

2017 INESCOP

INFORME RESULTADOS

PROYECTO:

CRNOTOX II
EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN
A NANOMATERIALES

INESCOP está desarrollando el proyecto “Estudio de los efectos de la exposición celular crónica a nanomateriales (IMDEEA/2017/5)” con el apoyo del Instituto Valenciano de Competitividad Empresarial (IVACE) y del Fondo Europeo de Desarrollo Regional. Se trata de un proyecto bianual, presentando la presente ficha un resumen de los principales resultados de la segunda anualidad (2017).

La nanotecnología. Una innovación en auge

La nanotecnología es un área con gran expansión y proyección de futuro. Se encuentra ya en el mercado europeo una gran variedad de productos que incluyen nanomateriales en su composición (productos de higiene, textiles, dispositivos ópticos o electrónicos, etc.). El interés radica en el hecho de que el pequeño tamaño de los nanomateriales les proporciona propiedades que difieren a las del mismo material en su forma “no nano”, como propiedades físicas, químicas, ópticas o térmicas novedosas.

Es precisamente la rápida expansión que está sufriendo esta tecnología y su incorporación a

nuestra vida cotidiana la que nos impulsa a tener en consideración no solo sus indudables ventajas, sino también los posibles inconvenientes para la salud de las personas y el medio ambiente que puede suponer el hecho de estar expuestos, con cada vez más frecuencia, y durante más tiempo, a artículos que contienen nanomateriales en su composición.

Con esta premisa en mente, se planteó el proyecto **CRNOTOX II**, que constituye la segunda anualidad del proyecto CRNOTOX. Durante la primera anualidad se establecieron los métodos para la evaluación crónica de la citotoxicidad que se han empleado durante el resto del proyecto.

Obtención y caracterización de nanomateriales



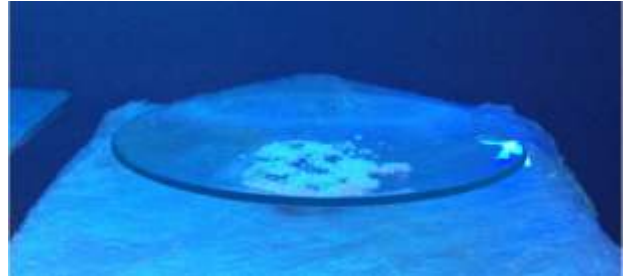
Figura 1: Nanopartículas de zinc

Obtención de nanomateriales

Durante esta etapa, a partir de los nanomateriales seleccionados durante la primera anualidad del proyecto, en función de su posible interés industrial, el volumen mundial de producción, y la potencialidad de su uso en materiales de calzado, se ha continuado con la obtención de muestras de los nanomateriales de interés. Concretamente, se han aplicado diferentes procedimientos de síntesis química encaminados a la obtención de nanopartículas de plata, oro, zinc, titanio y sílice. Adicionalmente, se han obtenido nanocompuestos

de sílice combinados con nanopartículas metálicas, y se han ensayado diferentes modificaciones en los procedimientos de síntesis para estudiar sus efectos sobre las nanopartículas resultantes.

Figura 2: Activación catalítica de nanopartículas de zinc con luz UV



Caracterización de nanomateriales

Con el fin de determinar las propiedades de las nanopartículas y nanocompuestos obtenidos, tras la aplicación de los diferentes procedimientos de síntesis se ha llevado a una caracterización exhaustiva de las mismas.

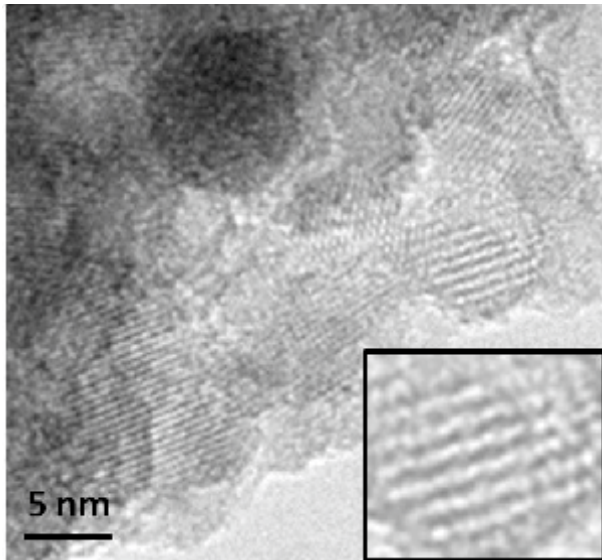


Figura 3: Nanopartículas de zinc. Imagen de microscopía TEM

Ampliada una zona para que se observen los planos cristalinos característicos

Se han empleado diferentes técnicas de análisis, que permiten establecer parámetros como el tamaño, estructura (forma, planos cristalinos), estado de agregación, concentración, etc. Parámetros que determinan, por un lado, la calidad del material obtenido tras cada síntesis, y por otro lado, permiten establecer la posible influencia de la modificación de los parámetros de obtención. Entre las metodologías de caracterización empleadas se encuentran la microscopía electrónica de transmisión (TEM), de barrido (SEM), y de emisión de campo (FESEM). También la espectroscopía UV, la determinación del espectro infrarrojo y la espectrometría de masas.

