

**Università Politecnica delle Marche**  
Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente  
Corso di Laurea in Scienze Ambientali e Protezione Civile

# **Bioaccumulo e formazione *in vivo* di nanoparticelle di biossido di titanio in cozze commestibili**

Bioaccumulation and *in vivo* formation of titanium dioxide nanoparticles in edible mussels

Tesista: Cappelli Sara Cassandra  
Docente relatore: Prof.ssa Annibaldi Anna

A.A. 2020/2021



# Riassunto esteso dello studio

- Negli ultimi decenni è sensibilmente aumentato l'impiego di nanoparticelle (NPs), e allo stesso modo sono aumentate le emissioni di tali NPs in ambiente, con conseguente rischio di esposizione per uomo e animali. Di particolare importanza, in tal proposito, sono le nanoparticelle di biossido di titanio ( $\text{TiO}_2\text{NPs}$ ), dato il loro largo impiego in numerosi settori e prodotti.
- Lo scopo di questo studio è, infatti, quello di valutare il bioaccumulo di  $\text{TiO}_2\text{NPs}$  in cozze commestibili allevate in acqua di mare artificiale inquinata. È stato condotto uno studio *in vivo* esponendo le cozze a diverse concentrazioni di  $\text{TiO}_2\text{NPs}$  o titanio ionico per 4 giorni.
- La spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS) ha mostrato la presenza di titanio in tutti i gruppi proporzionalmente ai livelli di esposizione. La ICP-MS a singola particella ha rivelato la presenza di NP sia nelle cozze trattate con  $\text{TiO}_2\text{NP}$  che nelle cozze trattate con titanio ionico, suggerendo una potenziale formazione di nanoparticelle in vivo. Questi risultati sono stati confermati dal TEM-EDX. Tuttavia, le cozze hanno eliminato più del 70% di  $\text{TiO}_2\text{NPs}$  dopo 3 giorni di depurazione.
- Questi risultati mostrano il potenziale di esposizione dei consumatori al  $\text{TiO}_2\text{NPs}$  quando cozze contaminate vengono consumate senza un adeguato processo di depurazione.

# Le nanoparticelle

La produzione e l'utilizzo di nanoparticelle (NPs) sono notevolmente aumentati negli ultimi decenni

Produzione, uso e smaltimento di NPs portano ad emissioni in ambiente, aumentando l'esposizione degli organismi viventi

Tra le NPs da monitorare maggiormente, l'OCSE ha indicato le nanoparticelle di biossido di titanio:

## TiO<sub>2</sub>NPs

Perché tramite le acque reflue possono confluire nell'ambiente marino che, con le sue particolari caratteristiche, ne può favorire l'aggregazione, rendendo le NPs più facilmente assimilabili e accumulabili

Per le loro proprietà, diffusione e importanza commerciale

Perché il loro impiego continuo comporta il rilascio in ambiente, con conseguente rischio di esposizione per uomo e animali

# Molluschi bivalvi come bioindicatori

---

Per chiarire il ruolo e il destino delle  $\text{TiO}_2$ NPs in matrici ambientali e biologiche, possono essere utilizzati i molluschi bivalvi che, in quanto filtratori, possono essere considerati potenziali indicatori di questi nuovi contaminanti.

Negli studi finora condotti sui bivalvi, la valutazione del bioaccumulo è stata limitata alla misurazione della concentrazione totale di titanio utilizzando metodi analitici classici (AAS, ICP-MS, ICP-OES), senza però distinguere le NPs dagli ioni.

La rilevazione delle NPs è complicata, in quanto le tecniche analitiche classiche non sono in grado di definire contemporaneamente tutti i parametri che caratterizzano un nanomateriale. Di conseguenza, mancano dati sull'effettiva concentrazione di  $\text{TiO}_2$ NPs nei tessuti e del loro potenziale di trasformazione *in vivo* nel mollusco.

# Lo studio dell'IZSve

Lo studio è stato condotto dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSve), in collaborazione con il RIKILT (Istituto per la Sicurezza Alimentare dell'Università di Wageningen, Paesi Bassi).

I risultati sono stati recentemente pubblicati sulla rivista Food Chemistry.



- I molluschi bivalvi possono fungere da sentinelle del potenziale bioaccumulo?  
Per rispondere a tale quesito, i ricercatori IZSve hanno valutato la capacità delle NPs di biossido di titanio di accumularsi in cozze (*Mytilus galloprovincialis*) sottoposte a contaminazione sperimentale.
- È stato condotto uno studio in vivo su esemplari di *Mytilus galloprovincialis* provenienti dalla laguna veneta, suddivisi in gruppi trattati (con NPs e/o titanio ionico) e gruppi di controllo. Al termine del trattamento, alcuni sono stati quindi sottoposti a depurazione, per valutarne l'efficacia; successivamente, tutti i mitili sono stati analizzati dal punto di vista chimico e istologico.

