



Università
Ca'Foscari
Venezia

**Corso di Laurea Magistrale in
Scienze Ambientali (LM-75)**

Valutazione e Gestione dei Sistemi Ambientali

Ordinamento ex D.M 270/2004

Tesi di Laurea Magistrale

**Valutazione della tossicità acuta di formulati a base
di nuovi materiali per la conservazione delle opere
d'arte moderna e contemporanea**

Relatore

Prof. Marco Picone

Laurenda

Irene Bendazzoli

Matricola 83919

Anno Accademico

2016/2017

INDICE

1.Obiettivi della tesi	Pag. 4
2.II progetto NANORESTART	Pag. 6
2.1 Gli obiettivi d NANORESTART	Pag. 7
2.2 Articolazione del progetto	Pag. 10
2.3 La valutazione di impatto ambientale dei nuovi formulati prodotti nell'ambito di NANORESTART: l'approccio del WP6	Pag. 12
2.3.1 <i>La valutazione del rischio: Autoclassificazione CLP</i>	<i>Pag. 14</i>
2.3.2 <i>Valutazione avanzata del pericolo: Integrated Testing Strategy</i>	<i>Pag. 16</i>
2.4 Le nanotecnologie e i nanomateriali	Pag. 19
2.4.1 <i>Problemi dei nanomateriali</i>	<i>Pag. 22</i>
3.Test di tossicità	Pag. 25
3.1 Metodi di valutazione della tossicità con test acuto su <i>Daphnia magna</i>	Pag. 28
3.1.1 <i>Generalità</i>	<i>Pag. 28</i>
3.1.2 <i>La specie test</i>	<i>Pag. 28</i>
3.1.3 <i>Esecuzione del test</i>	<i>Pag. 29</i>
3.1.4 <i>Materiali necessari per l'esecuzione del test</i>	<i>Pag. 31</i>
3.1.5 <i>Allevamento e mantenimento delle colture</i>	<i>Pag. 34</i>
3.1.6 <i>Elaborazione dei dati</i>	<i>Pag. 35</i>
3.1.7 <i>Procedura QA/QC</i>	<i>Pag. 35</i>
3.2 Metodi di valutazione della tossicità con test acuto su <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Pag. 36
3.2.1 <i>Generalità</i>	<i>Pag. 36</i>
3.2.2 <i>Le specie test</i>	<i>Pag. 37</i>
3.2.3 <i>Esecuzione del test</i>	<i>Pag. 37</i>
3.2.4 <i>Materiali necessari per l'esecuzione del test</i>	<i>Pag. 39</i>
3.2.5 <i>Allevamento e mantenimento delle colture</i>	<i>Pag. 40</i>
3.2.6 <i>Lettura dei risultati ed elaborazione dati</i>	<i>Pag. 40</i>

3.2.7 Procedura QA/QC	Pag. 41
3.3 Test Microtox©: Test di inibizione dell'emissione di luce del batterio <i>Vibrio fischeri</i>	Pag. 43
3.3.1 Generalità	Pag. 43
3.3.2 La specie test	Pag. 43
3.3.3 Esecuzione del test	Pag. 43
3.3.4 Screening test	Pag. 44
3.3.5 Basic test	Pag. 45
3.3.6 Procedura QA/QC	Pag. 47
4. Caso di studio: I prodotti NANORESTART	Pag. 48
4.1 Introduzione e obiettivi dell'indagine sperimentale	Pag. 48
4.2 Partner e prodotti NANORESTART	Pag. 48
4.2.1 Partner partecipanti al progetto NANORESTART	Pag. 48
4.2.2 Prodotti proposti nei Working Package	Pag. 49
4.3 Risultati dei test	Pag. 52
4.3.1 Risultati del test acuto su <i>Daphnia magna</i>	Pag. 52
4.3.2 Risultati del test acuto su <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Pag. 56
4.3.3 Risultati del test acuto su <i>Aliivibrio fischeri</i>	Pag. 59
4.4 Discussione risultati	Pag. 63
4.4.1 WP2 – sviluppo nuovi strumenti di pulizia	Pag. 63
4.4.2 WP3 – prodotti per consolidamento e il rafforzamento delle strutture	Pag. 64
4.4.3 WP4 – prodotti per la protezione delle superfici	Pag. 65
5. Conclusioni	Pag. 67
6. Bibliografia	Pag. 69

1.Obiettivi della tesi

Una svolta nella storia dell'arte è stata determinata dallo stile moderno e successivamente da quello contemporaneo, i quali si distanziano dalle ideologie tecniche e materiali che hanno accompagnato per molti anni lo stile degli artisti. Ciò che le distingue è l'esigenza di infrangere le tradizioni cercando nuove forme, nuovi metodi operativi e, di conseguenza, nuovi materiali di utilizzo. Questo slancio è legato all'incremento dell'industrializzazione e delle scoperte scientifiche, entrambi fattori di nuovi prodotti derivanti della chimica di sintesi che hanno introdotto nell'uso quotidiano, e quindi anche artistico, di nuovi leganti polimerici, "nuovi colori" acrilici e, infine, supporti plastici.

È necessario definire il termine "plastica", il quale viene utilizzato per individuare prodotti naturali (come per esempio cellulosa, gomma naturale); semisintetici (nitrato di cellulosa); e sintetici (prodotti derivanti dal petrolio).

Nomi importanti come Wassily Kandinsky, Kazimir Malevicj, Karel Appel, Jackson Pollock, Francis Bacon sono artisti che hanno apportato una rivoluzione nella storia dell'arte, caratterizzando il periodo moderno e contemporaneo.

L'arte in sé è contemplata come parte di un vasto patrimonio culturale, alla base dello sviluppo economico mondiale. Ai fini di massimizzare i benefici che il patrimonio artistico può apportare nel comparto turistico, è importante e necessario sviluppare, per l'appunto, strategie che possano assicurarne una conservazione duratura. Questi provvedimenti dovrebbero contrastare la degradazione legata sia a fattori climatici che ambientali; per conseguire questo obiettivo è necessario quindi intervenire attraverso materiali che consentano la pulizia, la protezione e la conservazione a lungo termine delle opere d'arte. Questo è il punto focale su cui si basa il progetto NANORESTART- NANOMaterials for the RESToration of works of ART-, il quale si concentra sull'utilizzo di nanotecnologie e prodotti di nuova sintesi nei processi volti alla preservazione di opere d'arte sia moderne che contemporanee. Tali prodotti, a loro volta, necessitano di un'attenta valutazione ai fini di informare i produttori riguardo gli impatti possibili sulla salute umana e sull'ambiente già nelle prime fasi di elaborazione del prodotto stesso, prima del suo inserimento nel mercato, nell'ambito di una procedura di sviluppo Safe by Design (SbD). Nell'ambito di questo processo valutativo, il presente lavoro di tesi si inserisce nella

prima fase di approfondimento ecotossicologico, che prevede, tramite un procedimento di Integrated Testing Strategy (ITS) a tre livelli (cfr. Capitolo 2), di caratterizzare la tossicità dei prodotti nei confronti dell'ambiente acquatico. Il primo step, relativo alla caratterizzazione della tossicità acuta, ha previsto l'impiego di 3 diversi indicatori ambientali, rappresentativi di diversi livelli di complessità e diverso ruolo all'interno della comunità biologica:

- il crostaceo *Daphnia magna*, attraverso un test acuto di immobilità (seguendo le linee guida proposte da OECD 202);
- l'alga verde unicellulare *Pseudokirchneriella subcapitata* attraverso il test di inibizione della crescita (OECD 201);
- il batterio bioluminescente *Aliivibrio fischeri* con il test Microtox© seguendo le linee guida di ISO 11348.

I risultati ottenuti dai test di tossicità acuta previsti dal primo step della valutazione ITS consentono di ottenere un quadro generale relativamente alla potenziale pericolosità dei prodotti analizzati per l'ambiente acquatico da confrontare con quanto emerge dalla classificazione dei medesimi prodotti ai sensi del regolamento (CE) 1272/2008 sulla classificazione, l'etichettatura e l'imballaggio (CLP) che inoltre disciplina la gestione dei rischi legati alle sostanze chimiche.

Gli obiettivi principali del presente lavoro di tesi sono quindi:

- la caratterizzazione della tossicità acuta dei formulati proposti nell'ambito del progetto NANORESTART;
- il confronto tra la tossicità acuta dei prodotti di nuova concezione ed i prodotti convenzionali attualmente utilizzati in ambito di restauro;
- la valutazione della tossicità acuta dei medesimi formulati ai sensi del Regolamento CLP (Reg. 1272/2008/CE);

2. Il Progetto NANORESTART

Il progetto NANORESTART- NANOMaterials for the RESToration of works of ART- (Figura 1) è stato avviato nel 2015, nell'ambito del programma NMP-21-2014 (Nanoscienze, Nanotecnologie, Materiali e nuove tecnologie di produzione) di “Horizon 2020”, il più vasto programma di ricerca e innovazione EU di sempre, con una disposizione finanziaria di circa 80 miliardi di € nel corso di 7 anni.

Il tema principale del progetto riguarda l'arte moderna e contemporanea, in particolare la pulizia, protezione e conservazione a lungo termine dei manufatti.

L'obiettivo è sviluppare prodotti di restauro/pulizia adeguati per i materiali utilizzati dagli artisti moderni e contemporanei, in modo da ridurre al minimo i rischi di degradazione degli artefatti, dovuti principalmente all'invecchiamento dei materiali e alla degradazione fisica e chimica legate all'ambiente in cui le opere sono conservate.

Le opere d'arte a cui è rivolto il progetto, infatti, sono conservate nei musei europei più importanti sia indoor sia outdoor, e quindi sottoposti all'esposizione a diversi tipi di agenti di deterioramento.



Figura 1. Logo del progetto NANORESTART
fonte: sito ufficiale del progetto
<http://www.nanorestart.eu>

I prodotti utilizzati nel procedimento di restauro e pulizia hanno la necessità di essere rinnovati rispetto a quelli utilizzati per le opere d'arte più antiche. Questo problema nasce dal diverso tipo di strumenti e materiali utilizzati dagli artisti moderni e contemporanei rispetto ai materiali classici.

Molte opere infatti sono costituite da materiali di sintesi chimica, come per esempio materiali plastici. Gli artisti moderni e contemporanei si sono avvalsi di prodotti provenienti dalla produzione industriale, materiali completamente diversi da quelli utilizzati nelle epoche precedenti. Questi nuovi materiali però hanno tempi di vita molto brevi e la loro debolezza rappresenta una sfida per i progettisti di prodotti di restauro rispettosi delle caratteristiche originali dei materiali, visto che questi possiedono anche una diversa sensibilità e stabilità nei confronti dei solventi di pulizia di uso comune (xilene, toluene, alcool) e della stessa acqua. La scarsa conoscenza relativamente ai processi di degradazione di molti materiali plastici

richiede quindi un approfondimento riguardo i possibili solventi, surfattanti e nanomateriali da utilizzare per le operazioni di pulizia, consolidamento e protezione, al fine di evitare che queste misure di "conservazione" possano invece contribuire al degrado dell'artefatto.

2.1 Gli obiettivi di NANORESTART

Il progetto mira a trovare soluzioni affidabili in termini di costi e complessità operativa per coloro che si troveranno ad utilizzare i nuovi materiali e le tecniche sviluppate, nonché alla sostenibilità economica ed ambientale delle nuove formulazioni. In particolare, il progetto mira ad introdurre nel mercato del restauro prodotti avanzati a base di gel, surfattanti e nanomateriali di nuova generazione, sfruttando le caratteristiche particolari ed uniche di questi prodotti, la cui introduzione nel mondo del restauro è avvenuta nell'ambito del progetto NANOFORART (2011-2014).

In particolare, gli obiettivi principali di NANORESTART sono:

- Sviluppo di nuove tecnologie per la pulizia, la protezione e la conservazione a lungo termine dei manufatti di arte contemporanea
- Valutazione dell'impatto ambientale delle nuove tecnologie
- Sfruttamento delle nuove tecnologie
- Disseminazione dei risultati, formazione degli utenti finali dei nuovi prodotti, condivisione delle esperienze

Il conseguimento di questi obiettivi sottintende il dover affrontare 4 principali sfide per la conservazione, definite dal progetto Conservation Challenges.

Il concetto principale sostenuto da questo progetto dichiara che la conservazione a lungo termine del patrimonio culturale contemporaneo si può basare solamente su un'attenta conoscenza e comprensione dei meccanismi di degradazione che possono incidere sui materiali artistici. Infatti, diversi materiali di cui si sono avvalsi gli artisti contemporanei, come per esempio materiali plastici, hanno un'enorme necessità di controllo mentre altri si trovano già in uno stato di degradazione avanzato.

Punto focale nella riduzione del rischio e dell'insorgere di effetti collaterali è quello

di individuare un'adeguata compatibilità tra le caratteristiche chimico-fisiche dei materiali di restauro e di conservazione e i materiali originari che compongono l'opera d'arte stessa. Quest'ultimi necessitano di trattamenti particolari, che abbiano lo scopo di evitare una rapida degradazione ma che concedano anche ai conservatori informazioni riguardo a processi di degradazione nelle fasi iniziali; si tratta quindi di un lavoro parallelo che controlla la degradazione delle opere d'arte e nello stesso momento crea dei materiali che possano garantire questo status.

Le 4 sfide di conservazione presentate sono:

- Pulizia delle superfici dipinte e plastiche delle opere d'arte contemporanea (CC1)
- Stabilizzazione delle tele e dei dipinti dell'arte contemporanea (CC2)
- Rimozione di materiali indesiderati nei materiali moderni (CC3)
- Miglioramento delle protezioni delle opere d'arte nei musei e negli spazi esterni (CC4)

CC1 - Pulizia delle superfici dipinte e plastiche delle opere d'arte contemporanea

Questa sezione del progetto si interessa principalmente della pulizia delle superfici delle opere d'arte contemporanee, spesso composte da pitture altamente viscosi, come le pitture acriliche, difficili da pulire.

Ciò che preoccupa maggiormente è la tendenza delle superfici di attirare materiale particellato, come per esempio la polvere, a causa delle sue proprietà elettrostatiche; il problema risulta avanzato nel momento in cui le particelle di polvere si depositano nel tempo tra i diversi livelli di pittura, e quindi risulta difficile la loro rimozione senza alterare le proprietà originarie della superficie. Inoltre, questo genere di superfici risultano sensibili all'abrasione su microscala e all'acqua e solventi.

Lo scopo finale quindi è trovare una tecnica non invasiva, tramite l'utilizzo di fluidi o gel possibilmente environmental-friendly

CC2 - Stabilizzazione delle tele e dei dipinti dell'arte contemporanea

Il focus principale di questa sezione è fronteggiare la degradazione delle tele.

L'acidità delle tele composte da materiali naturali, come per esempio la iuta, le porta a perdere nel tempo le proprietà meccaniche e a degradarsi in meno di 100 anni, richiedendo interventi costosi di conservazione. La degradazione della tela influenza molto la stabilità dello strato pittorico è quindi molto importante introdurre materiali e tecniche che possano garantire un rafforzamento delle tele stesse.

Un'altra sfida del progetto consta nel trovare soluzioni per il consolidamento di strati verniciati e di superfici plastiche, materiali molto usati nell'arte contemporanea.

L'invecchiamento di questi materiali, infatti, provoca la formazione di essudati e di sporco; in più, la continua perdita di materiale richiede continui interventi di stabilizzazione per evitare la formazione di fessurazioni. Questi problemi possono essere causati da tecniche di pittura non idonee, l'esposizione a basse temperature e sensibilità ai raggi UV.

CC3 - Rimozione di materiali indesiderati nei materiali moderni

La sfida che si pone questa sezione riguarda i materiali "indesiderati" che possono essere stati applicati sulle opere d'arte. Un esempio di materiale indesiderato è costituito dal nastro adesivo, a volte usato per riparare alcuni danni minori; questo materiale può cambiare nel tempo consistenza e colore, diventando sempre più viscoso e penetrando nel supporto.

I metodi attuali di rimozione prevedono sia l'uso di solventi sia metodi di aspirazione, che pur essendo efficienti, possono provocare la lacerazione del supporto cui è stato applicato il nastro adesivo. È necessario quindi trovare un metodo di rimozione che non comporti alcun tipo di modifica al manufatto.

Questo genere di sfida si interessa anche artefatti più antichi, come per esempio la rimozione di adesivi, acetati di cellulosa e PVC dalle pergamene e dalla carta; infatti, materiali come il PVC nel tempo possono trasudare plastificanti e acetato di cellulosa (che produce acido acetico), i quali possono degradare in maniera irreversibile il manufatto storico.

Per quanto riguarda l'arte contemporanea questo genere di sfida si concentra sulla rimozione di opere vandaliche (graffiti) sui murales esterni, sculture e monumenti e

risulta particolarmente esigente quando sono stati utilizzati colori acrilici, vinilici e alchilici.

CC4 - Miglioramento delle protezioni delle opere d'arte nei musei e negli spazi esterni

La sezione si concentra sulla conservazione dei prototipi rapidi (RP) che rappresentano una parte molto importante dei musei e delle collezioni. I materiali utilizzati in questo genere di opere d'arte sono materiali inorganici, come metalli e ceramiche, e materiali plastici e gommosi.

Sono opere molto complesse da preservare, vista la grande varietà di materiali utilizzabili, ma anche per le crescenti sperimentazioni degli artisti che apportano sulle opere in fase di post-produzione.

