



21° Congresso Nazionale

Società Italiana di Tossicologia

**Pericolo, rischio
e rapporto
rischio-beneficio**

BOLOGNA

20-22 Febbraio 2023

www.sitox.org

Andrea Spinazze, Francesca Borghi, Davide Campagnolo, Sabrina Rovelli, Giacomo Fanti, Marta Keller, Carolina Zellino, Andrea Cattaneo, Domenico M. Cavallo

Approccio probabilistico per la valutazione del rischio di nanomateriali: casi studio in scenari di esposizione occupazionale

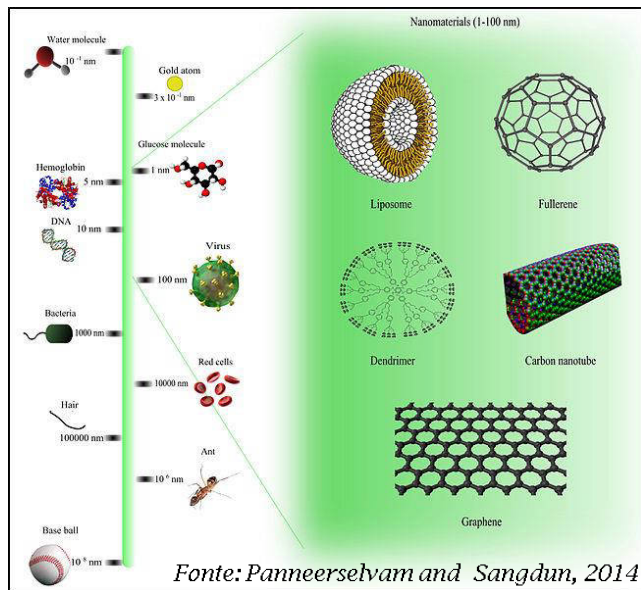
*Dipartimento di Scienza e Alta Tecnologia,
Università degli Studi dell'Insubria
Como*



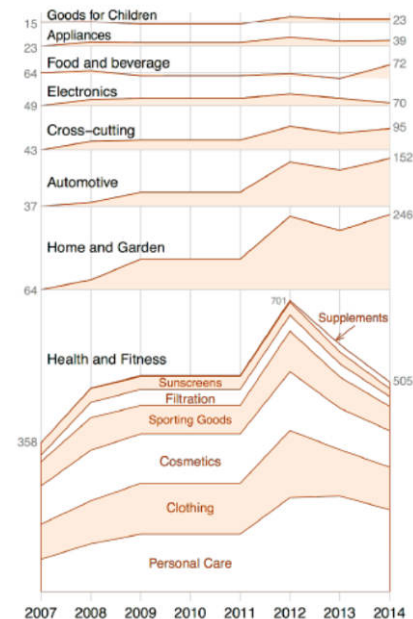
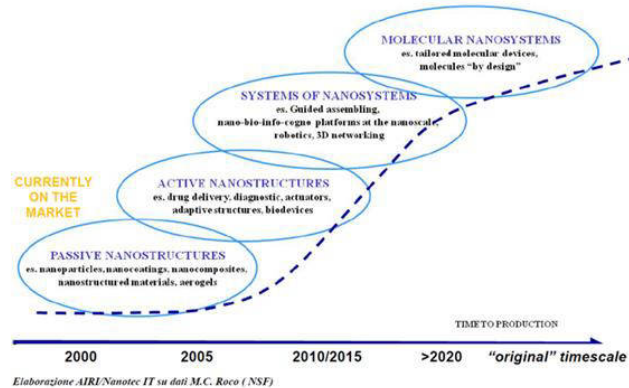
Nanomateriali ingegnerizzati (NM)

Materiali progettati e prodotti per avere almeno una dimensione < 100 nm

~~[COM(2011)696]~~ → **COMMISSION RECOMMENDATION of 10 June 2022 on the definition of nanomaterial (Text with EEA relevance) (2022/C 229/01)**



Proprietà peculiari - rendono i NM interessanti per applicazioni industriali, tecniche o biomediche



Queste stesse proprietà:

- possono definire un'attività biologica particolare (differente dallo stesso materiale in forma 'bulk')
- possono influenzare il potenziale tossicologico dei NM (e renderli pericolosi per la salute umana)

Biossido di Titanio	Nanoparticelle di argento
Nanotubi di carbonio a parete multipla (MWCNT)	Ossido di Cerio
Altri materiali fibrosi a base di carbonio	Biossido di silicio
Grafene	Seleniuro di cadmio (quantum dots)
Fullereni	Ossidi metallici (ZnO, FeO _x , Al ₂ O ₃)



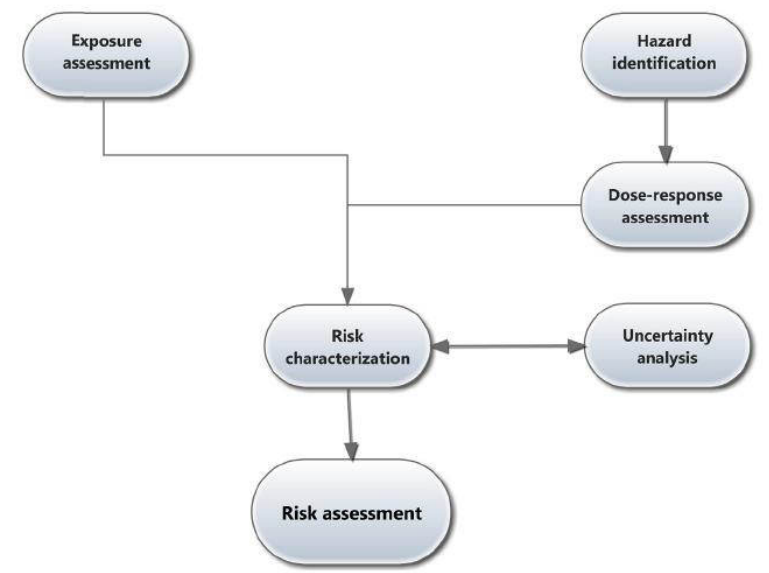
Biossido di titanio > 10.000 t/anno
CeO, FeO_x, ZnO, MWCNT 100 - 1000 t/anno
NM argento, quantum dots, fullerene < 10 t/anno
Biossido di silicio nanostrutturato = (da 10 a 10.000 t/anno)

Per un ulteriore sviluppo (sostenibile) dei NM, è **necessario valutare il loro eventuale impatto sulla salute e sull'ambiente**
 Necessità di strumenti per valutare adeguatamente gli impatti potenziali
 → **Risk Assessment (RA)**

La **metodologia** da utilizzare nel processo RA per i NM è **la stessa che viene utilizzata per altri agenti chimici**

