



# Università Ca'Foscari Venezia

Dipartimento di Scienze Ambientali, Informatica e Statistica

Corso di Laurea in Scienze Ambientali

A.A. 2016/2017

**TESI DI LAUREA MAGISTRALE**

**Valutazione della tossicità cronica di nuovi  
formulati attraverso la valutazione degli effetti  
sulla riproduzione di *Daphnia magna***

Relatore

Prof. Marco Picone

Candidata

**Sara Secco**

**836004**



## INDICE

<b>1. PREMESSA .....</b>	<b>PG.1</b>
<b>2. INTRODUZIONE ED OBIETTIVI DELLO STUDIO .....</b>	<b>PG. 9</b>
2.1 OBIETTIVI DELLO STUDIO .....	PG. 16
<b>3. MATERIALI E METODI .....</b>	<b>PG.17</b>
3.1 I NUOVI FORMULATI.....	PG. 17
3.2 TEST CRONICO DI RIPRODUZIONE con <i>Daphnia magna</i> .....	PG. 20
3.3 TEST DI EMBRIOTOSSICITA' con <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....	PG.26
<b>4. RISULTATI E DISCUSSIONE .....</b>	<b>PG. 32</b>
4.1 TEST CRONICO DI RIPRODUZIONE con <i>Daphnia magna</i> .....	PG. 32
4.2 TEST DI EMBRIOTOSSICITA' con <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....	PG. 40
<b>5. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE .....</b>	<b>PG. 42</b>
<b>I. ALLEGATO .....</b>	<b>PG. 44</b>
<b>II. ALLEGATO .....</b>	<b>PG. 46</b>
<b>III. ALLEGATO .....</b>	<b>PG. 48</b>

## BIBLIOGRAFIA

## **1. PREMESSA**

### **1.1 Il Progetto NanoRestArt**

NanoRestArt (NANOmaterials for the Restoration of works of ART) è un progetto recente finalizzato alla conservazione del patrimonio culturale europeo, ed in particolare alla protezione e alla conservazione a lungo termine delle opere d'arte moderne e contemporanee.

Il progetto è finanziato nell'ambito del programma NMP – 2014 – di HORIZON 2020 ed è coordinato dal Consorzio per lo Sviluppo dei sistemi a Grande Interfase (CSGI) con la partecipazione di 27 partners, tra università, centri di ricerca, associazioni industriali, musei ed esperti nella conservazione dei beni culturali in Europa e nel mondo.

Con un finanziamento di circa 11 milioni di euro per quattro anni, NanoRestArt rappresenta uno dei principali progetti di ricerca dell'Unione Europea sul tema della conservazione dei beni culturali.

Il progetto nasce dalla necessità di preservare nel lungo tempo le opere d'arte che sono state realizzate tra l'ultimo ventennio del XIX secolo e gli anni '40 del Novecento, perchè i materiali utilizzati dagli artisti in questo arco temporale sono radicalmente diversi da quelli che si utilizzavano nell'arte classica e risultano inoltre soggetti ad una più rapida degradazione delle tele che con le metodologie attualmente disponibili purtroppo non può essere arginata.

Tale progetto, quindi, vuole proporre delle soluzioni tecnologicamente all'avanguardia della moderna chimica e scienza dei materiali in un quadro completamente innovativo, volto alla sintesi di nuovi nanomateriali polifunzionali ed allo sviluppo di tecniche di restauro altamente innovative atte a preservare le suddette opere d'arte.

L'obiettivo cardine di NanoRestArt consiste nello sviluppo di nuovi materiali polifunzionali, ovvero di nanomateriali caratterizzati da migliorate proprietà chimiche e fisiche, che possano sostituire i prodotti convenzionali utilizzati fino a questo momento.

Un requisito fondamentale che si richiede è che i nuovi materiali sviluppati siano sostenibili e compatibili con i materiali artistici da conservare o ripristinare.

## **1.2 Gli obiettivi di NanoRestArt**

Gli obiettivi di NanoRestArt possono essere raggruppati in quattro categorie che interagiscono sinergicamente per soddisfare l'obiettivo di conservazione a lungo termine del patrimonio culturale.

**Obiettivo 1 - Sviluppo di nuovi strumenti e di nuovi materiali per la conservazione:**

l'obiettivo si focalizza sulla sintesi di nuovi nanomateriali appositamente ideati e sulla formulazione di sistemi complessi per una conservazione duratura delle opere d'arte moderne e contemporanee; il lavoro si incentra sullo sviluppo di nuovi strumenti per la pulizia controllata; il rafforzamento dei materiali che costituiscono l'opera d'arte e la protezione delle superfici, oltre che lo sviluppo di substrati nanostrutturati e di tecniche innovative per permettere analisi chimiche maggiormente accurate e sensibili.

**Obiettivo 2 - Valutazione dell'impatto ambientale delle nuove tecnologie:**

il concetto di sostenibilità è un concetto chiave per NanoRestArt. Tutte le soluzioni che vengono sviluppate nell'ambito di questo progetto devono necessariamente essere in linea con il regolamento REACH EU sulla sicurezza chimica, il cui obiettivo finale è la gestione sostenibile delle sostanze chimiche e dei materiali.

La sostenibilità viene valutata integrando tra di loro le varie componenti che caratterizzano il comparto ambientale (ad es. la sicurezza lungo l'intero ciclo di vita), il comparto economico (ad es. il prezzo di mercato), il comparto sociale (ad es. l'etica che guida il principio della conservazione) ed il comparto tecnico (ad es. gli aspetti relativi alla stabilità, alla compatibilità), per mezzo di indicatori strutturati semi-quantitativi, che consentono di sviluppare una metodologia basata su un'analisi di tipo multicriteriale (MCDA).

L'analisi multicriteriale consentirà di classificare tutti i nuovi formulati che andranno a sostituire i prodotti convenzionali, di confrontarli tra di loro e di prendere delle decisioni al fine di procedere con la scale-up industriale.

**Obiettivo 3 - Sfruttamento delle nuove tecnologie:**

le nuove soluzioni saranno accessibili in termini di costi e di complessità agli end-users, ovvero, a coloro che si occuperanno di conservazione e di ripristino delle opere d'arte moderne e contemporanee, come richiesto dal programma di lavoro di questo progetto.

A questo proposito, il progetto consentirà di accelerare lo sfruttamento industriale delle nuove tecnologie sviluppate, che sarà facilitato dalla comprensione prima e dal superamento poi delle barriere all'innovazione che ancora esistono in questo campo, sostenendo il coinvolgimento delle

SMEs in R&D (Research and Development in Small and Medium-Sized Enterprises), sovvenzionando lo sviluppo di prodotti pre-competitivi e scambiando le conoscenze acquisite con gli end-users.

Obiettivo 4 - La diffusione:

la valutazione del patrimonio culturale dipende in gran parte dagli esperti e dai responsabili politici, che definiscono (in collaborazione con gli istituti nazionali di conservazione) i protocolli ottimali che devono essere utilizzati dai conservatori. Tuttavia, i responsabili politici addetti alla conservazione dei beni culturali sono, molto spesso, distanti dallo sviluppo scientifico necessario per valutare quelli che possono essere gli impatti derivanti dalle nuove ricerche scientifiche. Per questo motivo, nella maggior parte dei casi, le reali aspettative dei conservatori non vengono soddisfatte.

Per affrontare questo problema NanoRestArt si appoggia ad importanti musei europei ed internazionali (piuttosto che nazionali o locali), istituzioni, imprese ed enti pubblici e privati.

### **1.3 Work Packages NanoRestArt**

Il progetto NanoRestArt è articolato in otto Work Packages (WPs) che si sviluppano in un arco temporale complessivo di 42 mesi.

La prima parte del progetto è volta allo sviluppo di nanomateriali e di nuove tecnologie ottimizzati per la conservazione e la preservazione delle opere d'arte moderne e contemporanee. Nella fase successiva, il progetto si focalizzerà sul trasferimento delle tecnologie innovative acquisite alle SMEs (Small and Medium-Sized Enterprises) e agli end-users (quali restauratori e musei) ai fini di attività di restauro, di conservazione, di sfruttamento delle nuove tecnologie e soprattutto di divulgazione delle stesse.

Il WP1 è interamente dedicato alla gestione del progetto che coprirà l'intero arco di tempo.

Il piano di lavoro ha inizio con la progettazione e la formulazione di sistemi nanostrutturati, gel e surfattanti con funzionalità specifiche che saranno impiegate per affrontare le sfide di conservazione di cui si è precedentemente parlato (WP2-WP5).

Questi sistemi, la cui formulazione sarà ottimizzata in base alle loro funzioni, saranno caratterizzati ed accuratamente valutati in termini di impatto ambientale ed ecotossicologico (WP6), prestando particolare attenzione alla potenziale pericolosità delle nanoparticelle impiegate nella formulazione dei sistemi, e agli impatti ambientali derivanti dall'utilizzo dei nuovi formulati.

Questo, inoltre, consentirà di comprendere e di verificare quali sono i meccanismi di interazione tra i nuovi nanomateriali sviluppati ed il comparto di destinazione finale dei prodotti.

Una volta valutate la sicurezza e l'applicabilità dei materiali più promettenti, avrà luogo la scalabilità industriale dei nuovi prodotti (WP7).

Il processo che permetterà alle nuove tecnologie di poter finalmente essere immesse nel mercato, sarà la standardizzazione dei protocolli applicativi, con la seguente produzione dei nanomateriali su media e larga scala. Saranno poi le Piccole, Medie e Grandi Imprese a fornire gli strumenti necessari affinché il processo possa concludersi positivamente.

La seconda fase del progetto NanoRestArt è volta alla diffusione delle conoscenze acquisite e delle tecnologie sviluppate, oltre che alle numerose attività di formazione e di educazione sull'utilizzo dei nuovi materiali, sistemi e strumenti (WP8).

In quest'ultima fase coloro che parteciperanno attivamente saranno gli end-users, tra i quali i musei e gli enti di conservazione pubblici e privati.

Nello specifico:

### **WP1 - Gestione**

Il pacchetto di lavoro 1 consiste nella gestione del progetto, gli obiettivi cardine sono: la gestione ed il coordinamento del progetto in modo efficace e in maniera qualitativa; trovare la migliore strategia per l'attuazione del progetto ed il raggiungimento dei traguardi prefissati; controllare e gestire in modo efficiente le risorse impiegate; il coordinamento scientifico (tra cui lo sviluppo dei piani di sfruttamento, le analisi di tipo scientifico, tecnico ed anche economico, la pianificazione, la tutela e la valorizzazione dei risultati).

### **WP2 – Nuovi strumenti per la pulizia**

L'obiettivo del pacchetto di lavoro 2 è lo sviluppo di nuovi sistemi con proprietà migliorate o nuove, specificatamente progettate per affrontare le sfide associate alla pulizia delle opere d'arte moderne e contemporanee. Questi nuovi sistemi rappresentano un significativo passo in avanti nel campo della conservazione. Le principali attività affrontate in questo pacchetto di lavoro riguardano: l'impiego di nuovi fluidi nanostrutturati, rispettosi per l'ambiente, per la rimozione di materiali indesiderati e in assenza di residui; l'impiego di soluzioni enzimatiche; l'utilizzo di gel specifici per il confinamento dei fluidi nanostrutturati e dei sistemi di bio-pulizia; la valutazione e la validazione di nuovi strumenti per la pulizia.

### **WP3 - Rafforzamento e consolidamento delle superfici**

Il pacchetto di lavoro 3 affronta un aspetto cruciale del risanamento conservativo, il ripristino delle proprietà meccaniche di un'opera d'arte. Le attività affrontate in questa fase riguardano: l'impiego di sistemi ibridi di biopolimeri funzionalizzati e di nanoparticelle inorganiche per il consolidamento di materiali fibrosi; l'utilizzo di nanomateriali per il rilascio controllato di plastificanti per substrati plastici; la valutazione e la validazione di nuovi strumenti per il rafforzamento delle superfici.

L'obiettivo del progetto è quello di testare materiali che siano altamente efficaci al fine di poterli impiegare nei reali casi di studio, rappresentando una vera e propria svolta nel campo della conservazione.

Nel corso di questo pacchetto di lavoro, la valutazione e la validazione degli strumenti e dei processi sarà estesa al di fuori di questo campo; tutte le conoscenze acquisite saranno fornite ai partner industriali ed agli enti di restauro e conservazione dei beni culturali.

#### **WP4 – Protezione delle superfici**

L'idea che sta alla base del pacchetto di lavoro 4 è quella di sviluppare sistemi di protezione polifunzionali (multistrato e compositi) che vanno al di là dei sistemi di protezione tradizionali comunemente impiegati (che si basano sull'utilizzo di rivestimenti passivi e di barriere che servono ad impedire l'interazione con le sostanze inquinanti e con i gas atmosferici).

Questo sarà possibile mediante la combinazione di sistemi di protezione "attivi" e "passivi".

I sistemi di protezione "attivi" si baseranno sull'impiego di matrici trasparenti di polimeri "green" funzionalizzati incorporando dei nanomateriali per conferire proprietà specifiche sulla superficie dei manufatti in metallo e/o in plastica.

I sistemi di protezione "passivi" con migliorate proprietà di gas-barriera saranno sviluppati ed implementati.

I nuovi strati di protezione "attivi" e "passivi" si combineranno tra di loro dando vita ad una struttura multistrato fortemente protettiva adatta alle superfici delle opere d'arte contemporanee (metallo e/o plastica) per garantire una protezione certa e duratura.

Quando necessario, gli strumenti di pulizia sviluppati nel pacchetto di lavoro 4 potranno essere impiegati per pulire efficacemente la superficie da trattare con gli strati polifunzionali protettivi "attivi" e "passivi" per migliorare l'adesione e le prestazioni del rivestimento. Inoltre, gli stessi strumenti di pulizia potranno essere adoperati per rimuovere la barriera protettiva, rendendo tale processo del tutto reversibile.

Le attività sviluppate in questo pacchetto di lavoro, quindi, sono:

lo sviluppo di sistemi di protezione "attivi"; lo sviluppo di sistemi di protezione "passivi" e la valutazione e la validazione delle nuove formulazioni di protezione delle superfici.

#### **WP5 –Substrati nanostrutturati per rilievi altamente sensibili**

L'obiettivo del pacchetto di lavoro 5 è quello di sviluppare substrati nanostrutturati e sensori per la rilevazione diagnostica della degradazione dei materiali e delle vernici che costituiscono le opere d'arte del patrimonio culturale moderno e contemporaneo, e l'identificazione delle singole componenti presenti in quantità ridotte. Infatti, rilevare quelle che sono le molecole prodotte dalla degradazione chimica delle opere d'arte è fondamentale per comprendere le fasi iniziali dei processi di deterioramento rapidi e irreversibili dei manufatti. Attraverso lo sviluppo di strumenti nuovi per il monitoraggio e per la degradazione, il pacchetto di lavoro 5 permetterà l'identificazione di quelli che saranno gli strumenti di restauro più adeguati. Ad esempio, il rilevamento e la precisa caratterizzazione dei prodotti di degradazione relativi alle tecniche di pittura moderna basate sui

leganti sintetici (alchidici, acrilici, vinilici) ed i composti organici volatili (VOC) emessi dalle materie plastiche e da altri materiali artistici contemporanei; oppure i coloranti utilizzati nelle opere d'arte e nei dipinti, che possono dissolversi per via della degradazione chimica.