Gli inquinanti atmosferici provenienti dall'ambiente urbano o all'interno dei musei possono compromettere irreversibilmente lo stato di conservazione dei manufatti, provocando la formazione di composti reattivi come cloruri, ossi-cloruri, solfuri e solfati che possono aumentare il processo di erosione sulle superfici, soprattutto quelle metalliche.

La sfida sta nel ricercare delle tecniche di conservazione che permettano la protezione di questi manufatti in aggiunta a quelle già utilizzate nella tradizione.

2.2 Articolazione del Progetto

Il progetto, ai fini del raggiungimento degli obiettivi proposti e del conseguimento dei risultati prefissati dalle Conservation Challenges, è stato articolato in 8 Working Packages (WP):

- WP1 - management del progetto
- WP2 - sviluppo di nuovi strumenti per la pulizia
- WP3 - prodotti per il consolidamento e il rafforzamento delle strutture
- WP4 - prodotti per la protezione delle superfici
- WP5 - substrati nanostrutturati per il rilievo sensibile delle opere d'arte

- WP6 - caratterizzazione dei prodotti in termini di impatto ambientale e valutazione ecotossicologica di tutti componenti
- WP7 - scalabilità industriale e sfruttamento delle nuove tecnologie
- WP8 - divulgazione delle nuove tecnologie.

Nella seguente figura (Figura 2) sono rappresentati i vari WP del progetto in maniera schematica. Come si può notare i WP da 1 a 7 procedono per arrivare alla conclusione del WP8.

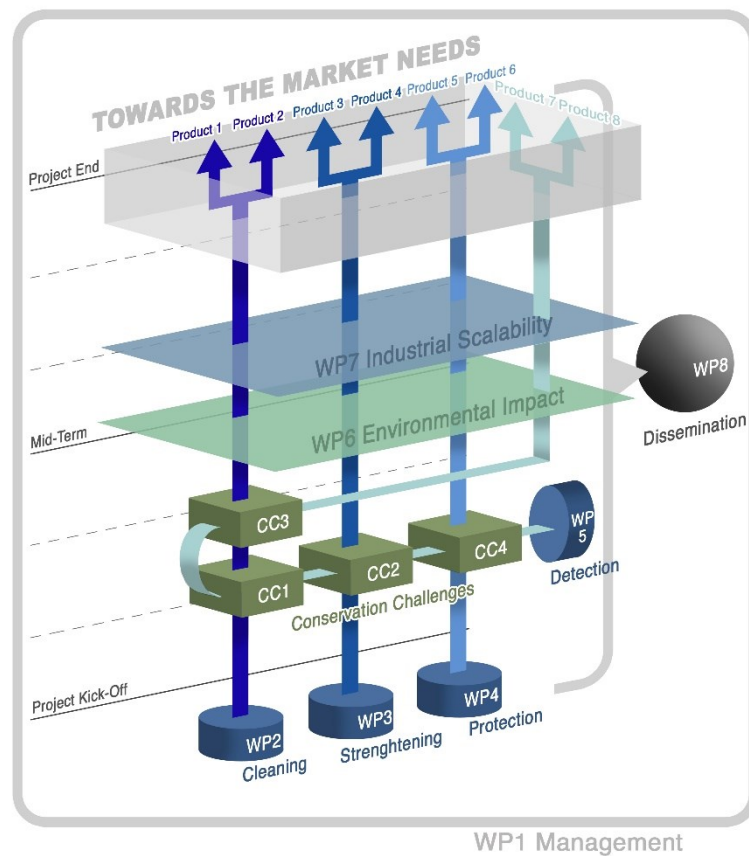


Figura 2 Schema dei Working Package all'interno del Progetto di NanoREstartART, fonte: sito ufficiale del progetto <http://www.nanorestart.eu/>

Questo elaborato si colloca all'interno del Work Package 6, che si interessa della valutazione di impatto ambientale.

2.3 La valutazione di impatto ambientale dei nuovi formulati prodotti nell'ambito di NANORESTART: l'approccio del WP6

Gli obiettivi principali del WP6, all'interno del progetto NANORESTART consistono nel:

- eseguire una valutazione di impatto ambientale delle più efficaci e promettenti tecnologie sviluppate nei WP2-5;
- identificare un set di indicatori per valutare la sostenibilità di queste tecnologie;
- sviluppare un approccio WoE (approccio multidisciplinare finalizzato all'analisi di rischio ecologico) che integri gli indicatori identificati per avere un'analisi di rischio generale dei prodotti.

Nell'ambito della valutazione di impatto ambientale il rischio è la probabilità che avvenga un effetto negativo sotto determinate condizioni; per evitare ciò è necessaria un'attenta valutazione che si incentri su tre differenti tipi di elementi:

- la sorgente, dalla quale l'effetto può nascere
- i percorsi di questo effetto
- i bersagli o scenari di esposizione a questo effetto

Tramite un'analisi di rischio di tipo sistematico possiamo prevedere le possibili conseguenze di un evento potenzialmente negativo sulla salute umana e sull'ambiente.

Il processo valutativo proposto dal progetto NANORESTART si focalizza su un approccio Safe by Design (SbD). Tale approccio rappresenta un metodo di gestione della sicurezza e della funzionalità dei materiali innovativi, tra cui quelli nanostrutturati, sin dalle prime fasi di ideazione del prodotto (Gottardo et al., 2016; Noorlander et al., 2016).

L'integrazione dell'approccio SbD all'interno del progetto NANORESTART offre un valido aiuto nella valutazione della sostenibilità dei prodotti, che risulta spesso lacunosa per quanto riguarda i nanomateriali di nuova produzione, anche nel contesto della conservazione delle opere d'arte. Il SbD può essere considerato una guida nella valutazione dei possibili impatti che possono essere generati dai formulati prodotti

nell'ambito di NANORESTART, che possa indirizzare i formulatori nelle prime fasi di sviluppo e di affinamento delle sostanze e miscele chimiche nanostrutturate. Questo approccio favorisce anche la comunicazione tra produttori e consumatori nella selezione dei prodotti più adeguati in modo che il loro uso sia sicuro e il più sostenibile possibile.

L'approccio SbD è stato introdotto nell'ambito della valutazione dell'impatto dei nanomateriali dal progetto NANoREG, in cui è stato adottato il modello Copper Stage Gate (Copper 1990; 2011) come base di elaborazione. Questo genere di modello si basa sull'uso schematico di stage o step (solitamente cinque) che rappresentano diverse attività del processo di valutazione.

Nel caso di NANORESTART, il processo valutativo adottato è stato suddiviso in 6 fasi:

- valutazione dello stato dell'arte: una "fase di proposta" in cui i formulatori hanno valutato le necessità dei restauratori e dei conservatori, ipotizzando nuove soluzioni per soddisfare le "conservation challenges";
- formulazione iniziale del prodotto: fase in cui sono stati elaborati i prodotti per la pulizia e la conservazione delle opere d'arte, tenendo in considerazione criteri tecnici, economici ed ecologici fondamentali per garantire il successo del prodotto sotto ogni punto di vista;
- valutazione dei rischi: valutazione preliminare, basata su pericoli e rischi dichiarati nelle schede di sicurezza relative agli ingredienti presenti nei nuovi formulati, eseguita in accordo con il Regolamento CE CLP (Classification, Labelling and Packaging);
- valutazione avanzata del rischio: valutazione ecotossicologica degli effetti tossici generati dai formulati nei confronti di indicatori acquatici, eseguita secondo una strategia di Intelligent (o Integrating) Testing Strategy (ITS);
- valutazione della sicurezza del prodotto: rappresenta la fase finale del processo di valutazione della sostenibilità, in cui sono integrate le informazioni ottenute nelle fasi precedenti, utilizzando un approccio semi-quantitativo.

Il presente lavoro di tesi si colloca nell'ambito della strategia ITS messa in atto nella fase di valutazione avanzata del pericolo, in particolare nella fase di valutazione degli

effetti acuti dei nuovi formulati nei confronti dell'ambiente acquatico; i risultati prodotti, inoltre, hanno consentito un confronto diretto tra dato sperimentale e classificazione dei formulati ottenuta secondo il Regolamento CLP nella fase di valutazione dei pericoli. Per meglio comprendere il background in cui si inserisce questo lavoro, di seguito si propone una descrizione più dettagliata delle fasi di valutazione e valutazione avanzata del rischio.

2.3.1 La valutazione del rischio: Autoclassificazione CLP

L'obiettivo di questa fase consiste nella valutazione del rischio posto in essere dai formulati proposti per la commercializzazione, sulla base delle informazioni note relativamente ai singoli ingredienti utilizzati. Questa valutazione prevede l'identificazione di pericoli secondo criteri fisici (PH), possibili pericoli per la salute umana (H) e per l'ambiente (ENV), ed infine il loro confronto con criteri definiti. Il CLP (Classification, Labelling, Packaging) è un regolamento comunitario (Reg. 1272/2008/EU) che prevede la classificazione dei prodotti chimici pericolosi e dei loro sub-prodotti in modo da rendere facilmente identificabili, anche agli utilizzatori finali, i potenziali rischi connessi al loro utilizzo.

Questo regolamento a partire dal 1 Giugno 2015 ha apportato delle modifiche alla direttiva DSD (67/548/CEE) sulle sostanze pericolose, a quella sui preparati pericolosi DPD (1999/45/CE) e risulta complementare al regolamento REACH (1907/2006). È un sistema di classificazione europeo ed è una norma che vincola tutti gli Stati membri in tutti i settori industriali.

Il regolamento CLP è stato emanato con la finalità di armonizzare il sistema di classificazione ed etichettatura con il sistema mondiale standardizzato GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals). Lo scopo principale del regolamento è definire se una sostanza chimica sia pericolosa: una volta identificate le sue caratteristiche potenzialmente dannose, queste proprietà devono essere comunicate dai produttori direttamente ai consumatori attraverso le etichettature dei prodotti stessi. In questo contesto, le imprese produttrici localizzate nell'Unione Europea, o che importano sostanze chimiche nell'Unione Europea, sono obbligate a classificare le sostanze che hanno immesso o che intendono immettere nel mercato; inoltre, devono informare l'European Chemicals Agency (ECHA) sia in merito ai risultati della classificazione sia dell'etichettatura, se queste operazioni non sono state eseguite in precedenza.

Il Regolamento CLP prevede tre fasi di definizione delle sostanze chimiche:

- la classificazione
- l'etichettatura
- l'imballaggio

La prima fase di "autoclassificazione" è lo step fondamentale del regolamento CLP, e permette di identificare se una sostanza presenta delle caratteristiche pericolose secondo diversi criteri. Questa fase dovrebbe essere applicata dalle aziende produttrici ed importatrici sulle nuove sostanze che intendono immettere nel mercato europeo.

Le fasi principali dell'autoclassificazione, sono:

- la raccolta dei dati e delle caratteristiche della sostanza (per esempio raccolta di dati tossicologici).
- il controllo della pertinenza delle informazioni rispetto ai criteri di classificazione del regolamento CLP.
- la decisione finale, che consiste nell'attribuire alla sostanza o miscela una categoria di pericolo che sono espresse nell'Annex I.

A valle di questo processo, le sostanze chimiche vengono ad una ad una classificate e inserite in una delle 4 categorie di pericoloso espresse dalla CLP:

- Pericolo chimico-fisico (PH)
- Pericolo per la salute umana (H)
- Pericolo per l'ambiente (ENV)
- Ulteriori pericoli

Le informazioni ottenute in questa prima fase devono essere segnalate agli attori presenti nella catena di approvvigionamento del prodotto, soprattutto i consumatori.

Nell'ambito del progetto NANORESTART per la classificazione del pericolo associato all'utilizzo delle formulazioni per la protezione, la pulizia ed il consolidamento delle opere d'arte sono state prese in considerazione diverse informazioni fornite dai produttori stessi:

- La lista di ingredienti presente nelle formulazioni
- Le schede di sicurezza fornite per ogni prodotto e/o ingrediente
- La percentuale di ciascuno nelle formulazioni iniziali

I risultati ottenuti nella valutazione di rischio, sono stati successivamente trasferiti ai produttori, allo scopo di informarli relativamente ad eventuali rischi specifici legati

alla formulazione dei preparati. Acquisite queste informazioni, i produttori possono valutare se e come intervenire per eliminare i rischi.

2.3.2 Valutazione avanzata del pericolo - Integrated Testing Strategy

Una valutazione tramite ITS si avvale di una serie di nodi decisionali che permettano la raccolta e l'analisi di dati inerenti alla classificazione di pericolo o di rischio di una sostanza chimica (Hengstler et al., 2006, Van Leeuwen et al., 2007).

Nella valutazione di pericolosità di nanomateriali una strategia a più livelli sembra essere il metodo migliore, per effettuare una valutazione attraverso una prima fase di test base fino ad arrivare a dei test più specifici (Oomen et al., 2014).

All'interno del progetto di NANORESTART, però, la percentuale di nanomateriali presenti nei formulati proposti dai produttori, è minima, quindi l'attenzione delle prove (eco)tossicologiche si concentra maggiormente sugli altri ingredienti presenti nei formulati, per la maggior parte solventi. Tuttavia non è possibile escludere a priori la tossicità dei nanomateriali durante il ciclo di vita del prodotto, infatti, è importante considerare la tossicità del reparto acquatico, serbatoio finale di qualsiasi sostanza chimica utilizzata dall'uomo.

Per il progetto NANORESTART è stata elaborata una valutazione ITS basata su tre livelli (Figura 3):

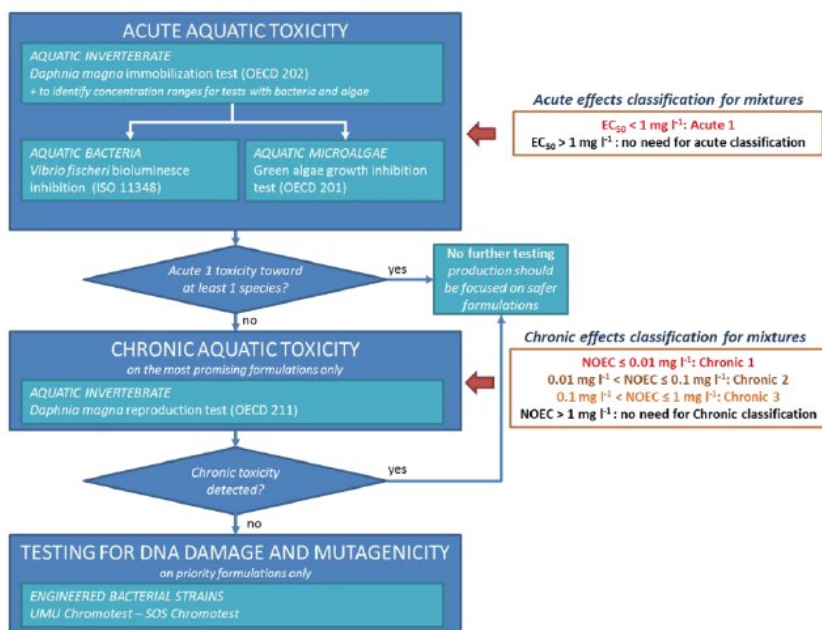


Figura 3 Integrated Testing Strategy adottata nel progetto NANORESTART

- Il 1° livello si concentra sulla valutazione della tossicità acuta utilizzando un set di test che comprendono specie indicatrici appropriate per descrivere l'intero ambiente acquatico. I test individuati per questo primo livello di valutazione sono tre: test acuto su *Daphnia magna* (OECD 202), test acuto su *Pseudokirchneriella subcapitata* (OECD 201) e test acuto Microtox© su *Vibrio fischeri* (ISO 11348). Tutti e tre i test vengono condotti per determinare la tossicità acuta delle sostanze e delle miscele applicando i criteri del regolamento CLP (ECHA, 2017). Il test Microtox© è stato aggiunto nel set di test per avere un ulteriore risultato di tossicità testando le sostanze sulla comunità microbica, un comparto chiave dell'ambiente acquatico non inclusa nel regolamento CLP. Nei tre test viene calcolare l'EC₅₀ di ciascuna sostanza e miscela, se l'EC₅₀ calcolato risulta minore di 1 mg l⁻¹ la sostanza viene valutata come acutamente tossica (Acute I), se invece la sostanza non risulta tossica (EC₅₀>1 mg l⁻¹) e se i formulatori la ritengono promettente per la futura commercializzazione, si procede nel livello 2;
- Nel 2° livello l'approccio ecotossicologico si concentra sugli effetti tossicologico a lunga durata (effetti cronici). Il test previsto in questo livello è unico ed si concentra sull'esposizione cronica della sostanza alla specie *D. magna*. Il test cronico è un test standard OECD (OECD 211) suggerito dal regolamento CLP e valuta l'inibizione della riproduzione del crostaceo cladocero durante un periodo di tempo di 21 giorni. Ciò che è possibile calcolare con questa tipologia di test è la NOEC (No Observed Effect Concentration) che esprime la massima concentrazione testata che indica un effetto. In accordo con il regolamento CLP, se il valore della NOEC si trova nel range 0.1-1 mg l⁻¹ la sostanza o miscela viene valutata Chronic 3; se si trova nel range 0.01-0.1 mg l⁻¹ viene classificata Chronic 2 e se è ≤1 mg l⁻¹ viene classificata come tossica Chronic 1 (la più alta classe di pericolosità). Se la NOEC è maggiore di 1 mg l⁻¹ la sostanza o miscela passa al terzo livello di valutazione.
- Nel 3° ed ultimo livello vengono applicati test più specifici per poter individuare informazioni non determinate nei precedenti due livelli. I test applicati in questo passaggio sono per esempio test di citossicità, test di danno genetico e di mutagenicità. I test proposti sono conformi allo standard internazionale ISO 13829 e prevedono l'utilizzo di due sistemi: umu e SOS-

Chromotest. Essi sono due sistemi a breve termine basati sulla rilevazione di lesioni del DNA indotte chimicamente e che potrebbero portare a delle mutazioni del DNA o nella risposta SOS (sistema di riparazione ad errori batterici). Questo genere di test forniscono informazioni di screening rapide anche sul potenziale genotossico per la valutazione del rischio umano ed ecologico.

