali (NM), la regione Lazio ha finanziato nel novembre 2015 il progetto RInnovaReNano (Ricerca ed innovazione responsabile delle nanotecnologie: valutazione della sicurezza ed adeguamento normativo, a supporto dello sviluppo industriale, e realizzazione di una piattaforma informativa sulle nanotecnologie finalizzata all'accesso ed alla diffusione delle conoscenze), di durata biennale, che prevede la collaborazione tra ISS e Associazione Italiana per la Ricerca Industriale (AIRI).

RInnovaReNano è da considerarsi un progetto pilota, che intende apportare un contributo utile allo sviluppo delle competenze e capacità scientifiche e tecnologiche delle imprese della regione Lazio coinvolte nella ricerca e innovazione degli NM e delle nanotecnologie, in un'ottica di sviluppo sostenibile e responsabile favorendo, inoltre, la sinergia tra diverse realtà regionali.

A questo riguardo, sono stati identificati come ambiti applicativi di maggiore rilevanza i settori: chimico e cosmetico, alimentare, biomedicale e chimico-farmaceutico.

Il progetto si prefigge molteplici obiettivi, volti principalmente a fornire alle imprese della regione Lazio gli strumenti necessari per rispondere alle crescenti richieste comunitarie riguardo agli NM. I principali obiettivi comprendono:

- confrontarsi con la realtà industriale regionale ed eventualmente nazionale, in collaborazione con le associazioni di categoria, rispetto agli NM di maggiore rilevanza industriale per le applicazioni in campo chimico e cosmetico, alimentare, biomedico e farmacologico, al fine di mantenere una stretta relazione tra le attività del progetto e gli interessi delle imprese;
- realizzare strumenti e attività di supporto per il trasferimento di saggi e metodologie, utilizzati nella valutazione del rischio degli NM, alla realtà industriale regionale, tramite corsi, condivisione di protocolli e procedure operative e collaborazioni in ambito di ricerca;
- istituire un sistema di monitoraggio delle attività di ricerca nazionali e internazionali mirate a diffondere le conoscenze e a supportare l'attività di regolamentazione per la gestione delle sostanze in forma nanometrica;
- costruire e gestire una banca dati telematica per favorire l'accesso degli utilizzatori (industria e comunità scientifica) alle conoscenze sulla tematica. La banca dati avrà lo scopo sia di raccogliere e mettere a disposizione informazioni relative alla valutazione della sicurezza degli NM e allo stato dell'arte delle attività di ricerca nazionali e internazionali, sia di integrare i dati esistenti, rendendo disponibile la documentazione prodotta dalla Commissione Europea (CE) e da altri organismi regolatori internazionali rispetto alle specifiche caratteristiche degli NM.
- selezionare tematiche di ricerca prioritarie a livello nazionale e internazionale per lo sviluppo responsabile delle nanotecnologie, e avviare un confronto con le imprese

* in quiescenza da agosto 2016

regionali, utilizzando i canali di comunicazione offerti dalle associazioni di categoria, al fine di facilitare la partecipazione congiunta a programmi nazionali o comunitari di ricerca;

- promuovere un'efficace interazione tra gli organismi nazionali competenti per le regolamentazioni vigenti sugli NM e la realtà industriale regionale;
- divulgare i risultati ottenuti tramite iniziative di formazione quali la realizzazione di workshop e conferenze.

Il raggiungimento degli obiettivi previsti avverrà attraverso diverse fasi di lavoro, come riportato nella Figura 1.

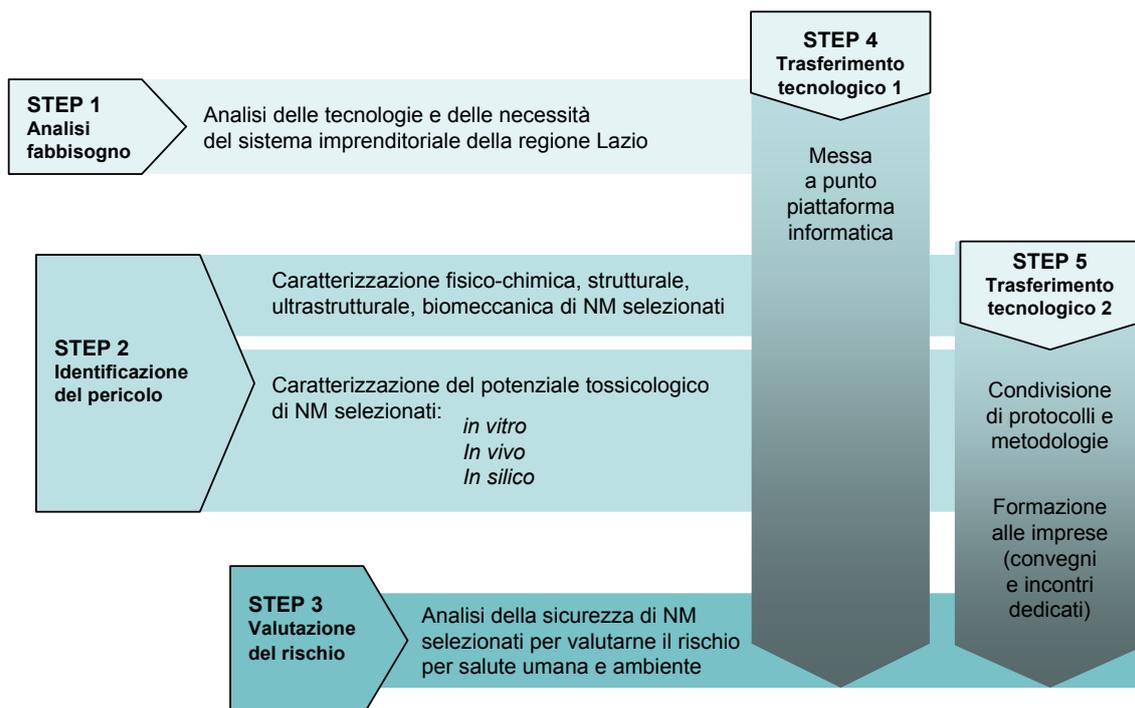


Figura 1. Fasi di lavoro previste dal progetto RinnovaReNano

SCENARIO TECNOLOGICO E FABBISOGNI DEL SISTEMA IMPRENDITORIALE

Sesto Viticoli

Associazione Italiana per la Ricerca Industriale, Roma

Nel recente quinquennio il sistema tecnologico del Paese si è dovuto confrontare con un mercato globale caratterizzato da periodici scenari di crisi economica e finanziaria e da una competitività sempre più serrata. In tale scenario, il sistema tecnologico italiano ha saputo, nonostante le ben note debolezze strutturali e finanziarie del Paese, mantenere il passo a livello internazionale in molti settori rilevanti per il contesto sociale ed economico del Paese, e sta generalmente conservando e talvolta incrementando la competitività dei suoi processi produttivi e dei suoi prodotti. Solo in alcuni specifici settori, anche se talvolta significativi per il Paese, la crisi economica e le pesanti problematiche strutturali e sociali non hanno permesso di mantenere il passo e quindi vi è stata una preoccupante contrazione della competitività e talvolta anche della presenza industriale.

Il rapporto “Le innovazioni del prossimo futuro – Tecnologie prioritarie per l’industria”, che l’Associazione Italiana per la Ricerca Industriale (AIRI) produce con cadenza triennale dal 1995, presenta le analisi e le relative valutazioni sulle previsioni di sviluppo tecnologico prioritario nel breve-medio termine di alcuni settori industriali di interesse per il Paese. Il rapporto è frutto del contributo volontario delle Aziende, delle Università e degli Enti di ricerca associati ad AIRI, anche in collaborazione con valide strutture di ricerca e sviluppo tecnologico pubbliche e private, o aziende non associate, quando si è ritenuto necessario (1).

A tale scopo, grazie ad una analisi il più possibile dettagliata e tecnicamente adeguata, sono state identificate 115 tecnologie prioritarie, che si ritiene necessario sviluppare per mantenere una adeguata competitività internazionale in dieci settori industriali rilevanti per il Paese:

- informatica e telecomunicazioni;
- microelettronica e semiconduttori;
- energia;
- chimica;
- farmaceutica e biotecnologie farmaceutiche;
- trasporto su strada, ferro e marittimo;
- aeronautica;
- spazio;
- beni strumentali;
- ambiente.

La priorità delle tecnologie è stata considerata in base a criteri quali: innovatività e impatto sulla competitività; fattibilità tecnica ed economica per arrivare al prodotto finito o al processo produttivo, e quindi al mercato; impatto socio-economico in termini di occupazione, sostenibilità sociale e ambientale, sintonia con le linee di indirizzo europee per Ricerca e Sviluppo (R&S).

Proprio in relazione a questo ultimo punto, appare opportuno confrontare come lo scenario tecnologico delineato per il nostro Paese sia in linea con l’impostazione europea che vede nelle *Key Enabling Technologies* (KET) (2) (biotecnologie industriali, nuovi materiali, fotonica, nanotecnologie, micro e nano elettronica, sistemi avanzati di produzione) lo strumento essenziale per la competizione sul mercato mondiale. Infatti, lo sviluppo di circa l’85% delle

115 Tecnologie Prioritarie richiede l'integrazione di due o più KET: a titolo di esempio in Tabella 1 è riportata la matrice KET/Tecnologie Prioritarie per il settore trasporti.

Tabella 1. Correlazione tra Tecnologie Prioritarie e KET nel settore trasporti

Tecnologie Prioritarie nei trasporti	KET			
	Nanotecnologie	Nuovi materiali	Bioteχνologie industriali	Sistemi avanzati di produzione
Sicurezza globale				X
Sostenibilità ambientale	X	X	X	
Efficienza energetica		X	X	X
Connettività				X
Comfort		X		X
Mezzi diversi				X
Life Cycle Assessment (LCA)		X	X	X
Logistica				X

Riguardo a nanotecnologie e nanomateriali, esse hanno un impatto su più del 50% delle Tecnologie Prioritarie, con un ruolo essenziale per abilitare nuove applicazioni e prodotti in tutti i settori considerati dal rapporto. Riguardo agli ambiti di interesse di RInnovaReNano, esempi di applicazioni specifiche identificate dallo studio includono: compositi, catalizzatori, additivi per uso industriale, funzionalizzazione delle superfici e materiali isolanti (chimica, materiali e costruzioni), tecniche analitiche, tecnologie mini-invasive e ingegneria tissutale (biomedicale), sistemi a rilasciato controllo di farmaci e *imaging* molecolare (farma/bio), principi attivi e conservanti (cosmetici), diagnostica per il controllo di qualità e di processo, materiali biodegradabili (agroalimentare).

Altro punto di sintonia con le *policy* europee è che l'innovazione tecnologica è sempre vista non come elemento a sé stante, ma come uno *step* dell'intera catena del valore che, partendo dalla conoscenza e arrivando al mercato, deve in ultima analisi contribuire ad affrontare con successo le grandi sfide sociali del nostro tempo. In questo contesto un valore sempre più significativo viene acquisto dallo sviluppo di una ricerca e innovazione responsabile (*Research and Responsible Innovation*, RRI), in cui la tecnologia diviene lo strumento per raggiungere una sostenibilità complessiva: sociale, ambientale ed economica (3).

Pur muovendosi nell'ambito di un obiettivo progettuale ben definito, RInnovaReNano rappresenta quindi una ottima opportunità, per il sistema pubblico e privato della ricerca, di creare *network* sul tema delle nanotecnologie e dei nanomateriali, da valorizzare in contesti diversi:

- iniziative regionali;
- iniziative nazionali (es. Fondo Crescita Sostenibile del MISE, Piano Nazionale delle Ricerche, ecc.);
- programma quadro europeo Horizon 2020.

contribuendo nei fatti non solo ad un miglioramento delle prestazioni funzionali del prodotto, ma soprattutto alla costruzione di una *governance* per un manifatturiero sostenibile nell'ottica di una innovazione moderna.

Tale obiettivo sarà tanto più facilmente raggiungibile quanto più forte sarà la cooperazione tra ricerca industriale e ricerca pubblica, intensificata in questo rispetto al recente passato.

Bibliografia

1. Associazione Italiana per la Ricerca Industriale. *Tecnologie prioritarie per l'industria, Le innovazioni del prossimo futuro: tecnologie prioritarie per l'industria*. IX Edizione. Roma: AIRI; 2016.
2. European Commission. *Key Enabling Technologies*. Brussels: European Commission. Disponibile all'indirizzo: https://ec.europa.eu/growth/industry/key-enabling-technologies_en; ultima consultazione 1/12/2016.
3. Associazione Italiana per la Ricerca Industriale, Consiglio Nazionale delle Ricerche. *Report sulla Ricerca e innovazione Responsabile, Accordo AIRI- CNR per la RRI*. Roma: AIRI; 2015. Disponibile all'indirizzo: <http://www.airi.it/wp-content/uploads/2015/12/Report-Airi-Ricerca-Innovazione-Responsabile.pdf>; ultima consultazione 1/12/2016.

APPROCCIO NORMATIVO A LIVELLO EUROPEO SUI NANOMATERIALI: STATO DELL'ARTE ED EVOLUZIONE

Maria Alessandrelli, Paola Di Prospero Fanghella, Rosa Draisci
Centro Nazionale Sostanze Chimiche, Istituto Superiore di Sanità, Roma

I nanomateriali (NM) in virtù delle loro caratteristiche chimico-fisiche e tecnologiche hanno aperto nuove prospettive di sviluppo scientifico e incentivato la realizzazione di progetti di ricerca sinergici tra industria, università ed enti di ricerca. L'immissione sul mercato dei nanomateriali ha reso, inoltre, più stringente la necessità di un efficace monitoraggio dal produttore al consumatore che non può prescindere da un quadro legislativo adeguato per la tutela della salute umana e ambientale. Attualmente non esiste una normativa *ad hoc* per gli NM ma è possibile applicare l'esistente legislazione sia a carattere orizzontale che di specifico settore.

Nell'ambito della normativa di settore, il Regolamento (CE) 1223/2009 sui cosmetici (1) introduce la definizione di "nanomateriale" (art. 2 comma k) ma specifica che la Commissione Europea (CE), considerando le varie definizioni di NM pubblicate da organismi diversi e i costanti sviluppi tecnico-scientifici nel settore delle nanotecnologie, adeguerà e adatterà la definizione di nanomateriale ai progressi tecnico-scientifici nonché alle definizioni concordate a livello internazionale. Al fine di assicurare un'adeguata tutela, l'articolo 13 prevede una dichiarazione dell'uso di NM che deve essere presente nella notifica di prodotto al CPNP (*Cosmetic Product Notification Portal*): tale procedura consente di descrivere il prodotto stesso in tutti i suoi aspetti (formula chimica, percentuale di materie prime usate, destinazione d'uso, etichetta, confezione primaria e secondaria). Per i prodotti contenenti NM, è, altresì, prevista una notifica che va presentata 6 mesi prima dell'immissione sul mercato che deve comprendere un'importante serie di informazioni (dimensione delle particelle, proprietà fisiche e chimiche, stima della quantità intesa come previsione di immissione sul mercato annuale, profilo tossicologico, dati sulla sicurezza, condizioni di esposizione ragionevolmente prevedibili).

Inoltre, come prescritto dall'articolo 19, l'elenco degli ingredienti esposto sulle confezioni dei cosmetici deve necessariamente menzionare tutti gli NM presenti. La CE, alla luce dello sviluppo scientifico, ha stabilito un periodico processo di riesame delle disposizioni del Regolamento (CE) 1223/2009 (1) in merito agli NM e, se necessario, può proporre opportune modifiche di tali disposizioni. La prima revisione è prevista entro luglio 2018.