Infine, i sistemi di rilevazione sviluppati in questa fase, innovativi e maggiormente sensibili, permetteranno la comprensione degli effetti nocivi dovuti ai restauri fatti in passato.

Il pacchetto di lavoro 5, dunque, caratterizzerà tutte e quattro le sfide di conservazione proposte nei WP2 – WP4.

### **WP6 – Valutazione di Impatto Ambientale**

I nuovi prodotti e le nuove tecnologie proposte nei WP2–WP5 devono essere specifici per la tipologia di opera d'arte moderna e/o contemporanea che si vuole conservare; per questo motivo è necessario avere informazioni dettagliate in merito alla natura delle opere d'arte stesse (dipinti su muro, dipinti su tela, dipinti su supporti mobili, dipinti su superfici in plastica e/o in metallo), in merito al loro stato di conservazione e alle condizioni ambientali in cui le opere d'arte sono collocate (all'interno o all'esterno).

Gli obiettivi del pacchetto di lavoro 6 sono:

- eseguire una Valutazione di Impatto Ambientale delle tecnologie più efficaci e promettenti sviluppate nei WP2–WP5;
- identificare un set di indicatori per valutare la sostenibilità delle suddette tecnologie e gli aspetti ambientali, economici, sociali e tecnici ad esse correlati;
- sviluppare la metodologia Weight of Evidence (WoE) integrando gli indicatori identificati in un giudizio tecnico-specifico semi quantitativo di sostenibilità;
- incorporare gli indicatori di valutazione della sostenibilità proposti e la metodologia sviluppata in un documento guida specifico per supportare i produttori verso la certificazione delle nano-tecnologie abilitate.

### **WP7 – Scale-up industriale e lo sfruttamento delle nuove tecnologie sviluppate**

L'obiettivo del pacchetto di lavoro 7 è quello di sviluppare una strategia ottimale per lo sfruttamento delle nuove tecnologie acquisite nel corso del progetto permettendone la loro applicabilità e diffusione a livello industriale, e utilizzandole non solo nell'ottica della conservazione dei beni culturali, ma, quando possibile, estendendole anche ad altri settori.

Questo sarà reso possibile grazie ad una serie di attività, tra le quali:

- la scalabilità industriale: i risultati ottenuti nei pacchetti di lavoro WP2–WP5 verranno associati a quelli dell’impatto ambientale e tossicologico derivante dall’utilizzo dei nuovi formulati (WP6) per dimostrarne la scalabilità industriale;
- la progettazione, prima, e la valutazione, poi, delle nuove tecnologie e dei nuovi materiali impiegati per capire quali sono quelli che forniscono una prestazione migliore (nell’ottica di minore impatto ambientale) in modo da poter essere utilizzati in ambito della conservazione dei beni culturali, e anche in altri settori;
- l’analisi SWOT, ovvero, performare un’analisi accurata sui possibili vantaggi, ma anche ostacoli, associati alle tecnologie chiave identificate nel corso del progetto, prendendo in considerazione tutte le dimensioni dei vari scenari (ad esempio: la scalabilità dei vari processi; i costi; la sostenibilità; gli aspetti normativi; gli aspetti della standardizzazione; le barriere socio-economiche; le caratteristiche specifiche del mercato);
- il confronto con gli end-users in merito alle proprietà specifiche di ciascun nuovo prodotto studiato, e la diffusione delle conoscenze acquisite e dei risultati ottenuti nel progetto.

#### **WP8 – Diffusione delle conoscenze e coinvolgimento degli stakeholders**

Gli obiettivi del pacchetto di lavoro 8 sono:

- la diffusione delle tecnologie sviluppate agli end-users (musei europei ed internazionali; enti di restauro pubblici e privati) per mezzo di attività di formazione e di educazione;
- la diffusione delle tecnologie sviluppate ai potenziali portatori di interesse (alle Piccole, Medie e Grandi Imprese -SMEs-; ai formulatori dei prodotti chimici impiegati nella conservazione e nel restauro delle opere d’arte moderne e contemporanee);
- le attività di gestione delle varie pubblicazioni scientifiche e dei brevetti associati a ciascun nuovo formulato che verrà commercializzato.

## 2. INTRODUZIONE ED OBIETTIVI DELLO STUDIO

L'università Ca' Foscari di Venezia è uno tra i 27 partner del progetto NanoRestArt.

L'attività principale in cui è coinvolto l'Ateneo consiste nella valutazione del potenziale impatto ambientale dei nuovi prodotti sintetizzati per il ripristino e la conservazione nel lungo periodo delle opere d'arte moderne e contemporanee (WP6 del Progetto).

Per raggiungere il suddetto obiettivo di Valutazione l'attività del WP6 è stata impostata secondo un approccio di tipo "Safe by Design" (SbD), il quale, a sua volta ha previsto una prima fase di valutazione preliminare dei pericoli associati alle nuove formulazioni, utilizzando l'approccio dell'autoclassificazione previsto dal Regolamento 1272/2008/UE "CLP", ed una seconda fase di valutazione ecotossicologica secondo un approccio "Integrated Testing Strategy" (ITS).

Nel seguito di questo capitolo saranno messe in evidenza strategie e finalità di questi diversi approcci messi in atto per la valutazione dei nuovi prodotti.

### **Approccio Safe by Design (SbD)**

Nonostante la crescente attenzione degli ultimi anni al restauro "green" del patrimonio culturale attraverso lo sviluppo di tecnologie più sicure e sostenibili (Balliana et al., 2016), sono veramente esigui gli studi inerenti la valutazione dei possibili rischi sulla salute umana e sull'ambiente per mezzo di tecniche sperimentali e di modellazione (Tedesco et al., 2015; Ferrari et al., 2015; Turk et al., 2017) ed è attualmente assente un framework quadro riguardante la valutazione della sostenibilità dei prodotti nano-sviluppati utilizzati per il restauro del patrimonio culturale.

In questo contesto di mancanza di riferimenti metodologici, si è sviluppato il concetto Safe by Design (Framework for Sustainability Assessment of Restoration Materials and Formulations), una valida strategia che garantisce la sicurezza dei nuovi prodotti nella fase di progettazione degli stessi, mantenendo le loro prestazioni e le loro funzionalità completamente integre (Gottardo et al., 2016; Noorlander et al., 2016b).

L'implementazione di questo concetto nel campo del ripristino e della conservazione dei beni culturali è essenziale ed innovativo, dal momento che fino ad ora questo settore è stato per lo più guidato da aspetti strettamente tecnici (ad es. la compatibilità con i materiali artistici, la controllabilità e la selettività del trattamento) (Baglioni et al., 2013), mentre gli aspetti relativi alla sicurezza e alla sostenibilità dei prodotti non sono mai stati approfonditi.

Dal punto di vista normativo, in Europa i regolamenti REACH (European Commission, 2006) e CLP (Classification, Labelling, Packaging, European Commission, 2008) rappresentano le

normative di riferimento per la valutazione della sicurezza e per la gestione dei nanomateriali per il restauro, quando questi si presentano sotto forma di sostanze o di miscele.

Tali normative forniscono i confini per la valutazione della sicurezza chimica dei nuovi formulati lungo il loro ciclo di vita e preparano il terreno ad un approccio più comprensivo per affrontare le varie questioni legate alla sostenibilità dei nuovi prodotti in cui le informazioni riguardanti il contesto ambientale, quello economico e quello sociale possono essere integrate in accordo con l'approccio della Triple Bottom Line (TBL)(Elkington et al., 1997).

Al fine di guidare la Valutazione dei potenziali impatti dei prodotti NanoRestArt così come la loro complessiva sostenibilità, nell'ambito del WP6 è stato prodotto un Framework SbD in accordo con il vigente contesto legislativo europeo in merito alle caratteristiche specifiche del processo di innovazione nel settore del restauro, che richiede una stretta collaborazione tra gli sviluppatori/formulatori dei prodotti ed i restauratori (Ormsby et al., 2016; Baglioni et al., 2015). Questo framework si propone di assistere i formulatori nelle primissime fasi della progettazione dei nuovi prodotti ed è volto a facilitare la comunicazione tra i conservatori, in modo che questi ultimi possano selezionare i più sicuri e sostenibili prodotti a base nano ed utilizzarli non solo nel campo del restauro delle opere d'arte ma anche in altri contesti del settore della conservazione.

### **Autoclassificazione secondo il regolamento CLP**

Il processo di autoclassificazione rappresenta uno dei passaggi chiave del processo SbD sviluppato nell'ambito di NanoRestArt.

Il regolamento 1272/2008/UE "CLP" (Classification, Labelling and Packaging) è la norma comunitaria che introduce in Europa un sistema di classificazione relativo alla classificazione, etichettatura ed imballaggio delle sostanze chimiche (e delle loro miscele) è stato allineato al sistema mondiale di classificazione ed etichettatura delle sostanze chimiche (GHS).

Gli obiettivi del CLP sono:

- facilitare la libera circolazione, nell'Unione Europea, delle sostanze e delle miscele, garantendo un elevato livello di protezione della salute umana e dell'ambiente;
- determinare quali proprietà di una sostanza o di una miscela portino a classificarla come pericolosa;
- comunicare i pericoli delle sostanze e delle miscele dal produttore al consumatore.

La classificazione del pericolo è un processo che coinvolge l'identificazione del pericolo chimico-fisico (PH), del pericolo per la salute umana (H) e del pericolo per l'ambiente (ENV) provocato da una sostanza o da una miscela, e la suddivisione in categorie che specificano la gravità del pericolo. Secondo il regolamento CLP è responsabilità dei fornitori (imprese produttrici e importatori) decidere in merito alla classificazione di una sostanza o una miscela di sostanze; in altre parole, si tratta di una autoclassificazione del prodotto a carico diretto di produttore o importatore.

Per poter autoclassificare una sostanza o una miscela è necessario:

- raccogliere le informazioni disponibili in merito al potenziale pericolo associato ad una sostanza (o miscela);
- esaminare l'attendibilità delle informazioni e cogliere le più rilevanti; valutare le informazioni rispetto ai criteri di classificazione;
- decidere se la sostanza (o miscela) può essere classificata come pericolosa in relazione alle classi di pericolo descritte nell'Allegato I del CLP ed il relativo grado di pericolo.

Nell'allegato I del CLP si specificano i principi che consentono ai fornitori di derivare la classificazione H o ENV delle miscele sulla base dei dati disponibili per le miscele e/o per gli ingredienti che costituiscono ogni sostanza. Si provvedono, inoltre, le regole specifiche per la classificazione delle miscele sulla base della classificazione di ciascuna sostanza che caratterizza la miscela. Se, come molto spesso succede, non dovessero essere disponibili le informazioni riguardanti i singoli componenti della miscela, la classificazione deve essere basata sulle soglie di concentrazione che si riferiscono alle sostanze classificate presenti nella miscela.

Quanto appena descritto è l'approccio impiegato nel progetto NanoRestArt per l'autoclassificazione dei nuovi formulati, a base nano e non, per il restauro delle opere d'arte moderne e contemporanee, in fase preliminare rispetto all'inizio delle indagini ecotossicologiche.

Nello specifico, è necessario essere in possesso della lista di tutti gli ingredienti che caratterizzano i formulati, delle Schede Di Sicurezza (SDS) includendo la classificazione del potenziale pericolo H e ENV in accordo con il regolamento CLP, e la percentuale (w/w come singolo valore o intervallo) di ciascuna componente presente nella formulazione iniziale.

In alcuni casi le Schede Di Sicurezza (SDS) per ciascun prodotto non sono disponibili, ad esempio perché l'ingrediente è di nuova sintesi oppure è presente in una specifica forma nano. In questi casi, è opportuno indicare che il pericolo per H o per ENV è sconosciuto per una determinata percentuale della formulazione (ad es. la %w/w dello specifico ingrediente).

In un secondo momento, i risultati ottenuti dalla valutazione del potenziale pericolo di ciascuna sostanza, con le relative categorie del grado di pericolo, sono stati comunicati ai formulatori in modo che questi possano correggere la formulazione iniziale del prodotto andando così a ridurre la pericolosità, oppure, decidere di non utilizzare un dato ingrediente (perché estremamente pericoloso) e sostituirlo con un altro che garantisca la stessa performance ed una pericolosità inferiore.

### **Valutazione ecotossicologica secondo l'Integrated Testing Strategy (ITS)**

Una strategia integrata di valutazione (ITS) consiste in uno schema di tipo gerarchico, suddiviso in differenti step e costituito da un insieme di nodi decisionali, che sulla base delle informazioni in possesso, permette di privilegiare una strada piuttosto che un'altra e permette di guidare il processo decisionale relativo ad un pericolo o rischio chimico (Hengstler et al., 2006; Van Leeuwen et al., 2007).

Le prime ITS sono nate nella metà degli anni Novanta nell'ambito di diverse ricerche ed iniziative che si proponevano di ridurre e di sostituire la sperimentazione animale ingiustificata (*in vitro*, *in vivo*) utilizzando una combinazione di metodi alternativi, i cosiddetti metodi di non testing *in silico* e *read across* (Blaauboer et al., 1999; Hakkinen and Green, 2002; Salem and Katz, 2003; Vermeire et al., 2007); tali strategie hanno avuto una considerevole espansione dopo l'introduzione del regolamento REACH nel 2006 (Jaworska et al., 2010).

Qualsiasi strategia ITS dovrebbe essere studiata per soddisfare uno scopo specifico, mantenendo un giusto equilibrio tra l'ambito di applicazione, le informazioni sufficienti, il costo e la fattibilità sperimentale della sperimentazione (Natsch, 2014). L'interruzione di una sequenza di test nell'ambito di una strategia ITS dipende molto dal livello di conoscenza che si desidera raggiungere e dallo scopo per cui si sta eseguendo una valutazione tossicologica.

Come riportato nel Working Group 10 di NanoSafety (Oomen et al., 2014) gli Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) che da letteratura si riferiscono alle ITS, sono necessari per una valutazione adeguata dell'impatto dovuto ai nanomateriali sulla salute umana e sull'ambiente.

Questi, infatti, dovrebbero:

- 1) essere in linea con le attuali linee guida dell'Unione Europea sulla sicurezza dei test con i nanomateriali;
- 2) considerare le situazioni di reale esposizione per valutare la tossicità delle forme più rilevanti dei nanomateriali lungo il ciclo di vita;
- 3) includere la possibilità di raggruppare i nanomateriali in categorie ben definite.

Attualmente NanoSafety sta sviluppando una completa Integrated Approches to Testing and Assessment (IATA) che dovrebbe essere ultimata entro il 2020 (Oomen et al., 2014).

Nel frattempo, Oomen ed i colleghi hanno presentato una prima versione degli approcci integrati di test tossicologici ed ecotossicologici con i nanomateriali, e di valutazione, nella quale si adotta una struttura a più livelli che permette di condurre nella prima fase i test più generici (ad es. i test *in vitro* di tossicità a breve termine) e nelle fasi successive i test via via più specifici (ad es. i test *in vivo* per la definizione della tossicità dovuta ai nanomateriali, e studi di ecotossicità con simulazioni ambientali).

In questo processo un grande aiuto è dato dalla possibilità di raggruppare i nanomateriali in categorie (quindi rinunciando a qualche test) e dall'identificazione delle principali vie di esposizione (evitando in questo modo test inutili).

