



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO

TÍTULO:

ECOTOXIECOLOGÍA DE NANOMATERIALES

Autor: M^a Teresa Areses Huete

Fecha: 17 de febrero 2020

Tutor: Miguel Ángel Casermeiro

ÍNDICE

RESUMEN.....	2
I. INTRODUCCIÓN	2
1. DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LAS NANOPARTÍCULAS	2
2. OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS Y SUS APLICACIONES	4
3. TOXICIDAD	6
II. OBJETIVOS	8
III. MATERIAL Y MÉTODOS	8
IV. RESULTADOS.....	9
1. TIPOS DE MODELOS DE EVALUACIÓN DE NANOPARTÍCULAS.....	9
2. IMPACTO EN LOS ECOSISTEMAS	9
3. MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE PREDICCIÓN Y EXPOSICIÓN DEL IMPACTO DE LAS NANOPARTÍCULAS.....	13
V. DISCUSIÓN	14
VI. CONCLUSIONES.....	16
VII. ANEXO.....	17
I. TABLA ADJUNTA 1. CLASIFICACIÓN DE ORGANISMOS EN LA BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS Y SUS APLICACIONES.	17
VIII. BIBLIOGRAFÍA	18

Resumen

La tecnología basada en nanoformas -nanomateriales- está presente en la vida cotidiana de todos los seres vivos, ha pasado -en aproximadamente dos décadas- de ser una ciencia desconocida a ser el presente y futuro (imprescindible) de una gran diversidad de campos industriales. Junto con sus propiedades únicas (tamaño, forma, composición, estructura...), la amplia diversidad de nanopartículas tiene, sin embargo, un desafío ambiental todavía por resolver. Los científicos, de distintas formas, caracterizan y analizan el destino de las nanopartículas a través de matrices que poco a poco van siendo menos complejas.

Gracias a los métodos de evaluación de impactos que hay hoy en día (modelos *in vivo* e *in vitro*) y métodos de predicción de exposición (*in silico* -cuantitativo- y modelos *control banding* -cualitativos-) podemos empezar a corregir o tomar medidas que ayuden a los seres vivos a reducir los daños que pueden provocar los nanomateriales. Además de controlar la producción y uso de éstos, otra tarea igual de importante es la de controlar la eliminación de residuos (en fase gaseosa, líquida o sólida) de nanopartículas, ya que en muchas ocasiones se tratan de compuestos tóxicos para nuestro organismo, y como ya hemos dicho, con un tamaño muy singular y más difícil de manejar que los materiales con escalas más grandes.

I. INTRODUCCIÓN

1. Definición y características de las nanopartículas

Uno de los grandes avances industriales del siglo XXI es la **nanotecnología**. Por nanotecnología entendemos la ciencia dedicada a la producción y manipulación de materiales a escala nanométrica (nm) cuyo fin abarca hoy en día, prácticamente, todas las disciplinas (tales como la industria farmacéutica, la alimenticia, la médica, la ingeniería, la electrónica, la ambiental, arquitectura, moda...). Esta nanociencia estudia las partículas a partir de una dimensión menor o igual a 100nm ($1\text{nm} = 10^{-9}\text{m}$ en el Sistema Internacional). (1 y 3)

A pesar del auge de esta ciencia a lo largo de estas dos últimas décadas, los humanos ya habían hecho uso de ésta 4 500 años antes. En el Antiguo Egipto se preparaban las pinturas (pigmentos sintéticos) y mezclas a escala nanométrica (el "Egyptian blue" fue el primer pigmento sintético utilizado por esta civilización). (2)

Las **nanopartículas** (NPs) han sido estudiadas y definidas ya por diferentes organizaciones (Environmental Protection Agency -EPA-, Food and Drug Administration -FDA-, International Organization for Standardization -ISO-, EU Comission...).

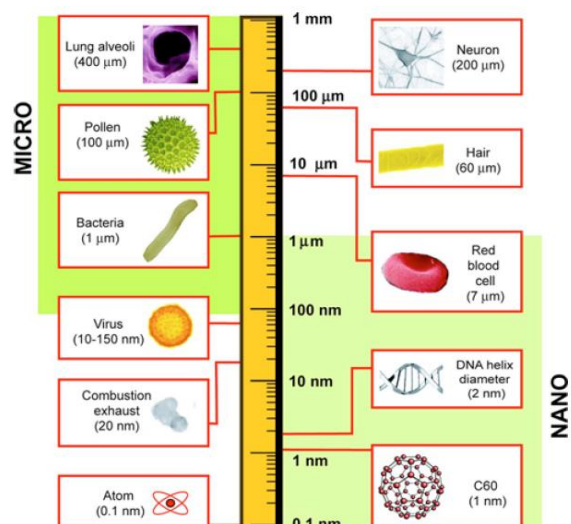


Figura 1. Representación de las distintas escalas de medida. Fuente: (12)

Dependiendo de la dimensión de estos materiales los podemos encontrar NPs en 0D (atrapados en un espacio adimensional), 1D (donde los electrones se mueven a lo largo del eje X, por ejemplo: nanofilms, nanofibras y “cubiertas/revestimiento”), 2D (los electrones se mueven a lo largo de los ejes X e Y, por ej: nanotubos y nanocables) o 3D (los electrones se mueven a lo largo de los ejes X, Y y Z, ej: nanopartículas o nano-objetos) (4 y 9). Esto quiere decir que, a pesar de la escala de éstas, las NPs no son moléculas simples, sino que están compuestas de tres capas (externa o superficial, media y la interna o núcleo).

Natural	Anthropogenic	
	Unintentional	Intentional
gas to particle conversions	internal combustion engines	engineered nanoparticles
forest fires	power plants	<i>(controlled size and shape,</i>
volcanoes (<i>hot lava</i>)	incinerators	<i>designed for functionality)</i>
viruses	airplane jets	<i>metals, semiconductors, metal oxides</i>
biogenic magnetite:	metal fumes	<i>carbon, polymers</i>
<i>magnetotactic bacteria</i>	<i>(smelting, welding, etc.)</i>	<i>nano-spheres, -wires,</i>
<i>protocists, mollusks</i>	polymer fumes	<i>-needles, -tubes, -shells,</i>
<i>arthropods, fish, birds</i>	other fumes	<i>-rings, -platelets;</i>
<i>human brain, meteorite?</i>	heated surfaces	<i>untreated, coated</i>
ferritin (12.5 nm)	frying, broiling, grilling	<i>(nanotechnology applied to many</i>
microparticles (<100 nm)	electric motors	<i>products: cosmetics, medical, fabrics,</i>
<i>(activated cells)</i>		<i>electronics, optics, displays, etc.)</i>

Tabla 1. Clasificación de ejemplos de NPs (<100nm) según su origen. Fuente: (1)

Este criterio (tabla 1) clasifica las NPs según su origen, pero también las podemos clasificar según su naturaleza: pueden crearse de forma natural -biosíntesis-, de forma no intencionada -existen de por sí en el ambiente- o de forma intencionada -sintéticas, “Engineered NPs” (ENPs)-. (4)

En función de la composición y distribución de estas capas, las NPs tendrán unas propiedades u otras, y además tendrán distintos métodos de caracterización. (3)

Las **características** que hacen la nanotecnología tan especial e innovadora son: el tamaño (1-100 nm) y morfología; en consecuencia, tendrán una habilidad especial de manipulación y, por último, dotarán a los materiales que las componen de propiedades físico-químicas únicas (5). Estas propiedades son: (3 y 4)

1. Propiedades electrónicas y ópticas (ejemplo: quantum dots).
2. Propiedades magnéticas (de gran importancia en las disciplinas médico-farmacéuticas y ambientales). Aquí el tamaño adecuado oscilaría entre 10-30nm.
3. Propiedades mecánicas. Esta propiedad consta de varios parámetros tales como elasticidad, resistencia, dureza, estrés y tensión, adhesión y fricción; además la superficie de revestimiento, el estado de agregación y la lubricación ayudan también dentro de las propiedades mecánicas de las NPs.
4. Propiedades térmicas. De gran importancia en nanometalurgia (alta conductividad térmica, mayor que en metales en forma sólida o líquida).
5. Propiedades químicas, dependiente de: composición elemental, estructura, carga, reactividad...