Il Regolamento (UE) 528/2012 BPR (*Biocidal Products Regulation*) (2), concernente l'immissione sul mercato e l'uso di biocidi, a differenza della precedente Direttiva 98/8/CE, introduce esplicitamente gli NM, li definisce nell'articolo 3 comma z, li esclude dalla categoria di prodotti a basso rischio e ammette la procedura di autorizzazione semplificata qualora il biocida non contenga alcun NM (art. 25). L'approvazione di un principio attivo non comprende gli NM, salvo dove esplicitamente indicato. I saggi trasmessi ai fini dell'approvazione di un principio attivo sono svolti conformemente al regolamento (CE) n. 440/2008 (3) relativo ai metodi di prova ai sensi del Regolamento (CE) 1907/2006 concernente la registrazione, valutazione, autorizzazione e restrizione delle sostanze chimiche REACH (*Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*) (4). Tuttavia, se i metodi di prova sono applicati agli NM è basilare illustrarne l'idoneità scientifica e, qualora necessario, riportare gli adattamenti/adeguamenti tecnici effettuati a seguito delle nanopeculiarità. Per quanto attiene alla "classificazione, imballaggio ed etichettatura" dei biocidi, l'articolo 69 stabilisce che

sull'etichetta figurino in modo chiaro e indelebile: gli eventuali NM contenuti nel prodotto, ogni specifico rischio correlato e il termine “nano” tra parentesi dopo ogni riferimento agli NM. Nell'ottica di un'adeguata indagine sulla valutazione dei rischi, a decorrere dal 1° settembre 2015, e ogni cinque anni, gli Stati Membri (SM) devono inviare alla CE una relazione sull'attuazione del regolamento 528/2012 nei rispettivi territori. La relazione contiene, insieme alle altre informazioni obbligatorie, anche quelle sull'uso di NM nei biocidi e sui potenziali rischi legati a tale uso (art. 65 comma 3d). Attualmente non sono previsti sviluppi di specifiche linee guida in merito ai *data requirements*, definiti dal Regolamento BPR, o per la valutazione degli NM usati nei prodotti biocidi. In ogni modo, nell'ambito del programma di lavoro per la revisione di tutti i principi attivi già in commercio, la CE ha pubblicato delle “note” per chiarire lo *status* delle sostanze attive esistenti.

Nel contesto legislativo europeo, le sostanze chimiche sono disciplinate dal Regolamento REACH (4) e dal Regolamento (CE) 1272/2008 CLP (*Classification, Labelling and Packaging of substances and mixtures*) (5) che rappresentano gli strumenti normativi cardine della gestione dei rischi derivanti dalle sostanze chimiche. REACH e CLP non contengono specifiche disposizioni per gli NM ma poiché si applicano a tutte le sostanze in qualsiasi dimensione, forma e stato fisico, come stabiliscono gli articoli 3 del REACH (4) e 2 del CLP (6), ricadono nel loro campo di applicazione e ogni richiesta di informazione presente nei due regolamenti è applicabile. Per quanto attiene alla definizione di nanomateriale, si adotta la Raccomandazione della CE (2011/696/UE) (7) tuttora in fase di revisione da parte della Commissione stessa che auspica di finalizzare il processo di riesame entro il 2016. A norma del Regolamento REACH, produttori e importatori hanno l'obbligo di presentare un fascicolo di registrazione per le sostanze fabbricate o importate in quantitativi pari o superiori a 1 tonnellata all'anno. Per quantitativi pari o superiori a 10 ton/anno il dichiarante deve presentare una relazione sulla sicurezza chimica (*Chemical Safety Report, CSR*) basata su *Chemical Safety Assessment (CSA)*. A seguito di un'indagine condotta sui dossier di registrazione, che includono anche riferimenti alla forma nano delle sostanze, il *Directorate-General for Environment (DG ENV)* della CE e il *Joint Research Centre (JRC)* hanno fornito una panoramica delle classificazioni presenti in conformità al regolamento CLP. È necessario sottolineare che in ragione delle loro specifiche caratteristiche, gli NM richiedono un approccio *case by case* perché i dati disponibili sulle proprietà intrinseche evidenziano differenze nella classe di pericolo per la forma nano e per quella *bulk* di una stessa sostanza chimica: conseguentemente classificazione ed etichettatura saranno differenti. DG ENV e JRC hanno tracciato un quadro dal quale è emerso che un solo dossier di registrazione presenta classificazione ed etichettatura (*Classification and Labelling, C&L*) armonizzate mentre tutti gli altri dossier esaminati sono in autoclassificazione. Due sono i fattori emergenti più preoccupanti: il primo riguarda l'impossibilità di giustificare scientificamente le differenze nella classificazione della forma *nano* e della forma *bulk* di una stessa sostanza; il secondo fattore è legato alle conclusioni diverse degli studi sui meccanismi tumorali che non assicurano dati sufficienti per classificare la forma *bulk* e la forma *nano* della stessa sostanza.

In base a queste criticità, una futura proposta di modifica del CLP dovrà tenere conto dell'inadeguatezza dei parametri classici per materiali così innovativi, della ricaduta di C&L su molte altre legislazioni a valle, dell'importanza di individuare le caratteristiche di pericolo in ambito REACH per la valutazione dell'esposizione e la caratterizzazione del rischio. Coerentemente, le guide di orientamento dell'Agenzia europea per le sostanze chimiche (*European Chemical Agency, ECHA*) per l'applicazione dei criteri del CLP (9) dovranno essere redatte in modo nanospecifico.

Dopo il *General Report on REACH* (6), la CE sta lavorando ad un *Impact Assessment Report (IAR)*, per illustrare le revisioni degli allegati REACH e stimare i costi collegati, che

pubblicherà nella seconda metà del 2016. Parallelamente la CE, insieme alle Autorità Competenti degli SM, agli stakeholder e all'ECHA sta operando per modificare gli allegati I, III, VI, VII, X, XI e XII del REACH. L'ECHA è, inoltre, leader nell'implementazione delle linee guida di orientamento sugli obblighi d'informazione e sulla valutazione della sicurezza chimica (*Information Requirements and Chemical Safety Assessment, IR&CSA*), necessarie all'industria per ottemperare alle prescrizioni REACH (8, 10).

Da aprile 2016 gli esperti provenienti da tutti gli SM, riuniti nell'ambito del PEG (*Partner Expert Group*), hanno esaminato gli allegati incentrati sugli NM di quattro guide ECHA (registrazione, *read-across*, *endpoints* sulla salute umana e sull'ambiente). Attualmente l'ECHA sta valutando i pareri tecnico-scientifici degli esperti per avviare la consultazione con i vari comitati dell'ECHA e la CE e stima di riuscire a pubblicare la versione finale delle guide entro maggio 2017.

In definitiva, il quadro legislativo sugli NM non può prescindere da un approccio integrato che parta dal monitoraggio degli NM di maggiore preoccupazione e portino ad un aumento della trasparenza in merito ai rischi-benefici di questi materiali attraverso la sinergia tra la qualità dei dati inviati dal settore industriale e la nanospecificità dei processi di valutazione.

Bibliografia

1. Europa. Regolamento (CE) 1223/2009 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 30 novembre 2009 sui Prodotti Cosmetici. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 342, 22.12.2009.
2. Europa. Regolamento (UE) 528/2012 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 22 maggio 2012, relativo alla messa a disposizione sul mercato e all'uso dei biocidi. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 167, 22.6.2012.
3. Europa. Regolamento (CE) 440/2008 della Commissione del 30 maggio 2008 che istituisce dei metodi di prova ai sensi del regolamento (CE) n. 1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH). *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 142, 31.5.2008.
4. Europa. Regolamento (CE) n. 1907/2006 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 18 dicembre 2006 concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH), che istituisce un'agenzia europea per le sostanze chimiche, che modifica la direttiva 1999/45/CE e che abroga il regolamento (CEE) n. 793/93 del Consiglio e il regolamento (CE) n. 1488/94 della Commissione, nonché la direttiva 76/769/CEE del Consiglio e le direttive della Commissione 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE e 2000/21/CE. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 136/3, 29.5.2007
5. Europa. Parlamento Europeo e Consiglio. Regolamento (CE) N. 1272/2008 del 16 dicembre 2008 relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele che modifica e abroga le direttive 67/548/CEE e 1999/45/CE e che reca modifica al regolamento (CE) n. 1907/2006. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 83, 31.12.2008.
6. Commissione delle Comunità Europee. "Relazione generale su REACH. Relazione della Commissione al Parlamento Europeo, al Consiglio, al Comitato Economico e Sociale Europeo e al Comitato delle Regioni. conformemente all'articolo 117, paragrafo 4, del regolamento REACH e all'articolo 46, paragrafo 2, del regolamento CLP e riesame di taluni elementi del regolamento REACH in conformità all'articolo 75, paragrafo 2, e all'articolo 138, paragrafi 2, 3 e 6, dello stesso regolamento". (Text with EEA relevance). {SWD(2013) 25 final}. Bruxelles, 5.2.2013 [COM(2013) 49 final]. Disponibile all'indirizzo: [http://www.parlamento.it/web/docuorc2004.nsf/8fc228fe50daa42bc12576900058cada/57d6727201c bf8bac1257b0900391498/\\$FILE/COM2013_0049_IT.pdf](http://www.parlamento.it/web/docuorc2004.nsf/8fc228fe50daa42bc12576900058cada/57d6727201c bf8bac1257b0900391498/$FILE/COM2013_0049_IT.pdf), ultima consultazione 01/12/2016.

7. Europa. Raccomandazione della Commissione del 18 ottobre 2011 sulla definizione di nanomateriale. (Testo rilevante ai fini del SEE), 2011/696/EU. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 275/38, 20.10.2011.
8. ECHA. *Guidance in a nutshell chemical safety assessment*. Helsinki: European Chemical Agency; 2011. Disponibile all'indirizzo: https://echa.europa.eu/documents/10162/13632/nutshell_guidance_csa_en.pdf; ultima consultazione 01/12/2016.
9. ECHA. *Guidance on the application of the CLP criteria. Guidance to Regulation (EC) No 1272/2008 on classification, labelling and packaging (CLP) of substances and mixtures*. Helsinki: European Chemical Agency; 2015. Disponibile all'indirizzo: http://echa.europa.eu/documents/10162/13562/clp_en.pdf; ultima consultazione 01/12/2016.
10. ECHA. *Guida alle prescrizioni in materia di informazione e alla valutazione della sicurezza chimica*. Helsinki: European Chemical Agency; 2011. Disponibile all'indirizzo: <https://echa.europa.eu/it/guidance-documents/guidance-on-information-requirements-and-chemical-safety-assessment>; ultima consultazione 01/12/2016.

CARATTERIZZAZIONE CHIMICA DELLE NANOPARTICELLE METALLICHE PER LA VALUTAZIONE DELL'ESPOSIZIONE

Francesco Petrucci, Beatrice Bocca, Alessandro Alimonti
Dipartimento Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

L'uso delle NanoParticelle di Metallo (NPM), particelle (aggregati atomici o molecolari) con un diametro compreso tra 1 e 100 nm, nei prodotti di consumo (alimenti, cosmesi, tatuaggi, farmaci, vaccini, prodotti per la casa, tessuti, ecc.) continua a crescere rapidamente. I vantaggi delle NPM devono essere valutati rispetto ai loro potenziali effetti tossici attraverso una corretta valutazione dell'esposizione e del rischio per l'uomo e l'ambiente. Tale valutazione presuppone la conoscenza delle caratteristiche chimico-fisiche delle NPM quali dimensione e distribuzione dimensionale, composizione, concentrazione e stato di aggregazione. La misura delle NPM direttamente nei prodotti di consumo è indispensabile per identificare i livelli di esposizione dell'uomo mentre la misura nei fluidi e tessuti umani è essenziale per valutarne il bioaccumulo e la stabilità nel tempo. A tal fine è prioritario mettere a punto metodi analitici idonei a valutare le suddette caratteristiche chimico-fisiche.

Di seguito vengono presentati i primi risultati di uno studio di caratterizzazione delle NPM in inchiostri per tatuaggi e in cosmetici e alcuni studi di letteratura *in vitro* e *in vivo* sulla stabilità e il bioaccumulo delle NPM in fluidi e tessuti umani. Le metodologie e l'approccio utilizzato saranno ulteriormente sviluppati e applicati nell'ambito del progetto RInnovaReNano al fine di contribuire ad uno sviluppo e impiego sicuro e responsabile delle NPM.

Tecniche analitiche

Le tecniche analitiche per la caratterizzazione chimico-fisica delle NanoParticelle (NP) e le informazioni che si possono ottenere dal loro utilizzo, sono riportate in Tabella 1.

Tabella 1. Tecniche analitiche e informazioni ottenibili sulle NP

Tecnica	Dimensione	Distribuzione dimensionale	Numero	Composizione e concentrazione	Agglomerati
DLS	X	X			
FFF-MALS	X	X			X
FFF-MALS-ICP-MS	X	X		X	X
SP-ICP-MS	X	X	X	X	

DLS: *Dynamic Light Scattering*

FFF-MALS: *Field Flow Fractionation-Multi Angle Light Scattering*

FFF-MALS-ICP-MS: *Field Flow Fractionation-Multi Angle Light Scattering-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry*

SP-ICP-MS: *Single Particle-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry*

La tecnica del *Dynamic Light Scattering* (DLS) fornisce uno screening iniziale circa la presenza di materiale nanometrico nel campione. Le particelle presenti vengono colpite da un raggio laser e le variazioni di intensità della luce diffusa dalla particella colpita (*scattering*) vengono misurate in funzione del tempo; per mezzo di un algoritmo si riesce a ricostruire la distribuzione dimensionale e il raggio idrodinamico medio (R_h) delle particelle.

La tecnica di frazionamento a flusso di campo (*Field Flow Fractionation*, FFF) permette di operare una pre-separazione tra materiale nanometrico e materiale micrometrico in campioni complessi. Il campione viene iniettato all'interno di un canale di separazione dove scorre un flusso di eluizione; l'applicazione di un flusso perpendicolare di focalizzazione spinge le particelle più grandi verso le pareti del canale, da dove si muovono più lentamente, e le particelle più piccole verso il centro del canale dove diffondono più rapidamente. Le particelle di dimensioni nanometriche usciranno a tempi di ritenzione (T_r) più bassi. Tale sistema può essere accoppiato a due rivelatori, un *Multi Angle Light Scattering* (MALS) e uno spettrometro di massa con sorgente a plasma (*Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry*, ICP-MS). Il MALS permette di misurare le variazioni di intensità dello *scattering* delle particelle ad angoli differenti e fornisce una misura assoluta delle dimensioni delle particelle colpite (raggio di girazione, R_g). L'ICP-MS fornisce la composizione e la concentrazione del metallo associato alle particelle.

La tecnica del *Single Particle* (SP)-ICP-MS fornisce il numero e la dimensione delle particelle metalliche, distinguendole dalla forma dissolta del metallo. L'assunzione di base dell'SP-ICP-MS è che ogni impulso registrato rappresenta una singola NP; la frequenza degli impulsi è direttamente proporzionale al numero delle particelle e l'intensità degli impulsi è proporzionale alla loro dimensione.

Valutazione delle NPM in inchiostri per tatuaggi

Gli inchiostri per tatuaggio sono costituiti da pigmenti di natura organica e inorganica, in forma micro- e nano-particellare, prevalentemente allo stato solido, caratterizzati da bassa solubilità e alta resistenza alla degradazione. Le NP possono essere utilizzate al fine di ottenere una migliore qualità dell'inchiostro in termini di brillantezza, persistenza e fotostabilità (1). Negli inchiostri neri sono state già riscontrate NP di *Carbon Black* (CB) e negli inchiostri di colore bianco NP di TiO_2 (2). Ad oggi sono poco noti gli effetti dell'interazione tra le NP e i sistemi biologici, ma le NP di CB e TiO_2 sono state classificate dall'*International Agency for Research on Cancer* (IARC) come possibili cancerogeni per l'uomo (Group 2B) (3).

