




ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Biociències

Departament de Genètica i de Microbiologia

Grup de Mutagènesi

**Desarrollo de métodos encaminados a mejorar
nuestra comprensión sobre los riesgos que
supone la exposición a nanoplásticos.**

TESIS DOCTORAL

Lourdes Vela Romero

2023



Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Biociències

Departament de Genètica i de Microbiologia

Grup de Mutagènesi

**Desarrollo de métodos encaminados a mejorar
nuestra comprensión sobre los riesgos que supone la
exposición a nanoplásticos.**

Tesis presentada respetuosamente por:

Lourdes Vela Romero

A la Universitat Autònoma de Barcelona en cumplimiento parcial de los requisitos para
la obtención del título de Doctor en Genética, según el Programa de Doctorado en
Genética

Bajo la supervisión del Dr. Ricard Marcos Dauder, la Dra. Alba Hernández Bonilla y la
Dra. Susana Pastor Benito

AGRADECIMIENTOS

Ha sido un largo y gratificante camino recorrido en estos cuatro años de Tesis Doctoral en los cuales gracias a la colaboración y apoyo de muchas personas esta Tesis ha podido ser desarrollada y completada con éxito.

En primer lugar, quiero agradecer de manera muy especial a mis directores de Tesis, el Dr. Ricard Marcos, la Dra. Alba Hernández y la Dra. Susana Pastor por abrirme las puertas del Grupo de Mutagénesis de la UAB y permitirme desarrollar mi investigación bajo su orientación y apoyo continuo. Gracias por la confianza brindada aún desde antes de mi llegada al grupo de investigación.

También, agradezco a Josefa Domenech por su ayuda en la primera fase de mi investigación y por servir de guía en el camino. A Aliro Villacorta y Michelle Morataya por todo su apoyo, ayuda y colaboración en la realización de los artículos científicos y de este trabajo. A todos mis amigos del grupo de investigación: Irene, Javi, Laura, Alba, Bala, Gooya, Ali, Joan, y Jessica por brindarme su compañía, motivación y distracción en las largas jornadas de trabajo. Gracias especiales a Glòria Umbert y Cristian Valiente por su invaluable ayuda en el laboratorio.

Asimismo, agradezco el apoyo de la Fundación Carolina y de la Universidad UTE que me han otorgado la beca y el apoyo necesario para poder realizar mis estudios doctorales a lo largo de estos 4 años. De igual manera quiero agradecer el apoyo del proyecto Plasticheal que ha contribuido al desarrollo de este trabajo.

Gracias a todas las personas que conocí a lo largo de cada una de mis estancias doctorales y me brindaron su apoyo haciendo que el camino sea menos complicado. Especialmente gracias a Jennifer y a Samuel, siempre tendrán un lugar especial en mi corazón.

Finalmente, quisiera expresar mi gratitud a mi familia, especialmente mis padres y mi hermana por su amor, apoyo, comprensión y paciencia durante todo este tiempo.

A la persona más importante en mi vida, mi esposo Jorge, por su apoyo incondicional en esta meta profesional. Por estar siempre a mi lado, acompañándome y dándome fuerzas

para que pueda continuar y terminar el objetivo que nos propusimos. Gracias por ser el mejor compañero de vida y por ser el mejor apoyo que pueda tener. Gracias por motivarme e impulsarme a ser cada día mejor.

Gracias de nuevo a todos aquellos que formaron parte de esta difícil pero extraordinaria parte de mi vida, gracias por su tiempo, sus experiencias y por contribuir con mi formación académica.

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
Ag⁺	Ion de plata
AgNO₃	Nitrato de plata
AgNPs	Nanoplata
Caco-2	Células derivadas de adenocarcinoma de colon humano
COP	Contaminantes orgánicos persistentes
CRM	Microscopía confocal Raman
dfPSNPLs	Nanopoliestireno digerido fluorescente
DHE	Dihidroetidio
DLS	Dispersión dinámica de luz
dPSNPLs	Nanopoliestireno digerido
EPS	Poliestireno expandido
FPG	Formamidopirimidina DNA glycosilasa
fPSNPLs	Nanopoliestireno fluorescente
FTIR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
ICP-MS	Espectrometría de masas por plasma acoplado inductivamente
MNPLs	Micro y nanoplásticos
MPLs	Microplásticos
NPLs	Nanoplásticos
NTA	Análisis del tamaño de nanopartículas
ODD	Daño oxidativo al DNA
OECD	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico
PdI	Índice de polidispersidad
PE	Polietileno
PE-HD	Polietileno de alta densidad
PE-LD	Polietileno de baja densidad
PE-LLD	Polietileno lineal de baja densidad
PE-MD	Polietileno de media densidad

PET	Polietileno tereftalato
PET(Ti)NPLs	Nanopartículas de polietileno tereftalato con dióxido de titanio
PETNPLs	Nanopartículas de polietileno tereftalato
PP	Polipropileno
PPE	Equipos de protección personal
PS	Poliestireno
PSMNPLs	Micro/nanoesferas de poliestireno
PSNPLs	Nanopoliestireno
PUR	Poliuretano
PVC	Cloruro de polivinilo
Raji-B	Línea celular linfocítica humana
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SEM	Microscopía Electrónica de Escaneo
TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión
THP-1	Línea celular monocítica humana
TiO₂	Dióxido de titanio
TiO₂NPs	Nanopartículas de dióxido de titanio
TK6	Línea celular linfoblástica

ABSTRACT

In the past few years, the growing production/consumption of plastic has turned plastics into the world's largest pollutant. When plastics are released into the environment, they reduce their size range into micro/nano plastics (MNPLs) by the effects of many environmental factors. The ubiquity of these nanoparticles and the fact that they can display different physicochemical properties, compared with their original versions, have raised growing concerns about their risks to the environment and to human health. Moreover, the ability of MNPLs to act as vectors of heavy metals, or to release the additives or persistent organic pollutants incorporated during their manufacture, raises concerns about their potential risk.

Human exposure to MNPLs takes place through inhalation, dermal contact, and food ingestion, the last one being the main route of entry of MNPLs into humans. Once MNPLs enter the human body via ingestion (or alternatively via inhalation) they must pass through different compartments of the gastrointestinal tract that may affect different physicochemical properties and surface features. To effectively analyze the toxicity of MNPLs, we determined the potential effects of *in vitro* digestion on the physicochemical/biological characteristics of polystyrene nanoplastics (PSNPLs). In our study, an *in vitro* digestion process was performed on pristine polystyrene (PSNPLs) and on its fluorescent counterpart (fPSNPLs) resulting in their digested products (dPSNPLs and dfPSNPLs). Using transmission electron microscopy (TEM), scanning electron microscopy (SEM), and dynamic light scattering (DLS) methodologies we have determined that no changes in the size of the particle, or in their surface were observed. Nevertheless, the digested particles show a relevant tendency to agglomerate, and by using confocal Raman microspectroscopy (CRM) we have determined a differential presence of proteins on their surface. Regarding cell uptake, digested PSNPLs showed greater cell uptake than undigested PSNPLs in all three tested cell lines (TK6, Raji-B, and THP-1). Despite these differences in cell uptake, no differences in intracellular ROS production, nor oxidative damage were observed. Finally, genotoxic damage induction was detected but only at the highest concentrations in THP1 cells. This indicates that the

greater ability of digested PSNPLs to internalize was not accompanied by greater hazardous effects.

In addition to the hazard that MNPLs represent by themselves, these plastic particles can adsorb other pollutants or heavy metals from the environment and, consequently, transport and transfer them to different organisms through ingestion, inhalation, and skin contact, potentially increasing their toxicity. Thus, in our second chapter, we have evaluated the possible interactions between nanopolystyrene (PSNPLs) and silver materials (AgNPs and silver nitrate) and their effects on human Intestinal Caco-2 cells. Using TEM microscopy, we confirmed the adsorption between the nanopolystyrene particles and the silver particles, and the spectra obtained through TEM-EDX confirmed the presence of the metal in the formed complexes. Furthermore, we have detected that the amount of silver (nanosilver and ionic silver) increases significantly as nanopolystyrene concentrations increase. Using Caco-2 cells and confocal microscopy, we have observed the co-localization of nanopolystyrene/nanosilver in different cellular compartments, including the cell nucleus. Despite the internalization of these complexes in the Caco-2 cells, no increases in the ROS levels, nor genotoxic damage induction was detected in a dose-dependent manner of nanopolystyrene.

The hazard of the environmental MNPLs not only increases if they adsorb contaminants from the environment but, during their production unsafe products, such as additives, are added to increase the properties of the polymers and prolong their life. Among such additives, metals can be pointed out. To better understand the complexity of these metals included in the plastic, in our third chapter, we used opaque PET milk bottles containing titanium nanoparticles to obtain their derivative nanoplastics [PET(Ti)NPLs] using the degradation method, via sanding, developed in the Group. We had success in obtaining such PET(Ti)NPLs that, as true-to-life MNPLs, can be very useful to better understand their potential hazards. In addition, this type of metal-doped MNPLs can be very useful to understand their fate when internalized by complex organisms. By using a wide set of tools such as TEM, SEM, DLS-MADLS, and FTIR the obtained PET(Ti)NPLs were extensively characterized. The nanometric size of the particles was verified and their morphology was characterized. In addition, the presence of Ti together with the PET

particles was confirmed, and using confocal microscopy and flow cytometry, we detected the internalization of PET(Ti)NPLs in the three studied cell lines (TK6, Raji-B, and THP-1), being THP1 the one that internalizes the most. Despite the cell internalization of the PET(Ti)NPLs particles, the study does not show any increase in cell toxicity, as a preliminary approach. Further studies are required to have a more complete view of their harmful effects on cells.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LOS PLÁSTICOS	1
1.2. PRODUCCIÓN Y CONSUMO DE PLÁSTICO	2
1.3. CONTAMINACIÓN AMBIENTAL POR PLÁSTICO	4
1.3.1. Microplásticos y nanoplásticos	5
1.4. PELIGRO POTENCIAL DE LOS MNPLs EN EL AMBIENTE	7
1.5. PRINCIPALES VÍAS DE EXPOSICIÓN EN LOS SERES HUMANOS A MICRO Y NANOPLÁSTICOS	9
1.5.1. Inhalación	9
1.5.2. Vía dérmica	10
1.5.3. Vía oral	11
1.5.3.1. El sistema digestivo como principal vía de ingreso y translocación de los micro y nanoplásticos en el cuerpo humano	12
1.5.3.2. Efecto de la digestión sobre las características o comportamiento de los micro y nanoplásticos	15
1.5.3.3. Formación de la corona de proteínas	16
1.6. RIESGOS POTENCIALES DE LOS MICRO Y NANOPLÁSTICOS PARA LA SALUD HUMANA	18
1.6.1. Citotoxicidad	18
1.6.2. Daño oxidativo y apoptosis	19
1.6.3. Inflamación	20
1.6.4. Alteraciones del sistema inmune	21
1.6.5. Genotoxicidad	22
1.7. LOS MNPLs COMO VECTORES DE CONTAMINANTES AMBIENTALES ...	24
1.8. MICRO y NANOPLÁSTICOS AMBIENTALMENTE REPRESENTATIVOS	26
1.8.1. MNPLs fabricados a partir de muestras ambientales de plásticos	26
1.8.2. Metodologías para la localización de los MNPLs en el interior de las estructuras celulares	27
2. OBJETIVOS	31
3. JUSTIFICACIÓN, METODOLOGÍA, RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
3.1. CAPÍTULO 1: Efecto potencial de la digestión <i>in vitro</i> en las características fisicoquímicas y biológicas de los nanoplásticos de poliestireno	33

3.1.1. JUSTIFICACIÓN	33
3.1.2. MATERIALES Y MÉTODOS	34
3.1.2.1. Partículas de nanopoliestireno utilizadas, digestión <i>in vitro</i> y dispersión de las muestras	34
3.1.2.2. Caracterización de las partículas de poliestireno digeridas y sin digerir	35
3.1.2.2.1. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	35
3.1.2.2.2. Microscopía electrónica de escaneo (SEM)	36
3.1.2.2.3. Dispersión dinámica de luz (DLS) y potencial Zeta	36
3.1.2.2.4. Análisis del tamaño de nanopartículas (NTA)	36
3.1.2.2.5. Microscopía confocal Raman (CRM)	37
3.1.2.3. Líneas celulares y cultivos	37
3.1.2.4. Viabilidad celular	37
3.1.2.5. Detección de internalización celular por citometría de flujo	38
3.1.2.6. Localización intracelular de fPSNPLs y dfPSNPLs mediante microscopía confocal	38
3.1.2.7. Cuantificación de especies reactivas de oxígeno (ROS)	38
3.1.2.8. Inducción al daño genotóxico y oxidativo del DNA	39
3.1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
3.1.3.1. Caracterización de las partículas	40
3.1.3.1.1. Morfología, distribución de tamaños en estado seco y forma	40
3.1.3.1.2. Distribución del tamaño en solución acuosa y potencial Zeta	42
3.1.3.1.3. Análisis de nanoseguimiento (NTA)	43
3.1.3.2. Visualización y caracterización de las proteínas en la superficie de las partículas de PS	44
3.1.3.3. Detección de internalización celular por citometría de flujo	47
3.1.3.4. Detección de internalización por microscopía confocal	48
3.1.3.5. Ensayo de citotoxicidad	49
3.1.3.6. Producción intracelular de ROS	50
3.1.3.7. Daño genotóxico y oxidativo	52
3.1.4. CONCLUSIONES	54
3.2. CAPÍTULO 2: Nanopartículas de poliestireno como vectores de metales. Interacción de las partículas de nanopoliestireno con nanopartículas de plata y con nitrato de plata, y sus efectos en las células intestinales humanas Caco-2.	57

