

Nanocontaminación. Investigación sobre efectos de nanomateriales en el medio ambiente

Dr. José María Navas

jmnavas@inia.es

Grupo de Disrupción Endocrina y Toxicidad
de Contaminantes (DETC)

INIA, Ctra. de la Coruña Km 7.5,
E-28040 Madrid, España.

Definición de nanomaterial

En el laboratorio mientras trabajamos, definición informal:

Nanopartículas: partículas con un tamaño muy reducido, en la escala “nano” ...
de 1 a 600, 700, 800 nm...

Definición oficial:

Necesidad: nanomateriales se registran en el marco de la legislación europea (REACH, fitosanitarios, biocidas, productos farmacéuticos, cosméticos, etc)
(REACH:Reglamento CE nº 1907/2006 sobre el Registro, la Evaluación, la Autorización y la Restricción de sustancias y de preparados químicos)

Recomendación de la comisión de 18 de octubre sobre la definición de nanomaterial (2011/696/EU).

“A nanomaterial as defined in this recommendation should consist for 50 % or more of particles having a size between 1 nm-100 nm.”

Estudio sobre los efectos de nanomateriales en el medio ambiente:

Esencial estudiar

EXPOSICIÓN
(concentración
en medio)

PELIGRO
(efectos nocivos,
toxicidad)

RIESGO

Estudio sobre la toxicidad de nanopartículas:

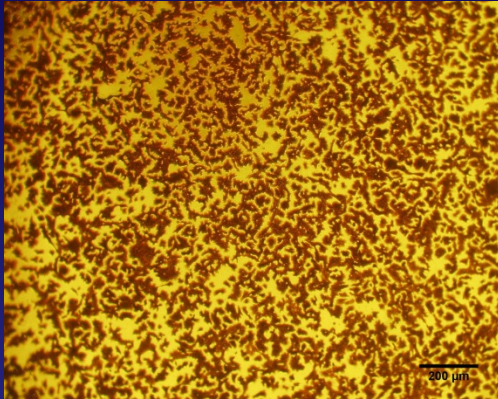
Métodos *in vitro* (e.g. con líneas celulares):

REACH, consideraciones iniciales:

(40) La Comisión, los Estados miembros, la industria y otras partes interesadas deben seguir contribuyendo a la promoción de métodos de ensayo alternativos ... incluidas... las **metodologías *in vitro***.

¿Qué son las líneas celulares?

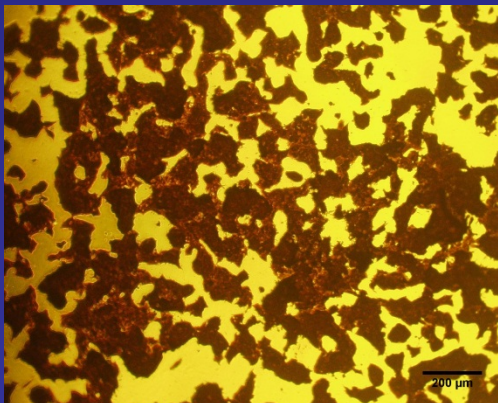
Líneas celulares



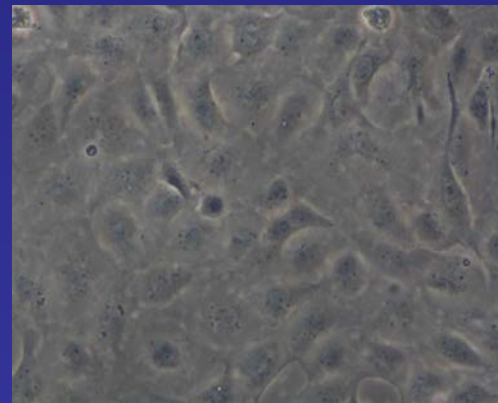
PLHC-1



RTG-2



HepG-2



RTH-149

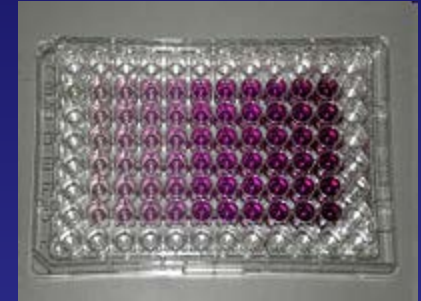
Medidas de toxicidad celular a través de una batería de ensayos

Citotoxicidad

- Integridad de la actividad mitocondrial
- Alteraciones en el funcionamiento lisosomal
- Integridad de la membrana plasmática