Sono stati campionati 9 inchiostri di colori diversi (*Brite orange*, *Ice blue*, *Dark chocolate*, *True black*, *Black outlining*, *Monthly red*, *Grasshopper green*, *Mean green*, *Deep violet*) contenenti pigmenti organici (prevalentemente a base di ftalocianine di Cu, azocomposti e CB) e inorganici (prevalentemente a base di TiO_2), come dichiarato in etichetta.

I risultati dell'analisi DLS dei 9 inchiostri per tatuaggi, espressi come raggio idrodinamico (R_h), indice di polidispersione (PDI) e diametro medio delle particelle (D_{50}), sono riportati in Tabella 2. Tutti gli inchiostri risultavano poli-dispersi (dato che il valore del PDI era sempre $> 0,10$) ovvero costituiti da particelle di dimensione variabile da pochi nanometri a centinaia di nanometri. Le particelle più piccole sono state riscontrate nei pigmenti neri (*True black* e *Black outlining*), mentre tutti i pigmenti colorati contenevano materiale di dimensioni medie tra 150 e 421 nm. Il viola (*Deep violet*) è l'unico colore che mostrava due popolazioni distinte di particelle con dimensioni medie di 31 e 137 nm. È presumibile che i colori neri contengano principalmente particelle di CB; mentre particelle di TiO_2 sono presenti in quasi tutti i colori per schiarire le varie tonalità.

Tabella 2. Risultati dell'analisi effettuata su inchiostri per tatuaggi tramite DLS*

Nome dell'inchiostro	R _h medio	D50	PDI
	nm	nm	
<i>Brite orange</i>	147	56	0,23
<i>Ice blue</i>	421	255	0,43
<i>Dark chocolate</i>	418	305	0,23
<i>True black</i>	98	67	0,15
<i>Black outlining</i>	152	72	0,19
<i>Monthly red</i>	211	143	0,24
<i>Grasshopper green</i>	277	144	0,26
<i>Mean green</i>	337	230	0,16
<i>Deep violet</i>	31; 137	24	0,28

* *Dynamic Light Scattering*

Dal valore del D50 si evidenzia che 4 pigmenti (*Brite orange*, *True black*, *Black outlining*, *Deep violet*) contenevano il 50% di particelle con R_h < 100 nm; tali inchiostri possono essere considerati nanomateriali sulla base della Raccomandazione 2011/696/UE sulla definizione di nanomateriale.

In Tabella 3 sono riportati i risultati dell'analisi FFF-MALS-ICP-MS di 4 inchiostri per tatuaggi.

Tabella 3. Risultati dell'analisi effettuata su inchiostri per tatuaggi tramite FFF-MALS-ICP-MS*

Nome dell'inchiostro	FFF T _r min	MALS R _g medio (range) nm	ICP-MS Concentrazione mg/mL		
			Al	Cu	Ti
<i>Ice blue</i>	17-28	42 (16-65)	-	4,6	-
	28-56	269 (60-490)	0,4	-	110
<i>Deep Violet</i>	15-32	56 (11-100)	-	-	-
	32-54	271 (100-490)	0,3	-	65,2
<i>Black outlining</i>	17-50	137 (21-330)	-	1,8	-
<i>Grasshopper green</i>	16-27	46 (18-56)	-	2,2	-
	27-56	405 (50-1200)	0,8	-	160

* *Field Flow Fractionation-Multi Angle Light Scattering-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry*

È stata confermata la distribuzione monomodale delle NP per l'inchiostro nero (*Black outlining*) e bimodale per il viola (*Deep violet*), come ottenuto nell'analisi DLS (Tabella 2); nel blu (*Ice blue*) e nel verde (*Grasshopper green*) sono stati individuati nuovi gruppi di NP precedentemente non rilevate nelle misurazioni DLS. Microparticelle (269-405 nm) contenenti Al (0,3-0,8 mg/mL) sono state trovate nei colori blu, viola e verde; NP (42-137 nm) contenenti Cu (1,8-4,6 mg/mL) nei colori blu, nero e verde; e microparticelle (270-400 nm) contenenti Ti (65,2-160,2 mg/mL) nei colori blu, viola e verde. L'inchiostro nero non conteneva né Al né Ti.

In Tabella 4 sono riportati i risultati dell'analisi SP-ICP-MS dei 4 inchiostri precedentemente analizzati con l'FFF-MALS-ICP-MS. È stata confermata la presenza di Al (come Al₂O₃) e Ti (come TiO₂) nelle particelle più grandi (244-546 nm) e di Cu (come Cu-ftalocianine o CuO) nelle particelle nanometriche (< 100 nm), come già ottenuto nell'analisi FFF-MALS-ICP-MS

(Tabella 3). Inoltre, contando il numero di NPM, i colori blu, nero e verde contenevano circa il 65% di NP di Cu con dimensione < 100 nm; quindi tali colori possono essere considerati nanomateriali di Cu. È stato inoltre osservato che la maggior parte di Al (74-95%) e Ti (45-70%) erano presenti in forma ionica.

Tabella 4. Risultati dell'analisi effettuata su inchiostri per tatuaggi tramite SP-ICP-MS*

Nome dell'inchiostro	Composizione metallica	Diametro particelle (media±DS) nm	Particelle < 100 nm %
<i>Ice blue</i>	Al ₂ O ₃	183±11	0
	Cu-ftalocianine	109±17	65
	TiO ₂	441±161	0
<i>Deep Violet</i>	TiO ₂	427±97	0
<i>Black outlining</i>	CuO	109±19	67
<i>Grasshopper green</i>	Al ₂ O ₃	226±14	0
	Cu-ftalocianine	110±17	63
	TiO ₂	466±179	0

* Single Particle-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry

Valutazione delle NPM in cosmetici

Nell'ambito del progetto Europeo PROSAFE «*Nanotechnology & Cosmetics*» sono state svolte attività di sorveglianza del Mercato Comune Europeo per le nanotecnologie utilizzate nei cosmetici (4). L'attività è stata svolta in 11 autorità di sorveglianza in 10 Stati Membri, tra cui l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) per l'Italia, più la Turchia. Particolare attenzione è stata prestata alla determinazione di TiO₂, ZnO e SiO₂ in prodotti per il trucco, per la protezione solare e per la cura della pelle, per un totale di 352 prodotti ispezionati.

In 85 prodotti cosmetici sono stati riscontrati TiO₂, ZnO e SiO₂ (Figura 1) e la presenza di NP di TiO₂, ZnO e SiO₂ tramite analisi FFF-MALS-ICP-MS e SP-ICP-MS (Figura 2).

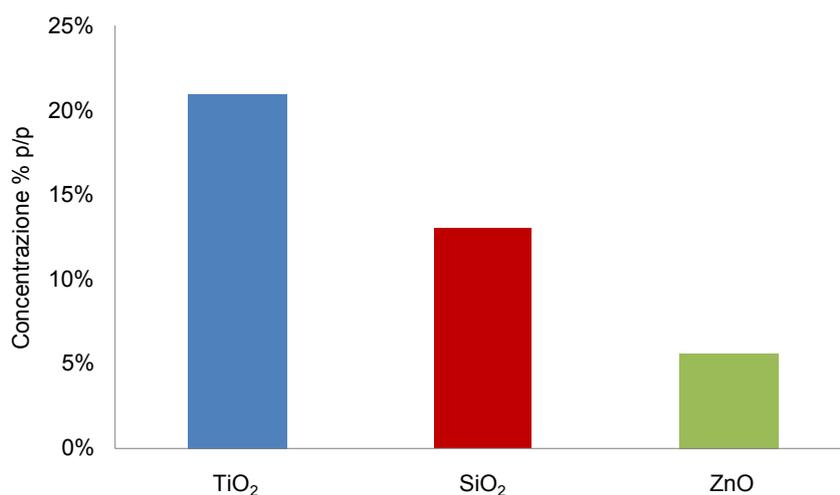


Figura 1. Presenza di TiO₂, SiO₂ e ZnO negli 85 prodotti cosmetici analizzati all'ISS

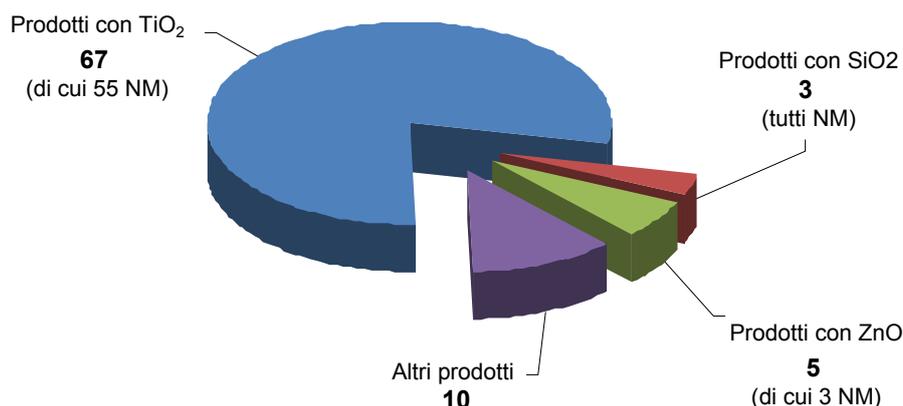


Figura 2. Presenza di nanomateriali (NM) di TiO_2 , SiO_2 e ZnO negli 85 prodotti cosmetici analizzati all'ISS

Il TiO_2 è stato trovato in 67 degli 85 campioni analizzati, con una concentrazione tra lo 0,1% e il 21% p/p; tali campioni risultavano conformi al Regolamento 2009/1223/UE che limita il contenuto del TiO_2 ad un massimo del 25% p/p in prodotti cosmetici. In 55 degli 85 cosmetici il TiO_2 è stato classificato come nanomateriale (Raccomandazione 2011/696/UE). Il SiO_2 è stato trovato in 3 campioni (fondotinta, 2,2% p/p; olio abbronzante, 2,5% p/p; prodotto per la cura della pelle, 13% p/p) e in tutti come nanomateriale. Lo ZnO è stato trovato in 5 campioni con concentrazioni tra lo 0,6% e il 5,6% p/p, e in 3 come nanomateriale.

Valutazione delle NPM in campioni biologici

La stabilità delle NPM è stata studiata nel sangue e nelle urine con studi *in vitro*, seguendo la variazione delle loro dimensioni, nonché la concentrazione delle specie ioniche generate da parziale o completa disaggregazione (5). Il recupero e la biodisponibilità delle NPM in tessuti sono stati valutati tramite studi *in vitro* su tessuti bovini e *in vivo* su *Lombrius variegatus* (6). Le analisi sono state eseguite tramite SP-ICP-MS per differenziare tra le frazioni ioniche del metallo e le aggregazioni particellari.

Per le prove di stabilità, sangue e urina sono stati addizionati con NP di Ag a 40 nm e 80 nm per raggiungere una concentrazione di 250.000 particelle/mL e sonicati per 5 minuti. Il sangue è stato diluito 20 volte con 0,5% di NH_4OH + 0,1% di Triton-X, mentre l'urina è stata diluita 20 volte con una soluzione acquosa contenente 0,5% di HNO_3 . Sono stati, inoltre, preparati campioni di controllo (bianchi) contenenti i soli reagenti. I risultati mostravano una diminuzione nel tempo delle dimensioni delle NP di Ag sia a 40 nm sia a 80 nm. Tale diminuzione risultava più pronunciata nel campione bianco che nel sangue; sembrerebbe, quindi, che il sangue possa svolgere un ruolo protettivo nel prevenire la disaggregazione delle NP di Ag. Inoltre, è stato osservato che le NP di Ag nelle urine, in particolare quelle a 80 nm, risultavano meno stabili che nel sangue.

Per le prove di recupero, ai campioni di tessuto bovino sono stati aggiunti 19 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ di NP di Ag a 60 nm; e per gli studi di biodisponibilità, campioni di *Lombrius Variegatus* sono stati messi a contatto per 24 ore con una soluzione di 5 mg/L di NP di Ag a 70 nm. I tessuti sono stati

estratti con tetrametilammonio idrossido (TMAH) nel rapporto solvente tessuto 20:1. I risultati mostravano che il numero e le dimensioni delle NP di Ag nel campione bianco (solo TMAH) e nella soluzione di estratto di tessuto bovino rimanevano uguali; quindi, l'estrazione non influenzava la stabilità delle particelle. Dopo 24 ore di bioaccumulo su *Lombricus variegatus*, le NP di Ag rilevate nel tessuto avevano una dimensione (circa 55 nm) solo leggermente più piccola della dimensione nominale (70 nm); perciò, le particelle di Ag risultavano non soggette a significativa disaggregazione e potenzialmente biodisponibili in forma nanoparticellare.

Conclusioni

La combinazione di tecniche quali DLS, FFF-MALS-ICP-MS e SP-ICP-MS è idonea per una caratterizzazione chimica esaustiva (numero, dimensione, composizione e concentrazione) delle NPM in varie matrici. Alcuni materiali (tatuaggi e cosmetici) analizzati possono essere considerati indubbiamente dei nanomateriali sulla base della definizione 2011/696/UE, mostrando una possibile nuova via di esposizione dell'uomo a NPM con possibile rischio di tossicità locale (cute). Gli studi sui fluidi e tessuti biologici, ancorché preliminari, mostrano come le NPM siano stabili nel tempo e biodisponibili rappresentando, quindi, un potenziale rischio di tossicità sistemica. Le metodologie presentate saranno ulteriormente sviluppate e applicate alla valutazione dell'esposizione a NPM e a studi di biomonitoraggio delle NPM, all'interno del progetto RInnovaReNano.

Bibliografia

1. Dirks M. Making innovative tattoo ink products with improved safety: possible and impossible ingredients in practical usage. *Current Problems in Dermatology* 2015;48:118-27.
2. Høgsberg T, Loeschner K, Løf D, Serup J. Tattoo inks in general usage contain nanoparticles. *British Journal of Dermatology* 2011;165:1210-18.
3. IARC. *Carbon black, titanium dioxide, and talc*. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2010. (Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Vol. 93).
4. Joint Market Surveillance Action co-funded by the European Union. *Final Technical Report, Nanotechnology & Cosmetics*. (Grant Agreement No. 2012 82 01). Brussels: European Union; 2015. Disponibile all'indirizzo: http://www.prosafe.org/images/Documents/JA2012/JA2012Final_report_nanotechnology-and_cosmetics_16_06_2015_final_clean.pdf; ultima consultazione 25/05/16.
5. Cirtiu CM, Fleury N, Stephan C. Assessing the fate of nanoparticles in biological fluids using SP-ICP-MS. Application Note ICP-Mass Spectrometry. Waltham, MA: Perkin Elmer Inc.; 2015. Disponibile all'indirizzo: http://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/APP_012008_01-NexION-350S-Fate-of-NPs-in-Bio-Fluids.pdf; ultima consultazione 25/05/16.
6. Gray EP, Coleman JG, Bednar AJ, Kennedy AJ, Ranville JF, Higgins CP. Extraction and analysis of silver and gold nanoparticles from biological tissues using Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Environmental Science & Technology* 2013;47:14315-23.