Questo elaborato di tesi si inserisce nel primo livello di questa terza fase. Ciò che prevede questo primo livello è la raccolta e inferenza dei risultati di tre diversi test acuti di tossicità acquatica:

- Test acuto tramite l'utilizzo del crostaceo *D. magna*
- Test acuto tramite l'utilizzo della microalga *P. subcapitata*
- Test acuto sul batterio acquatico *A. fischeri*

I metodi per l'esecuzione dei test acuti ed i relativi risultati saranno approfonditamente trattati nei capitoli successivi.

2.4 Le nanotecnologie ed i nanomateriali

Preservare l'integrità dei manufatti artistici nel corso del tempo è un sfida periodica per conservatori e restauratori. Con questo scopo i ricercatori si sono spinti a investire su studi scientifici per identificare, caratterizzare e produrre nuovi materiali che possano aumentare il rendimento e la durata delle applicazioni e trattamenti di restauro. Materiali innovativi di grande interesse sono i nanomateriali, definiti anche prodotti nanostrutturati. Questi materiali rivoluzionari partecipano in modo sempre più attivo a un "business" in crescita esponenziale in diversi settori di attività come per esempio la medicina, l'ottica, la farmaceutica eccetera (Leter et al., 2014), nella Figura 4 sono mostrati i diversi campi in cui i nanomateriali vengono utilizzati.

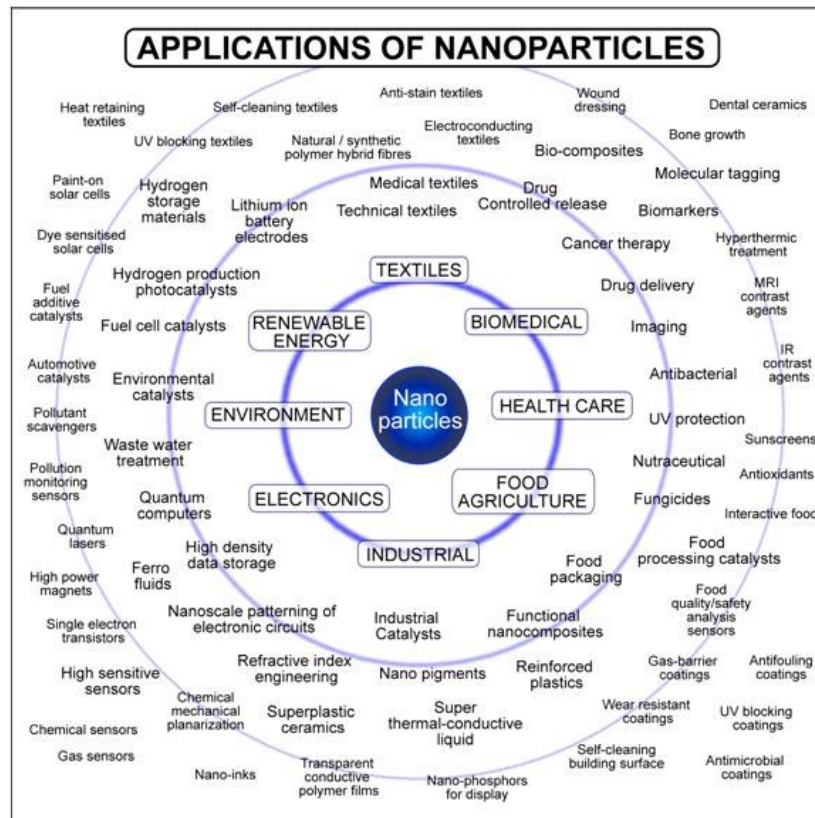


Figura 4. fonte: Tomberli L. , "Le nanoparticelle intossicano i nostri corpi", 2014

Il desiderio di produrre materiali innovativi che possano sostituire i prodotti di uso comune ha portato ad un aumento degli investimenti nel settore nanotecnologico, soprattutto nel continente europeo. In questo contesto si inserisce il progetto

NANORESTART, il quale stimola le aziende produttrici ad elaborare nuovi materiali, che includano le nanotecnologie, nel settore di conservazione delle opere d'arte contemporanee. La percentuale di concentrazione dei nanomateriali all'interno dei formulati sottoposti al controllo nel progetto, però, non sono molto alte.

Nonostante ciò non è stato escluso un attento controllo anche di questi materiali innovativi.

La conoscenza riguardo i nanomateriali, infatti, non è del tutto approfondita. Sorgono molte domande riguardo l'interazione dei nanomateriali con i sistemi biologici e la maggior parte di queste non ha ricevuto una risposta soddisfacente e chiara. Sono necessarie nuove ricerche scientifiche, che possano fornire maggiori informazioni riguardo, non solo alla loro composizione, destino e comportamento, ma anche alla loro tossicità nei confronti della salute umana e dell'ambientale (Klaime et al., 2008). In questo contesto è necessario affrontare scrupolosamente questi composti anche in ambito ecotossicologico, per indagarne gli effetti sui sistemi biologici *in toto*.

Ma cosa sono i nanomateriali?

La nomenclatura e la definizione in sé di questi composti è ancora confusa.

Primariamente il termine "nanomateriale" intende quel macrogruppo di materiali di piccola dimensione, più precisamente con almeno una dimensione minore di 100 nm.

All'interno di questo gruppo sono collocate:

- Le Nanoparticelle (NP), materiali che posseggono almeno una dimensione nel range 1-100 nm (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks, 2007) e possono essere sia di origine naturale che antropogenica. Nell'aria le NP possono essere considerate delle particelle ultra-fini, mentre nell'acqua e nel suolo sono simili ai colloidi ma con dimensioni differenti (Lead J.R., Wilkinson K.J., 2006).
- Le Engineered Nanoparticles (ENP), che rappresentano un particolare genere di nanoparticelle, progettate e prodotte industrialmente per il loro impiego in vernici, spray, prodotti cosmetici etc. (Walker C. H. et al., 2012). I materiali base che le compongono sono principalmente il diossido di titanio (TiO_2), l'argento (Ag), l'ossido di alluminio (Al_2O_3), l'ossido di zinco (ZnO), il carbonio, la cellulosa, sali ed idrossidi di calcio.

I nanomateriali possiedono caratteristiche chimico-fisiche peculiari, per questo motivo l'attenzione e lo studio di essi deve essere scrupoloso, con l'intento di

conoscerne i possibili rischi tossicologici. Il crescente sviluppo nella produzione di nanomateriali, infatti, ha suscitato un sempre maggior interesse nel conoscere ogni caratteristica nel loro rilascio e successivamente nei loro effetti. Questo genere di informazioni risulta necessario per le agenzie di regolazione (*regulatory agencies*) al fine di disciplinare la produzione e l'impiego di queste strutture (Klaine et al., 2008). Le caratteristiche evidenti dei nanomateriali sono:

- la loro piccola dimensione, che consente di non rispondere alle leggi della fisica classica;
- la loro aumentata reattività per la loro maggiore superficie reattiva disponibile (Figura 5).

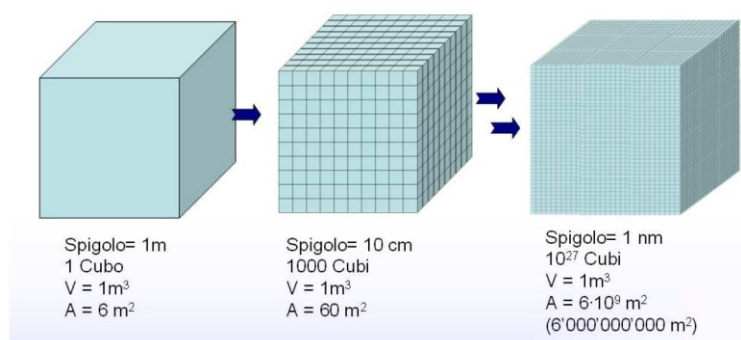


Figura 5. Comparazione di un materiale nelle diverse dimensioni, fonte: Progetto NANOCOAT

Un problema di grande importanza sussiste nell'uso delle normali metodiche di analisi tossicologica sui nanomateriali. È necessario infatti comprendere se le guide sperimentali utilizzate negli anni siano compatibili a questi materiali innovativi oltre a fornire dei risultati accurati e precisi. Questo ha spinto l'OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) ad identificare un gruppo di lavoro multidisciplinare con l'intento di identificare e approfondire possibili strategie di analisi dei nanocomposti.

Questo gruppo di lavoro multidisciplinare, definito Working Party on Manufactured Nanomaterials (WPMN, 2007) ha messo in evidenza le migliori misure di sicurezza nelle interazioni Bio-Nano e, tramite lo Sponsorship Programme, ha consentito di stilare una lista di nanomateriali, delle loro caratteristiche chimico-fisiche e del loro impatto sull'uomo e sull'ambiente. Questa base conoscitiva può essere affiancata al lavoro di sperimentazione e di ricerca per iniziare a definire gli effetti tossici dei nanomateriali nel loro intero ciclo di vita, dalla fabbricazione, al loro uso fino al loro smaltimento (OECD Working Party on Manufactured Nanomaterials, 2007).

Tuttavia, poiché i formulati proposti possiedono una bassa concentrazione di nanomateriali, queste raccomandazioni non sono pienamente pertinenti nell'ambito del progetto NANORESTART; la maggior parte degli ingredienti utilizzati, tra cui etanolo e benzotriazolo, si prestano a valutazioni di natura ecotossicologica più tradizionale, ed è stato effettivamente questo ad essere stato seguito.

2.4.1 Problemi dei nanomateriali

La nanotecnologia ricopre tutti i settori attorno a noi, possiamo trovare nanoparticelle negli alimenti che consumiamo ogni giorno, nei cosmetici che utilizziamo e persino nei medicinali che assumiamo. Per esempio, il diossido di titanio è ampiamente usato nel campo cosmetico come additivo delle creme solari, dando caratteristiche trasparenti sulla pelle; nanoparticelle di argento, invece, sono utilizzate nell'abbigliamento sportivo per impedire la formazione di batteri e nanofibre di carbonio si trovano come rinforzo nei pneumatici (Lempa et al., 2010).

L'uso dei nanomateriali nel corso degli anni ha portato a crescente preoccupazione riguardo i potenziali effetti tossici che questi possono generare, principalmente sulla salute umana, ma anche sull'ambiente ed in particolare sull'ambiente acquatico, che rappresenta il compartimento di accumulo finale di tutti i contaminanti introdotti nella biosfera.

Secondo un articolo di un gruppo di ricercatori della DePaul University e pubblicato su Project Censored (Ottobre 2010), la nanotecnologia mette a serio rischio la salute umana se non utilizzata con attenti controlli. Né è un esempio l'articolo pubblicato su European Respiratory Journal da Yuguo Song e il suo gruppo di ricerca, nel quale si riportano i problemi di salute causati a dei lavoratori che sono stati a stretto contatto con vernici contenenti nanomateriali. Le conseguenze si sono manifestate con gravi problemi polmonari ed eruzioni cutanee sul viso e sulle braccia, portando addirittura alla morte di due persone (Song et al., 2009).

Ulteriori studi condotti da Patrick Case, ricercatore e patologista del Southmead Hospital a Bristol, hanno contribuito a diffondere il termine "*toxic gossip*" riferito alla tossicità delle nanoparticelle metallifere che danneggiano il DNA umano. Questo termine ha sancito un collegamento diretto tra problemi di salute e il contatto umano con le nanoparticelle (Raloff, 2009).

Tra le particelle nanostrutturate che mostrano maggiore preoccupazione vi sono:

- argento, che principalmente causano tossicità agli organismi acquatici sia di acqua dolce che salata. Il loro contenuto nei corsi d'acqua è aumentato nel corso del tempo destando maggiore preoccupazione.
- nanofibre di carbonio, che vengono utilizzate in prodotti che permettono un contatto per inalazione causando problemi polmonari.
- buckyballs, che sono delle strutture a base di carbonio con una forma simile a un pallone da calcio, la loro dimensione permette loro di essere assimilate da organismi semplici come le piante, intaccando la catena trofica dalla base.

Il progressivo aumento delle applicazioni a base di prodotti "nano" ed il conseguente aumento della loro dispersione in ambiente ha portato a considerare le "nanoparticles" come contaminanti ambientali emergenti (Manzo et. al, 2013). Particolare interesse è stato dedicato agli effetti delle nanoparticelle l'ambiente acquatico, principale corpo recettore dei contaminanti e probabile sink finale dei prodotti sintetici. Infatti, la potenziale dispersione delle nanotecnologie nell'ambiente marino, potrebbe comportare rischi per l'intero biota (Hanna et al., 2013). Negli ultimi anni sono stati effettuati svariati studi riguardo la nanoparticelle a contatto con il comparto acquatico, anche se questi risultano nel complesso frammentari e difficilmente confrontabili tra essi. Inoltre, la maggior parte di essi si interessa alle acque dolci (Corsi et al., 2014; Libralato et al., Lofrano et al., 2016; Minetto et al., 2016; Vale et al., 2016).

Sono stati molto studiati gli effetti di nanoparticelle di argento nei confronti di diverse specie di alghe e sono stati riscontrati degli effetti simili, per esempio l'esposizione a piccole concentrazioni di esse causano inibizione della crescita algale, un decremento nel contenuto di clorofilla e della viabilità delle cellule in molte specie di alghe verdi e in minor misura di diatomee (Oukarroum et al., 2012; Burchardt et al., 2012; Miao et al., 2009). Sono stati analizzati anche gli effetti provocati da piccole concentrazioni di nanoparticelle di oro (1.67 mg l^{-1}) nei confronti dei batteri *A. fischeri*, ciò che è scaturito dall'analisi è un'elevata tossicità (EC_{50} di 0.561 mg l^{-1}) dopo solo 5 minuti di esposizione (Lopes et al., 2012).

Nonostante tutti gli sforzi profusi dalla ricerca negli ultimi anni, la conoscenza riguardante le nanoparticelle, il loro comportamento ambientale e la loro tossicità

rimane ancora lacunosa; per questo motivo sono sempre più numerosi gli studi e i progetti finalizzati ad analizzare il corso di vita di materiali nanostrutturati in diversi campi, ad integrare la lista degli studi già effettuati.

NANORESTART si colloca tra questi progetti che intendono valutare immissioni ed effetti delle nanostrutture prima che queste siano introdotte nel mercato.

3. Test di tossicità

La capacità di una sostanza o miscela a determinare effetti negativi nei confronti di un organismo con cui entra in contatto viene definita tossicità.

Tali effetti possono essere di diversa natura e dipendono da molteplici fattori:

- Caratteristiche chimico-fisiche del contaminante e la quantità dello stesso che entra a contatto con l'organismo
- Caratteristiche dell'ambiente in cui avviene il contatto e condizioni di esposizione, come la frequenza e la durata
- Organismo target

Procedura base per valutare la tossicità di un composto è l'esecuzione di saggi o test in laboratorio o in campo. Questi test sono condotti per valutare la natura e il grado degli effetti negativi che le sostanze chimiche possono indurre su di un organismo (Peshin et al., 1998) e prevedono un'esposizione controllata degli organismi a quantità note della sostanza tossica; le risposte ottenute (mortalità, inibizione della crescita o di attività enzimatiche) indicano l'effetto negativo generato dal contaminante sulle funzioni vitali dell'organismo con cui è giunto a contatto. Esistono diversi tipi di test di tossicità e la scelta di quale metodo utilizzare (o meglio, di quali metodi) dipende da molteplici fattori, tra cui assumono particolare rilievo:

- il tipo di contaminante o sostanza tossica;
- il settore in cui essa viene utilizzata;
- l'ambiente di rilascio, ovvero i comparti che sono principalmente interessati dal rilascio.

È importante sottolineare che in tutti i settori in cui vengono utilizzate sostanze chimiche tossiche e non, hanno come corpo recettore finale l'ambiente acquatico ed in ultima istanza l'ambiente marino.

I test o saggi di tossicità su sostanze pure possono essere raggruppati in tre diverse categorie, a seconda della durata di esposizione e delle concentrazioni utilizzate:

- Test acuti, che presuppongono esposizione ad elevate concentrazioni per breve tempo (generalmente < 96-h), e generalmente hanno come endpoint la mortalità e l'inibizione di reazione enzimatiche;
- Test subcronici, che presuppongono l'esposizione delle early-life stages, ovvero delle fasi più sensibili dello sviluppo di un organismo, in cui si misurano eventuali ritardi/malformazioni successive all'esposizione al tossico;
- Test cronici, rappresentativi di esposizione per lungo periodo a basse concentrazioni (condizione maggiormente rilevante dal punto di vista ecologico), in cui si misurano effetti su crescita e capacità riproduttiva.

Tra i vari metodi proposti dalla comunità scientifica, i **test acuti** risultano quelli di gran lunga maggiormente utilizzati per la loro semplicità e riproducibilità, i brevi tempi di risposta ed i costi generalmente contenuti, soprattutto in confronto con i test cronici, maggiormente impegnativi dal punto di vista dello sforzo lavoro e dei costi, anche se maggiormente rappresentativi per l'ambiente e più rilevanti anche in termini di gestione e conservazione.

