

L'ecotossicologia dei nanomateriali

Dott.ssa Sonia Manzo. ENEA CR Portici (NA)



ha fatto crescere la necessità di determinarne il potenziale rischio per l'uomo e per l'ambiente

Tuttavia :
attualmente non
esistono procedure e
metodi analitici in
grado di determinare la
concentrazione
ambientale di
nanomateriali
ingegnerizzati

Pertanto non se ne conosce la reale diffusione, ed è possibile solo fare delle stime

Il problema non è trascurabile

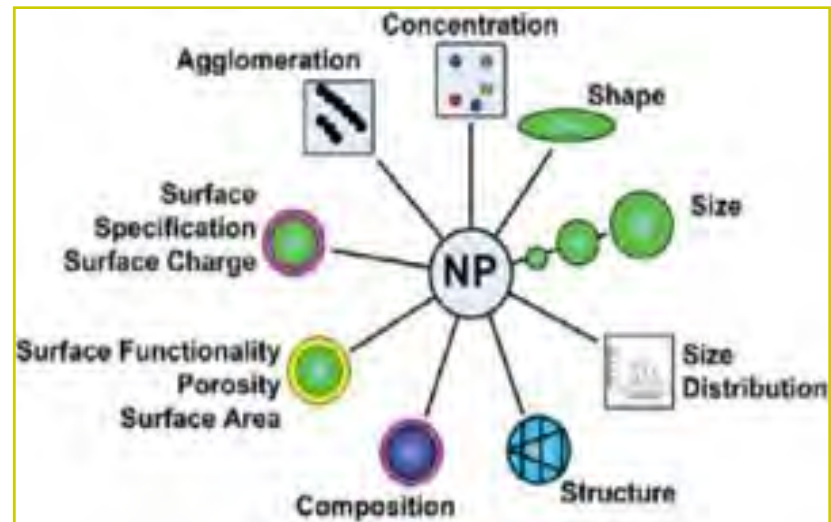
Se guardiamo ad esempio ai soli cosmetici, stime prudenti ci portano a poter affermare che in Italia vengono disperse ogni anno, **almeno 10 tonnellate di nanomateriali** conseguenti al solo utilizzo di questa categoria di prodotti.

Predicted concentrations of ENPs arising from use in consumer products

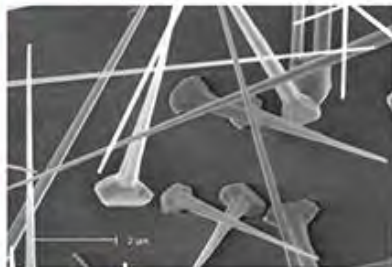
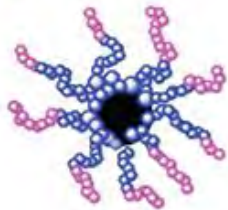
	Water ($\mu\text{g/l}$)	Soil ($\mu\text{g/kg}$)
Ag	0.010	0.43
AlO ₃	0.0002	0.01
Au	0.14	5.99
CeO ₂	<0.0001	<0.01
Fullerenes	0.31	13.1
Hydroxyapatite	10.1	422
Latex	103	4307
Organo-silica	0.0005	0.02
SiO ₂	0.0007	0.03
TiO ₂	24.5	1030
ZnO	76	3194

Tiede et al., 2009

Il loro comportamento/ tossicità dipende da :

