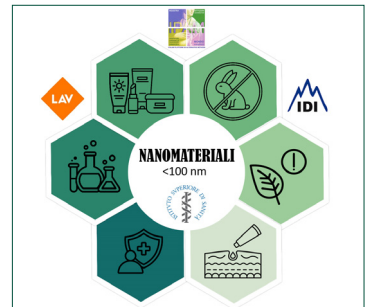


# INNOVAZIONE SCIENTIFICA E RICERCA ETICA: UNO STUDIO *IN VITRO* SULL'ASSORBIMENTO CUTANEO DEI NANOMATERIALI PER LA TUTELA DELLA SALUTE PUBBLICA E A SOSTEGNO DELLA RICERCA SENZA ANIMALI



Beatrice Battistini<sup>1</sup>, Stefano Caimi<sup>1</sup>, Isabella De Angelis<sup>2</sup>,  
Cristina Maria Failla<sup>3</sup>, Michela Kuan<sup>4</sup> e Beatrice Bocca<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Ambiente e Salute, ISS

<sup>2</sup>Piattaforma Italiana sui Metodi Alternativi

<sup>3</sup>Istituto Dermopatico dell'Immacolata

<sup>4</sup>Lega Anti Vivisezione

**RIASSUNTO** - Il Progetto "Valutazione dell'assorbimento cutaneo di nanomateriali: uso di metodi *in vitro* alternativi alla sperimentazione animale", sostenuto dalla Lega Antivivisezione (LAV), coordinato dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS) in collaborazione con l'Istituto Dermopatico dell'Immacolata (IDI-IRCCS) e la Piattaforma Italiana sui Metodi Alternativi (IPAM), rappresenta un esempio significativo di come i metodi *in vitro* possano contribuire al progresso scientifico, in linea con la normativa europea che promuove attivamente l'uso di approcci non animali. La sperimentazione *in vitro* condotta ha permesso di studiare l'esposizione umana a nanomateriali metallici e plastici ancora poco studiati in Italia, soprattutto per quanto riguarda l'assorbimento cutaneo di prodotti di uso quotidiano e il loro rilascio nell'ambiente. Oltre a vantaggi quali l'elevata riproducibilità, rapidità di esecuzione ed economicità, l'assenza di sperimentazione animale conferisce a questa ricerca una forte valenza etica, rafforzandone ulteriormente la rilevanza scientifica per la tutela della salute pubblica e dell'ambiente.

**Parole chiave:** nuovi approcci metodologici; nanomateriali; esposizione dell'uomo

**SUMMARY** (*Scientific Innovation and ethical research: an in vitro study on the skin absorption of nanomaterials for public health protection and in support of animal-free research*) - The project "Evaluation of Skin Absorption of nanomaterials: use of *in vitro* methods as alternatives to animal testing," supported by the Lega Antivivisezione (LAV) and coordinated by the Istituto Superiore di Sanità (the National Institute of Health in Italy, ISS) in collaboration with the Istituto Dermopatico dell'Immacolata (IDI-IRCCS) and the Italian Platform on Alternative Methods (IPAM), is a significant example of how *in vitro* methods can advance scientific research in line with European regulations promoting non-animal approaches. The *in vitro* experiments conducted allowed the study of human exposure to emerging nanomaterials, particularly metallic and plastic ones, which are still rarely investigated in Italy, especially regarding skin absorption from everyday products and their environmental release. In addition to advantages such as high reproducibility, speed of execution, and cost-effectiveness, the absence of animal testing gives this research strong ethical value, further enhancing its scientific relevance for public health and the environment.

**Key words:** New approach methodologies; nanomaterials; human exposure

beatrice.bocca@iss.it

I nanomateriali (NM), secondo la definizione della Raccomandazione della Commissione Europea 2022/C 229/01, sono sostanze chimiche organiche o inorganiche, naturali o di sintesi con dimensioni estremamente ridotte, comprese tra 1 e 100 nanometri. Hanno proprietà chimiche, fisiche, elettriche e meccaniche uniche che li rendono particolarmente interessanti per l'innovazione e l'applicazione in vari settori indu-

striali, quali il settore farmaceutico, medico, cosmetico, alimentare, agrario o tessile. In molti prodotti cosmetici di uso comune, come creme solari, deodoranti, dentifrici, shampoo, scrub e smalti, gli NM vengono aggiunti intenzionalmente per migliorare alcune proprietà del prodotto quali il colore, la trasparenza, la stabilità, la texture e la sensazione sulla cute. Tra gli NM metallici più impiegati nei cosmetici, spiccano argento (Ag) e ►