Nel caso di NanoRestArt i prodotti (e le miscele) attualmente in fase di sviluppo contengono percentuali davvero molto esigue di nanomateriali, per questo motivo possiamo aspettarci che i valori di ecotossicità risultanti dai test condotti possano maggiormente essere dovuti alla presenza di altri ingredienti (ad es. solventi) più che alla presenza di nanoparticelle.

Ad ogni modo, l'esposizione alle nanoparticelle lungo il ciclo di vita non può essere completamente esclusa a priori. Infatti le acque dolci ricevono i nanomateriali che sono stati rilasciati dai manufatti artistici trattati, mentre le acque reflue ricevono tutti i prodotti residuali, impattando in questo modo l'intero comparto ecologico, oltre che avendo effetti anche sulla salute umana.

Per queste ragioni, il comparto acquatico è stato identificato come il principale recettore sul quale condurre la valutazione dei potenziali impatti ambientali dovuti all'utilizzo dei nuovi prodotti di NanoRestArt.

Basandoci su queste considerazioni, è stata adottata da NanoRestArt, per la valutazione avanzata del pericolo, la Integrated Testing Strategy (ITS) di seguito riportata in maniera schematica.

### **1. Valutazione della tossicità acuta (Acute Aquatic Toxicity)**

Il primo step consiste in una serie di test acuti con crostacei (48 ore) ed alghe (72 ore), secondo le metodiche standard OECD 202 e OECD 201 rispettivamente, per la determinazione della tossicità nel breve termine per sostanze e miscele, in riferimento all'applicazione dei criteri CLP (ECHA, 2017).

Il MICROTOX è un test acuto (metodo standard ISO 11348) che è stato incluso nel set di saggi proposti nel progetto NanoRestArt al fine di poter prendere in considerazione anche i possibili effetti tossici delle sostanze chimiche e delle formulazioni attraverso la comunità microbica acquatica, una componente chiave del comparto acquatico non rappresentata dalle specie selezionate per condurre i test di tossicità previsti dalle attuali linee guida CLP.

Lo scopo del test acuto è di individuare la concentrazione che comporta un effetto di tossicità sul 50% degli individui esposti ( $EC_{50}$ ).

In accordo con la procedura CLP soltanto le formulazioni che presentano una  $EC_{50} < 1 \text{ mg l}^{-1}$  sono considerate acutamente tossiche (Acuto 1).

Se questo criterio non viene soddisfatto per nessuna specie, il test tossicologico prosegue con il secondo step.

### **2. Valutazione della tossicità cronica (Chronic Aquatic Toxicity)**

Il secondo step ha lo scopo di valutare la tossicità cronica dei nuovi formulati NanoRestArt attraverso la valutazione degli effetti a lungo termine sulla riproduzione di *D. magna* (OECD 211). Dal momento che il presente lavoro di tesi è volto ad approfondire proprio questo secondo step, maggiori chiarimenti verranno specificati nei capitoli successivi.

### **3. Valutazione di eventuali effetti mutageni (Testing for DNA Damage and Mutagenicity)**

Il terzo ed ultimo step ha lo scopo di verificare i possibili effetti di citotossicità, di danni al DNA e di mutagenicità che non possono essere rilevati applicando i soli test di tossicità acuta e cronica. A questo fine, il set di saggi ecotossicologici è stato ampliato con un saggio biologico *umu* - SOS-Chromotest (ISO 13829), un test a breve termine che serve per valutare il potenziale genotossico di composti chimici, e si basa sulla capacità degli agenti DNA offensivi di indurre l'espressione dell'operone *umu*; il gene *umu* è essenzialmente coinvolto nella mutagenesi batterica attraverso la risposta SOS.

L'*umu* - SOS-Chromotest ha il vantaggio di avere la sua procedura codificata sotto ISO 13829 "Water Quality- Determination of genotoxicity of water and waste water using the *umu*-test", e

anche se basato sui ceppi batterici, fornisce velocemente informazioni di screening anche sul potenziale genotossico per la valutazione del pericolo umano ed ecologico.

Parallelamente ai test ecotossicologici sono stati performati anche la caratterizzazione colloidale ed i test di lisciviazione per le formulazioni innovative, al fine di comprendere quale sia il loro comportamento ed il loro destino nel comparto ambientale.

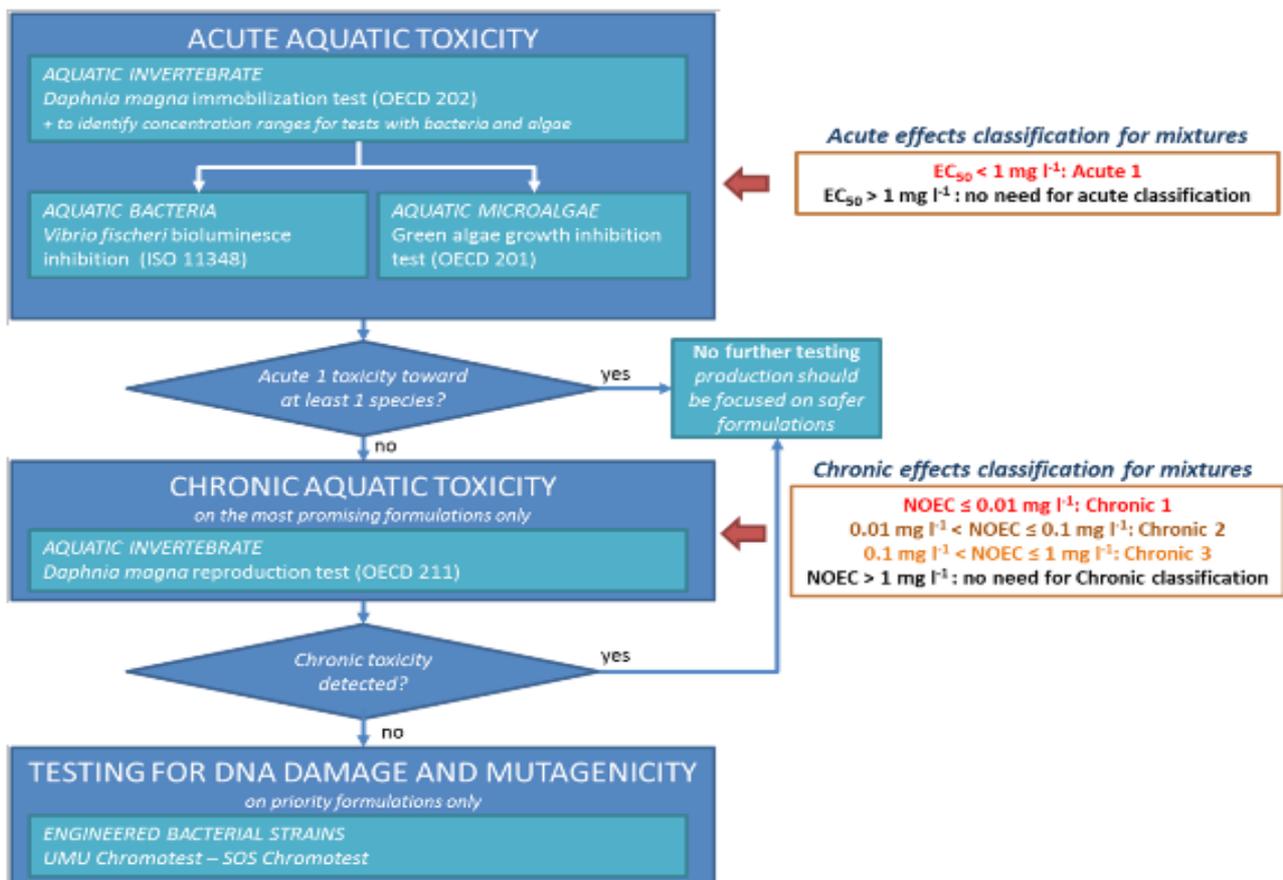


Fig. 1 Integrated Testing Strategy (ITS) adottata da NanoRestart per la valutazione avanzata del pericolo

## 2.1 OBIETTIVI DELLO STUDIO

Il presente lavoro di tesi si inserisce nel secondo livello dell'approccio ecotossicologico sviluppato nella ITS sopra descritta (e riportata in *Fig. 1*), corrispondente alla "Chronic Aquatic Toxicity", con l'obiettivo di valutare la tossicità cronica dei formulati di nuova sintesi attraverso la valutazione degli effetti a lungo termine sulla riproduzione con *Daphnia magna*.

Il test cronico di riproduzione con *D. magna* è l'unico test previsto dalla OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development) (OECD 211), in accordo anche con il documento guida CLP, per la caratterizzazione degli effetti a lungo termine (21 giorni) relativi alla sopravvivenza, al tempo trascorso dalla prima schiusa, e al numero di figli partoriti per femmina adulta dopo essere state esposte a sostanze chimiche e miscele.

L'obiettivo cardine del test cronico con *D. magna* è l'identificazione della NOEC (No Observed Effect Concentration), che si riferisce a quella concentrazione di campione alla quale gli organismi possono essere esposti senza che i valori dei parametri misurati siano statisticamente distinguibili da quelli del gruppo di controllo (in questo caso i parametri indagati sono stati il numero di figli partoriti ed il tasso di sopravvivenza).

In accordo con il regolamento previsto dalla CLP, i valori della NOEC compresi nell'intervallo 0.1-1 mg l<sup>-1</sup> portano ad una classificazione del prodotto come "Cronico 3", quelli compresi nell'intervallo 0.01-0.1 mg l<sup>-1</sup> alla classificaione "Cronico 2", mentre quelli che presentano una NOEC ≤ 0.01 mg l<sup>-1</sup> vengono classificati come "Cronico 1", la classe più pericolosa per gli effetti a lungo termine.

Inoltre, dal momento che lo scopo del presente lavoro è quello di valutare se i nuovi prodotti che verranno utilizzati dai conservatori in fase di restauro e di conservazione del patrimonio culturale sono tossici per l'ambiente, e, premettendo che molto presumibilmente sarà il comparto aquatico a ricevere tali prodotti e miscele, si è ritenuto opportuno affiancare alla valutazione prima descritta delle misure di tossicità subcronica in ambiente marino conducendo un test di embriotossicità mediante l'impiego di embrioni del mollusco bivalve *Mytilus galloprovincialis*.

La valutazione della tossicità associata ai nuovi formulati che sono stati utilizzati nel test si basa sulla percentuale delle larve-D (primo stadio della larva veliger) normalmente sviluppatasi in seguito all'esposizione ai formulati prodotti nell'ambito di NanoRestArt.

### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1 I NUOVI FORMULATI

I prodotti di nuova sintesi proposti nel progetto NanoRestArt, che andranno a sostituire i prodotti convenzionali utilizzati fino a questo momento per il ripristino e la conservazione delle opere d'arte moderne e contemporanee, sono di seguito elencati per tipologia e impiego, e si fa una sommaria descrizione della loro composizione. Si ricorda che trattandosi di prodotti per cui sussiste il segreto industriale ed esiste la possibilità di deposito di brevetti, non si può riportare nel dettaglio l'elenco e la quantità degli ingredienti impiegati.

Nel presente lavoro di tesi sono stati selezionati i 7 formulati ritenuti, a seguito dell'acquisizione dei risultati di autoclassificazione e del primo step di valutazione ecotossicologica (valutazione della tossicità acuta), quelli più promettenti per gli obiettivi di conservazione e meno impattanti dal punto di vista ambientale.

Proprio in ragione della possibile introduzione nel mercato di questi prodotti, si rende necessaria un'analisi più approfondita, che vada a verificare se questi formulati possono rappresentare un rischio per il biota nel medio-lungo termine, ovvero se sussista il rischio che possano emergere effetti di tossicità cronica (esposizione a lungo termine a basse concentrazioni) che rappresenta una condizione più comune in ambiente rispetto all'esposizione acuta su cui si basa il primo step del processo ITS e su cui si basa anche l'autoclassificazione secondo CLP.

In questa seconda fase del processo ITS si è dunque proceduto con la valutazione della tossicità cronica utilizzando il test di riproduzione con *D. magna*, come previsto dalla procedura ITS descritta al Capitolo 2. In più, al fine di fare una prima valutazione dei possibili effetti in ambiente marino, in questo lavoro si è eseguito anche il test di sviluppo larvale con *M. galloprovincialis*.

#### **Formulati proposti nell'ambito del WP2 – Formulazioni per la pulizia**

Tra tutti i nuovi prodotti proposti nel WP2, il cui obiettivo è quello di sviluppare sistemi per la pulizia controllata (come ad esempio gel altamente ritentivi per il confinamento degli enzimi e fluidi nanostrutturati a base di tensioattivi "green") è stato selezionato il formulato **G1-Ncap**, prodotto dal Consorzio Interuniversitario per lo Sviluppo dei Sistemi a Gradiente Interfase (CGSI). Stando all'auto classificazione CLP il formulato G1-Ncap presenta due pericoli per la salute umana (H), ovvero seri danni alla vista (CAT. 1) e irritazione del tratto respiratorio (STOT SE CAT. 3).

Il formulato comunque non comporta alcun rischio per l'ambiente acquatico.

G1-Ncap non contiene alcun ingrediente a base nano; è costituito prevalentemente da acqua (per il 60%), da una miscela di solventi organici, da uno specifico reagente impiegato per la sintesi dei polimeri, ed infine, dall'ingrediente Ncap, che secondo l'auto classificazione CLP costituisce il formulato G1-Ncap per il 5% ma, essendo un prodotto di nuova sintesi non dispone di una propria scheda di sicurezza (SDS); di conseguenza, non ne sono noti i possibili rischi per la salute umana (H) e per l'ambiente (ENV).

### **Formulati proposti nell'ambito del WP3 – Rafforzamento delle superfici e consolidamento**

Tra i nuovi prodotti proposti nel WP3, il cui obiettivo è lo sviluppo di sistemi per il rinforzo ed il consolidamento delle superfici (quali materiali a base di silice per il rinforzo meccanico di materiale tessile a base di cotone), sono stati selezionati i seguenti formulati:

Silica/PEI/CMC, CNF, CSGI 1(+) e CSGI 2(-).

Stando all'auto classificazione CLP i formulati **Silica/PEI/CMC** e **CNF** non sono classificabili, dal momento che risulta assente qualsiasi tipologia di rischio desumibile a partire dalla loro formulazione. Tuttavia, bisogna sottolineare come il formulato Silica/PEI/CMC contenga, seppure in percentuale molto bassa, (0.01%) l'ingrediente Polietilenimmina (PEI).

Il PEI è l'unico ingrediente classificato come "pericoloso" per l'ambiente acquatico (CAT. 2) tra tutti quelli utilizzati per lo sviluppo delle formulazioni per il consolidamento ed il rinforzo delle superfici; tuttavia, il suo uso in bassissima concentrazione in Silica/PEI/CMC non lo qualifica per l'inserimento di questo specifico pericolo nell'autoclassificazione.

Il formulato CNF, invece, è l'unico tra quelli sviluppati nel WP3 a non contenere l'ingrediente PEI, ma risulta costituito per il 99% da acqua e per l'1% da nanofibrille di cellulosa, per cui, con buona probabilità, eventuali effetti tossici possono essere relazionati solamente all'azione (meccanica o chimica) di queste ultime.