3.2.1. JUSTIFICACIÓN	57
3.2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	58
3.2.2.1. Dispersión y caracterización de los materiales de plata y de las nanopartículas de poliestireno.....	58
3.2.2.2. Interacciones entre plata/PSNPLs en medios de dispersión.....	59
3.2.2.3. Cultivos celulares y reactivos.....	60
3.2.2.4. Tratamientos de plata y nanopoliestireno	60
3.2.2.5. Ensayo de viabilidad celular.....	60
3.2.2.6. Colocalización intracelular de AgNPs y de fPSNPLs	61
3.2.2.7. Cuantificación de la absorción de plata mediante ICP-MS	61
3.2.2.8. Producción intracelular de ROS.....	62
3.2.2.9. Inducción de daño genotóxico y oxidativo en el DNA	62
3.2.2.10. Análisis estadístico.....	64
3.2.3. RESULTADOS	64
3.2.3.1. Caracterización de AgNPs y PSNPLs.....	64
3.2.3.2. Determinación de la interacción entre plata/PSNPLs en dispersión ...	65
3.2.3.3. Ensayo de citotoxicidad	67
3.2.3.4. Colocalización intracelular de complejos AgNPs/fPSNPLs.....	69
3.2.3.5. Cuantificación de la captación de plata.....	70
3.2.3.6. Producción de ROS intracelular.....	71
3.2.3.7. Determinación de la genotoxicidad y el daño oxidativo en el DNA	72
3.2.4. DISCUSIÓN.....	74
3.2.5. CONCLUSIONES.....	82
3.3. CAPÍTULO 3: Obtención de nanopartículas de PET dopadas con titanio de origen ambiental como modelo realista de nanoplástico.	83
3.3.1. JUSTIFICACIÓN	83
3.3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	86
3.3.2.1. Obtención de nanoplásticos de PET(Ti).....	86
3.3.2.2. Caracterización de las partículas de PET(Ti)NPLs	87
3.3.2.2.1. Caracterización del PET(Ti)NPLs mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectroscopía de rayos X de dispersión de energía (EDS)	87
3.3.2.2.2. Caracterización de PET(Ti)NPLs por dispersión de luz dinámica y multiángulo (DLS MADLS), y el potencial zeta	87

3.3.2.2.3.	Caracterización de PET(Ti)NPLs por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	87
3.3.2.2.4.	Caracterización de PET(Ti)NPLs por espectroscopia de masas ..	88
3.3.2.3.	Marcado de PET(Ti)NPL y visualización por microscopía confocal	88
3.3.2.4.	Cultivo de células	89
3.3.2.5.	Internalización celular de PET(Ti)NPL (complejidad interna), determinada por citometría de flujo	90
3.3.2.6.	Determinación de la internalización celular de PET(Ti)NPLs por microscopía confocal	90
3.3.2.7.	Perfil toxicológico de PET(Ti)NPLs en las líneas celulares utilizadas.	90
3.3.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	91
3.3.3.1.	Distribución de tamaño y forma en estado seco	92
3.3.3.2.	Morfología y composición en estado seco	93
3.3.3.3.	Distribución de tamaños de PET(Ti)NPL y potencial Zeta en solución acuosa	94
3.3.3.4.	Determinación química del PET(Ti)NPLs y cuantificación del contenido de Ti	96
3.3.3.5.	Marcaje de PET(Ti)NPL y visualización a través de microscopía confocal	97
3.3.3.6.	Evaluación de la internalización celular	99
3.3.3.7.	Toxicidad del PET(Ti)NPLs	101
3.3.4.	CONCLUSIONES	103
4.	DISCUSIÓN	105
5.	CONCLUSIONS	123
6.	REFERENCIAS	125
7.	ANEXOS	141
7.1.	Alternatives for Fluorescent Nanoplastic labelling for biological applications with focus on time optimization & True to life MNPLs tracking	141

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LOS PLÁSTICOS

Los plásticos son productos sintéticos fabricados de polímeros orgánicos a los cuales se les añaden aditivos químicos para darles las propiedades requeridas para sus propósitos comerciales como son el: color, resistencia a radiación solar, resistencia al calor, y transparencia, entre otras (Gigault et al., 2018; Jiang et al., 2020). En las últimas décadas se han convertido en los materiales más utilizados en una amplia variedad de aplicaciones comerciales, debido principalmente a su bajo costo, versatilidad y fácil producción, pudiendo fácilmente sustituir a otros materiales como el vidrio, metal, madera y fibras naturales (PlasticsEurope, 2020; Çobanoğlu et al., 2021). El rápido crecimiento de la industria del plástico se debe a las características únicas de los materiales producidos como: alta resistencia, alta maleabilidad, impermeabilidad a los líquidos, resistencia a la degradación física y química y bajo costo, constituyendo una inmensa familia de materiales únicos y versátiles cuyas características pueden ser modificadas en función de las necesidades (OECD, 2022).

De acuerdo con sus propiedades físicas se pueden clasificar en dos grupos: termoplásticos y termoestables. Se habla de termoplásticos cuando estos polímeros se derriten al calentarse y al ser enfriados se endurecen. Esta característica permite que el material sea recalentado, remodelado y enfriando rápidamente. Materiales como: polietileno (PE), polipropileno (PP), cloruro de polivinilo (PVC), polietileno tereftalato (PET), poliestireno (PS) y poliestireno expandido (EPS) son algunos ejemplos de termoplásticos. Por otro lado, cuando se habla de la familia de plásticos termoestables son aquellos que sufren una modificación química al ser calentados, creando una estructura tridimensional que no puede ser reversible. Como ejemplos de plásticos termoestables tenemos al poliuretano (PUR), los poliésteres no saturados, las resinas epóxicas, las resinas de melaminas, y los vinil ésteres entre otros (Millet et al., 2018) (Figura 1).

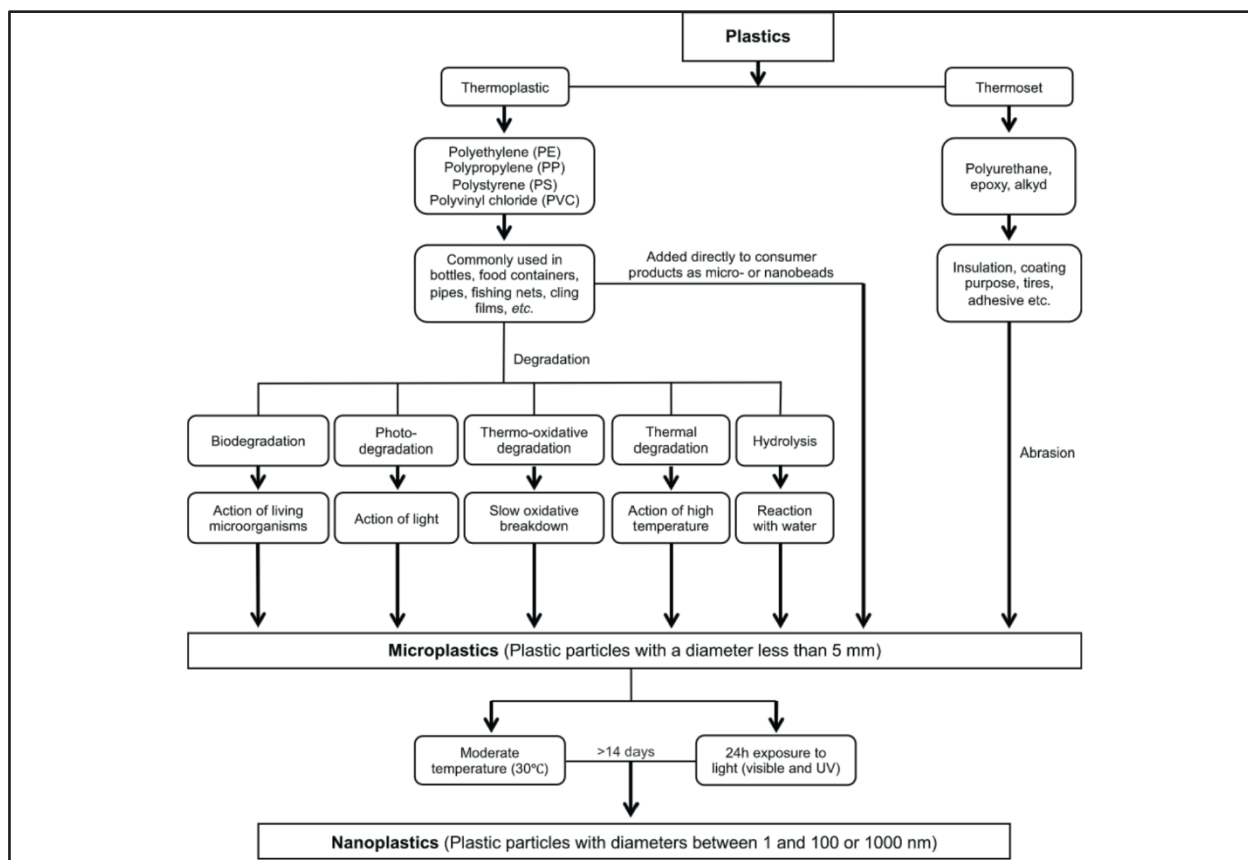


Figura 1. Tipos de plásticos y patrones de degradación ambiental. (Fuente: Jiang et al., 2020)

1.2. PRODUCCIÓN Y CONSUMO DE PLÁSTICO

En las últimas décadas la producción y consumo de plástico ha incrementado significativamente. En el año 2000 la producción de plástico fue de alrededor de 234 millones de toneladas por año, y en el año 2019 la producción fue de alrededor de 460 millones de toneladas (OECD, 2022). En el año 2020 la pandemia provocada por la COVID-19 tuvo un impacto relevante en el uso del plástico. Por un lado, el uso de plásticos en la industria y a nivel comercial se vio reducida por la cuarentena, lo cual representó una disminución temporal en la producción de plástico en un 2,2% comparado con el año 2019. Sin embargo, debido a la alta demanda de equipos de protección personal (PPE), como las mascarillas o los trajes de bioseguridad, se incrementó la producción de plástico para uso biomédico en un 17% y, adicionalmente, se incrementó

en un 40% el uso de plástico para embalaje debido al aumento en el consumo de comida para llevar y las compras en línea (Patrício et al., 2021) (Figura 2).

After a stagnation in 2020 due to the Covid-19 pandemic, the global plastics production increased to 390.7 million tonnes in 2021.

in million tonnes

Fossil-based plastics¹

Post-consumer recycled plastics²

Bio-based plastics (including bio-attributed plastics in 2021 data)³

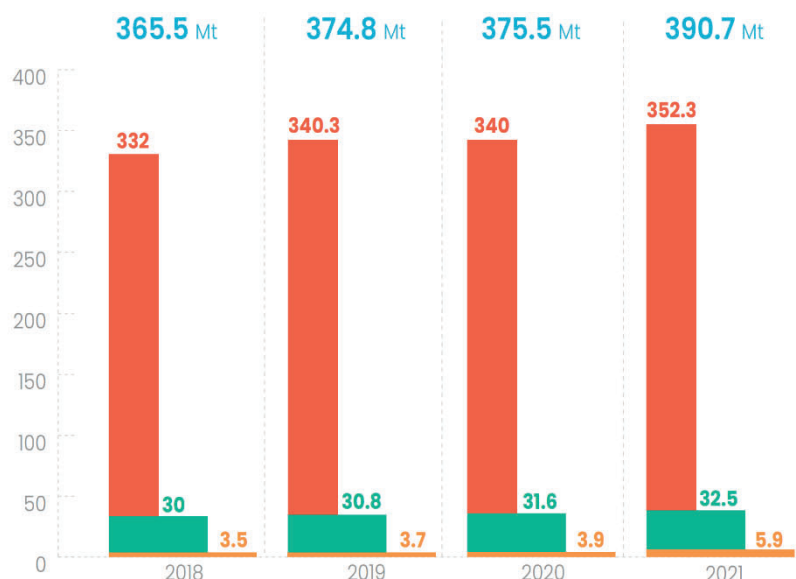


Figura 2. Incremento en la producción mundial de plástico en los últimos años. (Fuente: PlasticsEurope,2022).