Punto fondamentale affinché le risposte dei test siano affidabili e significative è costituito dalla scelta degli indicatori biologici da utilizzare. Un buon indicatore deve permettere di ottenere dei risultati adeguati e il più accurati possibili per estrapolare diversi tipi informazioni. La scelta degli indicatori più idonei deve guidata da alcuni principi fondamentali tra cui:

- il tipo di ambiente nel quale il contaminante viene rilasciato (ambiente acquatico, ambiente marino, costiero, etc.);
- il tipo di contaminazione (dose/concentrazione del contaminante, tipo di contaminante, caratteristiche chimico-fisiche del contaminante);
- le finalità dell'indagine.

Le caratteristiche fondamentali affinché un indicatore fornisca delle risposte adeguate agli obiettivi dello studio devono essere le seguenti:

- rilevanza ecologica per il corpo recettore e l'ambiente di studio, che è la caratteristica più importante nell'impiego di un indicatore in un test;

- semplicità nel mantenimento in laboratorio, per favorire l'impiego routinario del test;
- sensibilità ad un vasto range di contaminanti;
- capacità di produrre risposte rapide, precise e facilmente quantificabili;
- breve ciclo vitale in modo da poter effettuare non solo test acuti, ma anche saggi che coinvolgano l'intero ciclo vitale dell'organismo.

Tuttavia, difficilmente un singolo indicatore risponde a tutte le esigenze di uno studio, quindi diventa fondamentale fare ricorso ad una batteria di saggi ecotossicologici, che siano in grado di fornire indicazioni riguardo agli effetti che un contaminante può esercitare sulla comunità biologica, utilizzando diversi indicatori corrispondenti a diverse vie di esposizione, diversi livelli di complessità biologica e diverse nicchie ecologiche.

L'utilizzo dei test di tossicità (ed, implicitamente, il ricorso a batterie di saggi) per la valutazione delle sostanze chimiche presenti in commercio è stato introdotto nella normativa europea dal Regolamento REACH, che rimanda ai protocolli OECD per la scelta dei metodi e degli indicatori più idonei. Il regolamento CLP, pur non fornendo indicazioni precise sui metodi da adottare, suggerisce di far ricorso ad alcune macrocategorie di indicatori per definire la tossicità di sostanze e miscele, sia per quanto concerne la tossicità acuta (crostacei, pesci e microalghe), sia per la tossicità cronica (crostacei e pesci).

I metodi utilizzati in questo lavoro sperimentale sono stati selezionati in accordo con quanto previsto dalle citate normative europee (cfr. 2.3.2- Valutazione avanzata del pericolo - Integrated Testing Strategy, Tier I). Di seguito se ne descrivono le caratteristiche e le modalità di esecuzione.

3.1 Metodi di valutazione della tossicità con test acuto su *Daphnia magna*

3.1.1 Generalità

Il test di immobilizzazione (o di mortalità) con *Daphnia magna* è uno dei test maggiormente impiegati per la valutazione delle sostanze chimiche immesse nell'ambiente e sono disponibili numerosi protocolli standard e linee guida a livello nazionale (APAT-IRSA) ed internazionale (ISO, OECD, USEPA).

In accordo con quanto previsto dal regolamento REACH per l'analisi delle sostanze chimiche destinate alla commercializzazione, l'esecuzione del saggio di immobilità finalizzato alla valutazione dei formulati prodotti nell'ambito di NANORESTART è stata eseguita utilizzando il protocollo proposto da OECD (Guideline 202, OECD, 2004).

Al momento della sua prima formulazione, nel 1984, la linea guida OECD prevedeva due distinte modalità di applicazione:

- Un test acuto della durata di 24 ore con immobilizzazione come endpoint;
- Un test cronico della durata minima di 14 giorni con la riproduzione come endpoint;

Nelle successive revisione le due modalità operative sono state rese indipendenti e a ciascuna di esse è stata dedicata una linea guida: il test acuto è rimasto di competenza della OECD 201, mentre al test cronico di riproduzione è stata dedicata una guida *ex novo* (OECD 211).

3.1.2 La specie test

Il test acuto di immobilizzazione con crostacei secondo la linea guida OECD 202 prevede l'impiego di crostacei cladoceri, tra i quali la specie *D. magna* (Figura 6) risulta essere quella maggiormente utilizzata.

Questo crostaceo presenta dimensioni di circa 2-3 mm. Il corpo è compresso lateralmente, è avvolto da un carapace bivalve ed è diviso in 4



Figura 6 Immagine di un individuo di *Daphnia magna*, fonte: <https://fineartamerica.com/featured/water-flea-daphnia-magna-ted-kinsman.html>

parti: corpo, torace, addome e post-addome.

Il tempo di vita medio di un individuo è di circa quattro mesi ed esso si alimenta principalmente per filtrazione di alghe, batteri e detriti. Presenta dimorfismo sessuale la sua riproduzione può essere di due tipologie:

- riproduzione partenogenica, che prevede la nascita di juveniles (cloni delle madri);
- riproduzione anfigonica con produzione di uova durature in efippi, che si manifesta quando sopraggiungono situazioni di stress ambientale.

Gli individui di *D. magna* utilizzati per questo test sono quelli più giovani, di età inferiore a 24 ore, in modo da ridurre la variabilità della risposta legata alle diverse classi di età; è importante, inoltre, che gli individui utilizzati non siano appartenenti alla prima generazione di prole dei genitori partenogenetici, in quanto potrebbero manifestarsi dei problemi di variabilità di risposta ai contaminanti. Per ottenere i giovani di *D. magna* in quantità sufficiente e ottimizzare le attività sperimentali è necessario mantenere una coltura in laboratorio; tale coltura deve essere conservata in condizioni idonee e salutari in modo da evitare la comparsa di situazioni di stress, che possano portare ad elevati tassi di mortalità degli adulti e dei giovani.

3.1.3 Esecuzione del test

Il test consiste nell'esposizione degli individui di età < 24-h selezionati a diverse concentrazioni della sostanza chimica da analizzare e ad un controllo negativo con la sola acqua di diluizione, per un tempo predeterminato di 48 ore. L'immobilizzazione degli individui è controllata e valutata dopo 24 ore dall'inizio del test e dopo 48 ore, quando il test si conclude. Il numero di individui immobili riscontrato a ciascuna concentrazione e nel controllo è successivamente utilizzato per calcolare l'EC₅₀ (concentrazione che causa l'immobilizzazione del 50% degli individui testati) a 48 ore e a 24 ore (risultato opzionale).

Il test su nuovi materiali e sostanze pure solitamente si esegue in due distinte fasi:

- nella prima fase viene effettuato un test preliminare definito "range finding test" per determinare l'ordine di grandezza dell'EC₅₀ o, quantomeno, per identificare un range di concentrazioni più precise che mostrano un effetto sulla specie indicatrice;

- nella seconda parte, utilizzando le informazioni ricavate dal test preliminare, si effettua il test definitivo da cui si ricava una EC₅₀ più precisa e definitiva.

È importante che il test venga effettuato in contenitori idonei; i materiali più indicati sono il vetro ed altri materiali chimicamente inerti. Solitamente i contenitori utilizzati sono provette di vetro e beaker, che devono essere lavati accuratamente prima dell'inizio del test, secondo le procedure di QA/QC interne al laboratorio. Durante il test è inoltre necessario che i contenitori siano ben coperti, per evitare l'evaporazione del prodotto chimico, per ridurre la perdita di acqua e impedire l'entrata di polveri nella soluzione di analisi.

Nel caso dei campioni relativi al progetto NANORESTART, i test sono stati svolti tramite l'utilizzo di piastre da 6 pozzetti in polistirene (Figura 7) dove sono stati inseriti 5 individui di *D. magna* in 4 pozzetti (un pozzetto è stato lasciato volontariamente vuoto, mentre il restante è stato utilizzato come pozzetto di

diluizione nell'inserire gli individui).



Figura 7 Piastra da sei pozzetti

Gli individui durante il corso del test devono essere mantenuti nelle stesse condizioni di temperatura e luce dell'allevamento; nel caso fosse necessario cambiare le condizioni (temperatura diversa o modifiche nella composizione del medium rispetto a quello di allevamento) si rende necessario effettuare un test preliminare per valutare la risposta di *D. magna* alle nuove condizioni test.

Il medium in cui sono allevati gli individui di *D. magna*, utilizzato come acqua di diluizione e controllo negativo, deve avere delle caratteristiche idonee, che permettano il mantenimento della specie sia nella fase di coltura sia nella fase del test. Le caratteristiche che il medium deve avere sono sintetizzate nell'Annex 2 presente nella guida OECD 202, qui di seguito riportata (Tab.1).

Parametro	Concentrazione
Materiale particolato	<20 mg/L
Carbonio organico totale	< 2 mg/L
Ammoniaca libera	< 1µg/L
Cloro residuo	< 50 ng/L
Totale pesticidi organofosforici	< 50 ng/L
Totale pesticidi organoclorinici più policlorobifenile	< 50 ng/L
Cloro organico totale	< 25 ng/L

Tabella 1 Caratteristiche accettabili del medium per effettuare il test acuto di immobilità, fonte: OECD 202, Annex 2, 2004, modificata.

La temperatura di incubazione durante il test deve mantenersi entro il range di 18-22 °C, e un ciclo di 16 ore di luce e 8 di buio è raccomandato per questa tipologia di test.

3.1.4 Materiali necessari per l'esecuzione del test

I materiali necessari per l'esecuzione del test acuto di immobilizzazione con *D. magna* sono:

- beaker in vetro per la distribuzione delle soluzioni test
- piastre da 6 pozzetti in polistirene da utilizzare come camere-test
- medium con idonea composizione mineralogica per la sopravvivenza e la riproduzione di *D. magna*
- pipette Pasteur
- luce fredda per l'identificazione degli individui e valutazione della mobilità;

Il medium utilizzato inizialmente per la conservazione degli individui di *D. magna* è un'acqua sintetica preparata secondo le indicazioni della U.S. Environmental Protection Agency (USEPA), ottenuta aggiungendo ad acqua bidistillata 4 sali fino ad ottenere le seguenti concentrazioni:

- NaHCO₃ (192 mg l⁻¹)
- CaSO₄·2H₂O (120 mg l⁻¹)
- MgSO₄ ·7H₂O (246 mg l⁻¹)
- KCl (8 mg l⁻¹)

Tuttavia l'utilizzo di questo medium (hard water EPA medium), seppur idoneo per l'esecuzione del saggio (risposte nel controllo nella norma), non ha portato a buoni risultati per quanto concerne la riproduzione degli adulti; infatti, la produzione di giovani di *D. magna* era molto scarsa e spesso la produttività degli adulti calava drasticamente già dopo la produzione della seconda generazione.

Per questo motivo si è fatto ricorso ad un medium più complesso, ma che maggiormente si adatta al mantenimento per lungo tempo delle colture. La soluzione è stata trovata nell'utilizzo del Medium Elenndt M4 (1990), la cui composizione e procedura di preparazione è riportata nell'Annex 3 della linea guida OECD 202.

Nel dettaglio, la preparazione di questo medium prevede diverse fasi:

- preparazione delle soluzioni Stock 1
- preparazione dello Stock 2
- preparazione della soluzione composta da vitamine
- preparazione finale del medium M4 con l'unione delle fasi precedenti (Stock 1 + Stock 2 + vitamine)

La preparazione delle soluzioni Stock 1 prevede la predisposizione di diverse soluzioni (a concentrazione predeterminate) di micronutrienti in traccia, che sono la base per la costituzione di una soluzione di micronutrienti mista detta Stock 2 (Tab.2 e Tab.3).

Soluzione	Stock 1	Concentrazione (g/L)
1	H ₃ BO ₃	33.6
2	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.728
3	LiCl	0.61
4	RbCl	0.203
5	SrCl ₂ ·6H ₂ O	3.04
6	NaBr	0.32
7	Na ₂ Mo ₂ O ₄ ·2H ₂ O	0.126
8	CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.034
9	ZnCl ₂	0.104
10	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.08
11	KI	0.027

12	Na ₂ SeO ₃	0.018
13	NH ₄ VO ₃	0.005
14*	Na-EDTA	5.00
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	1.991

Tabella 2 Soluzioni per la preparazione dello Stock 1.

* La preparazione di Na-EDTA e FeSO₄·7H₂O avviene separatamente e immediatamente miscelate e autoclavate

Soluzione Stock 1		Concentrazione nello Stock 2 (ml/L)
1	H ₃ BO ₃	1.7
2	MnCl ₂ ·4H ₂ O	10
3	LiCl	10
4	RbCl	7
5	SrCl ₂ ·6H ₂ O	1
6	NaBr	1
7	Na ₂ Mo ₂ O ₄ ·2H ₂ O	10
8	CuCl ₂ ·2H ₂ O	10
9	ZnCl ₂	2.5
10	CoCl ₂ ·6H ₂ O	2.5
11	KI	2.4
12	Na ₂ SeO ₃	2.4
13	NH ₄ VO ₃	2.4
14*	Na-EDTA	20
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	

Tabella 3 Concentrazione delle soluzioni per la preparazione dello Stock 2

La preparazione della soluzione di vitamine, invece prevede (Tab.4):

Vitamina	Concentrazione (g/L)	ml/L di Stock 2
Tiamina (B ₁)	0.75	1.7
Cianocobalamina (B ₁₂)	0.01	10
Biotina (B ₇)	0.008	10

Tabella 4 Concentrazioni per la preparazione della soluzione di vitamine, concentrazione per costituire lo Stock 2

Una volta prodotti lo Stock 2 e la soluzione di vitamine è possibile preparare il Medium M4 (Tab.5).

	Soluzione	ml/L per M4
1	Stock II	50
2	CaCl ₂ ·2H ₂ O	1
3	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5
4	KCl	0.1
5	NaHCO ₃	1
6	Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	0.2
7	NaNO ₃	0.1
8	KH ₂ PO ₄	0.1
9	K ₂ HPO ₄	0.1
10	Vitamine	0.1

Tabella 5 Concentrazioni per la preparazione del Medium M4

3.1.5 Allevamento e mantenimento delle colture

Il mantenimento delle colture di *D.magna* è stato effettuato all'interno di beaker da 3L (circa 1,5-2 L di Medium M4), nel quale sono introdotti dai 30 ai 40 individui adulti. I beaker sono stati mantenuti a una temperatura di circa 20 °C e in condizioni di fotoperiodo 16:8 luce:buio all'interno di una cella termostatica del Laboratorio di Ecotossicologia dell'Università Ca Foscari di Venezia.

Il medium è stato rinnovato tre/quattro volte a settimana seguendo questa procedura:

- trasferimento di circa 30 adulti dalla coltura in una piastra temporanea riempita con il medium M4
- scarto degli individui rimanenti
- pulizia del contenitore
- riempimento del contenitore di circa 1,5/2 L di medium M4
- inserimento dei 30 individui adulti isolati precedentemente
- somministrazione del cibo

Il cibo somministrato consiste in una soluzione di coltura algale di *Pseudokirchneriella subcapitata* concentrata (il metodo di preparazione del medium di questa microalga verrà spiegato nel prossimo paragrafo).

Ogni 5/6 settimane l'allevamento è stato rinnovato, isolando 30 individui adulti ed inserendoli in un nuovo beaker da 3 L, seguendo le indicazioni precedenti.

3.1.6 Elaborazione dati

I dati di immobilizzazione sono stati raccolti dopo 24 ore dall'inizio del test, annotando gli individui immobili (ovvero morti) rispetto agli individui iniziali; gli stessi dati sono stati raccolti dopo 48 ore.

Al termine del test i dati sono stati elaborati tramite il metodo Trimmed Spearman-Kärber per calcolare l'EC₅₀ di ogni formulato sottoposto al test.

3.1.7 Procedura QA/QC

I test acuti sono stati eseguiti seguendo una procedura QA/QC finalizzata alla valutazione della sensibilità dei bioindicatori e del corretto funzionamento e pulizia dell'apparecchiatura utilizzata. Per il test acuto con *D. magna* questa procedura prevede:

- L'implementazione di un controllo positivo con il rame (Cu) come tossico di riferimento per ciascuna delle colture utilizzate durante il periodo sperimentale;
- L'implementazione di un controllo negativo con la sola acqua di diluizione per ciascuna sessione di test.

I criteri accettabili sono la sopravvivenza del 90% o più *D. magna* nel controllo negativo e l'ottenimento di un'EC₅₀ per il rame nel range 50-110 µg l⁻¹.

3.2 Metodo di valutazione della tossicità con test acuto su

Pseudokirchneriella subcapitata

3.2.1 Generalità

Il test acuto con microalghe è stato eseguito secondo la linea guida OECD 201, pubblicata per la prima volta nel 1984 e rivista nel 2002, al fine di aggiornare la procedura alle più recenti innovazioni introdotte nei test algali.

Il test proposto da queste linee guida consiste nella stima dell'inibizione della crescita algale conseguente all'esposizione a elementi o sostanze chimiche. La durata del test è di 72 ore. Il test consiste nella valutazione della eventuale diminuzione della crescita algale in una serie di colture esposte a diverse concentrazioni della sostanza chimica da saggiare. Questa risposta viene successivamente confrontata con la crescita media ottenuta in un campione di controllo (contenente il solo medium di crescita).

Endpoint di questo test è l'inibizione del tasso di crescita, espressa come il logaritmo di crescita della densità algale durante il periodo di esposizione.

Le informazioni che possono essere ricavate da questa tipologia di test sono:

- EC₅₀, ovvero la concentrazione che determina la riduzione del 50% del tasso di crescita;
- LOEC, ovvero la più bassa concentrazione tra quelle saggiate a cui si osserva una riduzione del tasso di crescita;
- NOEC, ovvero la più alta concentrazione tra quelle saggiate, a cui non si manifestano effetti significativi sul tasso di crescita;

I contenitori per il test devono essere di un materiale adeguato; solitamente vengono preferiti il vetro o materiali chimicamente inerti; per questa tipologia di test il contenitore deve offrire una superficie specifica minima di 0.15 cm²/ml.