oro (Au) ad azione idratante, anti-aging e antimicrobica, e biossido di titanio (TiO<sub>2</sub>) e ossido di zinco (ZnO) usati nelle creme solari per la loro comprovata efficacia come filtri UV (1). Negli ultimi anni, inoltre, anche le nanoplastiche e le microplastiche hanno trovato largo impiego, sostituendo spesso gli esfolianti naturali in numerosi prodotti cosmetici (2). Se da una parte gli NM rappresentano un mercato in rapida crescita con grandi vantaggi e potenzialità, dall'altra emergono incertezze sui possibili effetti e rischi per la salute umana e per l'ambiente dall'uso di queste sostanze (3). Sebbene la ricerca continui a indagare sugli effetti a lungo termine e sulla sicurezza degli NM (4), evidenze recenti indicano una tossicità dose-dipendente delle particelle di ossido di rame (CuO) e ZnO su linee cellulari cutanee (5). L'applicazione di prodotti contenenti NM sulla cute potrebbe consentire la penetrazione di queste sostanze attraverso la barriera cutanea, e la preoccupazione riguardo al possibile assorbimento sistemico degli NM è sostenuta da alcune fonti scientifiche e regolatorie (6). Gli NM presenti nei prodotti cosmetici possono, inoltre, essere rilasciati nell'ambiente attraverso il risciacquo con acqua, con potenziali effetti negativi su flora e fauna acquatiche, generando rischi per l'ambiente ancora poco conosciuti.

## Nanomateriali e implicazioni sanitarie

Il Comitato Scientifico Europeo per la Sicurezza dei Consumatori (CSSC), in diversi pareri pubblicati nel 2021, ha sottolineato come caratteristiche quali dimensioni, forma, solubilità e persistenza possano influenzare significativamente la biodisponibilità e il rischio di accumulo sistemico. Alla luce di queste evidenze, il Regolamento UE 2024/858 ha vietato l'uso di diversi NM metallici - tra cui Ag, Au, rame (Cu) e platino (Pt) - nei cosmetici, per i possibili rischi per la salute dei consumatori. Inoltre, il Regolamento (CE) n. 1223/2009 sui prodotti cosmetici stabilisce che TiO<sub>2</sub> e ZnO possono essere utilizzati come filtri UV nei cosmetici fino a una concentrazione massima del 25% in peso, a condizione che non comportino alcun rischio di esposizione per inalazione. Parallelamente, l'attenzione si è estesa alle microplastiche e nanoplastiche, sempre più presenti nei prodotti di largo consumo. Recentemente sono state introdotte dal Regolamento (UE) 2023/2055 restrizioni sull'uso intenzionale di microplastiche nei cosmetici, con l'obiettivo di limitarne i potenziali rischi

per la salute e la dispersione nell'ambiente. Soprattutto le nanoplastiche destano particolare preoccupazione per la loro capacità di interagire con cellule e tessuti, agendo anche come vettori di contaminanti come i metalli pesanti. Le interazioni tra particelle plastiche e metalliche complicano la valutazione del rischio, poiché gli effetti combinati possono intensificare le risposte biologiche con implicazioni ancora poco esplorate per la salute umana e dell'ambiente (7).

## Legislazione sulla protezione degli animali nella ricerca scientifica

La legislazione europea promuove attivamente l'adozione di metodi alternativi alla sperimentazione animale per la valutazione della sicurezza delle sostanze chimiche, inclusi gli NM. Al centro di questa evoluzione si colloca il principio delle 3R - Replacement (sostituzione), Reduction (riduzione) e Refinement (perfezionamento) - che rappresenta il fondamento etico e scientifico degli approcci alternativi. Anche la Direttiva 2010/63/UE stabilisce che l'impiego di animali a fini scientifici debba essere limitato al minimo indispensabile e sostituito, ove possibile, da metodi alternativi. In linea con questo orientamento, il Regolamento (UE) 2024/858 vieta esplicitamente la sperimentazione animale per la valutazione della sicurezza dei cosmetici destinati al mercato europeo. A supporto di questa transizione, organismi come l'European Food Safety Authority (EFSA) e il Ministero della Salute promuovono attivamente l'adozione di approcci alternativi (DLvo n. 26, 4 marzo 2014). Il laboratorio di riferimento dell'UE European Union Reference Laboratory-European Centre for the Validation of Alternative Methods (EURL-ECVAM), è incaricato della validazione di nuovi metodi, garantendone l'affidabilità e l'accettazione normativa. In Italia, la Piattaforma Italiana sui Metodi Alternativi (Italian Platform on Alternative Methods, IPAM) si dedica alla ricerca, formazione e sviluppo di nuove metodologie, contribuendo alla diffusione di pratiche più etiche e sostenibili nella sperimentazione scientifica.