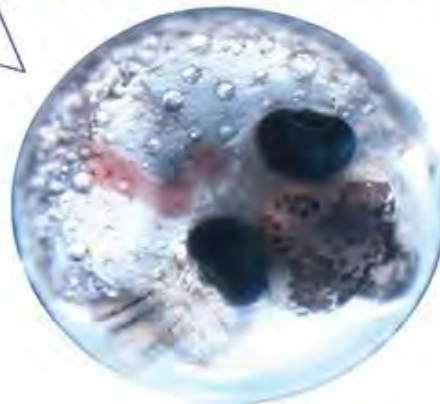


Nanomaterial Properties

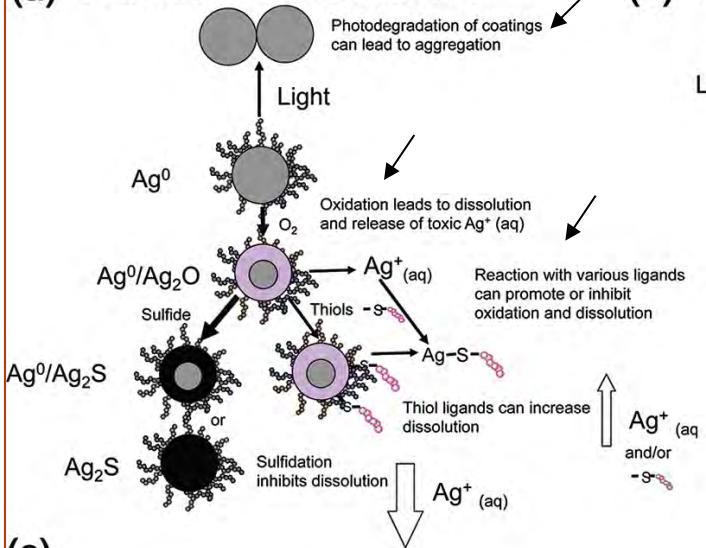


Environmental Transformations

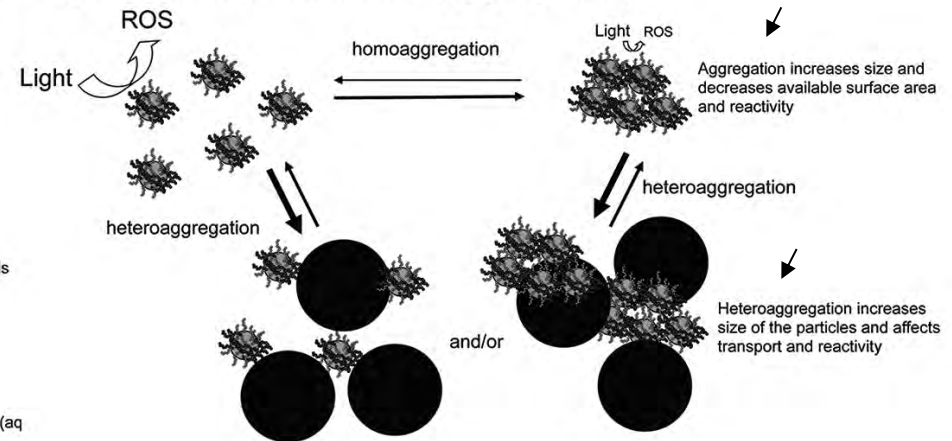
Exposure & Effects



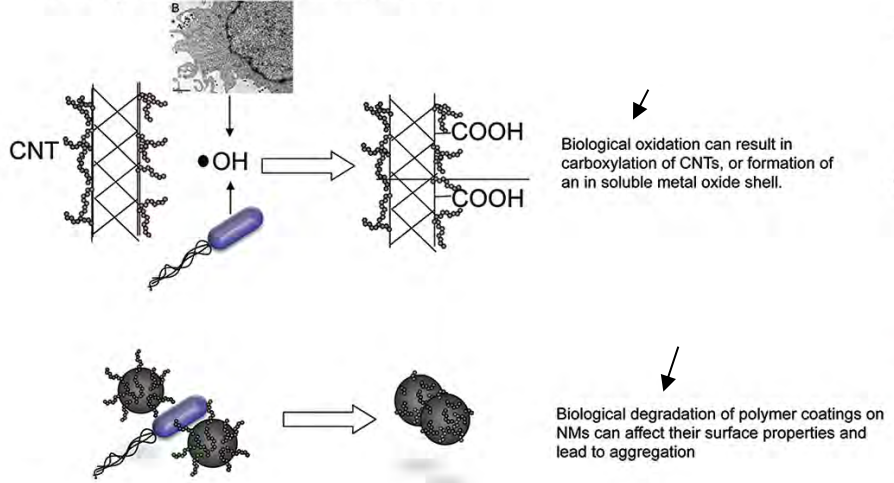
(a) Chemical Transformations



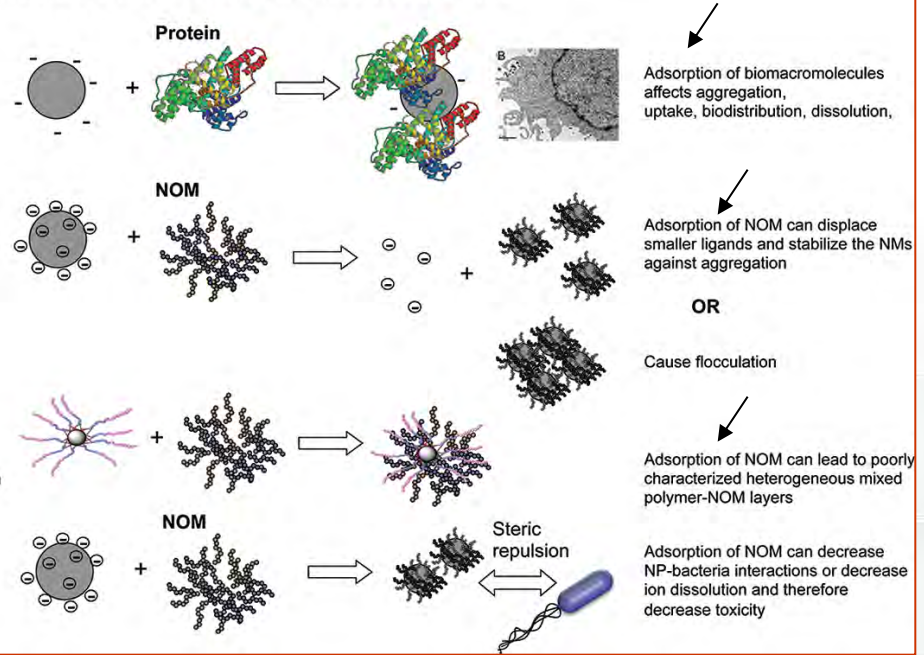
(b) Physical Transformations (aggregation)



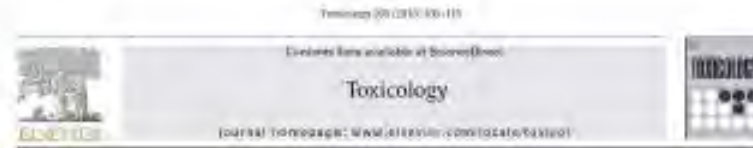
(c) Biological Transformations



(d) Interactions with Macromolecules



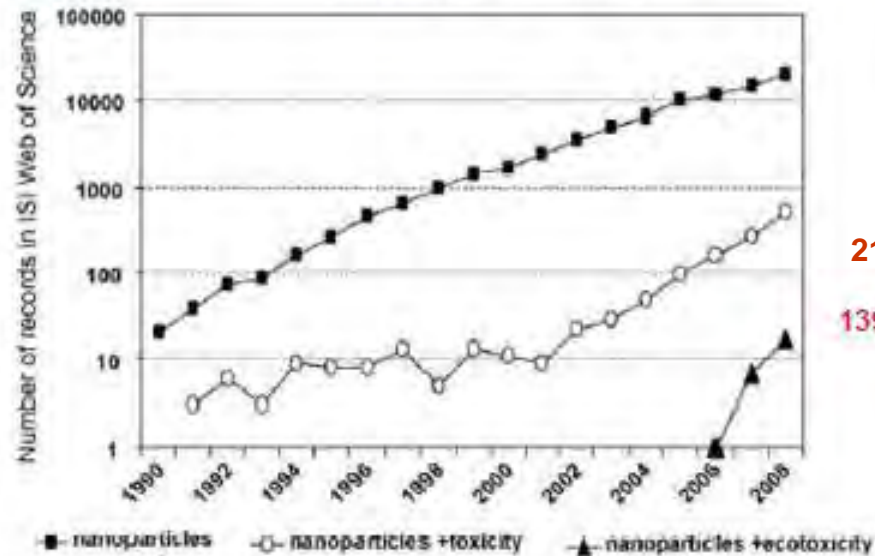
Tossicità ed ecotossicità delle NP



REVIEW

From ecotoxicology to nanotoxicology

Anne-Kathrin*, Henri-Charles Dubouquit



214 at May 2013

139 at May 2012

Fig. 1. Number of records in ISI Web of Science of Thomson Scientific. Search was made in April 3, 2009 using keywords "nanoparticles", "nanoparticles AND toxicity" and "nanoparticles AND ecotoxicity" (field: topic). "AND" means combination of the respective keywords.

