

Nuevos riesgos tóxicos por exposición a nanopartículas

Gutiérrez-Praena D¹, Jos A*¹, Pichardo S¹, Puerto M¹, Sánchez-Granados E², Grilo A², Cameán AM¹

¹Área de Toxicología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla. C/Profesor García González, 2. 41012 Sevilla (España).

²Hospital Universitario Virgen de Valme. Avda. Bellavista, s/n. 41014 Sevilla (España).

Recibido 16 de septiembre de 2009 / Aceptado 31 de diciembre de 2009

Resumen

La nanotecnología es una ciencia multidisciplinar que está teniendo un gran auge en la actualidad, ya que proporciona productos (nanopartículas) con nuevas propiedades fisicoquímicas, que son las que hacen que tengan una gran cantidad de aplicaciones. La exposición humana a estas nanopartículas se puede producir principalmente por las vías respiratoria (nanopartículas suspendidas en el aire), dérmica (nanopartículas ambientales, cosméticos) y oral (alimentos, agua). Por vía pulmonar las nanopartículas activan los mecanismos de defensa o son internalizadas en los intersticios. Por vía dérmica se pueden acumular en el estrato córneo o en los folículos pilosos, o bien atravesarlo y acumularse en la dermis. Por vía oral pueden ser absorbidas por las células epiteliales del intestino. La exposición también se puede producir a través de la instrumentación médica o prácticas clínicas, ya que se usan, por ejemplo, en el tratamiento y diagnóstico del cáncer de mama y en el control de infecciones en cirugía. Una vez las nanopartículas han sido absorbidas, se distribuyen por vía sanguínea y linfática, alcanzando diferentes órganos, tales como huesos, riñones, páncreas, bazo, hígado y corazón, en los que quedan retenidas y ejercen sus efectos tóxicos, aunque esto también se utiliza como una forma de vectorización de fármacos. La toxicidad de estas nanopartículas depende, entre otros factores, de su persistencia en los órganos y de si el hospedador puede provocar una respuesta biológica para eliminarlas. Los mecanismos de toxicidad no se conocen con exactitud, aunque parece ser que se incluyen daño en membranas celulares, disrupción del potencial de membrana, oxidación de proteínas, genotoxicidad, formación de especies reactivas de oxígeno e inflamación. Estudios sobre las vías respiratorias han mostrado disminución de la viabilidad celular *in vitro*, producción de estrés oxidativo e inflamación. En la piel se ha demostrado toxicidad y estrés oxidativo, pero otros autores destacan la ausencia de irritación y reacciones alérgicas. A nivel gastrointestinal *in vitro* se han observado reducción de la viabilidad celular y alteración del ADN, entre otros. Respecto a la legislación, actualmente no existen directrices específicas sobre nanotecnología y nanomateriales, en espera de un mayor conocimiento científico de sus efectos sobre la salud pública. La investigación en este campo es, por tanto, un aspecto prioritario en la actualidad que va a determinar la relación riesgo/beneficio de su uso y por tanto su futuro, que parece potencialmente prometedor.