## Obiettivi del Progetto

In questo contesto, si inserisce il Progetto "Valutazione dell'assorbimento cutaneo di nanomateriali: uso di metodi *in vitro* alternativi alla sperimenta-

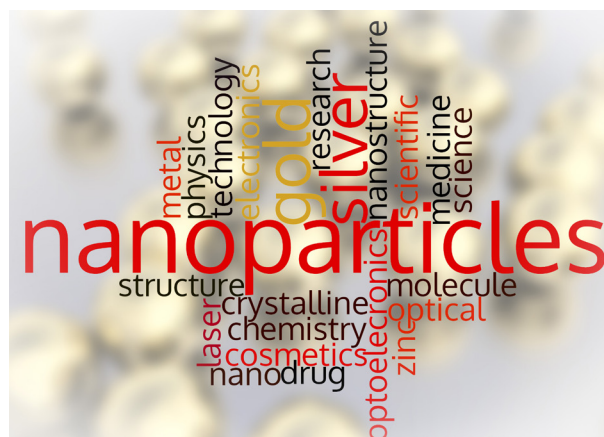
zione animale”, sostenuto dalla Lega Anti Vivisezione e coordinato dal Dipartimento Ambiente e Salute dell’ISS, responsabile scientifico Beatrice Bocca, in collaborazione con l’Istituto Dermopatico dell’Immacolata e l’IPAM. L’obiettivo è valutare la sicurezza per l’uomo e per l’ambiente correlata all’impiego degli NM in prodotti destinati al contatto con la cute, promuovendo l’uso di metodi *in vitro* alternativi alla sperimentazione animale in linea con i principi etici e scientifici dell’UE. Questi metodi, oltre a essere rispettosi del benessere animale, rappresentano soluzioni avanzate e sostenibili per la ricerca tossicologica.

I risultati dello studio contribuiranno a chiarire se l’esposizione cutanea a NM comporti rischi concreti per la salute umana e per l’ambiente, favorendo una gestione più consapevole e responsabile di questi nuovi ingredienti.

## Metodi alternativi sviluppati

Nel rispetto dell’obbligo di adottare metodi *in vitro* per la valutazione dell’assorbimento cutaneo degli NM, il protocollo sperimentale del Progetto ha previsto l’impiego di modelli di cute sintetica e di cute umana ottenuti da donazione di campioni cutanei in seguito a interventi di chirurgia plastica:

- **membrane cutanee sintetiche:** progettate per simulare la struttura multistrato della cute umana (epidermide, derma e tessuto sottocutaneo) e la sua composizione lipidica. Queste membrane offrono vantaggi quali disponibilità commerciale, facilità d’uso e di conservazione e riproducibilità. Tuttavia, rappresentano solo una simulazione parziale, non replicando totalmente la complessità biologica della cute;
- **cute umana da espianati chirurgici:** consente una valutazione più realistica della penetrazione cutanea, grazie alla conservazione dell’architettura tissutale originale, inclusi microcircolo, ghiandole pilosebacee, cellule immunitarie e matrice extracellulare. Questo approccio valorizza il riutilizzo di tessuti altrimenti destinati allo smaltimento, riducendo lo spreco di risorse biologiche e l’uso di animali da laboratorio, in linea con la Legge 10 febbraio 2020, n. 10. Presenta però criticità come la disponibilità limitata, la variabilità interindividuale e la necessità di protocolli rigorosi per conservazione e manipolazione.



Il protocollo sperimentale ha seguito la linea guida dell’Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) TG 428, considerata il principale riferimento per la valutazione dell’assorbimento cutaneo delle sostanze chimiche, che prevede l’utilizzo della cella di Franz, un sistema a due compartimenti (donatore e ricevente) separati dalla membrana cutanea. La formulazione contenente NM metallici viene applicata nel compartimento donatore a diretto contatto con la membrana cutanea, mentre nel compartimento ricevente viene inserita una soluzione tampone. Al termine del tempo di esposizione, i fluidi dei due compartimenti vengono raccolti e analizzati tramite spettrometria di massa Single Particle (SP-ICP-MS) per verificare l’eventuale passaggio transcutaneo di NM metallici (8) (Figura 1).