CARATTERIZZAZIONE *IN VITRO* E *IN SILICO* DEL POTENZIALE TOSSICOLOGICO DEI NANOMATERIALI

Andrea Zijno (a), Cristina Andreoli (a), Flavia Barone (a), Cecilia Bossa (a), Isabella De Angelis (a), Gabriella Di Felice (b), Ettore Meccia (a)

(a) Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(b) Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma

I recenti progressi della ricerca nel campo della scienza dei materiali hanno portato alla creazione di NanoMateriali (NM), le cui peculiari proprietà chimico-fisiche li differenziano dalla loro controparte in forma *bulk* e li rendono interessanti per svariate applicazioni commerciali e scientifiche. Attualmente sul mercato sono presenti oltre 1200 prodotti che contengono NM, utilizzati in diversi settori merceologici dall'elettronica, ai materiali da costruzione, ai prodotti alimentari, cosmetici e tessili, e in applicazioni nell'ambito delle telecomunicazioni, della salvaguardia ambientale, della produzione di energia, della purificazione dell'acqua e dell'utilizzo dell'energia solare (1).

Le peculiari proprietà chimico-fisiche degli NM determinano una grande reattività con i sistemi biologici dalle conseguenze al momento non completamente prevedibili sulla base della loro composizione chimica. Pertanto la sicurezza degli NM deve essere accuratamente valutata prima dell'immissione sul mercato.

La procedura di valutazione del rischio degli agenti chimici, tra i quali gli NM rientrano a tutti gli effetti, prevede come prima fase l'identificazione del pericolo della sostanza ossia l'identificazione delle sue proprietà tossicologiche intrinseche. In considerazione delle peculiari caratteristiche chimico-fisiche degli NM, la comunità scientifica e le autorità regolatorie stanno valutando la possibilità di utilizzare, con eventuali adeguamenti, i metodi di saggio attualmente in uso per le sostanze chimiche anche per gli NM. Un primo aspetto affrontato dalle autorità regolatorie è stato quello di fornire una definizione di NM che consentisse di identificare chiaramente i materiali da includere nelle normative e nei regolamenti specifici. Al riguardo nel 2011, la Commissione Europea (CE) ha pubblicato una raccomandazione in cui viene definito come NM un materiale naturale, incidentale o ingegnerizzato contenente particelle allo stato libero, aggregato o agglomerato in cui per almeno il 50% delle particelle nella distribuzione dimensionale numerica, una o più dimensioni esterne siano comprese nell'intervallo 1-100 nm (2). Questa definizione ha rappresentato un importante punto di partenza operativo per l'inclusione in diverse normative degli NM, ma, con il progredire delle conoscenze, sarà soggetta a revisione nel prossimo futuro.

Per quanto riguarda i metodi di saggio l'organizzazione per la cooperazione e lo sviluppo economico (*Organisation for Economic Co-operation and Development*, OECD) nel 2006 ha istituito il *Working Party on Manufactured Nanomaterials* (WPMN) che ha tra i principali obiettivi quello di valutare se i metodi di saggio finora utilizzati per gli agenti chimici tradizionali siano adeguati per la valutazione della sicurezza degli NM. A questo proposito nel 2013 l'OECD ha emanato una raccomandazione con la quale conclude che, allo stato attuale delle conoscenze, la maggior parte dei metodi previsti dalle linee guida OECD sono adeguati per valutare la sicurezza degli NM ma, allo stesso tempo, rileva che alcune linee guida devono essere adattate per tenere conto delle specifiche proprietà degli NM (3).

I metodi *in vitro* occupano un ruolo centrale nella valutazione del potenziale pericolo degli NM. Essi vengono utilizzati principalmente nelle fasi preliminare di screening e per l'identificazione dei possibili meccanismi tossici.

Alcuni degli aspetti critici nelle metodologie *in vitro* applicate per la valutazione del rischio degli NM sono comuni a tutti i sistemi di saggio e riguardano le fasi preliminari di caratterizzazione e dispersione degli NM. Da una ricognizione sul motore di ricerca PubMed, digitando i termini “nanomaterial” e “toxicity” risultano essere presenti nel database oltre 12000 articoli dai quali è spesso difficile arrivare a conclusioni attendibili sulla tossicità dei singoli NM proprio per la mancanza di informazioni e uniformità delle metodiche di sospensione dei diversi NM e della loro caratterizzazione analitica. Inoltre la mancanza di standardizzazione di queste procedure rende estremamente difficile il confronto tra i dati sperimentali prodotti sullo stesso NM in studi diversi.

Nell'ottica di standardizzare le procedure sperimentali preliminari, il progetto europeo FP7 “NANoREG - A common European approach to the regulatory testing of Manufactured Nanomaterials”, a cui partecipano diversi dipartimenti dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS), ha stabilito condizioni comuni di sospensione delle particelle mediante sonicazione, e ha fornito dei valori di riferimento per l'ottenimento di dispersioni confrontabili tra i diversi laboratori partecipanti. Analogamente le condizioni di caratterizzazione degli NM in sospensione sono state definite a priori e valutate mediante *Dynamic Light Scattering* e Microscopia Elettronica a Trasmissione. Allo scopo di ottenere informazioni sul comportamento degli NM nelle diverse condizioni sperimentali, la caratterizzazione (con entrambi i metodi) è stata effettuata, oltre che nella sospensione iniziale, anche dopo il trasferimento degli NM nei mezzi di coltura sia all'inizio che alla fine del trattamento. In questo stesso progetto, al fine di confrontare i dati sperimentali prodotti dai diversi laboratori coinvolti, sono stati utilizzati 19 NM di produzione industriale e provenienti dal *Joint Research Center* (JRC) della Commissione Europea. Anche i protocolli di saggio e i modelli cellulari sono stati uniformati tra i partecipanti al progetto.

Diversi aspetti critici relativi ai metodi di saggio erano stati precedentemente affrontati in ISS nell'ambito della partecipazione a progetti, sia nazionali (finanziati dal Ministero della Salute) che internazionali (es. in collaborazione con l'OECD).

Per quanto riguarda i saggi di citotossicità, come peraltro riportato in letteratura (4, 5), l'esperienza maturata in ISS con diversi NM ha confermato che molti dei saggi colorimetrici convenzionali, utilizzati per la valutazione della citotossicità – ad esempio il rilascio di Rosso Neutro (NRU), il rilascio di Lattico deidrogenasi (LDH), la misura dell'attività metabolica (MTS, MTT) – sono difficilmente applicabili agli NM in quanto questi possono reagire con i componenti chimici del saggio e/o interferire con i sistemi di rilevamento ottico (assorbanza, fluorescenza). Per questo motivo, particolare cautela deve essere posta nella loro applicazione agli NM e, soprattutto, deve essere allestito un adeguato gruppo di controlli che consenta di identificare i potenziali artefatti dovuti alle interazioni tra NM e procedure di saggio. Ad esempio è sempre bene saggiare gli NM in presenza e in assenza di cellule per verificare le possibili interferenze con il sistema di saggio (6).

Queste criticità hanno portato ad un notevole sforzo internazionale di ottimizzazione dei protocolli di saggio; nel progetto NANoREG, ad esempio, è stato condiviso da numerosi partecipanti un protocollo per il saggio dell'MTS che ha dato buoni risultati in termini di ripetibilità dei dati con varie linee cellulari e con diversi NM.

In un progetto svolto in ambito OECD e coordinato dal JRC, è stata invece valutata la capacità del saggio *Colony Forming Efficiency* (CFE) di essere utilizzato per lo screening di tossicità degli NM oltre che la sua trasferibilità e riproducibilità in laboratori diversi. Il CFE è un saggio clonogenico basato sulla capacità delle cellule integre di formare colonie quando piastrate a bassa densità su piastre Petri (Figura 1A). Può essere effettuato con qualsiasi cellula

aderente che sia in grado di originare colonie ed è *label-free*; conseguentemente viene annullata la possibilità di interferenza con i reagenti. Un'alterazione della vitalità a seguito ad esposizione con sostanze tossiche porterà ad una diminuzione del numero di colonie rispetto al controllo non trattato (Figura 1B). Nello studio, che ha visto la partecipazione di 12 laboratori incluso l'ISS, sono stati utilizzati nove NM di riferimento. I risultati ottenuti hanno indicato che il saggio è adatto e sufficientemente sensibile per la determinazione della citotossicità degli NM soprattutto nelle fasi preliminari di screening. La sua realizzazione è, però tecnicamente piuttosto lunga e laboriosa e sono quindi necessari ulteriori miglioramenti per una sua applicazione su larga scala (7).

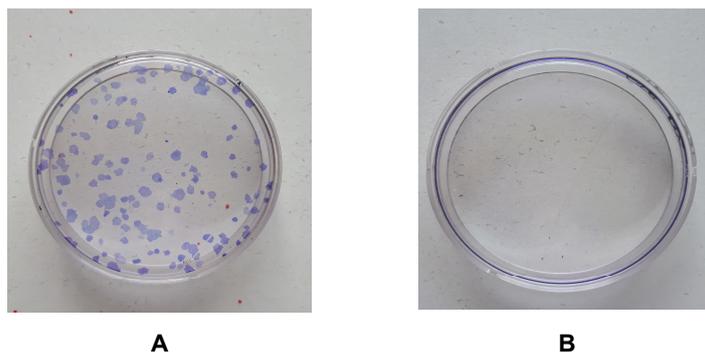


Figura 1. Saggio della Colony Forming Efficiency (CFE): controllo non trattato (A), piastra trattata con nanoparticelle di Ag 20 nm (3,5 μ M) (B)

Nell'ambito della procedura di valutazione del rischio, i saggi a breve termine di genotossicità *in vitro* rivestono un ruolo primario. Nel processo di identificazione del pericolo delle sostanze chimiche tradizionali viene utilizzata una batteria di saggi a breve termine che prevede: un saggio di mutazione nei batteri (*Bacterial Reverse Mutation Test*, OECD TG 471), un saggio di mutazione genica in cellule di mammifero (*In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Tests using Hprt and xprt genes*, OECD TG 476, o *In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Tests using the Thymidine Kinase Gene*, OECD TG 490) e un saggio di danno cromosomico (*In Vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test*, OECD TG 473 o *In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test*, OECD TG 487).

Nel 2013 il WPMN dell'OECD ha organizzato un *workshop* per verificare l'appropriatezza dei metodi validati per lo studio della genotossicità degli NM (Novembre 2013, Ottawa, Canada). In questo workshop si è concluso che i saggi di genotossicità attualmente previsti dalle linee guida OECD non sono completamente adatti a valutare la genotossicità degli NM e che quindi sono necessari alcuni adattamenti. In particolare è stato rilevato che il *Test di Ames* (OECD TG 471) sembra non essere idoneo per saggiare la genotossicità degli NM a causa della difficoltà degli NM a penetrare attraverso la parete batterica, e che anche il *Test del micronucleo* (OECD TG 487), considerato al momento il saggio di elezione per la genotossicità degli NM grazie alle sue capacità di rilevare sia le rotture cromosomiche (indotte in forma diretta oppure attraverso la formazione di radicali liberi) sia anomalie della segregazione cromosomica, deve andare incontro ad alcuni adeguamenti del protocollo sperimentale (8). Infatti, nella versione che include il trattamento con la citocalasina B, bisogna tener conto dell'interferenza di questa sostanza con il processo di endocitosi, il potenziale meccanismo di penetrazione degli NM all'interno della cellula (9). Questa problematica è stata affrontata in un recente progetto in ISS finanziato dal Ministero della Salute e all'interno del progetto NANoREG in cui è stata valutata

l'induzione di micronuclei (Figura 2) utilizzando protocolli sperimentali modificati rispetto a quanto previsto dalla attuale linea guida.

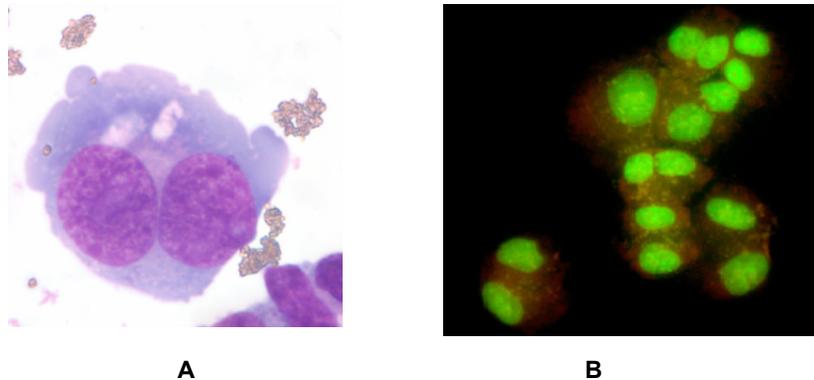


Figura 2. Linfociti binucleati (colorazione Giemsa) (A) e cellule binucleate BEAS-2B (colorazione Acridine Orange) (B) analizzati per la presenza di micronuclei dopo trattamento con nanoparticelle di TiO₂ (ben visibili con entrambe le colorazioni)

Altri fattori critici nei saggi di tossicità degli NM sono rappresentati dalla scelta dei modelli cellulari da utilizzare, che devono tener conto della penetrazione degli NM all'interno della cellula ed essere rappresentativi del potenziale sito bersaglio dovuto alla via di esposizione umana (tratto respiratorio, tratto gastrointestinale, epidermide). L'intervallo tra le dosi di trattamento e la dosimetria sono altri aspetti critici di cui tener conto.

Un aspetto particolare dello studio dell'impatto degli NM sui sistemi biologici è costituito dalla valutazione delle interazioni con il sistema immunitario (SI) ai fini della identificazione del pericolo connesso all'esposizione accidentale (ambientale, occupazionale) o intenzionale. Infatti, a differenza degli effetti su altri organi e sistemi, le potenziali interazioni degli NM con le componenti cellulari del sistema immunitario comprendono l'immunotossicità, ma non coincidono esclusivamente con essa, poiché possono interferire con le attività fisiologiche del SI sopprimendo la normale risposta protettiva verso infezioni e tumori, o potenziando risposte difensive, come l'infiammazione e l'attivazione del complemento, o promuovendo reazioni indesiderate, quali ipersensibilità o autoimmunità. Le conoscenze su tali interazioni sono ancora largamente inadeguate, e la previsione del rischio immunologico è ulteriormente complicata dalla limitata disponibilità di specifiche procedure e linee-guida armonizzate, a sua volta derivante dalla impossibilità di definire un unico semplice saggio *in vitro* in grado di determinare in modo esauriente il potenziale rischio immunologico e immunotossico degli NM. Dovrebbe quindi essere definito un pannello di saggi immunologici *in vitro* complementari che includa studi di citotossicità sulle cellule immunitarie, studi di antigenicità/immunogenicità, e studi sulle proprietà immunomodulatorie eventualmente esercitate dagli NM sulle funzioni immunitarie indotte da stimoli di riferimento. I fattori primari in questo processo riguardano la scelta di adatti bersagli immunologici e popolazioni cellulari (linee cellulari, cellule primarie), di sistemi rappresentativi della situazione reale (cellule umane o animali), di marcatori sufficientemente predittivi e quantificabili (citochine, prodotti metabolici), di saggi in grado di dare informazioni standardizzabili (condizioni sperimentali, dosi, tempi di esposizione). Le criticità specifiche individuabili, oltre a quelle comuni per lo studio di altri sistemi biologici, comprendono la biocompatibilità e la presenza di contaminanti con attività biologica/immunomodulatoria che possono interferire con i risultati dei saggi. Una limitazione

all'approccio *in vitro* in questo particolare settore proviene dalla difficoltà di ottenere alcune informazioni mediante l'uso esclusivo di saggi *in vitro*, soprattutto nel settore della biodistribuzione, della capacità di raggiungere il bersaglio desiderato, della valutazione degli effetti su risposte immunitarie che includono i diversi compartimenti del SI (innato, adattivo, cellulare, umorale). Anche queste problematiche sono affrontate all'interno del progetto europeo NANoREG, nel quale sono stati messi a punto saggi *in vitro* ed *ex vivo* per valutare gli effetti di NM con differente natura chimica, dimensione e struttura sulla vitalità e sulla funzionalità immunologica, in presenza o assenza di stimoli classici di attivazione, di una linea cellulare murina e di cellule primarie di ratto

L'enorme numero di potenziali NM che possono essere prodotti e immessi sul mercato costituisce un problema che va affrontato anche dal punto di vista della messa a punto sia di sistemi di saggio cosiddetti *high throughput* sia di metodologie *in silico* che permettano di ottenere predizioni del potenziale tossicologico di singoli o classi di NM.