# Lo studio *in vivo*

Gli esemplari raccolti sono stati divisi in 7 vasche diverse (100 individui per vasca):

Numero del gruppo	Trattamento
1-2	Controllo
3	Soluzione di titanio ionico
4-5	Sospensione di TiO <sub>2</sub> NPs a bassa concentrazione
6-7	Sospensione di TiO <sub>2</sub> NPs ad alta concentrazione

Il trattamento è durato 4 giorni.

Alla fine del trattamento 50 cozze per vasca sono state raccolte per l'analisi chimica e istologica.

Le restanti cozze sono state tenute in vita per altri 7 giorni per lo studio sulla depurazione.

# Analisi chimica



## Determinazione del livello di titanio totale

- Digestione del mollusco con acido nitrico
  - ICP-MS



## Individuazione delle TiO<sub>2</sub>NPs

- Digestione enzimatica
  - spICP-MS

# Risultati dell'analisi ICP-MS

L'analisi in ICP-MS ha mostrato la presenza di titanio in tutti i gruppi trattati (dal 3 al 7), in livello proporzionale all'esposizione stessa.

Non è stato rilevato titanio nei gruppi di controllo 1-2 (come previsto)

La quantità di titanio accumulata è proporzionale al trattamento somministrato, infatti la concentrazione di titanio totale dei gruppi 4-5 è minore di quella dei gruppi 6-7.

Questi risultati suggeriscono che nelle condizioni sperimentali di questo studio, la biodisponibilità del titanio è comparabile, indipendentemente dalla sua forma pura (ionica o NPs).

# Risultati dell'analisi spICP-MS

La precedente analisi non dà informazioni sulla forma di Ti (ionico o  $\text{TiO}_2\text{NP}$ ); per chiarire la presenza di  $\text{TiO}_2\text{NPs}$ , i dati sono stati analizzati tramite spICP-MS.

L'analisi in spICP-MS ha rivelato che tutto il titanio presente nelle cozze trattate con  $\text{TiO}_2\text{NPs}$  era sotto forma di NPs con distribuzione dimensionale simile alle nanoparticelle somministrate, evidenziando sia l'effettiva capacità dei mitili di bioaccumulare  $\text{TiO}_2\text{NPs}$  sia l'assenza di eventuali biotrasformazioni delle NPs.

Anche il titanio presente nelle cozze trattate con ioni di titanio era sotto forma di NPs, con una distribuzione dimensionale completamente diversa dagli altri gruppi, suggerendo in questo caso la potenziale formazione di NPs nel mollusco in vita a partire dal titanio ionico. Questi risultati sono stati successivamente confermati anche mediante microscopia elettronica a trasmissione (TEM) accoppiata a un rivelatore a dispersione di energia (EDS).

# L'importanza della depurazione e del controllo dei bivalvi

- Lo studio sulla depurazione ha evidenziato come già dopo 3 giorni dalla somministrazione, i mitili siano stati in grado di auto-depurarsi, con una diminuzione delle NPs presenti in tutti i gruppi trattati. Dopo 3 giorni di depurazione, le cozze contaminate hanno infatti eliminato oltre il 70% delle NPs di biossido di titanio, suggerendo una possibile esposizione dei consumatori all'ingestione di  $\text{TiO}_2$  NPs, qualora vengano consumate cozze non sottoposte a un adeguato processo di depurazione.
- I rischi potenziali derivanti dalla presenza delle NPs negli alimenti sono tuttora oggetto di studi e valutazioni scientifiche. Pertanto, anche nello specifico caso delle  $\text{TiO}_2$  NPs restano da stabilire i livelli massimi di sostanza che non abbiano un effetto tossico dimostrabile e rilevante per la salute umana.
- Sono necessarie ulteriori ricerche per definire diversi protocolli *in vivo* per comprendere e controllare l'accumulo di  $\text{TiO}_2$  NPs in altri tipi di molluschi contaminati da questi materiali. Infatti, deve essere sottolineato che il presente studio ha preso in considerazione un solo tipo di  $\text{TiO}_2$  NPs. I risultati attuali non possono essere generalizzati a tutti i tipi di  $\text{TiO}_2$  NPs a causa degli effetti ampiamente variabili di  $\text{TiO}_2$  NPs sull'attività biologica.

Grazie per  
l'attenzione