Estas características hacen que las NPs difieran significativamente de las micropartículas (μm) y los materiales más gruesos ("bulk materials"). Por lo tanto, podemos decir que los nanomateriales (NMs) son un puente entre la estructura atómica o molecular y los materiales gruesos (6).

2. Obtención de nanopartículas y sus aplicaciones

Como hemos mencionado anteriormente, las NPs pueden generarse de forma natural (procesos fisiológicos que realizan los seres vivos o accidentales (no intencionados) como por ejemplo las erupciones volcánicas), o de forma intencionada, es decir, sintetizadas por el ser humano con un fin. Dentro de este último grupo lo podemos dividir en biosíntesis o por síntesis química (2).

La manipulación de las condiciones de síntesis permite el control específico de la morfología de las partículas y de los medios para adaptar las propiedades de los materiales durante todo el proceso. Otro aspecto importante durante la elaboración de NPs es su estabilización, para que pueda mantenerse su tamaño y forma a lo largo del tiempo. (10)

- La **biosíntesis** de NMs, es la menos frecuente, pero sin embargo la menos contaminante para el medio ambiente y menos tóxica para los seres vivos. Se puede realizar a partir de:
 - **Bacterias** son biofactores potenciales para formación de NPs de Au -ejemplo: *E. coli* K12, 50nm-, Ag -ej: *Lactobacillus sp.*- y Cd -*Klebsiella aerogenes*-, además algunas especies producen óxidos magnéticos siendo de gran utilidad en el campo de la nanomedicina; también actinomicetos como *Thermomonospora sp.* y *Rhodococcus sp.* son bioprecusores en la formación de NPs de Au (8 nm) y de antibióticos.
 - **Levaduras** bioprecusores en la formación de semiconductores: CdS y PbS, además de NPs de Au, sales de Cd, Ag, Ni, Sb_2O_3 . Las levaduras juegan un papel importante dentro del ámbito de la biorremediación ambiental a partir de *Saccharomyces cerevisiae*.
 - **Algas** bioprecusores en la formación de NPs de Au y de compuestos antioxidantes.
 - **Reino Fungi**, este es el mejor candidato y más utilizado dentro de la biosíntesis de NPs debido a que presentan una gran variedad de enzimas en sus células (enzimas específicas por unidad de hongo), además de crecer a lo largo de sustratos inorgánicos (en los cuales hay una mejor distribución de los metales), son fáciles de cultivar en distintos tipos de sustratos sólidos. Las NPs de Au -*Fusarium oxysporum*- y Ag -*Aspergillus sp.*- son las más comunes dentro de este reino.
 - **Virus**, tanto de plantas como de hombres, éstos destacan dentro de la liberación de fármacos en un sitio de unión específico (todavía en desarrollo, pero con un gran potencial biosanitario).
 - **Plantas**, ya que las fibras de celulosa están formadas por partículas nanométricas (100 - 1.000 nm), además de contener nano-estructuras en su superficie que las dotan de super-hidrofobicidad (auto-limpieza y auto-secado) en sus hojas.
 - **Insectos**, sobre todo podrían ser de utilidad las NPs (comprendidas entre la micro y la nano escala) encontradas en las alas de estos insectos, para la protección frente al agua y a los contaminantes.

- **Reino animal**, tenemos muchas especies de las cuales podríamos obtener un gran número de nanocompuestos de mucho interés, como por ejemplo en las arañas, las mariposas, los moluscos... y, por último, podemos encontrar (y en un futuro, aprovechar) millones de compuestos con escala nanométrica en el **cuerpo humano**, por ejemplo: enzimas, huesos, proteínas, glucosa, anticuerpos, ADN... (tabla adjunta 1, anexo)

En resumen, podemos observar que hay una gran variedad opciones dentro de este grupo y que, por tanto, debemos fomentar el uso de este tipo de síntesis de NPs debido a que son compuestos naturales, no contaminantes para el medio ambiente y no perjudiciales para los seres vivos. (2 y 7)

Esta síntesis de nanopartículas puede ser intracelular o extracelular, dependiendo de la locación de dicha NP y del uso que vaya a tener. (8)

- Síntesis **industrial** de NMs. Aquí partimos de compuestos tales como:
 - Carbono y derivados: **fullerenos** (C₆₀) o **Nanotubos de C** -CNTs- (Single-Wall Nanotubes -SWNT-, Double-Wall Nanotubes -DWNT- o Multi-Wall Nanotubes -MWNT-). Los C₆₀ tienen un especial interés comercial debido a su buena conductividad eléctrica, elevada fuerza, a su estructura con afinidad electrónica y su versatilidad. Por su parte los CNTs, tienen aplicaciones comerciales como rellenos, absorbentes de gas en remediación ambiental y como medio de soporte para catálisis orgánicas e inorgánicas.
 - **Metales**: Cu, Ag, Au, Si... con propiedades fotoeléctricas únicas. Útiles en muchas áreas de búsqueda. Y óxidos metálicos como TiO₂, ZnO, Fe₂O₄, SiO₂ con diversas propiedades fisicoquímicas.
 - **Cerámicas**: las NPs de cerámica están formadas por nanometales inorgánicos no sólidos.
 - **Semiconductores**: estas NPs poseen propiedades intermedias entre metales y no metales y por eso se han encontrado gran variedad de aplicaciones en la literatura. Son útiles para: fotocatalisis, ópticas y electrónicas (por ejemplo, en tratamientos de aguas).
 - **Polímeros**: normalmente formados por bases orgánicas y la literatura los nombra como NPs, la mayoría son de forma capsular o esférica.
 - **Lípidos y derivados**: las aplicaciones de estas NPs son biomédicas (como transportador de fármacos y en terapia del cáncer). Es característica su forma esférica con diámetros entre los 10-100nm. Estos poseen un núcleo sólido y una matriz que contiene moléculas lipofílicas solubles, y además surfactantes y emulsificantes que estabilizan la capa externa. (3)

Los métodos de síntesis de NPs suelen agruparse en dos métodos: “m. de arriba hacia abajo” (top-down) y “m. de abajo hacia arriba” (bottom-up) (11). Son métodos que utilizan la aproximación. Dentro de cada método tenemos varios ejemplos de las técnicas más empleadas.

Son métodos de “arriba hacia abajo”:

- La evaporación térmica
- El depósito químico en fase de vapor (CVD)

- La preparación de clusters gaseosos
- La implantación de iones
- La molienda

Estas técnicas se basan en la división de sólidos en porciones más pequeñas. Son más costosos debido a la complejidad de los instrumentos (excepto la molienda).

Son métodos de “abajo hacia arriba”:

- El coloidal
- La reducción fotoquímica y radioquímica (fotólisis y radiólisis)
- La irradiación con microondas
- La utilización de dendrímeros
- La síntesis solvotermal
- El método sol-gel

En este caso, las técnicas utilizadas fabrican las partículas de cero a través de estos métodos de aproximación (parten de átomos o moléculas y los condensan tanto en fase gaseosa como solución). Los más empleados son los procedimientos químicos, de tal manera que, primero se reducen los iones metálicos a átomos metálicos, seguido de la segregación de éstos.