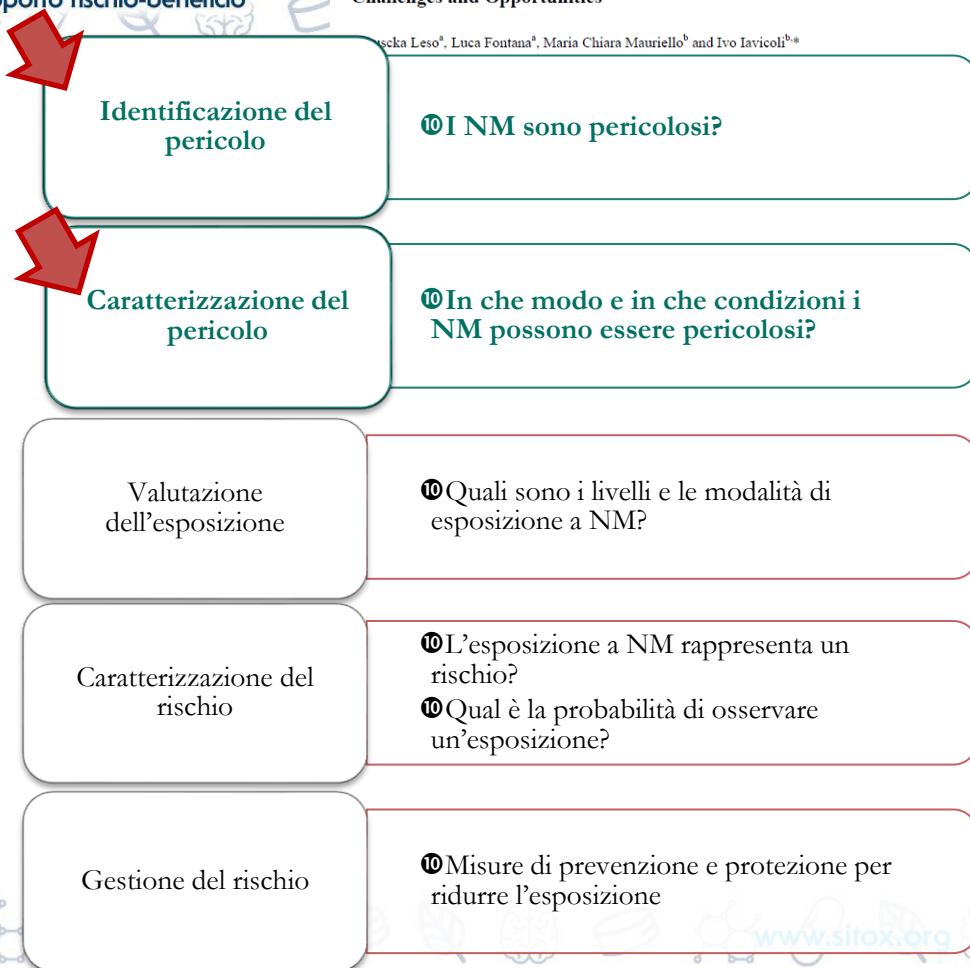
A livello pratico, il processo RA nel contesto delle nanotecnologie appare problematico, a causa delle **informazioni estremamente limitate attualmente disponibili** relative all'**identificazione dei pericoli**, alla **relazione dose-risposta** e limiti metodologici da affrontare nella **valutazione dell'esposizione**

M.-O. Mattsson, M. Simkó / Regulatory Toxicology and Pharmacology 84 (2017) 105–115



Lesko^a, Luca Fontana^a, Maria Chiara Mauriello^b and Ivo Iavicoli^{b,*}

Sebbene necessaria, la valutazione del rischio appare difficoltosa, perché i NM sono un **gruppo non uniforme di agenti chimici, caratterizzate da una varietà di proprietà fisico-chimiche il cui ruolo nel loro profilo tossicologico non è completamente compreso. Questo problema complica anche l'estrapolazione delle relazioni dose-risposta** e la valutazione dei livelli di esposizione che possono essere influenzati da tali caratteristiche. In questo scenario non è disponibile un adeguato modello di caratterizzazione del rischio in grado di informare sui rischi derivanti dall'esposizione a NM



Tra i fattori che rendono la procedura di RA particolarmente difficoltosa per i NM

- il grande numero di materiali
- la complessità dei cicli di vita dei NM
- le possibili variazioni di proprietà dei NM
- [...]
- la **difficoltà di ottenere dati appropriati sull'esposizione** (e con una metrica di misura adeguata)

Questo contributo si pone l'obiettivo di **analizzare e presentare alcuni aspetti rilevanti e possibili criticità riscontrabili nell'ambito del processo di valutazione dell'esposizione occupazionale a NM**, considerando lo stato dell'arte, le possibili integrazioni tra tecniche di misura e strategie di monitoraggio differenti, e proposte sperimentali definite nella letteratura scientifica

Identificazione del pericolo

❶ I NM sono pericolosi?

Caratterizzazione del pericolo

❷ In che modo e in che condizioni i NM possono essere pericolosi?

Valutazione dell'esposizione

❸ Quali sono i livelli e le modalità di esposizione a NM?

Caratterizzazione del rischio

❹ L'esposizione a NM rappresenta un rischio?
❺ Qual è la probabilità di osservare un'esposizione?

Gestione del rischio

❻ Misure di prevenzione e protezione per ridurre l'esposizione

Assessment of occupational exposure to engineered nanomaterials (NMs)

Inhalation exposure

(most common route of occupational exposure)

Cutaneous dosimetry

(conceptual framework for screening, prioritization, and assessment of dermal occupational exposure to NMs for risk assessment)

(Larrese Filon *et al.*, 2016; Brouwer *et al.*, 2016)

Biological monitoring

(limited by shortage of reliable information and availability of reliable biomarkers)

(Iavicoli *et al.*, 2014)

Need for an optimal NMs exposure monitoring

- To differentiate between engineered NMs and incidental nanoparticles
- To categorize different types of engineered NMs
- To use specific and appropriate exposure metrics
- To use easy to handle and practical instruments
- To compare exposure with proper Occupational Exposure Limits

Need for high quality exposure data
Need of a harmonized monitoring strategy

Exposure Assessment Strategies were proposed in the scientific literature and in technical documents

Estimate of Exposure to NMs

- Different tools have been developed for qualitative (control banding) or semi-quantitative estimation of occupational exposure to NMs
- These tools have not been calibrated or validated due to the low relevance of experimental data

Tiered Approaches for inhalation exposure assessment of NM

Tier 1

Collection of information and inspection (NMs emission)

- Standard industrial hygiene survey
- Gathering of qualitative information

Tier 2

Basic assessment (potential exposure)

- Direct reading instruments (CPC, OPC)
- Comparison to the background concentration levels to determine a realistic exposure value

Tier 3

In-depth assessment (clear evidence of exposure)

- Tier 2 measurements are integrated with particle sampling systems that allow analytical investigations (SEM, TEM, ICP-AES or TXRF)

Comprendere e gestire l'incertezza associata ai dati attualmente disponibili

I fattori di incertezza nella valutazione dell'esposizione e nel RA principali sono relativi all'identità fisico-chimica dei NM, alla loro tossicità, al livello di esposizione e degli scenari di rilascio ambientale (le incertezze si accumulano per «propagazione degli errori»)

- Incertezze sono spesso scarsamente riportate, non ben definite, o addirittura non note.
- Approcci deterministici comunemente applicati non possono stimare adeguatamente la probabilità di rischio derivanti da scenari in cui l'incertezza è notevole.
- Metodi probabilistici e stocastici (es. simulazioni Monte Carlo) possono stimare la distribuzione di probabilità di parametri di pericolo e di esposizione.
- In mancanza di un numero dati sufficienti queste distribuzioni possono spesso essere troppo ampie per generare informazioni significative per RA.



Nanotoxicology



ISSN: 1743-5390 (Print) 1743-5404 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/ntox20>

Probabilistic risk assessment of emerging materials: case study of titanium dioxide nanoparticles

Michael P. Tsang, Danail Hristozov, Alex Zabeo, Antti Joonas Koivisto, Alexander Christian Østerskov Jensen, Keld Alstrup Jensen, Chengfang Pang, Antonio Marcomini & Guido Sonnemann

È stato proposto un approccio probabilistico alla valutazione del rischio per le fasi di valutazione del pericolo, stima della relazione dose-risposta e valutazione dell'esposizione per un caso di studio (produzione di nanoparticelle di biossido di titanio in sette scenari di esposizione)

Comprendere e gestire l'incertezza associata ai dati attualmente disponibili

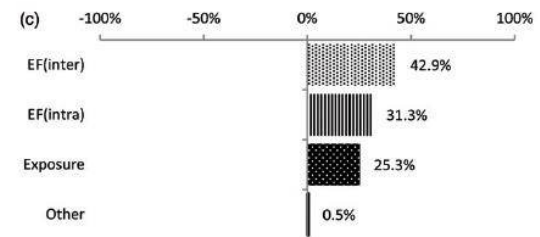
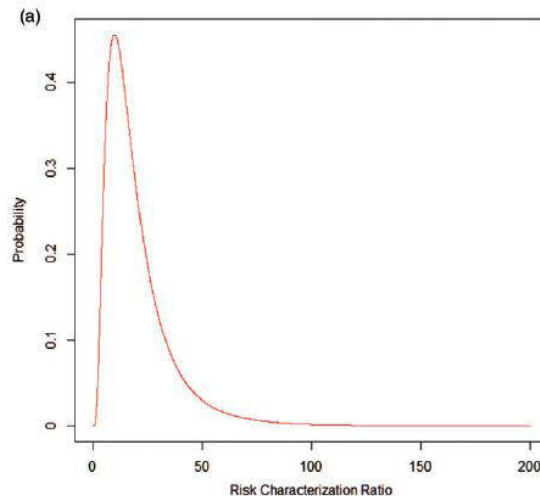
Il caso studio discute le modalità con cui **l'incertezza o la variabilità dei dati di base utilizzati per la valutazione del rischio possono essere integrati nelle fasi di valutazione dose-risposta, valutazione dell'esposizione e quindi nella caratterizzazione del rischio**

I dati relativi alla tossicità e all'esposizione non sono in genere ben definiti nella letteratura scientifica per la maggior parte dei NM

Questo **elevato livello di incertezza iniziale** comporta la **propagazione e amplificazione degli errori** fino alla valutazione finale del rischio.