Palabras clave: Nanopartículas, Riesgo tóxico, Toxicidad

Abstract: New toxic risks due to nanoparticles exposure

Nanotechnology is a multi-disciplinary science which is having a

great growth at present, as it provides products (nanoparticles) with new physico-chemical properties that can have many applications. Human exposure to these nanoparticles can be produced by respiratory (airborne nanoparticles), dermal (atmospheric nanoparticles, cosmetics) and oral routes (food, water). By respiratory route, nanoparticles can stimulate the defense mechanisms or can penetrate into gaps. By dermal route, they can be accumulated in the stratum corneum or in the hair follicles, or go through it and be accumulated in the dermis. By gastrointestinal route they can be absorbed by the epithelial cells of the intestine. Human can also be exposed by medical instrumentation or clinic practices, as nanoparticles are used, for example, for treatment and diagnostic of breast cancer and to control surgery infections. Once nanoparticles have been absorbed they are distributed by blood and lymphatic stream, reaching different organs, such as bones, kidneys, pancreas, spleen, liver and heart, where they are retained and can produce their toxic effects, although this ability is also used for drugs delivery. The toxicity of these nanoparticles depends, among other factors, on their permanence in organs and if the host can produce a biological response to eliminate them. The toxicity mechanisms have not been completely elucidated, although they are known to produce cell membrane damages, membrane potential disruption, proteins oxidation, genotoxicity, production of reactive oxygen species, and inflammation. Studies on the respiratory exposure have demonstrated a diminution of the cellular viability *in vitro*, oxidative stress production, and inflammation. On skin have been demonstrated toxicity and oxidative stress, although other authors have shown the absence of irritation and allergic reactions. Concerning the gastrointestinal route cellular viability reduction and DNA alterations has been observed *in vitro*, among other mechanisms. Regarding regulatory aspects, nowadays there are no specific normative about nanotechnology and nanomaterials so far, pending on further scientific knowledge about their effects on public health. The research on this field is one of the priority aspects nowadays as it will help to determine the risk/benefit ratio in the use of nanoparticles and therefore its future, that seems potentially promising.

Keywords: Nanoparticles, Toxic risk, Toxicity

Introducción

La nanotecnología es una ciencia multidisciplinar que está teniendo un gran auge en la actualidad y que consiste en el desarrollo de materiales, dispositivos y sistemas de tamaño nanométrico (1 nm = 10⁻⁹ m), proporcionando productos con nuevas propiedades fisicoquímicas diferentes a las de las moléculas individuales o sólidos de la misma composición [1,2]. Los nanomateriales o nanopartículas

*e-mail: angelesjos@us.es

(NP) pueden, en teoría, ser procesados a partir de casi cualquier sustancia química [3], por lo que su diversidad es muy extensa (Tabla 1)[4].

Tabla 1. Principales tipos de nanomateriales.

Principales tipos de nanomateriales
Liposomas
Polímeros
Nanopartículas de cerámica
Nanopartículas metálicas
Nanopartículas de oro
Nanomateriales de carbono (Fullerenos, Nanotubos)
Puntos cuánticos
Dendrimeros

El hombre y el medio ambiente siempre han estado expuestos a NP, ya que éstas se producen de forma natural durante las erupciones volcánicas, incendios forestales, etc., e incluso desde antiguo se han utilizado como cosméticos o pigmentos [5]. Sin embargo, es en la actualidad cuando la exposición a NP ha aumentado significativamente debido a fuentes antropogénicas, y previsiblemente seguirá aumentando cuando los productos basados en la nanotecnología tengan un uso común.

Las NP manufacturadas tienen un gran número de aplicaciones industriales, incluyendo electrónica, óptica, textil, así como aplicaciones en dispositivos médicos, biosensores y en remediación medioambiental [6]. De hecho, las NP se encuentran con frecuencia comercializadas formando parte de cosméticos y cremas solares (TiO₂, Fe₃O₄, ZnO), empastes dentales (SiO₂), sistemas de filtración de agua y catalíticos, células fotovoltaicas (CdS, CdSe, ZnS), etc. [7]. En el campo de la salud humana, las NP se utilizan para el desarrollo de nuevos fármacos (en España ya existen fármacos comercializados formulados con nanopartículas o en forma nanoparticulada, como por ejemplo el Abraxane[®]), el transporte de los mismos, para diagnóstico molecular y por imagen, desarrollo de nanoarrays, etc. Es tal su potencial que se estima que en el año 2015 los productos que incorporen nanotecnología contribuirán aproximadamente con un trillón de dólares a la economía mundial [8].

El desarrollo de la nanotecnología, no obstante, tiene que ir acompañado de estudios que permitan conocer los efectos que estas NP van a tener tanto en el hombre como en el medio ambiente, tanto más si se tiene en cuenta que NP no manufacturadas han demostrado inducir efectos tóxicos tales como silicosis o asbestosis. Es más, las diferentes propiedades fisicoquímicas de los nanomateriales en comparación con sus homólogos de escala macroscópica implican que su toxicocinética y perfil de toxicidad no pueden ser inferidos por extrapolación a partir de datos de sus equivalentes no nanoestructurados. De esta preocupación se han hecho eco los

organismos reguladores internacionales como la Unión Europea (UE), la Agencia de Protección Ambiental Americana (EPA), la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), etc., así como la comunidad científica, lo que se pone de manifiesto en el creciente número de publicaciones acerca de la toxicidad de las NP.

