

**AYUDAS DIRIGIDAS A CENTROS TECNOLÓGICOS CV PARA PROYECTOS DE I+D EN
COOPERACIÓN CON EMPRESAS**

Convocatoria 2023



Evaluación de la toxicidad de los microplásticos mediante bioensayos

Entregable 2

Informe del estado del arte

Perteneciente al PT2

Proyecto cofinanciado por:



Cofinanciado por
la Unión Europea

Información del documento

Título: **E2. Informe del estado del arte**

Cod. documento: Entregable E2

Proyecto: BIOMICRO

Fecha: 10/2023



AIMPLAS
INSTITUTO TECNOLÓGICO
DEL PLÁSTICO

AIMPLAS – Asociación de Materiales Plásticos y
Conexas
Calle Gustave Eiffel 4, Paterna 46980 – Valencia /
España
<https://www.aimplas.es/>

Persona de contacto: **Juan Francisco Ferrer Crespo. Líder del grupo de
Microplásticos**
TLF: +34 663461966; Email: jfferrer@aimplas.es

Agradecimientos: Las actividades descritas en este documento se encuadran en el proyecto BIOMICRO, que está cofinanciado por el Instituto Valenciano de Competitividad Empresarial (IVACE) y cofinanciado por la Unión Europea, dentro del programa AYUDAS DIRIGIDAS A CENTROS TECNOLÓGICOS CV PARA PROYECTOS DE I+D EN COOPERACIÓN CON EMPRESAS, con cargo al presupuesto del ejercicio 2023, con nº expediente IMDEEA/2022/66.

Confidencialidad

Público	Distribución libre del documento
Restringido	Distribución al personal afectado al proyecto
Confidencial	Distribución exclusiva a los destinatarios identificados
Uso interno	Documento de trabajo, distribución interna, autores y revisores del documento

Tabla de Contenidos

1	Introducción	4
2	Tareas realizadas	6
2.1	<i>Tarea 2.1. Revisión de la normativa y legislación vigente de los nano y microplásticos</i>	<i>6</i>
2.2	<i>Tarea 2.2. Revisión de la metodología para la obtención de formulaciones de referencia</i>	<i>9</i>
2.3	<i>Tarea 2.3. Estudios realizados para evaluar el efecto de los nano y microplásticos en la salud humana mediante bioensayos in vitro.....</i>	<i>10</i>
3	Conclusiones.....	23

1 Introducción

Los plásticos son materiales que han aportado beneficios a la sociedad y que se utilizan en muchos sectores debido a su durabilidad, fuerza, versatilidad y su precio económico. Sin embargo, en los últimos años la producción mundial de plásticos ha crecido y se estima que aproximadamente un 5 % de la producción termina en el medio ambiente convirtiéndose en micro y nanoplásticos (MNPs).

Los microplásticos son aquellos fragmentos plásticos con unas dimensiones entre 1 μm y 1000 μm y se caracterizan por poseer una baja degradabilidad y una superficie con carácter hidrofóbico. Además, pueden formarse fragmentos más pequeños llamados nanoplásticos, estos tienen un tamaño inferior a 1 μm .

Según su fuente de origen los MNPs, pueden ser primarios o secundarios. Los MNPs primarios son partículas de plástico fabricadas de forma intencionada y utilizadas habitualmente en medicamentos, pinturas, productos de limpieza e higiene, etc. También se pueden originar como subproductos durante la fabricación de materiales plásticos y durante el lavado de productos textiles. Los MNPs secundarios son aquellos que se originan debido a la fragmentación de macroplásticos mediante procesos físicos, químicos y biológicos, generando partículas más pequeñas.

En los últimos años, numerosos estudios han alertado de la presencia de estas partículas en el medio ambiente e incluso en los organismos vivos. Actualmente, se está comenzando a estudiar el efecto de los MNPs en los seres vivos. Además de estas partículas, se suman los aditivos y los contaminantes adsorbidos por estos. Se ha demostrado que las especies marinas contienen microplásticos y, por tanto, son transferidos a otros seres vivos por la cadena alimentaria. Los MNPs pueden cruzar las barreras y las membranas celulares de los organismos y causar diversos efectos moleculares.

Una gran herramienta para estudiar la toxicidad de los MNPs son los bioensayos basados en cultivos celulares. Así pues, se puede evaluar el peligro de estas partículas ya que permite obtener resultados comparables a los ensayos in vivo, lo que les convierte en unos ensayos de gran interés para la evaluación de los MNPs en el medio ambiente y que, posteriormente, se introducen en la cadena trófica y, por tanto, en el ser humano.

Aunque se han encontrado estas partículas en el medio ambiente y en los seres vivos, todavía no existe una legislación que regule el uso de MNPs ni una metodología de análisis estandarizada para estudiar la presencia de estos. Además, otro paso limitante es la ausencia de materiales plásticos que sirvan de referencia. Para poder continuar en esta línea de investigación es importante disponer de materiales que conserven la naturaleza química del material, el tamaño de partícula adecuado y que sean trazables biológicamente.

Por tanto, debido a la presencia de estos contaminantes en el medio ambiente y su posible efecto perjudicial sobre los organismos vivos, el objetivo principal de BIOMICRO es doble: por un parte, desarrollar MNPs que sirvan de material de referencia para futuras investigaciones y,

por otra parte, desarrollar una batería de bioensayos in vitro que permitan evaluar la toxicidad de los mismos.

Para darle soporte al objetivo principal, se persiguen los siguientes objetivos específicos:

- Revisión de la situación actual en cuanto a normativa de microplásticos, metodología para la obtención de formulaciones de referencia y bioensayos.
- Elaboración de materiales de referencia de MNPs y caracterización de su morfología, tamaño de partícula, estabilidad, etc.
- Desarrollar metodologías para fabricar patrones de MNPs que sirvan a las empresas de la Comunitat Valenciana para poner a punto técnicas de análisis y continuar en esta línea de investigación.
- Preparar patrones marcados con fluorescencia para poder monitorizarlos en futuros estudios un vitro e in vivo.
- Avanzar en el desarrollo de una metodología novedosa de la evaluación de riesgos basada en análisis de actividad biológica que permita determinar el nivel de preocupación ante los MNPs.
- Evaluar la citotoxicidad, genotoxicidad y estrés oxidativo de los MNPs mediante bioensayos basados en cultivos celulares.
- Impulsar esta línea de I+D centrada en los MNPs y su evaluación toxicológica.
- Ampliar el conocimiento relativo al desarrollo de formulaciones de referencia y a los bioensayos in vitro y aumentar los conocimientos sobre la peligrosidad de estas sustancias en los seres humanos.
- Transferir a las empresas participantes en el proyecto la información obtenida.
- Difundir y transferir los conocimientos adquiridos a través de jornadas, seminarios, etc.
- Los resultados del proyecto conllevan un potencial aumento directo en la seguridad del consumidor y del medioambiente, asimismo, se proporcionará a las empresas posicionamiento con respecto a la competencia frente a futuras regulaciones.
- Ayudar a las empresas de la Comunitat Valenciana a anticiparse a la previsible regulación de estos contaminantes y definir acciones preventivas.
- Promover la acción innovadora empresarial y, del mismo modo, AIMPLAS ampliará el conocimiento científico-técnico para futuras aplicaciones.
- Proveer a las empresas de la Comunitat Valenciana de importantes desarrollos y conclusiones que contribuyan a obtener ventajas competitivas en el mercado y una gran innovación en diversos sectores.

