

## ANEXO VII

### RESUMEN DE LA MEMORIA CIENTÍFICA DE LA INVESTIGACIÓN COMISIONADA

**Título del proyecto:**

Evaluación de los mecanismos de acción de los nanomateriales inhalados (NANOinCELL)

**Investigador/a principal:** Blanca Suarez sustituida por Felipe Goñi

**Equipo investigador:** María José Suárez, Eneritz Arriaga, Amaia Aspiazu, Jose Luis Gómez, Albiñe Leizea

**Entidad o persona solicitante:** Fundación Gaiker

**Fechas de realización:** Del 21/12/2016 al 20/12/2017

**SINOPSIS**

El presente proyecto se basa en un caso práctico en el cual se han cuantificado los NMs presentes en los aerosoles que se producen en la impresión de filamentos de Policarbonato (PC) con dos niveles de modificación (alto (5%) y bajo (2%) de un 1 tipo de nanocarga (nanotubos de carbono), seleccionados por su alto grado de utilización en los procesos de impresión con nanomateriales de altas prestaciones.

Estas nanocargas suelen dispersarse en el material plásticos formando agregados, que suelen romperse por la cizalla en el proceso de extrusión del filamento, antes del proceso de impresión. Asimismo los nanotubos producidos fueron testados a nivel toxicológico tanto a nivel celular como en epitelio pulmonar humano. Para determinar el grado de peligrosidad que pueden tener dichos NMs presentes en el aerosol.

El objetivo principal del proyecto fue la evaluación toxicológica y fisicoquímica de aerosoles que contienen nanomateriales derivados de procesos industriales basándonos en un caso de estudio real (impresión 3D). Los objetivos del presente proyecto fueron:

- Simulación in vivo de procesos de impresión 3D y recogida de muestras

reales sobre filtros adaptados con rejillas TEM.

- Cuantificación y análisis físico-químico de muestras recogidas en filtros a tiempo real y extrapolación de dosis in vitro.
- Análisis cito-toxicológico de los nanotubos de carbono producidos
- Análisis toxicológico, multidosaje de los nanotubos de carbono en modelo in vitro de epitelio pulmonar humano 3D.

Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas entre las rejillas blanco (que no deberían contener nanotubos) y las rejillas que han estado 3 horas en contacto con el aerosol, mientras se imprimió la totalidad de la pieza. Esto indicó que en procesos de impresión 3D con materiales plásticos que presentan nanomateriales en su composición (nanorefuerzos) no general aerosol nocivo para la salud.

Por otro lado, los resultados de citotoxicidad de los nanomateriales indicaron que compuestos de misma naturaleza, pero obtenidos de distintas fases de producción/distribución, presentaron respuestas toxicológicas diferentes.

Los resultados obtenidos en este proyecto nos indican que los procesos de impresión 3D con materiales plásticos con NMs particulados en su composición no suponen un riesgo laboral. Sin embargo, estos mismos NMs, según su fase de producción, tipo de distribución y estado, presentan unas respuestas toxicológicas muy diferentes. Por lo que nos hace reflexionar sobre la importancia del proceso de producción de dichos nanomateriales, sus tiempos de estancia en cada fase, así como conocer con más detenimiento las fases de producción donde el operario puede entrar en contacto con el NM y en qué estado podrá estar este.

## **METODOLOGÍA**

### **1. Puesta a punto sistema para la recogida de muestras en aerosol.**

El objetivo de esta actividad fue poner a punto un sistema de recogida de muestras de aerosol de un proceso real de transformación que involucrase la utilización de materiales plásticos con nano-refuerzos.

- Selección caso práctico: equipo convencional de cámara abierta, donde el operario está expuesto directamente a los aerosoles asociados a los materiales de impresión
- Construcción sistema de cerramiento: Cerramiento basado en planchas de PMMA de 5 mm de espesor selladas con silicona de alto

vacío con una serie de elementos que permitan “recoger” los aerosoles que se producen a distintos tiempos de impresión, minimizando a la vez, el efecto de otro tipo de contaminantes (por ejemplo, partículas de polvo), que induzcan a posibles errores en la detección por microscopía electrónica de transmisión (TEM) de agregados de nanotubos que procedan directamente del material utilizado en el proceso

## **2. Evaluación de flujo de aire hacia la zona de recogida de muestras**

Comprobación del correcto flujo de aire hacia el soporte de recogida de muestra mediante seguimiento de humos negros.