En este artículo, se pretende presentar una visión global de las principales vías de exposición a las NP, de sus efectos tóxicos y mecanismos de toxicidad implicados, así como de la incipiente normativa relativa a estos nuevos compuestos. No se considerarán aquí aspectos medioambientales cuya importancia y extensión requerirían igualmente una revisión.

Toxicocinética

1. Exposición y Absorción

La exposición humana a NP puede tener lugar a través del agua, el aire y los alimentos, entre otros, por lo que las vías oral, respiratoria y dérmica son las más relevantes.

1.1. Vía respiratoria

En el aire no sólo existen NP manufacturadas sino también de origen natural o derivadas de actividades antropogénicas. El hombre, por tanto, está expuesto simultáneamente a una variedad de materiales que tienen distinto tamaño, bien partículas individuales o agregadas. No se conocen datos sobre el nivel de partículas manufacturadas en el aire. Sin embargo, los estudios epidemiológicos han mostrado tradicionalmente una clara relación entre las partículas ultrafinas y enfermedades respiratorias con una mayor incidencia de inflamación, tos, sibilancias y un mayor potencial de carcinogenicidad [6]. Igualmente, el aumento de estas partículas en la atmósfera se ha asociado con efectos adversos cardiovasculares en individuos susceptibles como ancianos y pacientes con patologías previas [9]. Una vez que las NP han sido inhaladas se ponen en marcha los mecanismos de defensa, como la fagocitosis por los macrófagos alveolares, o bien son internalizadas en los intersticios, dependiendo de su tamaño y química superficial. No obstante, algunos autores sugieren que el aclaramiento por los macrófagos alveolares de NP < 100 nm de diámetro es menos efectivo que para partículas de mayor tamaño [7].

1.2. Vía dérmica

Las NP también pueden llegar al hombre por vía dérmica, particularmente en el ambiente laboral al depositarse en la piel las que están presentes en el aire, pero también mediante el uso de cosméticos y cremas solares que las contienen. Se han realizado diversos estudios tanto *in vivo* como *in vitro* para determinar si las NP se pueden absorber a través de la piel, encontrándose que algunas de ellas (TiO₂, esferas de poliestireno) no pueden atravesar el estrato córneo, aunque en algunos casos se ha observado acumulación en los folículos pilosos [10]. Otras, sin embargo, como los puntos cuánticos, sí han demostrado atravesar el estrato córneo y acumularse en la dermis [11]. En general, la piel intacta y sana parece ser una barrera efectiva para algunos nanomateriales [12].

1.3. Vía oral

La exposición oral a NP también puede ser una ruta relevante tanto a nivel ocupacional como ambiental resultante de la ingestión de comida y agua contaminada, la deglución de las partículas inhaladas o su transferencia mano-boca. A su vez, se pueden usar formulaciones a base de NP para aumentar la biodisponibilidad de fármacos. El nivel

de NP manufacturadas no se suele medir ni en las aguas naturales ni en las redes de suministro de aguas de bebida. No sólo las NP no se eliminan de forma específica en las plantas de tratamiento de aguas residuales sino que las nanotecnologías tienen aplicaciones industriales en este sector. Así, se emplean para eliminar contaminantes químicos y bacterias de los suministros de agua. En relación con la exposición a través de los alimentos, ésta puede tener lugar directamente a través de alimentos preparados que las contengan; indirectamente, a través de alimentos en cuyo embalaje estén presentes (por ejemplo se utilizan NP de plata por sus propiedades antimicrobianas y de barrera) [13]; mediante el consumo de suplementos nutricionales como vitaminas o minerales formuladas con tales sustancias [14]; a través de la cadena alimentaria al consumir vegetales, carnes o pescados que hayan sido previamente expuestos a NP debido a prácticas agrícolas o de producción (fertilizantes, piensos, medicamentos veterinarios), o bien por el consumo de animales salvajes procedentes de capturas del propio consumidor (pesca, etc.) [6]. Diversos estudios con modelos animales sugieren que las células epiteliales del intestino delgado son capaces de absorber NP de tamaño inferior a los 200 nm [15]. No obstante, la exposición sistémica tras una administración oral es baja [12].