Así pues, BIOMICRO pretende generar y transferir a las empresas de la Comunitat Valenciana tecnologías y conocimientos derivados de la realización de este proyecto de I+D. Se realizará una evaluación toxicológica con la finalidad de informar a la sociedad sobre los efectos de los MNPs. Por otro lado, gracias a la elaboración de patrones, se ayudará a las empresas a poner a punto metodologías que ayuden a identificar y cuantificar MNPs con tal de mejorar sus procesos de producción y evitar la generación de estas partículas. Por tanto, las empresas podrán asegurar en sus procesos la seguridad del consumidor y preservar el medio ambiente.

Las conclusiones que se obtengan de BIOMICRO servirán para conocer y evaluar el efecto de los microplásticos en la salud humana, así como disponer de materiales de referencia para continuar investigando en esta línea.

2 Tareas realizadas

Este entregable tiene como objetivo buscar y recopilar toda la bibliografía existente acerca de la normativa actualizada, la preparación de patrones y de los estudios realizados para evaluar la toxicidad de los microplásticos mediante bioensayos.

2.1 Tarea 2.1. Revisión de la normativa y legislación vigente de los nano y microplásticos

En la actualidad existen borradores para la normalización de los métodos analíticos para la detección y cuantificación de los MNPs y proyectos de legislación en proceso por parte de las autoridades para controlar el uso y la concentración de estos. Para anticiparse a la futura y previsible legislación, es necesario mantener actualizada la información y monitorizar el avance de las publicaciones.

Como numerosos estudios han alertado de la presencia de estas partículas en el medio ambiente y en los seres vivos, las organizaciones gubernamentales han tomado consciencia. Por tanto, en enero de 2018, la European Chemical Agency (ECHA) manifestó su intención de preparar un dossier sobre restricción de uso de microplásticos.

En febrero de 2019, el Parlamento Europeo emitió una propuesta de resolución (TA72019/0071)¹ que destaca la necesidad de abordar dicha contaminación en el contexto de tratamiento de aguas residuales.

En mayo de 2020 se publicó la norma UNE-CEN ISO/TR 21960² en la que se recoge una visión general sobre los conocimientos y actividades relacionadas con MNPs a nivel mundial. En esta norma, se definen los MPs como partículas menores de 5 mm y NPs como partículas con tamaño por debajo de 1 µm.

En otro documento de la ECHA (ECHA/NR/20/19) publicado en junio del 2020, el RAC (*Committee for Risk Assessment*) respalda la restricción del uso intencionado de microplásticos definiéndolos como plásticos en concentraciones de más del 0.01 % en peso o plásticos de tamaño inferior a 5 mm que derivan, en parte, de la fragmentación de macropelásticos y que por

¹ P8_TA-PROV(2019)0071 Requisitos mínimos para la reutilización del agua ***I Resolución legislativa del Parlamento Europeo, de 12 de febrero de 2019, sobre la propuesta de Reglamento del Parlamento Europeo y del Consejo relativo a los requisitos mínimos para la reutilización del agua (COM(2018)0337 – C8-0220/2018 – 2018/0169(COD)).

² Plásticos en el medio ambiente. Estado actual de los conocimientos y las metodologías (ISO/TR 21960:2020) (Ratificada por la Asociación Española de Normalización en mayo de 2020).

su difícil degradación permanecen en el medio ambiente durante décadas. Además, en este documento, el comité recomienda lo siguiente:

- Excluir los polímeros biodegradables de la restricción.
- Restringir el uso de microplásticos como material de relleno en campos de fútbol artificial.
- Limitar el tamaño de partícula de los microplásticos a 100 μm ya que los métodos analíticos para detectar estas partículas aún están en desarrollo.

El nuevo Plan de Economía Circular, Resolución del Parlamento Europeo, del 10 de febrero de 2021, sobre el nuevo Plan de Acción para la Economía Circular (2020/2077(INI))³ insta a la Comisión a que:

- Opte por una eliminación gradual general de los microplásticos añadidos de manera intencionada.
- Reduzca, mediante nuevas medidas reglamentarias y obligatorias, la liberación no intencionada de todos los microplásticos en origen, también, los procedentes de neumáticos, textiles y césped artificial y de la fabricación de granulados de plástico.
- Impulse la investigación para colmar las lagunas existentes en los conocimientos científicos sobre los microplásticos y los nanoplásticos y fomentar el desarrollo de alternativas más seguras y mercados competitivos con productos sin microplásticos.
- Adopte medidas a corto plazo de ecodiseño para evitar la contaminación por microplásticos.
- Se analice las fuentes, la distribución, el destino y los efectos de los microplásticos en el contexto del tratamiento de aguas residuales y de la gestión de aguas pluviales.

En septiembre de 2022 se publicó el Proyecto de enmienda del Anexo XVII de Reglamento REACH⁴ para la restricción del uso de microplásticos añadidos intencionadamente. La Comisión considera que las micropartículas de polímeros sintéticos inferiores a 0.1 μm plantean un riesgo equivalente o mayor para el medio ambiente que las partículas comprendidas entre 0.1 μm y 5 mm. No obstante, la Comisión está de acuerdo en que la identificación y cuantificación de partículas inferiores a 0.1 μm plantea actualmente dificultades analíticas debido a que las partículas son demasiado pequeñas. Así pues, recomienda que el límite inferior del tamaño de dichas partículas a efectos de la aplicación de la restricción debería fijarse, por tanto, en 0.1 μm .

En abril de 2023, los países de la Unión Europea en el Comité REACH votan a favor de restringir los microplásticos intencionados.

³ P9_TA(2021)0040 Nuevo Plan de acción para la economía circular. Resolución del Parlamento Europeo, de 10 de febrero de 2021, sobre el nuevo Plan de acción para la economía circular (2020/2077(INI)) (2021/C 465/03).

⁴ Document 32006R1907. COMMISSION REGULATION (EU) .../... of XXX amending Annex XVII to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) as regards synthetic polymer microparticles.

En cuanto a la situación actual de los microplásticos en España, el 8 de abril de 2022, se aprueba la Ley 7/2022⁵ de residuos y suelos contaminados para una economía circular que introduce en su Artículo 56 la prohibición de las microesferas de plástico de menos de 5 mm añadidas intencionadamente. El Real Decreto 3/2023⁶ aprobado el 10 de enero de 2023, establece los criterios técnico-sanitarios de la calidad del agua de consumo, su control y suministro. Este Real Decreto se elabora una lista de sustancias y compuestos que suscitan preocupación en relación con las aguas de consumo humano, los microplásticos se incluyen en esta lista a la espera de que la Comisión Europea adopte una metodología normalizada para medir estas partículas en aguas de consumo.

En septiembre de 2023, la Comisión Europea realizó una modificación del anexo XVII de la Regulación (CE) nº 1907/2006⁷ en relación con los microplásticos añadidos intencionadamente, aportando una definición legal de microplásticos, definiéndolos como:

Micropartículas de polímeros sintéticos: polímeros sólidos que cumplen las dos condiciones siguientes:

- a) Están contenidas en partículas y constituyen al menos el 1 % en peso de dichas partículas; o forman un recubrimiento superficial continuo sobre partículas;
- b) Al menos el 1 % en peso de las partículas mencionadas en la letra a) cumplen alguna de las condiciones siguientes:
 - I. todas las dimensiones de las partículas son iguales o inferiores a 5 mm;
 - II. la longitud de las partículas es igual o inferior a 15 mm y su relación longitud/diámetro es superior a 3.

Esta definición de microplásticos excluye a los polímeros que no hayan sido modificados químicamente, a los degradables, a los que no contienen átomos de carbono en su estructura química y a los que poseen una solubilidad superior a 2 g/L.