Alteraciones DNA

e.g. ensayo cometa



Evaluación de la toxicidad de nanopartículas:

Métodos in vivo:

Se basan en ensayos estandarizados, con protocolos aprobados a nivel internacional.
Por ejemplo, en las guías técnicas de la OCDE

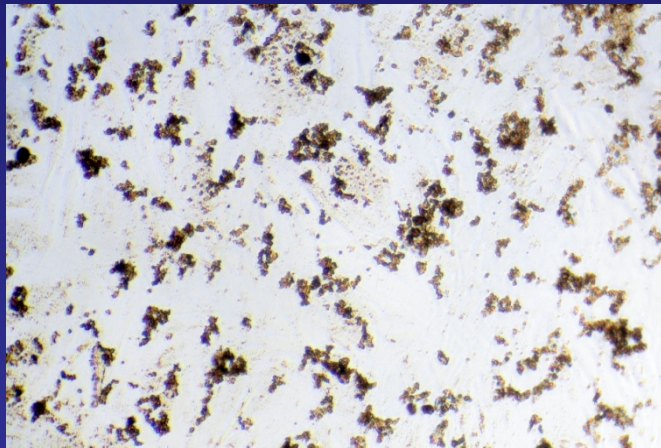
Toxicidad

- Aguda
(a corto plazo, concentraciones altas)
- Crónica
(a largo plazo, concentraciones bajas)

- Peces
- Gusanos (lombriz)
- Crustáceos
(e.g. Daphnia)
- Algas
- Anfibios (no estudiado hasta hoy)
- Aves (no estudiado hasta hoy)

Particularidades de la investigación sobre toxicidad de nanomateriales

Problema general: uso de suspensiones no disoluciones!!



RTG-2 expuestas a TiO_2 , [100 $\mu\text{g/ml}$]

- Exposición desigual
- Efectos mecánicos

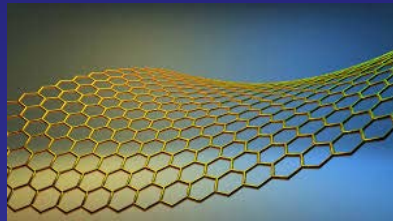
Particularidades de la investigación sobre toxicidad de nanomateriales

Esencial: caracterización de los nanomateriales en el medio de cultivo

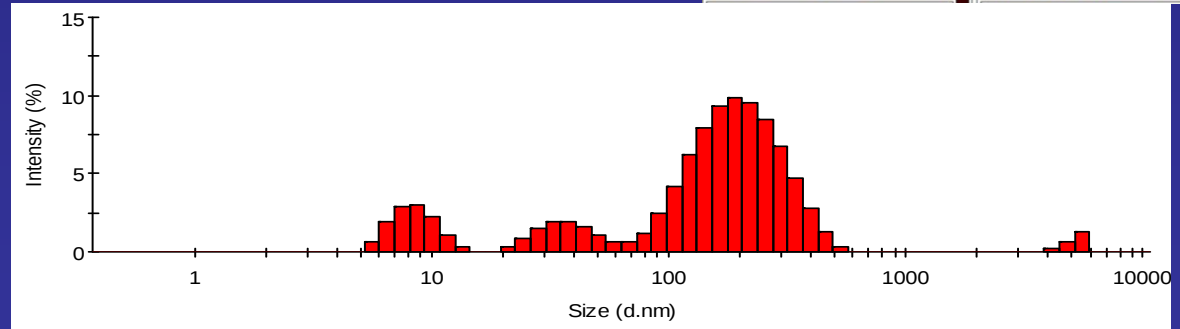
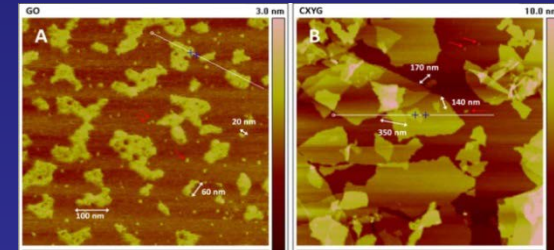
Determinar la distribución de la frecuencia del tamaño de partículas

Dynamic Light Scattering (DLS)

e.g. distribución del tamaño de partículas de una suspensión de grafeno



Grafeno. Forma alotrópica de C. Los átomos de C se organizan en una única capa de 2D