1.4. Otras vías

La exposición humana también puede ocurrir a través de la instrumentación médica o prácticas clínicas (vía parenteral, etc.). Las aplicaciones médicas de los nanomateriales se encuentran generalmente en fase experimental o clínica, pero de entre las propuestas destacan el uso de NP en el tratamiento y diagnóstico del cáncer de mama y el control de las infecciones durante la cirugía de implantes [6]. En España, como ya se ha comentado, existen comercializados medicamentos formulados con nanopartículas o en forma nanoparticulada, como el Abraxane® (paclitaxel), indicado en el tratamiento del cáncer de mama metastásico en determinados casos.

2. Distribución y Eliminación

Una vez que las NP son absorbidas pueden distribuirse por vía sanguínea o linfática, alcanzando distintos órganos y produciendo diferentes efectos sistémicos. Así, por ejemplo, ciertas NP pueden llevar a cabo una translocación neuronal desde el epitelio nasal hasta el bulbo olfativo, tal y como se ha demostrado en estudios en ratas [16,17], lo que implica una potencial vía de exposición del sistema nervioso central a estas sustancias [12]. Se han realizado diversos estudios relativos a la biodistribución de distintas NP. Así, por ejemplo, Wang y col. [18] observaron que, tras exponer a ratas por vía oral a NP de ZnO de 20 y 120 nm, éstas eran retenidas preferentemente en hueso, riñón y páncreas, y concluyeron que el hígado, bazo, corazón, páncreas y hueso eran los órganos diana. De hecho, esta especificidad de las NP a determinados órganos se aprovecha en clínica utilizándolas como vectores de fármacos [19,20]. Tras la traslocación de las NP desde el aparato respiratorio, el gastrointestinal, la piel o bien tras su administración parenteral, éstas son eliminadas del torrente circulatorio y su distribución final típica es el hígado (90%), el riñón y otros órganos con una alta actividad fagocítica, donde se acumulan y finalmente son eliminados a través de las heces o la orina [5]. Respecto a su metabolismo existen muy pocos datos, y parece estar condicionado por su composición química superficial [21].

Efectos tóxicos de las nanopartículas

La toxicidad de las partículas depende, entre otros factores, de su persistencia en los órganos en los que se depositan y de si el hospedador puede provocar una respuesta biológica para secuestrar o eliminar estos sistemas. Recientemente, diferentes investigadores han demostrado la toxicidad producida por NP en diferentes estudios *in vitro* [22-4] e *in vivo* [25]. Por este hecho, se acuña el nuevo término de “Nanotoxicología”, que se define como la “ciencia que examina los efectos dañinos y tóxicos de las nanoestructuras diseñadas artificialmente y de los nanomecanismos en los organismos vivos” [26].

El desarrollo de las nanopartículas se ha producido fundamentalmente por sus propiedades fisicoquímicas, las cuales, a su vez, son las que contribuyen a su toxicidad en los organismos vivos. Así, su forma, tamaño, tipo de material, pureza, área superficial, carga eléctrica, características estructurales, dosis, vía de administración, concentración en el órgano diana y duración de la acción, son algunas de las variables que van a determinar la toxicidad.

Los mecanismos de toxicidad no están totalmente elucidados para la mayoría de las NP. Entre otros se incluyen la disrupción de membranas o del potencial de membrana, la oxidación de proteínas, genotoxicidad, interrupción en la transmisión de energía, formación de especies reactivas de oxígeno y liberación de componentes tóxicos [27]. La inducción de reacciones inflamatorias también ha sido señalada como un mecanismo implicado en la patogenicidad de las NP manufacturadas [28], ya que las partículas ultrafinas ambientales han demostrado producir inflamación a nivel pulmonar [29]. Stone y Donaldson [30] sugieren la inducción de estrés oxidativo como el indicador adecuado para discriminar los efectos adversos de las distintas NP a nivel celular y molecular.