Incorporando con **tecniche probabilistiche** l'incertezza dei parametri di tossicità e esposizione nel corso della valutazione del rischio (e valutando la loro influenza sulla caratterizzazione del rischio), è possibile **ottimizzare la caratterizzazione dei rischi** associati all'esposizione a NM

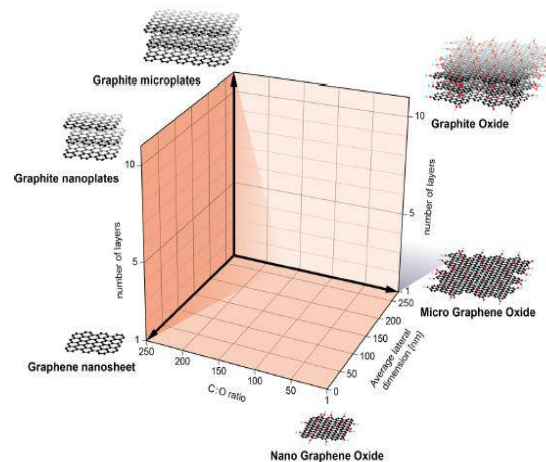
L'approccio probabilistico può confermare se tale rischio ha una probabilità alta o bassa (e in che misura)



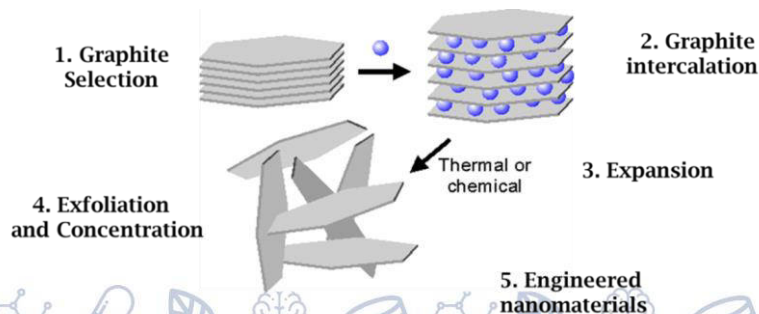
CASO STUDIO: GRAPHENE NANOPATELETS

- Applicare un approccio probabilistico per effettuare una valutazione del rischio per la salute, per un caso studio riguardante l'esposizione a NM, in scenari di esposizione occupazionale
- La procedura di risk assessment è stata applicata per lo studio di *nanoplatelets di grafene* (GNPs: *graphene nanoplatelets*)
- Questo NM è stato scelto come caso studio a causa del suo **largo utilizzo in numerose applicazioni tecnologiche** e a causa della contestuale mancanza di informazioni riguardo il **potenziale impatto sulla salute** derivante dall'esposizione occupazionale [Kim et al., 2016]

Source: Park et al., ACS Nano 2017, 11, 9574-9593



GNPs “graphite materials having a thickness and/or lateral dimension less than 100 nm [...]”. [Bianco et al., 2013]



CASO STUDIO: GRAPHENE NANOPATELETS – IDENTIFICAZIONE DEL PERICOLO

Identificazione del Pericolo

⑩ GNP: pericolo per la salute?

Valutazione Relazione Dose-Risposta

⑩ Come e in quali condizioni le GNP possono rappresentare un pericolo?

Valutazione dell'Esposizione

⑩ Quali sono i livelli e le modalità di Esposizione a GNP?

Caratterizzazione del Rischio

⑩ L'esposizione a GNP costituisce un rischio?
⑩ Qual è la probabilità di osservare un'esposizione rischiosa?

Gestione del Rischio

⑩ Definire adeguate misure di prevenzione e protezione, per ridurre l'Esposizione (e il rischio)

Test tossicologici e analisi per definire le proprietà pericolose di una sostanza chimica

Le caratteristiche fisico-chimiche dei NM possono influenzare il comportamento tossico-cinetico e tossico-dinamico: è necessario identificare quelle caratteristiche di NM che potrebbero essere pericolose per la salute

CASO STUDIO: GRAPHENE NANOPATELETS – IDENTIFICAZIONE DEL PERICOLO

Ricerca bibliografica

per identificare studi rilevanti e dati relativi alla tossicità del NM selezionato

- Studi **specifici per GNPs** (e non altre forme di Grafene)
- Studi **recenti** (2010 - 2018)
- Peer-review / altre fonti (*grey-literature*)
- Maggiore attenzione a **esposizione cronica per via inalatoria** (considerata la condizione di esposizione più rilevante in ambito occupazionale)
- **Differenti metriche di misura per descrivere la dose (e l'esposizione)**, sono state considerate, quando possibile, nella fase di identificazione del pericolo, così come nelle successive fasi della valutazione del rischio → *Concentrazione in massa e concentrazione numerica*

CASO STUDIO: GRAPHENE NANOPATELETS – IDENTIFICAZIONE DEL PERICOLO

Solo pochi studi *in vitro*^(*) e *in vivo*^(**) sono disponibili a oggi, forzando il valutatore a utilizzare *informazioni parziali* (ad oggi i dati disponibili non sono sufficienti a raggiungere una conclusione definitiva riguardo i potenziali pericoli associati all'esposizione a GNPs)

Le evidenze disponibili definiscono un basso livello di tossicità per le GNPs

[Lalwani et al., 2016; Ou et al., 2016]

NOAEL (*no-observed-adverse-effect-level*) = 1.88 mg/m³ (equivalenti a 1.99 x 10⁵ particelle/cm³)

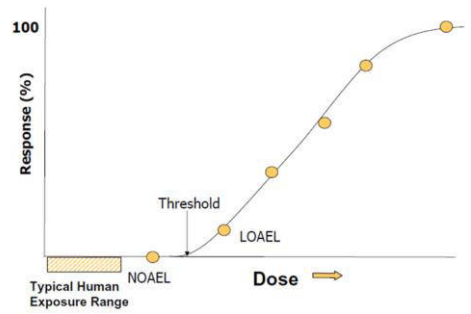
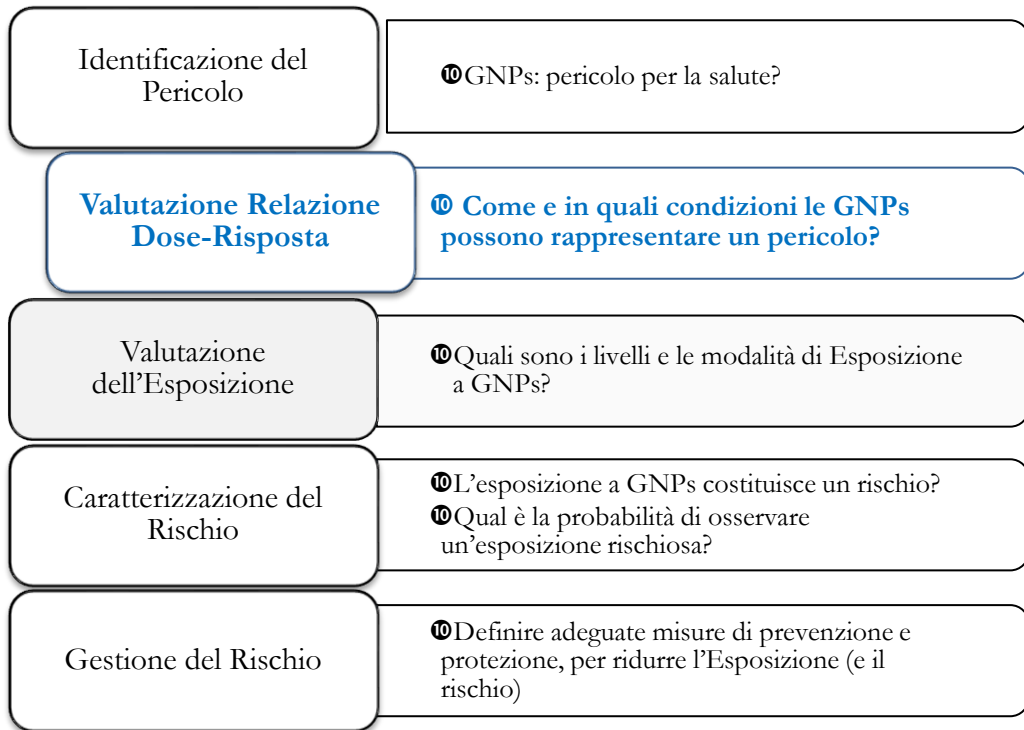
[Kim et al., 2016]