Per quanto riguarda i formulati **CSGI 1(+)** e **CSGI 2(-)**, essi sono classificati dalla CLP come in grado di generare irritazione agli occhi (CAT. 2), mentre non risultano classificabili per il 2% della loro composizione, legata alla presenza di carbonato di calcio in forma nano.

L'autoclassificazione non evidenzia pericoli per l'ambiente acquatico.

Sono simili in termini di costituenti chimici (si differenziano per l'assenza in CSGI 1(+) di carbossimetil-cellulosa) e sono costituiti in buona parte (> 85%) da una miscela di acqua ed etanolo. Entrambi sono caratterizzati dallo stesso contenuto sia per quanto concerne la componente a base nano e sia per il PEI.

### **Formulati proposti nell'ambito del WP4 – Protezione delle superfici**

Tra i nuovi prodotti proposti nel WP4, il cui obiettivo è lo sviluppo di sistemi per la protezione delle superfici per mezzo di nanoparticelle e di sistemi supramolecolari (compresi i rivestimenti attivi e passivi per substrati polimerici metallici e plastici), sono stati selezionati due formulati:

la **Formulazione 3** e la **Formulazione 4**.

L'auto classificazione CLP indica che ciascuna Formulazione presenta un solo pericolo per la salute umana (H) (irritazione agli occhi, CAT. 2) e nessun rischio per l'ambiente acquatico.

Le Formulazioni 3 e 4 sono sostanzialmente delle sospensioni a base di acqua ed etanolo, costituite dagli stessi ingredienti chimici, con l'eccezione dell'ingrediente HAVOH (alcol polivinilico amorfo; la sua presenza sembra stabilizzare la formulazione), presente nella Formulazione 4, ma assente in Formulazione 3; possibili effetti tossici di questi formulati possono essere dovuti alla presenza dell'1H-benzotriazolo e dell'etanolo (Et-OH).

### 3.2 Test cronico di riproduzione con *Daphnia magna*

#### **Principio del saggio**

Dal momento che vogliamo testare gli effetti a lungo termine dovuti all'impiego dei nuovi formulati NanoRestart, si è ritenuto opportuno condurre il test cronico di riproduzione con il crostaceo *Daphnia magna*, al fine di ottenere una valutazione ecotossicologica realistica della potenziale tossicità ambientale dovuta all'impiego dei nuovi prodotti sopra descritti.

A tale scopo, femmine di età inferiore a 24-h sono state esposte ai formulati di nuova sintesi prescelti ed al termine dei 21 giorni di esposizione si è valutata la prole totale prodotta per ciascun organismo di partenza (generazione parentale).

Tale saggio è stato condotto dopo aver conseguito i risultati del saggio acuto di immobilizzazione (OECD 202), al fine di non sottoporre la generazione parentale a concentrazioni che potevano comprometterne la sopravvivenza nell'arco dei 21 giorni di esecuzione del saggio.

Per quanto riguarda gli aspetti metodologici e procedurali riguardanti il test cronico di riproduzione con *D. magna*, si sono prese come riferimento le linee guida OECD (Guidelines for Testing of Chemicals) ed in particolare la “*Daphnia magna* Reproduction Test” (OECD 211).

Questa linea guida richiede che la specie da utilizzare nel saggio di tossicità cronica sia il crostaceo *D. magna* Straus, perché identificato essere un indicatore molto sensibile alle sostanze tossiche, ha dei tempi di riproduzione molto brevi e fornisce risposte affidabili in tempi relativamente brevi.

#### ***Daphnia magna*, caratteristiche generali**

La *D. magna* è un artropode di piccole dimensioni (gli individui adulti possono raggiungere i 5-6 mm mentre i piccoli arrivano non appena al millimetro) che possiede un carapace trasparente ricoprente non solo la camera incubatrice posta dorsalmente, fungendo da protezione per lo sviluppo delle uova e la crescita iniziale dei neonati, ma anche l'intero tronco comprese le appendici. Le funzioni natatorie sono quindi svolte dal secondo paio di antenne.

Nella parte anteriore, a livello del tronco, composto da un basso numero di segmenti, si dipartono soltanto cinque paia di appendici uguali tra di loro e non sono segmentate; questo è un chiaro indice di primitività evolutiva. Tali appendici sono relativamente mobili (nonostante la presenza del carapace) e assicurano perciò il continuo contatto e ricambio d'acqua all'interno del carapace,

condizione necessaria per la sopravvivenza in quanto *D. magna* porta dentro al medesimo anche le superfici respiratorie.

In condizioni normali la *D. magna* si riproduce per partenogenesi; una popolazione di daphnidi è quindi composta *in toto* da femmine adulte e giovani di varia età, il cui corredo genetico è uguale; sono madri e allo stesso tempo sorelle le une delle altre.

Questo aspetto è di fondamentale importanza, infatti è questo il principale motivo per cui questi organismi sono tanto usati per i test tossicologici: lavorando con organismi *in vivo* viene ad essere eliminata una grossa variabile, quella genetica.

La riproduzione sessuata, invece, ha luogo in risposta a stimoli ambientali negativi, per cui alcuni organismi neonati (sotto influsso ormonale) diventano maschi (simili dal punto di vista morfologico ma di dimensioni molto più ridotte) che si accoppiano con le femmine adulte.

Queste, in condizioni di stress ambientale, reagiscono riassorbendo le uova nella camera incubatrice, e una volta accoppiatesi producono una forma di resistenza, l'efippio, composta da due sole uova che non si sviluppano, ma avvolte da uno spesso strato di carapace (tipicamente di colore nero). L'efippio viene rilasciato e si svilupperà solo se le condizioni ambientali saranno cambiate, diventando favorevoli alla proliferazione di altre generazioni partenogenetiche.

## **Il test cronico**

In accordo con il Framework ITS (Integrated Testing Strategy) adottato da NanoRestArt (*Fig. 1*) sono stati selezionati 7 formulati (per la descrizione si veda il paragrafo 3.1) per condurre il test cronico di riproduzione con *D. magna*, con l'obiettivo di identificare i possibili danni nella sopravvivenza e nella riproduzione dovuta all'esposizione del crostaceo con i suddetti formulati. Femmine di *D. magna* di età inferiore alle 24-h sono state singolarmente esposte per un arco temporale di 21 giorni in condizioni di semi-staticità in un beaker da 100 mL contenente 50 mL di medium M4 (OECD 202, Allegato 3) (si veda Allegato I per composizione) e due distinte concentrazioni della sostanza da testare, una a concentrazione 0.1 mg l<sup>-1</sup> e l'altra a concentrazione 1.0 mg l<sup>-1</sup>.

La scelta di queste due concentrazioni è stata eseguita in considerazione dei seguenti criteri:

- la necessità di impiegare concentrazioni sufficientemente basse (idealmente rappresentative di esposizioni ambientali) da non pregiudicare la sopravvivenza degli individui a seguito di un periodo di esposizione prolungato;
- la necessità di utilizzare delle concentrazioni che siano rappresentative di soglie poste in essere dal regolamento CLP per un immediato confronto con le procedure di classificazione;

- costrizioni legate alla tipologia di prodotto (sospensioni di nanoparticelle, sospensioni di prodotti non sempre idrosolubili con tendenza a flocculare) che non consente di predisporre soluzioni a concentrazioni molto basse ( $< 0.1 \text{ mg l}^{-1}$ ) senza il rischio di incorrere in significativi errori di diluizione.

Le concentrazioni dei test sono state preparate a partire da soluzioni stock a  $1000 \text{ mg l}^{-1}$ , ottenute dalla diluizione dei prodotti da testare con il medium M4 Elendt e con aliquote note di sospensioni alimentari costituite dall'alga verde unicellulare *Pseudokirchneriella subcapitata* (somministrata *ad libitum* in modo tale da garantire un minimo di 0.1-0.2 mg C al giorno) (si veda Allegato II).

Le soluzioni da testare sono state rinnovate tre volte alla settimana (il lunedì, il mercoledì ed il venerdì); le femmine di *D. magna* sono state trasferite di volta in volta in beaker puliti utilizzando una pipetta Pasteur, prestando attenzione a non danneggiare gli esemplari.

Il numero di piccoli partoriti da ciascuna femmina adulta di *Daphnia* è stato conteggiato tre volte alla settimana, dopo il rinnovo delle soluzioni test.

Il numero di repliche che sono state eseguite è stato di 15 per il campione di controllo, mentre di 10 per ciascuna concentrazione testata.

Al termine dei 21 giorni di esposizione di *D. magna* alle suddette concentrazioni per ciascun prodotto, sono state registrate la capacità di sopravvivenza e quella di riproduzione delle femmine adulte di *D. magna* esposte, e, in un secondo momento, sono state comparate con quelle relative al campione di controllo, contenente solamente il medium M4 (Elendt).

I dati "grezzi" relativi alla produzione dei nuovi nati ottenuti dal test cronico (per ciascun formulato a due distinte concentrazioni) e quelli relativi alla capacità riproduttiva di *D. magna* ottenuti dal campione di controllo sono stati elaborati per mezzo dell'analisi della varianza (One-Way Analysis of Variance, ANOVA) e comparati tra di loro per mezzo del test LSD di comparazione multipla di Fisher (Least Significant Difference).

Queste due analisi statistiche hanno così permesso di quantificare le differenze significative in termini di capacità riproduttiva delle *D. magna* tra il campione di controllo e le 7 soluzioni da testare.

Tuttavia è da specificare che per poter eseguire il test dell'analisi della varianza (One-Way ANOVA) è stato necessario verificare la normalità e l'omogeneità delle varianze (omoschedasticità) dei dati grezzi, rispettivamente con i test di Kolomogorov-Smirnov e di Levene.

Inoltre, quando le condizioni di normalità e di omogeneità delle varianze non sono state soddisfatte, sono stati applicati il test Kruskal-Wallis ANOVA ed il test non parametrico Mann-Whitney U-test per controllare le differenze significative.

Tutte le analisi statistiche sono state performate impiegando la StatSoft Statistica v.7.0; e le differenze sono state considerate significative ad un livello di confidenza  $\alpha = 0.05$ .

### **Procedura di controllo qualità (QA/QC)**

I saggi sui campioni da sempre sono interessati a seguire una procedura di garanzia di qualità e di controllo di qualità (QA/QC), finalizzata a valutare la sensibilità dei bioindicatori ed il corretto funzionamento delle apparecchiature utilizzate, oltre che la loro pulizia.

Per quanto riguarda il test cronico con *D. magna*, la procedura di QA/QC prevede:

- 1) l'esecuzione di un controllo positivo con il tossico di riferimento, il rame (Cu), per ogni cultura utilizzata durante il periodo di sperimentazione (test acuto);
- 2) l'esecuzione di un controllo negativo (contenente soltanto il mezzo di diluizione) per ciascuna sessione di test.

I criteri di accettabilità prevedono che la sopravvivenza di *D. magna* sia pari al 90%, o superiore, nel controllo negativo e che la concentrazione che determina il 50% di effetto ( $EC_{50}$ ) per il rame (Cu) rientri nell'intervallo 50-110  $\mu\text{g l}^{-1}$ .

Inoltre, affinché i risultati del saggio siano accettabili, devono essere soddisfatti anche alcuni criteri caratteristici dell'esposizione cronica, ovvero:

- 1) la mortalità delle femmine adulte di *D. magna* nel controllo al termine del test sia  $\leq 20\%$ ;
- 2) il numero medio di piccoli prodotti dalle femmine adulte vive nel controllo sia  $> 60$ ;
- 3) il coefficiente di variazione per la fecondità nel controllo non deve superare il 20%;
- 4) gli organismi del controllo devono effettuare la prima schiusa entro i primi 11 giorni dall'inizio del test.

## Materiali e strumentazione

Per l'esecuzione del saggio, oltre alla normale strumentazione di laboratorio, sono necessari:

- una serie di recipienti con volume utile di 50 mL, che possano essere chiusi ermeticamente per consentire la valutazione della tossicità di sostanze volatili; a questo fine vengono utilizzati recipienti in vetro borosilicato o in plastiche fluorurate;
- ambiente controllato: il saggio viene eseguito in condizioni alterne di luce (16 ore) e di buio (8 ore) e, a tal fine, occorre disporre di una camera oscurabile e di un sistema di illuminazione che consenta di ottenere 1000 lux a livello delle vasche (lampade fluorescenti con indice di resa cromatica  $\geq 90$ ) e circa 300 lux sul piano di lavoro, fornito di temporizzatore per il controllo del fotoperiodo;
- ambiente con temperatura controllata: visto che le soluzioni poste nei recipienti da 50 mL devono essere mantenute a temperatura costante, è richiesto un sistema di termoregolazione (una camera termostatica) atto al mantenimento della temperatura dei liquidi in esame nell'ambito di  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ;
- un sistema di aerazione a bassa portata e pressione provvisto di diffusori a pietra porosa del tipo da acquario (da evitare nel caso di prodotti con ingredienti volatili);
- beaker in vetro con una capacità di 3 L per il mantenimento delle colture.

## Acqua per l'allevamento e la diluizione dei campioni

Per l'allevamento e l'esecuzione del test con *D. magna* si possono utilizzare le acque di rete non clorate, di falda o di un corpo idrico superficiale purché non siano contaminate. Si preferiscono le acque con una maggiore stabilità delle caratteristiche chimico-fisiche. Qualunque sia l'acqua impiegata, l'aerazione per 24 ore ed un trattamento con carbone attivo, preceduti nel caso di acque superficiali da filtrazione su membrane di  $0.22 \mu\text{m}$ , assicurano un netto miglioramento della qualità. Se necessario, l'acqua trattata va corretta in alcuni dei suoi costituenti maggiori per ottenere approssimativamente una durezza di  $150 \text{ mg CaCO}_3/\text{L}$ , un rapporto  $\text{Ca/Mg}=4$  e  $\text{Na/K}=10$ . La diluizione viene effettuata con acqua deionizzata o distillata filtrata su carbone attivo o con acqua Milli Q, mentre gli aumenti di concentrazione si ottengono per aggiunta di sali di grado analitico (es.  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{KCl}$ ).

L'acqua così preparata va saggiata per verificare l'idoneità all'allevamento di *D. magna*.

A questo scopo si utilizza un gruppo almeno di 10 organismi, di età inferiore alle 24 ore, mantenuti in 500 mL di acqua ed alle condizioni previste per l'allevamento. Ogni 48 ore si provvede al

trasferimento in altri 500 mL di mezzo fresco, all'aggiunta di cibo nelle quantità indicate ed alla conta, previa rimozione, dei daphnidi prodotti.

La prova ha una durata di due settimane, corrispondenti a tre schiuse. Le condizioni di idoneità dell'acqua di allevamento si hanno se:

- 1) la prima schiusa avviene entro il nono giorno;
- 2) il numero medio complessivo dei neonati per femmina dopo tre schiuse è superiore a 20 e preferibilmente prossimo a 60;
- 3) la mortalità non supera il 20%.

Nel caso specifico della sperimentazione condotta sui formulati di NanoRestArt, il medium utilizzato per l'allevamento degli organismi e come acqua di diluizione per il saggio è il medium M4 (Elendt, 1990), la cui preparazione e composizione è riportata in Allegato I.