Come per i protocolli sperimentali, anche per i metodi *in silico* si sta discutendo a livello OECD della revisione delle guide per l'estensione di tali approcci al caso degli NM. In questo ambito l'ISS ha partecipato all'Expert Meeting (Bruxelles, aprile 2016) per la discussione dell'aggiornamento della guida OECD sul *Grouping* delle sostanze chimiche (10), relativamente alla sezione sugli NM. L'ISS partecipa inoltre al progetto Horizon 2020 "NanoReg2 - Development and implementation of Grouping and Safe-by-Design approaches within regulatory frameworks", il cui fine è lo sviluppo e l'implementazione di approcci di *Grouping e Safe-by-Design* per gli NM in ambito regolatorio.

In generale, la comunità scientifica internazionale sta compiendo numerosi sforzi volti all'analisi degli aspetti da considerare per estendere agli NM l'applicazione di metodi *in silico*, quali approcci QSAR, *Grouping* e *Read across*, alla valutazione del rischio degli NM. Diverse strategie di *Grouping* sono state proposte negli ultimi anni sia in ambito nazionale che internazionale. Questo metodo, infatti, il cui utilizzo in ambiti regolativi è già previsto in numerose legislazioni per le sostanze convenzionali (es. REACH, *Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*), quando adeguatamente adattato alle caratteristiche peculiari degli NM, potrà rivelarsi uno strumento molto potente per una valutazione del rischio più rapida e più eticamente ed economicamente sostenibile.

Per quanto riguarda lo sviluppo di nuovi modelli (Q)SAR, applicabili agli NM per la predizione dell'attività tossicologica, il nodo cruciale è il reperimento di dati sperimentali adeguati. Per questo motivo, in ambiti diversi, vi sono iniziative in atto sia per selezionare e standardizzare dati esistenti nel dominio pubblico, sia per avviare nuovi esperimenti che prevedano la produzione di dati di buona qualità.

Le raccomandazioni e le criticità emerse e discusse in questi ambiti internazionali per l'adeguamento dei metodi *in silico*, verranno sviluppate e approfondite nel contesto di RInnovaReNano, traendo vantaggio dalla caratteristica di multidisciplinarietà del progetto.

Conclusioni

Il sempre più largo utilizzo di NM nei prodotti di consumo richiede una valutazione attenta del potenziale rischio per la salute umana. I tradizionali metodi *in vitro* utilizzati per le sostanze chimiche non in nano-forma possono non essere adeguati alle specifiche proprietà degli NM ed è pertanto necessario, in alcuni casi, rivedere e adattare le procedure di saggio utilizzate. In questo contesto, la partecipazione dell'ISS a progetti nazionali e internazionali fornirà utili strumenti di conoscenza per una corretta valutazione del pericolo associato agli NM nonché per l'identificazione di potenziali meccanismi di azione indispensabili per la predizione del pericolo

mediante metodi *in silico*. L'applicazione di metodi sviluppati nei precedenti progetti e il loro ulteriore miglioramento all'interno di RInnovaReNano, rappresenta uno degli obiettivi principali del progetto.

Bibliografia

1. Vance ME, Kuiken T, Vejerano EP, McGinnis SP, Hochella MFJr, Rejeski D, Hull MS. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein Journal of Nanotechnology* 2015;6:1769-80.
2. Europa. Raccomandazione della Commissione del 18 ottobre 2011 sulla definizione di nanomateriale. (Testo rilevante ai fini del SEE), 2011/696/EU. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 275/38, 20.10.2011.
3. Organisation for Economic Co-operation and Development. *Recommendation of the Council on the Safety Testing and Assessment of Manufactured Nanomaterials*. Paris: OECD; 2013. (Recommendation C(2013)107).
4. Stone V, Johnston H and Schins RPF. Development of in vitro systems for nanotoxicology: methodological considerations. *Critical Reviews in Toxicology* 2009;39(7):613-26.
5. Guadagnini R, Halamoda Kenzaoui B, Cartwright L, Pojana G, Magdolenova Z, Bilanicova D, Saunders M, Juillerat L, Marcomini A, Huk A, Dusinska M, Fjellsbø LM, Marano F, Boland S. Toxicity screenings of nanomaterials: challenges due to interference with assay processes and components of classic in vitro tests. *Nanotoxicology* 2015;9 (Suppl. 1):13-24.
6. Barone F, De Angelis I, De Berardis B, Zijno A, Andreoli C, Degan P, Polci ML, Alessandrelli M, Di Prospero Fanghella P. *Implementazione di metodi validati e sviluppo di metodi in vitro per determinare le caratteristiche fisico-chimiche e la potenziale attività geno/tossicologica di micro e nanoparticelle di biossido di titanio*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2015. (Rapporti ISTISAN 15/34).
7. European Commission, JRC Science and Policy Reports. *Interlaboratory comparison study of the Colony Forming Efficiency assay for assessing cytotoxicity of nanomaterials*. Brussels: Publications Office of the European Union; 2014. Disponibile all'indirizzo: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC92910>; ultima consultazione 23/06/2017.
8. Organisation for Economic Co-operation and Development. *Genotoxicity of manufactured nanomaterials: Report of the OECD Expert Meeting*. Paris: OECD 2014. (Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 43).
9. Gonzalez L, Sanderson BJS, Kirsch-Volders M. Adaptations on the in vitro MN assay for the genotoxicity assessment of nanomaterials. *Mutagenesis* 2011;26:185-91.
10. Organisation for Economic Co-operation and Development. *Guidance on grouping of chemicals, second edition*. Paris: OECD 2014. (Series on Testing and Assessment No. 194).

ASPETTI TOSSICOLOGICI NELLA VALUTAZIONE DI SICUREZZA DELLE NANOTECNOLOGIE NEL SETTORE AGROALIMENTARE

Roberta Tassinari, Laura Narciso, Francesca Maranghi

Dipartimento Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

La nanotecnologia è un campo delle scienze e delle tecnologie applicate che concerne il controllo della materia su scala atomica e molecolare, normalmente al di sotto di 100 nanometri. I nanomateriali (NM) possono manifestare proprietà fisico-chimiche diverse rispetto alle identiche sostanze non nano-strutturate, ad esempio una maggiore reattività chimica dovuta a una più ampia superficie. A partire dalle prime applicazioni, l'utilizzo delle nanotecnologie si è esteso velocemente anche al settore agroalimentare che ha sviluppato molteplici applicazioni riguardanti: i) il miglioramento delle caratteristiche organolettiche attraverso il trattamento delle proprietà meccanico-sensoriali (modifica del sapore/odore/consistenza); ii) la modifica dei valori nutrizionali ottimizzando l'assorbimento, la biodisponibilità dei nutrienti e/o degli integratori alimentari. Le nanotecnologie possono anche essere utilizzate nei materiali a contatto con gli alimenti (*Food Contact Materials*, FCM), contenitori, frigoriferi, per garantire una migliore protezione sfruttando le proprietà antibatteriche di alcuni NM o per rilevare il livello di freschezza dei cibi (nano-sensori). In futuro, i prodotti della nanotecnologia potrebbero avere un impatto considerevole sul settore alimentare e mangimistico, offrendo potenziali vantaggi per l'industria e il consumatore. È tuttavia necessario analizzare le proprietà e le caratteristiche specifiche degli NM in vista di potenziali rischi per la salute.

Valutazione del pericolo: l'approccio dell'autorità europea per la sicurezza alimentare

La valutazione della sicurezza degli NM rappresenta un argomento prioritario per l'autorità europea per la sicurezza alimentare (*European Food Safety Agency*, EFSA). Nonostante l'utilizzo delle nanotecnologie in campo agroalimentare preveda già una vasta gamma di applicazioni, gli NM negli alimenti possono essere considerati un rischio emergente. Infatti alcuni di essi sono prodotti di nuova sintesi e rappresentano pertanto un "potenziale pericolo di nuova identificazione per il quale si può verificare una significativa esposizione", mentre altri sono prodotti già conosciuti (sebbene mai valutati in nano-forma) per i quali aumenta in maniera significativa la produzione e l'utilizzo, quindi rappresentano "un potenziale pericolo noto per i quali si verifica inaspettatamente una nuova e aumentata esposizione" (1). Esempi di questo secondo caso sono il diossido di silicio e di titanio, additivi alimentari autorizzati per i quali solo recentemente è divenuta chiara l'esistenza di un'ampia distribuzione dimensionale, inclusa una frazione sulla nanoscala, conseguenza delle tecniche di produzione impiegate (2-4).

La valutazione del rischio degli NM negli alimenti ha mosso i suoi primi passi di recente; ne consegue un ritardo nella gestione del rischio che si traduce in un ritardo normativo. In attesa degli sviluppi delle ricerche scientifiche, l'atteggiamento dell'Unione Europea è molto prudente. Gli alimenti contenenti NM rientrano nella categoria dei *novel food* e si stabilisce che, per

motivi precauzionali di tutela della salute pubblica, non devono essere autorizzati alla commercializzazione prima del via libera da parte dell'EFSA. Inoltre, è richiesta una particolare attenzione per FCM che contengono NM, in modo da evitare la contaminazione degli alimenti. Tutti i nuovi cibi, comunque, dovranno essere soggetti a monitoraggio *post vendita*.

La popolazione generale può essere esposta agli NM attraverso la dieta come risultato di scenari espositivi diversi. Particelle nell'intervallo dimensionale "nano", di origine sia antropogenica che naturale, possono fare ingresso come contaminanti a vari livelli della catena alimentare, ad esempio come residui di fitofarmaci o di farmaci veterinari contenenti nanoparticelle oppure sotto forma di contaminanti ambientali che derivano dalla produzione, utilizzo e smaltimento di altri prodotti ottenuti con nanotecnologie, quali prodotti elettronici, medicali, cosmetici, ecc. Uno scenario differente è rappresentato dall'uso intenzionale delle nanotecnologie al settore agroalimentare.

Le attuali incertezze nella valutazione del rischio degli NM e delle loro possibili applicazioni derivano principalmente dalla limitatezza dei dati tossicologici e di esposizione al momento disponibili. Nello specifico, tali incertezze risiedono sia nella difficoltà di caratterizzare e quantificare gli NM negli alimenti, nei mangimi e nelle matrici biologiche, sia nella scarsità di informazioni disponibili sulla tossicocinetica e sugli effetti tossicologici in generale, soprattutto considerando la via di esposizione orale, la più realistica nella valutazione del rischio di alimenti e mangimi.

L'EFSA nel 2008 ha valutato i primi fascicoli relativi a NM di impiego alimentare. In particolare, il *panel* CEF (*Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids*) ha espresso parere favorevole all'uso di nitrato di titanio quale additivo in bottiglie di PET in quanto non vi è migrazione del NM nella bevanda contenuta; mentre il *panel* ANS (*Panel on Food Additives and Nutrient Sources Added to Food*) ha negato l'impiego diretto negli alimenti del nano-argento, sostanzialmente per l'assenza di informazioni che consentissero di valutare la biodisponibilità e la tossicità del NM proposto.

Successivamente, nel marzo del 2009, l'EFSA ha prodotto la sua prima opinione scientifica sulle nanoscienze e nanotecnologie in cui si stabilisce che il paradigma tradizionale del modello di valutazione del rischio (identificazione del pericolo, caratterizzazione del pericolo, valutazione dell'esposizione e caratterizzazione del rischio) può essere applicato anche agli NM ma che debbono essere prese in considerazione le proprietà specifiche (come composizione chimica, dimensioni delle particelle primarie/secondarie, forma fisica e morfologia, concentrazione di massa particellare, area superficiale specifica, chimica superficiale, carica superficiale, potenziale redox, reattività chimica, ecc.), che possono modificarne l'attività biologica (5).

Nel 2011 l'EFSA ha istituito lo Scientific Network for Risk Assessment of Nanotechnologies in Food and Feed, quale *forum* di discussione e trasferimento di informazioni fra esperti EFSA e dei paesi membri; successivamente, ha prodotto un documento che sviluppa un approccio pratico *step by step* per valutare i potenziali rischi derivanti dall'applicazione delle nanoscienze e nanotecnologie in alimenti e mangimi (6).

Il metodo prevede in prima istanza la caratterizzazione delle proprietà fisico-chimiche degli NM usati negli alimenti e mangimi, successivamente l'identificazione dei pericoli, che dovrebbe includere studi di tossicocinetica, tossicità subcronica, attraverso uno studio di tossicità orale a dosi ripetute per 90 giorni, e genotossicità. Il pannello dei saggi tossicologici da svolgere nel caso in cui in NM permanga in nanoforma dopo l'assorbimento attraverso il tratto gastro intestinale viene riassunto all'interno del documento nell'albero decisionale per il *toxicological testing* (REFF).

L'utilizzo delle nanotecnologie per gli imballaggi alimentari rappresenta un settore in rapida espansione; a tal proposito a gennaio 2016 il *panel* CEF ha pubblicato un'opinione riguardante

gli sviluppi recenti nella valutazione della sicurezza delle sostanze chimiche presenti nei materiali a contatto con gli alimenti in cui vi è una specifica sezione concernente gli NM (7). La valutazione tossicologica degli NM presenti negli imballaggi alimentari rientra in sei casi specifici:

- Caso 1 – nessuna presenza/persistenza dell’NM nei materiali a contatto con gli alimenti;
- Caso 2 – nessuna migrazione dell’NM dal FCM all’alimento. In entrambi i casi non sarà necessario produrre nuovi dati tossicologici per l’NM;
- Caso 3 – trasformazione completa dell’NM nella forma non-nano nella matrice alimentare prima dell’ingestione;
- Caso 4 – trasformazione completa del NM nella forma non-nano nel tratto gastrointestinale dopo l’ingestione. La valutazione della sicurezza riguarda la forma non-nano, nel caso 4 devono essere considerati gli effetti tossicologici locali dovuti al NM a livello del tratto gastrointestinale;
- Caso 5 – disponibilità di dati sulla forma non-nano se l’NM persiste nell’alimento e nel tratto gastrointestinale. L’approccio tossicologico si basa sul confronto delle informazioni tra NM e forma non-nano (studi di tossicocinetica, genotossicità, tossicità orale a dosi ripetute per 90 giorni). Se le differenze osservate indicano un aumento del rischio, sono necessari altri saggi per valutare la tossicità dell’NM. Se viene evidenziata una riduzione del rischio, qualsiasi altra richiesta di saggi tossicologici non è giustificata.
- Caso 6 – non sono disponibili dati sulla forma non-nano e l’NM persiste nell’alimento e nel tratto gastrointestinale. L’approccio tossicologico deve seguire le indicazioni dell’albero decisionale per il *toxicological testing*.

La disponibilità di dati per afferire ad uno dei casi suindicati dipende dalle specifiche proprietà degli NM e dal probabile impatto della matrice in cui sono dispersi (6).