1. Toxicidad pulmonar

Los efectos tóxicos de las NP sobre las vías respiratorias han sido de los más estudiados hasta el momento, al ser ésta una de las principales rutas de exposición. Estudios *in vitro* sobre células pulmonares han demostrado que NP de CeO₂ disminuyen significativamente la viabilidad celular e inducen estrés oxidativo al disminuir los niveles de glutatión (GSH) y α -tocoferol, y aumentar los de malonildialdehído, indicador de peroxidación lipídica [31]. La producción de estrés oxidativo y la liberación de mediadores de inflamación también han sido puestas de manifiesto para NP de TiO₂ [32]. Este tipo de NP, en estudios *in vivo* realizados en roedores expuestos por instilación intratraqueal, ha demostrado inducir lesiones pulmonares tales como infiltración de células inflamatorias y ensanchamiento de los intersticios, de mayor gravedad a menor tamaño de partícula [33]. Efectos similares son también producidos por nanotubos de carbono [34].

2. Toxicidad dérmica

De forma similar, los efectos dermatológicos de distintos tipos de NP también han sido evaluados tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, los nanotubos de carbono inducen citotoxicidad y estrés oxidativo en queratinocitos humanos (células HaCaT) [35] y en roedores [36], en los que se observa un ensanchamiento de la piel derivado de la acumulación de leucocitos polimorfonucleares y mastocitos. Otros autores, sin embargo, muestran que estos compuestos no producen ni irritación dérmica ni reacciones alérgicas [37].

3. Toxicidad gastrointestinal

A nivel gastrointestinal el número de estudios realizados es menor, no

obstante, *in vitro*, distintas NP como nanotubos de carbono [38], NP de platino [39] o puntos cuánticos de CdSe [40] han demostrado inducir efectos tóxicos tales como reducción de la viabilidad, alteración de la integridad del ADN, etc.

4. Otros efectos tóxicos

Diversos modelos celulares como células renales [41] hepáticas [42] o neuronales [43] también han mostrado sensibilidad a distintos tipos de NP.

En relación a la toxicidad sistémica de las NP, se han realizado ensayos de toxicidad aguda principalmente, que no identifican en su mayoría los órganos diana y en los que la caracterización del nanomaterial empleado es bastante limitada. No obstante, de forma general, los resultados de estos estudios muestran unos datos de dosis letal media en el rango de mg/kg a g/kg, lo que se considera de ligera a moderadamente tóxico [12].

Diversos tipos de NP han demostrado tener potencial genotóxico e interactuar con el ADN lo que puede iniciar o promover cáncer y afectar a la fertilidad [44]. Todos estos efectos adversos sobre la salud que se están observando a nivel experimental ponen de manifiesto la necesidad de evaluar la relación riesgo/beneficio del uso de la nanotecnología.

Marco legislativo

Actualmente no existe legislación específica sobre la nanotecnología y los nanomateriales. Así, en el reglamento (CE) N 1907/2006, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos [45] no hay ninguna referencia explícita a los nanomateriales. Sin embargo, los nanomateriales entran dentro de la definición de “sustancia” incluida en el REACH.

Según la Comunicación Europea “Nanociencias y nanotecnologías: Un plan de acción para Europa 2005-2009” [46] todos los usos y aplicaciones de las nanociencias y nanotecnologías deben satisfacer el nivel elevado de protección de la población, la salud, la seguridad, los consumidores y los trabajadores, así como el medio ambiente a que aspira la Comunidad.

En la Comunicación Europea “Aspectos reguladores de los nanomateriales” [47] se establece que la legislación actual cubre en gran medida los riesgos derivados de las NP. No obstante, esta normativa puede tener que modificarse en el futuro en base a la nueva información disponible.

El Parlamento Europeo en relación con los nanomateriales [48] recoge entre otras premisas que los beneficios de los nanomateriales sólo pueden ser tenidos en cuenta dentro de un marco de regulación conciso en el que se exponga la verdadera naturaleza de los problemas de salud relacionados con los nanomateriales; que la legislación debe actualizarse conforme se vayan conociendo nuevos datos sobre los nanomateriales; que se debe proteger por encima de todo la salud humana y el medio ambiente; el público tiene que estar informado de los productos que contienen nanomateriales; que hay que desarrollar protocolos de control para prevenir riesgos de exposición en los trabajadores; limitar los derechos de patentes a aplicaciones específicas o métodos de producción; etc.