El método químico es el más conveniente para obtener NPs uniformes y pequeñas. (10)

Las **aplicaciones** de estas partículas son muy diversas, las podemos resumir en cinco puntos:

- uso en medicamentos (síntesis y liberación de fármacos en lugares específicos, así como métodos de diagnóstico oncológicos)
- uso como antioxidantes y antirreflectantes (antisépticos, cosmética y solares)
- uso en fabricación e industria mecánica y de materiales
- uso en electrónica
- uso en cosecha y medio ambiente (biorremediación)

3. Toxicidad

El número de artículos sobre NMs y NPs ha ido creciendo exponencialmente desde el año 1990, sin embargo, el número de publicaciones sobre estos materiales y su toxicidad no es equiparable, según la ISI Web of Knowledge database (12). Esto hace que sea más complicada la búsqueda de información acerca del mecanismo de toxicidad de las NPs.

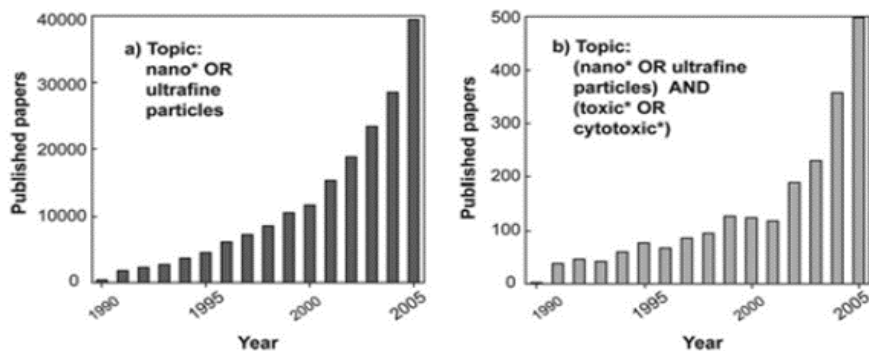


Tabla 2. Relación entre los artículos científicos publicados y el año con respecto a: (a) nanomateriales y (b) su toxicidad. Fuente: (12)

En la literatura está escrito que la piel, el tracto gastrointestinal (GI) y los pulmones están en constante contacto con el ambiente que nos rodea y por lo tanto son la principal vía de entrada de partículas exógenas a nuestro organismo. Mientras que la piel es una barrera efectiva y fuerte frente a los contaminantes ambientales, los pulmones y el tracto GI son más vulnerables. Y, por tanto, las principales patologías y daños se van a dar en estos lugares.

No obstante, debido a su pequeño tamaño, estas NPs, una vez que entran dentro de nuestro organismo -vía pulmonar preferentemente-, se translocan y pasan a circulación portal, llegando al sistema linfático, y por último a los órganos (corazón y cerebro se verán dañados principalmente) y tejidos del cuerpo.

Algunas nanopartículas, dependiendo de la composición y del tamaño, pueden producir un daño irreversible a las células por estrés oxidativo y/o daño celular principalmente por formación de radicales libres del Oxígeno (ROS) provocando fenómenos como la peroxidación lipídica, la alteración de proteínas, las mutaciones, las alteraciones genéticas -

ADN/ARN-, y apoptosis celular. (figura 2)

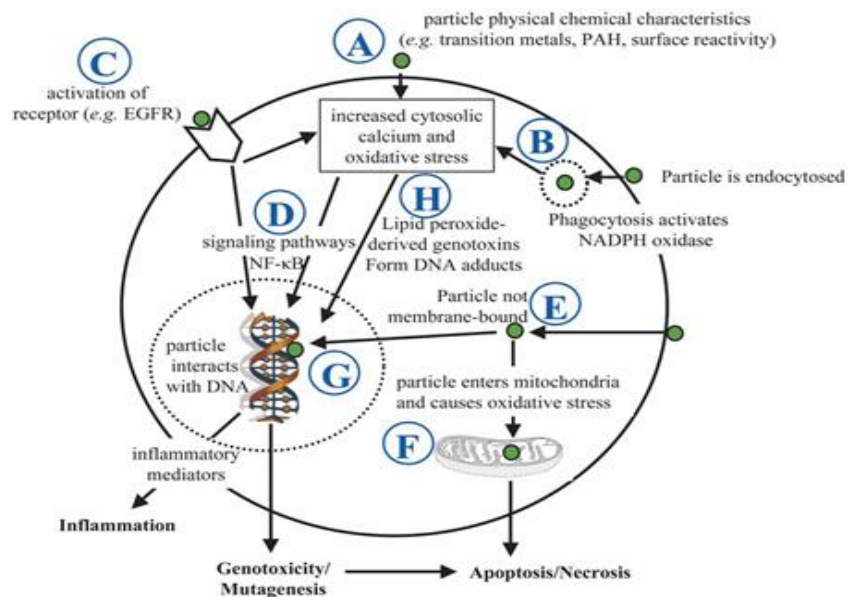


Figura 2. Mecanismos de toxicidad de las NPs en las células humanas, provocando mutagénesis y genotoxicidad sobre el ADN. Fuente: (1)

Y por consiguiente lleva a la aparición de enfermedades -pulmonares, cardíacas, dermatológicas e incluso cerebrales- además de cambios en la codificación de los genes pudiendo llegar a ser heredadas en las futuras generaciones.

Existen ya datos acerca de la incidencia y prevalencia de las patologías o daños producidos por las partículas PM 2,5 de la contaminación atmosférica (partículas con un diámetro menor a 2,5 micrómetros = 2500 nm), sobre todo está afectado el tracto respiratorio. Tras veinte años de estudios epidemiológicos se ha observado que, en la población europea, las PM2,5 disminuyen el promedio de vida en 8,6 meses. Además, recientemente se ha informado que la tasa de prevalencia de enfermedades respiratorias ha aumentado un 2,07%, mientras que la tasa de hospitalización lo ha hecho un 8% cuando la PM2,5 diaria aumenta a 10µg/m³. (41)

Por otro lado, la toxicidad de todas las NPs depende directamente de la genética individual de cada persona y por lo tanto afectan de formas distintas en unos organismos y en otros. Esto además proporciona “la caja de herramientas bioquímicas” mediante la cual el organismo puede adaptarse y combatir así las sustancias tóxicas de una forma personalizada. (12)

Además de la vía inhalatoria sobre hombres y animales, la toxicidad de estas nanopartículas también afecta a la fauna y flora de aguas y suelos de los ecosistemas. (figura 3)

Este tipo de impacto está siendo también estudiado en ambos ecosistemas de manera más exitosa ya que los estudios no requieren la complicación que supone investigar sobre los humanos.

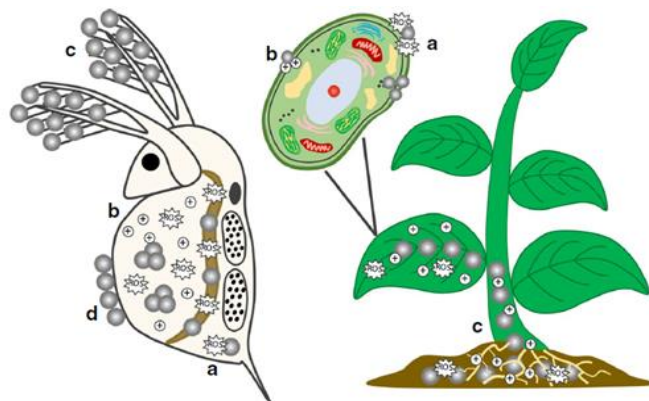


Figura 3. Representación de los distintos mecanismos de toxicidad de las NPs en regímenes acuáticos y terrestres: a=formación de ROS; b= propagación de iones; c= internalización subterránea; d= recubrimiento de la cubierta biológica. Fuente: (13)

Sin embargo, no hay datos concluyentes publicados todavía. Este tema será tratado posteriormente en el apartado IV.