Queste **informazioni**, seppure **non conclusive**, o potenzialmente **condizionate da un certo grado di incertezza**, sono state usate nelle fasi seguenti della valutazione del rischio

* Park et al., 2015; Chowdhury et al. 2013; Sanchez et al., 2012; Li et al., 2012; Liao et al., 2011; Zhang et al., 2010

** Kim et al., 2016; Park et al., 2015; Kanakia et al. 2015; Kanakia et al. 2014; Chowdhury et al., 2013; Schinwald et al., 2012; Zanni et al., 2012; Duch et al., 2011; Roberts et al., 2016

CASO STUDIO: GRAPHENE NANOPATELETS – VALUTAZIONE DELLA RELAZIONE DOSE-RISPOSTA



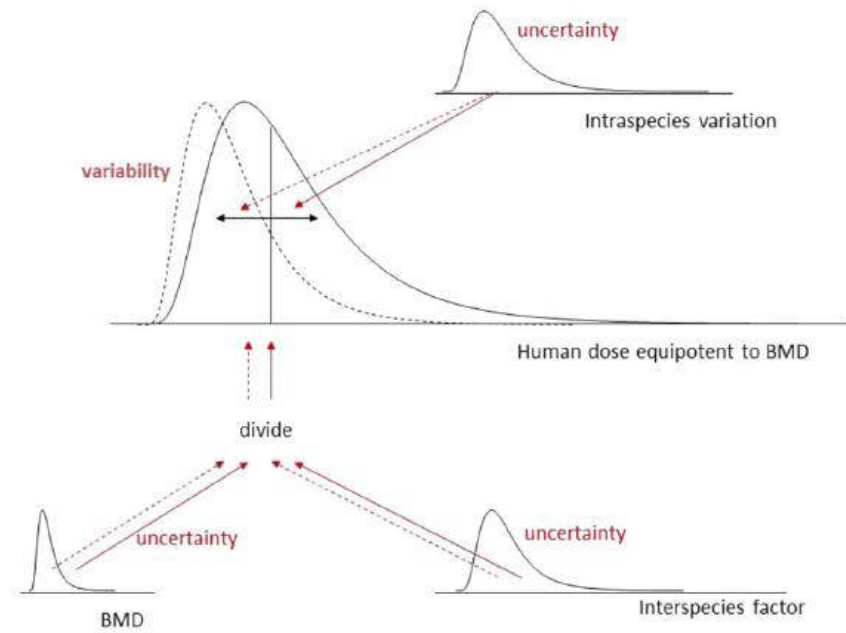
Definire una relazione dose-risposta richiederebbe la realizzazione di un grande numero di studi di alta qualità

Nell'ambito di RA per NM, **la mancanza di una definizione condivisa di dose rappresenta uno degli ostacoli più significativi per effettuare uno studio adeguato degli effetti tossici** e per confrontare adeguatamente tra loro i risultati di diversi esperimenti

CASO STUDIO: GRAPHENE NANOPATELETS – VALUTAZIONE DELLA RELAZIONE DOSE-RISPOSTA

Il metodo “benchmark dose” è stato usato per derivare un valore di riferimento (definito *Benchmark Concentration for Human - BMC_h*), da utilizzare come **valore limite di soglia** per l’esposizione occupazionale a GNPs per via inalatoria (*Occupational Exposure Level - OEL*)

Fonte: Slob et al., Risk Analysis, Vol. 34, No. 8, 2014



CASO STUDIO: GRAPHENE NANOPATELETS – VALUTAZIONE DELLA RELAZIONE DOSE-RISPOSTA

Test tossicologici in vivo (esposizione sub-acuta per via inalatoria)*

*risultati da studi per esposizione sub-cronica o cronica per inalatoria sarebbero stati preferibili, ma non sono stati identificati studi adeguati

Benchmark concentration

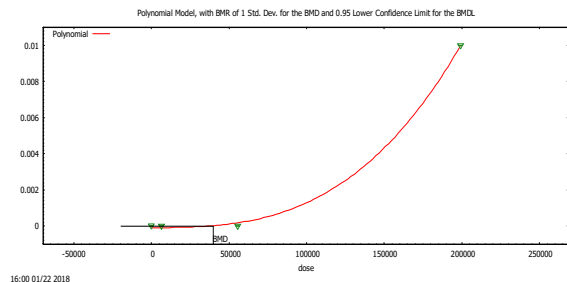
N=15 modelli validi per dosi [mg/m³]

N=16 modelli validi per dosi [particelle/cm³]

I modelli validi sono stati **aggregati** (*model averaging*) per ottenere valori di **benchmark concentration** per test **animali** (BMCA) → **distribuzioni di valori**

Applicando fattori di incertezza e una simulazione stocastica è stato possibile ottenere valori di BMCh (espressi come una distribuzione log-normale)

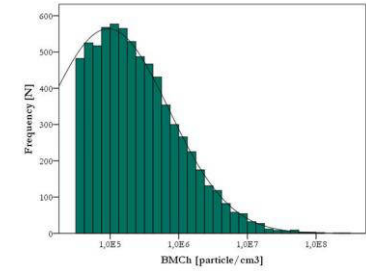
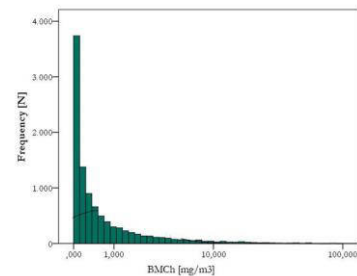
Dosimetry	BMCh	
	GM	GSD
Mass concentration [mg/m ³]	0.212	7.696
Number concentrations [particle/cm ³]	9.37 x 10 ⁴	7.655