L' ecotossicologia

studia e valuta

gli
Effetti

nell'
ECOSISTEMA

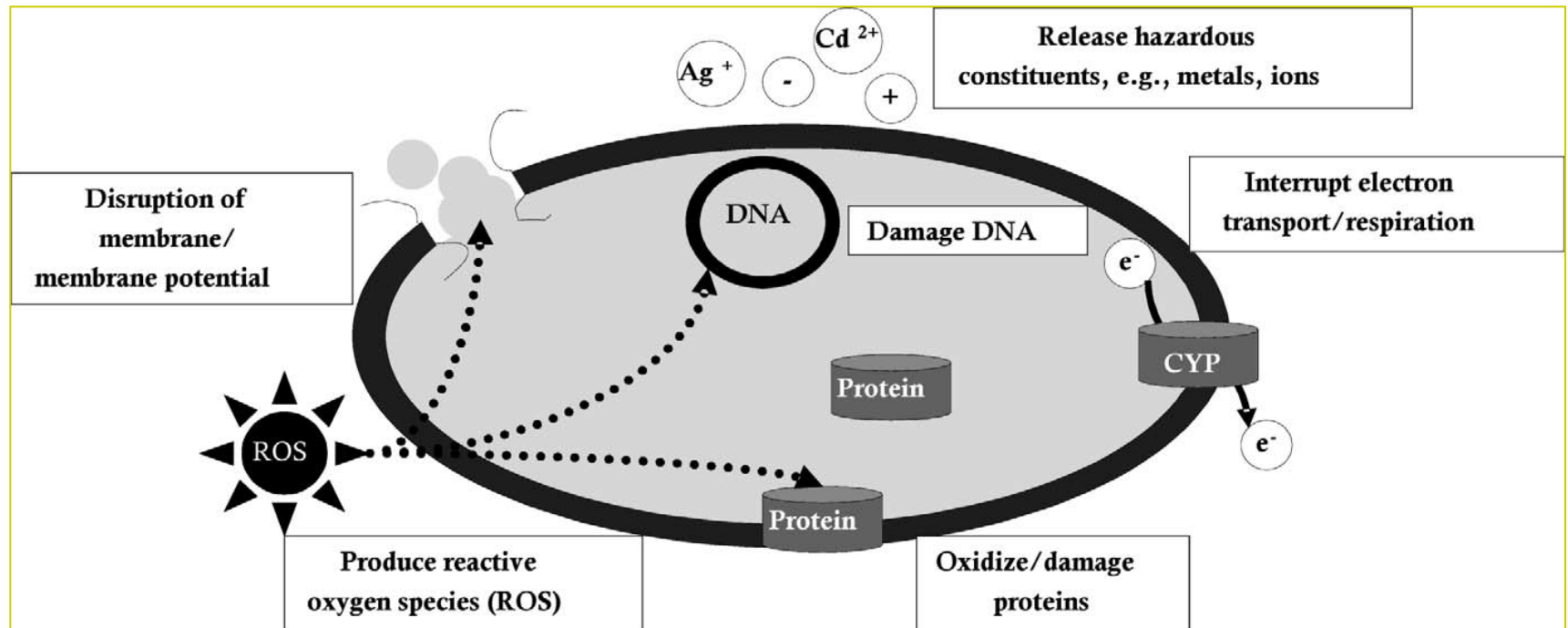
di Sostanze
chimiche e
miscele

Obiettivi

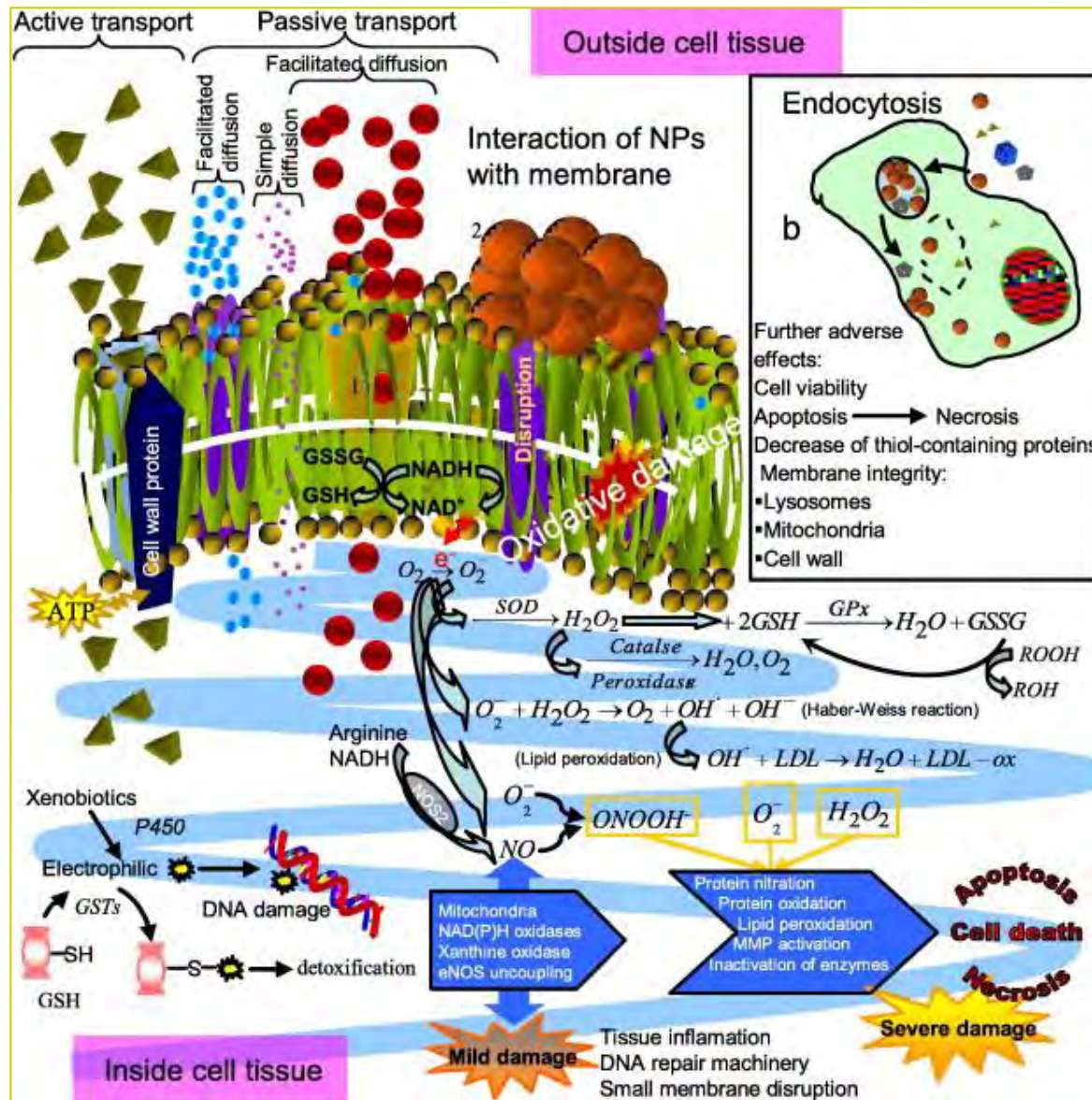
- Contribuire alla valutazione stato di qualità ambientale
- Definire la compatibilità ambientale di sostanze chimiche
- Contribuire alla valutazione del rischio ambientale