Sulla base di tale approccio, nell’ambito del progetto EU FP7 NANoREG (<http://www.nanoreg.eu/>) “A common European approach to the regulatory testing of Manufactured Nanomaterials” è stato effettuato uno studio a 90 giorni a dosi ripetute per via orale nel ratto, utilizzando come materiale la silice amorfa sintetica (SAS), diossido di silicio (SiO₂) NM-203, proveniente dal *Joint Research Centre repository*. Tale sostanza rappresenta l’additivo alimentare E551 – approvato dalla Comunità Europea – di grande interesse per la sicurezza alimentare. Lo studio è stato effettuato utilizzando la OECD TG 408 (8), implementata con parametri relativi a potenziali effetti sul genoma e sui sistemi immunitario, riproduttivo ed endocrino. Per la valutazione del rischio è stato utilizzato l’approccio del NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*) per definire valori di riferimento ai fini regolatori; l’approccio della *BenchMark dose* (BMD) è stato valutato in parallelo.

I risultati dello studio evidenziano la scarsa tossicità della sostanza per via orale. I maschi mostrano un più largo spettro di effetti rispetto alle femmine. È evidente la difficoltà, per la maggior parte dei parametri analizzati, nel definire una chiara relazione dose-risposta che ha portato alla mancata definizione di un NOAEL per lo studio. La BMD è stata invece calcolata ed è utilizzabile per la definizione di Valori di Riferimento. Ciò conferma la validità dell’approccio BMD per la sicurezza alimentare (9). Per quanto concerne l’applicabilità della OECD TG 408, usata come protocollo di base e arricchita con parametri atti alla caratterizzazione della nanoparticella e delle sue proprietà fisico-chimiche (es. caratterizzazione delle dispersioni, biodistribuzione del NM in tessuti bersaglio, ecc.), sono necessarie ulteriori considerazioni per il suo utilizzo nella caratterizzazione del pericolo di NM con caratteristiche similari alla SiO₂ NM-203.

Bibliografia

1. European Food Safety Authority. *Definition and description of “emerging risks”*. EFSA/SC/415 Final. Parma: EFSA; 2007.
2. Dekkers S, Krystek P, Peters RJB, Lankveld DPK, Bokkers BGH, Van Hoeven-Arentzen PH, *et al.* Presence and risks of nanosilica in food products. *Nanotoxicology* 2011;5(3):393-405.
3. Tassinari R, Cubadda F, Moracci G, Aureli F, D’Amato M, Valeri M, De Berardis B, Raggi A, Mantovani A, Passeri D, Rossi M, Maranghi F. Oral, short-term exposure to titanium dioxide nanoparticles in Sprague-Dawley rat: focus on reproductive and endocrine systems and spleen. *Nanotoxicology* 2014;8(6):654-62.
4. Tassinari R, La Rocca C, Stecca L, Tait S, De Berardis B, Ammendolia M.G, Iosi F, Di Virgilio A, Martinelli A, Maranghi F. In vivo and in vitro toxicological effects of titanium dioxide nanoparticles on small intestine. *AIP Conference Proceedings* 2015;1667:020016.
5. European Food Safety Authority. The potential risks arising from nanoscience and nanotechnologies on food and feed safety. *The EFSA Journal* 2009;958:1-39.
6. European Food Safety Authority. Guidance on the risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain. *The EFSA Journal* 2011;9(5):2140.
7. European Food Safety Authority. Recent developments in the risk assessment of chemicals in food and their potential impact on the safety assessment of substances used in food contact materials. *The EFSA Journal* 2016;14(1):4357.
8. Organisation for Economic Co-operation and Development. *Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents*. Paris: OECD; 1998. (Testing Guideline N.408). Disponibile all'indirizzo: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9740801e.pdf?expires=1498469817&id=id&accname=guest&checksum=43B56105261D60ECE6ED0A85B77B2D82>; ultima consultazione 23/06/2017
9. European Food Safety Authority. Use of the benchmark dose approach in risk assessment. Guidance of the Scientific Committee. *The EFSA Journal* 2009;1150:1-72.

ASPETTI REGOLATORI, METODOLOGIE DI INDAGINE E ASPETTI TECNICO-SCIENTIFICI PER SICUREZZA ED EFFICACIA DEI DISPOSITIVI MEDICI NANOSTRUTTURATI

Rossella Bedini, Barbara De Berardis, Mauro Grigioni, Agnese Molinari, Fabiana Superti
Dipartimento di Tecnologia e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

La valutazione del rischio di dispositivi medici contenenti nanomateriali (NM) in linea di principio non è diversa dalla valutazione del rischio richiesta per i DM. In accordo con il quadro normativo comunitario (Direttiva 93/42/CEE sui dispositivi medici (*Medical Devices Directive*, MDD), è definito dispositivo medico (1):

“qualunque strumento, apparecchio, impianto, software, sostanza o altro prodotto, utilizzato da solo o in combinazione, compreso il software destinato dal fabbricante ad essere impiegato specificamente con finalità diagnostiche e/o terapeutiche e necessario al corretto funzionamento del dispositivo, destinato dal fabbricante ad essere impiegato sull'uomo a fini di: 1) diagnosi, prevenzione, controllo, terapia o attenuazione di una malattia, 2) diagnosi, controllo, terapia, attenuazione o compensazione di una ferita o di un handicap, 3) studio, sostituzione o modifica dell'anatomia o di un processo fisiologico, 4) intervento sul concepimento, la cui azione principale voluta nel o sul corpo umano non sia conseguita con mezzi farmacologici né immunologici né mediante metabolismo, ma la cui funzione possa essere assistita da questi mezzi”.

In accordo con la MDD un dispositivo medico deve essere conforme ai requisiti essenziali come indicato nell'allegato I; un esempio è il seguente requisito generale:

“I dispositivi devono essere progettati e fabbricati in modo che la loro utilizzazione, se avviene alle condizioni e per gli usi previsti, non comprometta lo stato clinico o la sicurezza dei pazienti, né la sicurezza e la salute degli utilizzatori ed eventualmente di terzi, fermo restando che gli eventuali rischi associati all'uso previsto debbono essere di livello accettabile in rapporto ai benefici apportati al paziente e compatibili con un elevato livello di protezione della salute e della sicurezza.

Questo comporta:

- (i) la riduzione, per quanto possibile, dei rischi di errore nell'utilizzazione determinato dalle caratteristiche ergonomiche del dispositivo e dall'ambiente in cui è previsto che il dispositivo sia usato (progettazione per la sicurezza del paziente);
- (ii) la considerazione del livello della conoscenza tecnica, dell'esperienza, dell'istruzione e della formazione nonché, a seconda dei casi, delle condizioni mediche e fisiche degli utilizzatori cui il dispositivo è destinato (progettazione per utilizzatori comuni, professionisti, disabili o altro).”

Da quanto appena enunciato si comprende che la MDD prevede in modo cogente un'attività di analisi del rischio e la sua mitigazione in stretta relazione all'uso inteso proposto dal fabbricante (si veda la norma armonizzata ISO EN 14971 “Application of risk management to medical devices”).

Nanomateriali e dispositivi medici: aspetti regolatori

Al fine di garantire un elevato livello di protezione della salute, la libera circolazione delle merci e la certezza del diritto per i produttori, l'attuale regolamentazione ha ritenuto necessario introdurre una definizione uniforme di NM, ispirata anche alla Raccomandazione della Commissione Europea (2), sulla definizione di *nanomateriale*, con la flessibilità necessaria per adattare questa definizione al progresso scientifico e tecnico e successivo sviluppo normativo a livello dell'Unione e a livello internazionale.

Le proposte documentali più attuali (nuovo Regolamento sui DM) forniscono una definizione di *nanomateriale* che utilizza come intervallo delle dimensioni esterne quello compreso fra 1 nm e 100 nm (3). Da una inchiesta utilizzata per conoscere meglio il contesto produttivo nel settore dei dispositivi medici sono stati identificati dagli Organismi Notificati i seguenti casi di uso indicato attuale di NM (4):

- nanotubi di carbone per cementi ossei;
- nanoparticelle di idrossiapatite (polvere/paste) per il riempimento di cavità ossee;
- materiale polimerico con nanoparticelle per cementi dentali;
- nanoceramiche policristalline in materiali per la ricostruzione dentale;
- nano-argento o altri nanomateriali usati come rivestimenti su impianti e cateteri;
- nano-argento usato come un agente antibatterico (es. in materiale per medicazione).
- nanoparticelle magnetiche funzionalizzate di ossido di ferro per rilasciare miratamente nel sito tumorale agenti terapeutici riscaldando le nanoparticelle tramite campi magnetici alternati.

Pur essendo cresciuta l'attenzione negli ultimi 10-15 anni nei confronti del tema della sicurezza dell'utilizzo degli NM, tuttavia vi è ancora una forte incertezza scientifica circa i rischi e i benefici derivanti dal loro uso nei dispositivi medici. Al momento in ambito normativo e legislativo si assiste a una continua evoluzione sui metodi di valutazione della sicurezza degli NM in generale, e sul loro utilizzo nei dispositivi medici. Secondo il Comitato scientifico sui rischi sanitari emergenti e recentemente identificati (*Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks*, SCENIHR) (4) la valutazione del rischio associato agli NM (utilizzo e esposizione) può essere eseguita con gli stessi approcci già adottati per le sostanze in forma "microscopica". Tali approcci prevedono la stima dell'esposizione, l'identificazione del pericolo, la caratterizzazione del pericolo, e la valutazione dei rischi (si veda la norma EN ISO 14971). Tuttavia, le nanoparticelle, presentando caratteristiche peculiari strettamente legate alla loro dimensione, richiedono metodologie di valutazione appropriate.

Il comitato tecnico dell'*International Organization for Standardization*, ISO/TC 194 "Valutazione biologica e clinica dei dispositivi medici", sta preparando un documento sulla valutazione della sicurezza degli NM utilizzati nei dispositivi medici (ISO/TR 10.993-22). Il documento fornirà indicazioni su come applicare la serie di standard ISO 10993 per la valutazione biologica dei dispositivi medici e di quei dispositivi medici che contengono, generano o sono costituiti da NM. Esso conterrà sezioni sulla caratterizzazione dei componenti a scala nanometrica, sulla preparazione del campione per la prova biologica e sulle prove effettive. Il documento indicherà inoltre se per queste prove potranno essere utilizzati gli approcci standard e quali errori evitare nelle prove da effettuare sui dispositivi medici portatori di nanostrutture. Recentemente, la guida SCENIHR sulla determinazione dei potenziali effetti sulla salute degli NM utilizzati nei dispositivi medici (5) ha fornito un parere sugli approcci metodologici da utilizzare per la valutazione della sicurezza dei dispositivi medici contenenti NM. In particolare, la guida si riferisce anche alle particelle generate dall'usura e dalla rottura di dispositivi medici (es. protesi d'anca) che possono essere nell'intervallo di dimensioni degli NM.

Dispositivi medici contenenti nanomateriali: valutazione del rischio

Gli NM possono avere una vasta gamma di utilizzi nei dispositivi medici, sia come NM liberi (es. l'ossido di ferro nella ipertermia antitumorale, nei compositi dei riempitivi dentali, il nanoargento nelle medicazioni), NM nei rivestimenti di dispositivi medici (es. nano-idrossiapatite su impianti ossei), e inglobati nella matrice di materiale (es. nanotubi di carbonio nella parete di cateteri).

La valutazione della sicurezza dei dispositivi medici contenenti o costituiti da NM può essere effettuata basandosi sulla ISO 10993-1: 2009, "Valutazione biologica dei dispositivi medici - Parte 1- Valutazione e sperimentazione all'interno di un processo di gestione del rischio". L'approccio distingue il tipo di dispositivo medico, il punto di contatto e il tempo di contatto con il paziente. A seconda di queste tre categorie, devono essere considerati diversi effetti biologici (citotossicità, genotossicità, sensibilizzazione, tossicità sistemica) per la valutazione della sicurezza del dispositivo medico. Anche la guida SCENIHR (5) usa questo approccio e distingue chiaramente tra i dispositivi medici non invasivi e invasivi. L'uso di dispositivi medici può comportare vari tipi di esposizione, tra cui l'esposizione cutanea, l'esposizione per inalazione (intubazione, procedure odontoiatriche), l'esposizione delle mucose (attraverso vari tessuti mucosi, ad esempio la bocca), l'esposizione orale, l'esposizione parenterale (anche mediante iniezione o tramite impianti) e l'esposizione oculare. Il rischio correlato all'utilizzo di dispositivi medici con nanostrutture è principalmente associato alla possibilità di rilascio di nanoparticelle dal dispositivo medico stesso, e ai potenziali effetti tossici di queste. Tuttavia, anche nel caso in cui non ci sia rischio di rilascio e gli NM restino inglobati e fissati nel dispositivo, dovrebbe essere valutata la potenziale tossicità del NM stesso a causa delle sue peculiari proprietà fisico-chimiche che ne aumentano la reattività. A questo scopo, l'identificazione e la caratterizzazione dettagliata degli NM sono essenziali. Queste possono includere, ma non in maniera esclusiva, la determinazione dei seguenti parametri: la composizione chimica/identità, la dimensione delle particelle e la distribuzione delle dimensioni (particelle primarie/secondarie), la forma fisica e la morfologia, la concentrazione e la massa delle particelle, l'area di superficie specifica, la chimica di superficie, la carica di superficie, il potenziale redox, la solubilità e le proprietà di ripartizione, il pH, la viscosità, la densità e la porosità, la polverosità, la reattività chimica e l'attività catalitica, l'attività fotocatalitica. Per la valutazione di questi parametri sono disponibili diversi approcci e per ogni singolo NM devono essere usate le tecniche appropriate.

Conclusioni

Le nanotecnologie sono definite dalla Commissione Europea una delle tecnologie abilitanti fondamentali. Come innovazione, le nanotecnologie possono anche consentire vantaggi significativi per i dispositivi medici ma, allo stesso tempo, rappresentano nuove sfide per la valutazione del rischio. I dispositivi medici sono un gruppo molto eterogeneo e le loro applicazioni sono altrettanto varie. Alcuni prodotti sono connessi a una sola patologia, disabilità o lesioni, mentre altri possono essere applicati per la diagnosi e/o il trattamento di molteplici condizioni. Alcuni vengono utilizzati principalmente da una disciplina medica, mentre altri possono essere impiegati per una varietà di specializzazioni. Attualmente, vi è una crescente evoluzione sui metodi di valutazione della sicurezza degli NM in generale e, di conseguenza, anche per il loro uso nei dispositivi medici. Gli NM presentano caratteristiche specifiche che

possono indurre effetti tossici. Come per tutti i prodotti medicali, anche la valutazione dei rischi dei dispositivi medici contenenti NM deve essere eseguita con strumenti standardizzati. Le norme armonizzate non supportano ancora sufficientemente le applicazioni degli NM nei dispositivi medici. Alla luce delle attuali conoscenze è ancora necessario un approccio caso per caso per la valutazione del rischio associato all'utilizzo di dispositivi medici contenenti NM. Un approccio graduale per fasi (SCENIHR) si propone di evitare sperimentazioni non necessarie. È importante sottolineare che, per tecnologie innovative come queste, ci si deve comunque riferire agli sviluppi tecnico-scientifici dello stato dell'arte.