Esta modificación prohíbe la comercialización de micropartículas de polímeros sintéticos como sustancias independientes o cuando estén mezcladas en una concentración igual o superior al 0.01 % en peso, así como otras medidas específicas que afectan a la industria de la producción del plástico, la industria cosmética, la agricultura, etc.

⁵ BOE-A-2022-5809

⁶ BOE-A-2023-628

⁷ Reglamento (UE) 2023/2055 de la Comisión de 25 de septiembre de 2023 que modifica, por lo que respecta a las micropartículas de polímeros sintéticos, el anexo XVII del Reglamento (CE) nº 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo al registro, la evaluación de la autorización de la restricción de las sustancias y mezclas químicas (REACH).

2.2 Tarea 2.2. Revisión de la metodología para la obtención de formulaciones de referencia

Un paso limitante en la investigación de MNPs es la ausencia de materiales plásticos que sirvan de referencia. Por tanto, uno de los retos de este proyecto consiste en la obtención de formulaciones para poder realizar los ensayos y poder estudiar los efectos químicos, físicos y biológicos que pueden producir. Además, estos patrones contribuirán en la investigación de los MNPs y ayudarán a las empresas de la Comunitat Valenciana a calibrar instrumentos de medición, validar métodos de ensayo y comparar los resultados entre diferentes laboratorios.

En la bibliografía se recogen diversos métodos de preparación de nano y micropartículas, los más comúnmente utilizados son:

- **Evaporación del disolvente:** se forma una emulsión de un disolvente orgánico y un polímero en fase acuosa. A continuación, se evapora el disolvente y esto produce una precipitación del polímero en forma de nanopartículas que se recogen mediante centrifugación⁸. La fase acuosa en la que se encuentra el polímero contiene un surfactante biocompatible.
- **Emulsión por difusión del disolvente:** se forma una emulsión con una mezcla de una fase orgánica (polímero y un disolvente parcialmente miscible en agua) y una fase acuosa (agua y surfactante). Una vez obtenida esta emulsión, el siguiente paso consiste en la difusión del disolvente desde la fase interna añadiendo agua poco a poco. Debido a este cambio en la composición, el polímero se agrega y se forman las nanopartículas⁹.
- **Emulsión por adición de sal inversa:** este método es una modificación del anterior ya que la separación del disolvente se realiza mediante la adición de sal. La fase acuosa contiene un agente salificado con la finalidad de disminuir la solubilidad, este agente contiene electrolitos como $MgCl_2$ o $CaCl_2$. Finalmente, se agrega agua poco a poco y se forman las nanopartículas¹⁰.
- **Nanoprecipitación:** en este caso, la fase orgánica (polímero y disolvente parcialmente miscible en agua) se vierte sobre la disolución acuosa (agua y surfactante) gota a gota. Debido a la rápida difusión de la fase orgánica, las nanopartículas se forman espontáneamente para evitar las moléculas de agua. Una vez el disolvente difunde, el polímero precipita¹¹.

Debido a los diferentes modos de preparación de nano y micropartículas, estas pueden diferir en su composición, concentración y/o propiedades como el tamaño, la forma, las propiedades superficiales, la cristalinidad o la dispersión. Así pues, es importante caracterizar las partículas

⁸ Plard, J.-P.; Bazile, D. Comparison of the safety profiles of PLA50 and Me.PEG-PLA50 nanoparticles after single dose intravenous administration to rat. *Colloids Surf. B* **1999**, *16* (1-4), 173–183.

⁹ Moinard-Chécot, D.; Chevalier, Y.; Briançon, S.; Beney, L.; Fessi, H. Mechanism of nanocapsules formation by the emulsion–diffusion process. *J. Colloid Interface Sci.* **2008**, *317* (2), 458–468.

¹⁰ Ibrahim, H.; Bindschaedler, C.; Doelker, E.; Buri, P.; Gurny, R. Aqueous nanodispersions prepared by a salting-out process. *Int. J. Pharm.* **1992**, *87* (1-3), 239–246.

¹¹ Thioune, O.; Fessi, H.; Devissaguet, J. P.; Puisieux, F. Preparation of pseudolatex by nanoprecipitation: Influence of the solvent nature on intrinsic viscosity and interaction constant. *Int. J. Pharm.* **1997**, *146* (2), 233–238.

obtenidas con tal de conocer las propiedades de las partículas con las que se va a trabajar para poder evaluar correctamente los riesgos toxicológicos.

2.3 Tarea 2.3. Estudios realizados para evaluar el efecto de los nano y microplásticos en la salud humana mediante bioensayos in vitro

Las partículas que derivan de los plásticos y se fragmentan hasta dimensiones de micro y nanoplásticos, pasan a formar parte de la cadena trófica. Una vez ahí, pueden atravesar las barreras de diferentes organismos, así como las membranas celulares, y causar diferentes efectos moleculares. En 2016, Las Autoridades de Seguridad Alimentaria publicaban una guía donde se tiene en cuenta la presencia de estas partículas en la cadena trófica y su exposición en el ser humano (EFSA, 2016)¹². Sin embargo, el desconocimiento sobre la toxicidad y efectos adversos de los microplásticos y su cinética de absorción, dificultan la comprensión y evaluación de riesgos de los mismos.¹³

Las micropartículas plásticas pueden degradarse y fragmentarse en nanoplásticos (NPs)¹⁴. Debido a la preocupación incipiente de estas nanopartículas, en 2021 se publicó la Guía de Evaluación de Riesgos de nanomateriales en la cadena alimenticia (EFSA, 2021) con el objetivo de ampliar los estudios en nanomateriales (NM). El interés por esta Guía reside en la recopilación de estudios significativos que proporcionan información sobre las propiedades físico-químicas, la evaluación de la exposición y los peligros relacionados con la caracterización de estos nanomateriales. De hecho, en esta misma guía se describen los estudios *in vitro* e *in vivo* apropiados para identificar la dosis respuesta de los nanomateriales en los organismos e identificar los posibles riesgos.

Cabe destacar que los nanoplásticos son considerados contaminantes emergentes y presentan mayores riesgos que los microplásticos. Debido a su tamaño, superficie y permeabilidad biológica, pueden ser absorbidos por el organismo y causar daños severos en los sistemas fisiológicos¹⁵. Se han realizado diversos estudios de efectos de los nanoplásticos en células inmunitarias para evaluar la acumulación de los mismos, la viabilidad celular, los niveles de ROS intracelular, estudios sobre el potencial de membrana mitocondrial, apoptosis, expresión génica y daño al ADN¹⁶. De la misma forma, se han reportado investigaciones que muestran cómo los

¹² EFSA, 2016. Presence of microplastics and nanoplastics in food, with particular focus on seafood. EFSA J. 14 (6). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4501>.

¹³ Uptake and cellular effects of PE, PP, PET and PVC microplastic particles. Valerie Stock, Cecilia Laurisch, Josephin Franke, Merve Hilal Donmez, Linn Voss, Linda Bohmert, Albert Braeuning, Holger Sieg.

¹⁴ The gut microbiota, a key to understanding the health implications of micro(nano)plastics and their biodegradation. Microbial Biotechnology. 2022. Cristina Jiménez-Arroyo, Alba Tamargo, Natalia Molinero, M. Victoria Moreno-Arribas.

¹⁵ Cellular absorption of polystyrene nanoplastics with different surface functionalization and the toxicity to RAW264.7 macrophage cells Jiao Chen, Zijun Xu, Yuying Liu, AoXue Mei, Xiyuan Wang, Qingdong Shi.

¹⁶ Micro- and nanoplastic induced cellular toxicity in mammals: A review. Amrita Banerjee, Weilin L Shelver.

nanoplásticos se acumulan en diferentes órganos de roedores, como riñones, hígado o testículos.