## **3. Desarrollo de filamentos de impresión**

- Selección filamentos de base PC con porcentajes de nanotubos de carbono en los niveles más altos de incorporación que se utilizan más habituales en la industria de nanocomposites (hasta 5% de NMs).
- Caracterización: se seleccionó el grado PLASTICYL™ PC1501 suministrado por la empresa NANOCYL. Concentrado al 15% de nanotubos de carbono multiwall (NC7000™) en una resina de policarbonato de baja viscosidad y que se comercializa para aplicaciones donde se requiere de niveles de conductividad eléctrica adecuados para elementos con requisitos de disipación de carga estática (ESD) en aplicaciones del sector eléctrico y electrónico.

## **4. Proceso de obtención de filamento**

- Mezcla de policarbonato MAKROLON 2405 con PLASTICYL PC1501 diluyendo el masterbatch o concentrado de partida hasta conseguir el nivel de dilución o concentración de nanotubos de carbono deseado.
- Realización de filamentos de 1,75 mm de diámetro a partir de las granzas anteriores. Este proceso se realizó para la obtención de filamentos que contienen proporciones de 2 y 5% de nanotubos de carbono.

Para la realización de los filamentos se utilizó una extrusora monohusillo marca HAAKE. La refrigeración del filamento se realizó por medio de aire comprimido y se recogió directamente en bobina.

En el proceso de obtención de filamento, los parámetros de proceso que se controlaron para una mejor calidad de filamento fueron:

- ✓ Temperatura en fundido
- ✓ Diámetro de la boquilla
- ✓ Refrigeración del husillo (agua/aire)
- ✓ Velocidad de arrastre

El control del diámetro de los filamentos se evaluó mediante medidas con micrómetro previo al proceso de enrollado y fijado de los parámetros de velocidad de arrastre y extrusión.

### **5. Impresión de filamentos cargados con nanotubos.**

La diferente proporción en NM tiene como propósito identificar la influencia que puede tener la cantidad de este producto en la emisión de partículas de NM al aire. Identificamos por tanto los dos filamentos de la siguiente forma: Makrolon 2605 + 2% NM y Makrolon 2605 + 5% NM.

- Selección de geometría de pieza. Antes de proceder a las pruebas de monitorización de los aerosoles, se realizaron tests de imprimibilidad de los filamentos, para poner a punto las condiciones de impresión relacionadas con una geometría de pieza que se adaptara a los tiempos de monitorización que se van a utilizar en este caso práctico.
- Procedimiento de toma de muestras de aerosoles en proceso real. La salida de gases forzada que se dejó funcionando toda la noche (18 horas) previa a los ensayos para eliminar posibles contaminantes externos al propio proceso de impresión de los filamentos de nanocompuestos. Al realizar el experimento se colocan los discos TEM en la plataforma de extracción de aire.

Los portamuestras se recogieron durante la impresión a tiempos de exposición del proceso predeterminados de: 0 minutos (blanco), 20 minutos, 1 hora, 2 horas, y 3 horas.

### **6. Cuantificación de muestras mediante microscopía TEM**

Los soportes/rejillas obtenidas para cada una de las réplicas y tiempos del proceso de impresión, se evaluaron mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Esta técnica permite determinar la presencia y tamaño de agregado de materiales a escala nano.

## **7. Análisis cito-toxicológico de los nanotubos de carbono producidos**

Se procedió a solicitar a la empresa *Nanocyl* los nanomateriales con los que producían el producto final. Para de esta manera poder ir a la fuente de la producción del material PLASTICYLTM C1501.

Se recibieron tres nanomateriales (NMs) de misma naturaleza pero procesados en distintos tiempos (AN1, AN2 y AN3).

- En primer lugar se realizó el ensayo de citotoxicidad celular, para ello se analizó el efecto de los tres NMs en la impedancia de la línea celular de epitelio pulmonar A549.
- A continuación se evaluó la posible producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en presencia y ausencia de las NMs a las dos concentraciones previamente establecidas en ensayo de citotoxicidad.
- De la misma manera, mediante citometría de flujo se analizaron los cambios morfológicos producidos en la línea celular A549 por los NMs frente al control.
- Finalmente, se evaluó la posible respuesta inflamatoria de los macrófagos derivados de la línea celular monocítica THP1 a estos NMs. Para ello se cultivaron los macrófagos en presencia y ausencia de las nanofibras y se analizaron posteriormente citoquinas inflamatorias (IL-8 y IL-1 $\beta$ ).