Tale medium ha rispettato tutti i criteri sopra elencati ed ha garantito il mantenimento di una coltura feconda e di individui in grado di soddisfare i requisiti di accettabilità per i test acuti e cronici con *D. magna*.

Prima dell'inizio del saggio, il medium utilizzato per il controllo e le eventuali diluizioni deve possedere le seguenti caratteristiche:

- 1) la concentrazione di ossigeno disciolto deve essere  $> 3$  mg/L;
- 2) il pH deve rientrare nel range 6-9 con variazioni contenute entro 1.5 unità alla fine del test;
- 3) la durezza  $>140$  mg/L di  $\text{CaCO}_3$ ;

### 3.3 Test di embriotossicità con *Mytilus galloprovincialis*

#### Principio del saggio

Il mollusco bivalve *M. galloprovincialis* è una specie ampiamente utilizzata in ecotossicologia, come dimostra l'abbondanza di protocolli (His et al., 1997; Volpi Ghirardini et al., 2005) e metodiche standardizzate (ASTM, 1998; USEPA, 1995) presenti in letteratura.

Per l'applicazione ai formulati sintetizzati in ambito di NanoRestArt, la procedura adottata per l'esecuzione del saggio con il mitilo è quella proposta da Volpi Ghirardini et al., 2005.

L'obiettivo del saggio consiste nell'esposizione di embrioni bivalvi ottenuti per miscelazione di sospensioni di gameti ottenuti per stimolazione termica, ad una serie di concentrazioni di campione e ad un controllo, al fine di stimare la concentrazione che induce malformazioni o ritardi nello sviluppo in almeno il 50% degli organismi esposti ( $EC_{50}$ ).

Il test di embriotossicità è stato eseguito con acqua marina come medium di diluizione (previa filtrazione a 0.2  $\mu\text{m}$  in laboratorio) e concentrazioni crescenti delle sostanze da testare.

Nello specifico, sono state preparate nove piastre, di cui sette contenenti ciascuna un formulato diverso a concentrazione crescente, ovvero 0.01  $\text{mg l}^{-1}$ , 0.1  $\text{mg l}^{-1}$ , 1  $\text{mg l}^{-1}$ , 10  $\text{mg l}^{-1}$ , 100  $\text{mg l}^{-1}$ , 1000  $\text{mg l}^{-1}$ ; una piastra di controllo positivo contenente il tossico di riferimento (Cu) a concentrazioni nel range 0.06 – 0.60  $\text{mg l}^{-1}$ , ed una piastra di controllo negativo contenente soltanto l'acqua marina filtrata.

Per ciascuna sostanza da testare sono state eseguite tre repliche e ciascun test di embriotossicità con la sostanza indagata è stato eseguito in parallelo.

In un secondo momento i risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli disponibili in letteratura. L' $EC_{50}$  per la sostanza di riferimento (Cu) è stata calcolata utilizzando il software Trimmed Spearman-Kärber, distribuito dalla United States Environmental Protection Agency.

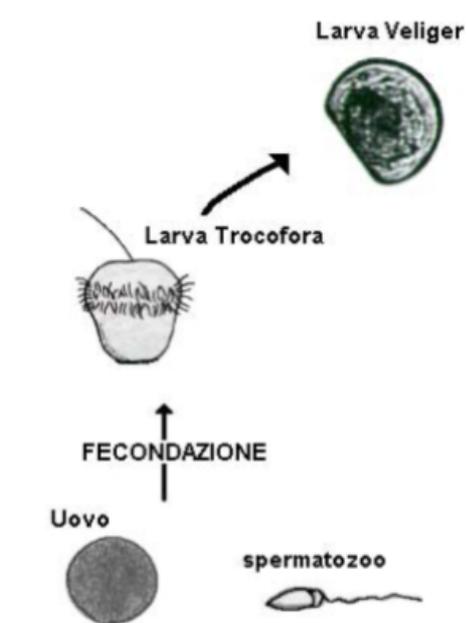
## **Mytilus galloprovincialis, caratteristiche generali**

Sempre più spesso i molluschi bivalvi sono utilizzati in embriotossicologia, infatti, essi soddisfano gran parte dei requisiti che devono possedere i buoni indicatori di tossicità: sono organismi di cui si hanno conoscenze biologiche approfondite e sono facilmente reperibili; per i test è possibile impiegare stadi molto sensibili del loro ciclo vitale, nonché disporre di end-point facilmente osservabili; per i saggi di embriotossicità si possono utilizzare stadi di sviluppo omogenei, e, per tempi limitati, sono organismi facili da mantenere in laboratorio, nonché sufficientemente tolleranti alla manipolazione (Volpi Ghirardini et al., 2001).

La sensibilità e la rapidità di risposta degli stadi larvali ed embrionali dei molluschi bivalvi come bioindicatori da impiegare nei saggi di tossicità è ampiamente riconosciuta a livello internazionale (USEPA, 1995; ASTM, 1998).

Nel saggio ecotossicologico con embrioni e larve di bivalvi marini, la valutazione della tossicità relativa alle sostanze tossiche da testare è basata sulla percentuale di larve-D (primo stadio della larva veliger) anormali trovate dopo la fertilizzazione delle uova.

In questo periodo, infatti, l'organismo si trova in una fase particolarmente delicata dello sviluppo embrionale poiché si verificano delle importanti modificazioni a livello fisiologico che portano alla formazione del veliger (Fig. 2) e l'eventuale contatto con le sostanze tossiche potrebbe provocarne la morte, il rallentamento dello sviluppo, o, in alternativa, uno sviluppo non corretto delle larve (Brunelli et al., 2004).



*Fig. 2 M. galloprovincialis, la prima fase dello sviluppo larvale*

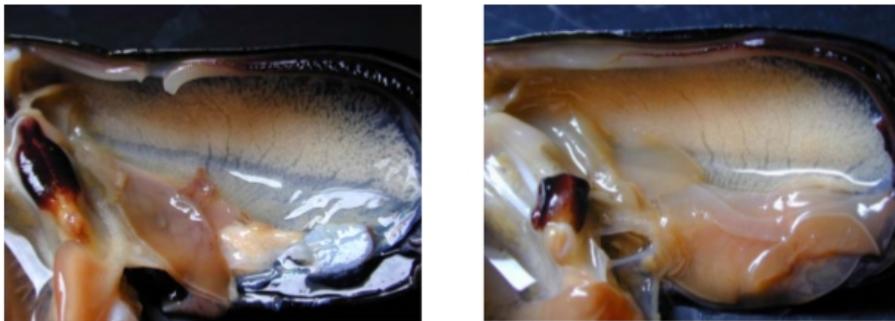
### **Campionamento degli individui ed esecuzione del test**

I bivalvi della specie *M. galloprovincialis* sono stati prelevati a Treporti (nella laguna di Venezia), un sito non inquinato in termini di concentrazioni di metalli pesanti. I molluschi sono stati trasportati in laboratorio a secco, avvolti in un panno umido.

Una volta in laboratorio, si è proceduto alla verifica della loro maturità: alcuni molluschi sono stati aperti, forzando le valve ed incidendo per mezzo di un bisturi i muscoli adduttori, si sono così osservate le gonadi. Attraverso l'aspetto delle gonadi si è potuto capire se l'individuo aveva raggiunto la maturità sessuale o meno.

Nel caso in cui la maturità sessuale era stata raggiunta, la gonade si presentava molto sviluppata e se incisa con un bisturi si osservava la fuoriuscita dei gameti; viceversa, se la gonade non era sviluppata e si presentava di aspetto particolarmente assotigliato e quasi trasparente, era indice della non maturità sessuale dell'individuo.

Nella *Fig. 3* sottostante è riportato un confronto tra una gonade non matura (a sinistra) ed una gonade matura (a destra).



*Fig. 3 M. galloprovincialis, confronto tra una gonade non matura (a sinistra) ed una gonade matura (a destra)*

Successivamente si è proceduto a costituire la serie di riproduttori, previa eliminazione degli organismi già morti o compromessi per la perdita di acqua, e gli organismi malformati o con evidenti segni di rottura della conchiglia.

I molluschi così selezionati sono stati puliti dai detriti e dagli eventuali organismi epibionti (raschiando manualmente la conchiglia aiutandosi con un bisturi) e sono stati sciacquati sotto l'acqua corrente.

In un secondo momento i riproduttori di *M. galloprovincialis* dello stock selezionato (all'incirca 30 organismi) sono stati indotti all'emissione di uova e di spermatozoi applicando un protocollo di stimolazione termica.

Gli individui sono stati trasferiti prima in una vasca contenente acqua alla temperatura di 18°C, e dopo 30 minuti sono stati trasferiti (manualmente) in una vasca simile contenente acqua alla temperatura di 28°C, per indurli, appunto, all'emissione dei gameti.

Dal momento che più di un paio di organismi di ambo i sessi avevano rapidamente emesso i gameti, gli organismi emittenti sono stati velocemente trasferiti in beaker da 100 mL contenente almeno 50 mL di acqua marina filtrata, in modo da far proseguire l'emissione di gameti.

Dopo circa 30 minuti, lo sperma di almeno 3 maschi è stato filtrato tramite un setaccio di maglia 32 µm ed è stato raccolto in unico cristallizzatore; le uova di almeno 3 femmine sono state filtrate attraverso un setaccio di maglia 100 µm, in modo da eliminare le eventuali impurità, e sono state raccolte in un cilindro graduato da 500 mL (sospensione A) portandolo a volume con acqua pulita alla temperatura di 18±1°C.

Successivamente si è proceduto alla fecondazione dei gameti unendo al cilindro graduato contenente le uova 10 mL della sospensione di sperma filtrato; la sospensione è stata miscelata mediante un agitatore per garantirne l'omogeneità.

Si è lasciata avvenire la fecondazione per 15 minuti, e nel frattempo, si è proceduto alla determinazione della densità della sospensione di uova (sospensione A): agitando la sospensione di uova se ne prelevano 10 mL che sono portati a volume in un cilindro graduato da 250 mL; si prelevano 4 sub campioni da 100 µL e li si è disposti su quattro vetrini portaoggetti.

Al microscopio (con ingrandimento 40x o 100x) si contano tutte le uova presenti nei vetrini e si calcola la densità delle uova nella sospensione A secondo le seguenti equazioni:

$$X_{mL} = X_M \cdot 10$$

$$X_{A/mL} = X_{mL} \cdot 25$$

Con:

$X_{mL}$  = uova/mL nel cilindro da 250 mL

$X_M$  = media delle 4 osservazioni nelle aliquote da 100 µL

$X_{A/mL}$  = uova/mL nella soluzione A

Il volume di soluzione A da introdurre in ogni pozzetto da 3 mL è dato da:

$$V(\mu L) = 200.000 / X_{A/mL}$$

Nelle camere da 3 mL, quindi, si è aggiunta la quantità di sospensione A determinata secondo la procedura sopra descritta, mantenendo la sospensione in continua agitazione, in modo da ottenere una densità di circa 60-70 cell/mL nelle camere test.

In seguito si sono preparate le nove piastre per l'esecuzione del test di embriotossicità (preparate come descritto nel paragrafo "Principio del saggio") e sono state riposte nella cella termostatica a  $18\pm 1^\circ\text{C}$  per 48 ore, al fotoperiodo di 16 h di luce : 8 h di buio.

Le diverse diluizioni delle sostanze da testare ed il controllo negativo (contenente la sola acqua salmastra) sono stati preparati con lo stesso tipo di acqua utilizzato per la stimolazione degli organismi.

Per ciascuna concentrazione e per il controllo sono state eseguite tre repliche.

Al termine del periodo di esposizione in cella termostatica, i campioni sono stati fissati con un paio di gocce di formalina tamponata al 40% in ogni pozzetto da 3 mL; in ultimo si è proceduto con la lettura dei campioni.

La lettura dei campioni è stata eseguita al microscopio ottico e sono stati conteggiati, per ogni camera test, i primi 100 organismi, registrando il numero di larve che aveva raggiunto un corretto e completo sviluppo dopo le 48 ore di incubazione (larve normali).

Quando si parla di larve normali, si fa riferimento alla larva di tipo veliger viva con completo e normale sviluppo della conchiglia (larva-D), visibile nella *Fig. 4* qui sotto riportata.



*Fig. 4 M. galloprovincialis, larva veliger*

### **Procedura di controllo qualità (QA/QC)**

Contemporaneamente ai saggi sui campioni si esegue sempre un test di controllo positivo con un tossico di riferimento (Cu) ed un controllo negativo con la sola acqua marina artificiale.

Le condizioni di accettabilità del test sono:

- 1) la percentuale di larve-D normali nel controllo  $\geq 70\%$  per *M. galloprovincialis*;
- 2) EC<sub>50</sub> per la sostanza di riferimento (Cu): compresa tra 14 – 23 µg/L di Cu per *M. galloprovincialis* (nel pieno del periodo riproduttivo; il range è esteso a 8 – 27 µg/L se si opera negli estremi del periodo riproduttivo) (Volpi Ghiaradini et al., 2005b).

### **Analisi dei dati**

Il valore di EC<sub>50</sub> è stato calcolato sulla base del numero di embrioni che dopo 48 ore dava origine a larve con completo e normale sviluppo della conchiglia (larve-D).

A tal fine, sono state considerate come anormali le larve trocofore ed i veliger deformati, ovvero con conchiglia incompleta, cerniera convessa, mantello che protrude dalla conchiglia.

Il valore di EC<sub>50</sub> è stato calcolato applicando ai dati raccolti nel corso dei saggi il metodo statistico Trimmed Spearman-Kärber.

### **Condizioni di accettabilità del test**

Affinchè il test di embriotossicità con *M. galloprovincialis* possa essere considerato valido devono essere rispettati i seguenti criteri di accettabilità (ASTM, E 724-98):

- 1) al termine del test più del 70% degli embrioni del controllo deve aver raggiunto uno sviluppo corretto e completo;
- 2) tutte le larve nelle camere test devono essere state prodotte dagli stessi riproduttori nella medesima emissione;
- 3) tutte le camere test devono essere identiche;
- 4) devono essere fatte più repliche (almeno 3) per ogni trattamento;
- 5) nelle camere test non devono essere aggiunte sostanze non contemplate nel saggio;
- 6) il test deve avere inizio entro le 4 ore dalla fecondazione degli embrioni;
- 7) le camere test devono essere incubate tutte alla stessa temperatura e per il medesimo tempo;
- 8) la differenza di temperatura tra inizio e fine test non deve essere superiore ad 1°C.

## 4. RISULTATI E DISCUSSIONE

### 4.1 Test cronico di riproduzione con *Daphnia magna*

Tutti i test condotti (3 distinte sessioni utilizzando 3 diverse colture) hanno soddisfatto i criteri di qualità per l'accettabilità del risultato, in accordo con quanto riportato nel paragrafo 3.2 (QA/QC).

In particolare, la sopravvivenza nel controllo è sempre stata superiore all' 80%, registrando un valore medio di 90.7% ed una deviazione standard di 8.1%.

Il coefficiente di variazione (CV) nei controlli è risultato sempre inferiore al 20% con valore minimo rilevato nel test eseguito sui prodotti di WP2 (CV = 5.7%) e massimo nel test condotto sui prodotti di WP4 (CV = 18.4%).