El principal límite que se encuentra con las partículas de plástico es que, en muchas ocasiones, se ha estudiado exclusivamente la toxicidad y absorción de partículas de polietileno (PE) esféricas, sin tener en cuenta otras superficies, morfologías y/o materiales. No obstante, algunos estudios han reportado la evaluación de absorción intestinal y citotoxicidad en partículas microplásticas derivadas de polipropileno (PP), polietileno (PE), policloruro de vinilo (PVC), tereftalato de polietileno (PET) en suspensión y sedimentadas empleando las líneas celulares Caco-2 (adenocarcinoma colorrectal humano) y HepG2 (carcinoma hepatocelular), confirmando la ausencia de efectos citotóxicos relacionados con la forma y el material de las micropartículas. Además, en estos mismos estudios se observó la existencia de una absorción dependiente de tamaño de las partículas de PE, lo que reforzaría la necesidad de estudiar materiales de dimensiones micro y nanométricas¹⁷.

Antes de entrar en contacto con las células, un compuesto (o contaminante) viaja por el tracto gastrointestinal. Para poder determinar de manera eficaz la toxicidad del compuesto a estudiar, es imprescindible tener en cuenta la influencia del ambiente gastrointestinal al que se somete una vez ingresa en el organismo, como pueden ser el pH, iones, compuestos orgánicos y enzimas. Hasta la fecha, se han empleado diversos modelos *in vitro* que simulan el proceso digestivo y que determinan la consiguiente biodisponibilidad y toxicidad del compuesto. No obstante, para el caso de las micropartículas de plástico, todavía se desconoce la influencia del proceso digestivo en su biodegradación y/o biodisponibilidad¹⁸. Por todo ello, se debe considerar también la velocidad de disolución/degradación de un nanomaterial: una alta velocidad de degradación convierte el nanomaterial a su correspondiente forma no-nanomaterial. En este sentido, la misma guía (EFSA, 2021) considera que las características nano específicas son sólo aplicables a los materiales que no se degradan o disuelven rápidamente bajo las condiciones fisiológicas del tracto gastrointestinal. A continuación, se reporta el flujo de trabajo que se debe seguir en nanomateriales (Ilustración 1)¹¹.

¹⁷ Uptake and cellular effects of PE, PP, PET and PVC microplastic particles. Valerie Stock, Cecilia Laurisch, Josephin Franke, Merve Hilal Donmez, Linn Voss, Linda Bohmert, Albert Braeuning, Holger Sieg.

¹⁸ Su Liu, Xiaomei Wu, Weiqing Gu, Jing Yu, Bing Wu. Chemosphere, 2020. Influence of the digestive process on intestinal toxicity of polystyrene microplastics as determined by in vitro Caco-2 models.

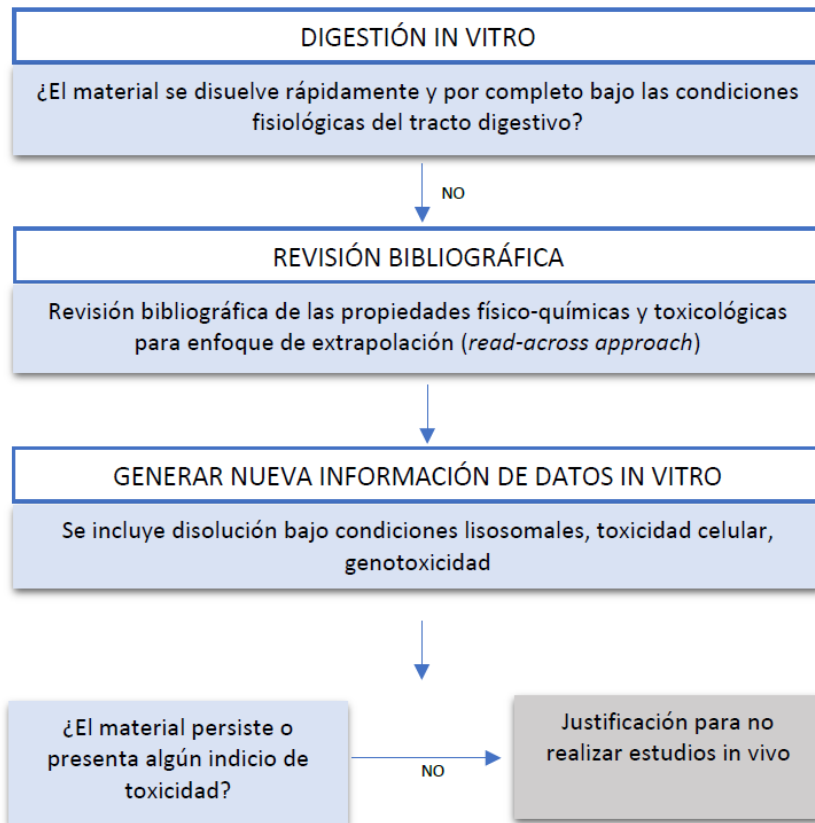


Ilustración 1. Descripción general del flujo de trabajo en NM¹¹

En primer lugar, es necesario estudiar la velocidad de degradación del nanomaterial a una forma no-nanomaterial bajo condiciones representativas del tracto gastrointestinal. De esa forma, se espera que los compuestos que se disuelven rápidamente no presenten comportamientos característicos de los nanomateriales y, por consiguiente, se podría concluir que las sustancias con propiedades químicas similares puedan tener efectos similares. Si por el contrario el nanomaterial no se degrada rápidamente bajo las condiciones gastrointestinales *in vitro*, se debe proceder por un lado a una revisión bibliográfica de las propiedades físico-químicas y toxicológicas de nanomateriales lo más similares posibles (enfoque de extrapolación, *read-across approach*), así como a la generación de nueva información de las propiedades toxicológicas del nanomaterial mediante la realización de ensayos *in vitro*.

Un concepto a tener en cuenta es la biodisponibilidad, que se define como la porción de especies moleculares (fármacos o contaminantes) que se liberan tras la digestión para acabar finalmente en la circulación sistémica. Para poder evaluar la toxicidad *in vitro* de las nano y micropartículas, es conveniente simular la digestión gastrointestinal *in vitro*. Actualmente, existen algunos modelos de digestión que utilizan matrices artificiales como fluidos gastrointestinales o diferentes pH para estudiar el proceso de las NP/MP ingeridas. De esta forma, se puede proporcionar información sobre los procesos de transformación que sufren las nano y

micropartículas en cuanto a su tamaño o estabilidad coloidal tras el contacto con los fluidos gastrointestinales¹⁹.

Entre los modelos *in vitro* que simulan el tracto digestivo, existen diferentes simulaciones fisiológicas, como la edad o las condiciones de alimentación (entre 30 y 120 minutos de digestión). Existen numerosas investigaciones que proponen diferentes modelos *in vitro* que simulan la digestión, proponiendo simulaciones que varían en pH, tipos de minerales, fuerza iónica, actividad enzimática y composición de jugos gástricos. Algunas publicaciones hasta la fecha han mostrado diferencias en cuanto al proceso digestivo, ya que la agregación/aglomeración de diferentes nanomateriales en saliva, jugo gástrico e intestinal artificiales, varía^{20,21}.