II. OBJETIVOS

Los objetivos principales de este trabajo son:

- El estudio del impacto de las nanopartículas en los seres vivos y en el medio ambiente
- La identificación de métodos de evaluación ecotoxicológica de las nanopartículas (*in vivo* e *in vitro*)
- Estudio de los modelos que evalúan la predicción y determinan la exposición de nanopartículas sobre los organismos vivos (método *in silico* y *control banding*)

III. MATERIAL Y MÉTODOS

En este trabajo se ha realizado una búsqueda de artículos científicos en distintas bases de datos informáticas, revistas de carácter científico... Estas han sido PubMed, Google Scholar, WOS, Springer Link, El Servier, Mendeley, entre otras.

Realizando una lectura y selección de las publicaciones más afines y que más se ajustan a la temática de este trabajo, se escogieron un total de 41 artículos encontrados a través de las bases de búsqueda citadas anteriormente. De éstos se extrajo la información más relevante y acorde para el estudio y la comprensión del trabajo, y así poder llegar a reunir los resultados y las conclusiones.

IV. RESULTADOS

1. Tipos de modelos de evaluación de nanopartículas

Debido al aumento del uso de los nanomateriales en los distintos sectores y a sus propiedades físico-químicas tan características es necesario realizar análisis y estudios de éstos para evaluar el impacto que tienen frente a los distintos ecosistemas.

Los métodos de evaluación que se realizan hoy en día, son modelos *in vivo* y modelos *in vitro*; y se han llevado a cabo, en esta última década, los modelos predictivos (cuantitativos) de estudio *in silico*.

- Los **estudios *in vivo***, son aquellos que se realizan sobre organismos vivos (tanto procariontas como eucariotas). Esto es de gran utilidad ya que de esta manera podemos conocer datos de acumulación, biodistribución, metabolismo, persistencia y eliminación a “tiempo real”. Además, también conoceremos la respuesta y repercusión inmediata y directa de estos procesos dentro de los distintos organismos a nivel interno (células, órganos y tejidos) y a nivel externo (aspecto). (15)
- Los **estudios *in vitro*** son también modelos de gran interés y de uso frecuente, debido a que se pueden alcanzar un número elevado de líneas celulares (en hombres/mujeres), se puede identificar el mecanismo toxicológico primario de las NPs, y por tanto revelar el daño celular directo (primario) que puede verse falseado por reacciones secundarias de los procesos biológicos y fisiológicos de los organismos (de la metodología *in vivo* como la inflamación, la apoptosis ...etc.). Otras características de este tipo de modelos son la rapidez, la efectividad y la eficiencia (buena relación coste/eficacia). Sin embargo, no aporta todos los datos que nos aportan los estudios en seres vivos (no sabemos el daño a “tiempo real” de células, órganos o tejidos). (16 y 17)
- Y por último tenemos los **estudios *in silico***. Con este tipo de estudios, evaluamos las NPs mediante programas informáticos (no hay pruebas en seres vivos). Estos son modelos predictivos y proporcionan bases de datos de tamaño considerable, además de proporcionar análisis (cuantitativos “Q”) como: estructura-actividad (QSAR: quantitative structure-activity relationship), análisis estructura-propiedad (QSPR: quantitative structure-properties relationships), análisis de acoplamiento molecular y simulaciones de dinámica molecular (serie ADME + T = toxicidad) y proporcionan además una evaluación de las propiedades de estas NPs. (18)

Los estudios de modelos *in vivo* e *in vitro* se comentarán en el apartado 2 y los estudios *in silico* en el apartado 3 junto a los modelos informáticos cualitativos *control banding*.

2. Impacto en los ecosistemas

Es importante el análisis sobre los ecosistemas terrestres y acuáticos, ya que dependiendo del tipo y uso que se le da a la NPs acabará en un medio u otro. Por ejemplo, el destino del TiO₂ (una de las NPs de mayor uso tecnológico e industrial, en 2010, el TiO₂ -junto con el SiO₂- fueron los materiales de mayor relevancia en términos de producción en todo el mundo: >10.000 toneladas/año), según Bundschuh (13), es vía acuática; mientras que el destino final del nAg o CNTs es terrestre. Por eso se hace necesario este tipo de estudios.

En esta figura se puede observar la tendencia durante una década acerca de las publicaciones científicas acerca del impacto de las NPs sobre los ecosistemas -acuático y terrestre- y el proceso biológico en el que influyen (negativamente, experimentando procesos de envejecimiento medioambiental) de manera más significativa. (13)

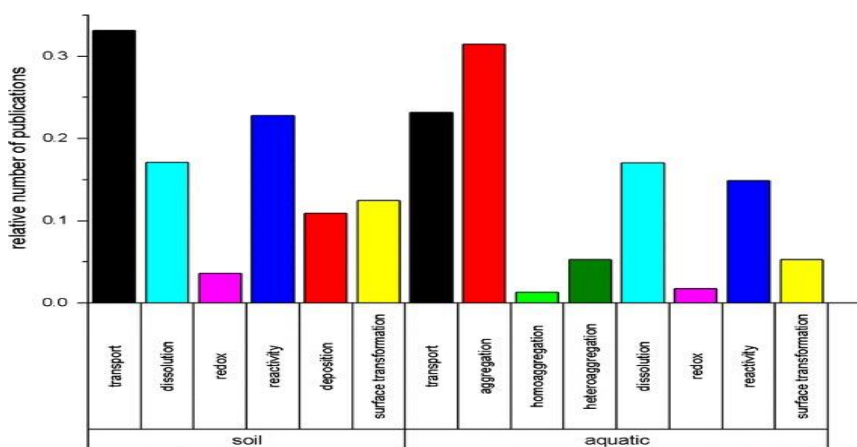


Figura 4. Comparación entre el número relativo de publicaciones relacionadas con el medio terrestre y el medio acuático entre 2007 y 2017. Fuente: (13)

➤ **Medio acuático (modelos *in vivo*)**

Considerando la figura (5) adjunta, con los datos recogidos en 2016, el riesgo observado de las ENPs es: **nAu** > **nZnO** > **nAg** > **nCuO** > **TiO₂** > **nC₆₀**, en orden decreciente. Esto evidencia que las nanopartículas de oro (Au) son las que más se acumulan en los organismos acuáticos, seguido del ZnO. Ambos compuestos son de gran interés dentro de muchas industrias, las **nAus** son utilizadas en la alimentaria por su poder antiséptico; otra aplicación de reciente descubrimiento es en la terapia del cáncer. El **ZnO**, sin embargo, lo encontramos en la industria cosmética y productos de higiene personal, y también, se encuentra en fármacos para distintos tratamientos de la piel (irritaciones tanto de bebés como de adultos, acné, dermatitis, grietas...), como antiséptico en algunas ocasiones. Además, otra utilidad que se le da a este compuesta es la de recubrimiento de superficies (de vidrio o hierro, por ejemplo) o como aditivo. Las **nAgs** también se encuentran con una amplia concentración en algas y anélidos. Los usos de este tipo de nanopartículas también son amplios (propiedades antimicrobianas, siendo de gran utilidad las nAgs en tratamientos de agua, pintura, y material sanitario-vendajes etc.-, y envases para el almacenamiento de alimentos).