Vista la sensibilità dell'endpoint considerato al variare delle condizioni al contorno, è di fondamentale importanza mantenere uno stretto controllo di temperatura e luminosità. Per questi motivi, per l'esecuzione del saggio si utilizzano celle termostatiche o incubatori all'interno dei quali la temperatura deve essere mantenuta entro un range di 20 ± 2 °C in condizioni di luminosità pressoché costante su tutta la superficie occupata dalle piastre o dalle beute utilizzate per il test.

La densità delle colture algali viene determinata mediante conteggio al microscopio utilizzando una camera di conta (camera di Bürker o analoga).

3.2.2 Le specie test

Il test di crescita algale è un tipo di saggio che consente l'utilizzo di diverse specie di alghe, appartenenti a diversi gruppi sistematici. Le specie ritenute più adeguate nelle linee guida OECD 201 sono le seguenti:

- *Pseudokirchneriella subcapitata* (alga verde in precedenza nota conosciuta come *Selenastrum capricornutum*)
- *Navicula pelliculosa* (diatomea)
- *Anabaena flos-aquae* (cianobatterio)
- *Synechococcus leopoldensis* (cianobatterio)

Ai fini della sperimentazione nell'ambito del progetto NANORESTART la specie indicatrice selezionata per il primo step della procedura di valutazione ecotossicologica è la cloroficea *P. subcapitata* (Korshikov, Hindák, 1990). Questa specie di alga verde presenta delle caratteristiche morfologiche peculiari: la forma



delle sue cellule è simile a quella di una falce e si presenta sempre in forma solitaria (Figura 8). La sua lunghezza è di circa 8-14 μm ed è un valido indicatore ecotossicologico, essendo sensibile alla presenza di metalli e altre sostanze tossiche (Passarelli et al., 2005).

Figura 8 Cellule della specie algale *P. subcapitata*,
fonte:<http://algalweb.net>

3.2.3 Esecuzione del test

L'inizio del test coincide con l'inoculo di una aliquota di *P. subcapitata* (5×10^4 cellule/ml) in fase di crescita esponenziale in ciascuno dei pozzetti contenenti le soluzioni da saggiare ed il controllo negativo.

L'inoculo algale è stato preparato a partire da una coltura di mantenimento in fase di crescita esponenziale, che viene periodicamente rinnovata nel laboratorio di Ecotossicologia del DAIS per avere sempre dei cloni algali pronti per l'esecuzione dei saggi.

I test acuti, svolti nel progetto NANORESTART, sono stati effettuati in triplicato su 6 diluizioni seriali del campione (a partire da una concentrazione di 1000 mg l⁻¹) ottenuti diluendo il campione con il medium di crescita. Le concentrazioni ottenute sono state distribuite in piastre sterili da 24 pozzetti (Figura 9) in ognuno delle quali sono stati inoculati:

- 3 ml di soluzione da testare
- 0.15 ml di soluzione di macronutrienti (preparati secondo la norma ISO 10253)
- aliquota di coltura algale (5×10^4 cell ml⁻¹)



Figura 9 Piastra da 24 pozzetti

Per ogni test è stata allestita una piastra di controllo (solo acqua di diluizione) per un successivo confronto nella parte di elaborazione dei dati.

Come nel caso di *D. magna*, i test sono stati effettuati in due fasi:

- nella prima fase sono stati eseguiti dei test preliminari (range-finding) utilizzando un ampio range di concentrazioni (0.1 - 1000 mg l⁻¹);
- nella seconda fase, invece, sono stati effettuati test definitivi con concentrazioni della sostanza chimica più ravvicinate, finalizzate al calcolo di una EC₅₀ più precisa;

Nella fase di incubazione (72-h), le piastre del test sono state sigillate per evitare la fuoriuscita di aria e, in accordo con quanto prevista dalle linee guida OECD, sono state mantenute in una camera climatica ad una temperatura 20 ± 2 °C ed in condizioni di illuminazione continua e costante (6000 lux).

Al termine delle 72 ore il test è stato fissato aggiungendo una goccia di formaldeide tamponata al 4% in ciascun pozzetto per poi procedere al conteggio al microscopio, tramite microscopio rovesciato e camera di conta di Bürker.

3.2.4 Materiali per l'esecuzione del test

I materiali necessari all'esecuzione del saggio sono i seguenti:

- Beaker in vetro da 50 e 100 ml per la preparazione delle soluzioni
- pipette Pasteur
- Piastre da 24 pozzetti in polistirene con coperchio
- Medium di crescita
- Microscopio ottico per il conteggio algale
- Camera di Burker

I medium adeguati nell'esecuzione di test sono riportati nell'Annex 3 delle linee guida OECD 201 (OECD 2002). I medium proposti sono di due tipologie:

- Medium OECD TG 201 in accordo allo standard ISO 8692
- Medium AAP dell'EPA (EPA 1971) in accordo con ASTM (1998)

Nella sperimentazione e valutazione dei formulati del progetto NANORESTART il medium optato per la crescita della coltura algale di *P. subcapitata* è il medium OECD TG 201 e la sua preparazione prevede la diluizione delle sostanze riportate nella seguente tabella (Tab.6) in un litro di acqua deionizzata:

Stock	Nutriente	Concentrazione mg/L in Stock	mL/L di acqua
1-Macronutrienti	NH ₄ Cl	1500	10
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	1200	
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	1800	
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1500	
	K ₂ HPO ₄	160	
2-Fe-EDTA	FeCl ₃ ·6H ₂ O	64	1
	Na ₂ -EDTA·2H ₂ O	100	
3-micronutrienti	H ₃ BO ₃	185	1
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	415	
	ZnCl ₂	3	
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	1.5	
	CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.01	
	Na ₂ Mo ₂ O ₄ ·2H ₂ O	7	
4-NaHCO ₃	4-NaHCO ₃	50000	1

Tabella 6 Composizione del medium di coltura della specie *P. subcapitata*

3.2.5 Allevamento e mantenimento delle colture

La coltura algale è stata mantenuta ad una temperatura nel range 21-24 °C all'interno di una cella termostatica presente nel Laboratorio di Ecotossicologia dell'Università Ca' Foscari di Venezia. Essa è stata conservata e fatta crescere all'interno di una beuta mantenuta in costante movimento tramite l'impiego di una piastra agitatrice. La soluzione è stata rinnovata una volta alla settimana per mantenere le alghe sempre in una condizione di crescita esponenziale

3.2.6 Lettura dei risultati ed elaborazione dati

La determinazione della densità algale è stata effettuata con l'ausilio di un microscopio ottico e l'uso dell'emocitometro (o camera) di Bürker. Il posizionamento delle cellule algali di ogni pozzetto all'interno della camera di Bürker è avvenuto tramite l'utilizzo di pasteur di vetro. Come mostrato nella Figura 10 una camera di Bürker è composta da due celle quadrangolari in cui le cellule algali pescate dalla soluzione test tramite una pipetta Pasteur vengono inoculate e successivamente contate; prima di procedere all'inoculo, al di sopra della camera stessa è posto un vetrino coprioggetti che viene bloccato lateralmente

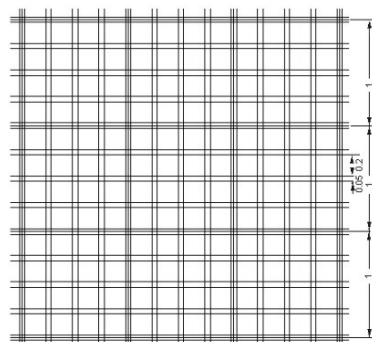


Figura 10 Esempio di camera di Bürker, a destra ingrandimento delle camere di conta presenti.

da due pinze e che consente la diffusione per capillarità delle alghe sulla superficie della camera di conta.

Le due celle presenti in alto e in basso nella camera sono formate da 9 quadrati a loro volta suddivisi in 16 quadratini più piccoli, la conta avviene partendo dal quadrato in alto a sinistra e si procede nella lettura dei tre quadrati della diagonale.

Una volta terminata la conta si procede utilizzando la seguente formula:

$$media = \frac{\text{numero cellule contate}}{\text{numero aree contate}}$$

La media risultante dei conteggi eseguiti nelle 2 celle rappresenta il risultato finale della conta cellulare, che è stato successivamente riportato in una scheda di raccolta

dati. Questa operazione è stata replicata tre volte per ciascuna concentrazione del test.

Per ogni replica sperimentale, è stato calcolato il tasso di crescita seguendo l'equazione:

$$\mu = \frac{\ln x_L - \ln x_0}{t_L - t_0}$$

in cui:

t_0 = tempo di inizio del test

t_L = tempo di fine del test, che è 72 ore

x_0 = densità iniziale delle cellule

x_L = densità finale delle cellule

I tassi di crescita così ottenuti per ciascuna replica di ogni concentrazione sono stati impiegati per calcolare la percentuale d'inibizione del tasso di crescita algale rispetto al controllo negativo, seguendo l'equazione:

$$I_{\mu_{X_i}} = 100 \cdot \frac{\mu_C - \mu_{X_i}}{\mu_C}$$

μ_C = media del tasso di crescita del controllo

μ_{xi} = tasso di crescita calcolato per la replica i-esima della concentrazione X (si ottiene mediando i risultati delle singole repliche).

In caso si riscontri un $I_{\mu} > 50\%$ è possibile calcolare l'EC₅₀. Il software utilizzato per la stima dell'EC₅₀ è il programma LWL, appositamente sviluppato dal DTU di Kongens Lyngby, Danimarca, ed utilizzato per il trattamento di dati continui, assumendo una distribuzione LogNormal, di Weibull o Logit dei dati di tossicità (Christensen et al., 2009).

3.2.7 Procedura QA/QC

La procedura QA/QC per la *P. subcapitata* è simile a quella precedentemente descritta per la *D.magna* e prevede:

- esecuzione di un test di controllo positivo con una sostanza di riferimento (Kr₂Cr₂O₇);
- esecuzione di un controllo negativo con acqua di diluizione (medium di coltura) per ciascun test.

Secondo le linee guida OECD 201, i risultati del test sono considerati positivi ed adeguati quando il tasso di crescita medio del controllo negativo supera i 0.97 d^{-1} e il coefficiente di variazione del tasso di crescita (CV) nel controllo è minore del 7 %.

3.3 Test Microtox®: Test di inibizione della bioluminescenza naturale di *Aliivibrio fischeri*

3.3.1 Generalità

Il sistema Microtox® è un test biologico di tossicità acuta basato sull'utilizzo della bioluminescenza naturale di *A. fischeri*. Poiché in presenza di contaminanti l'emissione di luce da parte di *A. fischeri* diminuisce, la misura dell'eventuale inibizione della bioluminescenza a seguito dell'esposizione del batterio ad una sostanza nota o ad un campione naturale di acqua o sedimento, consente di valutare il grado di tossicità della sostanza o della matrice testata. Il test è un metodo acuto standard ISO (ISO 11348) ed assume particolare rilievo in quanto consente di prendere in considerazione i possibili effetti tossici esercitati dai formulati nei confronti della comunità acquatica microbica, una componente chiave della fauna acquatica; la sua inclusione nella batteria di saggi utilizzata per valutare la tossicità dei formulati prodotti in ambito NANORESTART rappresenta un valore aggiunto rispetto a quanto richiesto dal regolamento CLP, che non contempla la valutazione degli effetti nei confronti della comunità microbica.

3.3.2 La specie test

A. fischeri (famiglia delle Vibrionaceae) è un batterio flagellato marino Gram-negativo con una forma bastoncellare molto diffuso nell'ambiente marino. Esso è un cosmopolita, ma con maggior diffusione nelle fasce temperate e subtropicali. La sua bioluminescenza è determinata dalla trascrizione dell'operone Lux.

3.3.3 Esecuzione del test

In accordo con l'ISO 11348 questa tipologia di test può essere effettuata usando un preparato "fresco" di batteri o preparazioni di batteri liofilizzati. Nella sperimentazione all'interno del progetto di NANORESTART si è usufruito dei batteri liofilizzati forniti dal rivenditore esclusivo per l'Italia dei prodotti Microtox(r) (ECOTOX LDS, Cornaredo, Milano). Per l'esecuzione del saggio sono stati inoltre utilizzati il luminometro Microtox M500 (che mantiene i campioni a 15°C ed esegue le letture della bioluminescenza) ed il software di gestione MicrotoxOMNI che guida l'operatore in tutti i passaggi previsti dal protocollo e nel calcolo dell'EC₅₀.

La procedura di saggio inizia con la riattivazione dei batteri, che avviene secondo la seguente modalità:

- inoculo di 1 mL di soluzione ricostituente (soluzione di NaCl al 20%) in una cuvetta specifica per l'esecuzione del test Microtox e incubazione della stessa a 4°C per circa 15 minuti, utilizzando l'apposito pozzetto presente nel luminometro M500;
- travaso della soluzione ricostituente refrigerata a 4°C nella fiala contenente i batteri liofilizzati;
- sciogliere i batteri con una lenta rotazione, quindi riversare il contenuto della fiala nuovamente nella cuvetta posta a 4°C;
- lasciare riposare per 20-30 minuti prima dell'utilizzo;

Una volta ricostituiti, i batteri devono essere utilizzati entro 24 ore.

Per l'analisi dei campioni, si è effettuato dapprima uno "screening test" ad una concentrazione di 1000 mg l⁻¹; successivamente, in base alla risposta, si è eventualmente effettuato un "basic test" su una serie di concentrazioni ristrette, al fine di calcolare l'EC₅₀ in modo accurato.

Entrambi questi test sono gestiti da templates presenti nel software MicrotoxOMNI che guida l'operatore in tutte le fasi di preparazione del campione e di lettura dei risultati.

3.3.4 Screening test

Il test è stato eseguito con 1 controllo (soluzione al 20% di NaCl) e 1 replica del campione, utilizzando i pozzetti posti nella fila A e nella fila B dell'analizzatore M500, ed il pozzetto F3 per la diluizione dei batteri.

Per il test si procede come segue:

- posizionare le cuvette nei pozzetti da A1,A2,B1,B2 ed in F3;
- aggiungere nel pozzetto F3 1500 µL di diluente;
- aggiungere nel pozzetto A1 1000 µL diluente;
- aggiungere nel pozzetto A2 2500 µL di campione e 250 µL di acqua di mare ricostituita e scartare 750 µL di soluzione (concentrazione iniziale 91%);
- attendere 5 minuti;

- trasferire quindi 150 µL di reagente batterico nel pozzetto F3 e mescolare;
- attendere 15 minuti entro i quali aggiungere 100 µL dei batteri diluiti del pozzetto F3 nei pozzetti da B1 a B2;
- al termine dei 15 minuti inserire la cuvetta B1 nel pozzetto di lettura ed eseguire il set-up dello strumento (tasto SET);
- eseguire quindi le letture delle I_0 (intensità luminosa iniziale) dei pozzetti da B1 e B2;
- trasferire quindi 900 µL del controllo e del campione da A1 e A2 a B1 e B2 (raggiungendo una concentrazione finale pari al 90% della concentrazione iniziale di prodotto saggiato);
- premere quindi la barra spaziatrice ed attendere il suono del timer precedentemente impostato (5, 15 o 30 minuti) ed eseguire le letture nei tempi reimpostati.

I risultati vengono espressi come % di effetto (I%) data dalla seguente relazione:

$$I(\%) = 100 \cdot \left(I_b - \frac{I_c}{I_b} \right)$$

dove:

I_c = emissione luminosa del campione

I_b = emissione luminosa del bianco di controllo

Qualora la % di effetto ottenuta sia stata superiore al 50%, si è proceduto all'esecuzione del "Basic test".

3.3.5 Basic test

Il test è stato eseguito con 1 replica utilizzando 1 controllo e 9 diluizioni, utilizzando i pozzetti A1, B1 per il controllo, da A2 a D4 per il campione, ed il pozzetto F3 per la diluizione dei batteri.

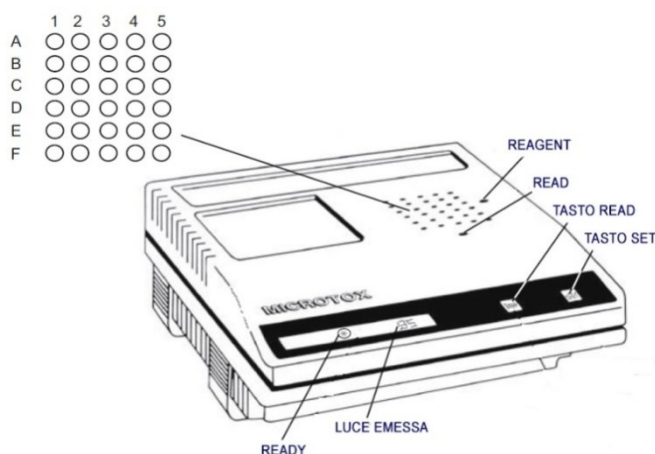
Per la diluizione dei campioni e l'esecuzione del saggio si è proceduto come segue:

- distribuzione delle cuvette Microtox nei pozzetti da A1 a D4 ed in F3;
- aggiunta di 1500 µL di diluente nel pozzetto F3;
- aggiunta di 1000 µL di diluente nei pozzetti da A1 a A5 e da C1 a C4;

- aggiunta di 2500 μL di campione e 250 μL di acqua di mare sintetica nel pozzetto C5, e scarto di 750 μL di soluzione;
- esecuzione di diluizioni seriali 1:2 trasferendo 1000 μl di campione a partire dal pozzetto C5 al pozzetto C4, dal pozzetto C4 al pozzetto C3 e così via fino ad arrivare al pozzetto A2, dove vengono scartati 1000 μL di campione in eccesso;
- attesa di 5 minuti per la stabilizzazione del campione e contemporaneo trasferimento di 150 μL dei batteri precedentemente ricostituiti nel pozzetto F3;
- attesa di 15 minuti, durante i quali sono stati aggiunti 100 μL dei batteri diluiti dal pozzetto F3 nei pozzetti da B1 a B5 e da D1 a D5;
- al termine dei 15 minuti inserimento della cuvetta B1 nel pozzetto di lettura ed eseguire il set-up dello strumento (tasto SET);
- seguendo le indicazioni a video del software MicrotoxOMNI, eseguire le letture delle I_0 dei pozzetti da B1 a B5 e da D1 a D5;
- terminata la lettura trasferire immediatamente 900 μL del bianco e del campione da A1 a B1, da A2 a B2, da A3 ad B3, da A4 a B4 e così via fino alla fine;
- esecuzione delle letture della bioluminescenza secondo gli intervalli scanditi del timer (5, 15 e 30 minuti) controllato dal software MicrotoxOMNI

Al termine delle letture il software produce l'EC50 e tutti i parametri necessari per la valutazione della qualità del dato.