Por todo ello, se carece de un modelo *in vitro* de digestión validado y estandarizado. Además, la selección del modelo se debería a la robustez y reproducibilidad de los resultados. Para aumentar la fiabilidad de los factores que pueden afectar en la digestión del nanomaterial (degradación, disolución, aglomeración, etc) la velocidad de degradación/disolución se debería determinar incluyendo diferentes tiempos (al menos 4 puntos en duplicado: 5 – 15 – 30 – 60 min) en la fase intestinal. Por otro lado, el ensayo se debería realizar con tres concentraciones diferentes, ya que es un factor que podría afectar a la agregación de las partículas, siendo la concentración intermedia aquella de exposición real para el ser humano. La Guía de la EFSA publicada en 2021 propone, además, evaluar analíticamente la distribución, tamaño, concentración o productos de degradación en cada sección del modelo de digestión *in vitro*, empleando técnicas como spICP-MS, microscopía de transmisión electrónica o espectroscopía de rayos X.

Por otro lado, el moco presente en las cavidades del tracto gastrointestinal no inhibe la difusión de partículas con diámetros inferiores a 100nm, mientras que las partículas con diámetros entorno a 500nm parecen presentar una difusión limitada. Esta diferencia en la difusión de partículas en función del diámetro podría deberse al tamaño de los poros presentes en las mucinas (glicoproteínas epiteliales involucradas en la protección de la integridad de la mucosa y preservación de la barrera epitelial). De hecho, la diferencia de diámetros de las partículas se traduce, también en una velocidad de difusión diferente para cada una²².

¹⁹ Dissolution test for risk assessment of nanoparticles: a pilot study. Pasquale Bove, Maria Ada Malvindi, Sachin Sayaji Kote, Rosalia Bertorelli, Maria Summaa and Stefania Sabella

²⁰ Athena M Keene, David Peters, Rodney Rouse, Sharron Stewart, Elliot T Rosen, Katerine M Tyner. Nanomedicine, 2012. Tissue and cellular distribution of gold nanoparticles varies based on aggregation/agglomeration status.

²¹ Ikjot SinghSohal, Young Kwan Cho, Kevin S. O'Fallon, Peter Gaines, Philip Demokitou, Dhimiter Bello. ACS Nano, 2018. Dissolution Behavior and Biodurability of Ingested Engineered Nanomaterials in the gastrointestinal Environment.

²² Balázs H. Bajka, Neil M. Rigby, Kathryn L. Cross, Adam Macierzanka, Alan R. Macierzanka, Alan R. Mackie. Colloids and surfaces B: Biointerfaces. 2015. The influence of small intestinal mucus structure on particle transport *ex vivo*

A pesar de las limitaciones citadas anteriormente, se ha construido un procedimiento de trabajo para la digestión de nanomateriales. Además, el desarrollo de un método *in vitro* supone emplear un procedimiento más económico y, sobre todo, más ético²³.

Entre los modelos *in vitro* de digestión gastrointestinal que permiten evaluar el procesamiento de micro y nanopartículas, algunas investigaciones realizadas hasta la fecha han empleado el modelo propuesto por el Instituto de Tecnología e Investigación en Nanoregulación (Ilustración 2)²⁴, como en el caso de Liu et al., para el estudio de micropartículas de PS de 100 y 5nm. Otros trabajos reportados también emplean el mismo modelo de digestión gastrointestinal *in vitro* para partículas de óxido de grafeno²⁵.

²³ NANoREG D5.03 DR In vitro screening methodology for absorption or crossing of other barriers. 2017. National Institute for Public Health and the Environment.

²⁴ Dissolution test for risk assessment of nanoparticles: a pilot study. Pasquale Bove, Maria Ada Malvindi, Sachin Sayaji Kote, Rosalia Bertorelli, Maria Summaa and Stefania Sabella.

²⁵ Biotransformation and biological interaction of Graphene and Graphene oxide during simulated oral ingestion. Nano-Micro Small Journal. 2018. Daniela Guarnieri, Paola Sánchez-Moreno, Antonio Esaú Del Rio Castillo, Francesco Bonaccorso, Francesca Gatto, Giuseppe Bardi, Cristina Martín, Ester Vázquez, Tiziano Catelani, Stefania Sabella, Pier Paolo Pompa.

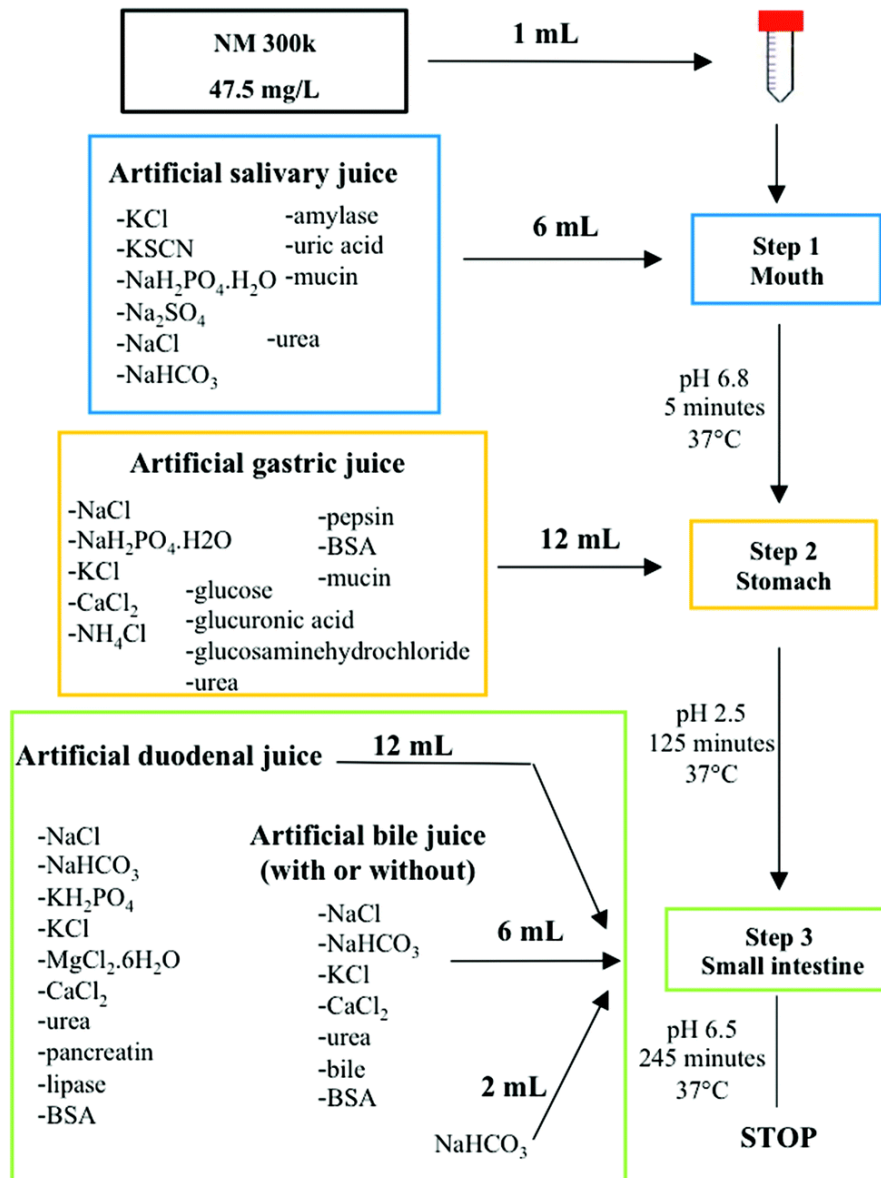


Ilustración 2. Modelo de digestión gastrointestinal in vitro²⁴.

Todas las investigaciones realizadas han permitido diseñar un procedimiento que pueda superar las limitaciones en cuanto a procesamiento de partículas en un modelo de digestión in vitro. Dicho procedimiento, NANoREG D5.03 es un protocolo propuesto por miembros del Instituto Nacional de Salud Pública y Medioambiental que surge de la necesidad de comprender y evaluar la distribución de nanomateriales y poder predecir los riesgos de exposición de los mismos. La absorción de los nanomateriales a través de las diferentes barreras biológicas es clave para determinar la exposición interna y la concentración a la que podría llegar al órgano objetivo.