Los efectos que provocan estas NPs sobre los organismos acuáticos, citados en la figura 5, son reacciones bioquímicas dentro de éstos, los cuales terminan desencadenando especies reactivas de Oxígeno (ROS), en algas y organismos con clorofila, NPs como la Ag o el ZnO inhiben o interfieren negativamente en su síntesis, en moluscos y peces interfieren con el ADN (cuando pasan a formas iónicas: Ag⁺, Au⁺, TiO⁻ etc., el Cu⁻ se encuentra en altas concentraciones en tejidos de anélidos y moluscos dando lugar a reacciones tóxicas).

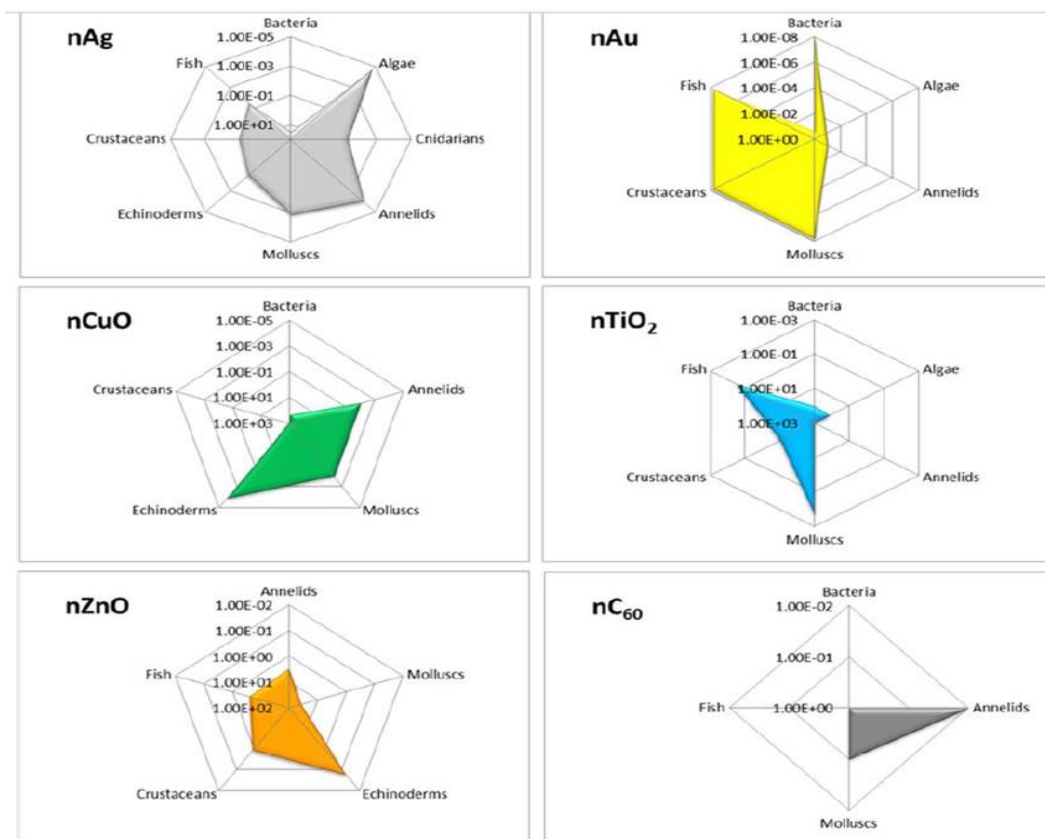


Figura 5. Representación de las concentraciones, en mg/L, de seis tipos de NPs sobre distintos grupos taxonómicos (anélidos, moluscos, equinodermos, cnidaria, peces, bacterias (acuáticas), algas y crustáceos) presentes en el agua salada. Fuente: (19)

➤ **Medio terrestre** (modelos *in vivo*)

A continuación, se muestra la tabla con los resultados de datos en estudios *in vivo*:

ESTUDIOS IN VIVO			
MODELOS	NPs	EFFECTOS	REF
Ratas y ratones	SWNT y MWNT	Inducción de la respuesta inflamatoria y formación de granulomas y fibrosis en pulmones	Lam et al. 2004 (25)
Conejos de indias	MWNT	Causan neumonitis (lesiones pulmonares)	Grubek-Jaworska et al. 2006 (26)
Ratones, ratas y hamsters	TiO ₂ ultrafinas	Inflamación pulmonar y en consecuencia aumento de macrófagos y neutrófilos, fibrosis en ratas y aumento en los niveles proteínas y LDH	Bermudez et al. 2006 (27)
Ratas	Óxido de Cd (<40nm)	Aumento de neutrófilos (desde el día cero) e inflamación multifocal alveolar	Takenaka et al. 2004 (28)

Tabla 3. Ejemplos de estudios *in vivo* en el medio terrestre

ESTUDIOS IN VIVO			
MODELOS	NPs	EFFECTOS	REF
Ratas	Ni ultrafino	Respuesta dosis dependiente en pulmones (aumento de peso, acumulación alveolar de MCFs, lipoproteinosis y calcificación aguda alveolar)	Serita et al. 1999 (29)
Ratones	TiO ₂	Inductor de daño celular (genotoxicidad, oxidación del ADN e inflamación)	Trouiller et al. 2009 (30)

Tabla 3. Continuación

➤ *In vitro* (sin distinción en los ecosistemas)

A continuación, se muestra la tabla con los resultados obtenidos, a través de los estudios *in vitro* sobre los distintos tipos de líneas celulares recogidos, en los seres vivos -sin distinguir entre el medio acuático y terrestre-:

ESTUDIOS IN VITRO			
LÍNEAS CELULARES	NPs	EFFECTOS	REF
Células subcutáneas	CNTs	Inductores de producción de TNFa (proinflamación)	Sato et al. 2005 (20)
Proteína nucleoplasmática	SiO ₂	Deterioro de la respuesta nuclear celular	Chen & von Mikeez. 2005 (21)
<i>Zea mays</i> (maiz), <i>Cucumis sativus</i> (pepino), <i>Glycine max</i> (soja), <i>Brassica oleracea</i> (repollo), y <i>Daucus carota</i> (zanahoria)	Al	Fototoxicidad	Yang & Watts. 2004 (22)
Fibroblastos humanos, carcinoma hepatocelular humano	Fullerenos (C ₆₀)	Oxidación lipídica	Sayesa et al. 2005 (23)
Mesotelio y fibroblastos de células humanas y en roedores	Óxidos de Ti, Zn, Fe, Zr y Ce y Ca ₃ (PO ₄) ₂	Evaluación dosis-dependiente. Desde daño celular leve hasta provocar la muerte celular	Brunner et al. 2006 (24)

Tabla 4. Ejemplos de estudios *in vitro*

3. Métodos de evaluación de predicción y exposición del impacto de las nanopartículas

- *In silico* (cuantitativo). Tal y como indica el artículo de Shityakov (18), el en que evalúan el impacto de las NPs sobre la barrera hemato-encefálica (BHE) en función de los distintos tipos de procesos: en la permeación, en la agregación y la citotoxicidad de éstas. Los resultados (predictivos) que se obtienen han sido sobre distintos tipos de NPs (liposomales, alótropos del C, péptidos, óxidos metálicos, magnéticos...) y cómo dañan la BHE. (18)