De acuerdo con datos de PlasticsEurope 2022, en el año 2021 las industrias que más utilizaron plástico a nivel mundial fueron las de empaquetamiento y las de construcción,

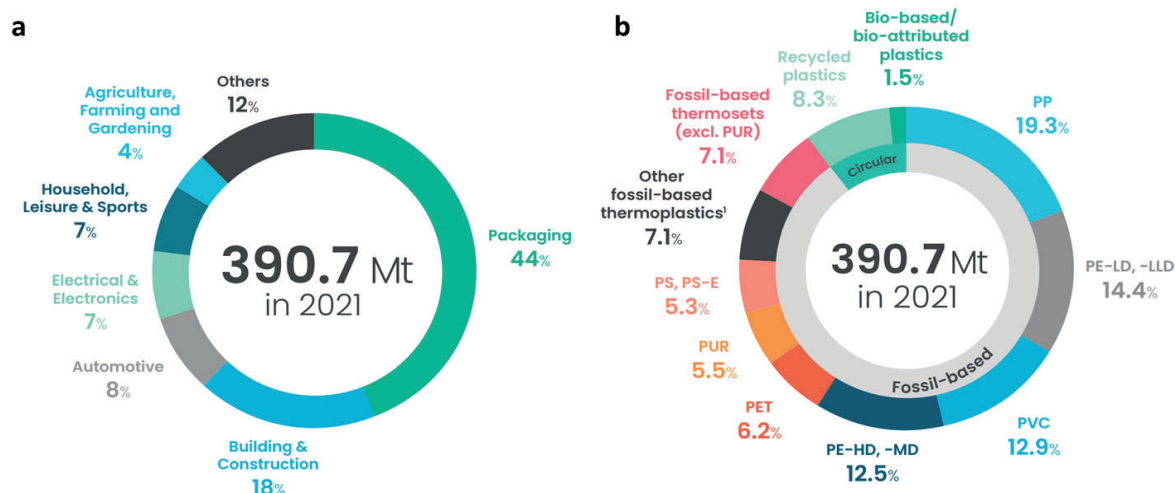


Figura 3. Principales industrias a nivel mundial que utilizan plástico a) y tipos de resinas más utilizadas a nivel mundial b) (Fuente: PlasticsEurope,2022).

seguidas por la industria automotriz y la industria eléctrica y electrónica (Plastic Market Size, Share & Trends, 2022; PlasticsEurope, 2022) (Figura 3a).

A nivel mundial, en el año 2021, y de acuerdo con el tipo de resina, los polímeros plásticos más utilizados fueron: polipropileno (PP, 19,4%), polietileno de baja densidad y polietileno linear de baja densidad (PE-LD & PE-LLD, 14,4%), cloruro de polivinilo (PVC, 12,9%) y polietileno de alta y de media densidad (PE-HD & PE-MD, 12,5%) (PlasticsEurope, 2022) (Figura 3b).

1.3. CONTAMINACIÓN AMBIENTAL POR PLÁSTICO

Algunas de las características de los plásticos que los hacen únicos y deseables también pueden suponer inconvenientes. Son altamente resistentes a la degradación física y química, por lo cual pueden persistir en el ambiente por décadas. Así, el incremento en la producción y consumo de plástico también ha incrementado la cantidad anual de residuos plásticos que entran al ambiente en todo el mundo. En el año 2000 la cantidad de residuos plásticos generados fue de 156 millones de toneladas, y en el año 2019 fue de 353 millones de toneladas. De estos residuos plásticos sólo el 9% son reciclados, el 19% son incinerados, cerca del 50% terminan en vertederos sanitarios controlados y los restantes 22% finalizan en vertederos de basura no controlados, quemados a cielo abierto o depositados en el ambiente (OECD, 2022). Adicionalmente, la pandemia de la COVID-19 ha incrementado la cantidad de los desechos plásticos en el ambiente debido al uso excesivo de plásticos de un solo uso, principalmente de PPE (Figura 4).

Cada año alrededor de 8 millones de toneladas de residuos plásticos entran a los océanos y más de 250.000 toneladas de plásticos se encuentran flotando en las superficies de los mismos (Banerjee & Shelper, 2021). A lo largo del tiempo, y debido a factores como la degradación microbiana, la exposición prolongada a la luz ultravioleta, el viento, las corrientes marinas o la abrasión física, los plásticos se pueden fragmentar en micro y/o en nanoplásticos (MNPLs).

1.3.1. Microplásticos y nanoplásticos

De acuerdo con su origen, los MNPLs se pueden clasificar en primarios y secundarios. Los primarios son aquellos que son fabricados a micro o nano escala y son utilizados como componentes principales de productos industriales como en los cosméticos o en los dentífricos; así, estos materiales pueden entrar directamente en el ambiente en la escala micro o nano. Los MNPLs secundarios son el resultado del fraccionamiento de residuos plásticos de un mayor tamaño, ellos incluyen embalajes plásticos, bolsas plásticas, bolsas de infusiones, o botellas plásticas, entre otros. En el ambiente, los plásticos sufren una degradación constante, permitiendo su transformación en micro y nanoplásticos (MNPLs) (Cortés et al., 2020). Este fraccionamiento puede ocurrir a través de procesos químicos o físicos y es dependiente del ambiente que les rodea (Bradney et al., 2019). Esta transformación se puede dar por un proceso de biodegradación o por degradación no biológica. La biodegradación viene dada por acción de bacterias ambientales y otros microorganismos que fragmentan los plásticos en MNPLs. La degradación térmica, la degradación física, la fotodegradación, la degradación termooxidativa, y la hidrólisis son ejemplos de degradación no biológica. La hidrólisis y la fotodegradación son procesos naturales en los cuales las moléculas de agua y la luz ultravioleta fragmentan las uniones químicas de los polímeros convirtiéndolos en formas monoméricas (Figura 1). Estos procesos de degradación alteran las propiedades mecánicas de las partículas de plástico e incrementan su área superficial específica, provocando cambios en las reacciones fisicoquímicas de estas moléculas, y alterando también las interacciones con los microorganismos (Yee et al., 2021).

Según su tamaño los podemos clasificar en microplásticos (MPLs) y en nanoplásticos (NPLs). Aunque el término micro/nanoplástico (MNPL) se usa cada vez más, no existe un acuerdo general sobre los límites existentes entre los tamaños de los microplásticos y de los nanoplásticos. En el campo de los nanomateriales, diseñados específicamente a dicho tamaño, se considera clásicamente que las nanopartículas generadas oscilan entre 1 y 100 nm, pero esta definición estricta deja fuera otros tamaños colocados en el rango nano. Esta originaria definición se ha tratado de replicar en el caso de los MNPLs; sin embargo, hay que recordar que los materiales diseñados por la industria se

construyen en el tamaño deseado y las dispersiones obtenidas son uniformes en tamaño. Por lo contrario, los MNPLs secundarios están constituidos por una amplia gama de tamaños y formas y es necesario cierto acuerdo para definir las fronteras entre MPLs y NPLs.

En la actualidad, muchos autores consideran que los MPLs son aquellos fragmentos plásticos con tamaños entre 5 mm y 100 nm, siendo los NPLs los que su tamaño oscila entre 1 y 100 nm (Banerjee & Shelver, 2021). Ante esta situación, Hartmann et al. (2019) propusieron categorizar los MNPLs de acuerdo con las unidades convencionales de tamaño: nano (1-1000 nm) y micro (1-1000 μ m). Sin embargo, para mantener la definición clásica de nanomaterial/nanoplástico, propusieron dividir el rango nano (1-1000 nm) entre nanoplásticos (1-100 nm) y plásticos submicrométricos (100-1000 nm). Esta clasificación es la que en esta Tesis se considera más adecuada, aunque se debe contar con el acuerdo general, principalmente de aquellos que provienen del campo de los nanomateriales. La división entre MPLs y NPLs es relevante ya que las partículas que se encuentran en la nano escala tienen un comportamiento físico químico diferente,

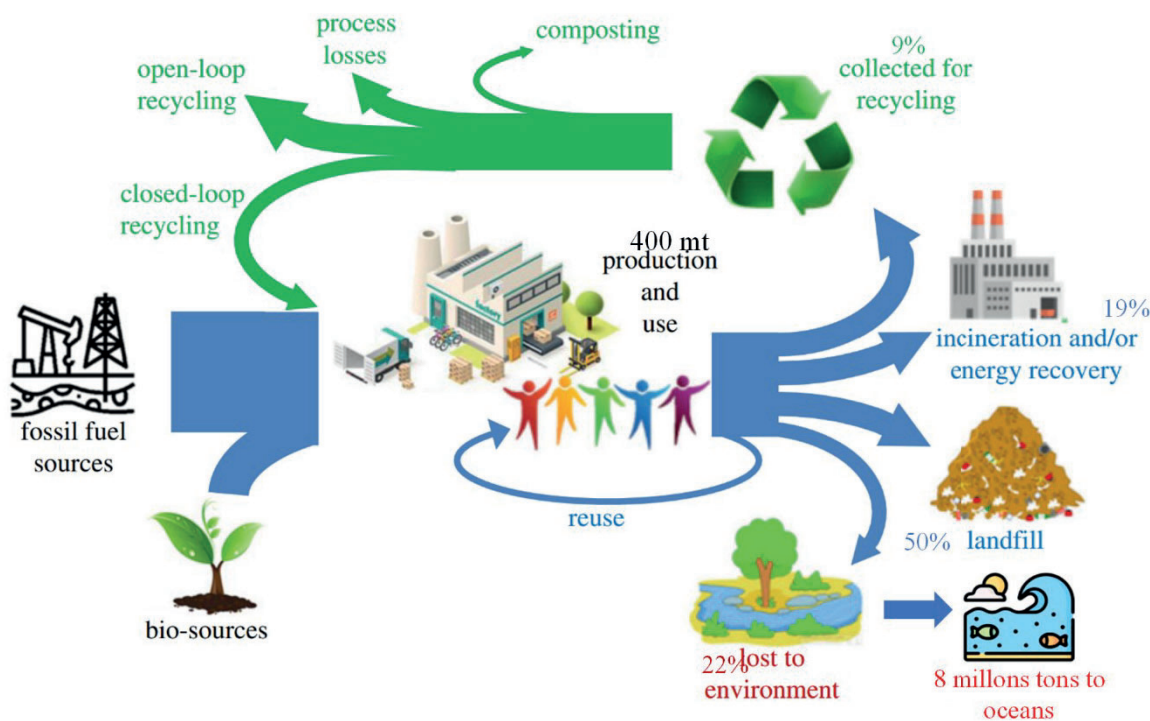


Figura 4. Esquema del ciclo de vida del plástico. (Adaptado de Bucknall, 2020)

diferente reactividad y diferentes interacciones biológicas, comparadas con las partículas de mayor tamaño (Halle & Ghiglione, 2021).

1.4. PELIGRO POTENCIAL DE LOS MNPLs EN EL AMBIENTE

Los MNPLs tienen el potencial de formarse directamente en el ambiente a partir de la fragmentación de plásticos de mayor tamaño y así, estas partículas se pueden dispersar y resultar omnipresentes en los distintos compartimentos ambientales (Mitrano et al., 2021). A pesar de que la alarma sobre los MNPLs se generó a partir de la constatación de la gran presencia de desechos plásticos en el medio marino, se considera que alrededor del 80% de los MNPLs son generados en la tierra, mientras menos del 20% provienen del mar. Al fragmentarse los MPLs generan millones de partículas de NPLs las cuales, debido fundamentalmente a su baja densidad, se pueden distribuir por todo el mundo (Yee et al., 2021). Así, la presencia de MNPLs se ha descrito en ambientes con poca actividad humana como en lagos en montañas alejadas, el hielo del mar Ártico, y en las profundidades de los océanos. Consecuentemente, también se han hallado en el aire que respiramos, fundamente en las grandes ciudades, y en los alimentos que consumimos (Mitrano et al., 2021).

La gran proporción de residuos plásticos y su lenta degradación da como resultado una acumulación creciente en el ambiente, lo que conlleva consecuencias negativas como el cambio climático, la acidificación de los océanos, y el agotamiento del ozono (Chang, 2019). A pesar de la amplia presencia de los MNPLs en el ambiente, todavía no se sabe bien el peligro específico que pueden presentar para la salud de los organismos expuestos, incluidos los humanos. La presencia de estas partículas en el ambiente crea un riesgo inicialmente para los organismos marinos y terrestres inferiores en los cuales se genera una bioacumulación de MNPLs (Jiang et al., 2020) (Figura 5). En la base de la cadena alimenticia se ha detectado la presencia de MNPLs en una variedad de organismos planctónicos (quetognatos, copépodos y sálpidos), pero también a niveles trópicos superiores como en invertebrados (crustáceos, equinodermos y bivalvos) o en vertebrados (peces, aves marinas y mamíferos acuáticos y terrestres) (Bouwmeester et al., 2022).