Para evaluar los riesgos de las micro y nanopartículas de plástico, se emplean modelos *in vitro* basados en cultivos celulares debido a su bajo coste y practicidad. Además, los bioensayos *in vitro* han permitido obtener resultados comparables a los ensayos *in vivo*, lo que les convierte en una gran alternativa para la evaluación de toxicidad y en una batería de ensayos de carácter

ético, haciendo posible las 3R (por sus siglas en inglés: *Replace, Reduce and Refine*), cuyo objetivo es el de reducir el uso de ensayos en animales²⁶.

Es importante tener en cuenta que los micro- y nanoplasticos a evaluar deben estar contenidos en un vehículo compatible con el sistema biológico a emplear. La Guía de la EFSA (2021) establece que se debe determinar la estabilidad y las características físico-químicas del nanomaterial en el vehículo empleado. Se han reportado estudios que han empleado DMSO, buffer salino fosfatado (PBS) o DMEM a una concentración final de 2mg/mL²⁷. Este paso es de vital importancia para la administración de las micro y nanopartículas y debe comprobarse la estabilidad en el vehículo seleccionado, ya que las partículas podrían absorberse o aglomerarse, lo que podría reducir la exposición real y dar lugar a falsos negativos.

Algunos estudios publicados hasta la fecha han reportado la importancia de los sistemas *in vitro* para evaluar la captación de partículas de plástico. El epitelio intestinal es la superficie más amplia y que entra en contacto con una gran variedad de sustancias, incluidos los micro y nanoplasticos²⁸. La línea celular Caco-2 se ha empleado como modelo para el epitelio intestinal humano y resulta ser una de las mejores elecciones para estudiar la fisiología intestinal y para evaluaciones toxicológicas *in vitro*.

La región principal responsable de la absorción de nutrientes es el epitelio intestinal. Antes de llegar a dicha región, las partículas ingeridas oralmente deben atravesar el epitelio estomacal. Para este tipo de células, se han realizado estudios que han demostrado cómo la captación de partículas de PS por parte de células gástricas de adenocarcinoma depende de su tamaño²⁹. Del mismo modo, el tamaño de las partículas también influye en la captación por parte de las células de la barrera intestinal. Se han propuesto diferentes escenarios que definen la captación de las partículas de plástico por parte del intestino:

- (i) Las partículas permanecen en el lumen. En este caso, las partículas también podrían desencadenar un impacto en la salud, perturbando la capa celular, generando irritación local del tejido intestinal o liberando contaminantes tóxicos que contenía absorbidos en su estructura;
- (ii) Las partículas cruzan la barrera intestinal a través de las uniones estrechas (*tight junctions*) presentes entre las células epiteliales del intestino;
- (iii) Las partículas pueden ser captadas por los enterocitos y atravesar la barrera intestinal;

²⁶ Is cell culture a suitable tool for the evaluation of micro- and nanoplastics ecotoxicity? Messika Revel, Coraline Roman, Amélie Châtel.

²⁷An assessment of the toxicity of polypropylene microplastics in human derived cells. Jangsun Hwang, Daheui Choi, Seora Han, Jonghoon Choi, Jinkee Hong.

²⁸ Uptake and effects of orally ingested polystyrene microplastic particles in vitro and in vivo. Stock et al., 2019. Archives of Toxicology 93:1877-1833.

²⁹ Polystyrene nanoparticles internalization in human gastric adenocarcinoma cells, Toxicology in vitro, 2016, 31, 126 – 136.

- (iv) Las partículas pueden ser captadas por otros tipos celulares del epitelio intestinal;
- (v) Se puede esperar también que algunas partículas no atraviesen el torrente sanguíneo y permanezcan dentro de las células intestinales. De esta forma, las partículas se liberarán hacia el lumen gastrointestinal al final del ciclo de vida de la célula intestinal (72h aproximadamente).

Tal y como se ha reportado en algunas publicaciones hasta la fecha, es posible la captación y transporte de partículas de entre 5 y 10 μm por parte de las células epiteliales del intestino. Tal y como se ha mencionado anteriormente, durante el proceso de digestión, las partículas pueden aglomerarse, lo que podría influir en la captación de las partículas por parte de las células. Por todo ello, existen numerosos estudios publicados que emplean sistemas *in vitro* para simular la captación y transporte de partículas de plástico. Concretamente, se han reportado diferentes estudios donde se emplea la línea celular Caco-2 y se evalúa el transporte de partículas de plásticos (PS y PET) a diferentes tamaños, cargas y tiempos de exposición³⁰.

De esta forma, se han realizado estudios para evaluar los efectos toxicológicos de las partículas de plástico en diferentes especies acuáticas, mostrando efectos inflamatorios, genotóxicos y respuestas al estrés oxidativo¹³. En la tabla 1 se reportan los resultados obtenidos tras la evaluación de partículas de diferentes tamaños y cargas en la línea celular Caco-2:

Tabla 1. Revisión de estudios de evaluación de micro y nanopartículas en modelos *in vitro*²⁹

Referencia	Línea celular y partículas empleadas	Resultados
Efectos tóxicos		
Wu et al., 2019	Caco-2 PS: 100 y 500 nm Concentraciones: 1 – 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$	<ul style="list-style-type: none"> - No citotóxico - Estrés oxidativo muestra efectos tóxicos suaves - Perturbación en el potencial de membrana mitocondrial, especialmente las partículas de 500 nm - Inhibición del transportador de membrana ABC por parte de las partículas de 100nm
Sin efectos tóxicos		
Magri et al., 2018	Caco-2 PET: 100 nm Concentraciones: 1 – 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$	<ul style="list-style-type: none"> - Sin citotoxicidad - Captación celular cerca de los lisosomas - Transporte del 3% a través de Caco-2 tras 24h - Sin efectos tóxicos tras 24h
Stock et al., 2019	Caco-2 Caco-2/modelo Raji B (células M) Caco-2/ HT29-MTX PS: 1 μm , carboxilado	<ul style="list-style-type: none"> - toxicidad sólo en concentraciones no fisiológicas con 1 μm de PS (-)

³⁰ Micro- and nanoplastics – current state of knowledge with the focus on oral uptake and toxicity. Paul Maxi B. et al., 2020. *Nanoscale advances*, 2, 4350 – 4367.