Possibili Meccanismi di tossicità dei nanomateriali per i batteri



Comportamento della membrana cellulare in presenza di nanomateriali

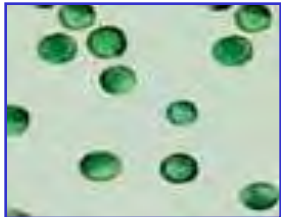


Effetti ecotossicologici di NPs in acqua di mare

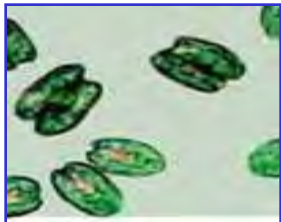
Growth inhibition
96 h US EPA 1985



Dunaliella tertiolecta



Isocrysis galbana



Tetraselmis suecica



Artemia salina

mortality 48h, IRSA-CNR, 1997



Paracentrotus lividus

embryos
development 72 h, US EPA 1995

ZnO, SiO₂
SWCNTs
Carbon Black

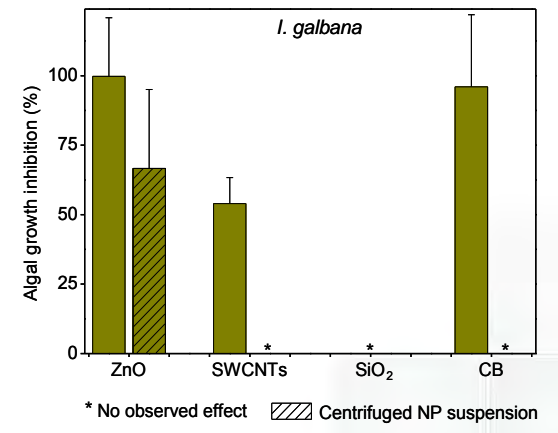
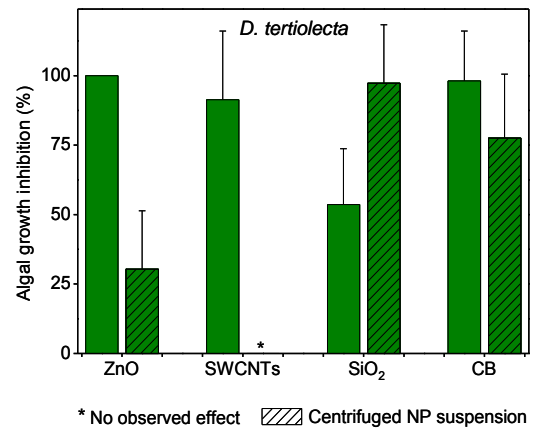
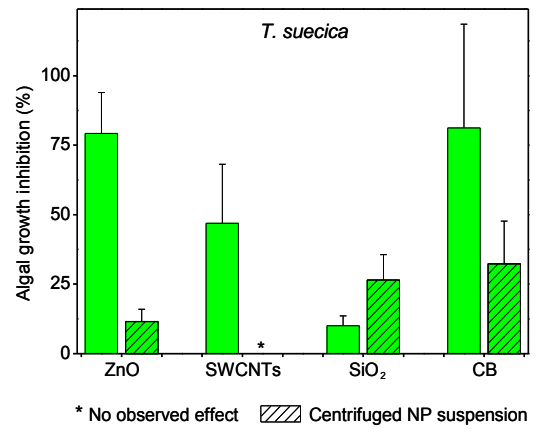
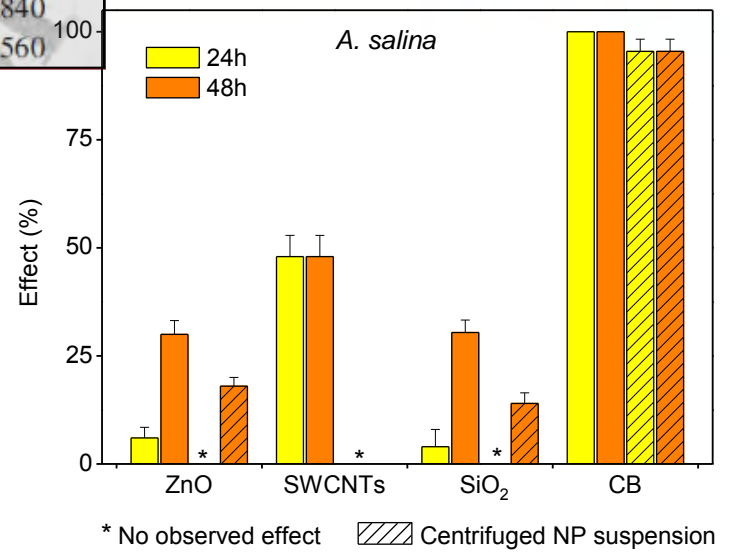
Limit concentration test

Centrifugazione

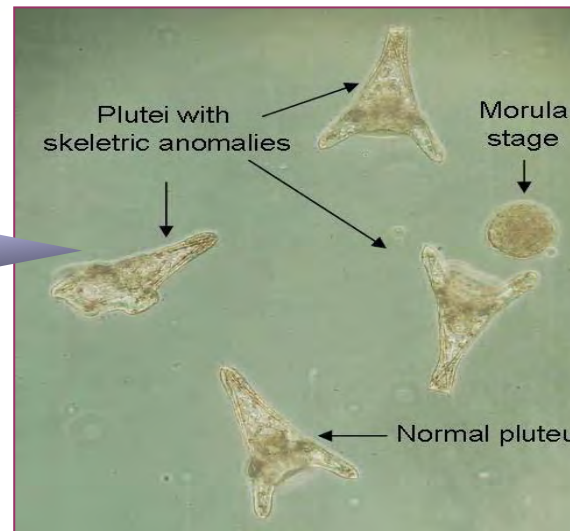
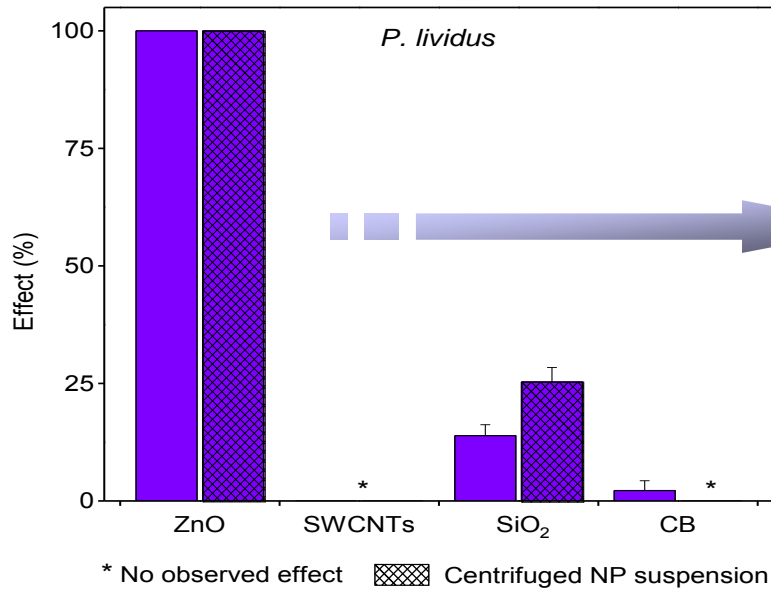
Characterization of Nanoparticles
in Seawater for Toxicity Assessment Towards Aquatic Organisms

Particles	Concentration (mg l ⁻¹)	Size range (nm)	
		Centrifuged	Not centrifuged
ZnO	133	-	1860-2500
SWCNTs	66	650-780	800-1800
SiO ₂	200	400-460	950-1840
CB	66	-	1130-1560

- *A. salina* risulta particolarmente sensibile alle sospensioni di CB e di SWCNTs
- CB mostra effetti simili nel campione centrifugato e non centrifugato
- ZnO e SiO₂ provocano effetti moderati a 48 h principalmente nel campione non centrifugato

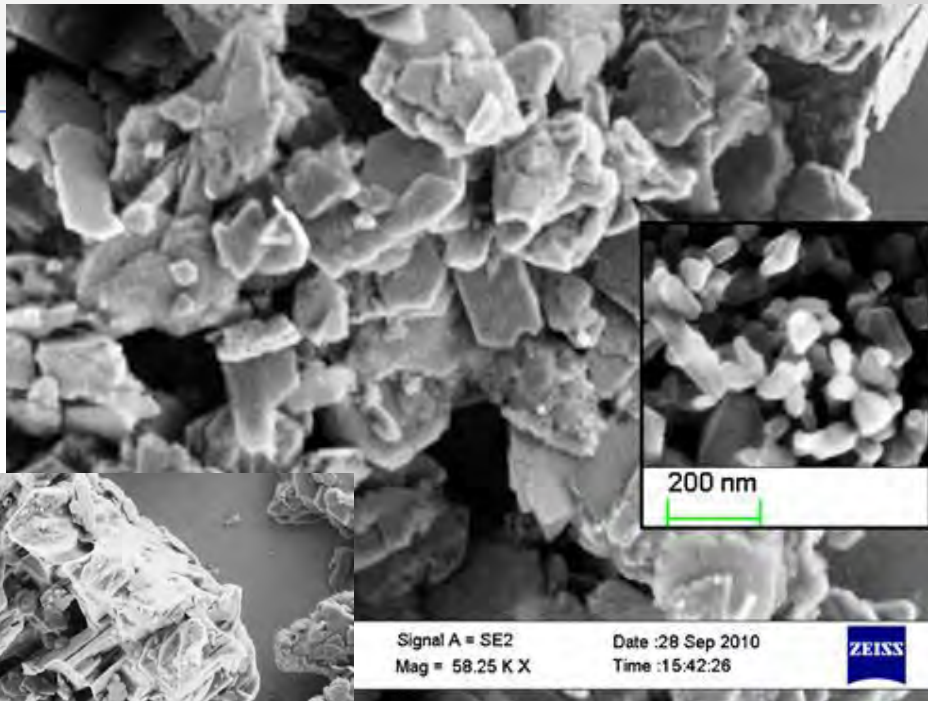


D. tertiolecta risponde sensibilmente a tutte le sospensioni, mostrando generalmente effetti maggiori nel campione non centrifugato.