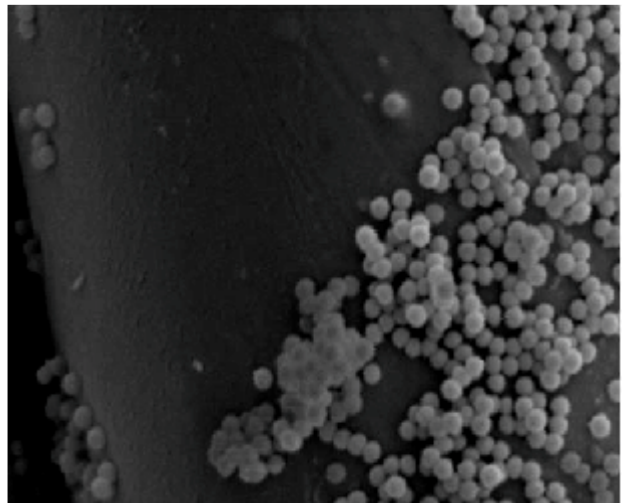


Figura 4: Esferas de sílice sobre fibra textil

Obtención de nanomateriales soportados y su envejecimiento

En esta etapa, el trabajo realizado ha consistido en obtener muestras de materiales modelo (diferentes polímeros termoplásticos como TPU, TPE o PVC y textiles) en los cuales se han incorporado las nanopartículas obtenidas y caracterizadas en la etapa anterior. Es lo que hemos denominado “nanomateriales soportados”.



Figura 5: Probeta de material termofusible con nanopartículas de plata

Las muestras se han obtenido bien en masa, añadiendo la cantidad correspondiente de un nanomaterial dado a la granza del polímero termofusible previamente fundido, o bien sumergiendo los textiles en soluciones de concentraciones establecidas de las nanopartículas. Las muestras obtenidas han sido caracterizadas, para corroborar la presencia de las nanopartículas, así como determinar

parámetros como su distribución o estado de agregación dentro del material.

Con el fin de simular el efecto del uso y de la exposición ambiental, se han sometido probetas de dichos nanomateriales soportados a un envejecimiento acelerado en laboratorio, que ha consistido en la exposición a luz ultravioleta o bien a una atmósfera enriquecida en ozono mediante un equipo de ozonización. Al igual que en la etapa anterior, se ha procedido a la caracterización de las probetas, con el fin de comprobar la calidad del material obtenido así como poder determinar el posible efecto ejercido por las condiciones de envejecimiento.

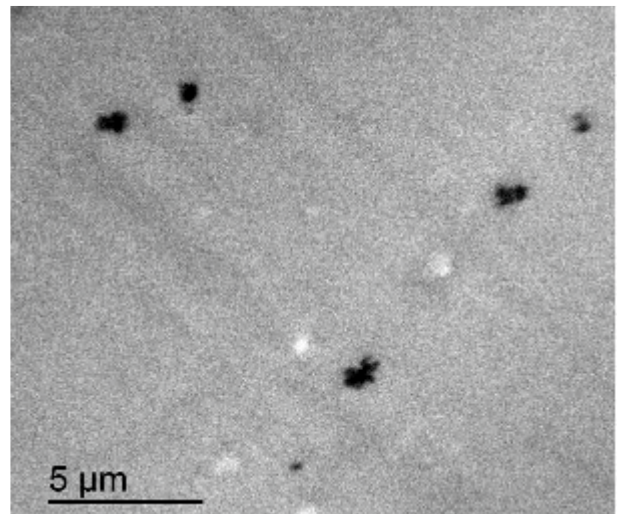


Figura 6: Imagen de microscopía TEM de poliuretano con nanopartículas de zinc

Evaluación del efecto citotóxico de los nanomateriales y de los nanomateriales soportados

En esta etapa, se han llevado a cabo la evaluación del posible efecto celular tanto de las nanopartículas como los de los nanomateriales soportados. Para ello, hemos empleado las metodologías de evaluación in vitro puestas a punto durante la primera anualidad del proyecto. Se emplean cultivos de células humanas de epidermis (una línea celular de queratinocitos) y de dermis (fibroblastos). De este modo, los estudios realizados in vitro pretenden reflejar una de las vías fundamentales de exposición a nanomateriales, que es la vía dérmica.