	PS: 4 y 10 μm , sulfonada $1 \cdot 10^3$ a $1 \cdot 10^{10}$ μm^2 de superficie de partículas por mL	- captación mínima, siendo la mayor en partículas de 4 μm (máx 3%)
Hesler et al., 2019	Caco-2/ HT29-MTX PS: 50 y 500 nm Carboxilada Concentraciones 0.01 - 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	- sin citotoxicidad - transporte a través de la barrera no significativo - distribución intracelular de las partículas - captación celular: la internalización fue visible por microscopía electrónica
Abdelkhalik et al., 2018	Caco-2 PS: 50 nm y 200 nm Carboxilado o sulfonado 15 – 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$	- Sin citotoxicidad - Transporte mínimo: 2.82% para partículas carboxiladas de 50 nm y 13.9% para partículas de 50nm sulfonadas
Stock et al., 2020	Línea celular con HepG2 PE polidisperso 25 – 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	- Citotoxicidad sólo en situaciones de sobrecarga
Lehner et al., 2020	Caco-2/HET29-MTX con monocitos, macrófagos y células dentríticas PP, PU, PA	- Sin citotoxicidad - No se liberan citoquinas inflamatorias - No hay cambios en la integridad de la barrera

Por todo lo mencionado anteriormente, se propone una batería de ensayos que evalúe los MP y NP, con y sin tratamiento gastrointestinal para determinar la influencia del proceso de digestión, su transporte y difusión celular, y posibles efectos citotóxicos, genotóxicos y en el estrés oxidativo (ilustración 3)

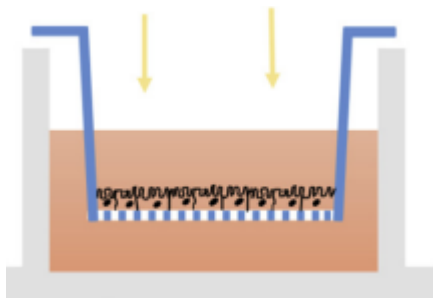


Ilustración 3. Esquema representativo sobre el proceso propuesto para el proyecto

1. Citotoxicidad:

La citotoxicidad es un criterio de valoración toxicológico esencial a la hora de medir alteraciones de la homeostasis celular que pueden provocar la muerte celular por necrosis o apoptosis. El efecto citotóxico puede deberse a la disrupción de los mecanismos celulares basales y la integridad celular como la morfología celular, la viabilidad celular, el crecimiento celular, tasas metabólicas y control de la transcripción de genes basales, etc.

La **citotoxicidad se plantea como un prerequisite previo al estudio de criterios de valoración toxicológicos específicos** (genotoxicidad) sobre sustancias o mezclas, puesto que permiten definir el rango de concentración para pruebas in vitro posteriores, la cual puede oscilar del 50% hasta el 80% según los bioensayos aplicados, evitando la mala interpretación de los datos.

Estableciendo la concentración a la que el 50% (o el 30% con respecto al punto final) de las células se ven afectadas (es decir, IC50 o IC 30), es posible comparar cuantitativamente las respuestas de compuesto en diferentes sistemas o varios compuestos en sistemas³¹. La evaluación de la citotoxicidad se ha utilizado como predictor toxicidad sistémica aguda in vivo³².

Los criterios de valoración de la citotoxicidad deben ser sensibles, factibles, consistentes y obtener un poder discriminatorio. Los más comunes se centraron en la **degradación de la permeabilidad celular** o bien en la **proliferación celular**. Brevemente, los principios de estos ensayos se basan en la incubación de las células expuestas a la mezcla problema, en presencia de un colorante de exclusión (azul tripán) / inclusión (rojo neutro, MTT, WST-1, resazurina) que se incorporará en células muertas / vivas o en orgánulos específicos para una fácil detección de la viabilidad celular. Estudios sobre la citotoxicidad de microplásticos han empleado técnicas de colorantes de inclusión (MTT y Resazurina³³).

La liberación extracelular de los componentes "marcadores" intracelulares también se pueden medir dando información sobre el daño en la permeabilidad de la célula. Los métodos que miden la proliferación celular se basan en el principio de que cualquier efecto tóxico, al matar células o al bloquear el ciclo celular, reduce la proliferación de toda una población. También son comunes los métodos bioquímicos (contenido de proteína total o incorporación de BrdU) y los métodos de recuento (capacidad de formación de colonias)³⁴. Hwang et al., evaluaron la toxicidad de microplásticos de polipropileno (PP) en líneas celulares de mamífero empleando el kit Cell Counting Kit-8 (CCK-8), un ensayo de citotoxicidad colorimétrico no radioactivo y sensible para detectar el número de células viables en la proliferación. Además, en este mismo estudio

³¹ Eisenbrand, G., Pool-Zobel, B., Baker, V., Balls, M., Blaauboer, B.J., Boobis, A., Carere, A., Kevekordes, S., Lhuguenot, J.C., Pieters, R., Kleiner, J., 2002. Methods of in vitro toxicology. Food Chem. Tox 40, 193-236.

³² Hamm, J., Sullivan, K., Clippinger, A.J., Strickland, J., Bell, S., Bhatarai, B., Blaauboer, B., Casey, W., Dorman, D., Forsby, A., Garcia-Reyero, N., Gehen, S., Graepel, R., Hotchkiss, Hastwell, P.W., Webster, T.W., Tate, M., Billinton, N., Lynch, A.M., Harvey, J.S., Rees, R.W., Walmsley, R.M., 2009. Analysis of 75 marketed pharmaceuticals using the GADD45a-GFP 'GreenScreen HC' genotoxicity assay. Mutagenesis. 24, 455-463.

³³ Toxicity assessment of pollutants sorbed on environmental sample microplastics collected on beaches: Part I- adverse effects on fish cell line. Pauline Pannetier, Jerome Cachot, Christelle Clerandau, Florian Faure, Kim Van Arkel, Luiz F. de Alencastro, Clement Levasseur, Frederic Sciacca, Jean-Pascal Bourgeois, Benedicte Morin.

³⁴ Adan, A., Kiraz, Y., Baran, Y., 2016. Cell proliferation and cytotoxicity assays. Curr.Pharm. Biotechnol. 17, 1213-1221.

se reportó que estas micropartículas de PP causaban un aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) dependiente del tamaño y de la concentración de las partículas³⁵.

2. Genotoxicidad:

La genotoxicidad es un término más amplio que hace referencia a procesos que alteran la estructura, información contenida o la segregación de ADN³⁶. En este sentido, hay tres niveles de mutaciones (mutaciones genéticas, alteraciones cromosómicas estructurales y numéricas) que pueden desempeñar un papel en el cáncer, en trastornos y defectos congénitos. Es por ello que las pruebas de genotoxicidad pueden proporcionar información sobre el mecanismo de acción, que es fundamental para la caracterización de los riesgos cancerígenos y respaldar el uso de modelos sin umbrales para estimación de los efectos de dosis bajas³⁷. Por lo tanto, se han determinado diferentes ensayos para estudiar los efectos genotóxicos mediante ensayos *in vitro*, los cuales deben incluir la absorción celular y considerar los que estudien mutación génica y estructural y aberraciones en el número de cromosomas. Según las Autoridades de Seguridad Alimentaria y la Guía de 2021 sobre nanomateriales, el ensayo *in vitro* que se propone para la evaluación de genotoxicidad les a **prueba *in vitro* de micronúcleos en cultivos celulares de mamífero** (OECD TG 487) para el estudio de daño en estructura y número cromosómico.

Por otro lado, la prueba de **mutación inversa bacteriana (prueba de Ames, OECD TG 471)** siempre se acepta como parte de cualquier estrategia de evaluación de riesgos debido a su especificidad para la detección de carcinógenos genotóxicos. Se realiza en cinco cepas de *Salmonella typhimurium* y / o *Escherichia coli*, y ha sido ampliamente validado como bioensayo por lo que se ha adoptado a nivel internacional. Se ha llevado a cabo durante los últimos 40 años como prueba de detección inicial en la mayoría de las pruebas de mutagenicidad de nuevos productos³⁸. También se puede aplicar un método líquido en formato micro (**prueba Ames II**) a solo dos cepas (*S.typhimurium* TA mix y TA 98) con lectura colorimétrica. Es una herramienta eficaz como alternativa a la prueba estándar de Ames puesto que requiere menos material y mano de obra. Además, presenta una variabilidad interlaboratorio baja³⁹. La prueba Ames II se ha ampliado para incluir otras cepas de prueba, lo que se conoce como **Ames MPF TM**,

³⁵ An assessment of the toxicity of polypropylene microplastics in human derived cells Jangsun Hwang, Daheui Choi, Seora Han, Jonghoon Choi, Jinkee Hong.