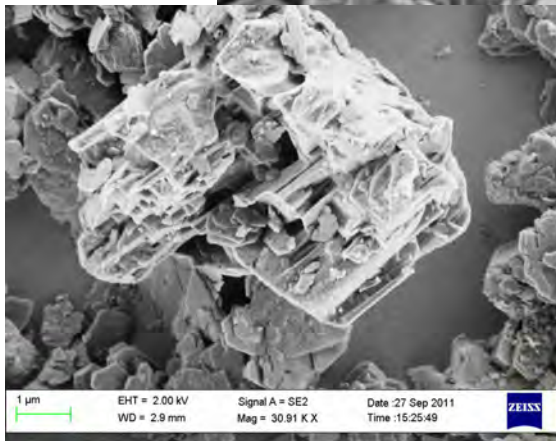


ZnO (centrifugato e non) esercita il 100% effetto sugli embrioni del riccio di mare.

SiO₂ mostra solo scarsi effetti tossici, SWCNT e CB non mostrano alcun effetto tossico







SEM image of a ZnO contaminated soil sample ($230 \text{ mg}_{\text{Zn}} \text{ kg}_{\text{soil}}^{-1}$). Inset: SEM image of pure ZnO NPs.



Investigation of ZnO nanoparticles' ecotoxicological effects towards different soil organisms

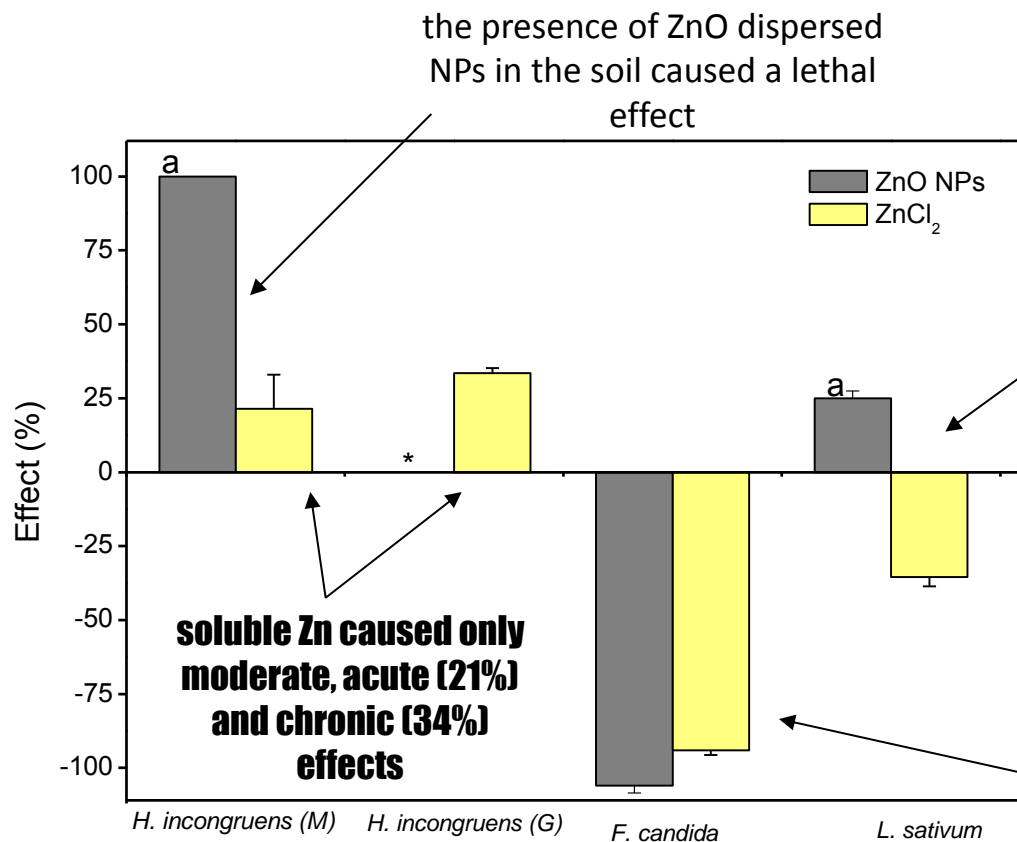
Manzo S., *et al. Environ Sci Pollut Res* (2011) 18:756–763

Batteria di test ecotossicologici utilizzata per il suolo

Test organism	Test endpoint	Reference
 <i>Lepidium sativum</i>	seed germination root elongation 72 h	EPA, 1996; OECD, 2003
 <i>Heterocypris incongruens</i>	6d growth mortality	Chial & Persoone 2002
 <i>Folsomia candida</i>	reproduction rate 28 d avoidance test 100 min	ISO 11267 (1999) Aldaya <i>et al.</i> 2006
 <i>Vicia faba</i>	Micronucleus frequency 96 h	Kanaya <i>et al.</i> 1994

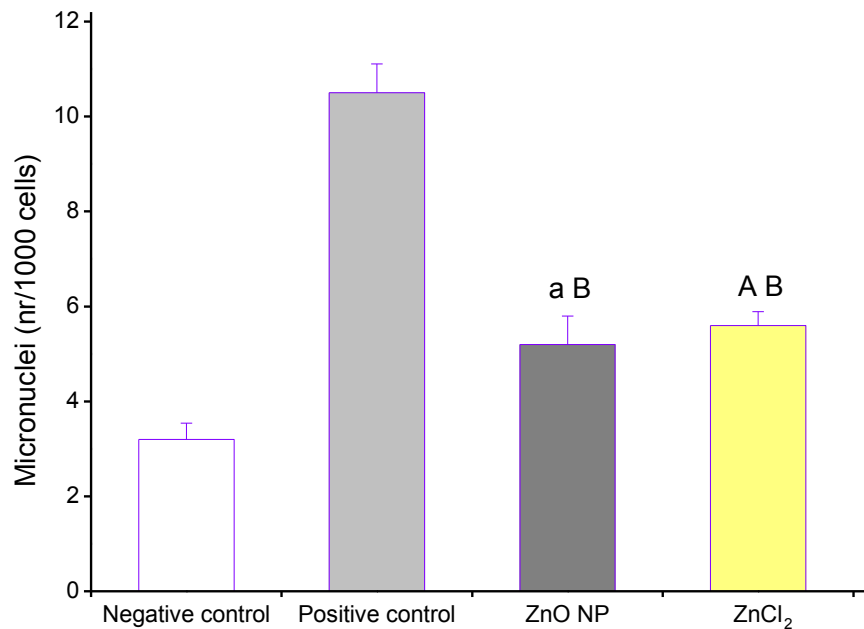
Toxicity in soil matrix : ZnO NP versus ionic Zn

ZnO NP toxicity. Mean percent effect of mortality (M) and body growth (G) measured at Zn concentration of 230 mg Kg⁻¹ d.w., tested both as ZnO NPs and ZnCl₂. (a) indicates statistically significant difference with p<0.05 between the two treatments; (*) no data could be measured because of 100% mortality.