Las nanotecnologías, por lo tanto, constituyen un área prioritaria para la UE, en particular en lo que se refiere a investigación sobre su seguridad en el hombre y el medio ambiente, lo que se pone de manifiesto por el presupuesto destinado a esta línea en el 7º Programa

Marco [49]. En este sentido, la Comisión ha publicado una recomendación relativa a un código de conducta en la investigación sobre nanociencias y nanotecnologías [50].

Según Handy y Shaw (2007), nos encontramos todavía en una fase de recopilación de datos y aún no se puede llevar a cabo una evaluación del riesgo general del uso de las nanotecnologías en el contexto de la salud pública. Será en función de los resultados de esa evaluación cuando se tendrán que poner en marcha medidas de gestión por parte de los organismos reguladores.

Conclusiones

La población está expuesta a un gran número de NP tanto de origen natural como manufacturadas. La exposición se puede dar por vía inhalatoria, dérmica, oral o parenteral y va a aumentar en los próximos años como consecuencia de la aplicación de las nanotecnologías a una gran variedad de campos como el tecnológico, alimentario, médico, etc. Las investigaciones actuales sugieren que las NP pueden producir efectos tóxicos para la salud, por lo que se hace necesario evaluar la relación riesgo/beneficio de las mismas y que los organismos reguladores establezcan las medidas adecuadas en función de los resultados que se obtengan.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía la financiación del proyecto PI00192/2007.

Bibliografía

1. Medina C, Santos-Martínez MJ, Radomski A, Corrigan OI, Radomski MW (2007) Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. *Br J Pharmacol* 150:552-558
2. Sajja HK, East MP, Mao H, Wang YA, Nie S, Yang L (2009) Development of multifunctional nanoparticles for targeted drug delivery and noninvasive imaging of therapeutic effect. *Curr Drug Discov Technol* 6:43-51
3. Dreher KL (2004) Health and Environmental Impact of Nanotechnology: Toxicological Assessment of Manufactured Nanoparticles. *Toxicol Sci* 77:3-5
4. Gutiérrez-Praena D (2009) Evaluación toxicológica de nanotubos de carbono funcionalizados con ácido carboxílico en la línea celular intestinal humana Caco-2 como estudio previo a su potencial utilización médica. Trabajo fin de Máster Ciencia, Tecnología y Uso Racional del Medicamento, Universidad de Sevilla.
5. Casals E, Vázquez-Campos S, Bastús NG, Puntès V (2008) Distribution and potential toxicity of engineered inorganic nanoparticles and carbon nanostructures in biological systems. *Trends Analyt Chem* 27(8):672-683
6. 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
7. Brayner R (2008) The toxicological impact of nanoparticles.