## Primi risultati del Progetto

Gli esperimenti condotti su diversi NM metallici certificati hanno mostrato che alcuni di essi - come Ag, ossido di cerio ( $\text{CeO}_2$ ),  $\text{CuO}$ ,  $\text{TiO}_2$  e ossido di zirconio ( $\text{ZrO}_2$ ) - possono attraversare, anche se in quantità limitata, la cute sintetica utilizzata nei test. Questo risultato è stato più marcato per le particelle più piccole, in particolare quelle con diametro inferiore a 50 nanometri, evidenziando che la dimensione è un fattore chiave nella capacità degli NM di penetrare la cute (Figura 2).

Sono stati analizzati anche diversi prodotti cosmetici di uso quotidiano, come creme solari, idratanti, anti-aging, fondotinta e deodoranti (Figura 3) e in alcuni di essi sono state determinate nanoparticelle di Ag, Au e  $\text{TiO}_2$ . In particolare, nanoparticelle di ▶

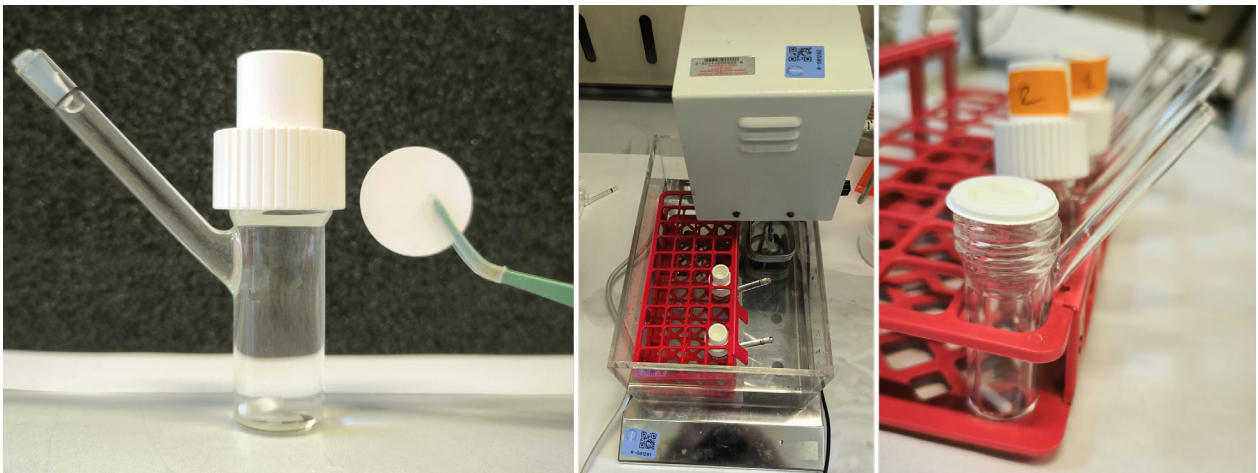


Figura 1 - Cella di Franz e membrana sintetica utilizzate per gli esperimenti *in vitro* di assorbimento cutaneo

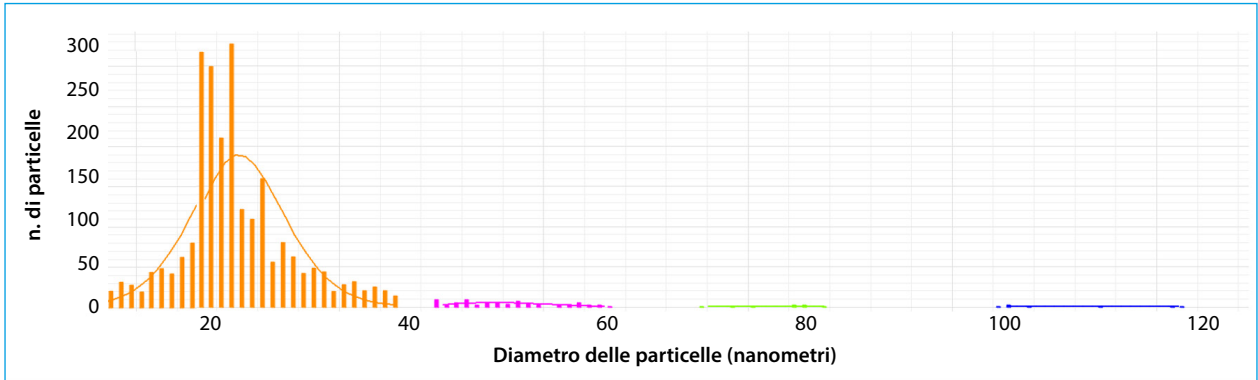


Figura 2 - Permeabilità cutanea dei nanomateriali di Ag



Figura 3 - Prodotti cosmetici analizzati



TiO<sub>2</sub> sono state determinate in creme per bambini, in formulazioni spray dove può verificarsi il rischio di inalazione accidentale. Inoltre, le analisi hanno confermato che le nanoparticelle di Ag e TiO<sub>2</sub> presenti nelle creme idratanti e solari possono attraversare la cute sintetica, soprattutto se molto piccole.