Il numero di figli prodotti a fine test nel controllo è sempre risultato superiore a 60 individui per femmina, con un valore minimo di  $60.5 \pm 3.5$  ind. nel test condotto sui prodotti di WP2 ed un massimo di  $70.2 \pm 12.9$  ind. nel test condotto sui prodotti di WP4.

La media globale di individui prodotti per femmina, effettuando il pooling di tutti i dati ottenuti nel periodo sperimentale relativamente ai controlli è di  $65.3 \pm 10.2$ .

In tutti i test effettuati, la prima generazione di cloni è stata prodotta entro il decimo giorno di incubazione.

Questi dati evidenziano come la coltura, pur producendo dei risultati in linea con i controlli di qualità previsti, si attesti al limite basso di accettabilità per quanto concerne la riproduzione; tale problema potrebbe essere indipendente dalle condizioni di mantenimento della coltura, ma essere legato al tasso riproduttivo relativamente del clone utilizzato, già osservato in passato dal gruppo di lavoro.

Il test acuto con la sola sostanza di riferimento (Cu) ha confermato la buona qualità degli individui prodotti dalle colture, producendo una  $EC_{50}$  media di  $77 \mu\text{g l}^{-1}$  ( $n = 3$ ) con valori compresi tra 71 e  $88 \mu\text{g l}^{-1}$ , in accordo con la carta di controllo intralaboratorio ( $50-110 \mu\text{g l}^{-1}$ ).

I risultati del test cronico di riproduzione con *D. magna* testato sui 7 formulati proposti in questo lavoro di tesi sono di seguito presentati per WP (Working Package) di riferimento, seguendo il modello di categorizzazione seguito dal progetto NanoRestArt.

## WP2 – prodotti per la pulizia

I risultati ottenuti nel test cronico di riproduzione con *D. magna* sottolineano la tossicità cronica per il prodotto **G1-Ncap** (Tab. 4.1).

WP2	Sopravvivenza %	Prole per femmina	CV%
<i>D. magna</i> test cronico			
Controllo	80	60,50 ± 3,46	5,7
G1-Ncap 1.0 mg l <sup>-1</sup>	40	44,50 ± 11,09	24,9

Tab. 4.1, Risultati del test cronico con *D. magna* per il Formulato G1-Ncap

Alla concentrazione di 1.0 mg l<sup>-1</sup> la mortalità (del 60%) è risultata essere più elevata rispetto a quella ottenuta nel controllo (20%) ed anche la produzione di piccoli per ciascuna femmina viva di *D. magna* è risultata essere significativamente inferiore nel test con il tossico G1-Ncap rispetto al controllo, come si può vedere dai risultati ottenuti con la statistica Kruskal-Wallis ANOVA:  $H_{1,12} = 5.673$ ,  $p = 0.02$ .

Nel caso del formulato G1-Ncap è stato possibile condurre il test di tossicità cronica soltanto per la concentrazione 1.0 mg l<sup>-1</sup> poiché per l'altra concentrazione (0.1 mg l<sup>-1</sup>) si è verificata una anomala mortalità delle femmine adulte di *D. magna* (nel corso dei 21 giorni di esposizione al tossico), non garantendo un numero significativo di dati sui quali condurre un'analisi della varianza.

Analizzando la composizione del formulato, per G1-Ncap gli effetti cronici sulla riproduzione di *D. magna* possono essere legati agli ingredienti Ncap, propilene carbonato (PC), sec-butanolo (2-BuOH), 2-butanone (MEK o metil etil chetone) ed etil acetato (EA).

Per quanto riguarda l'ingrediente Ncap, trattandosi di un prodotto di nuova sintesi, mancano informazioni tossicologiche relativamente agli effetti cronici, quindi non è possibile procedere con supposizioni relativamente alla causalità. Analoghe considerazioni valgono per PC, 2-BuOH e MEK per i quali si dispongono di dati in letteratura riguardo la tossicità acuta ma mancano informazioni riguardo gli effetti subletali a lungo termine (inclusi effetti sulla produzione).

Per quanto concerne l'ingrediente etil acetato (EA), invece, in letteratura è disponibile un dato di tossicità cronica (NOEC = 2.4 mg l<sup>-1</sup>, Khün et al., 1989) che porta ad escludere il contributo di

questo estere alla tossicità rilevata in questo caso, dal momento che la concentrazione stimata di EA nelle soluzioni test è di 0.07 mg l<sup>-1</sup> e 0.007 mg l<sup>-1</sup>, quindi di diversi ordini di grandezza inferiore alla NOEC riportata in letteratura.

Prendendo in considerazione i dati disponibili in letteratura associati alla tossicità acuta dei suddetti ingredienti, si può ipotizzare che il 2-BuOH ed il MEK contribuiscano maggiormente alla tossicità del formulato G1-Ncap rispetto a quanto possano influire gli ingredienti Ncap e PC.

Questi ultimi presentano una minore tossicità acuta ( $EC_{50} > 1000$  mg l<sup>-1</sup>), rispetto a 2-BuOH e MEK (rispettivamente  $EC_{50} > 665$  mg l<sup>-1</sup>;  $EC_{50} > 500$  mg l<sup>-1</sup>), quindi pur risultando non tossici ai sensi della CLP, questi due ingredienti possono essere in grado di esercitare effetti tossici a concentrazioni presumibilmente più basse rispetto a Ncap e PC.

Tali considerazioni hanno ovviamente solo valore qualitativo, vista la totale assenza di informazioni riguardo effetti a lungo termine, non solo relativamente al test con *D. magna*, ma anche in relazione ad altri indicatori; inoltre, gli effetti sinergici ed additivi degli ingredienti che costituiscono il formulato non possono essere esclusi.

In accordo con i dati qui proposti, la NOEC stimata per G1-Ncap è  $< 1$ , generando per il formulato una classificazione come minimo “Cronico 3”, in riferimento ai criteri CLP (*Fig. 1*, paragrafo: INTRODUZIONE).

### WP3 – prodotti per il rafforzamento ed il consolidamento delle superfici

I risultati ottenuti nel test cronico di riproduzione con *D. magna* sottolineano la presenza di tossicità cronica per i prodotti **Silica/PEI/CMC, CNF, CSGI 1(+)** e **CSGI 2(-)** e sono riportati in *Tabella 4.2*.

Tutti i campioni sottoposti ad analisi hanno evidenziato delle risposte significativamente diverse dal controllo (One-Way ANOVA e Fisher LSD-test,  $p < 0.05$ ).

WP3	Sopravvivenza %	Prole per femmina	CV%
<b><i>D. magna</i> test cronico</b>			
Controllo	100	62,8 ± 7,3	11,7
CNF 0.1 mg l <sup>-1</sup>	100	39,1 ± 5,8	14,9
CNF 1.0 mg l <sup>-1</sup>	100	31,4 ± 11,7	37,1
CSGI 1 (+) 0.1 mg l <sup>-1</sup>	100	41,3 ± 10,9	26,4
CSGI 1 (+) 1.0 mg l <sup>-1</sup>	90	43,3 ± 11,2	25,8
CSGI 2 (-) 0.1 mg l <sup>-1</sup>	70	32,7 ± 12,6	38,5
CSGI 2 (-) 1.0 mg l <sup>-1</sup>	90	31,4 ± 13,0	41,3
Silica/PEI/CMC 0.1 mg l <sup>-1</sup>	80	34,8 ± 16,6	47,9
Silica/PEI/CMC 1.0 mg l <sup>-1</sup>	70	36,2 ± 18,8	27,5

Tab. 4.2, Risultati del test cronico con *D. magna* per i Formulati Silica/PEI/CMC, CNF, CSGI 1(+) e CSGI 2(-)

Per quanto riguarda il prodotto CNF, la formulazione che lo costituisce non comporta mortalità per le femmine adulte vive di *D. magna* ma inibisce in modo significativo (One-Way ANOVA:  $F_{2,27} = 35.961$ ,  $p < 0.001$ ) la produzione di piccoli sia alla concentrazione 1.0 mg l<sup>-1</sup> (Fisher LSD Test:  $p < 0.001$ ) che alla concentrazione 0.1 mg l<sup>-1</sup> (Fisher LSD Test:  $p < 0.001$ ).

Gli stessi risultati si sono ottenuti anche per le altre tre formulazioni, Silica/PEI/CMC, CSGI 1(+) e CSGI 2(-), per le quali, tuttavia, si è riscontrata della mortalità, sia alla concentrazione 1.0 mg l<sup>-1</sup> (per tutti i tre i formulati), sia alla concentrazione 0.1 mg l<sup>-1</sup> (per CSGI 2(-) e Silica/PEI/CMC).

La NOEC stimata per i suddetti prodotti è  $< 0.1$  mg l<sup>-1</sup>, quindi tali formulati sono classificati almeno come “Cronico 2”, in accordo con le soglie CLP (*Fig. 1*, paragrafo: INTRODUZIONE).

Dal momento che tra tutti e quattro questi formulati, il CNF è l'unico a non contenere l'ingrediente PEI (polietilenimmina) ed ha come ingrediente di base le sole nanofibrille di cellulosa, la sua tossicità può essere conferita soltanto alla presenza delle nanofibrille, sebbene non siano presenti in letteratura dei dati di confronto che permettano di dare giudizi definitivi.

Molto probabilmente tali nanostrutture potrebbero aver alterato la riproduzione di *D. magna* limitando l'assimilazione di energia attraverso il cibo, interferendo sia meccanicamente con la digestione degli alimenti o modificando la capacità di assorbimento dei nutrienti attraverso l'intestino.

Per i formulati Silica/PEI/CMC, CSGI 1(+) e CSGI 2(-), l'ingrediente potenzialmente implicato nella tossicità cronica potrebbe essere il PEI, l'unico classificato come "pericoloso" per l'ambiente acquatico (Cat. 2) tra i vari ingredienti utilizzati per lo sviluppo delle formulazioni a protezione e consolidamento delle superfici.

Tuttavia, anche in questo caso i dati relativi alla tossicità cronica sono del tutto assenti; ciò nonostante il PEI, così come miscele di disperdenti a base di PEI, sono noti per determinare effetti acuti (Petersen et al., 2010; Salehi et al., 2017) ed effetti *in vitro* o citotossici (Godbey et al., 1999). Per quanto riguarda la tossicità del PEI, diversi studi accertano che il PEI libero danneggia le cellule, ma se questo è legato al DNA gli effetti nocivi diminuiscono notevolmente; il suo possibile effetto tossico è dovuto al fatto che il PEI impermeabilizza le cellule impedendo scambi gassosi e di membrana (Godbey et al., 1999); inoltre, studi hanno dimostrato la capacità del PEI di far aggregare strutture a nanoscala nel tubo digerente di *D. magna* (Petersen et al., 2010), quindi non si esclude che l'azione impermeabilizzante del PEI possa generare effetti tossici per azione meccanica oltre che legata ad interferenze di tipo biologico.

In ogni caso, il contributo dovuto al polimero CMC, costituente del formulato Silica/PEI/CMC, non può essere escluso a priori, nonostante la mancanza di informazioni relative alla tossicità a lungo termine.

## WP4 – protezione delle superfici

I risultati ottenuti nel test cronico di riproduzione con *D. magna* sottolineano la tossicità cronica per i prodotti **Formulazione 3** e **Formulazione 4** e sono riportati in *Tabella 4.3*.

WP4	Sopravvivenza %	Prole per femmina	CV%
<b>D. magna test cronico</b>			
Controllo	87	70,2 ± 12,9	18,4
F3 0.1 mg l <sup>-1</sup>	80	40,0 ± 15,7	39,2
F3 1.0 mg l <sup>-1</sup>	100	57,2 ± 12	21
F4 0.1 mg l <sup>-1</sup>	100	47,1 ± 6,1	13
F4 1.0 mg l <sup>-1</sup>	100	54,7 ± 11,4	20,8

Tab. 4.3, Risultati del test cronico con *D. magna* per il Formulato 3 ed il Formulato 4

Per entrambe le formulazioni la produzione di piccoli è significativamente diversa rispetto ai risultati ottenuti nel controllo (One-Way ANOVA:  $F_{4,46} = 9.672$ ,  $p < 0.001$ ) sia alla concentrazione 1.0 mg l<sup>-1</sup> (Fisher LSD Test:  $p < 0.01$ ) sia alla concentrazione 0.1 mg l<sup>-1</sup> (Fisher LSD Test:  $p < 0.01$ ). La NOEC stimata per le suddette formulazioni è quindi  $< 0.1$  mg l<sup>-1</sup>, come per le formulazioni proposte dal WP3, anche in questo caso i risultati permettono di classificare le Formulazioni 3 e 4 come “Cronico 2”, in accordo con le soglie del regolamento CLP (*Fig. 1*, paragrafo: INTRODUZIONE).

Per quanto concerne l'identificazione delle cause della tossicità dei formulati 3 e 4, l'ingrediente inizialmente valutato come “potenzialmente” rilevante è stato l'etanolo (Et-OH), dal momento che entrambi i formulati presentano un'elevata concentrazione di Et-OH (etanolo) nella loro composizione (circa il 43%); tuttavia, alle concentrazioni di prodotto utilizzate nel test (1.0 mg l<sup>-1</sup> e 0.1 mg l<sup>-1</sup>) corrispondono concentrazioni di 0.430 mg l<sup>-1</sup> e 0.043 mg l<sup>-1</sup> di Et-OH, che trasformate in concentrazioni di massa, corrispondono rispettivamente allo 0.0000435 e 0.0000043%, risultando almeno di due ordini di grandezza inferiori rispetto alla NOEC riportata in letteratura per Et-OH (0.008%) per il test cronico di riproduzione con *D. magna* (Zhao et al., 2009).

Questo dato, quindi, porta ad escludere che gli effetti di tossicità nel lungo termine riscontrati possano essere ricondotti alla presenza dell'etanolo (Et-OH), e suggerisce il coinvolgimento di altri ingredienti, tra cui l'1H-benzotriazolo (presente in entrambi i formulati) e l'alcol polivinilico amorfo (HAVOH), presente quest'ultimo soltanto nella Formulazione 4.

Tuttavia, dal momento che per i suddetti ingredienti non sono al momento disponibili informazioni sulla tossicità cronica, né nei confronti di *D. magna* né nei confronti di altri indicatori, non è

possibile effettuare ulteriori approfondimenti riguardo la causalità, non potendo così arrivare ad una valutazione definitiva.

In ogni caso, gli effetti sinergici ed additivi dei tensioattivi e dei nanomateriali coinvolti nelle due formulazioni non possono essere esclusi in termini di contributo alla tossicità della miscela.

Di seguito è riportata la tabella riassuntiva per il test cronico di riproduzione con *D. magna*: i 7 formulati sono raggruppati per WP di riferimento (*Tab. 4.4*).

I dati grezzi sono riportati in Allegato 3.