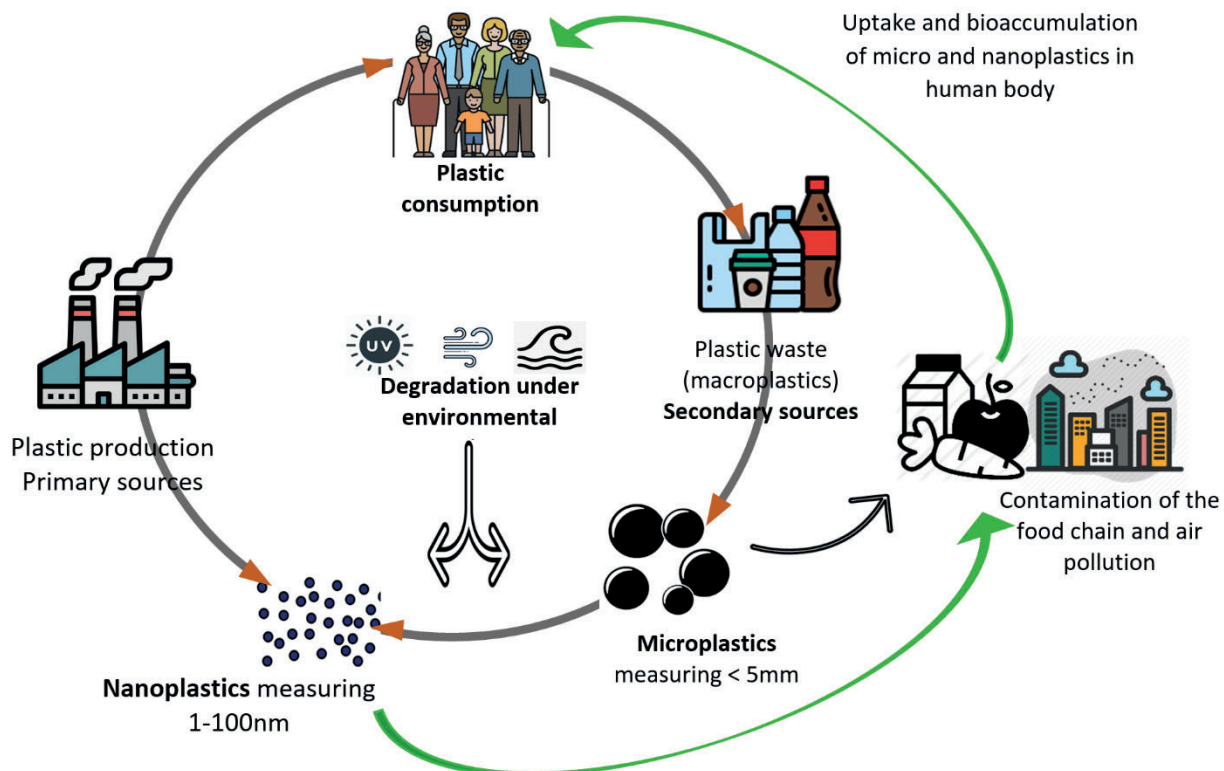


Figura 5. Fuentes y destino de los MNPLs en el ambiente. (Adaptado de Yee et al., 2021)

Estudios realizados en varias especies marinas principalmente bivalvos, como las ostras, almejas, conchas y mejillones, a las cuales se las ha expuesto al consumo de MNPLs se ha observado que éstas se acumulan en sus tejidos y causan efectos negativos en su salud. Por ejemplo, en estudios realizados en los mejillones azules (*Mytilus edulis*) con microesferas de poliestireno de entre 3 y 10 μm , mostraron que estas partículas se acumulan en el intestino y se translocan al sistema circulatorio. En otro estudio realizado en el cangrejo (*Carcinus maenas*) alimentados con mejillones (*M. edulis*) que contenían microplásticos de poliestireno de 0,5 mm se encontró la presencia de los MPLs en la hemolinfa del cangrejo entre 24 horas y 21 días después de haberlos consumido. En *Corbicula fluminea* expuesta a poliestireno de 80 nm se ha observado la generación de estrés oxidativo en la masa visceral, en branquias, y en el manto afectando la funcionalidad del hígado, neurotoxicidad e inflamación intestinal (Bouwmeester et al., 2015). Adicionalmente, otros estudios han demostrado la presencia de MPLs en organismos marinos que se encuentran en su ambiente natural como es el caso de *M.*

edulis y en varias especies de peces en las cuales se encontró la presencia de microplásticos en el contenido intestinal (Poma et al., 2019).

Recientemente, las investigaciones sobre los riesgos de los MNPLs se han enfocado en modelos animales de mamíferos como en ratones expuestos a MPLs de poliestireno de 5 a 20 μm por un lapso de 28 días, los cuales mostraron la presencia de microplásticos en el hígado, riñón e intestino; además, los resultados sugieren que hay alteraciones relacionadas con el metabolismo, lípidos, y energía (Jiang et al., 2020). Debido a la persistencia de los MNPLs en la naturaleza se puede estimar que la transferencia trófica permitiría la acumulación biológica en humanos (Bouwmeester et al., 2015).

1.5. PRINCIPALES VÍAS DE EXPOSICIÓN EN LOS SERES HUMANOS A MICRO Y NANOPLÁSTICOS

El peligro potencial frente a la exposición a los MNPLs dentro de la cadena alimenticia también se extiende a los seres humanos, debido a la presencia de los mismos en los alimentos diarios que se consumen. Varios estudios han demostrado que los MNPLs ingresan a la alimentación humana a través de varias rutas: consumo de animales que se encuentran en su ambiente natural, contaminación durante la producción de los alimentos, y a través de la migración de estas partículas de los envases plásticos de los alimentos y bebidas. Los MNPLs se han detectado en la mayoría de alimentos como: miel, sal, azúcar, pescado, gambas, y bivalvos. Adicionalmente, la inhalación, la exposición a través de piel, y la vía parenteral constituyen vías importantes de exposición en los seres humanos (Mitrano et al., 2021; Yee et al., 2021) (Figura 6).

1.5.1. Inhalación

Los MNPLs presentes en el aire, originados por la contaminación del aire con polvo de plástico, pueden ser inhalados. En ambientes interiores, las partículas plásticas se encuentran suspendidas en el aire, estas provienen principalmente de textiles sintéticos, principalmente de ropa y muebles. Adicionalmente, estas partículas se pueden transferir al agua durante el lavado de la ropa. Los MNPLs más representativos en el aire son las fibras sintéticas, que probablemente se derivan de la ropa (Yee et al., 2021; Abbasi, 2021). En ambientes externos, la exposición podría ocurrir por partículas que se liberan

al ambiente como resultado del lodo generado del tratamiento de aguas residuales, el cual se utiliza como fertilizante en tierras agrícolas. Una vez que se seca el lodo, el viento puede transportar las partículas de plástico y distribuirlas en el ambiente (Lehner et al., 2019; Abbasi, 2021). En las grandes zonas urbanas la presencia de MNPLs se asocia con la degradación de los neumáticos (Baensch-Baltruschat et al., 2020). Hay que recordar que el área de la superficie alveolar de los pulmones es enorme, tiene aproximadamente 150 m² y posee una barrera de tejido extremadamente fina, la cual mide menos de 1 µm. Esta barrera es lo suficientemente delgada como para permitir que las nanopartículas penetren a través de ella, provocando inflamación pulmonar y genotoxicidad secundaria. Adicionalmente, estas partículas podrían ingresar en los capilares del sistema sanguíneo, permitiendo la dispersión de las mismas por todo el cuerpo (Yee et al., 2021; Banerjee & Shelver, 2021). Esta información proveniente de los nanomateriales, se podría extrapolar al caso de los NPLs.

1.5.2. Vía dérmica

Los productos de salud y belleza son otra fuente importante de MNPLs. Productos como los cosméticos, cremas para afeitar, pasta de dientes, jabones faciales, y cremas para las arrugas, entre otros, poseen cantidades significativas de MNPLs que pueden entrar en contacto con la piel y ser absorbidos por la misma (Kumar et al., 2022). La piel está protegida por el estrato córneo, capa más externa de la piel, la cual forma una barrera protectora en contra de heridas, químicos y agentes microbianos. El estrato córneo está compuesto de corneocitos que están rodeados por la laminilla de lípidos hidrofílicos como ceramidas, ácidos grasos y colesterol. Dado que los MNPLs son hidrofóbicos, es poco probable su absorción a través del estrato córneo, por lo que se prevé que la absorción sea a través de las glándulas sudoríparas, las heridas en la piel o los folículos pilosos. Así, la exposición a la luz UV puede causar daño a la piel debilitando la barrera cutánea, e incrementando así la posibilidad de penetración de los MNPLs. Adicionalmente, varios compuestos como alcoholes, amidas cíclicas, ésteres, ácidos grasos, o ingredientes como la urea, el glicerol y los ácidos α-hidroxilo mejoran la penetración de fármacos y formulaciones a través de la barrera cutánea. Asimismo, éstos pueden incrementar la capacidad de los NPLs para penetrar la barrera de la piel (Yee et al., 2021).

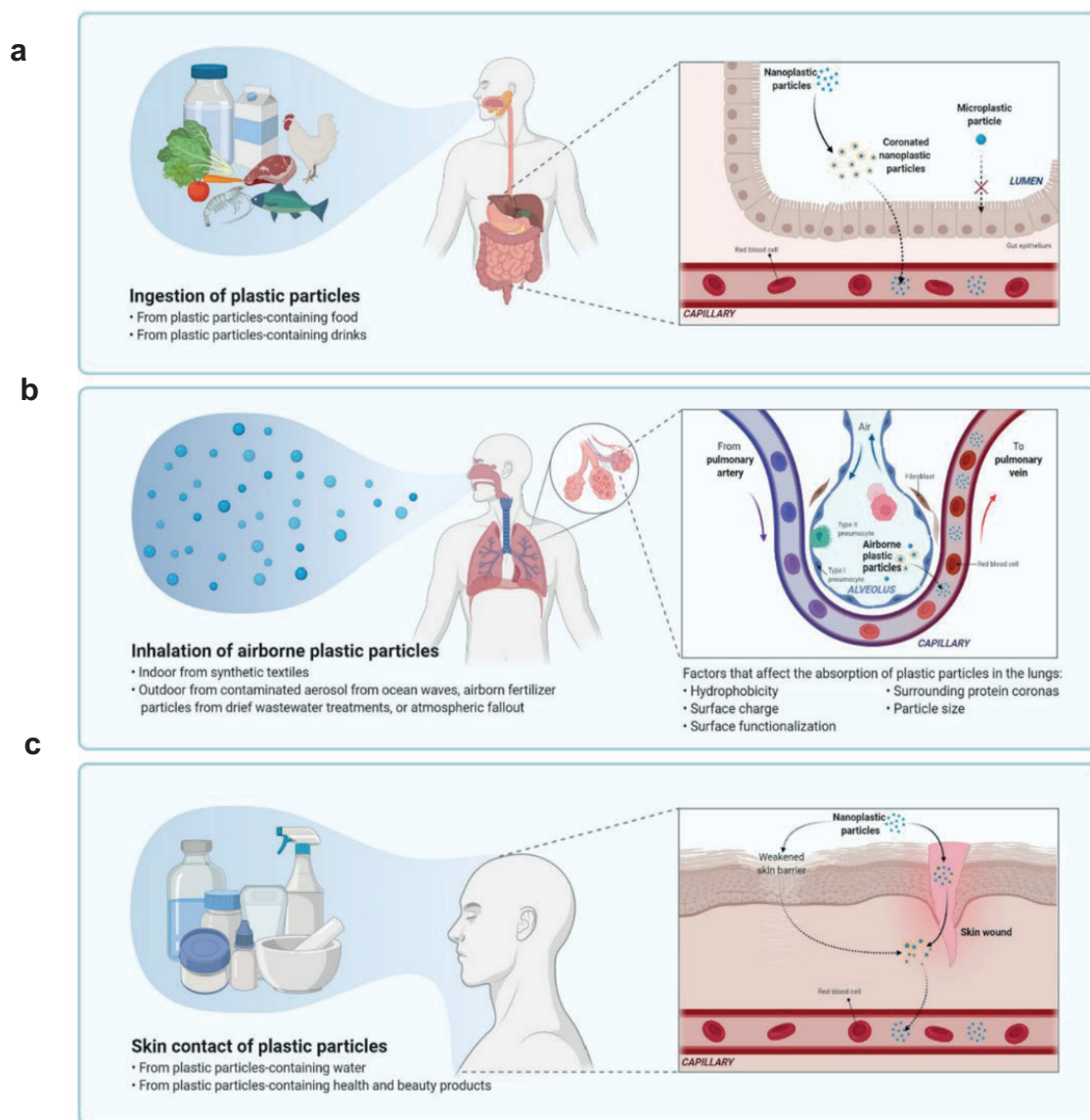


Figura 6. Vías de entrada de MNPLs al cuerpo humano. a) ingestión, b) inhalación, c) contacto con la piel. Estas partículas pueden interactuar con proteínas, lípidos, iones y agua en el cuerpo humano, formándose una corona en ellas lo que puede facilitar su absorción. A su vez, estas partículas pueden atravesar las barreras biológicas y alcanzar la circulación linfática y sanguínea llegando a diversos órganos y tejidos. (Fuente: Yee et al., 2021)

1.5.3. Vía oral

La ingestión representa la mayor ruta de entrada de los MNPLs en el cuerpo humano. Éstos pueden ser ingeridos a través del consumo de alimentos o bebidas contaminadas con los mismos. Debido a la presencia de partículas plásticas en las aguas naturales,

muchos organismos marinos como peces, mejillones, camarones, ostras, bivalvos, etc, pueden consumir MNPLs de manera accidental, los cuales finalmente son consumidos por los seres humanos. La presencia de MNPLs también se ha evidenciado en productos como la miel, cerveza, sal, agua embotellada y agua de grifo. Adicionalmente, en frutas y verduras también se han encontrado MNPLs, los cuales pueden llegar a las mismas a través del proceso de empaquetado, sin embargo, estudios recientes han demostrado que los MNPLs presentes en los suelos son capaces de viajar desde la raíz y llegar a las diversas partes de las plantas, incluidas semillas, tallos, hojas y frutos, ingresando a la cadena alimenticia y finalmente consumidos por los seres humanos (Ebrahimi et al., 2022; Kumar et al., 2022). Un estudio realizado por Cox et al. (2019) estimó que el consumo anual de MNPLs es de 74.000 a 121.000 partículas a través de la ingestión e inhalación, lo cual varía con la edad y el género (Liu et al., 2020).