Se llevaron a cabo tres ensayos independientes de cada parámetro a analizar. Con al menos 3 replicas por grupo experimental. Posteriormente se llevo a cabo análisis estadístico, analizando la distribución normal, así como T-student.

## **8. Análisis toxicológico, multidosaje de los nanotubos de carbono en modelo in vitro de epitelio pulmonar humano 3D**

Para este estudio se empleó el modelo de barrera pulmonar MucilAir 3D. Es un modelo de epitelio pulmonar humano reconstituido en interfase aire-líquido. Que nos permite llevar a cabo una deposición solida sobre dicho epitelio.

Las alteraciones fisiológicas en el epitelio pulmonar por interacción con el NM se midieron a través del análisis de los posibles cambios en la

resistencia eléctrica transepitelial y los análisis de citotoxicidad inducida (LDH y Resazurin). Estos estudios se llevaron a cabo en ensayos con unos intervalos de duración de 15 días, para de esta manera comprobar la evolución de la barrera pulmonar:

- TEER; Analizado cada día. La confluencia celular en un cultivo en monocapa se determinó a través de la lectura de TEER. Este análisis se realiza a través del medidor EVOM, instrumento diseñado específicamente para las mediciones de TEER en cultivos de tejido como es la BP.
- LDH; Analizado cada día. En ensayo colorimétrico de citotoxicidad a través del enzima Lactato Deshidrogenasa se mide la cantidad de LDH que hay en el sobrenadante. El LDH es un enzima citosólico que se haya en el medio ambiente cuando la membrana citoplasmática y por lo tanto la célula está dañada.
- Resazurin; Analizado cada 2-4 días. El ensayo de viabilidad mediante Resazurin (7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide) es usado habitualmente como un indicador de viabilidad. El ensayo se basa en la capacidad que tiene las células viables, aquellas metabólicamente activas en reducir el resazurin a resorufin y dihydroresorufin. Siendo esta una conversión intracelular llevada a cabo por la mitocondria, microsomas y reductasas citosolicas. El resorufin por la bio-reducción es medido en un fluorimetro. Además, este compuesto no es toxico y es estable en el medio, por lo que permite realizar continuas mediciones sin afectar a el epitelio pulmonar humano.

## **RESULTADOS**

Para realizar la impresión de estos hilos o filamentos se escogió una geometría bastante simple de forma que no generase problemas ajenos a la naturaleza del filamento que pudieran enmascarar el comportamiento real de éste y que den lugar a parones, o recalentamientos de los extruidos.

A pesar de que la geometría fue sencilla, esto no significa que se alterasen las condiciones que se producirían en una impresión más complicada. Las temperaturas, tiempo de impresión, velocidad de impresión y demás variables implicadas fueron totalmente iguales.

Por otro lado el procedimiento de toma de muestras se llevó a cabo con la máxima fiabilidad, llevando el sistema experimental de análisis (discos TEM) al propio sistema de recogida, para no tener perdidas en el procesado. La impresora fue integrada en el sistema de cerramiento, el cual tenía acoplado

una salida de gases forzada. Al realizar el experimento se colocaron los discos TEM en la plataforma de extracción de aire.

Los soportes/rejillas obtenidas para cada una de las réplicas y tiempos del proceso de impresión no presentaron diferencias significativas entre las rejillas blanco (que no deberían contener nanotubos) y las rejillas que han estado 3 horas en contacto con el aerosol, mientras se imprime la totalidad de la pieza.

Respecto a los estudios citotológicos, a continuación se muestra una tabla en la que se han resumido los resultados de todos los ensayos de toxicidad celular *in-vitro* realizadas para las NMs.

Nanofibra de carbono	Citotoxicidad	Producción ROS	Cambios morfológicos	Secreción IL-1 $\beta$	Secreción IL-8
AN1	-	+	++	+	-
AN2	64.5 $\mu$ g/ml	+	++	+	+
AN3	-	-	+	++	+

Los resultados obtenidos en los ensayos de citotoxicidad, producción de ROS como inflamación determinaron que los diferentes compuestos presentaron respuestas diferentes. Siendo los tres compuestos la misma composición, pero obtenidos de distintas fases de producción/distribución.