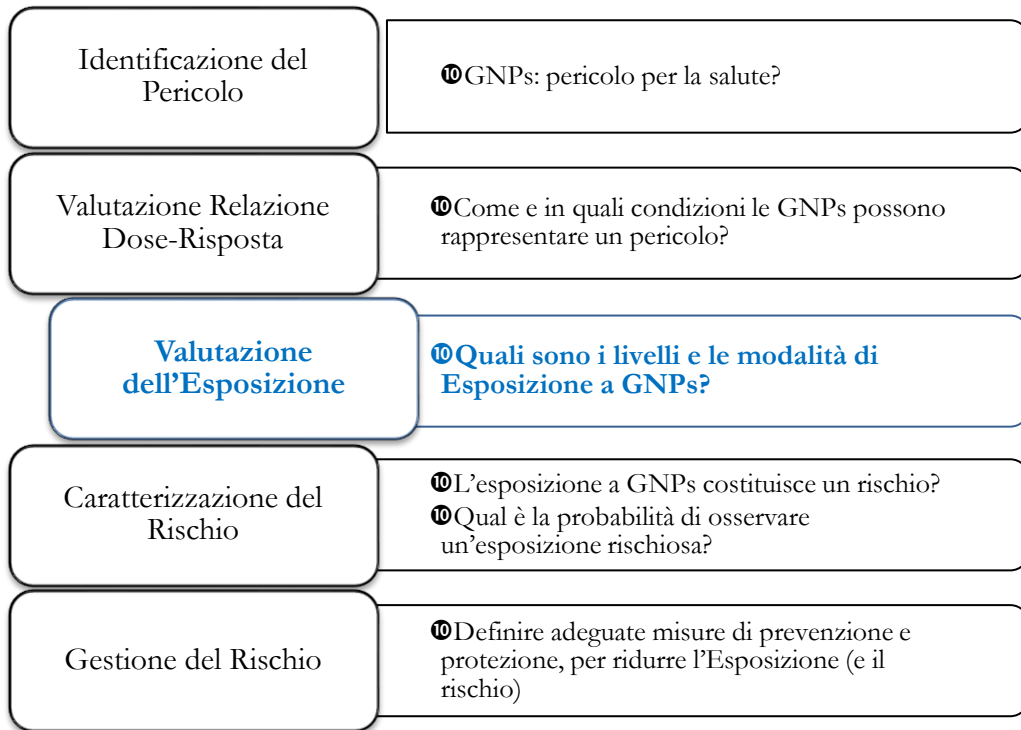
16:00 01/22 2018

BMDs Wizard v. 1.10 + BMD Software v2.7.0.4

$$BMCh = \frac{BMCL_{\alpha}}{EF_{inter} * EF_{intra} * UF_i}$$



CASO STUDIO: GRAPHENE NANOPATELETS – VALUTAZIONE DELL’ESPOSIZIONE



RICERCA di SCENARI di ESPOSIZIONE

(ES = Exposure scenario)

BEN CARATTERIZZATI

Ricerca bibliografica

- Studi recenti (2015-ad oggi)
- Peer-reviewed /grey sources
- DB = MARINA, NANEX, NECID
- Esposizione professionale (produzione/manipolazione)
- Concentrazione in massa/in numero
- Criteri di inclusione/esclusione [...] → dati di esposizione di qualità

CASO STUDIO: GRAPHENE NANOPATELETS – VALUTAZIONE DELL’ESPOSIZIONE

2 ES basati su dati ricavati da studi pubblicati nella letteratura scientifica

ES1: produzione su larga scala di GNPs

[Spinazzè et al., 2016]

ES2: produzione su piccola scala di GNPs

[Lee et al., 2016]

1 ES basato su dati ricavati da misure sperimentali effettuate nell’ambito di questo studio

ES3: manipolazione di GNPs in laboratorio (ES3)

[misure sperimentali → Spinazzè et al., 2018]

Ogni ES è stato suddiviso in PROFILI di esposizione, per differenze sostanziali nella caratterizzazione dei profili dei lavoratori esposti o della tipologia di ambiente di lavoro.

I valori di esposizione sono stati espressi come **concentrazione in massa** [mg/m^3] e/o **concentrazione numerica** [$\text{particelle}/\text{cm}^3$].

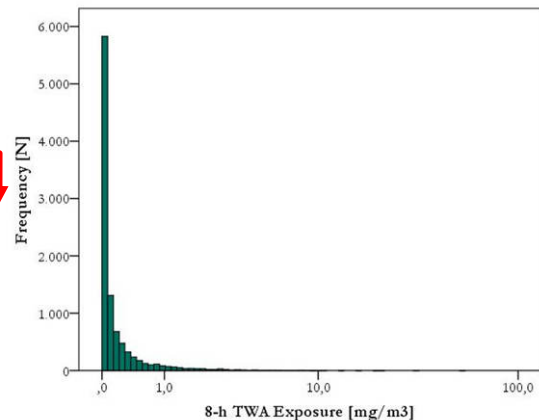
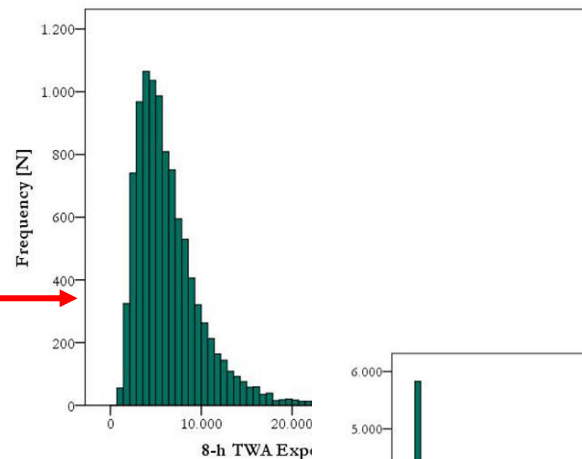
Valori medi di esposizione (GM)

- variabili tra 3.80×10^{-4} (ES1-P1) e 2.92×10^{-1} (ES2 -P1) mg/m^3
- variabili tra 2.40×10^2 (ES3-P1) e 6.44×10^3 (ES1-P2) $\text{particelle}/\text{cm}^3$

CASO STUDIO: GRAPHENE NANOPATELETS – VALUTAZIONE DELL’ESPOSIZIONE

Per ogni ES/profilo, è stata simulata una **distribuzione stocastica dei valori di esposizione, assumendo una distribuzione log-normale**

ES [Source]	Worker Profile Metric	GM	GSD
ES1 [35]	Profile 1 (P1) - Engineer		
	Number concentration [particle/cm ³]	3.32×10^3	1.95×10^2
	Mass concentration [mg/m ³]	3.80×10^{-4}	1.00×10^{-6}
	Profile 2 (P2) - Operator (Graphite Expansion)		
	Number concentration [particle/cm ³]	6.44×10^3	3.78×10^3
	Mass concentration [mg/m ³]	3.86×10^{-3}	8.50×10^{-5}
ES2 [39]	Profile 3 (P3) - Operator (Drying)		
	Number concentration [particle/cm ³]	9.09×10^2	5.36×10^2
	Mass concentration [mg/m ³]	3.68×10^{-3}	7.80×10^{-5}
	Workplace	GM	GSD
ES2 [39]	Profile 1 (P1) - Workplace A		
	Mass concentration [mg/m ³] - Total suspended particles	2.92×10^{-2}	1.92
	Mass concentration [mg/m ³] - Respirable particle	3.47×10^{-2}	1.06
	Profile 2 (P2) - Workplace B		
ES3 [40]	Mass concentration [mg/m ³] - Total suspended particles	3.30×10^{-3}	1.30
	Worker Profile	GM	GSD
	Metric		
ES3 [40]	Profile 1 (P1) - Handling GNPs		
	Number concentration [particle/cm ³]	2.40×10^2	3.10



CASO STUDIO: GRAPHENE NANOPATELETS – CARATTERIZZAZIONE DEL RISCHIO

Identificazione del Pericolo	⑩ GNPs: pericolo per la salute?
Valutazione Relazione Dose-Risposta	⑩ Come e in quali condizioni le GNPs possono rappresentare un pericolo?
Valutazione dell'Esposizione	⑩ Quali sono i livelli e le modalità di Esposizione a GNPs?
Caratterizzazione del Rischio	⑩ L'esposizione a GNPs costituisce un rischio? ⑩ Qual è la probabilità di osservare un'esposizione rischiosa?
Gestione del Rischio	⑩ Definire adeguate misure di prevenzione e protezione, per ridurre l'Esposizione (e il rischio)

Il rischio è definito calcolando un **indice di rischio** (*risk characterization ratio - RCR*)

$$RCR = \frac{EXPi}{BMCh}$$

Uno scenario è definito a rischio per valori di **RCR ≥ 1** (*i.e. per valori di esposizione superiori al valore di soglia di esposizione*)

CASO STUDIO: GRAPHENE NANOPATELETS – CARATTERIZZAZIONE DEL RISCHIO

Distribuzione dei valori di RCR

Gli ES/profilo considerati hanno mostrato di avere distribuzioni con valori di **RCR** anche superiori al **valore unitario** (indicando quindi la *presenza di un rischio*), ma **in nessuno dei casi considerati il livello di rischio è risultato statisticamente significativo**

Tra il 94 e il 99% dei valori di RCR < 1

- Nel caso peggiore (ES1 - profilo 2) si osservava una probabilità del 6% di avere un RCR ≥ 1
- Nel caso migliore (ES3 - profilo 1) si osservava una probabilità dello 0.02% di avere un RCR ≥ 1

Analisi dell'incertezza del metodo:

- ~75%: fattori di incertezza usati per la stima di BMCh
- ~25%: stima dell'esposizione