1.5.3.1. El sistema digestivo como principal vía de ingreso y translocación de los micro y nanoplásticos en el cuerpo humano

Tras la ingestión, los MNPLs presentes en el tracto digestivo se encuentran con la mucosa intestinal y con el epitelio intestinal, juntos éstos representan una barrera formidable para evitar la absorción de xenobióticos. El epitelio intestinal consiste mayoritariamente en enterocitos, además de células de Goblet productoras de mucus, y de micropliegues o células M especializadas en transportar antígenos desde el lumen al tejido linfoide subyacente (Banerjee & Shelper, 2021).

Varios estudios realizados en animales y en modelos intestinales *in vitro* han demostrado que los MNPLs pueden atravesar la barrera intestinal, a través de los enterocitos, y alcanzar la circulación linfática o el sistema circulatorio, llegando así a diferentes órganos y tejidos, acumulándose en los mismos o impactando en el sistema inmune o en la viabilidad celular (Wright & Kelly, 2017; Banerjee & Shelper, 2021). Prueba de la ingestión de MNPLs es el estudio reciente que ha demostrado la presencia de MNPLs en heces humanas, lo cual apoya la teoría que los seres humanos ingieren MNPLs a través del agua y alimentos (Yee et al., 2021). Adicionalmente, Ragusa et al. (2021) han observado la presencia de MNPLs en la placenta humana, lo que respaldaría la teoría de que estos

pueden translocarse de las membranas tisulares a la sangre y llegar a la placenta humana y otras partes del cuerpo (Figura 7) (Kumar et al., 2022).

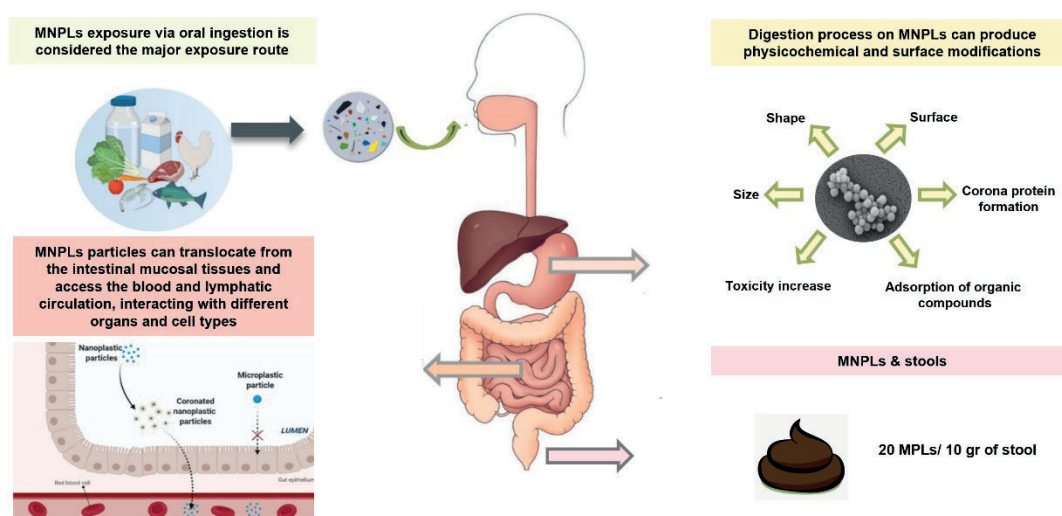


Figura 7. Los MNPLs en el tracto gastrointestinal humano. Después de la ingestión algunas modificaciones fisicoquímicas pueden ocurrir en la superficie de los MNPLs como la formación de la corona, la cual va a depender del medio que las rodea. Los MNPLs pueden atravesar la barrera intestinal llegando a la circulación sanguínea y linfática y, finalmente son excretados en las heces. (Adaptado de Kumar et al., 2022)

Cuando los MNPLs entran en contacto con el epitelio gastrointestinal hay varias potenciales rutas de ingreso y translocación. Una de las rutas es a través de la transferencia paracelular de las nanopartículas a través de las uniones estrechas del epitelio. Sin embargo, es poco probable que los MNPLs puedan penetrar a este nivel, ya que los poros en los canales de unión estrecha tienen un tamaño funcional máximo de aproximadamente 1,5 nm (Wright & Kelly, 2017; Yee et al., 2021). Es más probable que los MNPLs transloquen a través de la vía transcelular, principalmente mediante fagocitosis o endocitosis, infiltrando las células M en las placas de Peyer (Yee et al., 2021). Ragusa et al. (2021) observaron que la sección distal del intestino es la principal vía de ingreso de los MNPLs vía endocitosis. Esto también se observó en estudios *in vitro* utilizando partículas de poliestireno (Lehner et al., 2019). Otra vía de ingreso a través de la barrera intestinal, y quizás la más aplicable a los MNPLs debido a su tamaño (hasta 130 μm de diametro), es a través de la persorción. En la persorción las partículas son presionadas a través de los “agujeros” presentes en la capa epitelial debido a la

descamación celular, hacia los tejidos que se encuentra en la región inferior de la barrera. Las células dendríticas son capaces de fagocitar tales partículas, y transportarlas a los vasos linfáticos y a las venas subyacentes (Wright & Kelly, 2017) (Figura 8).

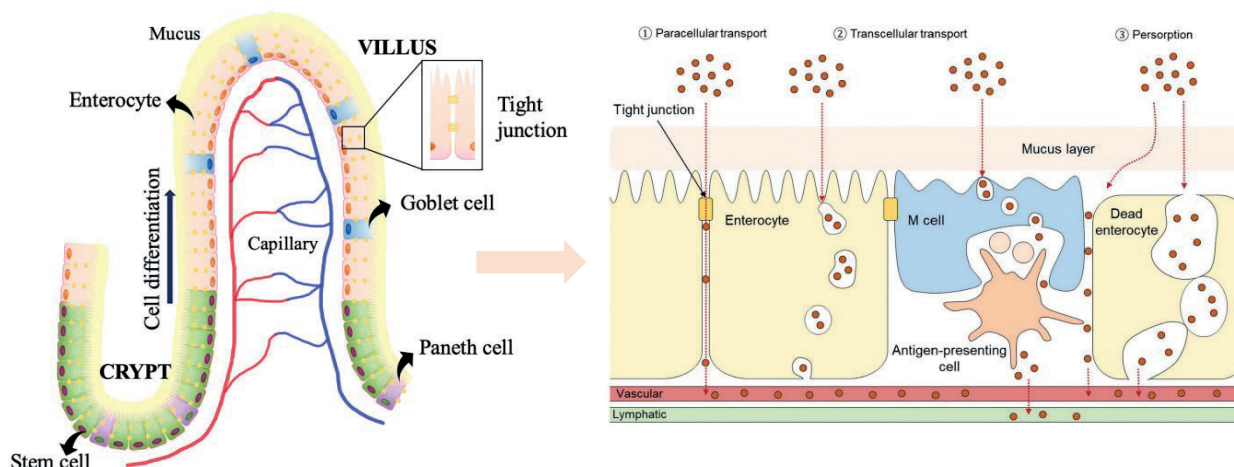


Figura 8. Esquema del transporte de nanopartículas en el tracto intestinal. (Adaptado de Fedi et al., 2021 & Wang et al., 2019)

Debido a la limitación de estudios *in vivo* acerca de la internalización y la translocación de los MNPLs, se han utilizado monocultivos de células intestinales o incluso modelos más complejos que incluyen multicultivos de células intestinales humanas. Forte et al. (2016) demostraron que las nanopartículas de poliestireno con un diámetro de 44 nm se acumulan más rápida y eficientemente en el citoplasma de las células de adenocarcinoma gástrico humano, en comparación con las de diámetro de 100 nm. En modelos de tricultivo de células intestinales *in vitro* (Caco-2, HT29-MTX, y células M), Walczak et al. (2015) determinaron que la translocación de partículas de poliestireno con diámetros de 50 y 100 nm con diferentes cargas en sus superficies (positiva, negativa, y sin carga), su translocación se ve influenciada por el tamaño y la composición química de la superficie. El tamaño afectó a la translocación de las nanopartículas, siendo mayor para las de 50 nm y menor para las de 100 nm. Sin embargo, la naturaleza química de la superficie parece más importante, ya que las partículas de poliestireno de 50 nm con carga negativa presentaron una mayor tasa de translocación. Adicionalmente, Mahler et al. (2012) sugirieron que la exposición oral aguda a nanopartículas de poliestireno

cargadas positivamente puede alterar el transporte intestinal de hierro, así como la absorción celular (Lehner et al., 2019).

1.5.3.2. Efecto de la digestión sobre las características o comportamiento de los micro y nanoplásticos

Tras la ingestión, se dan una serie de procesos que influyen las características fisicoquímicas de los MNPLs. Debido a su tamaño, superficie, y carga, el trayecto de los MNPLs está fuertemente influenciado por la interacción con los componentes biológicos que los rodean (Lehner et al., 2019). Una vez ingeridos, los MNPLs pueden presentar cambios físicos o químicos, que afectan su capacidad y tasa de absorción (Yee et al., 2021). Para evaluar efectivamente los patrones que modulan la translocación de los MNPLs es necesario tener en cuenta características como tamaño, carga, y modificaciones en la superficie. Sin embargo, los estudios realizados acerca de la translocación de los MNPLs a través de la barrera intestinal no han considerado los efectos que pueden tener los diferentes ambientes fisicoquímicos del tracto digestivo en el comportamiento de los MNPLs. Así, factores como el pH y la fuerza iónica pueden afectar las características y el comportamiento de los MNPLs durante la translocación (Walczak et al., 2015).

Antes de alcanzar el epitelio intestinal, las partículas deben pasar a través de diferentes compartimentos del tracto gastrointestinal, lo cual puede afectar sus propiedades fisicoquímicas y superficiales. El proceso de la digestión humana se inicia en la boca por la acción de la amilasa presente en la saliva, continua con la acción de los jugos gástricos del estómago y finalmente mediante la acción de los fluidos intestinales alcalinos. Estos componentes digestivos podrían corroer las partículas plásticas o cambiar su forma o tamaño haciéndolas potencialmente más bioreactivas (Stock et al., 2020). Hay que recordar que la mayoría de los plásticos no biodegradables contienen una mezcla de átomos de carbono, oxígeno, nitrógenos, azufre y fósforo, lo cual genera cargas no balanceadas que la digestión podría alterar (Paul et al., 2020). En este contexto, Stock et al. (2020), sometieron a diferentes tipos de MPLs (PE, PP, PVC, PET y PS) al efecto de la digestión artificial simulando la fase oral, gástrica e intestinal de la digestión humana; sin embargo, el estudio no evidenció cambios en las propiedades físicas o

químicas de los MPLs, lo cual podría sugerir que durante el proceso de digestión no ocurre una mayor degradación de las partículas (Fournier et al., 2021). Por otro lado, estudios realizados utilizando poliestireno neutro, carboxilado, y aminado de 20 y 200 nm, evidenciaron que las partículas forman agregados cuando están en contacto con la saliva humana debido a presencia de las mucinas que pueden unirse a la superficie de las partículas de poliestireno. Adicionalmente, mostraron una fuerte asociación entre los componentes biológicos de los fluidos gástricos y las partículas estudiadas, sin alteración de la estructura ni del tamaño de las partículas (Paul et al., 2020).

1.5.3.3. Formación de la corona de proteínas

Probablemente el parámetro más importante que la digestión puede afectar es la formación de la corona proteínica que envuelve los MNPLs. Esta corona está formada por sustancias adsorbidas en la superficie de las nanopartículas por interacciones hidrofóbicas entre los grupos carbonos, o por fuerzas electroestáticas con los grupos funcionales (Cao et al., 2022) (Figura 9). Walczak et al. (2015) hallaron que la digestión afecta la composición de la corona de proteínas e induce cambios en las proteínas de bajo peso molecular. Esto puede afectar las interacciones biológicas y su translocación en el tracto intestinal (Fournier et al., 2021).