Este método analítico-predictivo se ha ido desarrollando en esta última década con el fin de reducir el uso de animales en los experimentos y debido a la rapidez y la economía de los estudios *in silico*, además de aportarnos datos e información de una alta fiabilidad. No obstante, éste solo es un ejemplo dentro de los muchos que se están realizando en la actualidad. (31)

- *Control banding* (cualitativo) encontramos 2 tipos de programas informáticos, ambos son técnicas basadas en metodología simplificada -es decir, métodos sencillos de usar, que obtengan el nivel de exposición al compuesto en estudio, en el cual los técnicos deben ser conscientes de sus limitaciones de uso; estas metodologías efectúan un primer diagnóstico de la situación a evaluar (36) -:
 - o Método Stoffenmanager Nano. [-www.stoffenmanager.nl-](http://www.stoffenmanager.nl) A través de este programa los trabajadores pueden conocer los riesgos a los que están expuestos por el contacto de las NPs, a través del nivel de peligrosidad. Este método nos proporciona la tabla siguiente:

Exposición \ Peligro	Peligro				
	A	B	C	D	E
1	3	3	3	2	1
2	3	3	2	2	1
3	3	2	2	1	1
4	2	1	1	1	1

Tabla 5. Matriz de decisiones en función del peligro y de la exposición. Fuente: (32)

En ésta, se clasifica el **peligro** mediante cinco letras: la A -menos peligrosa- hasta la E -que representa el máximo peligro-. Se considera banda de peligro C cuando el tamaño de partícula primaria supera los 50 nm y en la banda D cuando el tamaño es 50 nm o inferior. La **exposición** se establece mediante números (que van del 1 al 4), ésta se obtiene a partir de la multiplicación de varios factores (ocho en total). Estos son: la emisión potencial de la sustancia, la emisión potencial de la actividad, la distancia al foco, la reducción de la transmisión, la reducción de la inmisión y el fondo y la duración y la frecuencia de la tarea. Cuanto mayor sea la exposición mayor será el número del resultado de dicha función.

La combinación de cinco bandas de peligrosidad y cuatro bandas de exposición dan lugar a la tabla 5, con las tres bandas de riesgo (verde o número 3 -sin riesgo-, amarillo o número 2 -riesgo- y rojo o número 1 -alto riesgo-).

Este método presenta dos parámetros limitantes para la detección de las NPs, deben ser insolubles (en caso contrario, se evalúan a través del Stoffenmanager *genérico*) y persistentes para que se pueda evaluar dicha exposición. Por otro lado, se trata de un método sencillo y de fácil manejo y permite ver claramente el riesgo al que los trabajadores estarán expuestos. (32)

- **Nanotool** -www.controlbanding.net-. Otra herramienta que podemos encontrar online, de mayor precisión que la explicada anteriormente. (33)

Este programa utiliza como parámetros de evaluación la severidad y la probabilidad. Ambos parámetros se clasifican mediante escala numérica (del 1 al 100). La **severidad** depende de las características toxicológicas (a cada parámetro -hay 15 a día de hoy- toxicológico se le asigna un valor en función de la intensidad de este, y se suman), y la **probabilidad** con el riesgo potencial de exposición (hay 5 factores que determinan el riesgo de exposición, cada uno de ellos tiene unos valores numéricos que determinan su magnitud), también sumando estos obtenemos la puntuación final de la probabilidad.

		PROBABILIDAD			
		Extremadamente improbable (0-25)	Poco probable (26-50)	Probable (51-75)	Muy Probable (75-100)
SEVERIDAD	Muy alta (76-100)	RL3	RL3	RL4	RL4
	Alta (51-75)	RL2	RL2	RL3	RL4
	Media (26-50)	RL1	RL1	RL2	RL3
	Baja (0-25)	RL1	RL1	RL1	RL2
RL1: Ventilación general RL2: Ventilación por extracción localizada o campanas de humos RL3: Confinamiento RL4: Buscar asesoramiento externo					

Tabla 6. Matriz de decisiones en función de la severidad y la probabilidad. Fuente: (34)

Con esta probabilidad conocemos la posibilidad de que las NPs pasen al ambiente y en consecuencia puedan ser inhaladas o entren en contacto con la piel. (33)

Y resultado de todo ello se obtiene una tabla (6) que nos determina como debe de ser la ventilación del lugar donde se están manipulando las NPs.

Este tipo de métodos simplificados son de aproximación por lo que las puntuaciones que se obtienen tienen un carácter orientativo y la experiencia del evaluador juega un papel fundamental en ellos. (35)

V. DISCUSIÓN

La nanotecnología supone un cambio de paradigma pasando de ser un tema desconocido hasta hace poco, a formar parte de los distintos ámbitos de la población a lo largo de este siglo. Debido a ello, no sólo se van descubriendo sus aplicaciones (que siguen en aumento), sino que también empezamos a conocer sus efectos sobre la salud de los seres vivos y sobre el medio ambiente. Y, en consecuencia, es de vital necesidad poder medir las nanopartículas a lo largo de su vida (desde su síntesis hasta su eliminación).

Después de realizar una búsqueda y lectura de numerosos artículos y revistas científicas, no se puede confirmar al 100% -todavía- las consecuencias de la exposición a las mismas. Esto puede ser debido a que no existe un equipo o método universal de detección de nanopartículas como tal.

Hoy en día los análisis que se realizan de estas NPs son a través de técnicas microscópicas (microscopio electrónico de transmisión -TEM-, microscopio electrónico de barrido -SEM-, microscopio de fuerza atómica -AFM-...) cromatográficas (tamaño de exclusión cromatográfica -SEC-, capilaridad por electroforesis -CE-, cromatografía hidrodinámica -HDC-, "field-flow fractionation" -FFF-...) espectroscópicas (difracción de rayos X -XRD-, espectroscopía fotoelectrónica de rayos X -XPS-, espectroscopía de resonancia magnética nuclear -NMR- ...), técnicas de centrifugación y filtración (analítica de ultracentrífuga -ANUC-, ultra-centrifugación -UC-...), gravimetría, potencial Z, BET (determina la superficie), voltímetros, análisis térmicos...etc.

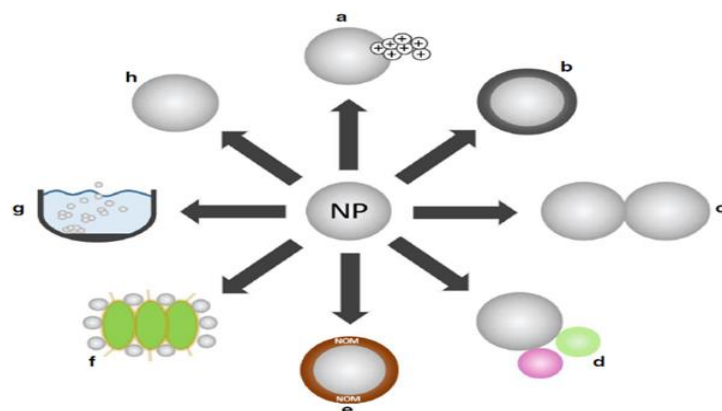


Figura 6. Tipos de interacciones de las NPs considerando los distintos tipos de propiedades que poseen -a= disolución, b= sulfuración, c= homo-agregación, d= hetero-agregación, e= revestimiento con materia orgánica natural (NOM), f= adsorción en la superficie biológica, g= sedimentación, h= persistencia-. Fuente: (13)

La toxicidad (potencial) y el comportamiento de las NPs se verán afectados por una amplia gama de factores: estado de agregación, composición elemental, concentración del material, número de partículas, forma, tamaño y tamaño distribución, solubilidad, estructura, área superficial y porosidad, carga, así como su reactividad (ejemplos en figura 6). Y en función de éstos, se utilizará una u otra técnica de análisis, o varias. (37)

Por tanto, el conocimiento de la existencia y utilidad de las nanopartículas está cada día más presente dentro de la sociedad en la que nos encontramos, pero en lo que habría que profundizar es en su gestión a lo largo de la vida de éstas, para poder controlar y evitar los efectos tóxicos y contaminantes que tienen.