- Nanotoday 3:1-2, 48-55
8. Ray PC, Yu H, Fu PP (2009) Toxicity and Environmental Risks of Nanomaterials: Challenges and Future Needs. *J Environ Sci Health C* 27:1-35
 9. Ibaldo-Mulli A, Wichmann HE, Kreyling W, Peters A (2002) Epidemiological Evidence on Health Effects of Ultrafine Particles. *J Aerosol Med* 15(2):189-201
 10. Nohynek GJ, Lademann J, Ribaud C, Roberts MS (2007) Grey goo on the skin? Nanotechnology, cosmetic and sunscreen safety. *Crit Rev Toxicol* 37:251-277
 11. Ryman-Rasmussen JP, Riviere JE, Monteiro-Riviere NA (2006) Penetration of intact skin by quantum dots with diverse physicochemical properties. *Toxicol Sci* 91:159-165
 12. Stern ST, McNeil SE (2008) Nanotechnology Safety Concerns Revisited. *Toxicol Sci* 101(1):4-21
 13. Bouwmeester H, Dekkers S, Noordam MY, Hagens WI, Bulder AS, Cees de Heer, ten Voorde SECG, Wijnhoven SWP, Marvin HJP, Sips AJAM (2009) Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production. *Regul Toxicol Pharmacol* 53:52-62
 14. Watanabe J, Iwamoto S, Ichikawa S, (2005) Entrapment of some compounds into biocompatible nano-sized particles and their releasing properties. *Colloids Surf B Biointerfaces* 42:141-146
 15. Jani P, Halbert GW, Langridge J, Florence AT (1990) Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa: quantitation and particle size dependency. *J Pharm Pharmacol* 42:821-826
 16. Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W, Cox C (2004) Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol* 16:437-445
 17. Elder A, Gelein R, Silva V, Feikert T, Opanashuk L, Carter J, Potter R, Maynard A, Ito Y, Finkelstein J, Oberdörster G. (2006). Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system. *Environ Health Perspect* 114: 1172-1178
 18. Wang B, Feng W, Wang M, Wang T, Gu Y, Zhu M, Ouyang H, Shi J, Zhang F, Zhao Y, Chai Z, Wang H, Wang J (2008) Acute toxicological impact of nano and submicro-scaled zinc oxide powder on healthy adult mice. *J Nanopart Res* 10:263-276
 19. Tanaka T, Decuzzi P, Cristofanilli M, Sakamoto JH, Tasciotti E, Robertson FM, Ferrari M (2009) Nanotechnology for breast cancer therapy. *Biomed Microdevices* 11:49-63
 20. Kasuya T, Kuroda S (2009) Nanoparticles for human liver-specific drug and gene delivery systems: *in vitro* and *in vivo* advances. *Expert Opin Drug Deliv* 6(1): 9-52
 21. European Food Safety Authority (2009). The Potential Risks Arising from Nanoscience and Nanotechnologies on Food and Feed Safety. Question No EFSA-Q-2007-124a. The EFSA Journal, 958:1-39.
 22. Radomski A, Jurasz P, Alonso-Escolano D, Drews M, Morandi M, Malinski T, Radomski MW (2005) Nanoparticle-induced platelet aggregation and vascular thrombosis. *Br J Pharmacol* 146:882-893
 23. Shvedova AA, Kisin ER, Mercer R, Murray AR, Johnson VJ, Potapovich AI, Tyurina YY, Gorelik O, Arepalli S, Schwegler-Berry D, Hubbs AF, Antonini J, Evans DE, Ku BK, Ramsey D, Maynard A, Kagan VE, Castranova V, Baron P (2005) Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289:698-708
 24. Hussain SM, Javorina A, Schrand AM, Duhart H, Ali SF, Schlager JJ (2006) The interaction of manganese nanoparticles with PC-12 cells induces dopamine depletion. *Toxicol Sci* 92:456-463
 25. Chen Z, Meng H, Xing G, , Zhao Y, Jia G, Wang T, Yuan H, Ye C, Zhao F, Chai Z, Zhu C, Fang X, Ma B, Wan L (2006) Acute toxicological effects of copper nanoparticles *in vivo*. *Toxicol Lett* 163:109-120
 26. Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J (2005b) Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 113:823-839
 27. Klaine SK, Alvarez PJ, Batley GE, Fernandes TF, Handy RD, Lyon DY, Mahendra S, McLaughlin MJ, Lead JR (2008) Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environ Toxicol Chem* 27 (9):1825-1851
 28. Pulskamp K, Diabaté S, Krug HF (2007) Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species independence on contaminants. *Toxicol Lett* 168: 58-74
 29. Diabaté S, Mühlhopt S, Paur HR, Wottrich R, Krug HF (2002) In vitro effects of incinerator fly ash on pulmonary macrophages and epithelial cells. *Int J Hyg Environ Health* 204:323-326
 30. Stone V, Donaldson K (2006) Nanotoxicology. Signs of stress. *Nat Nanotechnol* 1:23-24
 31. Lin W, Huang Y, Zhou XD, Ma Y (2006) Toxicity of Cerium Oxide Nanoparticles in Human Lung Cancer Cells. *Int J Toxicol* 25:451-457
 32. Singh S, Shi T, Duffin R, Albrecht C, van Berlo D, Höhr D, Fubini B, Martra G, Fenoglio I, Boro PJA, Schins RPF (2007) Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO₂: Role of the specific surface area and of surface methylation of the particles. *Toxicol Appl Pharmacol* 222:141-151
 33. Liu R, Yin L, Pu Y, Liang G, Zhang J, Su Y, Xiao Z, Ye B (2009) Pulmonary toxicity induced by three forms of titanium dioxide nanoparticles via intra-tracheal instillation in rats. *Prog Nat Sci* 19:573-579
 34. Warheit DB, Laurence BR, Reed KL, Roach DH, Reynolds GAM, Webb TR (2004) Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. *Toxicol Sci* 77:117-12
 35. Shvedova AA, Castranova V, Kisin ER, Schwegler-Berry D, Murria AR, Gandelsman VZ, Maynard A, Baron P (2003) Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. *J Environ Sci Health A* 66:1909-192
 36. Murray AR, Kisin E, Leonarda SS, Younga SH, Komminenia C, Kagan VE, Castranova V, Shvedova AA (2009) Oxidative stress and inflammatory response in dermal toxicity of single-walled carbon nanotubes. *Toxicology* 257:161-171
 37. Huczko A, Lange H (2001) Carbon nanotubes: experimental evidence for a null risk of skin irritation and allergy. *Fullerene Sci Technol* 9(2):247-250
 38. Jos A, Pichardo S, Puerto M, Sánchez E, Grilo A, Cameán AM (2009) Cytotoxicity of carboxylic acid functionalized single wall