Nella Figura 11 viene mostrato il luminometro M500 utilizzato per effettuare i test,



nella quale sono sintetizzati le sue funzioni base.

Figura 11 Luminometro M500 utilizzato nell'esecuzione dei test

3.3.6 Procedura QA/QC

Sebbene questo saggio non preveda l'impiego di organismi allevati o campionati in natura, risultando quindi soggetto a minore variabilità e minor problemi di campionamento, risulta comunque necessario verificare:

- La sensibilità degli organismi utilizzati e del loro stato di conservazione
- Il funzionamento del sistema
- La procedura stessa di esecuzione della prova (replicabilità, riproducibilità, confounding factors).

La procedura QA/QC per quanto riguarda i batteri bioluminescenti prevede:

- L'implementazione di un controllo positivo con una sostanza di riferimento, Zn, per ciascun lotto batterico utilizzato
- La valutazione della bioluminescenza (I_0) nel controllo negativo (NaCl 2% soluzione)
- La valutazione della corretta esecuzione delle misure, in particolare il coefficiente di correlazione (R^2) tra la concentrazione ed inibizione della bioluminescenza e la bioluminescenza nei controlli

Il valore dell' EC_{50} di Zn dovrebbe essere compreso nell'intervallo 0.6-2-2 m/L, l' I_0 , invece, deve essere nell'intervallo tra 80 e 110 %.

4.Caso di studio: i prodotti NANORESTART

Il pacchetto WP6 all'interno del progetto NanoREStart si è occupato della valutazione ambientale delle formulazioni proposte per la pulizia, il consolidamento e la conservazione delle opere d'arte moderna e contemporanea. Queste formulazioni, infatti, devono rispettare criteri di sicurezza, imposti dal regolamento CLP, in modo da non interferire in modo negativo sulla salute umana e sull'ambiente.

Questo attento controllo è necessario e obbligatorio per i fornitori e/o importatori di sostanze chimiche; queste, infatti, non possono essere immesse nel mercato se non possiedono delle adeguate etichettature che specificino ogni caratteristica e specifico pericolo associato all'impiego del prodotto.

4.1 Introduzione e obiettivi dell'indagine sperimentale

Lo scopo del lavoro di laboratorio è stato quello di valutare la tossicità acuta (nei confronti dell'ambiente acquatico) di ogni sostanza chimica ricevuta dai produttori attraverso l'impiego di una batteria di test di tossicità, spiegati nei paragrafi precedenti.

4.2 Partner e formulati proposti

4.2.1 Partner del progetto NANORESTART

Formulati per la pulizia, conservazione e consolidamento delle opere d'arte moderna e contemporanea sono stati proposti da 6 partner tra i partecipanti al progetto NANORESTART; di seguito (Tab.7) sono riportati i diversi formulati in ordine di Working Package con indicazione del partner che li ha prodotti:

WP	Partner	Formulazioni
WP2	CSGI	AM5
		G1
		G1 Ncap
WP3	Chalmers	Silica/PEI
		Silica/PEI/CMC
		CNF
	MBN	NRA-CE04
	ZFB	ZFB-SB
WP4	KI	U2
	ISMN-CNR	Formulazione 1
		Formulazione 2
		Formulazione 3
		Formulazione 4
		Formulazione 5
ZFB	SCE v.1	

Tabella 7 Formulati proposti al controllo dai vari Partner all'interno del progetto NANORESTART

LEGENDA TABELLA 7

Chalmers University of Technology =, Università tecnica svedese con sede a Goteborg.
ISMN-CNR = Istituto per lo studio dei materiali nanostrutturati, è un istituto di ricerca multidisciplinare incentrato sul campo dei nanomateriali e sul loro utilizzo.
CSGI = Consorzio interuniversitario per lo sviluppo dei sistemi a Grande Interfase, sede all'Università di Firenze che è anche il partner che coordina l'intero progetto
KI = Kemijski inštitut di Lubiana, Istituto Nazionale per la Chimica della Slovenia
MBN = Nanomaterialia SPA, azienda di produzione di materiali innovativi tramite lo sviluppo di impianti tecnologici ed industriali
ZFB =(Zentrum für Bucherhaltung GmbH), azienda che si occupa del restauro e della conservazione dei libri, che ha sede a Lipsia.

4.2.2 Prodotti proposti nei Working Package

Ricordiamo che i diversi Working Package esprimono diverse tipologie di prodotto a seconda del loro scopo di utilizzo:

- WP2- sviluppo di nuovi strumenti per la pulizia
- WP3 - prodotti per il consolidamento e il rafforzamento delle strutture
- WP4 - prodotti per la protezione delle superfici

WP2 – sviluppo nuovi strumenti di pulizia

I formulati prodotti nell'ambito del WP2 sono stati prodotti e forniti da CSGI che ha sviluppato diverse microemulsioni adibite ad una pulizia controllata delle opere d'arte, come per esempio gel altamente ritentivi per il confinamento di enzimi e

fluidi nanostrutturati a base di surfattanti green. Tra questi due tipi di prodotto di pulizia, i gel posseggono una composizione non tossica mentre i fluidi di nuova formulazione nanostrutturata necessitano di un controllo più approfondito.

I target di interesse di questo ambito di lavoro sono pitture murali, pitture su tela, pergamena, pelle (il fluido viene gelificato per questa applicazione), carta, metallo e plastica. L'applicazione di questi prodotti può essere effettuata sia in ambienti interni che in ambienti esterni, l'importante è che il range di temperatura rimanga tra i 10 e i 40 °C.

I formulati proposti in questo WP (AM5, G1 e G1 Ncap) sono sistemi colloidali completamente trasparenti ed incolori. Essi contengono solventi, reagenti per la sintesi di polimeri e tensioattivi etossilati non ionici; quest'ultimi sono biodegradabili e non sono tossici per l'ambiente acquatico. La differenza sostanziale tra i tre prodotti è la quantità contenuta nella composizione dei composti Biosoft e Ncap, analizzati a parte nella sperimentazione.

WP3 – prodotti per il consolidamento e il rafforzamento delle strutture

In questo Working Package i partner partecipanti sono: Chalmers, CSGI, MBN e ZFB.

Lo scopo di questo WP è cruciale, siccome si interessa sullo sviluppo di formulati che migliorino la stabilità e favoriscano il consolidamento delle superfici artistiche, in particolare tele. I materiali sviluppati contengono:

- prodotti a base di silice (silica) e PEI (polietilenimmina) per il rafforzamento meccanico dei tessuti a base di cotone e altri materiali fibrosi come la carta, principalmente utilizzati nella parte retrostante delle tele delle opere d'arte (Silica/PEI, Silica/PEI/CMC).
- miscele di alcol, contenenti nanoparticelle di carbonato di calcio e derivati di cellulosa (nanofibrille di cellulosa), per aumentare la resistenza meccanica delle opere d'arte a base di cellulosa (NRA CE04, CNF, CSGI 1 +, CSGI 2-). L'uso di nanocellulosa consente il consolidamento di materiali a base di fibre utilizzando materiali quasi interamente naturali.
- miscele a base di eptano, cellulosa nanocristallina, nanoparticelle di MgO e metil-idrossi-etil cellulosa (ZFB-SB).

WP4 - prodotti per la protezione delle superfici

In questo Working Package i partner partecipanti sono: ISMR-CNR, KI e ZFB. L'obiettivo di questo WP consiste nello sviluppo di sistemi che possano proteggere le superfici delle opere d'arte, con particolare riferimento alle statue e manufatti da conservare sia in ambiente chiuso, sia outdoor. L'idea base è quella di sviluppare una nuova strategia di protezione che si distanzi dai sistemi tradizionali, basata su rivestimenti passivi e barriere per impedire l'interazione tra inquinanti e agenti atmosferici. È stata sviluppata, quindi, una combinazione tra sistemi di protezione attivi e passivi. I sistemi attivi sono basati su matrici polimeriche green integrate da materiali nanostrutturati che consentano determinate caratteristiche ai manufatti metallici e/o plastici, questo strato verrà protetto da un film più esterno facilmente rimovibile. I sistemi passivi hanno migliori proprietà di barriera ai gas e vengono integrati ai sistemi attivi creando una struttura multistrato fortemente protettiva, affidabile e duratura. Questi prodotti possono essere combinati con quelli presentati nel WP2, pulendo infatti le superfici da trattare è possibile migliorare l'adesione e le prestazioni del rivestimento.

Le formulazioni proposte da ISMN-CNR (F1, F2, F3, F4, F5) consistono in dispersioni colloidali, contenenti 2-mercaptobenzotriazolo e nanoparticelle di CaCO_3 (F1, F2), nanoparticelle di Ca(OH)_2 in etanolo e chitosano (F3, F4) e rivestimenti a base di chitosano e liquido ionico (F5). Invece, SCE v.1, prodotto da ZFB, consiste in una soluzione di benzotriazolo e nanoparticelle di Ca(OH)_2 in una miscela di eptano e alcol isopropilico.

Il rivestimento passivo proposto per questo progetto è il prodotto U2, specifico per substrati di bronzo. Esso non presenta un colore specifico ed è completamente diluibile con esteri, chetoni e toluene.

4.3 Risultati dei test

In questo paragrafo vengono riportati i risultati dei test acuti scelti per la valutazione della tossicità e di pericolo delle sostanze chimiche e formulati proposti al controllo all'interno del progetto NANORESTART.

In accordo con il regolamento CLP, un prodotto viene considerato come "acuto", e quindi etichettato come "Acute 1", se e solo se l'EC₅₀ calcolato in uno dei saggi eseguiti è minore di 1 mg l⁻¹.

Per tutti i saggi sono stati effettuati inizialmente dei test preliminari range finding e successivamente un test definitivo per il calcolo accurato della EC₅₀. Per quanto riguarda il test acuto con *D. magna*, per alcuni formulati non è stato effettuato un test definitivo dal momento che nel test preliminare non è stata identificata una EC₅₀ < 1000 mg l⁻¹. Inoltre, i range di concentrazione utilizzati nel test definitivo con *D. magna* sono stati utilizzati per identificare l'intervallo di concentrazioni da utilizzare nei saggi con gli altri indicatori (*P. subcapitata*, *A. fischeri*).

4.3.1 Risultati test acuto su *Daphnia magna*

Risultati QA/QC

I test di ecotossicità acuta eseguiti hanno soddisfatto i criteri QA/QC. Per quanto riguarda i test con la sostanza di riferimento (n = 3) hanno fornito un'EC₅₀ a 24 ore medio di 77,7 µg l⁻¹, un minimo di 71 µg l⁻¹ e un massimo di 88 µg l⁻¹. Questi limiti sono ben compresi nei limiti di accettabilità del diagramma di controllo (50-110 µg l⁻¹). La sopravvivenza nel controllo negativo è sempre stata > 95%.

Risultati dei test sui campioni

Nella seguente tabella (Tab.8) sono riportati i risultati ottenuti nei test di tossicità acuta con *D. magna* per i formulati proposti. In Tab.9 sono invece riportati i risultati relativi ad alcuni ingredienti fondamentali per alcune formulazioni.

WP	Partner	Formulazione	Test preliminare 24 h	Test definitivo 24 h	Test preliminare 48 h	Test definitivo 48 h
WP2	CSGI	AM5	91 (51-163)	84 (71-100)	112 (58-219)	70 (66-74)
		G1	263 (193-359)	157 (140-175)	207 (133-324)	162 (144-184)
		G1 Ncap	>1000 (5%)	-	>1000 (10%)	-
WP3	Chalmers	Silica/PEI	>1000 (0%)	-	>1000 (45%)	-
		Silica/PEI/CMC	>1000 (0%)	-	>1000 (10%)	-
		CNF	>1000 (0%)	-	>1000 (0%)	-
WP3	CSGI	CSGI 1 +	>1000 (5%)	-	>1000 (5%)	-
		CSGI 2 -	>1000 (0%)	-	>1000 (5%)	-
WP3	MBN	NRA-CE04	>1000 (5%)	-	>1000 (15%)	-
WP3	ZFB	ZFB-SB	518 (n.c.)	-	331 (210-522)	-
WP4	ISMN-CNR	Formulazione 1	>1000 (40%)	>1000 (10%)	386 (273-545)	197 (131-295)
		Formulazione 2	>1000 (10%)	>1000 (10%)	368 (n.c.)	517 (258-1030)
		Formulazione 3	>1000 (5%)	-	>1000 (30%)	-
		Formulazione 4	>1000 (30%)	-	>1000 (30%)	-
		Formulazione 5	>1000 (15%)	-	>1000 (40%)	-
WP4	KI	U2 *	-	162 (n.c.)	-	159 (63-400)
WP4	ZFB	SCE v.1	251 (184-342)	-	87 (44-174)	-

Tabella 8 Riassunto dei risultati ottenuti nella batteria di saggi acuti con *D.magna* dei prodotti proposti nel progetto NANORESTART

WP	Partner	Ingrediente	Test pre. 24h	Test def. 24h	Test pre. 48h	Test def. 48h
WP 2	CSGI	Ncap	-	316 (n.c.)	-	282 (225-353)
		BioSoft	-	11 (7-19)	-	20 (13-30)
WP 4	MBN	NRA-CC04	> 1000 (0%)	-	> 1000 (5%)	-

Tabella 9 Riassunto dei risultati ottenuti nell'analisi di tossicità acuta con *D. magna* di singoli ingredienti all'interno dei prodotti proposti nel progetto NANORESTART

WP2 – sviluppo nuovi strumenti di pulizia

Tra i prodotti saggiati, i minori effetti tossici sono stati rilevati da G1-Ncap, per cui non è stato identificato alcun effetto significativo fino a 1000 mg l⁻¹; gli altri prodotti, AM5 e G1 pur non essendo classificabili come tossici ai sensi del Regolamento CLP evidenziano una certa tossicità nei confronti di *D. magna*, maggiormente evidente nel caso di AM5.

I test effettuati sugli ingredienti che differenziano AM5 e G1 (BioSoft) e G1-Ncap (Ncap) evidenziano una più elevata tossicità di BioSoft rispetto a Ncap, fornendo una base di valutazione per le diverse performance dei formulati nei confronti di *D. magna*.

WP3 – prodotti per il consolidamento e il rafforzamento delle strutture

La maggior parte dei formulati proposti non determina effetti significativi nei confronti di *D. magna*, con la sola eccezione di ZFB-SB, formulato per il rafforzamento di superfici cellulosiche. Nessun effetto è stato riscontrato neanche per NRA-CE04, ingrediente base di altri formulati saggiati nell'ambito del presente studio.

WP4 - prodotti per la protezione delle superfici

Le formulazioni 3, 4 e 5 non mostrano effetti tossici di alcun tipo nei confronti di *D. magna* sia dopo 24 h sia dopo 48 h. Le formulazioni 1 e 2, invece, mostrano tossicità dopo 48 h seppur non di elevata intensità. Per ulteriori approfondimenti, è stata valutata la tossicità dell'ingrediente NRA CC-04, ingrediente della formulazione 1 e 2, che però non ha mostrato nessun effetto di tossicità evidente.

L'unico prodotto analizzato come rivestimento passivo è stato il formulato U2, il quale ha mostrato delle problematiche fisiche di applicazione al test. La consistenza del prodotto infatti è molto viscosa e diluendolo con il medium M4 esso si è indurito, formando flocculi, dimostrandosi non idoneo all'esecuzione del saggio. Successivamente è stato diluito in una soluzione acquosa di M4 e 0.05% di Et-OH; questo trattamento ne ha permesso la sua applicazione nel test con la *D. magna*, tuttavia non ha eliminato il problema di flocculazione del composto nel corso dell'esecuzione del test. I risultati riportati devono quindi considerarsi una sottostima della reale tossicità del prodotto.