Dentro del tracto gastrointestinal hay distintos tipos de moléculas con las que los MNPLs pueden interactuar: proteínas, lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos, iones, y agua. De manera específica, la adsorción de las proteínas de los fluidos corporales en las superficies de los MNPLs resulta en la formación de la denominada corona proteínica alrededor de las partículas, que puede afectar de manera crítica la interacción de las partículas con las células (Shi et al., 2021). Diversos estudios han demostrado que las interacciones entre las nanopartículas, órganos y tejidos generalmente ocurren con nanopartículas recubiertas de proteína en lugar de nanopartículas desnudas, lo que probablemente provoca cambios en sus características y propiedades (Lehner et al., 2019). Walczak et al. (2015) demostraron en modelos gastrointestinales *in vitro* que simulan la digestión humana, que las nanopartículas de poliestireno, dependiendo de las condiciones en las que se encuentren, van a formar diferentes coronas y esto puede incrementar el ingreso y translocación de éstas. Adicionalmente, se ha observado que

las partículas de poliestireno quedan retenidas en el intestino por la influencia de la corona proteica (Lehner et al., 2019; Yee et al., 2021).

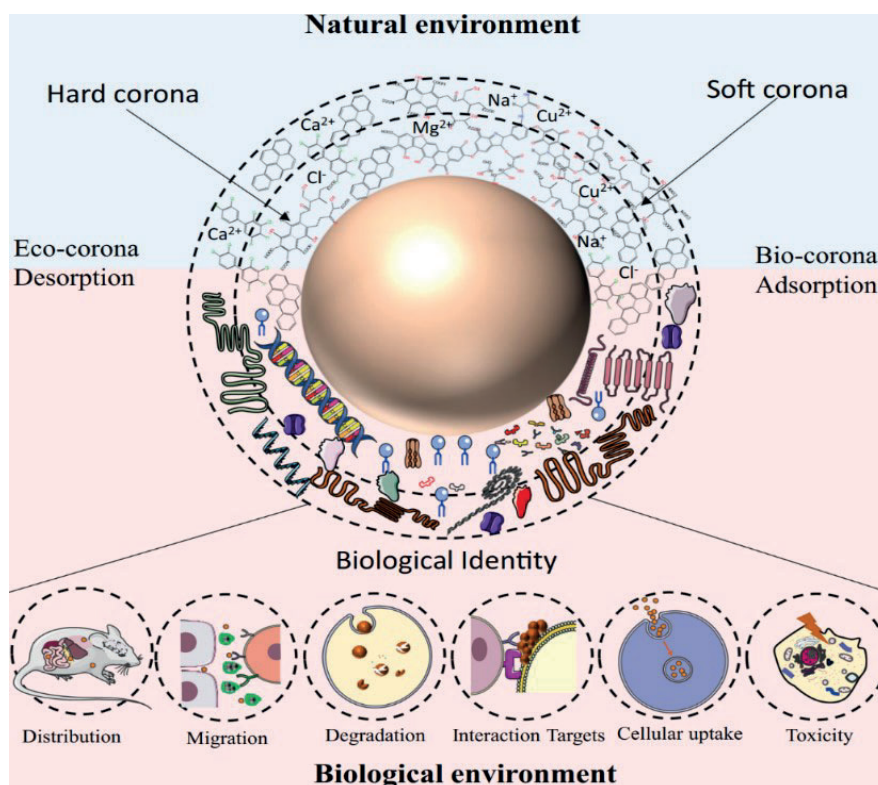


Figura 9. Tipos de coronas presentes en los MNPLs. Los componentes naturales del ambiente se pueden adsorber en la superficie de los MNPLs y formar eco-coronas. Cuando los MNPLs se encuentran con sistemas biológicos, estos pueden interactuar con abundantes biomoléculas incluyendo: proteínas, lípidos y ácidos nucleicos que reemplazan a algunos de los componentes de la eco-corona y forman la bio-corona. La corona ofrece una identidad biológica para los MNPLs que impacta su distribución, migración, degradación, interacción, internalización celular, y toxicidad en los organismos. (Fuente: Cao et al., 2022)

Liu et al. (2020), utilizaron MPLs de poliestireno para analizar la influencia del proceso digestivo en la toxicidad intestinal en el modelo *in vitro* con células Caco-2. Este estudio mostró que el proceso digestivo no altera la constitución química de las partículas, pero forma una corona en la superficie de las partículas. La formación de la corona en la superficie permite un cambio en el tamaño, en el potencial Z, y en la absorción de compuestos. Adicionalmente, las partículas de 100 nm mostraron una mayor toxicidad intestinal comparadas con las de 5 μ m. Este estudio también reveló que el proceso de digestión *in vitro* incrementa los efectos proinflamatorios en la monocapa de Caco-2. En otro estudio realizado por Wang et al. (2021) estos autores investigaron como influyen

los MPLs de poliestireno químicamente transformado por los fluidos gástricos artificiales sobre la citotoxicidad en células hepáticas. Este estudio reveló que las partículas transformadas de 500 nm aumentan los efectos adversos en los hepatocitos, incluyendo cambios morfológicos, daño de la membrana e incremento en la apoptosis celular vía estrés oxidativo. Este aumento de la citotoxicidad puede venir dado por la degradación, cambio en la carga de la superficie y la alteración de la superficie química después de la transformación del poliestireno (Wang et al., 2020). Sin embargo, son pocos los estudios que han evaluado alteraciones fisicoquímicas en los MNPLs debido al proceso digestivo y sus consecuentes efectos en su internalización y citotoxicidad.

1.6. RIESGOS POTENCIALES DE LOS MICRO Y NANOPLÁSTICOS PARA LA SALUD HUMANA

A pesar de los estudios enfocados en la presencia ambiental de los MNPLs y sus efectos toxicológicos en distintos organismos, la información sobre su influencia en la salud humana es aún escasa (Rubio et al., 2020). Varios estudios han encontrado potenciales efectos negativos sobre la salud humana debido a su inhalación o ingestión. Las alteraciones detectadas incluyen: respuesta inmune, toxicidad celular, daño en la membrana celular, inflamación, y daño de órganos debido a la translocación en diferentes partes del cuerpo (Wright and Kelly, 2017). Por su parte, Cortés et al. (2020) determinaron que los MNPLs pueden penetrar en las células del epitelio intestinal y ejercer potenciales efectos perniciosos como citotoxicidad, daño oxidativo en el DNA, daño genotóxico, e incremento de los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno (ROS). Estos efectos se encuentran esquematizados en la Figura 10.

1.6.1. Citotoxicidad

Varios estudios *in vitro* han examinado la influencia de los MNPLs en la viabilidad celular, mostrando efectos leves. Wu et al. (2019) utilizaron la línea celular Caco-2 y encontraron que el nanopoliestireno (PSNPLs) de 0.1 μm y de 5 μm produce poca citotoxicidad, leves cambios en la integridad de la membrana y cambios insignificantes en su capacidad de translocación; adicionalmente, observaron cambios en el potencial de la membrana mitocondrial, con cambios más pronunciados con las partículas de mayor tamaño (5 μm).

Otros estudios realizados con PSNPLs sugieren que su exposición altera significativamente la viabilidad celular y el ciclo celular, lo que induce la detención del ciclo celular en la fase S (fase de síntesis) y activa la transcripción de genes inflamatorios, la hemólisis y la expresión de proteínas asociadas con el ciclo celular y la pro-apoptosis (Kumar et al., 2022).

Otros autores han evidenciado efectos citotóxicos de PSNPLs fluorescentes de 1 μm en células Caco-2 a concentraciones altas (50 $\mu\text{g/mL}$) (Stock et al., 2019). Sin embargo, en otros estudios realizados con líneas celulares cerebrales y epiteliales humanas (T98G y HeLa), no se han evidenciado efectos adversos (Schirinzi et al., 2017). El daño citotóxico generado por los MNPLs se ha atribuido, principalmente, al daño en la membrana celular y al estrés oxidativo inducido. Así, diversos estudios han demostrado que las partículas de polietileno pueden penetrar en el medio hidrofóbico de la bicapa de la membrana plasmática y provocan cambios estructurales. Así mismo, las partículas que son endocitadas pueden permeabilizar la membrana endosomal-lisosomal e interactuar con los orgánulos intracelulares (Banerjee & Shelper, 2021). Adicionalmente, el incremento en la generación de ROS se puede provocar por la incorporación de aditivos durante la polimerización y el procesamiento de la partícula plástica, la cual al interactuar con el entorno biológico, puede causar incremento de estrés celular (Wright & Kelly, 2017).

1.6.2. Daño oxidativo y apoptosis

Varios estudios *in vitro* han demostrado que diferentes tipos de partículas de nano poliestireno pueden inducir estrés oxidativo, apoptosis y autofagia. Así, Chiu et al. (2014) demostraron que nano esferas de poliestireno positivamente cargadas pueden inducir muerte celular en células RAW 264.7 (macrófagos de ratón) y en células BEAS-2B pulmonares epiteliales humanas. Asimismo, partículas de poliestireno no modificadas o funcionalizadas han demostrado que inducen apoptosis en varios tipos de células humanas, incluyendo macrófagos alveolares humanos primarios (MAC), células epiteliales alveolares humanas primarias tipo 2 (AT2), células de leucemia monocítica humana (THP-1), células epiteliales alveolares humanas inmortalizadas tipo 1 (TT1), células de carcinoma de colon humano (Caco-2), y células de cáncer de pulmón humano (Calu-3) (Yee et al., 2021). A pesar de los efectos tóxicos observados en los modelos *in*

vitro, no se tiene una evidencia clara de la toxicidad en ciertos órganos en exposiciones *in vivo* en ratones. En órganos como el hígado, duodeno, intestino grueso, testículos, pulmones, corazón, bazo y riñones no se observó toxicidad después de la exposición oral de una mezcla de MPLs. Otros estudios han demostrado que la exposición por sonda oral de MPLs, o por su incorporación en el agua suministrada, causó inflamación del hígado, respuestas neurotóxicas, reducción del peso corporal y del hígado, reducción de la excreción de mucina en el colon, alteración del metabolismo de aminoácidos y ácidos biliares y alteración de la composición del microbiota intestinal. Algunos de estos efectos también se observaron en la descendencia de los ratones expuestos (Yee et al., 2021). El tamaño de las partículas también es un factor que influencia el estrés oxidativo; así, las partículas de mayor tamaño pueden provocar la inflamación del tracto gastrointestinal o de las vías respiratorias, mientras que las partículas más pequeñas pueden atravesar la barrera intestinal o pulmonar provocando estrés oxidativo intracelular y la posterior citotoxicidad en los órganos donde se acumulan (Rubio et al., 2020). En estudios *in vitro*, Wu et al. (2019) utilizaron PSNPLs de 0,1 y de 5 μm en la línea celular Caco-2, observando la inducción de efectos moleculares leves, incluido el daño oxidativo.

1.6.3. Inflamación

La inducción de inflamación es generalmente un factor clave en el desarrollo de diversas enfermedades. Esta inflamación está generada por citoquinas proinflamatorias (IL-1b, IL-6, IL-8, TNF-a, etc.) y citoquinas antiinflamatorias (IL-2, IL-10, etc.), y distintos estudios han demostrado que los MNPLs pueden inducir cambios en los factores inflamatorios en diferentes tipos celulares, como las células alveolares humanas, células epiteliales tipo 1, células A549, y células AGS, y estos efectos fueron de una manera dependiente del tamaño (Wu et al., 2019). La respuesta de los mediadores de citoquinas para los MNPLs implica una activación compleja, que está relacionada con el tamaño y química superficial de las partículas. En un estudio realizado por Ruenraroengsak et al. (2012) se observó que las células expuestas a 50 nm NPLs exhibieron una liberación significativamente mayor de IL-6 e IL-8 que la de las células expuestas a la misma concentración de NPLs de 100 nm. Además, las mismas concentraciones de NPLs de 50 nm, funcionalizadas con grupos amino, exhibieron respuestas significativas con liberación marcada de IL-6

e IL-8, mientras que las respuestas a NPLs de 50 nm no modificadas no fueron tan marcadas, observándose una respuesta significativamente menor con las partículas de NPLs carboxiladas (Shi et al., 2021). De manera similar, en otro estudio *in vitro* también se observó que las partículas de polietileno sin modificar que medían entre 0,3 y 10 μm causaron que los macrófagos de ratones produjeran niveles significativos de citoquinas, como IL-6, IL-1 β y TNF α . Además, otros estudios indican que cuando los componentes de polietileno se utilizan como prótesis, estos pueden fragmentarse como resultado del desgaste y formar residuos en las articulaciones. Las partículas desprendidas de polietileno pueden activar los factores proinflamatorios TNF α e IL-1, así como los factores pro-osteoclásticos, incluido el receptor activador del ligando NF- κ B (RANKL), que causa la reabsorción ósea periprotésica, y que podría eventualmente provocar que el paciente pierda la prótesis (Yee et al., 2021).