Y por otro lado, los estudios de toxicidad llevados a cabo en barrera pulmonar para AN3, permitieron llevar a cabo un estudio a más largo plazo de tiempo, no solo 24 horas. Donde se observó una pequeña tendencia en el daño celular pero no las reacciones observadas a nivel celular. Este NM3 es el nanomaterial analizado en el que menor citotoxicidad fue observada.

Ante los resultados obtenidos donde un mismo NM, según su fase de producción, tipo de distribución y estado presenta unas respuestas toxicológicas tan diferentes. Nos hace reflexionar sobre la importancia del proceso de producción de dichos nanomateriales, sus tiempos de estancia en cada fase, así como conocer con más detenimiento las fases de producción donde el operario puede entrar en contacto con el NM y en qué estado podrá estar este.

### **UTILIDAD PRÁCTICA DE LOS RESULTADOS EN RELACIÓN CON LA PREVENCIÓN DE RIESGOS LABORALES.**

En este caso práctico, donde se valoró la presencia de nanotubos de carbono en el aerosol generado por una impresora 3D convencional,

podemos afirmar que al imprimir la totalidad de una pieza modelo, dicho proceso de impresión 3D con materiales plásticos que presentan nanomateriales en su composición (nanorefuerzos) no genera aerosol nocivo para la salud. Y que por lo tanto, el uso de impresión 3D con este tipo de materiales plásticos con NMs en su composición no presenta un riesgo laboral.

Aunque siempre se tendrá que tener en cuenta el porcentaje de nanomateriales que presente dicho material plástico. Como se indica en la memoria del proyecto, se trabajaron con materiales plásticos con porcentajes de 2 al 5 % de NMs. Porcentaje habitual en este tipo de materiales para impresión 3D. Pero porcentajes más altos de estos nanomateriales (no presentes en el mercado actualmente) deberían de ser valorados.

Por otro lado, los resultados de citotoxicidad de los nanomateriales indicaron que compuestos de misma naturaleza, pero obtenidos de distintas fases de producción/distribución, presentaron respuestas toxicológicas diferentes.

Los resultados obtenidos en este proyecto nos indican que los procesos de impresión 3D con materiales plásticos con NMs particulados en su composición no suponen un riesgo laboral. Sin embargo, estos mismos NMs, según su fase de producción, tipo de distribución y estado, presentan unas respuestas toxicológicas muy diferentes. Por lo que nos hace reflexionar sobre la importancia del proceso de producción de dichos nanomateriales, sus tiempos de estancia en cada fase, así como conocer con más detenimiento las fases de producción donde el operario puede entrar en contacto con el NM y en qué estado podrá estar este.

Cabe destacar que la exposición a los nanotubos, en nuestro caso, ha sido realizada bajo el principio de máxima precaución, realizando todas las pesadas en cámaras aisladas (glove box) y con equipos de protección individual. Desconocemos el procedimiento de los operarios de producción, así como de los consumidores. En las hojas técnicas de los productos aparecen como desconocidas las potencialidades tóxicas de ellos.

## **CONCLUSIONES FINALES Y POSIBLES RECOMENDACIONES**

1. El proceso de impresión 3D con materiales plásticos que presentan nanomateriales en su composición (nanorefuerzos) no genera un aerosol nocivo para la salud.

Por lo tanto, el uso de impresión 3D con este tipo de materiales plásticos con NMs (del 2 al 5%) en su composición no presenta un riesgo laboral intrínseco para el operario de dicha impresora.

2. Los NMs que están incorporados en el material plástico como nanorefuerzo, según su fase de producción, tipo de distribución y estado, presentan unas respuestas toxicológicas muy diferentes.

Dado el creciente aumento en la utilización y producción de nanomateriales en diversas industrias, la evaluación de la exposición de toda persona que pueda encontrarse en contacto con ellas durante la cadena de producción o de uso así como su posible toxicidad ha de ser evaluada minuciosamente. Los nanotubos de carbono tienen muy baja densidad, siendo fácilmente dispersados en el ambiente en estado sólido y por lo tanto capaces de alcanzar las vías aéreas con mucha facilidad. De la misma manera, desconocemos su toxicidad una vez dispersados en líquido.

Es realmente importante tener definido y caracterizado el proceso de producción y distribución de los materiales nanoparticulados, sus tiempos de estancia en cada fase, con que otros compuestos interactúa así como conocer con más detenimiento las fases de producción donde el operario puede entrar en contacto con el NM y en qué estado podrá estar este.