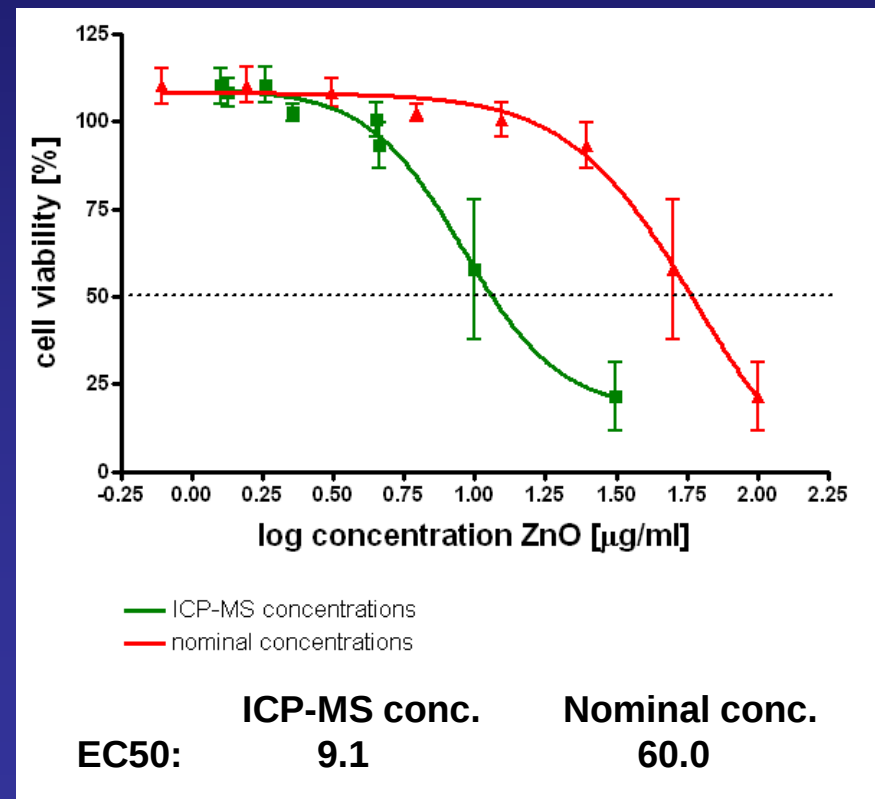
- Lammel et al., 2013. *Particle and Fiber Toxicology*. 10:27
- Lammel & Navas. 2014. *Aquatic Toxicology*. 150: 55-65
- Lammel et al., 2015. *Environmental Toxicology* 30: 1192 - 1204

Determinar concentraciones reales (y no trabajar con las nominales / teóricas)

(al trabajar con suspensiones las concentraciones varían enormemente al realizar suspensiones seriadas)

e.g. toxicidad de nanopartículas de ZnO calculada usando concentraciones teóricas (rojo) y reales (verde)