Tab. 4.4, Risultati del test cronico con *D. magna* per i formulati G1-Ncap, CNF, CSGI 1(+), CSGI 2(-), Silica/PEI/CMC, Formulazione 3 e Formulazione 4

WP	Partner	Formulazione	Sopravvivenza (%)		Prole per femmina			p-value
			campione	controllo	campione	controllo	campione	
WP2	CSGI	G1Ncap - 1 mg l <sup>-1</sup>	40%	85%	44.5 ± 11.1	60.5 ± 3.5	0,021	
WP3	Chalmers	CNF - 0.1 mg l <sup>-1</sup>	100%	100%	39.1 ± 5.8	62.8 ± 7.3	< 0,001	
		CNF - 1 mg l <sup>-1</sup>	100%	100%	31.4 ± 11.7	62.8 ± 7.3	< 0,001	
WP3	CSGI	CSGI 1 (+) - 0.1 mg l <sup>-1</sup>	100%	100%	41.3 ± 10.9	62.8 ± 7.3	< 0,05	
		CSGI 1 (+) - 1.0 mg l <sup>-1</sup>	90%	100%	43.3 ± 11.2	62.8 ± 7.3	< 0,05	
WP3	CSGI	CSGI 2 (-) - 0.1 mg l <sup>-1</sup>	70%	100%	32.7 ± 12.6	62.8 ± 7.3	< 0,05	
		CSGI 2 (-) - 1.0 mg l <sup>-1</sup>	90%	100%	31.4 ± 13.0	62.8 ± 7.3	< 0,05	
WP3	CSGI	Silica/PEI/CMC - 0.1 mg l <sup>-1</sup>	80%	100%	34.8 ± 16.6	62.8 ± 7.3	< 0,05	
		Silica/PEI/CMC - 1.0 mg l <sup>-1</sup>	70%	100%	36.2 ± 18.8	62.8 ± 7.3	< 0,05	
WP4	ISMN-CNR	Formulazione 3 - 0.1 mg l <sup>-1</sup>	80%	87%	44.0 ± 15.7	70.2 ± 12.9	< 0,001	
		Formulazione 3 - 1 mg l <sup>-1</sup>	100%	87%	57.2 ± 12.0	70.2 ± 12.9	0,012	
		Formulazione 4 - 0.1 mg l <sup>-1</sup>	100%	87%	47.1 ± 6.1	70.2 ± 12.9	< 0,001	

## 4.2 Test di embriotossicità con *Mytilus galloprovincialis*

I test condotti hanno soddisfatto i criteri di qualità per l'accettabilità del risultato, in accordo con quanto riportato nel paragrafo 3.3 (QA/QC).

In particolare, la media di larve sviluppatesi normalmente nel controllo, dopo l'esposizione per 48 ore, è stata di  $95 \pm 5$ ; ben superiore al criterio di accettabilità del test che prevede una percentuale di larve normalmente formate  $\geq 70\%$ .

Il valore di  $EC_{50}$  è stato calcolato sulla base del numero di embrioni che dopo 48 ore risultava in larve vive con completo e normale sviluppo della conchiglia (larve-D).

L' $EC_{50}$  con la sostanza di riferimento (Cu) è stata calcolata applicando il metodo statistico Trimmed Spearman-Kärber ai dati che sono stati raccolti nel corso delle prove.

Il test con la sostanza di riferimento (Cu) preparato a partire da un sale di nitrato di rame, ha prodotto una  $EC_{50}$  media a 48 ore di  $32 (30 - 34) \mu\text{g l}^{-1}$ ; leggermente superiore rispetto a quanto riportato nella più recente carta di controllo presa come riferimento ( $9.47 \mu\text{g l}^{-1} - 21.72 \mu\text{g l}^{-1}$ ) (Libralato et al., 2009).

Con buona probabilità questa discrepanza può essere dovuta al fatto che l'acqua di diluizione utilizzata nel test è acqua marina naturale filtrata a  $0.2 \mu\text{m}$ , che garantisce una migliore performance dei controlli rispetto alle acque marine artificiali (utilizzate in fase di predisposizione della carta di controllo), ma può contenere tracce di leganti e chelanti naturali in quantità tale da determinare un sensibile aumento dell' $EC_{50}$  per il rame.

Considerando quindi l'introduzione di questa variabile (acqua naturale) e che le differenze rispetto alla carta di controllo costruita utilizzando acque ricostituite è comunque minima, si è ritenuto di considerare accettabile il risultato del test.

I risultati del test di sviluppo larvale con *M. galloprovincialis* mettono in evidenza che, contrariamente a quanto osservato per il test cronico con *D. magna*, nessuno dei 7 formulati ha dato problemi di sviluppo larvale.

In nessun caso è calcolabile l' $EC_{50}$ , in più i risultati ottenuti alla massima concentrazione saggiata ( $1000 \text{ mg l}^{-1}$ ) sono del tutto confrontabili con i risultati ottenuti nei controlli (Tab. 4.5), quindi nè i solventi presenti nelle formulazioni, nè i composti a base nano sembrano influenzare lo sviluppo larvale.

Sostanzialmente il test subcronico con i mitili conferma i risultati dei test acuti condotti nel primo step di valutazione ITS eseguito sui prodotti (assenza di tossicità acuta, nessuna  $EC_{50}$  calcolabile, effetti trascurabili alla massima concentrazione saggiata).

Il risultato non è del tutto inatteso, in particolare per quanto riguarda i nanomateriali, visto che questi in presenza di una soluzione con forza ionica elevata, come l'acqua di mare, tendono ad aggregarsi, rendendosi meno disponibili per l'assimilazione da parte del biota.

Campione	% larve-D	$EC_{50}$
<b>Controllo</b>	95.1 ± 5.1	/
<b>G1-Ncap</b>	86.6 ± 6.0	n.c.
<b>CSGI 1(+)</b>	96.7 ± 0.6	n.c.
<b>CSGI 2(-)</b>	96.3 ± 1.5	n.c.
<b>CNF</b>	91.6 ± 5.0	n.c.
<b>Silica/PEI/CMC</b>	84.7 ± 10.1	n.c.
<b>F3</b>	84.0 ± 8.0	n.c.
<b>F4</b>	89.7 ± 5.1	n.c.

Tab. 4.5 Riepilogo dei risultati con *M. galloprovincialis*; la percentuale di larve-D è riferita alla massima concentrazione saggiata di  $1000 \text{ mg l}^{-1}$

## 5. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Il presente lavoro di tesi ha permesso di trarre alcune conclusioni e fare delle considerazioni riguardo ai test di tossicità che sono stati condotti, e ha permesso di collezionare una serie di risultati che saranno utili per il compimento del progetto NanoRestArt.

Nonostante la classificazione ai sensi del regolamento CLP e la batteria di test acuti, che sono stati condotti in precedenza in accordo con l'approccio ITS intrapreso nell'ambito del progetto, abbiano riscontrato assenza di rischio per l'ambiente acquatico per i 7 formulati oggetto del presente lavoro di tesi, il test cronico con *D. magna* ha evidenziato come questi stessi prodotti, a concentrazioni fino a cinque ordini di grandezza inferiori a quelle che non determinano effetti acuti, sono in grado di determinare una riduzione della capacità riproduttiva di *D. magna*.

I risultati (presentati nel capitolo precedente) dimostrano che l'approccio basato sull'autoclassificazione ai sensi del regolamento CLP non consente di stimare in maniera esaustiva i rischi posti in essere dai prodotti e miscele di nuova concezione, perché da un lato c'è un'oggettiva carenza di conoscenze riguardo la tossicità cronica di molti prodotti chimici di uso anche quotidiano (quindi si tratta di una problematica che va oltre il caso specifico di NanoRestArt), dall'altro l'approccio basato su analisi di informazioni relative ai singoli ingredienti non consente di mettere in evidenza effetti sinergici, additivi e di potenziamento che si possono generare nelle miscele. Anche se limitato a soli 7 prodotti, questo lavoro di tesi vuole sottolineare che l'approccio ecotossicologico mirato alla valutazione degli effetti a lungo termine sia insostituibile per identificare i possibili rischi per l'ambiente acquatico nel processo di valutazione di nuovi prodotti destinati alla commercializzazione. Quindi una ITS deve sempre prevedere l'impiego di almeno un saggio in grado di caratterizzare i potenziali effetti cronici di sostanze o miscele di nuova sintesi.

La ricerca di possibili ingredienti in grado di conferire alle formulazioni proprietà tossicologiche a lungo termine è stata resa vana dall'assenza, in letteratura così come nelle schede di sicurezza, di informazioni riguardo la tossicità cronica della maggior parte degli ingredienti. La carenza di dati relativi alla tossicità cronica dei formulati ha rappresentato quindi un problema oggettivo anche nell'interpretazione dei dati.

Ovviamente, questo problema è generale e non si applica ai soli formulati sviluppati nell'ambito di NanoRestArt.

Questo lavoro di tesi evidenzia, quindi, come sia necessario approfondire gli aspetti relativi agli effetti a lungo termine, non solo per i prodotti e le miscele di nuova introduzione, ma anche per molte sostanze che già sono presenti nel mercato e di cui non si conoscono gli effetti sull'ambiente acquatico, se non limitatamente all'esposizione acuta.

L'esposizione cronica, inoltre, è una condizione più rappresentativa e frequente di quanto avviene in ambiente rispetto all'esposizione acuta (gli effetti acuti hanno grande importanza nei casi di inquinamento grave conseguente ad un incidente), e proprio per questo motivo la valutazione tossicologica è più interessata alla tossicità cronica soprattutto per i composti persistenti che possono accumularsi nell'organismo animale ed avere conseguenze a livello ambientale.

Appare quindi fondamentale che gli sforzi nel campo della ricerca e della valutazione dei prodotti siano da focalizzare sulle esposizioni croniche anziché sui test acuti, anche se questo comporta un esponenziale aumento delle risorse richieste in termini di tempo, costi e forza lavoro.

Se il test cronico con *D. magna* sembra confermare la tossicità cronica per i 7 formulati, non si può dire lo stesso per il test di embriotossicità con *M. galloprovincialis*.

Infatti, il test conferma i risultati ottenuti dall'autoclassificazione ai sensi del regolamento CLP e dei test acuti; nonostante si tratti di un test subcronico che prevede l'esposizione delle fasi di vita più critiche di un bioindicatore (early-life stages) probabilmente non rappresenta un metodo sufficientemente sensibile per l'identificazione degli impatti sull'ambiente marino-costiero.

Anche in questo caso appare quindi fondamentale che l'approccio valutativo debba essere spostato verso i test di tossicità cronica, o verso indicatori che mostrino particolare sensibilità per i prodotti organici (solventi e altre formulazioni) che possono generare endocrine disruption (interferendo con il sistema endocrino).

## ALLEGATO I

### Preparazione del medium M4

Il medium M4 di Elendt (1990) si ottiene attraverso la preparazione di una serie di soluzioni di elementi in traccia, vitamine e macronutrienti da aggiungere ad acqua distillata per ottenere un medium con il necessario contenuto di micronutrienti e le caratteristiche di durezza ed alcalinità adatte per la crescita dei cladoceri. La preparazione avviene in diverse fasi:

- 1) preparazione delle soluzioni stock degli elementi in traccia (soluzioni Stock I) e composizione della soluzione di elementi in traccia Stock II a partire dalle aliquote delle singole Stock I (Tab. 1);
- 2) preparazione della soluzione composta di vitamine (Tab. 2);
- 3) preparazione delle soluzioni di macronutrienti e composizione finale del medium M4 da aliquote di soluzioni preparate in precedenza (Stock II, vitamine, macronutrienti) (Tab. 3).

La soluzione di vitamine può essere preparata e successivamente congelata ed aggiunta al medium M4 poco prima del suo utilizzo.

**Tabella 1. Preparazione delle soluzioni di partenza (Stock I) degli elementi in traccia ed aliquote necessarie per la composizione della soluzione Stock II.**

1	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	33.6	1.7
2	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.728	10
3	LiCl	0.61	10
4	RbCl	0.203	7
5	SrCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	3.04	1
6	NaBr	0.32	1
7	Na <sub>2</sub> Mo <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.126	10
8	CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.034	10
9	ZnCl <sub>2</sub>	0.104	2.5
10	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.08	2.5
11	KI	0.027	2.4
12	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0.018	2.4
13	NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	0.005	2.4
14 <sup>1</sup>	Na-EDTA	5.000	20
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.991	

<sup>1</sup> Le soluzioni di Na-EDTA e Fe vanno preparate separatamente, miscelate ed autoclavate immediatamente.

**Tabella 2. Preparazione della soluzione di vitamine.**

Tiamina (B <sub>1</sub> )	0.75	1.7
Cianocobalamina (B <sub>12</sub> )	0.01	10
Biotina (B <sub>7</sub> )	0.008	10

**Tabella 3. Preparazione del medium M4.**

1	Stock II	-	50
2	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	293.8	1
3	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	246.6	0.5
4	KCl	58	0.1
5	NaHCO <sub>3</sub>	64.8	1
6	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	50	0.2
7	NaNO <sub>3</sub>	2.74	0.1
8	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.43	0.1
9	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.84	0.1
10	Vitamine	-	0.1

## ALLEGATO II

### Coltura di *Daphnia magna*

L'allevamento di *Daphnia magna* si allestisce in beaker di vetro da 3 L riempiti con 1.5-2 L di medium M4, entro cui si mantengono 20-30 adulti.

L'allevamento va mantenuto ad una temperatura di circa 20°C (entro il range 18-26°C) ed in condizioni di fotoperiodo 16:8 luce:buio.

Il medium di coltura viene rinnovato almeno tre volte a settimana:

- 1) mettere un'aliquota del medium in una vasca temporanea;
- 2) trasferire 25-30 adulti dalla coltura alla vasca temporanea;
- 3) scartare le rimanenti *Daphnia*;
- 4) riempire con il nuovo medium;
- 5) somministrare il cibo.

È fondamentale mantenere un numero di individui inferiore a 200 nella coltura per evitare l'overcrowding e la comparsa di maschi e femmine con efippio. Il cibo è somministrato almeno tre volte alla settimana in forma di coltura algale di *Pseudokirchneriella subcapitata* concentrata (circa  $4.5 \times 10^9$  cell ml<sup>-1</sup>) in modo da ottenere una concentrazione finale di circa  $3 \times 10^5$  cell ml<sup>-1</sup> nella coltura di cladoceri. L'allevamento si rinnova ogni 5-6 settimane, isolando 30-40 giovani di *Daphnia* dalla coltura madre in un nuovo beaker da 3 L riempito con 1.5-2 L di medium alle stesse condizioni indicate in precedenza. La coltura di *P. subcapitata* cresce in un medium preparato secondo quanto riportato in Tab. 1.

**Tabella 1. Composizione del medium di coltura per *P. subcapitata*.**

	NH <sub>4</sub> Cl	1500	
	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1200	
1-macronutrienti	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1800	10
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1500	
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	160	
2- Fe-EDTA	FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	64	1
	Na <sub>2</sub> -EDTA·2H <sub>2</sub> O	100	
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	185	
	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	415	
3- micronutrienti	ZnCl <sub>2</sub> *	3	1
	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O*	1.5	
	CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O*	0.01	
	Na <sub>2</sub> Mo <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	7	
4- NaHCO <sub>3</sub>	NaHCO <sub>3</sub>	50000	1

Per quanto riguarda invece i reagenti  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , dato l'esiguo quantitativo necessario, per evitare errori di pesata, si preparano soluzioni con concentrazione maggiore, da diluire successivamente per ottenere la diluizione finale.