A clear difference between ZnO NPs and soluble Zn can be observed instead for root elongation

ZnO NPs and ZnCl₂ spiked soils produce a clear biostimulation respect to standard soil devoided of Zn

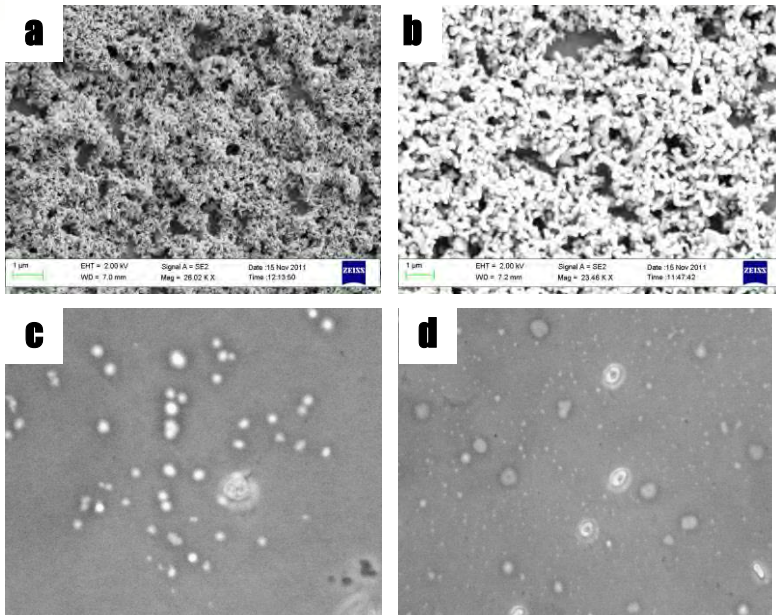


Vicia faba



Slight genotoxic effects with *V. faba* micronucleus test were appraised with both spiked soils

Mean values of *V. faba* micronucleus frequencies due to exposure to ZnO NP and ZnCl₂ spiked soils. OECD soil was used as negative control. Positive control was prepared by standard soil saturated with K₂Cr₂O₇ solution (10 mg l⁻¹). Statistically significant differences between each treatment and the negative control have (a) p<0.05 and (A) p<0.01; as for positive control differences were statistically significant with (B) p<0.01.



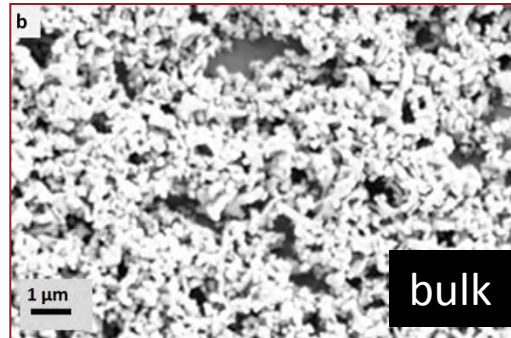
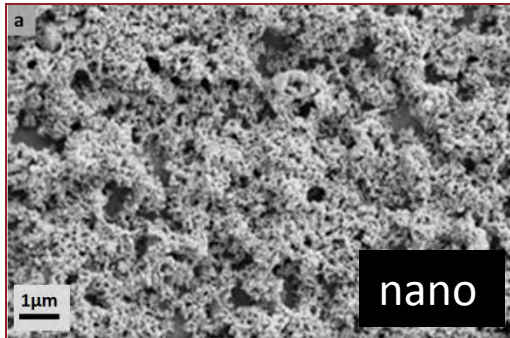
Nano and bulk ZnO, as received, observed by SEM (a, b) and phase contrast microscopy images of their dispersions in the test medium in the presence of algal cells (for comparison purposes the mean size of algal cells is $\sim 10 \mu\text{m}$) (c,d).

La tossicità del nZnO è attribuibile esclusivamente allo Zn^{2+} ?

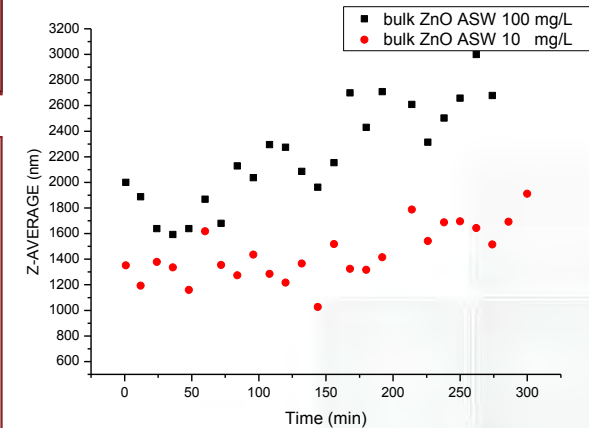
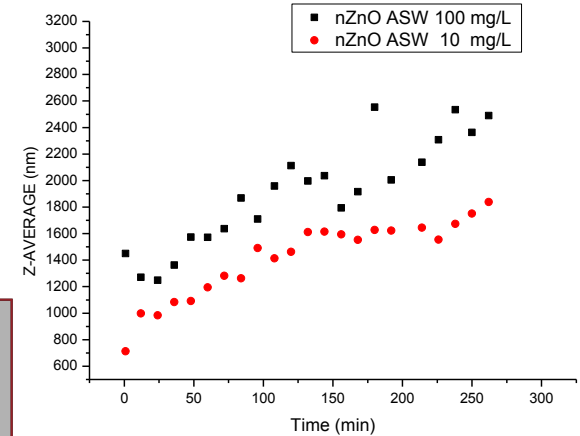
Toxic effects of ZnO nanoparticles towards marine algae *Dunaliella tertiolecta*

Manzo S. et al., 2013 STOTEN.

Caratterizzazione di nanoZnO in acqua di mare



Cinetica di aggregazione (DLS)

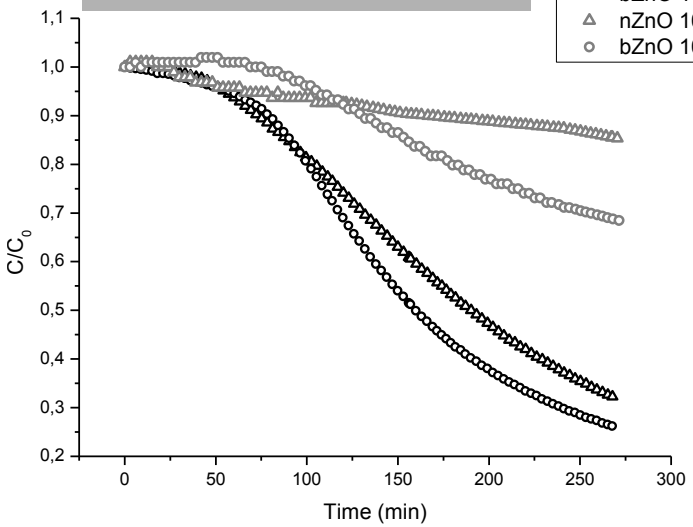


Curva di sedimentazione

- ▲ nZnO 100ppm
- bZnO 100ppm
- △ nZnO 10ppm
- bZnO 10 ppm

Aggregazione rapida di nZnO. Le dimensioni degli aggregati aumentano per tutto il periodo di osservazione.
Più lenta aggregazione per ZnO bulk