³⁶ ECHA, 2008. Guidance on information requirements and chemical safety assessment: guidance for the implementation of REACH. European Chemicals Agency, Helsinki.

³⁷ Eisenbrand, G., Pool-Zobel, B., Baker, V., Balls, M., Blaauboer, B.J., Boobis, A., Carere, A., Kevekordes, S., Lhuguenot, J.C., Pieters, R., Kleiner, J., 2002. Methods of *in vitro* toxicology. Food Chem. Tox 40, 193-236.

³⁸ Mortelmans, K., Zeiger, E., 2000. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. Mutat., Res. 455, 29-60.

³⁹ Fluckiger-Isler, S., Baumeister, M., Braun, K., Gervais, V., Hasler-Nguyen, N., Reimann, R., Van Gompel, J., Wunderlich, H. G., Engelhardt, G., 2004. Assessment of the performance of the Ames II assay: a collaborative study with 19 coded compounds. Mutat. Res. 558, 181-197.

convirtiéndolo en una herramienta rápida y confiable para evaluar la mutagenicidad^{40 41}. No obstante, debido a que los nanomateriales no son capaces de penetrar las paredes bacterianas y las bacterias, al contrario que las líneas celulares de mamíferos no pueden internalizar nanopartículas, se concluyó que la prueba de mutación inversa bacteriana (Prueba de Ames, OECD TG 476) no es el ensayo idóneo para la evaluación de genotoxicidad de nanomateriales. Otros bioensayos detectan lesiones primarias en el ADN, que pueden ser reparadas, por lo que son menos predecibles que los ensayos basados en mutaciones en el ADN o aberraciones cromosómicas y son comúnmente utilizados como ensayos de pre-screening³⁷. El **ensayo cometa** detecta roturas de hebras simples y dobles de ADN, así como roturas de las hebras de ADN que surgen durante la reparación del ADN. Se considera un ensayo indicador de lesiones pre-mutagénicas. El ensayo de cometa es un ensayo rápido, sencillo y muy sensible para medir el daño del ADN en células o tejidos de mamíferos a partir de las cuales se pueden preparar suspensiones de células individuales³⁸. Además, la división celular no es necesaria y un número bajo de células es suficiente para el análisis. A pesar del uso generalizado in vitro, todavía no existe una directriz de la OCDE disponible. Sin embargo, el procedimiento es consistente con publicaciones internacionales que definen las condiciones óptimas para implementar el ensayo⁴².

Respecto a los estudios de toxicología ambiental, las líneas de cultivos celulares se consideran una de las herramientas más fiables para estudiar el efecto de compuestos químicos, concretamente la línea de hígado, ya que juega un papel fundamental en el metabolismo y eliminación de sustancias xenobióticas⁴³.

Los modelos in vitro reportados en bibliografía para evaluar la toxicidad de micro y nanoplásticos son, principalmente, HepG2 y Caco-2. En concreto, para la línea celular Caco-2, se ha empleado en numerosas ocasiones para estudiar la absorción y translocación de contaminantes como metales pesados y nanomateriales a través de la barrera intestinal. Además, cultivos de Caco-2 han servido para estudiar el daño en microvellosidades intestinales y para evaluar la supresión génica de proteínas de transporte, por lo que se consideran una gran herramienta para estudiar la permeabilidad de microplásticos e integridad intestinal⁴⁴.

⁴⁰ Flückiger-Isler, S., Kamber, M., 2012. Direct comparison of the Ames microplate format (MPF) test in liquid medium with the standard Ames preincubation assay on agar plates by use of equivocal to weakly positive test compounds. *Mutat. Res.* 747, 36-45.

⁴¹ Kamber, M., Flückiger-Isler, S., Engelhardt, G., Jaeckh, R., Zeiger, E., 2009. Comparison of the Ames II and traditional Ames test responses with respect to mutagenicity, strain specificities, need for metabolism and correlation with rodent carcinogenicity. *Mutagenesis* 24, 359-366.

⁴² Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/cometa assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206-221.

⁴³ Toxicity assessment of pollutants sorbed on environmental sample microplastics collected on beaches: Part I- adverse effects on fish cell line. Pauline Pannetier, Jerome Cachot, Christelle Clerandau, Florian Faure, Kim Van Arkel, Luiz F. de Alencastro, Clement Levasseur, Frederic Sciacca, Jean-Pascal Bourgeois, Benedicte Morin.

⁴⁴ Lipidomic analysis of single and combined effects of polyethylene microplastics and polychlorinated biphenyls on human hepatoma cells Albert Men'endez-Pedriz, Joaquim Jaumot, Carmen Bedia.

Es importante tener en cuenta que los micro- y nanoplásticos a evaluar deben estar contenidos en un vehículo compatible con el sistema biológico a emplear. La Guía de la EFSA (2021) establece que se debe determinar la estabilidad y las características físico-químicas del nanomaterial en el vehículo empleado. Se han reportado estudios que han empleado DMSO, buffer salino fosfatado (PBS) o DMEM a una concentración final de 2mg/mL⁴⁵. Este paso es de vital importancia para la administración de las micro y nanopartículas y debe comprobarse la estabilidad en el vehículo seleccionado, ya que las partículas podrían absorberse o aglomerarse, lo que podría reducir la exposición real y dar lugar a falsos negativos.

3. Estrés oxidativo:

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son producidas como una consecuencia del metabolismo aeróbico fisiológico normal. La cadena de transporte de electrones de la mitocondria, los peroxisomas, la NADPH oxidasa, la óxido nítrico sintetasa desacoplada y el sistema del citocromo P450 son las fuentes más importantes de producción de los ROS. El desequilibrio entre la producción de los ROS y el sistema de defensa antioxidante en los sistemas vivos ocasiona una ruptura de la función celular y, por consiguiente, un daño. Este desequilibrio ocurre por una sobreproducción de ROS y una reducción del mecanismo de defensa antioxidante. Las acciones protectoras contra los ROS son llevadas a cabo por varias enzimas (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa) y también por los compuestos no enzimáticos (vitamina E, ascorbato, glutatión, transferrina, ceruloplasmina, etc.). Los ROS son moduladores cruciales de las funciones celulares. A bajas concentraciones, los ROS son participantes esenciales en la señalización celular, la inducción de la respuesta mitogénica y la defensa contra agentes infecciosos, mientras que el exceso de ROS puede alterar la función normal y promover el daño irreversible a lípidos, ácidos nucleicos y a proteínas celulares.

⁴⁵An assessment of the toxicity of polypropylene microplastics in human derived cells. Jangsun Hwang, Daheui Choi, Seora Han, Jonghoon Choi, Jinkee Hong.

3 Conclusiones

Una vez consultada la bibliografía más relevante que se encuentra en este estado del arte, se ha llegado a diversas conclusiones en cuanto a la normativa y legislación sobre los MNPs, la obtención de formulaciones de referencia y los estudios realizados para evaluar el efecto de estas partículas en la salud humana mediante bioensayos.

En cuanto a la normativa sobre los MNPs, se puede concluir que existe una intención clara desde la Unión Europea y las instituciones gubernamentales de regular la situación de los microplásticos, su prevención y/o eliminación, advirtiéndole a la industria sobre la necesidad de buscar alternativas para el caso de que sus productos pudieran generar microplásticos.

Además, existe una gran dificultad en la estandarización de una metodología de análisis, en la puesta a punto de métodos y en la realización de bioensayos debido a la inexistencia de materiales de referencia. En la bibliografía se recogen diversas formas de preparar micropartículas, así como diferentes estudios realizados para evaluar los efectos de estas mediante bioensayos in vitro.