ES-Profile (Conc. metric)	GM	Lower 95% CI	Upper 95% CI	RCR ≥ 1 (95%CI)	Probability (%) RCR≥1
ES1 - P1 (Number)	2.58×10^{-2}	2.49×10^{-2}	2.68×10^{-2}	No	2.7
ES1-P1 (Mass)	1.47×10^{-3}	1.42×10^{-3}	1.53×10^{-3}	No	0.04
ES1-P2 (Number)	4.37×10^{-2}	4.21×10^{-2}	4.54×10^{-2}	No	5.7
ES1-P2 (Mass)	1.50×10^{-2}	1.44×10^{-2}	1.56×10^{-2}	No	1.7
ES1-P3 (Number)	6.05×10^{-3}	5.82×10^{-3}	6.29×10^{-3}	No	0.5
ES1-P3 (Mass)	1.43×10^{-2}	1.37×10^{-2}	1.48×10^{-2}	No	1.6
ES2 - P1 (TSP)	7.46×10^{-3}	7.04×10^{-3}	7.90×10^{-3}	No	4.6
ES2-P1 (Respirable)	1.43×10^{-2}	9.10×10^{-3}	1.02×10^{-2}	No	6.1
ES2-P2 (TSP)	3.26×10^{-4}	3.05×10^{-4}	3.48×10^{-4}	No	0.8
ES3 - P1 (Number)	1.87×10^{-3}	1.80×10^{-3}	1.94×10^{-3}	No	0.02

CASO STUDIO: GRAPHENE NANOPATELETS – GESTIONE DEL RISCHIO

Identificazione del Pericolo	⑩GNPs: pericolo per la salute?
Valutazione Relazione Dose-Risposta	⑩Come e in quali condizioni le GNP's possono rappresentare un pericolo?
Valutazione dell'Esposizione	⑩Quali sono i livelli e le modalità di Esposizione a GNP's?
Caratterizzazione del Rischio	⑩L'esposizione a GNP's costituisce un rischio? ⑩Qual è la probabilità di osservare un'esposizione rischiosa?
Gestione del Rischio	⑩Definire adeguate misure di prevenzione e protezione, per ridurre l'Esposizione (e il rischio)

L'utilità dell'adozione di un approccio probabilistico per questo tipo di valutazione è stata discussa, confrontando i risultati ottenuti con quelli disponibili e derivati dall'utilizzo di un approccio deterministico

CASO STUDIO: GRAPHENE NANOPATELETS – GESTIONE DEL RISCHIO

L'utilizzo di misure di gestione del rischio era già descritto per ES1 e ES2

Fonte: *Spinazzè et al., 2016 – ES1*

Table 1. Risk management options used for different work tasks.

	Production (expansion, exfoliation, drying)	Maintenance	Cleaning	Laboratory test
Organization, Procedures	Warnings, Training, Specific Operating Procedures (S.O.P.)			
Engineering Control	Enclosure of high-exposure potential activity: fixed containment booths: HEPA-filtered, double locked-holding area			Chemical Hoods (EN 14175-compliant)
	Closed-process, fully automated production line; General Ventilation		+ HEPA-filtered Vacuum Cleaners	
Personal Protective Equipment	Safety Boots and Gloves; Filtering half-face mask (FFP2- or FFP3-class filter); Nitrile gloves and disposable safety gloves			

Fonte: *Lee et al., 2016 - ES2*

Engineering controls	PPE in use
Inside fume hood	Working clothes, gloves, no respirator
Clean room (class 10 000), local exhaust ventilation	Working clothes (dust-free garment) with gloves
Clean room (class 1 000), local exhaust ventilation	Working clothes (dust-free garment) with gloves

L'uso dell'approccio probabilistico per la valutazione del rischio **ha evidenziato la presenza di un certo livello di rischio residuo** (sebbene non statisticamente significativo) **in questi scenari**

CASO STUDIO: GRAPHENE NANOPATELETS – GESTIONE DEL RISCHIO

Il livello di rischio dei due ES potrebbe essere ridotto, **implementando le misure di gestione del rischio già poste in opera:**

- ES1 : **introduzione di ulteriori sistemi di controllo**
(i.e. sistemi di aspirazione localizzata)

- ES2: **definita la presenza di rischio associata alla manipolazione di GNPs sotto cappa chimica**

- **nell'ambito di ES3 sono state definite indicazioni operative, per la definizione di appropriate procedure di lavoro, utili a ridurre il livello di rischio associato alla manipolazione di GNPs**

CASO STUDIO: GRAPHENE NANOPATELETS – LIMITI DELLO STUDIO

I limiti principali dello studio riguardano:

- **Selezione delle fonti usate per la valutazione del pericolo:** potrebbe avere introdotto un bias nella procedura di valutazione del rischio (*i risultati degli studi disponibili sono stati valutati con approccio cautelativo*) → **richiesto un periodico aggiornamento in funzione di evoluzione delle evidenze disponibili**
- **Eterogeneità delle proprietà chimico-fisiche delle GNP:** può aver determinato un certo grado di **incertezza nella fase di valutazione del pericolo**
- **Assunzioni e semplificazioni** (es. nella definizione di distribuzioni parametriche), che introducono incertezze nella valutazione del rischio (*per questa ragione è stata condotta un'analisi della sensibilità, utile a quantificare l'impatto di queste incertezza sul risultato finale*)
- **Sebbene pragmatico e utile, l'approccio rivela i suoi limiti quando si affronta l'eterogeneità dei rischi e nella previsione degli effetti sulla salute a lungo termine.**

CASO STUDIO: GRAPHENE NANOPATELETS – LIMITI DELLO STUDIO

I limiti principali dello studio riguardano:

- **Sebbene pragmatico e utile, l'approccio rivela i suoi limiti quando si affronta l'eterogeneità dei rischi e nella previsione degli effetti sulla salute a lungo termine.**

“Based on the available data, the occupational exposure limit cannot be determined. More experimental toxicity studies according to specific guidelines (tentatively validated for nanomaterials) and more information on the actual occupational exposure level to GBMs are needed. Furthermore, ADME (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion), genotoxicity, developmental and reproductive toxicity data related to the occupational exposure to GBMs have to be implemented. In addition, sub-chronic and/ or chronic studies are still needed to completely exclude other toxic effects and/ or carcinogenicity” [Pelin et al., Nanoscale, 2018, 10, 15894]

CASO STUDIO: GRAPHENE NANOPATELETS – CONCLUSIONI

Identificazione del Pericolo

⑩GNPs: pericolo per la salute?

Le evidenze disponibili (non conclusive) definiscono un **basso livello di tossicità**

Valutazione Relazione Dose-Risposta

⑩ Come e in quali condizioni le GNP's possono rappresentare un pericolo?

È stato derivato un «valore di riferimento» per l'esposizione per via inalatoria a GNP's (**BMCh**) (**concentrazione ponderale e numerica**)

Valutazione dell'Esposizione

⑩ Quali sono i livelli e le modalità di Esposizione a GNP's?

Sono stati definiti e caratterizzati 3 ES (e diversi profili di esposizione):
ES1: **produzione su larga scala**; ES2: **produzione su piccola scala**;
ES3: **manipolazione in laboratorio**

Caratterizzazione del Rischio

⑩ L'Esposizione a GNP's costituisce un rischio?
⑩ Qual è la probabilità di osservare un'esposizione rischiosa?