1.6.4. Alteraciones del sistema inmune

El sistema inmunológico es una red interactiva de órganos linfoides, células, factores humorales y citoquinas. La función principal del sistema inmunitario es proteger al huésped de sustancias extrañas. Debido a que las nanopartículas suelen ser captadas primero por los fagocitos, se pueden producir interacciones adversas entre los MNPLs y el sistema inmunitario, como la inmunoestimulación o la inmunosupresión, que pueden causar inflamación o interferencia autoinmune, o promover la susceptibilidad del huésped de infecciones y cáncer. Se han observado trastornos de la función inmunitaria de los MNPLs, incluida la muerte de las células inmunitarias, la alteración de la expresión de los receptores de superficie, y la secreción de interleuquina (Shi et al., 2021). En un estudio reciente se han investigado los efectos del PSNPL de 50 y de 100 nm con diferentes cargas en células de macrófagos NR838. Este estudio observó que sólo el PSNPL funcionalizado con grupos amino mostró citotoxicidad, junto con la inducción de especies reactivas de oxígeno intracelular, un aumento de los niveles de calcio libre citoplasmático, la disminución del índice fagocítico, una disminución del potencial de membrana mitocondrial, y la reducción del contenido de ATP intracelular. La magnitud de estos efectos depende del tamaño y de la concentración de la partícula (Shi et al., 2021). En otro estudio realizado por Stock et al. (2019), se evaluó la exposición a MPLs

esféricos fluorescentes de 1, 4, y 10 μm en la línea celular humana monocítica THP-1. En este estudio se observó que los MPLs no interfirieron con la diferenciación o con los procesos de activación de los macrófagos humanos.

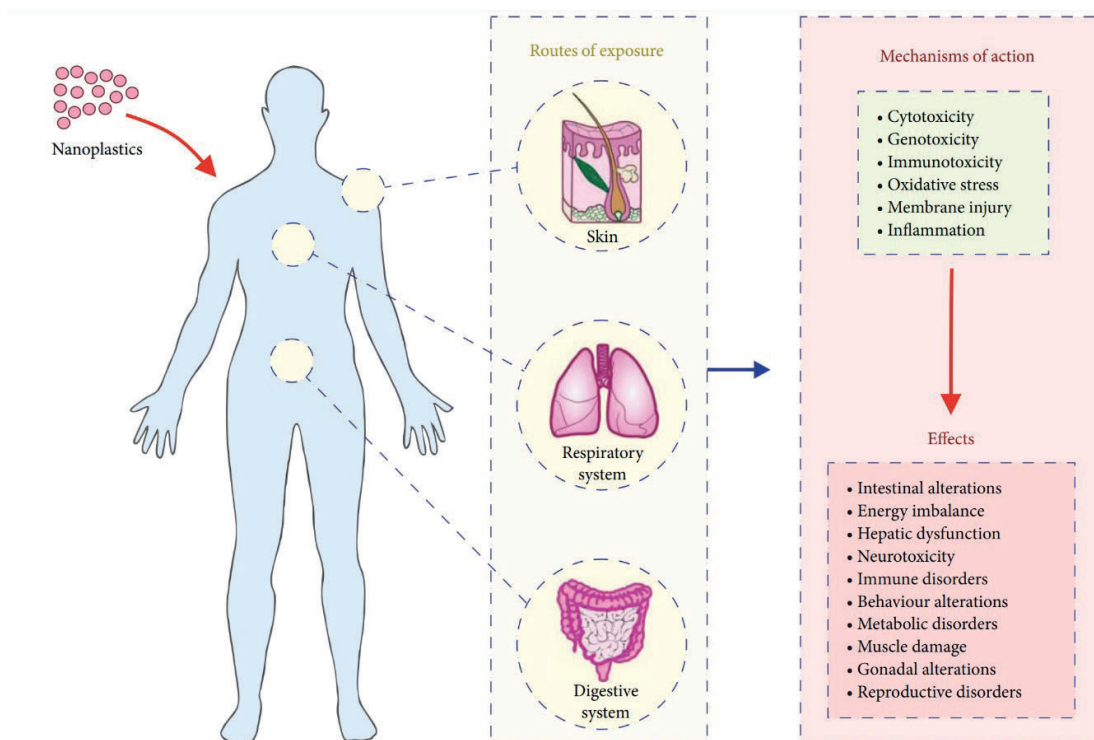


Figura 10. Mecanismos de acción y posibles efectos de los MNPLs en el cuerpo humano. (Fuente: Joksimovic et al., 2022).

1.6.5. Genotoxicidad

El daño en el DNA es un efecto tóxico importante y, por tanto, la detección de los potenciales efectos genotóxicos de los MNPLs es un tema preocupante. Estas partículas podrían inducir genotoxicidad por diferentes mecanismos como puede ser 1) dañando la membrana nuclear a través del contacto con las partículas que son suficientemente pequeñas y pueden atravesar la membrana nuclear; 2) de manera indirecta por la generación de ROS citoplasmático que puede llegar al núcleo, y 3) por el deterioro de la maquinaria de replicación y/o la de reparación (Rubio et al., 2020; Shi et al., 2021).

Estudios realizados por Paget et al. (2015) observaron que las PSNPLs funcionalizadas con grupos amino inducían genotoxicidad en células Calu-3 y en macrófagos THP-1. En

un estudio realizado por Zhang et al. (2011) demostraron que los NPLs con grupos funcionales carboxilo podrían ejercer efectos dañinos para el DNA dependientes del tamaño en las células macrófagas de ratón RAW 264.7 (Shi et al., 2021).

En otro estudio, Poma et al. (2019) analizaron el efecto genotóxico de las PSNPLs esféricas (100 nm) en la línea celular del prepucio Hs27 a través del ensayo de micronúcleos. Los resultados mostraron una elevación significativa en la frecuencia de los micronúcleos lo que indica daño en el DNA. Sin embargo, en estudios realizados con otras líneas celulares como el realizado por Cortés et al. (2020) en la línea celular indiferenciada Caco-2, indica que el NPLs de 50 nm no induce un incremento en la frecuencia de micronúcleos (Cortés et al., 2020).

Rubio et al. (2020) evaluaron el daño genotóxico y oxidativo en tres diferentes líneas celulares linfoblásticas humanas: THP1, TK6, y Raji-B a través del ensayo del cometa. Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de PSNPLs en diferentes períodos de tiempo. Los resultados mostraron que las células THP1 no mostraron ningún efecto genotóxico. Sin embargo, en las células Raji-B se observó un incremento en el daño genotóxico a las concentraciones mayores, y en TK6 únicamente se observó incremento en los niveles de daño oxidativo (Rubio et al., 2020).

Los diferentes resultados obtenidos en los estudios publicados indican que es necesario profundizar en nuestro conocimiento de los efectos en diferentes tipos celulares. Adicionalmente, se debe tener en cuenta el tamaño de las partículas de plástico, ya que esto también afecta su interacción con las células humanas. Además, la carga de la partícula también puede afectar su interacción con la célula y su estructura. Dado que la mayoría de los estudios *in vitro* utilizan partículas de poliestireno, es difícil extrapolar los resultados a otros tipos de partículas de plástico. Por lo tanto, es importante que se analicen los efectos con otros tipos de partículas plásticas (Yee et al., 2021).

De acuerdo con la literatura analizada, no se han encontrado efectos adversos severos de los MNPLs en los estudios basados en modelos de mamíferos *in vitro* o *in vivo*; sin embargo, existen razones para priorizar la investigación sobre los efectos biológicos de estas partículas. Hay que señalar que la mayoría de los estudios se han hecho con MPLs pero, a diferencia de las partículas a mayor tamaño, el pequeño tamaño de los NPLs

puede facilitar su absorción epitelial y su biodistribución sistémica a los órganos tras la exposición humana (Wright y Kelly, 2017). Adicionalmente, la biopersistencia de estos materiales en ambientes biológicos, y la continuada exposición en humanos, pueden conducir a la bioacumulación de MNPLs en tejidos y órganos, lo que puede conducir a efectos perniciosos a largo plazo. Además, los MNPLs presentan diferentes tipos de aditivos tóxicos bien conocidos, que pueden producir diversos tipos de efectos adversos (Shi et al., 2021). Otro punto a tener en cuenta es la alta superficie por volumen y la hidrofobicidad que presentan estas partículas, lo cual promueve la adsorción de otros compuestos químicos lo que las convierte en perfectos portadores de contaminantes orgánicos persistentes (COP), agentes antibacterianos, o metales pesados, entre otros (Rubio et al., 2020).

1.7. LOS MNPLs COMO VECTORES DE CONTAMINANTES AMBIENTALES

Estudios recientes sugieren que diversas sustancias químicas peligrosas pueden ser adsorbidas por los MNPLs y, adicionalmente, estos complejos pueden exhibir una toxicidad más alta que los químicos por sí solos (Jiang et al., 2020). Sustancias como los contaminantes orgánicos y los metales pesados son ejemplos de compuestos que se pueden adsorber en los MNPLs. Diversos estudios han demostrado la capacidad de adsorción de los MNPLs en fase acuosa con varios tipos de contaminantes orgánicos, sugiriendo que los MNPLs pueden aumentar las exposiciones ambientales, así como la correspondiente toxicidad cuando coexisten con ellos. En el caso de los metales pesados, varios estudios han demostrado que los MNPLs pueden actuar como vectores transportando varias trazas de elementos tóxicos en ambientes acuáticos y sedimentarios, permitiendo la acumulación de estos metales (Teuten et al., 2009). Se ha demostrado que la exposición prolongada de los MNPLs a varios metales pesados (incluyendo cadmio, níquel, zinc, y plomo) genera un incremento de la acumulación de estos metales cuando se encuentran en condiciones ambientales (Jiang et al., 2020). A pesar de la reciente preocupación por los efectos de los MNPLs, no se dispone de suficiente evidencia que permita evaluar su habilidad de unirse a metales trazas, así como los mecanismos involucrados. Esta presencia de metales traza podría resultar de la incorporación de metales como aditivos en la producción del plástico, pero también ser

originados por procesos de adsorción (Davranche et al., 2019). Se ha demostrado la habilidad de los restos plásticos colectados de playas y MNPLs recuperados del agua del mar en el Giro del Atlántico Norte de contener cantidades variables de metales trazas (Gigault et al., 2018). Adicionalmente, se ha evidenciado que la adsorción de metales traza es considerablemente mayor en los restos plásticos que provienen del ambiente, comparado con la de los plásticos nuevos (Holmes et al., 2014; Brennecke et al., 2016).

Las partículas plásticas son capaces de acumular elementos trazas de los sedimentos o del ambiente acuático que los rodea. Su naturaleza hidrofóbica y su gran área de superficie facilitan la adsorción de contaminantes; además, los contaminantes orgánicos prefieren unirse a partículas plásticas en lugar de a fragmentos plásticos de mayor tamaño (Bradney et al., 2019). De esta manera, esta capacidad del plástico de actuar como vector puede resultar en numerosos efectos perjudiciales en los ecosistemas terrestres y acuáticos (Brennecke et al., 2016). Las partículas plásticas pueden interactuar con contaminantes inorgánicos, incluyendo elementos trazas como aluminio, cadmio, cobalto, cromo, cobre, hierro, níquel, plomo y zinc. La adsorción y no adsorción de los contaminantes asociados a las partículas plásticas en el ambiente puede estar influenciada por diversos factores, tales como, las condiciones ambientales, el área de la superficie, la materia orgánica disuelta y la actividad microbiana (Holmes et al., 2014).

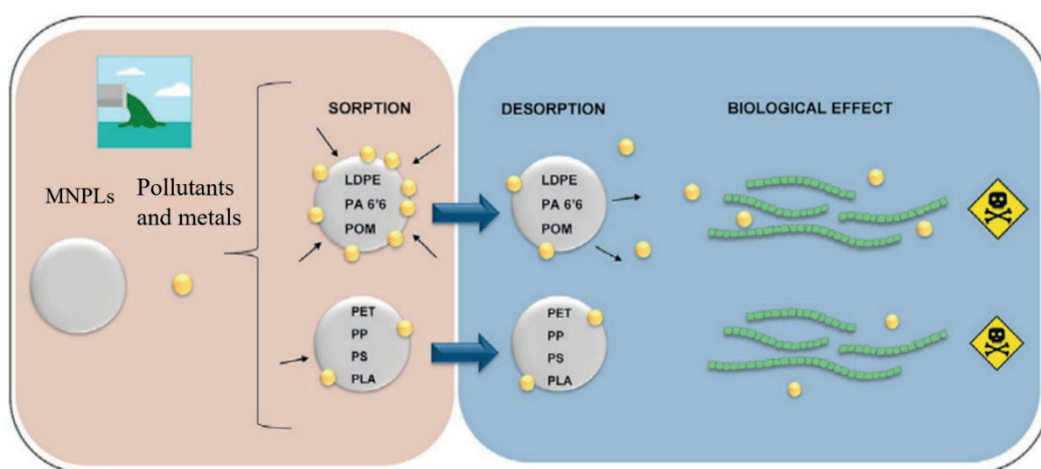


Figura 11. MNPLs como vectores de contaminantes o metales. Los MNPLs pueden adsorber sustancias químicas peligrosas o metales y estas sustancias pueden exhibir una diferentes toxicidad y un efecto biológico diferente al original. (Adaptado de: Legan et al., 2021)

Este hecho de que los MNPLs puedan ser vectores de contaminantes aumentan la preocupación de que al cuerpo puedan ingresar no sólo los MNPLs sino también los químicos tóxicos que los MNPLs transportan. Existe incluso la posibilidad de que la combinación de MNPLs y sus químicos adsorbidos puedan ser más tóxicos que sus contrapartes por si solos (Jiang et al., 2020).