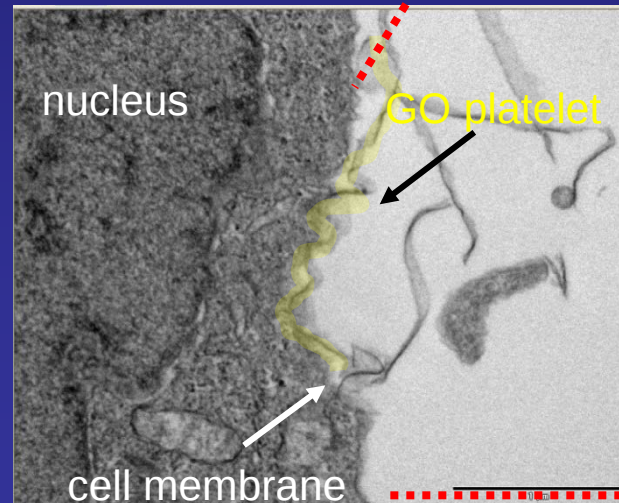
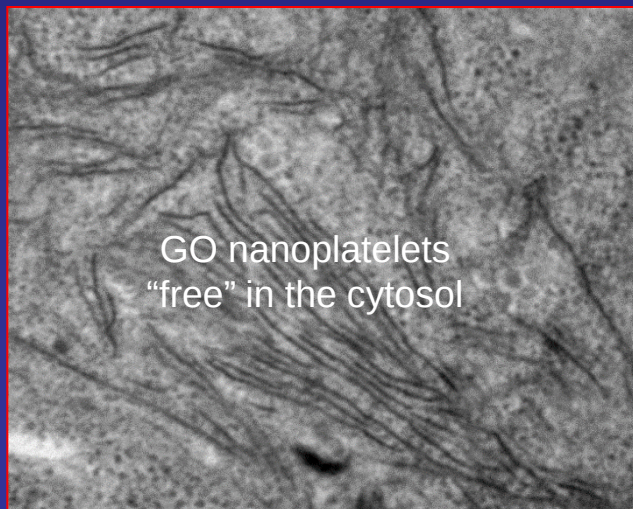
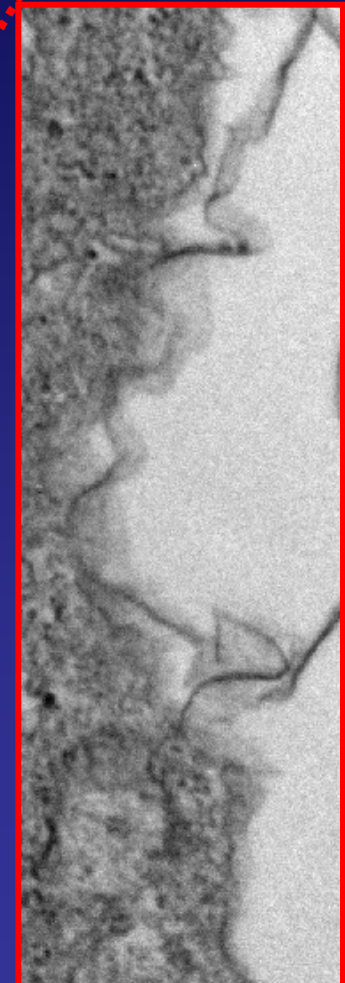
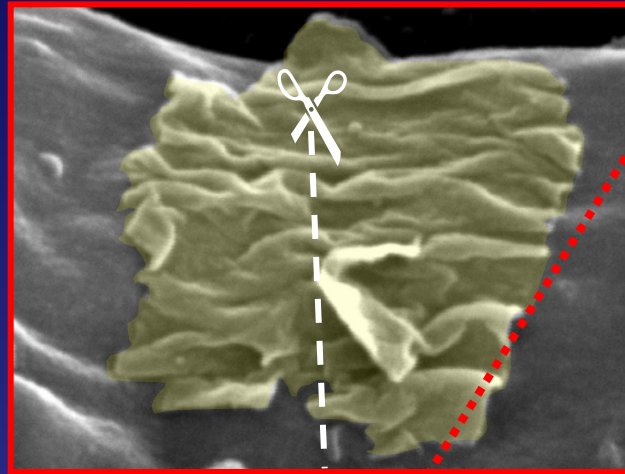
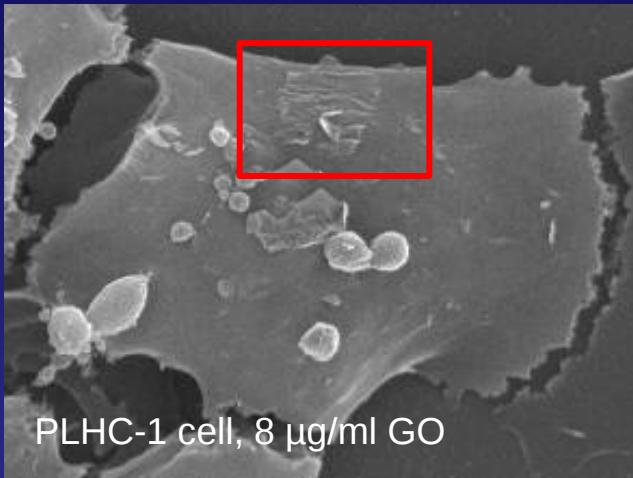
Para NMs metálicos
Inductively Coupled
Plasma Mass
Spectrometry
(ICP-MS)



Observar, mediante microscopía electrónica la interacción con los sistemas vivos (e.g. células)

Grafeno. Forma alotrópica de C.
Los átomos de C se organizan en una única capa de 2D

e.g. copos de grafeno interaccionan con la membrana celular, no la rompen pero penetran en la célula



- Lammel et al., 2013. *Particle and Fiber Toxicology*. 10:27
- Lammel & Navas. 2014. *Aquatic Toxicology*. 150: 55-65
- Lammel et al., 2015. *Environmental Toxicology* 30: 1192 - 1204

CONCLUSIÓN

Estudios sobre la toxicidad y efectos ambientales de los nanomateriales son muy complejos debido a sus particulares propiedades físico-químicas (y a que no son solubles)



Estudio sobre la toxicidad de nanopartículas.

Aspectos a tomar en consideración en el futuro.

Lagunas de conocimiento.