- carbon nanotubes on the human intestinal cell line Caco-2. *Toxicol in Vitro*. Aceptado. DOI:10.1016/j.tiv.2009.07.001
39. Pelka J, Gehrke H, Esselen M, Türk M, Crone M, Bräse S, Muller T, Blank H, Send W, Zibat V, Brenner P, Schneider R, Gerthsen D, Marko D (2009) Cellular Uptake of Platinum Nanoparticles in Human Colon Carcinoma Cells and Their Impact on Cellular Redox Systems and DNA Integrity. *Chem Res Toxicol* 22: 649-659
40. Wang L, Nagesha DK, Selvarasah S, Dokmeci MR, Carrier RL (2008b) Toxicity of CdSe Nanoparticles in Caco-2 Cell Cultures. *J Nanobiotechnol* 6:11
41. Cui D, Tiana F, Ozkanb CS, Wanga M, Gaoa H (2005) Effect of single wall carbon nanotubes on human HEK293 cells. *Toxicol Lett* 155: 73-85
42. Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, Geiss KT, Schlager JJ (2005) In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol in Vitro* 19:975-983
43. Jeng HA, Swanson J (2006) Toxicity of Metal Oxide Nanoparticles in Mammalian Cells. *J Environ Sci Health A* 41:2699-2711
44. Singh N, Manshian B, Jenkins GJ, Griffiths SM, Williams PM, Maffei TG, Wright CJ, Doak SH (2009) NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials* 30:3891-3914
45. Reglamento (CE) n° 1907/2006 del Parlamento Europeo del Consejo de 18 de diciembre de 2006 relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH), por el que se crea la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos, se modifica la Directiva 1999/45/CE y se derogan el Reglamento (CEE) n° 793/93 del Consejo y el Reglamento (CE) n° 1488/94 de la Comisión así como la Directiva 76/769/CEE del Consejo y las Directivas 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE y 2000/21/CE de la Comisión. *Diario Oficial de la Unión Europea* L 396/1 de 30/12/2006
46. European Commission Communication, "Nanosciences and nanotechnologies: an action plan for Europe 2005-2009" 2005. COM(2005)243 final of 7.6.2005
47. European Commission Communication, "Regulatory aspects of nanomaterials". COM(2008)366 final of 17.6.2008
48. European Parliament Committee on the Environment, Public Health and Food Safety, Draft report on regulatory aspects of nanomaterials (2008/2208(INI)) of 19.1.2009
49. EuroNanoForum 2009. Nanotechnology for Sustainable Economy. European and International. Forum on Nanotechnology. Conclusions. Prague (Czech Republic) 2-5 June 2009. European Research Area. European Commission
50. Commission of the European Communities (2008) Commission recommendation of 07/02/2008 on a code of conduct for responsible nanosciences and nanotechnologies research. C (2008)424 final