Figura 7: Evaluación de cultivo celular con SEM

Se han realizado exposiciones de los cultivos a concentraciones reducidas de nanomateriales, durante periodos de tiempo crónicos, reproduciendo de forma simplificada en el laboratorio lo que ocurriría en situaciones cotidianas, es decir, el uso prolongado de artículos con nanopartículas. Se ha evaluado la supervivencia celular, así como aspectos relacio-

ados con la actividad metabólica, morfología celular (estado del citoesqueleto y membrana celular) o potencial de membrana mitocondrial. Se ha observado que, en el caso de las nanopartículas de plata, se producen efectos a largo plazo, incluso a concentraciones relativamente bajas. En el caso de otro tipo de nanopartículas, como las de zinc o titanio, el cultivo a largo plazo no permite observar efectos celulares destacables. Concretamente para las formulaciones de nanopartículas de titanio ensayadas, ninguna de las concentraciones y tiempos testados ha permitido observar modificaciones en el estado de las células, a pesar de producirse acúmulos de nanopartículas sobre la superficie de las mismas.

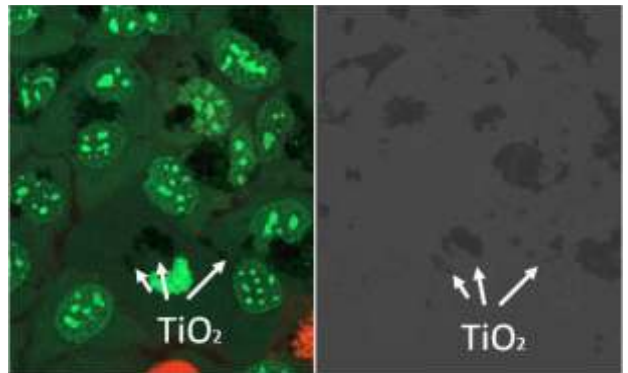


Figura 8: Microscopía confocal de células expuestas a nanopartículas de titanio

A continuación, se ha procedido a la evaluación in vitro del efecto de los nanomateriales soportados. Previamente, se ha comprobado que los materiales de soporte no tuvieron per se un efecto dañino sobre los cultivos celulares.

Para la evaluación se obtienen probetas de las diferentes muestras, que se esterilizan y se ponen en contacto directo con los cultivos celulares, o bien se obtienen extractos de los materiales en medio de cultivo celular, que se añade a las células (contacto indirecto).

Como los ensayos están encaminados a obtener información sobre el efecto in vitro tras una exposición prolongada, se efectúa una exposición a dosis medias-bajas durante periodos de hasta 21 días (mientras que en los estudios de efecto agudo el tiempo habitual son 24h). Adicionalmente, se ha evaluado el efecto de diferentes tipos de nanopartículas sobre el desarrollo de raicillas de *Allium cepa*, empleada como modelo vegetal de toxicidad. De esta forma, se intenta determinar no sólo el efecto sobre células humanas, sino también sobre organis-

mos complejos que pueden formar parte de los ecosistemas a donde pueden acabar los materiales tras su vida útil.