Prodotti convenzionali

In questo paragrafo vengono riportati i risultati dei prodotti convenzionali, ovvero di prodotti attualmente utilizzati dall'industria del restauro e della conservazione per il trattamento delle opere d'arte (Tab. 10). Questi sono:

- Etanolo e toluene come solventi per la pulizia (WP2);
- PARALOID come prodotto per il rafforzamento ed il consolidamento (WP3);
- INCRALAC come rivestimento attivo (WP4)
- SOTER come rivestimento passivo (WP4)

WP	Prodotto	Tst prel. 24 h	test def 24 h	test prel. 48 h	test def 48h
WP2	Etanolo	-	> 600	-	> 600
	Toluene	-	>1000	-	>1000
WP3	PARALOID	> 1000 (0%)	> 1600 (5%)	631 (279-1500)	> 1600 (35%)
WP4	INCRALAC	316 (n.c.)	466 (371-586)	261 (168-408)	278 (222-349)
	SOTER	1000 (n.c.)	-	> 1000 (30%)	-

Tabella 10 Riepilogo risultati del test acuto con *D.magna* con i prodotti convenzionali

Tutti prodotti convenzionali non mostrano caratteristiche da poterli classificare come acutamente tossici secondo il regolamento CLP, tuttavia alcuni di essi mostrano una tossicità significativa nei confronti della *D.magna*, come per esempio il prodotto INCRALAC.

4.3.2 Risultati test acuto su *P. subcapitata*

Risultati QA/QC

Per i saggi con *P. subcapitata* è stato eseguito un singolo test con il tossico di riferimento ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) con un risultato EC_{50} medio di 2.56 mg l^{-1} . I criteri di accettabilità sono stati soddisfatti poiché il tasso di crescita nel controllo negativo è stato di $1.53 \pm 0.01 \text{ d}^{-1}$ ($n = 3$, $\text{CV} = 1\%$) per la prima sessione di test e $1.31 \pm 0.03 \text{ d}^{-1}$ ($n = 3$, $\text{CV} = 2.5\%$) per la seconda sessione.

Risultati dei test sui campioni

I risultati ottenuti con il test di crescita su *P. subcapitata* sono riportati in Tab. 11. Sono stati riportati in tabella i dati ottenuti con il software LKL assumendo sia una distribuzione LogNorm, sia una distribuzione di Weibull. Per la discussione dei risultati, visto che le EC_{50} calcolate assumendo le due distribuzioni prescelte erano simili, sono stati presi in considerazione solamente i dati con distribuzione LogNorm. Nella Tabella 12 si riportano invece i risultati relativi agli ingredienti di nuova sintesi utilizzati per le formulazioni sviluppate in ambito di WP2 e WP4.

Per quanto riguarda il formulato U2, rivestimento passivo sviluppato nell'ambito del WP4, non è stato possibile effettuare il test di crescita algale, poiché l'aggiunta di etanolo necessaria alla solubilizzazione del prodotto determina effetti tossici sulle alghe, presumibilmente a causa della rottura delle pareti cellulari in seguito a interazione con questo alcol.

WP	Partner	Formulazione	LKL (logNorm)	LKL(Weibull)
WP2	CSGI	AM5	358 (n.c.)	395 (47-742)
		G1	>1000 (46%)	>1000 (46%)
		G1 Ncap	665 (476-929)	718 (501-936)
WP3	Chalmers	Silica/PEI	27 (15-50)	29 (13-44)
		Silica/PEI/CMC	>1000 (31%)	>1000 (31%)
		CNF	>1000 (25%)	>1000 (25%)
WP3	CSGI	CSGI 1 +	>1132 (8%)	> 1132 (8%)
		CSGI 2 -	>1000 (35%)	>1000 (35%)
WP3	MBN	NRA-CE04	>1000 (25%)	>1000 (25%)
WP3	ZFB	ZFB SB	>1080 (14%)	>1080 (14%)
WP4	ISMN-CNR	Formulazione 1	381 (n.c.)	427 (303-552)
		Formulazione 2	497 (389-635)	529 (412-646)
		Formulazione 3	446 (396-502)	448 (404-492)
		Formulazione 4	>1000 (44%)	>1000 (44%)
		Formulazione 5	396 (n.c.)	490 (n.c.)
WP4	ZFB	SCE v.1	>1200(7%)	>1200 (7%)

Tabella 11 Riassunto dei risultati del test acuto con *P. subcapitata* sui prodotti NANORESTART

WP	Ingrediente	LKL (LogNorm)	LKL (Weibull)
WP2	Biosoft	>100 (22 %)	> 100 (22%)
	Ncap	>100 (17 %)	>100 (17%)
WP4	NRA-CC04	385 (280-531)	405 (n.c.)

Tabella 12 Riassunto dei risultati ottenuti nell'analisi di tossicità acuta con *P. subcapitata* di singoli ingredienti all'interno dei prodotti proposti nel progetto NANORESTART

WP2 – sviluppo di nuovi strumenti di pulizia

Tra i prodotti saggiati, i minori effetti tossici sono stati rilevati da G1 ($EC_{50} > 1000$ mg l⁻¹), a differenza di quanto osservato per il test acuto con *D. magna*. Gli altri prodotti, AM5 e G1 Ncap, pur non essendo classificabili come tossici ai sensi del regolamento CLP, evidenziano una certa tossicità nei confronti della microalga *P. subcapitata*, maggiormente evidente nel caso di AM5 (in accordo con quanto osservato per *D. magna*). I test effettuati sugli ingredienti BioSoft (per AM5 e G1) ed Ncap (per G1-Ncap) non hanno riscontrato la presenza di effetti tossici fino ad una concentrazione di 100 mg/L.

WP3 – prodotti per il consolidamento e il rafforzamento delle strutture

La maggior parte dei prodotti saggiati non provocano effetti tossici nei confronti di *P. subcapitata* ad eccezione del prodotto Silica/PEI, prodotto a base di silice e polietilenimina per il rafforzamento meccanico dei tessuti a base di cotone e altri materiali fibrosi. Esso, pur non essendo classificabile come acutamente tossico ai sensi del regolamento CLP, mostra una tossicità più alta nei confronti della microalga rispetto alla *D. magna*.

WP4 – prodotti per la protezione delle superfici

La formulazione 4 e SCE v.1 non mostrano alcun tipo di effetto tossico nei confronti di *P. subcapitata* dopo le 72 ore di esposizione. Tutte le altre formulazioni, invece mostrano una certa tossicità, pur non essendo classificabili acutamente tossici ai sensi del regolamento CLP. Tra i prodotti che mostrano effetti di tossicità, quello risultare maggiormente inibente per la crescita algale dopo 72 ore di esposizione è la formulazione 1. I test effettuati sull'ingrediente NRA-CC04, presente nella formulazione 1 e 2, evidenziano effetti tossici nei confronti di *P. subcapitata*, lontana comunque dai limiti previsti dal regolamento CLP.

Prodotti convenzionali

I prodotti convenzionali mostrano complessivamente una maggiore tossicità rispetto ai formulati NANORESTART; in particolare, risulta particolarmente tossico il prodotto INCRALAC, che mostra effetti tossici molto vicini alla soglia definita dal regolamento CLP. Tutti gli altri prodotti convenzionali, pur mostrando effetti tossici elevati, non sono classificabili con "Acute 1" ai sensi del Regolamento CLP.

WP	Prodotto	LKL (LogNorm)	LKL (Weibull)
WP2	Etanolo	8.09	8.09
	Toluene	12.5	12.5
WP3	PARALOID	6.5 (n.c.)	6.4 (1- 20)
WP4	INCRALAC	< 4	< 4
	SOTER	> 100 (7%)	> 100 (7%)

Tabella 13 Riepilogo risultati del test acuto con *P. subcapitata* con i prodotti convenzionali

4.3.3 Risultati test acuto su *Vibrio fischeri*

Risultati QA/QC

Il lotto batterico ha fornito un'EC₅₀ per Zn di 1.2 mg l⁻¹, in accordo con l'intervallo di accettabilità fornito dal produttore (0.6 – 2.2 mg l⁻¹). L'emissione luminosa media dei batteri esposti al controllo negativo (I₀) è 89.9 ± 3.4% (n = 46), con valori che vanno dall'83.4% al 97.1%, il tutto nel criterio di accettabilità (80 - 110%).

Risultati test sui campioni

I risultati del test di inibizione della bioluminescenza batterica sono riportati in Tabella 14, per tutti e 3 gli intervalli di esposizione considerati (5, 15 e 30 minuti di esposizione). I risultati riportati con segno negativo identificano un aumento della bioluminescenza (biostimolazione), un effetto che non viene valutato come tossico ma che indica un'alterazione del metabolismo microbico ed in quanto tale da tenere in considerazione. I risultati relativi agli ingredienti sono riportati in Tab.15.

WP	Partner	Formulazione	Risultato test		
			5 min	15 min	30 min
WP2	CSGI	AM5	39 (38-40)	39 (37-41)	45 (44-47)
		G1	108 (107-110)	99 (93-105)	103 (101-104)
		G1 Ncap	256 (253-259)	197 (191-203)	170 (162-178)
WP3	Chalmers	Silica/PEI	>1000 (2%)	>1000 (15%)	>1000 (30%)
		Silica/PEI/CMC	>1000 (0%)	>1000 (0%)	>1000 (0%)
		CNF	>1200 (1%)	>1200 (0%)	>1200 (0%)
WP3	CSGI	CSGI 1 +	>1000 (-16%)	>1000 (-22%)	>1000 (-19%)
		CSGI 2 -	>1260 (27%)	>1260 (40 %)	>1260 (37%)
WP3	MBN	NRA-CE04	>1000 (12%)	>1000 (4%)	>1000 (7%)
WP3	ZFB	ZFB SB	25 (21-30)	35 (28-45)	59 (55-64)
WP4	ISMN-CNR	Formulazione 1	>1000 (41%)	681 (422-1098)	632 (444-901)
		Formulazione 2	>1000 (30%)	>1000 (38%)	>1000 (42%)
		Formulazione 3	>1000 (12%)	>1000 (21%)	>1000 (24%)
		Formulazione 4	>1000 (10%)	>1000 (17%)	>1000 (23%)
		Formulazione 5	>1000 (0%)	>1000 (0%)	>1000 (0%)
WP4	ZFB	SCE v.1	30 (28-33)	45 (42-48)	59 (55-64)

Tabella 14 Riepilogo dei risultati riscontrati nel test acuto con *A. fischeri* sui prodotti NANORESTART

WP	Ingrediente	5 minuti	15 minuti	30 minuti
WP2	Biosoft	4,1 (3,9-4,4)	4,2 (3,4-5,3)	4,6 (3,4-6,1)
	Ncap	12,6 (12,3-13,0)	11,5 (10,8-12,2)	11,8 (11,5-12,0)
WP4	NRA-CC04	> 1000 (0%)	> 1000 (0%)	> 1000 (0%)

Tabella 15 Riassunto dei risultati ottenuti effettuando il test acuto Microtox su *A. fischeri* con i singoli ingredienti all'interno della composizione dei prodotti NANORESTART

WP2 – sviluppo di nuovi strumenti di pulizia

Tra i prodotti saggiati, tutti hanno mostrato effetti tossici nei confronti del batterio bioluminescente, seppur non classificabili come acutamente tossici ai sensi del regolamento CLP. Il prodotto che mostra una tossicità più elevata è AM5. Per quanto concerne gli ingredienti, il Biosoft, presente nella composizione di AM5 così come in G1, presenta una tossicità abbastanza elevata, che si colloca poco lontana dai limiti di tossicità acuta ai sensi del regolamento CLP. L'ingrediente Ncap, pur evidenziando una significativa tossicità, risulta essere meno inibitorio per il metabolismo microbico rispetto a Biosoft.

WP3 – prodotti per consolidamento e il rafforzamento delle strutture

Tutti i prodotti saggiati non mostrano effetti evidenti di tossicità nei confronti di *A. fischeri*, tranne per il prodotto ZFB-SB, il quale tuttavia non risulta sufficientemente tossico per generare un giudizio di tossicità acuta ai sensi del regolamento CLP. Il formulato CSGI 1 (+) ha prodotto un effetto di biostimolazione ad indicare un'alterazione del metabolismo microbico che va tenuta in considerazione nella valutazione complessiva delle performance ambientali del formulato.

WP4 – prodotti per la protezione delle superfici prodotti convenzionali

La maggior parte dei prodotti saggiati non mostra effetti tossici, con l'eccezione di formulazione 1 e SCE v.1. La formulazione 1 determina una certa tossicità dopo 15 e 30 minuti, sebbene non sia classificabile come acutamente tossica ai sensi del regolamento CLP. Una decisamente maggiore tossicità viene mostrata dal prodotto SCE v.1, anche se rimane entro i limiti dei criteri citati dal regolamento CLP per la definizione del giudizio di tossicità acuta. L'ingrediente NRA-CC04, che si trova

all'interno della composizione dei prodotti F1 ed F2, non ha mostrato tossicità per tutta la durata del test.

Prodotti convenzionali

I risultati del test Microtox applicato ai prodotti convenzionali sono riportati in Tab.16.

WP	Prodotto	5 minuti	15 minuti	30 minuti
WP2	Etanolo	n. d.	n. d.	n. d.
	Toluene	n. d.	n. d.	n. d.
WP3	PARALOID	> 1000 (-16%)	> 1000 (-32%)	> 1000 (-35%)
WP4	INCRALAC	16 (13-19)	25 (19-33)	38 (28-51)
	SOTER	6,2 (3,1-15,5)	4,4 (2,7-7,4)	4,1 (2,4-7,0)

Tabella 16 Riepilogo dei risultati ottenuti saggiando i prodotti convenzionali del progetto NANORESTART con il batterio bioluminescente *A. fischeri* (n.d. = non disponibile)

I prodotti convenzionali saggiati hanno mostrato differenti effetti. Il PARALOID genera un aumento della bioluminescenza del batterio causata da un'alterazione del metabolismo microbico (biostimolazione); al contrario, INCRALAC e SOTER risultano essere tossici nei confronti di *A. fischeri* già dopo 5 minuti di esposizione, con SOTER che dimostra maggiore tossicità rispetto ad INCRALAC, sebbene entrambi risultino all'interno dei limiti di tossicità non rilevabile ai sensi del regolamento CLP. Non sono disponibili dati relativamente alla sensibilità di *A. fischeri* a etanolo e toluene.

4.4 Discussione dati

In questo capitolo verranno discussi i risultati ottenuti nelle tre differenti tipologie di test ecotossicologici apportati sui formulati proposti nell'ambito del progetto NANORESTART.

4.4.1 WP2 – sviluppo nuovi strumenti di pulizia

Nonostante i risultati dei test di tossicità sui prodotti non indichino presenza di tossicità acuta secondo i criteri del regolamento CLP, i formulati hanno mostrato differenti effetti tossici nei confronti dei 3 indicatori utilizzati.

Il formulato AM5 presenta una tossicità più elevata in tutte e tre le diverse tipologie di test rispetto agli altri due formulati, anche alle concentrazioni più basse tra quelle saggiate; la maggiore tossicità è particolarmente evidente nel caso del test Microtox, in cui già dopo 5 minuti di esposizione al composto del batterio *A. fischeri* gli effetti risultano importanti.

Le differenze così marcate tra AM5 e gli altri due formulati G1 e G1 Ncap, hanno spinto ad approfondire su quale potesse essere la componente tossica di questo prodotto. I dati relativi agli ingredienti suggeriscono come il prodotto che rende AM5 più tossico sia con buona probabilità il BioSoft, che presenta infatti una tossicità abbastanza elevata soprattutto nei test con *D.magna* e *A.fischeri*. Anche la diversa tossicità tra il formulato G1 e G1Ncap può essere messa in relazione alla presenza di BioSoft: nel primo è presente una percentuale di Biosoft, seppur in quantità minore rispetto a AM5, che lo rende più tossico alla *Daphnia* nei confronti di G1-Ncap che non contiene tale composto, sostituito nella formulazione dal meno impattante Ncap. I dati relativi agli ingredienti suggeriscono quindi che gli effetti mostrati da G1 siano strettamente correlati alla presenza di Biosoft, mentre gli effetti tossici di G1 Ncap siano correlati alla presenza di Ncap. A margine di questo, bisogna inoltre considerare anche che il Biosoft è classificato come H302 (nocivo se ingerito) di categoria 4, e H318 (provoca gravi lesioni oculari) di categoria 1 nella sua scheda di sicurezza, a sottolineare come questo ingrediente sia potenzialmente pericoloso.

Il confronto con i prodotti convenzionali utilizzati per la pulizia delle superfici (nella fattispecie etanolo e toluene) evidenzia una decisamente maggiore tossicità di questi

ultimi nel test di inibizione della crescita algale rispetto alle nuove formulazioni, ed in particolare del formulato G1-Ncap. Etanolo ed toluene risultano infatti più tossici rispetto a G1-Ncap tanto per le alghe quanto per *D. magna*, mentre rispetto ad AM5 e G1 risultano decisamente meno tossici nei confronti dei cladoceri.

In generale, analizzando complessivamente i risultati ottenuti dai test, appare evidente come il prodotto G1-Ncap sembri possedere delle caratteristiche che ne conferiscono un minore impatto sull'ambiente acquatico, almeno per quanto concerne gli effetti acuti a breve termine. Nell'ambito della valutazione ITS rappresenta quindi il migliore prodotto del WP2, da sottoporre ai successivi step valutativi previsti dal progetto per approfondirne anche gli effetti cronici ed eventualmente la possibile citotossicità.

4.4.2 WP3 – prodotti per il consolidamento e il rafforzamento delle strutture

I risultati dei test acuti apportati sui prodotti del WP3 evidenziano come tali formulati non presentino tossicità acuta, secondo il regolamento CLP, che prevede una soglia fissata a $EC_{50} < 1 \text{ mg l}^{-1}$. Tuttavia i diversi formulati presentano delle caratteristiche tossicologiche marcatamente differenti tra di loro.