(Información de convocatorias H2020 y "Nanosafety task force" del H2020)

- **EXPOSICIÓN**
- **Desarrollo de métodos analíticos para detectar nanomateriales y poder establecer valores reales de exposición en Medio Ambiente**
 - No se trata de desarrollar métodos nuevos (los que hay tienen una enorme sensibilidad y precisión), sino de aplicar los que ya tenemos de un modo apropiado

e.g. NPs de CeO_2 se podrían detectar usando la técnica de ICP-MS ya disponible hoy en día que determina concentraciones de Ce en una muestra ambiental.
 - Número de partículas: mediante spICP-MS
 - Distinción entre Ce natural y Ce de NMs manufacturados:
 - Ce en nanopartículas artificiales: aparece puro
 - Ce en nanopartículas naturales: aparece con La en proporción Ce/La 2/1

Estudio sobre la toxicidad de nanopartículas.

Aspectos a tomar en consideración en el futuro.

Lagunas de conocimiento.

(Información de convocatorias H2020 y “Nanosafety task forcé” del H2020)

- **PELIGRO (TOXICIDAD)**
 - **Pequeñas adaptaciones para NMs en los métodos existentes (e.g. TG de la OCDE) para estimar toxicidad (métodos que en general se consideran apropiados para NMs)**

e.g. TG305 de la OCDE para determinar bioacumulación de productos químicos en peces

- Contempla exposición a través del agua y a través del alimento
- En el caso de los NMs, puesto que no son solubles exposición a través del agua no parece apropiada, pero se podrían administrar a través del alimento:
 - Dentro de la OCDE España está realizando estudios para ver si es viable incorporar los NMs a los piensos y administrárselos a los peces

Estudio sobre la toxicidad de nanopartículas.

Aspectos a tomar en consideración en el futuro.

Lagunas de conocimiento.

(Información de convocatorias H2020 y
“Nanosafety task force” del H2020)

- **PELIGRO (TOXICIDAD)**

- **Desarrollo de métodos para observar efectos a largo plazo, tanto in vivo como in vitro.**

e.g. Desarrollo de métodos in vitro basados en el uso de cultivos primarios de células en 3D

- Grupo DETC (INIA) está desarrollando metodologías
 - de exposición a largo plazo en líneas celulares mantenidas en monocapa (21 días, en vez de las 24 ó 72 h típicas de los estudios in vitro) (Artículo enviado).
 - De exposición a largo plazo usando cultivos en 3D (Objetivo: llegar a 28 días de exposición o más en un sistema muy similar al del órgano del que provienen las células).

Estudio sobre la toxicidad de nanopartículas.

Aspectos a tomar en consideración en el futuro.

Lagunas de conocimiento.

(Información de convocatorias H2020 y
“Nanosafety task force” del H2020)

- **EVALUACIÓN DEL RIESGO (EXPOSICIÓN Y PELIGRO)**
- **Desarrollo de métodos para agrupar los NMs**

Proyecto NANOREG2

- Gran número de NMs manufacturados (bajo la misma composición química un número infinito de posibilidades de tamaños, de formas, de coatings, etc)
 - Agrupación permitiría abordar la evaluación del riesgo por grupos
 - Dentro de cada grupo se podría establecer la toxicidad de un NM a partir de la observada en otros que tengan las mismas propiedades físico-químicas (read-across)

Estudio sobre la toxicidad de nanopartículas.

Aspectos a tomar en consideración en el futuro.

Lagunas de conocimiento.

(Información de convocatorias H2020 y
“Nanosafety task force” del H2020)

- **EVALUACIÓN DEL RIESGO (EXPOSICIÓN Y PELIGRO)**
 - **“Safe by Design” approaches en el desarrollo de NMs**

Proyecto NANOREG2

- “Safe by Design” (SbD). Seguridad a través el diseño
 - Se trata de fabricar NMs de modo que, ya desde su fabricación sean seguros, a lo largo de todo su ciclo de vida.
 - El SbD considera
 - NMs diseñados como más seguros
 - Producto con NMs más seguro (a lo largo de todo el ciclo de vida: fabricación, uso, desechado, reciclaje).
 - Proceso de fabricación, desarrollado como más seguro

FUENTES DE FINANCIACIÓN

AGRADECIMIENTOS

PROYECTOS EUROPEOS



PROYECTOS NACIONALES



DGCEAMN, SGCAMAI

¡GRACIAS!

INIA, grupo DETC
(Disrupción Endocrina y
Toxicidad de Contaminantes)