Bibliografia

1. Italia. Decreto legislativo 24 febbraio 1997, n. 46 emendato col Decreto legislativo 25 gennaio 2010, n.37. “Attuazione della direttiva 2007/47/CE che modifica le direttive 90/385/CEE per il ravvicinamento delle legislazioni degli stati membri relative ai dispositivi medici impiantabili attivi, 93/42/CE concernente i dispositivi medici e 98/8/CE relativa all'immissione sul mercato dei biocidi”. *Gazzetta Ufficiale* n. 60 del 13 marzo 2010.
2. Europa. Raccomandazione della Commissione del 18 ottobre 2011 sulla definizione di nanomateriale. (Testo rilevante ai fini del SEE), 2011/696/EU. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* n. L 275/38, 20 ottobre 2011.
3. Europa. Regolamento (UE) 2017/745 del Parlamento e del Consiglio del 5 aprile 2017 relativo ai dispositivi medici, che modifica la direttiva 2001/83/CE, il regolamento (CE) n. 178/2002 e il regolamento (CE) n. 1223/2009 e che abroga le direttive 90/385/CEE e 93/42/CEE del Consiglio. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 117/92 del 5 maggio 2017.
4. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR). *Risk assessment of products of nanotechnologies*. Brussels: European Commission, 2009.
5. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR). *Guidance on the determination of potential health effects of nanomaterials used in medical devices*. Brussels: European Commission, 2015

ASPETTI REGOLATORI RELATIVI ALLA QUALITÀ E SICUREZZA NELLO SVILUPPO DI NANOFARMACI

Gabriella Di Felice, Bianca Barletta, Cinzia Butteroni, Silvia Corinti
Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immuno-mediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Le nanotecnologie costituiscono un settore di ricerca in rapida evoluzione con un ampio orizzonte di applicabilità. Nel contesto della biomedicina, il loro contributo allo sviluppo di approcci innovativi per la diagnosi e la terapia delle malattie è già una realtà in crescente sviluppo.

La definizione di “nanofarmaco” fa riferimento ad un farmaco basato su materiale nanostrutturato o in scala “nano”, ingegnerizzato per avere effetti medici peculiari basati sulla struttura (1). Tali effetti comprendono il trasporto di molecole farmacologicamente attive (anche attraverso barriere biologiche), il loro indirizzo specifico a bersagli (organi, tessuti, cellule, o organuli subcellulari), il loro rilascio controllato e/o sito-specifico. Applicazioni più specializzate sono state sviluppate per l’attivazione dall’esterno (per esempio ablazione termica di tumori e rilascio controllato di farmaci su stimolo), o come veicoli di terapie combinate, agenti per *imaging*, sistemi di trasporto per vaccini, supporti per medicina rigenerativa (2).

Per maggior chiarezza sulla dimensione “nano” in riferimento ai farmaci, è importante sottolineare che i limiti dimensionali 1-100 nm, stabiliti nella raccomandazione della Commissione Europea dell’ottobre 2011 (3) sulla definizione di nanomateriale, non vengono rigidamente applicati nel settore farmaceutico. In particolare, è stato riconosciuto che il limite superiore di 100 nm non è scientificamente giustificato in questo settore di applicazione, ove prevale la considerazione globale delle caratteristiche fisico-chimiche, biologiche e fisiologiche, e viene quindi generalmente accettato un limite fino a 300 nm e in alcuni casi anche oltre fino a 1000 nm (2, 4).

I nanofarmaci sono in grado di esercitare meccanismi di azione complessi, che combinano proprietà meccaniche, chimiche, farmacologiche e immunologiche, e possono svolgere contemporaneamente funzioni diagnostiche e terapeutiche; inoltre, per alcune tipologie di nanofarmaci può risultare difficile, in base al meccanismo d’azione prevalente, la classificazione regolatoria come farmaco o dispositivo medico.

Nonostante le obiettive difficoltà associate all’attività regolatoria e alle procedure di autorizzazione, numerosi prodotti medicinali contenenti nanoparticelle sono stati già registrati sia a livello europeo che mondiale. Di conseguenza, numerose specialità basate sull’impiego di Nanomateriali (NM) sono presenti sul mercato mondiale ed europeo (1, 5), e molte di più si trovano nelle differenti fasi di sviluppo preclinico o clinico. Infatti, il processo di sviluppo di un nanofarmaco è lungo e complesso; in particolare, le fasi che vanno dalla ricerca di base sul meccanismo di azione alla determinazione della sicurezza preclinica *in vitro* e *in vivo* possono durare molti anni, mentre l’intero processo può superare i 15-20 anni (1). Sulla durata della fase preclinica gravano problematiche specifiche di sicurezza, che deve essere concettualmente distinta dall’aspetto più ampio della tossicologia di un nanomateriale, in quanto per un farmaco sono previste particolari dosi, vie e frequenze di somministrazione, nel contesto di una specifica situazione clinica e/o popolazione di pazienti (6).

Nella valutazione di sicurezza sono state individuate le seguenti criticità (7): lo sviluppo di saggi *in vitro* standardizzati e validati, con un opportuno pannello di materiali di riferimento; la messa a punto di modelli *ex vivo/in vivo* rilevanti per la via di somministrazione; la generazione

di approcci *in silico* per predire le risposte biologiche e tossicologiche; l'approfondimento dello studio farmacocinetico (ADME: Assorbimento, Distribuzione, Metabolismo, Escrezione); la particolare attenzione ai fattori critici che governano le interazioni degli NM con i sistemi biologici (es. la bio-corona proteica); la creazione di una rete interdisciplinare di ricerca e formazione sui nanofarmaci per gli aspetti biologici, tossicologici e clinici. Altri punti importanti che necessitano adeguata considerazione riguardano la persistenza degli NM contenuti in farmaci nelle cellule, nei tessuti e negli spazi interstiziali (1), e il loro impatto sul sistema immunitario e sulla modulazione intenzionale o accidentale delle sue funzioni (soppressione, adiuvanza, ipersensibilità) (8, 9).

Nel settore della qualità, le criticità tuttora aperte riguardano la caratterizzazione del nanofarmaco e del nanomateriale in esso contenuto, sulla quale impatta la grande eterogeneità sia delle tipologie di NM utilizzati, che spesso ne impedisce la categorizzazione, sia delle caratteristiche di uno stesso nanomateriale in fasi diverse del processo produttivo, che può influire negativamente sulla riproducibilità tra lotti di produzione (5). Per qualsiasi farmaco, infatti, la caratterizzazione chimica o biochimica del prodotto (con particolare attenzione alla presenza di aggregati e degradati) e la sua stabilità devono essere rigorosamente definite nei vari stadi del processo produttivo, dalla sintesi alla formulazione del prodotto finito, sino alla forma farmaceutica nel contenitore primario, e poi alla conservazione a differenti tempi e temperature. Anche in questo settore è quindi necessario investire nello sviluppo di nuovi approcci per la caratterizzazione della identità, delle impurezze, della eterogeneità del nanomateriale in termini di superficie e di distribuzione delle dimensioni (10, 11).

Pur nella consapevolezza delle peculiarità associate alla valutazione di qualità e sicurezza nei nanofarmaci, allo stato attuale esiste un ampio consenso a livello internazionale sulla appropriatezza del vigente sistema regolatorio per la loro approvazione finalizzata all'immissione in commercio (4, 6). Le agenzie regolatorie europee e mondiali hanno comunque intrapreso, e portano avanti anche in maniera condivisa, una serie di iniziative per rispondere adeguatamente alle sfide che la crescente complessità dei nanofarmaci in sviluppo possono porre a livello regolatorio e autorizzativo. La *European Medicines Agency* (EMA) già dai primi anni 2000 ha istituito il "Nanomedicine Research Group" presso il *Committee for Medicinal Products for Human Use* (CHMP), che ha prodotto nel 2006 il "Reflection paper on nanotechnology-based medicinal products for human use" (EMEA/CHMP/79769/2006) con lo scopo di comunicare lo stato dell'arte sull'argomento e stimolare la discussione sui punti deboli o controversi, contribuendo così al processo di potenziale sviluppo di nuove linee-guida e specifici documenti regolatori. Successivamente, nel 2009, è stato costituito l'"International Regulators Subgroup on Nanomedicines" che riunisce rappresentanze non solo europee (EMA), ma anche statunitensi (*Food and Drug Administration*, FDA), giapponesi (*Ministry of Health, Labour and Welfare*, MHLW), canadesi (Health Canada). Il primo "International Workshop on Nanomedicines", organizzato da EMA nel 2010 (http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news_and_events/news/2010/09/news_detail_001108.jsp&mid=WC0b01ac058004d5c1), riafferma nelle sue conclusioni che l'attuale quadro regolatorio, adeguato per la valutazione e l'autorizzazione dei nanofarmaci, consente la valutazione di molti aspetti, ma persiste un *gap* scientifico tra le conoscenze attuali e i nanofarmaci (soprattutto emergenti) che deve essere colmato da specifiche competenze scientifiche, apportate dalla consultazione di esperti multidisciplinari. I passi successivi hanno di conseguenza visto nel 2011 la creazione nell'ambito del CHMP del "Multidisciplinary Expert Group on Nanomedicines", a cui si deve l'elaborazione negli anni successivi di quattro *Reflection paper* su specifiche categorie di nanofarmaci per fornire guida e supporto agli *sponsor* coinvolti nel loro sviluppo.

Allo stato attuale, la maggioranza dei cosiddetti nanofarmaci di prima generazione, già approvati con l'attuale sistema regolatorio e presenti sul mercato, è basata sull'impiego di limitate categorie di NM: liposomi, proteine PEGilate, coniugati proteina-farmaco, nanocristalli, nanoparticelle metalliche (5). Le nuove sfide che si profilano nel settore riguardano principalmente due aree: lo sviluppo di nanofarmaci di "seconda generazione", e l'avvento dei "nanosimilari" (4). Nel primo caso, i continui avanzamenti delle nanoscienze stanno portando allo sviluppo di nuove nanostrutture complesse che verranno utilizzate per la creazione di tipologie innovative di nanofarmaci, agenti per *imaging* e per *teranostica*, per i quali si renderà necessaria una specifica valutazione regolatoria prima dell'accesso alla sperimentazione clinica di fase I nell'uomo e all'autorizzazione. Nel secondo caso, la scadenza dei brevetti sui primi nanofarmaci avrà come conseguenza la produzione di "nanofarmaci simili" o "nanosimilari", analogamente a quanto accaduto con farmaci chimici (generici) e biologici (biosimilari); la loro similarità con il farmaco originale di riferimento dovrà essere dimostrata con adeguati studi di comparabilità in termini di qualità, sicurezza, efficacia terapeutica. Data la complessità e l'eterogeneità dei nanofarmaci, si renderà probabilmente necessario in questi studi un approccio "caso per caso" o almeno "classe-specifico" per supportare adeguatamente l'equivalenza prima dell'autorizzazione. La necessità di specifiche competenze scientifiche è stata sottolineata nella discussione già da alcuni anni aperta sull'argomento (12).

L'EMA e le altre agenzie regolatorie hanno individuato alcuni obiettivi prioritari da perseguire nel prossimo futuro: lo sviluppo e la validazione di nuovi metodi per implementare le linee-guida esistenti; l'individuazione precoce di rischi e criticità emergenti; l'impulso al dialogo scientifico tra accademia, industria, agenzie regolatorie; l'incremento delle competenze e conoscenze messe a disposizione delle agenzie regolatorie da parte del mondo della ricerca.

In questo scenario si identifica il ruolo delle competenze nel settore delle nanotecnologie e degli NM espresse dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS) e rappresentate nel Progetto RInnovaReNano. Le *expertise* presenti nel gruppo ISS, già coinvolto in progetti nazionali e internazionali su questi aspetti, sono in grado di intervenire sia a livello della ricerca di base sugli effetti biologici di NM per la loro applicazione in senso terapeutico, sia nello sviluppo di nuovi metodi sperimentali per la valutazione della tossicità *in vitro* e *in vivo*, sia nella parallela attività multidisciplinare di parere, valutazione e controllo.

Bibliografia

1. Etheridge ML, Campbell SA, Erdman AG, Haynes CL, Wolf SM, McCullough J. The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 2013;9:1-14.
2. Duncan R, Gaspar R. Nanomedicine(s) under the microscope. *Molecular Pharmaceutics* 2011;8(6):2101-41.
3. Europa. Raccomandazione della Commissione del 18 ottobre 2011 sulla definizione di nanomateriale. 2011/696/EU. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* n. L 275/38, 20 ottobre 2011.
4. Ehmann F, Sakai-Kato K, Duncan R, Hernán Pérez de la Ossa D, Pita R, Vidal JM, Kohli A, Tothfalusi L, Sanh A, Tinton S, Robert JL, Silva Lima B, Papaluca-Amati M. Next-generation nanomedicines and nanosimilars: EU regulators' initiatives relating to the development and evaluation of nanomedicines. *Nanomedicine (London)* 2013;8(5):849-56.
5. Weissig V, Tracy K, Pettinger TK, Murdock N. Nanopharmaceuticals (part 1): products on the market. *International Journal of Nanomedicine* 2014;9:4357-73.

6. Duncan R. Nanomedicine(s) and their regulation. In: Fadeel B (Ed.). *Handbook of safety assessment of nanomaterials. From toxicological testing to personalized medicine*. Singapore: Pan Stanford Publishing; 2014. p. 1-42.
7. Nyström AM, Fadeel B. Safety assessment of nanomaterials: Implications for nanomedicine. *Journal of Controlled Release* 2012;161:403-8.
8. Dobrovolskaia MA, Germolec DR, Weaver J. Evaluation of nanoparticle immunotoxicity. *Nature Nanotechnology* 2009;4:411-4.
9. Dobrovolskaia MA, Shurinb M, Shvedova AA. Current understanding of interactions between nanoparticles and the immune system. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2016;299:78-89.
10. Mc Neil SE. Challenges for nanoparticle characterization. *Methods in Molecular Biology* 2011;697:9-15.
11. Wu L, Zhang J, Watanabe W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Advances in Drug Delivery Reviews* 2011;63(6):456-69.
12. Schellekens H, Klinger E, Muhlebach S, Brin JF, Storm G, Crommelin DJ. The therapeutic equivalence of complex drugs. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2011;59(1):176-83.

RUOLO DELLE NANOVESCICOLE NEL TRASPORTO DI FARMACI E NANOPARTICELLE DI VARIA NATURA

Stefano Fais, Luana Lugini, Cristina Federici, Mariantonia Logozzi, Tommaso Azzarito, Davide Mizzi, Rossella Di Raimo, Elisabetta Iessi

Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma

La nanomedicina è una delle più importanti aree di studio della ricerca medica, sia a livello di diagnosi che di terapia di pazienti e di soggetti sani. Le nanoparticelle e le vescicole extracellulari possono essere considerate due classi di modelli di biomimetismo della nanomedicina.

Crescenti evidenze dimostrano che i fluidi corporei contengono notevoli quantità di vescicole della dimensione di 30-1000 nm che sono rilasciate dalla maggior parte dei tipi cellulari umani sia di soggetti sani che malati. Tra le vescicole extracellulari molta importanza hanno assunto gli esosomi, di dimensione dai 30 ai 150 nm, derivanti dall'apparato endosomiale cellulare e le microvescicole, di dimensione dai 150 ai 1000 nm, che originano dalla membrana plasmatica. Queste vescicole trasportano molecole, come proteine, lipidi, metaboliti, acidi nucleici, sia costitutivi che cellula-specifici. Tale contenuto può essere trasferito alle cellule bersaglio mediante un processo di fusione e/o endocitosi. Le nanovesicole sono anche in grado di indurre una funzione specifica nelle cellule bersaglio, mediante un legame recettore-ligando, per es. tra i recettori che inducono la morte cellulare per apoptosi, Fas/FasL (Cd 95 CD 95-L) TRAIL/TRAILR (*Tumor Necrosis Factor- Alfa –Related Apoptosis Ligand*) (1, 2).