L'indice di Rischio **RCR** consente di calcolare **intensità e probabilità** del rischio associato all'esposizione

Gestione del Rischio

⑩ Definire adeguate misure di prevenzione e protezione, per ridurre l'Esposizione (e il rischio)

Indicazioni specifiche per la Gestione del Rischio

CASO STUDIO: GRAPHENE NANOPATELETS – CONCLUSIONI

- L'approccio probabilistico per il RA è stato applicato per GNPs in 3 scenari di esposizione occupazionale
- **Simulazioni stocastiche** sono state utilizzate per le fasi di valutazione della relazione dose-risposta, di valutazione dell'esposizione e di caratterizzazione del rischio, consentendo l'introduzione di **fonti di variabilità**, il cui impatto sul risultato, in termini di **incertezza** è stato successivamente quantificato
- È stato **stimato un livello soglia per l'esposizione occupazionale** per GNPs e effettuata una valutazione del rischio probabilistico considerando sia la **concentrazione numerica** che la **concentrazione in massa**
- L'approccio probabilistico adottato ha permesso di
 - **Definire quantitativamente la probabilità che si verifichi una condizione di rischio**, consentendo la valutazione di specifiche misure di gestione del rischio
 - **Considerare la variabilità intrinseca e l'incertezza** nelle fasi di valutazione dose-risposta, nella valutazione dell'esposizione e di caratterizzazione del rischio

Lo studio convalida l'uso dell'approccio probabilistico per la valutazione del rischio per la salute umana per le tecnologie emergenti, come i nanomateriali ingegnerizzati



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Hygiene and Environmental Health

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijheh

Probabilistic approach for the risk assessment of nanomaterials: A case study for graphene nanoplatelets

Andrea Spinazzè*, Andrea Cattaneo, Francesca Borghi, Luca Del Buono, Davide Campagnolo, Sabrina Rovelli, Domenico M. Cavallo

Dipartimento di Scienza e Alta Tecnologia, Università degli Studi dell'Insubria, Via Valleggio 11 - 22100, Como (CO), Italy

CASO STUDIO: NANOTUBI DI CARBONIO

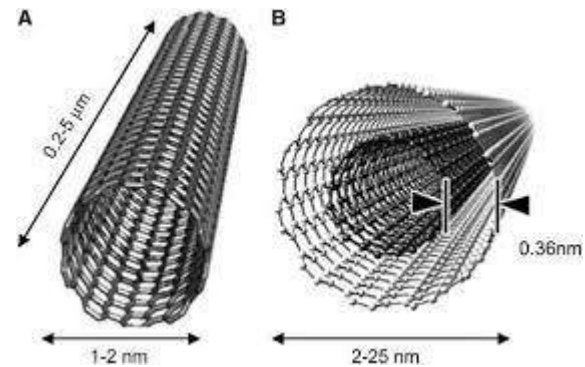


Article

Carbon Nanotubes: Probabilistic Approach for Occupational Risk Assessment

Andrea Spinazzè ^{*}, Carolina Zellino, Francesca Borghi, Davide Campagnolo, Sabrina Rovelli, Marta Keller, Giacomo Fanti, Andrea Cattaneo and Domenico M. Cavallo

Nanomaterials 2021, 11, 409. <https://doi.org/10.3390/nano11020409>



BIBLIOGRAFIA

- Bianco et al., Carbon, 65 (2013) 1-6
Chowdhury et al., Scientific Reports, 3 (2013)
Duch et al., Nano Letters, 11 (2011) 5201-5207
Hristozov et al., Environment International 95 (2016) 36-53
Kanakia et al., Biomaterials, 35 (2014) 7022-7031
Kanakia et al., Scientific Reports, 5 (2015)
Kim et al., Nanotoxicology, 10 (2016) 891-901
Lalwani et al., Advanced Drug Delivery Reviews, 105 (2016) 109-144
Lee et al., Inhalation Toxicology, 28 (2016) 281-291.
Li et al., Biomaterials, 33 (2012) 402-411
Liao et al., Acs Applied Materials & Interfaces, 3 (2011) 2607-2615.
Ou et al., Particle and Fibre Toxicology, 13 (2016)
Park et al., Archives of Toxicology, 89 (2015) 1557-1568
Roberts et al., Particle and Fibre Toxicology 13 (2016): 34
Sanchez et al., Chemical Research in Toxicology, 25 (2012) 15-34
Spinazzè et al., Aerosol Science and Technology, 50(8) (2016), 812-821
Spinazzè et al. Med Lav (2018); 109, 4: 285-296
Schinwald et al., Acs Nano, 6 (2012) 736-746
Tsang et al., Nanotoxicology, 11 (2017) 558-568
Zanni et al., Nano Letters, 12 (2012) 2740-2744
Zhang et al., Acs Nano, 4 (2010) 3181-3186

Grazie per l'attenzione

Prof. Andrea Spinazzè, PhD
DiSAT - Università degli Studi dell'Insubria
RAHH - Risk Assessment for Human Health
Environmental and Occupational Hygiene Research Group

✉ andrea.spinazze@uninsubria.it

🔗 <https://rahh.uninsubria.it/>



CASO STUDIO: NANOTUBI DI CARBONIO – IDENTIFICAZIONE DEL PERICOLO

Analisi documentale della letteratura

- identificare studi rilevanti e dati relativi alla tossicità dei NTC
- maggiore attenzione a **esposizione cronica per via inalatoria** (considerata la condizione di esposizione più rilevante in ambito occupazionale) e alla **tossicità polmonare**
- **differenti metriche di misura** per descrivere la dose (e l'esposizione) sono state considerate, quando possibile, nella fase di identificazione del pericolo, così come nelle successive fasi della valutazione del rischio
- *Concentrazione in massa e concentrazione numerica*

POSSIBILI EFFETTI INDAGATI:

- TOSSICITA' POLMONARE
 - INFIAMMAZIONE DEL SISTEMA RESPIRATORIO
 - *LESIONE DEL SISTEMA RESPIRATORIO*
 - FIBROSI DEL SISTEMA RESPIRATORIO
 - *BIOPERSISTENZA DEI NTC NEL POLMONE*
 - *DANNO GENETICO NEL POLMONE*
 - *TUMORE MALIGNO NEL SISTEMA RESPIRATORIO*
- TOSSICITA' NEL SISTEMA RIPRODUTTIVO E LEGATA ALLO SVILUPPO

CASO STUDIO: NANOTUBI DI CARBONIO – IDENTIFICAZIONE DEL PERICOLO

- **infiammazione persistente** del sistema respiratorio provocata **già a basse concentrazioni** di materiale inalato
- esistono evidenze per le quali i NTC abbiano **alta biopersistenza** (fibre di corta lunghezza sono meno persistenti); la tipologia e le dimensioni possono influenzare la risposta dell'organismo all'esposizione
- l'**insolubilità** è pari, se non maggiore, a quella dell'asbesto. Alcuni NTC possono diventare più solubili dopo degradazione, riducendo la lunghezza e possibilmente la biopersistenza. Possono così essere eliminati dal polmone
- **genotossicità** in seguito ad **esposizione acuta**
- poche evidenze della **patologia tumorale**

- non ci sono prove evidenti di una relazione diretta tra la fibrosi polmonare e l'esposizione
- non esistono evidenze che possano confermare l'iperplasia persistente indotta dall'esposizione

Queste informazioni, seppure non conclusive, o potenzialmente condizionate da un certo grado di incertezza, sono state usate nelle fasi seguenti della valutazione del rischio.

CASO STUDIO: NANOTUBI DI CARBONIO – VALUTAZIONE RELAZIONE DOSE-RISPOSTA

Test tossicologici in vivo
(esposizione cronica o sub-cronica)



US EPA BMD Software v. 3.2

Benchmark concentration

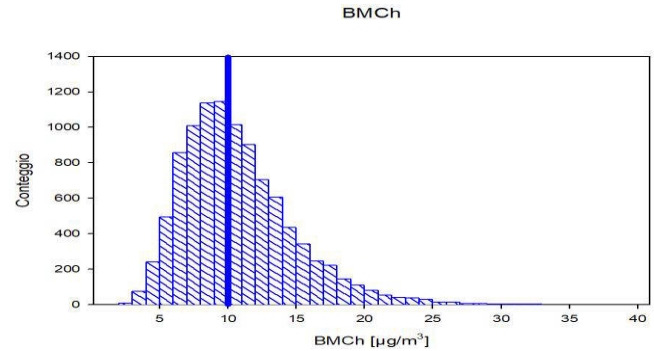
N=25 modelli validi per dosi (mg/m³)

N=0 modelli validi per concentrazione numerica (fibre/m³).