Poco a poco, las organizaciones y las fundaciones van creando protocolos de actuación para afrontar y reducir los impactos de las nanopartículas. Éste es el caso del Centro Nacional de Nuevas Tecnologías (CNNT), situado en Madrid (INSHT), cuya jerarquización está representada en la figura 7. (38)



Figura 7. Pirámide de medidas de control adoptadas por el CNNT. Fuente: (38)

A priori puede parecer que las nanopartículas tienen más perjuicios que beneficios ya que cuando una nueva ciencia emerge, el desconocimiento y la incertidumbre pueden causar este tipo de pensamientos. También, es debido a la imposibilidad de uso de una sola técnica de medición ya que para lograr una evaluación completa de las nanopartículas son necesarias -a día de hoy- varias técnicas en función del tipo o morfología y composición de éstas. Otro factor que suma desconfianza hacia este tipo de tecnología es la falta de seguridad en la protección de ecosistemas y la promoción de la salud hacia los organismos vivos. Si bien, como se ha mencionado a lo largo de este trabajo, la nanotecnología puede y, de hecho, está aportando grandes avances y beneficios en la vida de las personas.

VI. CONCLUSIONES

- La nanotecnología es un campo multidisciplinar que se ha ido desarrollando de manera exponencial especialmente en la última década. Las extraordinarias propiedades de las nanopartículas dan lugar a múltiples aplicaciones, algunas ya en el mercado y otras en fase de desarrollo, de modo que ya se habla de “la segunda revolución industrial” (33). Dichas aplicaciones revolucionarias podrían suponer un gran beneficio para la sociedad.
- Tenemos que seguir investigando acerca de los métodos de análisis de estas partículas. A día de hoy, las más explotadas son los métodos de evaluación *in vitro* -nos aproximan a los mecanismos subyacentes-, e *in vivo* -permiten estudiar las condiciones biológicas en las que ocurre un fenómeno y cuáles son sus consecuencias a tiempo real- y más recientemente *in silico* -programas que permiten anticipar la magnitud de las respuestas del sistema en estudio-
- Además, se están creando programas informáticos de predicción de la exposición y del impacto cuando se trabaja cerca de estas NPs, como los mencionados en este trabajo “Stoffenmanager genérico o nano” o “Nanotool”.
- Aunque no haya un método universal de detección y cuantificación de nanopartículas establecido, sabemos que existe un riesgo de exposición hacia los seres vivos. Las afectaciones más frecuentes son las pulmonares y las cardiovasculares, a la vez que las zonas externas del cuerpo como piel, ojos o nariz que se ven afectadas de manera negativa.
- Todavía no existe una regulación internacional sobre nanopartículas. Nos encontramos a día de hoy en una “fase de recopilación de datos” (39 y 40) y en consecuencia no se puede llevar a cabo una evaluación del riesgo (generalizado) del uso de las nanotecnologías. Será en función de los resultados de las evaluaciones cuando se pondrán poner en marcha las medidas de gestión necesarias por parte de los organismos reguladores.

VII. ANEXO

- i. Tabla adjunta 1. Clasificación de organismos en la biosíntesis de nanopartículas y sus aplicaciones.

ORGANISMOS	APLICACIONES
Bacterias	<ul style="list-style-type: none"> - Biofactores potenciales en la formación de NPs de Au, Ag y Cd y de algunos óxidos magnéticos (importancia en nanomedicina) - Bioprecusores de antibióticos
Levaduras	<ul style="list-style-type: none"> - Bioprecusores de semiconductores -CdS y PbS- y NPs de Au, sales de Cd, Ag, Ni, Sb₂O₃ - Papel importante en la biorremediación
Algas	<ul style="list-style-type: none"> - Bioprecusores de NPs de Au y compuestos antioxidantes - <i>Chlorella vulgaris</i> se utiliza para la biosíntesis de nAgs
Reino Fungi	<ul style="list-style-type: none"> - Elevada presencia de enzimas (de alta especificidad) en sus células - Crecen en sustratos inorgánicos (favorece la distribución de metales) - Facilidad de cultivar en distintos tipos de sustrato sólido - <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Verticillium sp.</i> son organismos que se usan para la biosíntesis de distintos tipos de NPs (nAu, nCdS...)
Virus	<ul style="list-style-type: none"> - Importancia dentro de la investigación farmacéutica por su uso en la liberación del principio activo (pa) en su sitio específico
Plantas	<ul style="list-style-type: none"> - La celulosa que las forma ya es nanométrica de por sí, dotando a este compuesto de una hidrofobicidad única (útil en procesos de auto-limpieza y de auto-secado)
Insectos	<ul style="list-style-type: none"> - En investigación las NPs y micropartículas que contienen las alas de estos organismos, ya que estas poseen propiedades de protección frente al agua y a los contaminantes
Reino animal	<ul style="list-style-type: none"> - En investigación ciertos grupos tales como arañas, mariposas, moluscos... - Dentro de este grupo tenemos nuestra especie, la cual está constituida por millones de NPs -enzimas, componentes del hueso, proteínas, glucosa, anticuerpos, ADN/ARN...etc- que podrían servir también en futuras terapias.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Oberdorster G., Stone V., Donaldson K., (2007). Toxicology of nanoparticles: a historical perspective. *Journal of Nanotoxicology*, 1(1), 2-25 <https://doi.org/10.1080/17435390701314761>
- (2) Jeevanandam J., Barhoum A., Chan Y. S., Dufresne A., Danquah M. K. (2018). Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein J. Nanotechnol*, 9, 1050–1074. [doi:10.3762/bjnano.9.98](https://doi.org/10.3762/bjnano.9.98)
- (3) Khan I., Saeed K., Khan I. (2017). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), 908-931. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>
- (4) Tiede K., Boxall A. B. A., Tear S. P., Lewis J., David H., Hassellöv M. (2008). Detection and characterization of engineered nanoparticles in food and the environment. Pubmed. DOI:[10.1080/02652030802007553](https://doi.org/10.1080/02652030802007553)
- (5) Chow J. C., Watson J. G., Savage N., Solomon C. J., Cheng Y. S., McMurry P. H., ... & Biswas P. (2005). Nanoparticles and the environment. *Journal of the Air & Waste Management Association*, 55(10), 1411-1417. <https://doi.org/10.1080/10473289.2005.10464743>
- (6) Henglein A. (1993). Physicochemical Properties of Small Metal Particles in Solution – Microelectrode Reactions, Chemisorption, Composite Metal Particles, and the Atom-To-Metal Transition. *J Phys Chem*, num 97:5457–5471.
- (7) Hulkoti N. I. & Taranath T. C. (2014). Biosynthesis of nanoparticles using microbes- A review. DOI: [10.1016/j.colsurfb.2014.05.027](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.05.027)
- (8) Hasan S. (2015). A review on Nanoparticles: Their synthesis and types. *Journal of Recent Sciences*. ISSN, 2277, 2502.
- (9) Handy R. D., von der Kammer F., Lead J. R. Hassellöv M., Owen R., Crane M. (2008). The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles. *Ecotoxicology*. May;17(4):287-314. DOI:[10.1007/s10646-008-0199-8](https://doi.org/10.1007/s10646-008-0199-8)
- (10) Zanella R. (2012). Metodología para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología*, 5(1).
- (11) Rao C. N. R., Müller A., y Cheetham A. K. (2004). *The Chemistry of Nanomaterials* (vols. 1 y 2). Weinheim: Wiley-VCH.
- (12) Buzea C., Pacheco I. I., Robbie K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4), MR17-MR71.
- (13) Bundschuh M., Filser J., Lüderwald S., McKee M. S., Metreveli G., Schaumann G. E., Schulz R., Wagner S. (2018). Nanoparticles in the environment: where do we come from, where do we go to? Pubmed, *Environ Sci Eur*. 2018;30(1):6. DOI:[10.1186/s12302-018-0132-6](https://doi.org/10.1186/s12302-018-0132-6)
- (14) Guo D., Xie G., Luo J. (2014). Mechanical properties of nanoparticles: basics and applications. *J. Phys. D Appl. Phys.* 47, 13001. <http://dx.doi.org/10.1088/0022-3727/47/1/013001>.
- (15) Chifiriuc M. C., Ratiu A. C., Popa M., Ecovoiu A.; *Int J Mol Sci*. 2016 Feb 14;17(2):36. DOI: [10.3390/ijms17020036](https://doi.org/10.3390/ijms17020036)