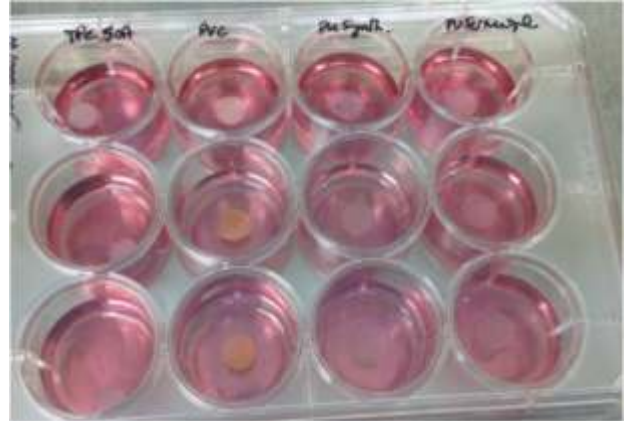


Figura 9: Placa multipocillo con polímeros para evaluar su toxicidad

Efecto TiO₂NPs

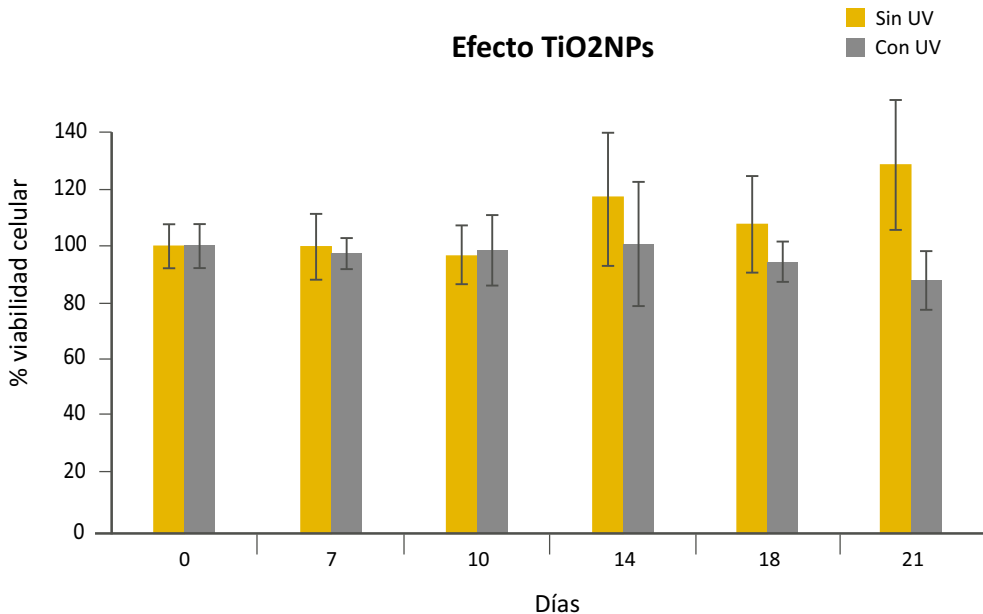


Figura 10: Ensayo de supervivencia celular en queratinocitos expuestos a nanopartículas de titanio

Los resultados obtenidos muestran como, en línea con lo observado para las nanopartículas aisladas, la incorporación de nanomateriales en bienes de uso debe realizarse con mucha precaución, puesto que en determinadas condiciones pueden producirse efectos de toxicidad celular. Esto es especialmente relevante en el caso de nanopartículas muy reactivas, como ocurre con las de plata. Los procedimientos de incorporación en los diferentes materiales deben tener en cuenta el efecto sobre los mismos que ejercerá el uso, así como el envejecimiento debido a la exposición ambiental, además del destino final que tendrán los mismos una vez finalizado su ciclo de vida. Incluso en el caso de nanopartículas menos preocupantes a priori, como es el caso de las de zinc y titanio, la ausencia de efectos relevantes debe tomarse con precaución, pues hay que tener en cuenta factores como la

interacción con otros compuestos químicos o efectos acumulativos que actúen incrementando paulatinamente la concentración de exposición.

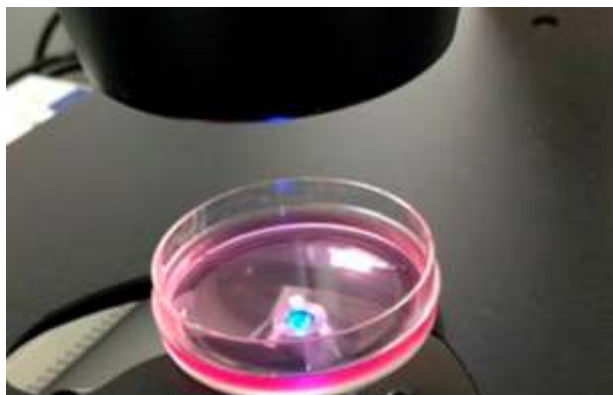


Figura 11: Evaluación de muestras mediante microscopía de fluorescencia

DATOS DEL PROYECTO

TÍTULO: ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN CELULAR CRÓNICA A NANOMATERIALES

ACRÓNIMO: CRONOTOX II

PROGRAMA: PROYECTOS DE I+D EN COOPERACIÓN CON EMPRESAS 2017

PERIODO EJECUCIÓN: ENERO 2017 - DICIEMBRE 2017

FINANCIACIÓN:

Convocatoria de ayudas del Instituto Valenciano de Competitividad Empresarial (IVACE) dirigida a centros tecnológicos de la Comunitat Valenciana para proyectos de I+D de carácter no económico realizados en cooperación con empresas para el ejercicio 2017. Proyecto apoyado por el IVACE (Generalitat Valenciana) y cofinanciado en un 50% por la Unión Europea a través del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), dentro del Programa Operativo FEDER de la Comunitat Valenciana 2014-2020, con número de expediente IMDEEA/2017/5.

Desarrolla:



Financia:



Una manera de hacer Europa