Distribuzione log-normale

Applicando fattori di incertezza e una simulazione stocastica è stato possibile ottenere valori di BMCh



$$BMC_h = \frac{BMCL_a}{EF_{inter} \times EF_{intra} \times UF_i}$$

Metrica	BMC _a	BMCL _a	BMCU _a	BMCh
	Media (± SD) [mg/m ³]			GM (± GSD) [µg/m ³]
C in massa	14.1 (± 1.1)	9.4 (± 1.0)	20.4 (± 2.3)	10.0 (± 1.5)

CASO STUDIO: NANOTUBI DI CARBONIO – VALUTAZIONE DELL'ESPOSIZIONE

1 SE basato su dati ricavati da studi pubblicati nella letteratura scientifica



SE1: moderna fabbrica di up-scaling che produce films di NTCPS

Lo scenario prevede 3 eventi lavorativi (EL):

- **EL1:** produzione di film di NTCPS con LEV (ventilazione locale di scarico) con tempo di raccolta da 1 a 10 minuti
- **EL2:** produzione di film di NTCPS senza LEV con un tempo di raccolta di 8 minuti
- **EL3:** pulizia di uno dei reattori

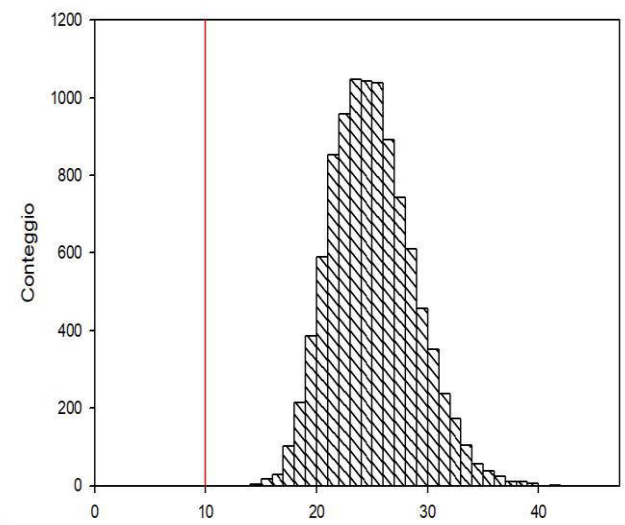
CASO STUDIO: NANOTUBI DI CARBONIO – VALUTAZIONE DELL’ESPOSIZIONE

Per ogni EL è stata definita una distribuzione stocastica dei valori di esposizione assumendo una distribuzione log-normale.

TECNICA	EL	GM [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]	GSD [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]
Nanoscan	EL1	0.81	0.56
	EL2	1.00	1.58
	EL3	1.19	n.a.
ELPI	EL1	0.53	7.08
	EL2	24.8	1.16
	EL3	2.76	3.53
OPS	EL1	0.56	2.30
	EL2	1.58	1.48
	EL3	n.a.	n.a.

BMCh=10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$

ELPI - EL2



CASO STUDIO: NANOTUBI DI CARBONIO – CARATTERIZZAZIONE DEL RISCHIO

EL1+EL2+EL3 (Nanoscan): probabilità RCR>1 dello 0%.

→ scenario con RCR < 1: assenza di rischio

EL1+EL2 (OPS): probabilità di RCR>1 pari a 0.1%.

→ scenario con RCR>1: rischio generalmente basso

Nessuno degli EL ha mostrato un livello di rischio statisticamente significativo al 95% dell'IC.

EL1+EL2+EL3 (ELPI):

EL1 (ELPI): probabilità RCR>1 del 7%

EL2 (ELPI): probabilità RCR>1 del 98,6%

EL3 (ELPI): probabilità RCR>1 del 16,2%

→ scenario con RCR>1: rischio più elevato

→ EL2 ha mostrato un livello di rischio **statisticamente significativo** al 95% dell'IC

EL1: RCR ≥ 1 rischio presente compreso tra lo 0% e il 7,0% (non statisticamente significativo)

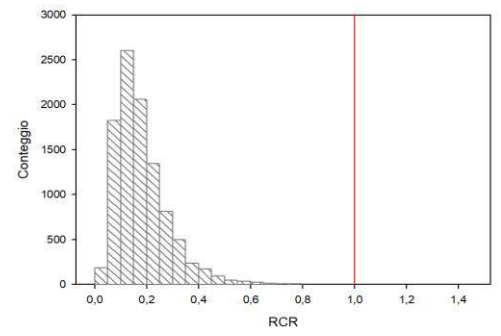
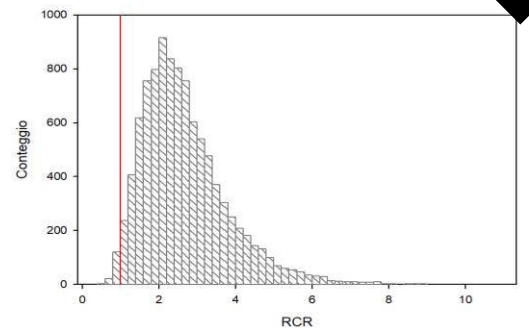
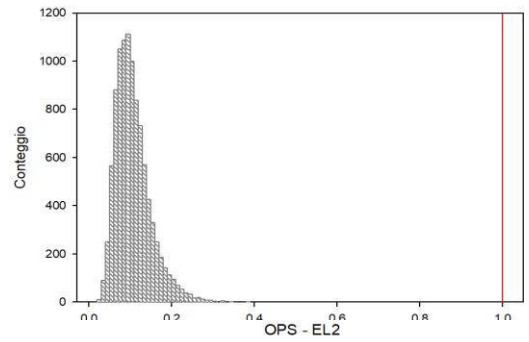
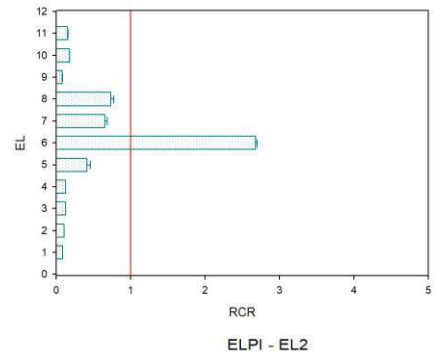
EL2: : RCR ≥ 1 rischio presente compreso tra lo 0% e il 98,6% (**statisticamente significativo**)

EL3: RCR ≥ 1 rischio presente compreso tra lo 0% e circa il 16,2% (non statisticamente significativo)

Tecnica	EL	RCR ≥ 1 (95%IC)	Probabilità (%) RCR≥1
Nanoscan	EL1	no	0.0
	EL2	no	0.0
	EL3	no	0.0
ELPI	EL1	no	7.0
	EL2	si	98.6
	EL3	no	16.2
OPS	EL1	no	0.1
	EL2	no	0.1
	EL3	n.a.	0.0

CASO STUDIO: NANOTUBI DI CARBONIO – CARATTERIZZAZIONE DEL RISCHIO

Nanoscan - EL2



CASO STUDIO: NANOTUBI DI CARBONIO – GESTIONE DEL RISCHIO

La Caratterizzazione del Rischio ha evidenziato eventi lavorativi con probabilità di rischio anche statisticamente significativa.

Il livello di rischio potrebbe essere ulteriormente ridotto attraverso l'implementazione delle procedure di Gestione del Rischio.

- **procedure organizzative** (avvisi, formazione e procedure operative specifiche)
- **controlli ingegneristici** (racchiudere attività ad alto potenziale di esposizione e utilizzare cabine di contenimento fisse)
- **DPI** (maschere facciali con filtri di classe FFP2 o FFP3)

CASO STUDIO: NANOTUBI DI CARBONIO – LIMITI DELLO STUDIO

Eterogeneità delle proprietà chimico-fisiche, morfologiche dei NTC → effetto negativo sulla salute?

Selezione delle fonti utilizzate per la Valutazione del Pericolo → i risultati degli studi disponibili sono stati considerati con un approccio precauzionale

Assunzioni e semplificazioni utilizzate nelle simulazioni di distribuzione parametrica
introduzione di incertezze nel processo di RA → è stata condotta un'analisi della sensibilità utile a quantificare l'impatto di queste incertezza sul risultato finale

Nessun modello matematico valido è stato applicato ai dati di dose-risposta basati sulla concentrazione numerica → limitazione di utilizzo per alcuni scenari e limitazione per confronto con altri valori limite

Sebbene pragmatico e utile, tale approccio rivela i suoi limiti quando si affronta l'eterogeneità dei rischi e nella previsione degli effetti sulla salute a lungo termine.