## **DIFUSIÓN Y EXPLOTACIÓN DE RESULTADOS**

**“Nanotoxicología. Presente y futuro”** en NANOMATERIALES EN LOS LUGARES DE TRABAJO. Goñi, F. 2017, Barakaldo, 28 Noviembre.

**“Readiness of control banding tools for safe innovation and regulatory occupational exposure assessment of nanomaterials”** en 8TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NANOTECHNOLOGY, OCCUPATIONAL AND ENVIRONMENTAL HEALTH. Liguori, B.; Quintero, F.A.; Ahmad, M.; Jovanovic, A.; Suarez, B.; Rodriguez, I.; Micheletti, C.; Atluri, R.; Raun Jacobsen, N.; Foss Hansen, S.; Baun, A.; Alstrup Jensen, K. 2017, Elsinore (Dinamarca), 29 Mayo-1 Junio.

**“Introducción al concepto “safe by design” y principales avances en su aplicación”** en 10 ALAMENOS 9. NANOFORUM. Suarez, B. 2017, San Sebastián, 27 abril.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Andrew R. Collins, Felipe Goñi- de-Cerio, Blanca Suarez-Merino, ... and Maria Dusinska. High throughput toxicity screening and intracellular detection of nanomaterials. Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology. Version of Record online: 7 JUN 2016 | DOI: 10.1002/wnan.1413
2. Wang XZ, Yang Y, Li R, McGuinness C, Adamson J, Megson IL, Donaldson K. Principal component and causal analysis of structural and acute in vitro toxicity data for nanoparticles. Nanotoxicology 2014,

- 8:465–476.
3. Farrera C, Fadeel B. It takes two to tango: Understanding the interactions between engineered Nanomaterials and the immune system. *Eur J Pharm Biopharm* 2015, 95:3–12.
  4. Nel A, Xia T, Madler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 2006, 311:622–627.
  5. Donaldson K, Poland CA. Nanotoxicity: challenging the myth of nano-specific toxicity. *Curr Opin Biotechnol* 2013, 24:724–734.
  6. Arora S, Rajwade JM, Paknikar KM. Nanotoxicology and in vitro studies: the need of the hour. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012, 258:151–165.
  7. Dusinska M, Magdolenova Z, Fjellsbo LM. Toxicological aspects for nanomaterial in humans. *Methods Mol Biol* 2013, 948:1–12.
  8. Dusinska M, Fjellsbø LM, Magdolenova Z, Ravnum S, Rinna A. Safety of nanomaterial in nanomedicine. In: Hunter RJ, Preedy VR, eds. *Nanomedicine in Health and Disease*. Jersey, British Isles Enfield, New Hampshire: CRC Press; 2011, 203–226.
  9. Donaldson K, Stone V, Tran CL, Kreyling W, Borm PJ. Nanotoxicology. *Occup Environ Med* 2004, 61:727–728.
  10. Lewinski N, Colvin V, Drezek R. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small* 2008, 4:26–49.
  11. Kar et al. 2016 Extrapolating between toxicity endpoints of metal oxide nanoparticles: Predicting toxicity to *Escherichia coli* and human keratinocyte cell line (HaCaT) with Nano-QTTR. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 126 pp. 238-244.
  12. Puzyn et al. 2011 Using nano-QSAR to predict the cytotoxicity of metal oxide nanoparticles. *Nature Nanotechnology*, 6 pp. 175-178.
  13. Hansen, SF, Alstrup Jensen K, Baun A (2011) NanoRiskCat: a conceptual model for risk classification of nanomaterials. Environmental project no. 1372 2011. Danish Environmental Protection Agency, Copenhagen
  14. Höck, J., Epprecht, T., Furrer, E., Gautschi, M., Hofmann, H., Höhener, K., et al., 2013. Guidelines on the Precautionary Matrix for Synthetic Nanomaterials [Internet]. Federal Office of Public Health and Federal Office for the Environment
  15. Liguori, B., Hansen S.F., Baun, A., Jensen, K.A. Control banding tools for occupational exposure assessment of nanomaterials — Ready for use in a regulatory context? *NanoImpact Vol 2*, april 2016, pp 1-17.
  16. Paik, S.Y., Zalk, D.M., Swuste, P., 2008., “Application of a pilot control banding tool for risk level assessment and control of nanoparticle exposures”. *Ann. Occup. Hyg.* 52, 6419–428.