Nella tabella sottostante sono indicate le possibili soluzioni di partenza e le diluizioni da eseguire:

$\text{ZnCl}_2$	104 mg	52 mg	-	29 mL
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	80 mg	40 mg	20 mg	18.8 mL
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	34 mg	17 mg	-	0.3 mL

### ALLEGATO III

Dati "grezzi" del test cronico di riproduzione con *D. magna* sui quali è stata condotta la Statistica Kruskal-Wallis ANOVA

#### WP2

(Controllo vs G1-Ncap)

Campione	Gruppo	Prole
Controllo	1	67
Controllo	1	59
Controllo	1	57
Controllo	1	63
Controllo	1	61
Controllo	1	61
Controllo	1	60
Controllo	1	56

Campione	Gruppo	Prole
G1Ncap 1 mg l <sup>-1</sup>	2	37
G1Ncap 1 mg l <sup>-1</sup>	2	58
G1Ncap 1 mg l <sup>-1</sup>	2	34
G1Ncap 1 mg l <sup>-1</sup>	2	49

**WP3**

**(Controllo vs CNF, CSGI 1 (+), CSGI 2(-), SILICA/PEI/CMC)**

Campione	Gruppo	Prole	Campione	Gruppo	Prole	Campione	Gruppo	Prole
Controllo	1	53	CNF 0.1 mg l <sup>-1</sup>	2	34	CSGI 1 (+) 0.1 mg l <sup>-1</sup>	4	29
Controllo	1	52	CNF 0.1 mg l <sup>-1</sup>	2	42	CSGI 1 (+) 0.1 mg l <sup>-1</sup>	4	20
Controllo	1	68	CNF 0.1 mg l <sup>-1</sup>	2	48	CSGI 1 (+) 0.1 mg l <sup>-1</sup>	4	43
Controllo	1	61	CNF 0.1 mg l <sup>-1</sup>	2	37	CSGI 1 (+) 0.1 mg l <sup>-1</sup>	4	47
Controllo	1	57	CNF 0.1 mg l <sup>-1</sup>	2	41	CSGI 1 (+) 0.1 mg l <sup>-1</sup>	4	44
Controllo	1	72	CNF 0.1 mg l <sup>-1</sup>	2	30	CSGI 1 (+) 0.1 mg l <sup>-1</sup>	4	43
Controllo	1	63	CNF 0.1 mg l <sup>-1</sup>	2	37	CSGI 1 (+) 0.1 mg l <sup>-1</sup>	4	44
Controllo	1	62	CNF 0.1 mg l <sup>-1</sup>	2	35	CSGI 1 (+) 0.1 mg l <sup>-1</sup>	4	36
Controllo	1	67	CNF 0.1 mg l <sup>-1</sup>	2	39	CSGI 1 (+) 0.1 mg l <sup>-1</sup>	4	60
Controllo	1	73	CNF 0.1 mg l <sup>-1</sup>	2	48	CSGI 1 (+) 0.1 mg l <sup>-1</sup>	4	47

CNF 1.0 mg l <sup>-1</sup>	3	19
CNF 1.0 mg l <sup>-1</sup>	3	43
CNF 1.0 mg l <sup>-1</sup>	3	37
CNF 1.0 mg l <sup>-1</sup>	3	40
CNF 1.0 mg l <sup>-1</sup>	3	7
CNF 1.0 mg l <sup>-1</sup>	3	32
CNF 1.0 mg l <sup>-1</sup>	3	32
CNF 1.0 mg l <sup>-1</sup>	3	45
CNF 1.0 mg l <sup>-1</sup>	3	34
CNF 1.0 mg l <sup>-1</sup>	3	25

CSGI 1 (+) 1.0 mg l <sup>-1</sup>	5	55
CSGI 1 (+) 1.0 mg l <sup>-1</sup>	5	55
CSGI 1 (+) 1.0 mg l <sup>-1</sup>	5	33
CSGI 1 (+) 1.0 mg l <sup>-1</sup>	5	47
CSGI 1 (+) 1.0 mg l <sup>-1</sup>	5	39
CSGI 1 (+) 1.0 mg l <sup>-1</sup>	5	34
CSGI 1 (+) 1.0 mg l <sup>-1</sup>	5	56
CSGI 1 (+) 1.0 mg l <sup>-1</sup>	5	25
CSGI 1 (+) 1.0 mg l <sup>-1</sup>	5	46

Campione	Gruppo	Prole
CSGI 2 (-) 0.1 mg l <sup>-1</sup>	6	27
CSGI 2 (-) 0.1 mg l <sup>-1</sup>	6	41
CSGI 2 (-) 0.1 mg l <sup>-1</sup>	6	48
CSGI 2 (-) 0.1 mg l <sup>-1</sup>	6	40
CSGI 2 (-) 0.1 mg l <sup>-1</sup>	6	31
CSGI 2 (-) 0.1 mg l <sup>-1</sup>	6	9
CSGI 2 (-) 0.1 mg l <sup>-1</sup>	6	33

CSGI 2 (-) 1.0 mg l <sup>-1</sup>	7	36
CSGI 2 (-) 1.0 mg l <sup>-1</sup>	7	44
CSGI 2 (-) 1.0 mg l <sup>-1</sup>	7	42
CSGI 2 (-) 1.0 mg l <sup>-1</sup>	7	43
CSGI 2 (-) 1.0 mg l <sup>-1</sup>	7	9
CSGI 2 (-) 1.0 mg l <sup>-1</sup>	7	33
CSGI 2 (-) 1.0 mg l <sup>-1</sup>	7	11
CSGI 2 (-) 1.0 mg l <sup>-1</sup>	7	32
CSGI 2 (-) 1.0 mg l <sup>-1</sup>	7	33

Campione	Gruppo	Prole
SILICA/PEI/CMC 0.1 mg l <sup>-1</sup>	8	37
SILICA/PEI/CMC 0.1 mg l <sup>-1</sup>	8	37
SILICA/PEI/CMC 0.1 mg l <sup>-1</sup>	8	24
SILICA/PEI/CMC 0.1 mg l <sup>-1</sup>	8	40
SILICA/PEI/CMC 0.1 mg l <sup>-1</sup>	8	41
SILICA/PEI/CMC 0.1 mg l <sup>-1</sup>	8	7
SILICA/PEI/CMC 0.1 mg l <sup>-1</sup>	8	65
SILICA/PEI/CMC 0.1 mg l <sup>-1</sup>	8	27

SILICA/PEI/CMC 1.0 mg l <sup>-1</sup>	9	52
SILICA/PEI/CMC 1.0 mg l <sup>-1</sup>	9	3
SILICA/PEI/CMC 1.0 mg l <sup>-1</sup>	9	2
SILICA/PEI/CMC 1.0 mg l <sup>-1</sup>	9	47
SILICA/PEI/CMC 1.0 mg l <sup>-1</sup>	9	31
SILICA/PEI/CMC 1.0 mg l <sup>-1</sup>	9	28
SILICA/PEI/CMC 1.0 mg l <sup>-1</sup>	9	56
SILICA/PEI/CMC 1.0 mg l <sup>-1</sup>	9	2
SILICA/PEI/CMC 1.0 mg l <sup>-1</sup>	9	37

**WP4**  
**(Controllo vs Formulato 3, Formulato 4)**

Campione	Gruppo	Prole	Campione	Gruppo	Prole	Campione	Gruppo	Prole
Controllo	1	81	F3 0.1 mg l <sup>-1</sup>	2	46	F4 0.1 mg l <sup>-1</sup>	4	48
Controllo	1	58	F3 0.1 mg l <sup>-1</sup>	2	44	F4 0.1 mg l <sup>-1</sup>	4	46
Controllo	1	84	F3 0.1 mg l <sup>-1</sup>	2	31	F4 0.1 mg l <sup>-1</sup>	4	34
Controllo	1	75	F3 0.1 mg l <sup>-1</sup>	2	38	F4 0.1 mg l <sup>-1</sup>	4	42
Controllo	1	61	F3 0.1 mg l <sup>-1</sup>	2	39	F4 0.1 mg l <sup>-1</sup>	4	55
Controllo	1	60	F3 0.1 mg l <sup>-1</sup>	2	11	F4 0.1 mg l <sup>-1</sup>	4	50
Controllo	1	86	F3 0.1 mg l <sup>-1</sup>	2	67	F4 0.1 mg l <sup>-1</sup>	4	43
Controllo	1	61	F3 0.1 mg l <sup>-1</sup>	2	44	F4 0.1 mg l <sup>-1</sup>	4	50
Controllo	1	61				F4 0.1 mg l <sup>-1</sup>	4	53
Controllo	1	78	F3 1 mg l <sup>-1</sup>	3	56	F4 0.1 mg l <sup>-1</sup>	4	50
Controllo	1	50	F3 1 mg l <sup>-1</sup>	3	48			
Controllo	1	91	F3 1 mg l <sup>-1</sup>	3	51	F4 1 mg l <sup>-1</sup>	5	42
Controllo	1	67	F3 1 mg l <sup>-1</sup>	3	62	F4 1 mg l <sup>-1</sup>	5	72
			F3 1 mg l <sup>-1</sup>	3	76	F4 1 mg l <sup>-1</sup>	5	75
			F3 1 mg l <sup>-1</sup>	3	43	F4 1 mg l <sup>-1</sup>	5	52
			F3 1 mg l <sup>-1</sup>	3	67	F4 1 mg l <sup>-1</sup>	5	57
			F3 1 mg l <sup>-1</sup>	3	44	F4 1 mg l <sup>-1</sup>	5	55
			F3 1 mg l <sup>-1</sup>	3	74	F4 1 mg l <sup>-1</sup>	5	57
			F3 1 mg l <sup>-1</sup>	3	51	F4 1 mg l <sup>-1</sup>	5	43
						F4 1 mg l <sup>-1</sup>	5	50
						F4 1 mg l <sup>-1</sup>	5	44

## BIBLIOGRAFIA

ASTM. American Society for Testing and Materials. (1998). Standard Guide for Conducting Static Acute Toxicity Test Starting with Embryos of Four Species of saltwater Bivalve Molluscs. E724-98.

Balliana E., Ricci G., Pesce C., Zendri E.. (2016). Assessing the value of green conservation for cultural heritage: positive and critical aspects of already available methodologies. *International Journal of Conservation Science* 7(1): 185-202.

Baglioni P. and Chelazzi D. (Eds) (2013). *Nanoscience for the Conservation of Works of Art*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.

Baglioni P., Chelazzi D., Giorgi R.. (2015). *Nanotechnologies in the Conservation of Cultural Heritage*. A compendium of materials and techniques. Springer.

Blaauboer B.J., Barrat M.D., Houston J.B.. (1999). The integrated use of alternative methods in toxicological risk evaluation. *Alternatives to Laboratory Animals* 27,229–237.

Brunelli, Gelli, F., Pregolato, Pumo, Scialoja, Bencivelli, Selvatico, Roncarati & Savorelli, F. (2004). Rilevazione delle emergenze idriche con sensori di preallarme e valutazione della qualità delle acque destinate alla molluschicoltura con test ecotossicologici su *Mytilus galloprovincialis*. *Biologia Marina Mediterranea*, 11 (2): 490-492.

ECHA, 2017. *Guidance on the application of the CLP criteria*. Version 5.0. July 2017. European Chemical Agency, Helsinki (Finland).

Elkington J. (1997). *Cannibals with forks: the triple bottom line of twenty-first century business*. Capstone, Oxford. 402 pp.

Ferrari A.M., Pini M., Neri P., Bondioli F. (2015). Nano-TiO<sub>2</sub> Coatings for Limestone: Which Sustainability for Cultural Heritage? *Coatings* 5: 232-245.

Godbey W.T., Wu K.K., Mikos A.G. (1999). Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery. *Journal of Controlled Release*, 60: 149-160.

Gottardo S., Quiros Pseudo L., Totaro S., Riego Sintes J., Crutzen H. (2017). NANoREG framework for the safety assessment of nanomaterials, EUR 28550 EN, doi 10.2760/245972.

Hakkinen P.J., Green D.K.. (2002). Alternatives to animal testing: information resources via the internet and world wide web. *Toxicology* 173, 3–11.

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.

His, E., Seaman, R.N.L. & Beiras, R. (1997). A simplified bivalve larval bioassay method for seawater quality assessment. *Water Research* 31: 351-355.

Jaworska J., Gabbert S., Aldenberg T.. (2010). Towards optimization of chemical testing under REACH: A Bayesian network approach to Integrated Testing Strategies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 57:157–167.

- Libralato G., Losso C., Avezz F., [ugrave] & A. Volpi Ghirardini (2009) Influence of the salinity adjustment methods, salts and brine, on the toxicity of wastewater samples to mussel embryos, *Environmental Technology*, 30:1, 85-91.
- Natsch A., Rorijs E., Emter R., Loveren V. H., Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals.
- Noorlander C., Bekker C., Soeteman-Hernandez L., Sabella S., Quik J., Peijnenburg W., Prina-Mello A., Sips A. (2016a). Inventory of existing regulatory accepted toxicity tests applicable for safety screening of MNMs. NANoREG deliverable 6.4.
- OECD. (1998). OECD Guideline for Testing of Chemicals. Guideline 211: *Daphnia magna* reproduction test. Adopted September 1998.
- 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.
- Ormsby B., Phenix A., Keefe M., Learner T. (2016). A productive collaboration between conservation and industry: Developing wet surface cleaning systems for unvarnished painted surfaces. *Studies in Conservation*, 61:sup2, 313-314.
- 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.
- Salem H., Sidney A Katz, Katz SA., 2003. *Alternative Toxicological Methods*. INBUNDEN, Engelska.
- Tedesco E., Mičetić I., Ciappellano S.G., Micheletti C., Venturini M., Benetti F., et al. (2015). Cytotoxicity and antibacterial activity of a new generation of nanoparticle-based consolidants for restoration and contribution to the safe-by-design implementation. *Toxicology in Vitro* 29: 1736-1744.
- Turk J., Mauko Pranjić A., Tomasin P., Škrlep L., Antelo J., Favaro M., Sever Škapin A., Bernardi A., Ranogajec J., Chiurato M. (2017). Environmental performance of three innovative calcium carbonate-based consolidants used in the field of built cultural heritage. *International Journal of Life Cycle Assessment*, 22(9):1329-38.
- 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.
- Vermeire, T.G., Aldenberg, T., Dang, Z., Janer, G., De Knecht, J.A., Van Loveren, H., Peijnenburg, W.J.G.M., Piersma, A.H., Traas, T.P., Verschoor, A.J., Van Zijverden, M., Hakkert, B. (2007). *Selected Integrated Testing Strategies (ITS) for the risk assessment of chemicals*. RIVM Report. RIVM, Bilthoven, The Netherlands.

Volpi Ghirardini A. & Pellegrini, D. (2001). I saggi di tossicità nella valutazione della qualità di acque e sedimenti di ambienti marini e di transizione: indicazioni per la scelta, la messa a punto, la valutazione e l'utilizzo dei metodi. *Biologia Marina Mediterranea*, 8(2):1-16.

Volpi Ghirardini A., Losso C., Arizzi Novelli A., Baù A., His E., Ghetti P.F., 2005a. *Mytilus galloprovincialis* as bioindicator in embryotoxicity testing to evaluate sediment quality in the Lagoon of Venice(Italy). *Chem. Ecol.* 21,455–463.

Zaho M., Wang C., Liu Kevin K., Sun L., Li L., Liu W., 2009. Enantioselectivity in chronic toxicology and accumulation of the synthetic pyrethroid insecticide bifenthrin in *Daphnia magna*.