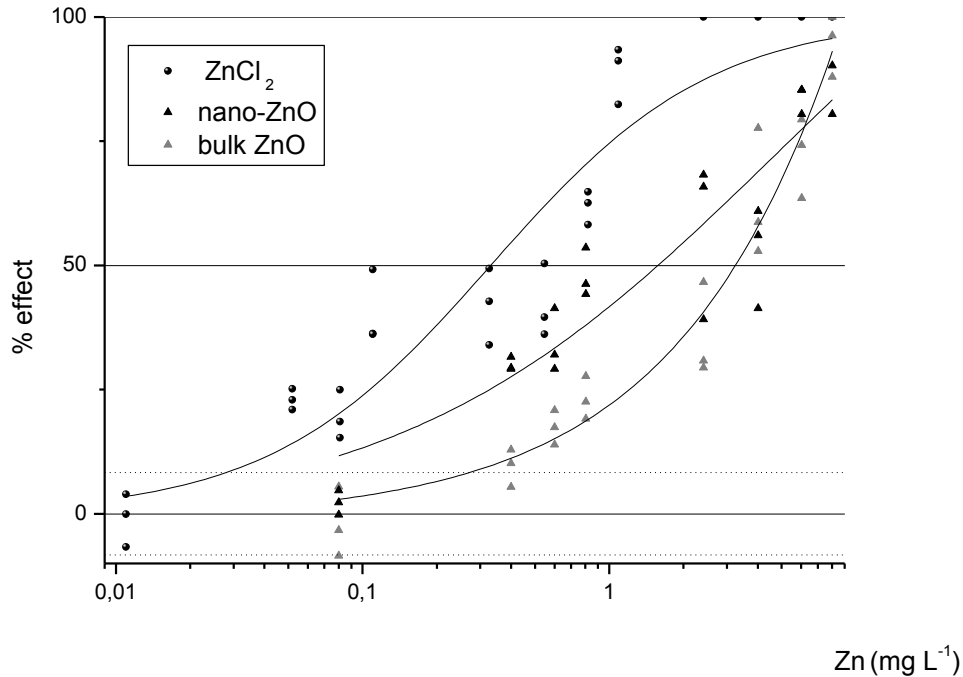
Veloce sedimentazione per i grandi aggregati alla concentrazione di 100mg/L
Sedimentazione meno veloce al diminuire della concentrazione e delle dimensioni



Optical absorbance at 468 nm

➔ La dissoluzione di entrambe le specie di ZnO in acqua di mare a 10 mg/L risulta quasi completa dopo 24 h

Toxic effect of nanoZnO towards *D. tertiolecta*



nano-ZnO risulta di fatto piu' tossico del corrispettivo bulk mostrando, inoltre una tossicità differente rispetto a quella del Zn²⁺.

	NOEC (mg L ⁻¹)	LOEC (mg L ⁻¹)	EC50 (mg L ⁻¹)
ZnCl ₂	0.02	0.11	1.35 [0.76-1.45]
Zn ²⁺	0.01	0.05	0.65 [0.36-0.70]
<u>nano-ZnO</u>	0.1	0.5	2.42 [0.97-2.87]
<u>Zn</u>	0.08	0.40	1.94 [0.78-2.31]
<u>bulk ZnO</u>	1	3	4.45 [3.45-5.98]
<u>Zn</u>	0.80	2.41	3.57 [2.77-4.80]

EC50 values were obtained by the ICp EPA method [25]. NOEC and LOEC values were calculated by the Dunnett's procedure



Embriotossicità (Pagano *et al.*, 1986; U. S. EPA, 1995)

Endpoints

Sviluppo embrionale
Frequenza tipo di
malformazione



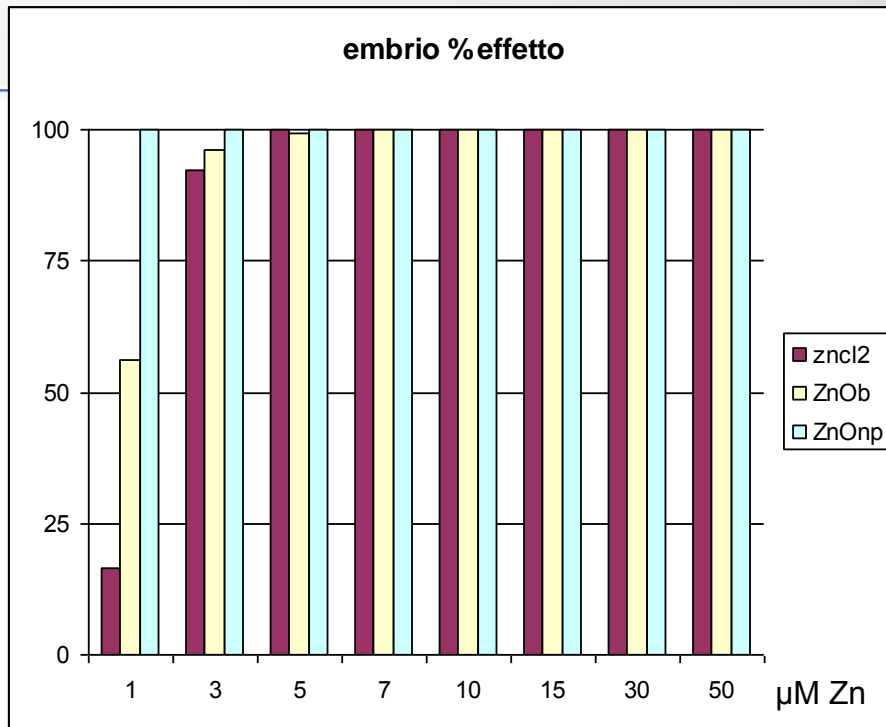
Spermiotossicità (Pagano *et al.* 1986, modificato)

Endpoints

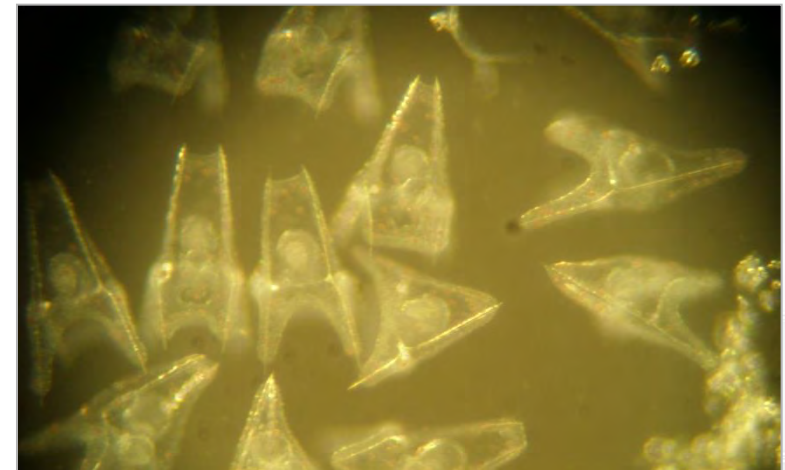
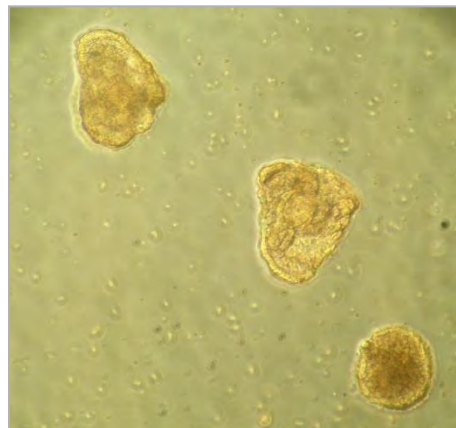
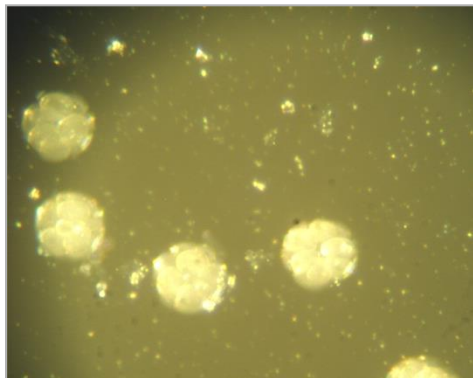
Capacità fecondante
Qualità della progenie

Embriotoxic and spermiotoxic Effects of nanosized and bulk ZnO for mediterranean sea urchin *Paracentrotus lividus*