Gli effetti di Silica/PEI/CMC, CNF, CSGI 1 (+), CSGI 2 (-) e NRA-CE04 nei confronti degli indicatori biologici scelti sono trascurabili. Risultano invece meritevoli di approfondimento gli effetti sulla crescita algale causati dal formulato Silica/PEI. La principale differenza nella composizione tra Silica/PEI e Silica/PEI/CMC (non tossico) riguarda la percentuale di PEI contenuta nei due formulati:

- 0.7 % nel Silica/PEI
- 0.1 % nel Silica/PEI/CMC

È ipotizzabile quindi che la tossicità maggiore di Silica/PEI rispetto a Silica/PEI/CMC sulla crescita algale, possa essere dovuta alla maggiore quantità di PEI presente nella composizione del prodotto stesso. Questa ipotesi è rafforzata se consideriamo che il PEI è l'unico composto ad essere classificato come pericoloso per l'ambiente acquatico (CAT2) tra gli ingredienti utilizzati nella composizione dei prodotti di consolidamento delle superfici artistiche. In letteratura è stato dimostrato, inoltre, che nanotubi trattati con PEI possono aggregarsi nel tratto digerente di *D.*

magna (Petersen et al., 2011), quindi non si esclude che l'azione impermeabilizzante del PEI possa generare effetti tossici già nel breve termine

Il prodotto ZFB SB risulta essere quello maggiormente tossico, sia per *D. magna* sia per l'inibizione della luminescenza del batterio *A. fischeri*. Questo risultato non sorprende, sia per la presenza di eptano e altri solventi nella formulazione, sia perché il prodotto ZFB-SB risulta classificato nella sua scheda di sicurezza come H225 (liquido e vapori molto infiammabili), H304 (può essere letale in caso di ingestione e di penetrazione nelle vie respiratorie), H410 (molto tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata).

I test sul prodotto PARALOID, mettono chiaramente in evidenza come i nuovi formulati siano migliori, dal punto di vista della tossicità acuta, rispetto al prodotto convenzionale, con la sola eccezione del prodotto ZFB-SB che risulta essere maggiormente tossico nei confronti della *Daphnia* e del batterio luminescente rispetto al PARALOID. Prendendo in considerazione i risultati *in toto* si considerano i formulati Silica/PEI/CMC, CNF, CSGI 1 (+), CSGI 2 (-) e NRA-CE04 come "non tossici" per quanto concerne gli effetti a breve termine, quindi idonei al passaggio al livello successivo di analisi ecotossicologica nell'ambito dell'ITS (test cronico con *D. magna*) e ad essere presi in considerazione per la produzione su larga scala.

4.4.3 WP4 - prodotti per la protezione delle superfici prodotti convenzionali

I diversi effetti riscontrati nei vari formulati, in particolare per quanto concerne i formulati 1 e 2 rispetto agli altri, non trovano un immediato riscontro nell'analisi degli ingredienti che li contraddistinguono. Dalla lista dei "sospetti" è escluso l'etanolo, presente in concentrazione simile in tutti i formulati e comunque presente in concentrazioni non tossiche per *D. magna*, come emerso a seguito dei test di controllo eseguiti. Un contributo di tossicità da parte del composto NRA-CC04, è anch'esso da escludere, vista la sua esclusiva tossicità per il comparto algale. Rimane incerto il possibile contributo di componenti a nanoscala e solventi che non è stato possibile sottoporre a test nell'ambito del presente lavoro di tesi.

La tossicità di SCEv.1 nei confronti di *D. magna* e dei batteri bioluminescenti è probabilmente legata alla elevata concentrazione di eptano e alcol isopropilico, sebbene non sia possibile escludere *a priori* un contributo di benzotriazolo e nanoparticelle di idrossido di calcio, di cui non si hanno a disposizione attualmente

parametri di tossicità con cui confrontare i risultati del test sui formulati che li contengono. La tendenza a crescere dell'EC50 calcolato per SCE v.1 nei confronti di *A. fischeri* supporta l'ipotesi che a generare effetti siano solventi che esercitano azione tossica (o narcotica) nei primi istanti di esposizione, per poi evaporare e/o perdere l'effetto inibitorio.

Il prodotto convenzionale INCRALAC ha mostrato una tossicità maggiore dei formulati proposti dai partner di progetto, soprattutto per quanto concerne l'inibizione della crescita algale, per cui il risultato è molto vicino alla soglia limite di tossicità acuta in accordo con il regolamento CLP. Ciò che rende questo prodotto tossico potrebbe collegarsi alla presenza di toluene (NOEC di 28 mg l⁻¹) e benzotriazolo nella sua composizione (LeBlanc, 1980).

È rilevante sottolineare come i dati di tossicità dei nuovi prodotti indichino come questi siano complessivamente migliori dei prodotti convenzionali in termini di possibili effetti sulla matrice acquatica, con eccezione del prodotto SCE v.1, che presenta comunque effetti nei confronti di *D. magna* e batteri non dissimili da quelli dei prodotti convenzionali. In generale, si possono identificare in formulazione 3 e formulazione 4 i prodotti con le migliori performance ambientali (in termini di effetti acuti) e idonee al passaggio al livello successivo di analisi ecotossicologica (test cronico *D. magna*).

Per quanto concerne i coating passivi, il prodotto convenzionale SOTER, sebbene testato nella sua sola fase liquida, mostra un'evidente tossicità nei confronti dei batteri, non molto superiore al limite imposto dal CLP per identificare come "acuta" la tossicità. Il dato relativo al test con *D. magna* dimostra una chiaramente inferiore tossicità del prodotto convenzionale rispetto al formulato di nuova generazione (circa un ordine di grandezza); l'impossibilità di eseguire i test algali e con i batteri sul coating passivo U2, tuttavia, consente un confronto solo parziale tra il nuovo formulato ed il prodotto convenzionale; il solo test con *D. magna*, infatti, non può rappresentare un termine di paragone sufficiente perché considera un singolo endpoint misurato in una singola specie. Per quanto concerne U2, la minima differenza tra EC50 calcolato a 24 ore e dato rilevato a 48 ore, fa presumere che gli effetti tossici siano prevalentemente legati all'esposizione ai solventi presenti nel formulato, che agiscono nelle prime ore di esposizione sull'indicatore per poi disperdersi..

5. Conclusioni

Il progetto NANORESTART- NANOMaterials for the RESToration of works of ART-, avviato nel 2015, si concentra nello sviluppo e nella valutazione di prodotti per la pulizia, protezione e conservazione di opere d'arte moderne e contemporanee. L'arte è un importante elemento del patrimonio culturale, alla base dello sviluppo economico mondiale, quindi, la sua preservazione è un elemento fondamentale per massimizzare i benefici nel comparto soprattutto turistico ed economico.

In questo contesto, questo lavoro di tesi si inserisce nella prima fase di valutazione ambientale dei nuovi formulati proposti dai partner partecipanti al progetto.

I punti chiave emersi in questa sperimentazione, che ha riguardato esclusivamente la valutazione della tossicità acuta, sono i seguenti:

- sebbene per il regolamento comunitario CLP nessuno dei formulati proposti risulti tale da farlo classificare come “Acute 1”, l’applicazione dei saggi di tossicità già in questa prima fase (fase 1 dell’ITS) ha fatto emergere delle chiare differenze di tossicità tra i vari formulati (nell’ambito anche di prodotti destinati allo stesso impiego), ed ha consentito di effettuare uno screening dei prodotti molto più selettivo ed ecologicamente rilevante rispetto all’approccio previsto dal CLP, consentendo di effettuare una "preselezione" dei prodotti da sviluppare per la successiva applicazione su grande scala e su cui effettuare gli approfondimenti di natura ecotossicologica relativi alla fase 2 dell’ITS.
- si evidenzia inoltre come l’approccio sperimentale sui nuovi formulati non possa essere del tutto sostituito da valutazioni "desk" basate sulle schede di sicurezza (SdS); nonostante molti saggi abbiano confermato ciò che era stato rilevato nelle SdS, è importante considerare nella sperimentazione e nella valutazione della tossicità di prodotti chimici i possibili effetti sinergici, additivi e anche la reazione provocata dal mescolamento delle diverse componenti in un unico prodotto.
- Il confronto diretto con i prodotti convenzionali ha fatto rilevare che i nuovi formulati sono migliori dal punto di vista dell’impatto ambientale, anche considerando che le concentrazioni saggiate sono comunque molto alte e che non rappresentano verosimilmente situazioni che si potranno riscontrare realmente in ambiente.

- È importante sottolineare che l'assenza di effetti acuti in un prodotto non significa che esso non possa determinare effetti a lungo termine nell'ambiente acquatico, dal momento che in condizioni reali ambientali ci si può trovare in condizioni di esposizione cronica, che aumentano le possibili vie di esposizione (come per esempio ingestione di alimento contaminato) e ulteriori possibili meccanismi di azione. La valutazione della tossicità acuta deve essere quindi sempre e solo il primo step di una valutazione complessiva che deve mirare soprattutto alla valutazione degli effetti subletali a lungo termine che i nuovi prodotti, così come quelli già presenti in commercio, possono generare a diversi livelli di complessità biologica.

BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

ASTM 1998: Standard Guide for Conducting Static 96-h Toxicity Tests with Microalgae. ASTM E 1218-97a.

Burchardt, A. D., Carvalho, R. N., Valente, A., Nativo, P., Gilliland, D., Garcia, C., P., Passarella, R., Pedroni, V., Rossi, F., Lettieri, T., 2012. Effects of Silver Nanoparticles in Diatom *Thalassiosira pseudonana* and Cyanobacterium *Synechococcus sp.* Environmental Science & Technology 46 (20), pp. 11336-11344.

Callegaro, S., Minetto, D., Pojana, G., Bilanicová, D., Libralato, G., Volpi Ghilardini, A., Hasselöv, M., Marcomini, A., 2015. Effects of alginate on stability and ecotoxicity of nano-TiO₂ in artificial seawater. Ecotoxicology and Environmental Safety 117, 107–114.

Copper R.G., 1990. Stage-Gate Systems: A New Tool for Managing New Products. Business Horizons, May-June.

Copper R.G., 2011. Winning at new products: creating value through innovation. New York: Basic books, 4th edition.

Corsi, I., Cherr, G.N., Lenihan, H.S., Labille, J., Hasselov, M., Canesi, L., Dondero, F., Frenzilli, G., Hristozov, D., Puntès, V., Libralato, G., Marcomini, A., Sabbioni, E., Matranga, V., 2014. Common strategies and technologies for the ecosafety assessment and design of nanomaterials entering the marine environment. ACS Nano 8 (10), 9694–9709.

EPA 1971: Algal Assay Procedure: Bottle Test. U.S. Environmental Protection Agency, Corvallis, OR.

Gottardo S., Quiros Pedudo L., Totaro S., Riego Sintes J., Crutzen H, 2017. NANoREG framework for the safety assessment of nanomaterials. EUR 28550 EN.

- Hanna, S.K., Miller, R.J., Zhou, D., Keller, A. A., Lenihan, H. S., 2013. Accumulation and toxicity of metal oxide nanoparticles in a soft-sediment estuarine amphipod". *Aquatic Toxicology*, 142–143, 441–446.
- Hengstler J. G., Foth H., Kahl R., Kramer P. J., Lilienblum W., Schultz T. W., Schweinfurth H, 2006. The REACH concept and its impact on toxicological sciences. *Toxicology*, 220, 232-239
- Klaine S. J., Alvarez P. J.J., Batley G. E., Fernandes T. F., Handy R. D., Lyon Delina Y., Mahendra Shaily, McLaughlin Michael J. and Lead Jamie R., 2008. Nanomaterials in the enviroment: behavior, fate, bioavailability and effect. *Enviromental Toxicology and Chemistry*, 27, 2008, pp.1825-1851
- ISO 13829:2000. Water quality – Determination of the genotoxicity of water and waste water using the umu-test.
- ISO. 2007. Water quality -- Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test). ISO 11348-2007.
- Lead, J. R., Wilkinson, K. J., 2006. Aquatic Colloids and Nanoparticles: Current Knowledge and Future Trends. *Enrивonmental Chemistry*, 3, pp. 159-171.
- LeBlanc, G.A., 1980. Acute toxicity of priority pollutants to water flea (*Daphnia magna*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 24, 684-691.
- Lempa, J., Shaerban, T., Tellez, K., Wolande, J., 2010. Nanotech particles pose serious DNA risks to humans and the environment. Project Censored, 17.
<http://projectcensored.org/17-nanotech-particles-pose-serious-dna-risks-to-humans-and-the-environment/>
- Leter Giorgio, Pacchierotti Francesca, 2014. La modulazione della risposta cellulare in nanotossicologia e nanomedicina: ruolo dell'autofagia e della disfunzione lisosomiale. *Biologi Italiani*, 43-53.

Libralato, G., Costa Devoti, A., Zanella, M., Sabbioni, E., Mičetić, I., Manodori, L., Pigozzo, A., Manenti, S., Groppi, F., Volpi Ghirardini, A., 2016. Phytotoxicity of ionic, micro- and nano-sized iron in three plant species. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 123, 81–88.

Lofrano, G., Carotenuto, M., Libralato G., Domingos, R. F., Markus, A., Dini, L., Gautam, R. K., Baldantoni, D., Rossi, M., Sharma, S. K., Chattopadhyaya, M. C., Giugni, M., Meric, S., 2016. Polymer functionalized nanocomposites for metals removal from water and wastewater: an overview. *Water Research* 92, 22–37.

Lopes, I., Ribeiro, R., Antunes, F. E., Rocha-Santos, T. A. P., Rasteiro, M. G., Soares, A. M. V. M., Gonçalves, F., Pereira, R., 2012. Toxicity and genotoxicity of organic and inorganic nanoparticles to the bacteria *Vibrio fischeri* and *Salmonella typhimurium*. *Ecotoxicology* 21, pp. 637-648.

Manzo, S., Miglietta, M.L., Rametta, G., Buono, S., Di Francia, G., 2013. Toxic effects of ZnO nanoparticles towards marine algae *Dunaliella tertiolecta*. *Science of The Total Environment* 445–446, 371–376.

Miao, A., Schwehr, K. A., Xu, C., Zhang, S., Luo, Z., Quigg, A., Santschi, P. H., 2009. The algal toxicity of silver engineered nano particles and detoxification by exopolymeric substances. *Environmental Pollution* 157, pp. 3034-3041.

Minetto D., Volpi Ghirardini A., Libralato G., 2016. Salwater ecotoxicology of Ag, Au, CuO, TiO₂, ZnO and C₆₀ engineered nanoparticles: An overview. *Environment International*, 92-93, 189-201.

NANOFORART – Nano-materials for the conservation and preservation of movable and immovable artworks, 2014.

Noorlander C., Sips A., Höck J., Höhener K., Lehmann H. C., 2016. NANoREG Safe-by-Design (SbD) Concept. Report prepared within NANoREG projects.

OECD. (2004). OECD Guideline for Testing of Chemicals. Guideline 202: *Daphnia* sp. Acute Immobilization Test. Adopted April 2004.

OECD (2007). Working Party on Manufactured Nanomaterials.

OECD. (2011). OECD Guideline for Testing of Chemicals. Guideline 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. Adopted March 2006. Annex revised July 2011.

Oukarroum, A., Bras, S., Perreault, F., Popovic, R., 2012. Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 78, pp. 80-85.

Oomen A.G., Bos P.M., Fernandes T.F., Hund-Rinke K., Boraschi D., Byrne H.J., Aschberger K., Gottardo S., von der Kammer F., Kühnel D., Hristozov D., Marcomini A., Migliore L., Scott-Fordsmand J.J., Wick P., Landsiedel R., 2014. Concern-driven integrated approaches to nanomaterial testing and assessment. Report of the NanoSafety Cluster Working Group 10. *Nanotoxicology*, 8(3):334–348.

Passarelli, P., Sbalchiero, A., 2005. Test di inibizione algale con *Selenastrum capricornutum* o *Pseudokirchneriella subcapitata*. Istituto di ricerca sulle acque – cnr. Notiziario dei metodi analitici.

Peshin SS, Lall S.B., Bano R., 1998. Toxicity testing methods. *International Journal of Medical Toxicology & Legal Medicine*, vol 1, pp. 81-85.

Petersen, E.J., Pinto, R.A., Mai, D.J., Weber Jr, W.J.. 2011. Influence of Polyethyleneimine graftings of multi-walled carbon nanotubes on their accumulation and elimination by and toxicity to *Daphnia magna*. *Environmental Science and Technology*, 45: 1133-1138.

Raloff J., 2009. Nanoparticles' indirect threat to DNA. *Science & The Public*
<https://www.sciencenews.org/blog/science-public/nanoparticles-indirect-threat-dna>

REACH, 1907/2006. Regolamento CE del Parlamento Europeo e del consiglio
concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle
sostanze chimiche.

Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks, 2007.

Song Y., Li X., Du X., 2009. Exposure to Nanoparticles Is Related to Pleural
Effusion, Pulmonary Fibrosis and Granuloma. *European Respiratory Journal*.

Vale, G., Mehennaoui, K., Cambier, S., Libralato, G., Jomini, S., 2016.
Manufactured nanoparticles in the aquatic environment- biochemical responses on
freshwater organisms: a critical overview. *Aquatic Toxicology* 170, 162–174.

Van Leeuwen C. J., Patlewicz G. Y., Worth A. P., 2007. Intelligent Testing
Strategies. In: Van Leeuwen C. J., Vermeire T. G. (Eds.), *Risk Assessment of
Chemicals: An Introduction*. Springer, Dordrecht, pp. 467-509.

Walker C. H., Sibly R. M., Hopkin S. P., Peakall D. B., 2012. *Principles of
Ecotoxicology*. Fourth edition, CRC Press.