Noi abbiamo dimostrato che i componenti lipidici della membrana plasmatica e il pH acido del microambiente cellulare rivestono un ruolo chiave nella regolazione del traffico degli esosomi nel melanoma umano (3).

Le nanovesicole hanno diverse funzioni biologiche che giustificano il fatto che possano essere usate come agenti terapeutici nella risposta immunitaria, nei *trial* clinici e nel campo della medicina rigenerativa (4,5). Avendo poi anche un contenuto cellula-specifico, gli esosomi possono essere considerati delle riserve di bio-marcatori circolanti per una grande varietà di patologie umane.

I nostri studi precedenti hanno dimostrato che gli esosomi possono essere individuati, caratterizzati e quantificati dal plasma sia di donatori sani che di pazienti con tumore tramite un saggio immunoenzimatico chiamato EXOTEST (6). L'EXOTEST è un test ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) che utilizza una combinazione di due anticorpi, uno per la cattura degli esosomi e l'altro per la loro rivelazione. Generalmente per la cattura si utilizzano anticorpi specifici diretti verso marcatori esosomiali, come Rab5B, CD81 e CD63, oppure diretti contro proteine tumore-specifiche, come la caveolina-1. Per la rivelazione del segnale si usano specifici anticorpi secondari. Tramite questo saggio abbiamo evidenziato che nei pazienti con tumore il livello degli esosomi circolanti è più elevato che nei donatori sani. Risultato confermato anche dagli esperimenti condotti sui topi SCID. I nostri dati supportano quindi l'uso dell'EXOTEST non solo per caratterizzare quantitativamente e qualitativamente gli esosomi circolanti nel plasma di pazienti con tumore, ma anche come nuovo strumento in diagnostica.

Le ultime ricerche suggeriscono che gli esosomi possono veicolare molecole di natura chimica, come la curcumina, il cisplatino e la doxorubicina (7-9). Uno studio dimostra che la curcumina veicolata dagli esosomi è più efficace nel prevenire l'infiammazione al cervello che la curcumina da sola (10). Noi abbiamo dimostrato, inoltre, che gli esosomi rilasciati da tumori

trattati con il chemioterapico cisplatino, contengono il cisplatino nella forma chimica nativa/attiva (8). Quindi gli esosomi possono essere visti allo stesso tempo sia come sorgente di biomarcatori tumorali che come veicoli di sostanze in grado di raggiungere il tumore, di tracciarlo e contrastarlo.

Dati preliminari da noi ottenuti mostrano che gli esosomi di varie origini cellulari possono essere caricati con molecole, quali l'Arancio di Acridina (AO), che fungono allo stesso tempo sia da traccianti, essendo naturalmente fluorescenti, che da sostanze ad azione citotossica, in seguito a stimolazione con la luce ad opportune lunghezze d'onda (11). Questi risultati mostrano inoltre che l'Arancio di Acridina veicolata dagli esosomi è maggiormente concentrata e trattenuta per un tempo più lungo nelle cellule tumorali bersaglio. Evidenze sperimentali mostrano che gli esosomi sono acidi, e quindi molecole acidofile, come l'Arancio di Acridina, potrebbero essere considerate sostanze ideali da essere caricate in questo tipo di vescicole, perché facilmente trattenute e veicolate. Gli esosomi caricati con sostanze citotossiche potrebbero fungere sia da marcatori diagnostici che da agenti terapeutici diretti verso le lesioni neoplastiche.

Infine, ricerche recenti mostrano che gli esosomi sono in grado di trasportare diversi tipi di RNA (12, 13) e una grande varietà di virus, tra cui l'EBV (*Epstein Barr Virus*) (14). Si può quindi ipotizzare che in un futuro molto vicino le nanovesicole possano rappresentare uno strumento utile anche per lo screening e la diagnosi di malattie virali.

Abbiamo inoltre evidenziato la presenza negli esosomi della proteina prionica (15) e di molecole di RNA capaci di essere trasferite dalle cellule somatiche alle cellule germinali, per mezzo degli esosomi (16, 17). Tutti questi dati suggeriscono fortemente che saggi basati sull'utilizzo degli esosomi, possono rappresentare dei nuovi strumenti per lo screening di malattie trasmissibili.

Alla luce di queste premesse, gli obiettivi della ricerca che verrà effettuata nell'ambito del presente progetto sono:

- 1) verificare se gli esosomi sono in grado di veicolare nanomateriali (come ad esempio il titanio) tramite studi preclinici, sia *in vitro* utilizzando i macrofagi e gli esosomi da questi rilasciati, sia *in vivo* usando topi trattati a diversi dosaggi con nanomateriali;
- 2) verificare se nel plasma di pazienti a cui sono state impiantate protesi a base di nanomateriali, ritroviamo tale materiali negli esosomi circolanti.

I nostri studi preliminari sulle vescicole extracellulari, considerate come marcatori diagnostici e come possibili vettori terapeutici, hanno stimolato l'interesse e l'attenzione di diverse industrie farmaceutiche. Infatti, piccole e grandi compagnie farmaceutiche, il cui elenco è riportato di seguito, stanno sfruttando questi risultati al fine di renderli commercializzabili. Tali industrie stanno investendo nella valutazione delle tecnologie attualmente in uso, per l'individuazione e la caratterizzazione degli esosomi nei diversi fluidi biologici e nello sviluppo di nuove tecnologie da applicare a scopo diagnostico.

Le industrie che stanno attualmente investendo sugli esosomi sono:

- Exosome Diagnostics, Inc.;
- Aethlon Medical Inc.;
- System Biosciences
- HansaBiomed;
- Exothera;
- Exosomics
- Codiack;
- Bioscience;
- Izon;

- Invitrogen;
- Biovision.

La partecipazione attiva delle industrie farmaceutiche supporterà sicuramente il futuro sviluppo del filone della ricerca sugli esosomi, portando diversi benefici in termini di:

- 1) produzione su larga scala di nanovesicole a scopo terapeutico;
- 2) sviluppo di nuove tecniche per l'isolamento e la caratterizzazione di queste nanovesicole;
- 3) standardizzazione nella raccolta del campione.

Considerando che gli esosomi: i) sono strumenti naturali, acellulari, non tossici, capaci di trasportare in maniera autocrina e paracrina diverse molecole nelle cellule bersaglio; ii) possono indurre cambiamenti fenotipici e genotipici nelle cellule bersaglio; iii) possono contenere specifici marcatori di malattie; iv) possono veicolare potenziali molecole terapeutiche, è verosimile ipotizzare che essi potranno svolgere un ruolo chiave nel futuro sviluppo della nanomedicina.

In particolare gli esosomi possono essere considerati innovativi strumenti di teranostica, che come dice la parola, inglobando terapia e diagnosi, consentiranno l'individuazione e il monitoraggio della malattia negli stadi precoci e il trasporto specifico del farmaco più adatto a curare la malattia.

Bibliografia

1. Andreola G, Rivoltini L, Castelli C, Huber V, Perego P, Deho P, Squarcina P, Accornero P, Lozupone F, Lugini L, Stringaro A, Molinari A, Arancia G, Gentile M, Parmiani G, Fais S. Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *Journal of Experimental Medicine* 2002;195(10):1303-16.
2. Huber V, Fais S, Iero M, Lugini L, Canese P, Squarcina P, Zaccheddu A, Colone M, Arancia G, Gentile M, Seregini E, Valenti R, Ballabio G, Belli F, Leo E, Parmiani G, Rivoltini L. Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape. *Gastroenterology* 2005;128(7):1796-804.
3. Parolini I, Federici C, Raggi C, Lugini L, Palleschi S, De Milito A, Coscia C, Iessi E, Logozzi M, Molinari A, Colone M, Tatti M, Sargiacomo M, Fais S. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *Journal of Biological Chemistry* 2009;284(49):34211-22.
4. Yanez-Mo M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borrás FE, Buzas EI, Buzas K, Casal E, Cappello F, Carvalho J, Colás E, Cordeiro-da Silva A, Fais S, Falcon-Perez JM, Ghobrial IM, Giebel B, Gimona M, Graner M, Gursel I, Gursel M, Heegaard NH, Hendrix A, Kierulf P, Kokubun K, Kosanovic M, Kralj-Iglic V, Krämer-Albers EM, Laitinen S, Lässer C, Lener T, Ligeti E, Linē A, Lipps G, Llorente A, Lötvall J, Manček-Keber M, Marcilla A, Mittelbrunn M, Nazarenko I, Nolte-'t Hoen EN, Nyman TA, O'Driscoll L, Oliván M, Oliveira C, Pällinger É, Del Portillo HA, Reventós J, Rigau M, Rohde E, Sammar M, Sánchez-Madrid F, Santarém N, Schallmoser K, Ostensfeld MS, Stoorvogel W, Stukelj R, Van der Grein SG, Vasconcelos MH, Wauben MH, De Wever O. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles* 2015;4:27066.
5. Lener T, Gimona M, Aigner L, Börger V, Buzas E, Camussi G, Chaput N, Chatterjee D, Court FA, del Portillo HA, O'Driscoll L, Fais S, Falcon-Perez JM, Felderhoff-Mueser U, Fraile L, Gho YS, Görgens A, Gupta RC, Hendrix A, Hermann DM, Hill AF, Hochberg F, Horn PA, de Kleijn D, Kordelas L, Kramer BW, Krämer-Albers EM, Laner-Plamberger S, Laitinen S, Leonardi T, Lorenowicz MJ, Lim SK, Lötvall J, Maguire CA, Marcilla A, Nazarenko I, Ochiya T, Patel T, Pedersen S, Pocsfalvi G, Pluchino S, Quesenberry P, Reischl IG, Rivera FJ, Sanzenbacher R, Schallmoser K, Slaper-Cortenbach I, Strunk D, Tonn T, Vader P, van Balkom BW, Wauben M, Andaloussi SE, Théry C, Rohde E, Giebel B. Applying Extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials – An ISEV Position Paper. *Journal of Extracellular Vesicles* 2015;4:30087.

6. Logozzi M, De Milito A, Lugini L, Borghi M, Calabrò L, Spada M, Perdicchio M, Marino ML, Federici C, Iessi E, Brambilla D, Venturi G, Lozupone F, Santinami M, Huber V, Maio M, Rivoltini L, Fais S. High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients. *PLoS One* 2009;4(4):e5219.
7. Sun D, Zhuang X, Xiang X, Liu Y, Zhang S, Liu C, Barnes S, Grizzle W, Miller D, Zhang HG. A novel nanoparticle drug delivery system: the anti-inflammatory activity of curcumin is enhanced when encapsulated in exosomes. *Molecular Therapy* 2010;18(9):1606-14.
8. Federici C, Petrucci F, Caimi S, Cesolini A, Logozzi M, Borghi M, D'Ilio S, Lugini L, Violante N, Azzarito T, Majorani C, Brambilla D, Fais S. Exosome release and low pH belong to a framework of resistance of human melanoma cells to cisplatin. *PLoS One* 2014;9(2):e88193.
9. Smyth T, Kullberg M, Malik N, Smith-Jones P, Graner MW, Anchordoquy TJ. Biodistribution and delivery efficiency of unmodified tumor-derived exosomes. *Journal of Controlled Release* 2015;199:145-55.
10. Zhuang X, Xiang X, Grizzle W, Sun D, Zhang S, Axtell RC, Ju S, Mu J, Zhang L, Steinman L, Miller D, Zhang HG. Treatment of brain inflammatory diseases by delivering exosome encapsulated anti-inflammatory drugs from the nasal region to the brain. *Molecular Therapy* 2011;19:1769-79.
11. Kusuzaki K, Hosogi S, Ashihara E, Matsubara T, Satonaka H, Nakamura T, Matsumine A, Sudo A, Uchida A, Murata H, Baldini N, Fais S, Marunaka Y. Translational research of photodynamic therapy with acridine orange which targets cancer acidity. *Current Pharmaceutical Design* 2012;18:1414-20.
12. Valadi, H, Ekstrom, K, Bossios, A, Sjostrand, M, Lee, JJ and Lötval, JO (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology* 2007;9(6):654-9.
13. Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakhal S, Wood MJ. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nature Biotechnology* 2011;29(4):341-5.
14. Canitano A, Venturi G, Borghi M, Ammendolia MG, Fais S. Exosomes released in vitro from Epstein-Barr virus (EBV)-infected cells contain EBV-encoded latent phase mRNAs. *Cancer Letters* 2013;337(2):193-9.
15. Properzi F, Logozzi M, Abdel-Haq H, Federici C, Lugini L, Azzarito T, Cristofaro I, di Sevo D, Ferroni E, Cardone F, Venditti M, Colone M, Comoy E, Durand V, Fais S, Pocchiari M. Detection of exosomal prions in blood by immunochemistry techniques. *Journal of General Virology* 2015;96(Pt 7):1969-74.
16. Balaj L, Lessard R, Dai L, Cho YJ, Pomeroy SL, Breakefield XO, Skog J. Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nature Communications* 2011;2:180.
17. Cossetti C, Lugini L, Astrologo L, Saggio I, Fais S, Spadafora C. Soma-to-germline transmission of RNA in mice xenografted with human tumour cells: possible transport by exosomes. *PLoS One* 2014;9(7):e101629.

CONCLUSIONI

Flavia Barone, Isabella De Angelis, Antonella Pilozi e Loredana Musmeci*

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

Il Convegno ha registrato un significativo apprezzamento da parte dei partecipanti. Nel corso dei lavori è emerso chiaramente che le nanotecnologie e i Nanomateriali (NM) rappresentano un elemento chiave per la futura competitività di molti settori produttivi della Regione Lazio.

È stata da più parti sottolineata l'importanza di un dialogo che coinvolga i molteplici soggetti interessati allo sviluppo responsabile delle nanotecnologie attraverso la creazione di *network* dedicati.

È stato anche evidenziato che le incertezze, reali o percepite, riguardo ai rischi per la salute umana e per l'ambiente, unite alla mancanza di chiarezza in ambito regolatorio, hanno un effetto negativo sullo sviluppo delle nanotecnologie. Dato che la soluzione di tali incertezze passa inevitabilmente attraverso una dettagliata comprensione delle proprietà intrinseche di questi materiali innovativi, unita ad una adeguata conoscenza delle possibili interazioni con i sistemi biologici, la possibilità di riuscire a definire e quantificare su base scientifica un rischio accettabile per gli NM diviene estremamente importante e necessaria.

Il progetto RInnovaReNano è stato quindi percepito da gran parte dell'*audience* come l'avvio di un percorso comune, di cui la realizzazione di una piattaforma informativa rappresenta il principale strumento operativo. Da più parti, inoltre, si è auspicato che questa piattaforma possa in un futuro rivestire carattere nazionale.

In particolare, durante la sessione pomeridiana riservata, a cui hanno partecipato, tra gli altri, rappresentanti di importanti realtà territoriali come Federchimica, Cosmetica Italia, Unioncamere, cluster CHICO (*Cluster of Health Innovation and Community*), oltre a rappresentanti di università e enti di ricerca pubblici, sono state evidenziate sia le positività che le criticità dell'approccio progettuale di RInnovaReNano.

I punti emersi durante la vivace e partecipata discussione hanno riguardato principalmente la possibilità di rafforzare le collaborazioni pubblico-privato in funzione delle necessità delle imprese. A tale riguardo la partecipazione di AIRI (Associazione Italiana per la Ricerca Industriale) al progetto rappresenta sicuramente un punto di forza nell'interazione tra Istituto Superiore di Sanità e imprese regionali.

* in quiescenza da agosto 2016

*Serie Rapporti ISTISAN
numero di giugno 2017, 2° Suppl.*

*Stampato in proprio
Settore Attività Editoriali – Istituto Superiore di Sanità*

Roma, giugno 2017