Embriotossicità

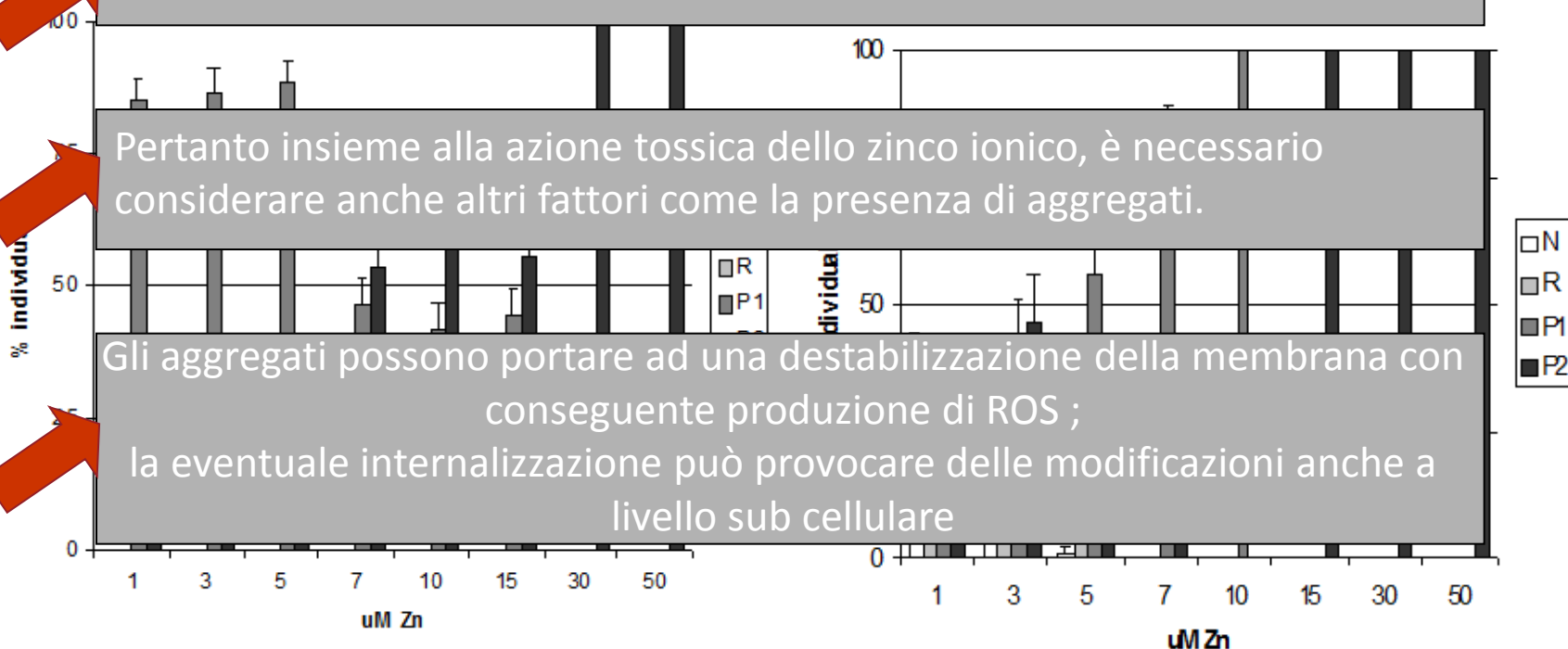


Si evidenziano
differenze alla
concentrazione di
1 µM Zn (0.08mg/L)



Anomalie di sviluppo in embrioni di *P. lividus* dopo esposizione a nano ZnO

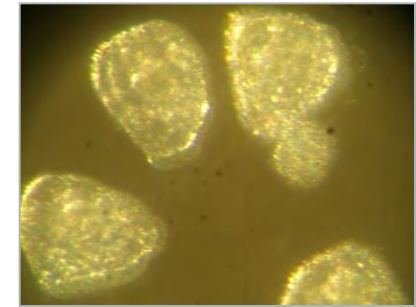
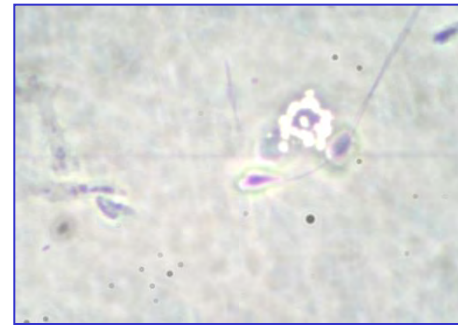
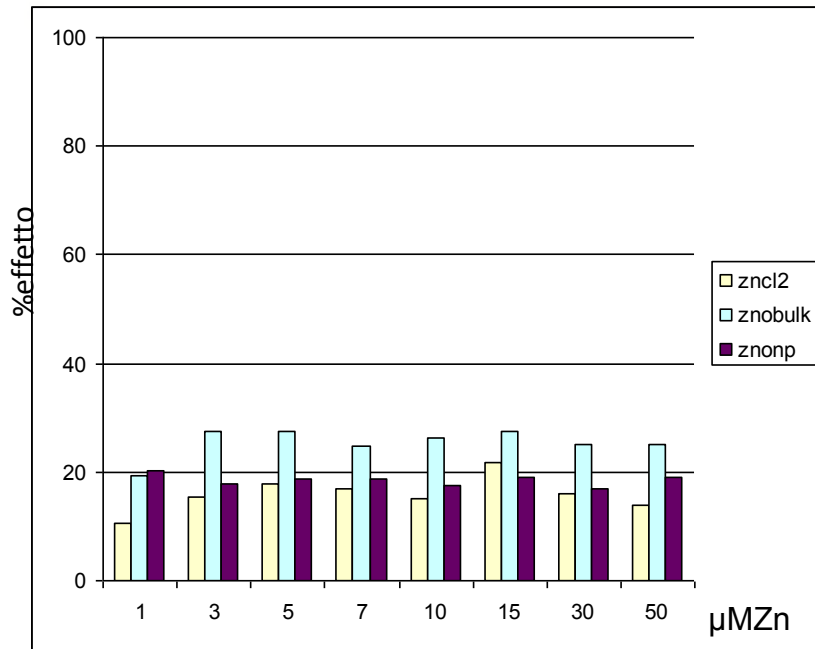
Si evidenzia un andamento particolare per la tipologia di danno P1 nel caso di esposizione a nano ZnO



Pertanto insieme alla azione tossica dello zinco ionico, è necessario considerare anche altri fattori come la presenza di aggregati.

Gli aggregati possono portare ad una destabilizzazione della membrana con conseguente produzione di ROS ;
la eventuale internalizzazione può provocare delle modificazioni anche a livello sub cellulare

Valutando la distribuzione delle anomalie della progenie si possono evidenziare alcune differenze di tipologia di effetto



Effetti legati alla esposizione di gameti maschili a nZnO

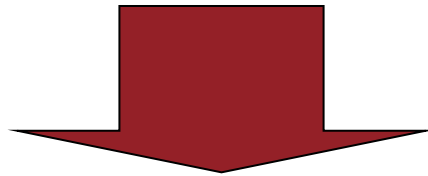
La cellula spermatica è altamente differenziata

Il tasso di fecondazione non risulta particolarmente modificato

Accumula un danno trasmissibile: 100% effetto (P2) per la progenie ottenuta da spermatozoi esposti a ZnO

In conclusione

- La tossicità di nanoZnO per i gameti e gli embrioni di *P. lividus* non è attribuibile esclusivamente alla dissoluzione di ioni zinco
- Esiste una possibile azione tossica legata alla dimensione originaria del materiale, che ne può determinare interazioni particolari sia con gli organismi che con la matrice



Ulteriori studi sono necessari per individuare il meccanismo di azione tossica delle particelle di ZnO per *P. lividus*

Grazie per l'attenzione