- (16) López Fernández A., García-Díaz I., Casermeiro M. A. (2017). ¿Cómo evaluamos el impacto ambiental en las nanopartículas?
- (17) Arora S., Rajwade J. M., Paknikar K. M. (2011). Nanotoxicology and in vitro studies: the need of the hour. *Toxicol Appl Pharmacol*. Epub 2011 Dec 2. DOI: [10.1016/j.taap.2011.11.010](https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.11.010)
- (18) Shityakov S, Roewer N, Broscheit JA, Förster C. (2017). In silico models for nanotoxicity evaluation and prediction at the bloodbrain barrier level: A mini-review <https://doi.org/10.1016/j.comtox.2017.02.003>
- (19) Minetto D., Volpi Ghirardini A., Libralato G. (2016). Saltwater ecotoxicology of Ag, Au, CuO, TiO₂, ZnO and C₆₀ engineered nanoparticles: an overview. Pubmed, *Environ Int*. 2016 Jul-Aug;92-93:189-201. DOI:[10.1016/j.envint.2016.03.041](https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.03.041)
- (20) Sato Y., Yokoyama A., Shibata K., Akimoto Y., Ogino S., Nodasaka Y., Kohgo T., Tamura K., Akasaka T., Uo M., Motomiya K., Jeyadevan B., Ishiguro M., Hatakeyama R., Watari F., Tohji K. (2005). Influence of length on cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes against human acute monocytic leukemia cell line THP-1 in vitro and subcutaneous tissue of rats in vivo. *Mol Biosyst*, num 1(2):176_182.
- (21) Chen M., von Mikecz A. (2005). Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to SiO₂ nanoparticles. *Exp Cell Res*, 305:51–62.
- (22) Yang L. & Watts D. J. (2005). Particle surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nanoparticles. *Toxicol Lett*, num 158:122–132.
- (23) Sayesa C. M., Gobin A. M., Ausmanc K. D., Mendez J., West J. L., Colvin V. L. (2005). Nano-C60 cytotoxicity is due to lipid peroxidation, *Biomaterials* Volume 26, Issue 36, Pages 7587-7595 DOI:[10.1016/j.biomaterials.2005.05.027](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.05.027)
- (24) Brunner T. J., Wick P., Manser P., Spohn P., Grass R. N., Limbach L. K., Bruinink A., Stark W. J. (2006). In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: Comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. *Environ Sci Technol*, num 40:4374–4381.
- (25) Lam C. W., James J. T., McCluskey R., Hnter R. L. (2004). Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicological Sci*, num 77:126_134
- (26) Grubek-Jaworska H., Nejman P., Czuminiska K., Przybylowski T., Huczko A., Lange H., Bystrzejewski M., Baranowski P., Chazan R. (2006) Preliminary results on the pathogenic effects of intratracheal exposure to one-dimensional nanocarbons. *Carbon*, num 44:1057–1063
- (27) Bermudez E., Mangum J. B., Wong B. A., Asgharian B., Hext P. M., Warheit D. B., Everitt J. I. (2004). Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles. *Toxicol Sci*, num 77:347–357
- (28) Takenaka S., Karg E., Kreyling W. G., Lentner B., Schulz H., Ziesenis A., Schramel P., Heyder J. (2004). Fate and toxic effects of inhaled ultrafine cadmium oxide particles in the rat lung. *Inhal Toxicol*, num 16:83–92
- (29) Serita F., Kyono H., Seki Y. (1999). Pulmonary clearance and lesions in rats after a single inhalation of ultrafine metallic nickel at doce levels comparable to the threshold limit value. *Ind Health*, num 37:353–363

- (30) Trouiller B., Reliene R., Westbrook A., Solaimani P., Schiestl R. H. (2009). Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability in vivo in mice. *Cancer Res.* 2009 Nov 15;69(22):8784-9. DOI:[10.1158/0008-5472.CAN-09-2496](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2496)
- (31) Fina B. L., Lombarte M., Rigalli A. (2013). INVESTIGACIÓN DE UN FENÓMENO NATURAL: ¿ESTUDIOS IN VIVO, IN VITRO O IN SILICO? *Osteol*, 9(3): 294-299
- (32) Tanarro Gozalo C. NTP 877: Evaluación del riesgo por exposición a nanopartículas mediante el uso de metodologías simplificadas. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el trabajo (INSHT).
- (33) Instituto nacional de seguridad e higiene en el trabajo (INSHT) NTP 877. Evaluación del riesgo por exposición a nanopartículas mediante el uso de metodologías simplificadas.
- (34) Paik S. Y., Zalk D. M., P Swuste P. (2008). Application of a pilot control banding tool for risk assessment and control of nanoparticle exposures. *Ann Occup Hyg*, 52 (6): 419-428.
- (35) Sousa E., Tanarro C., Bernaola M., Tejedor, J. N. (2008). Aplicación de métodos simplificados de evaluación del riesgo químico con efectos para la salud. *Seguridad y Salud en el Trabajo*, num 50: 27-39.
- (36) Metodología simplificada para la Evaluación de Riesgos de Agentes Químicos. Anexo 2: "Guía Europea de Agentes Químicos". Fremap
- (37) Chau C. F., Wu S. H., Yen G. C. (2007). The development of regulations for food nanotechnology. *Trends Food Sci Technol*, num 18: 269–280
- (38) Tanarro C., Gálvez V. (2009). Nanopartículas: ¿un riesgo pequeño? *Rev. del Instituto de Seguridad e Higiene en el trabajo*, num 50: 32-44
- (39) Handy RD, Shaw BJ (2007) Toxic effects of nanoparticles and nanomaterials: Implications for public health, risk assessment and the public perception of nanotechnology. *Health, Risk & Society*, 9(2): 25-144
- (40) Gutiérrez-Prádena G., Jos A., Pichardo S., Puerto M., Sánchez-Granados E., Grilo A., Cameán A. M. (2009). Nuevos riesgos tóxicos por exposición a nanopartículas. *Rev. Toxicol*, num 26: 87-92
- (41) Xing Y-F., Xu Y-H., Shi M-H., Lian Y-X. (2016). The impact of PM2.5 on the human respiratory system. *J Thorac Dis.* 2016 Jan; 8(1): E69–E74. doi: [10.3978/j.issn.2072-1439.2016.01.19](https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2016.01.19)