## Prospettive future

I risultati ottenuti avvalorano la possibilità di applicare i metodi alternativi alla sperimentazione animale per la valutazione dell'esposizione dell'uomo a NM. I metodi sviluppati nell'ambito di questo Progetto saranno adattati per studiare l'esposizione a NM in altri ambiti della ricerca scientifica e per analizzare l'esposizione ad altre sostanze potenzialmente pericolose. L'utilizzo di un modello di cute umana permetterà di corroborare i dati preliminari ottenuti con le membrane cutanee sintetiche. Inoltre, lo studio sarà esteso alla valutazione del rilascio in ambiente da prodotti contenenti NM, fornendo dati preziosi per la stima del rischio ambientale associato alle nanotecnologie. ■

Studio realizzato nell'ambito del Progetto "Valutazione dell'assorbimento cutaneo di nanomateriali: uso di metodi *in vitro* alternativi alla sperimentazione animale", finanziato dalla Lega Anti Vivisezione (LAV).

## Dichiarazione sui conflitti di interesse

Gli autori dichiarano che non esiste alcun potenziale conflitto di interesse o alcuna relazione di natura finanziaria o personale con persone o con organizzazioni, che possano influenzare in modo inappropriato lo svolgimento e i risultati di questo lavoro.

## Riferimenti bibliografici

1. Gupta V, Mohapatra S, Mishra H, *et al.* Nanotechnology in Cosmetics and Cosmeceuticals-A Review of Latest Advancements. *Gels* 2022;8(3):173 (doi: 10.3390/gels8030173).
2. Piotrowska A, Czerwińska-Ledwig O, Serdiuk M, *et al.* Composition of scrub-type cosmetics from the perspective of product ecology and microplastic content. *Toxicol Environ Health Sci* 2020;12(1):75-81 (doi: 10.1007/s13530-020-00051-9).
3. Saweres-Argüelles C, Ramírez-Novillo I, Vergara-Barberán M, *et al.* Skin absorption of inorganic nanoparticles and their toxicity: A review. *Eur J Pharm Biopharm* 2023;182:128-40 (doi: 10.1016/j.ejpb.2022.12.010).
4. Bocca B, Battistini B. Biomarkers of exposure and effect in human biomonitoring of metal-based nanomaterials: their use in primary prevention and health surveillance. *Nanotoxicology* 2024;18(1):1-35 (doi: 10.1080/17435390.2023.2301692).
5. Battistini B, Lulli D, Bocca B, *et al.* Tattoo Ink Metal Nanoparticles: Assessment of Toxicity In Vitro and with a Novel Human Ex Vivo Model. *Nanomaterials* 2025;15(4):270 (doi: 10.3390/nano15040270).
6. Larese Filon F, Mauro M, Adami G, *et al.* Nanoparticles skin absorption: New aspects for a safety profile evaluation. *Regul Toxicol Pharmacol* 2015;72(2):310-22 (doi: 10.1016/j.yrtph.2015.05.005).
7. Maity S, Biswas C, Banerjee S, *et al.* Interaction of plastic particles with heavy metals and the resulting toxicological impacts: a review. *Environ Sci Pollut Res Int* 2021;28(43):60291-307 (doi: 10.1007/s11356-021-16448-z).
8. Bocca B, Battistini B, Petrucci F. Silver and gold nanoparticles characterization by SP-ICP-MS and AF4-FFF-MALSUV-ICP-MS in human samples used for biomonitoring. *Talanta* 2020;220:121404 (doi: 10.1016/j.talanta.2020.121404).

## TAKE HOME MESSAGES

- I metodi alternativi alla sperimentazione animale si dimostrano efficaci e più eticamente corrette nella valutazione dell'esposizione a sostanze chimiche potenzialmente pericolose come i nanomateriali (NM).
- La presenza di NM nei prodotti di uso quotidiano richiede le opportune valutazioni di sicurezza sia per l'uomo sia per l'ambiente.
- Nei prossimi anni, ci si aspetta un crescente sviluppo e adozione dei metodi non-animale in molti contesti scientifici e regolatori.