1.8. MICRO y NANOPLÁSTICOS AMBIENTALMENTE REPRESENTATIVOS

Los estudios destinados a determinar el peligro potencial de los MNPL sobre el medio ambiente, y más aún sobre la salud humana, enfrentan grandes desafíos. El primero es la selección de MNPLs ambientalmente representativos para ser utilizados como materiales de referencia. Esto es especialmente relevante debido a la imposibilidad de recolectar MNPLs reales del medio ambiente, especialmente en la nanoescala. Así, la mayoría de los estudios disponibles han utilizado el único tipo de MNPLs que está disponible comercialmente en una amplia gama de tamaños, modificaciones químicas de la superficie y marcados con fluorescencia, como son las micro/nanoesferas de poliestireno PSMNPLs (Rodríguez-Hernández et al., 2019; Villacorta et al., 2022). Además, estas partículas comerciales tienen surfactantes en su superficie que pueden modificar su vía de interacción con los organismos acuáticos o con los modelos *in vitro* (Balakrishnan et al., 2019). Por lo tanto, la mayoría de nuestro conocimiento sobre el riesgo potencial de los MNPLs para la salud humana está limitado al uso de los PSMNPLs. Ante esta situación, el obtener materiales representativos de los MNPLs secundarios presentes en el ambiente es un reto por superar.

1.8.1. MNPLs fabricados a través de muestras ambientales de plásticos

Existen pocos estudios que hayan desarrollado protocolos de preparación de MNPLs a partir de materiales plásticos presentes en el ambiente. Cole (2016) utilizó un microtomo para producir diferentes tipos de microfibras; Magrì et al. (2018) prepararon nanopartículas de PET mediante ablación con láser de botellas de plásticos, para imitar NPLs ambientales. En estudios recientes realizados por Rodríguez-Hernández et al. (2019) y Villacorta et al. (2022), se obtuvieron muestras de nano PET a través del método de abrasión mecánica en condiciones ácidas, a partir de botellas de agua fabricadas con

PET. A través de este método se pueden obtener nanoplásticos a partir de cualquier fuente de material plástico ambiental. Adicionalmente, dentro de las fuentes originales de plástico útiles para obtener MNPLs útiles para hacer una correcta evaluación de riesgos, están aquellos plásticos que contienen en su estructura aditivos a base de metales. Estos aditivos a base de metales tienen una amplia gama de funciones en los plásticos y pueden actuar como biocidas, agentes antimicrobianos, lubricantes, retardantes de llama, rellenos inertes, pigmentos de color, protección a la luz, y estabilizadores. Estos aditivos aumentan la rigidez y la dureza del plástico y, a menudo, reducen el grosor y el costo del producto (Turner, 2021). Algunos de estos aditivos son el sulfato de bario (barita), el carbonato de calcio (calcita), el silicato de magnesio hidratado, y el dióxido de titanio. La presencia de estos metales puede suponer un potencial riesgo, no sólo por su posible liberación en el medio sino también por su comportamiento en diferentes condiciones fisicoquímicas, como puede ser los ambientes biológicos de muchos animales, cuando los MNPLs son ingeridos involuntariamente.

1.8.2. Metodologías para la localización de los MNPLs en el interior de las estructuras celulares

Otro factor limitante que se tiene que tomar en cuenta para una correcta evaluación de los riesgos de los MNPLs es la posibilidad de poder marcarlos, de forma que puedan ser fácilmente seguidos/detectados para su correcta localización en el interior de las estructuras celulares. En la actualidad, únicamente disponemos de partículas comerciales de PSMNPLs marcadas con fluorescencia las cuales pueden diferir en su composición y comportamiento de las partículas ambientales.

Detectar a los MNPLs en ensayos de internalización, particularmente cuando hay que evaluar su destino, es de suma importancia. Algunos tipos de plásticos muestran diferentes tipos de autofluorescencia, la cuál puede ser útil para su detección. Sin embargo, sus longitudes de onda de emisión y de excitación están localizadas en el rango UV, lo cual dificulta al análisis ya que los efectos de los filtros y la fluorescencia de fondo pueden afectar drásticamente la reproducibilidad y la calidad de la señal debido al ruido de fondo. Además, los posibles aditivos y contaminantes pueden dar artefactos en la señal de fluorescencia (Capolungo et al., 2021).

Una mejora en la detección de MNPLs implica el uso de fluoróforos capaces de teñir las partículas plásticas, permitiendo su identificación y localización en el interior de estructuras celulares, principalmente a través de microscopía de fluorescencia. Sin embargo, en la actualidad, el uso de estas partículas marcadas se encuentra sesgado por el uso de micro/nanoesferas comerciales de poliestireno y polietileno fluorescentes. La disponibilidad de estas partículas y el tamaño controlado de las mismas hace que su uso sea amplio entre los investigadores. No obstante, estas micro/nanoesferas no corresponden totalmente a muestras representativas ambientales, ya que su morfología difiere de las que se encuentran en el ambiente como son las fibras o los fragmentos plásticos (Karakolis et al., 2019, Caldwell et al., 2021). Así, debido a la falta de MNPLs ambientales representativos, se ha propuesto la tinción de las partículas plásticas obtenidas en laboratorio a partir de material plásticos, enriqueciendo de esta manera la disponibilidad de MNPLs de diferente morfología, tamaño y composición química (Gao et al., 2022).

El uso de estos marcadores fluorescentes permite el seguimiento y la cuantificación de los MNPLs principalmente a través de metodologías de microscopía de fluorescencia. Entre las tinciones más utilizados con los MNPLs está el Rojo Nilo [RN, 9-(dietilamino)benzo[a]fenoxazin-5-ona], el cual tiñe los plásticos mediante una interacción hidrofóbica, uniéndose específicamente a los lípidos neutros permitiendo una tinción *in situ*, volviéndose fuertemente fluorescente sólo en presencia de un ambiente hidrófobo (Capolungo et al., 2021). Sin embargo, el marcaje con RN presenta algunos inconvenientes como que tiende a formar agregados a altas concentraciones, resultando en una disminución de la intensidad de la fluorescencia o en la ausencia completa de la misma. Adicionalmente, a altas concentraciones de RN se incrementa la señal del ruido de fondo dada por una adsorción inespecífica en otros materiales o por una agregación de las partículas de RN. Otro posible inconveniente viene dado por el hecho que el RN no es específico sólo para plástico, ya que tiñe otros materiales orgánicos y los cuerpos lipídicos. Debido a esto, puede haber una sobreestimación del contenido plástico en muestras ambientales y en el interior de la célula (Malafaia et al., 2022). Otro factor limitante importante es el hecho que el RN es adsorbido solamente en la superficie de las partículas y puede ser fácilmente desabsorbido incrementando la intensidad de

fluorescencia del medio (Capolungo et al., 2021). Además, investigaciones recientes han propuesto que las tinciones fluorescentes como la del RN pueden interferir en la toxicidad de los MNPLs y en la evaluación de su translocación y bioacumulación en el organismo (Malafaia et al., 2022).

La industria textil ha desarrollado muchos tintes para tejidos. Estos colorantes contienen aminas aromáticas en su estructura, por lo que se consideran compuestos fluorescentes atractivos. Así, estos tintes textiles comerciales tienen el potencial de aplicarse como marcadores fluorescentes de los MNPLs debido a su sencillo procedimiento de tinción, así como a la posible emisión de fluorescencia (Karakolis et al., 2019; Capolungo et al., 2021). Sin embargo, su estabilidad no se ha probado en NPLs. Resumiendo, los tintes disponibles en el mercado como iDye Pink o Rodamina B pueden ser útiles para teñir PS, PET, PVC y fibras, entre otros tipos de plásticos, especialmente en la nanoescala, dando mejores señales que las que obtenidas usando RN.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

De acuerdo con lo presentado en la Introducción, el objetivo general de esta Tesis es aportar información sobre los efectos que puede provocar la exposición a los MNPLs en los seres humanos.

Para lograr este objetivo general, en esta Tesis se han planteado tres objetivos específicos los cuales se desarrollan en sendos capítulos. A saber:

- i. Evaluar si la digestión *in vitro* altera las características fisicoquímicas del nanopoliestireno, así como sus efectos biológicos en líneas celulares linfocíticas humanas.

Este objetivo se desarrolla en el capítulo 1, y su contenido se ha redactado en forma de artículo científico que se encuentra publicado en la revista *Environmental Pollution*, Con el título: *The potential effects of in vitro digestion on the physicochemical and biological characteristics of polystyrene nanoplastics*.

- ii. Determinar si las partículas de nanopoliestireno actúan como vectores de metales, específicamente de plata (AgNO_3 y AgNPs) y evaluar si esta relación entre metal y polímero incrementa la citotoxicidad en la línea intestinal humana Caco-2.

El objetivo del capítulo 2 se ha desarrollado en una colaboración dentro del Grupo, que ha supuesto una publicación en la revista científica *Biomolecules*, titulada: *Polystyrene nanoplastics as carriers of metals. Interactions of polystyrene nanoparticles with silver nanoparticles and silver nitrate, and their effects on human intestinal Caco-2 cells*.

- iii. Obtención de micro nanoplásticos partir de botellas de PET opacas que contienen partículas de dióxido de titanio, como modelos representativos de los MNPLs secundarios presentes en el ambiente, y determinación de sus posibles efectos biológicos en líneas celulares linfocíticas humanas.

Este objetivo se presenta en el capítulo 3 y, gracias a una colaboración dentro del Grupo, que ha supuesto una publicación en la revista científica *Science of the Total Environment*, titulada: *Titanium-doped PET nanoplastics of environmental origin as a true-to-life model of nanoplastic*.

3. JUSTIFICACIÓN, METODOLOGÍA, RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3. JUSTIFICACIÓN, METODOLOGÍA, RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. CAPÍTULO 1: Efecto potencial de la digestión *in vitro* en las características fisicoquímicas y biológicas de los nanoplásticos de poliestireno.

El artículo científico desarrollado en el presente capítulo se ha llevado a cabo con la colaboración de: Aliro Villacorta^{1,3}, Tom Venus⁴, Susana Pastor¹, Alba García-Rodríguez¹, Laura Rubio^{1,5}, Irina Estrela-Lopis⁴, Ricard Marcos¹ y Alba Hernández¹.

¹Group of Mutagenesis, Department of Genetics and Microbiology, Faculty of Biosciences, Universitat Autònoma de Barcelona.

³Facultad de Recursos Naturales Renovables, Universidad Arturo Prat, Iquique, Chile.

⁴ Institute of Medical Physics and Biophysics, University of Leipzig, Germany.

⁵ Nanobiology Laboratory, Department of Natural and Exact Sciences, Pontificia Universidad Católica Madre y Maestra, Santiago de los Caballeros, Dominican Republic.

3.1.1. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años la creciente producción y consumo del plástico ha convertido al poliestireno en uno de los mayores contaminantes a nivel mundial (Ebrahimi et al., 2022). Cuando los plásticos son liberados al ambiente éstos reducen su tamaño a MNPLs por efecto de las diferentes condiciones ambientales (Bradney et al., 2019; Cortés et al., 2020). La exposición humana a los MNPLs puede ser a través de la ingestión, la inhalación y el contacto con la piel. Sin embargo, la ingestión oral es considerada como la mayor ruta de exposición para los seres humanos (Yee et al., 2021). Una vez que los MNPLs ingresan al cuerpo vía ingestión, éstos deben pasar a través de los diferentes compartimentos del tracto gastrointestinal. El tracto gastrointestinal posee diferentes componentes fisicoquímicos y biológicos, los cuales pueden afectar a las propiedades y características de la superficie de las partículas como carga, forma, superficie, incluso corroer la partícula, o incrementar su toxicidad (Stock et al., 2020).

Probablemente, uno de los parámetros más importantes en que la digestión puede participar, es en la formación de la corona proteica, la cual puede afectar a las interacciones biológicas y a la translocación a través de la barrera intestinal de las partículas (Fournier et al., 2021). Así, para analizar de manera efectiva la toxicidad de los MNPLs se debe considerar la influencia del ambiente del tracto digestivo. Los nanoplasticos de poliestireno (PSNPLs) son los más frecuentes en el medio ambiente, y se ha demostrado su habilidad de translocarse desde la mucosa intestinal y acceder hacia la circulación sanguínea y linfática (Rubio et al., 2020). En este contexto, el objetivo de nuestro estudio fue determinar la influencia del proceso digestivo simulando *in vitro* las características fisicoquímicas del PSNPLs y caracterizar sus efectos biológicos en tres diferentes líneas celulares leucocíticas humanas: Raji-B (linfocitos B), TK6 (linfoblastos) y THP-1 (monocitos). Para este fin se sometió a las partículas de PSNPLs a un proceso de digestión *in vitro*, el cual simula los componentes de los fluidos gastrointestinales. Las partículas resultantes del proceso se analizaron mediante TEM, SEM, Zetasizer y NTA para determinar el tamaño, morfología, tamaño hidrodinámico y carga superficial, respectivamente. Adicionalmente se utilizó microscopía Raman para evaluar las proteínas en la superficie de las partículas. Finalmente, para evaluar si hay cambios en las características biológicas de las células expuestas se estudió la internalización de las partículas, su toxicidad celular, los niveles de ROS intracelular y la genotoxicidad.

3.1.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.2.1. Partículas de nanopoliestireno utilizadas, digestión *in vitro* y dispersión de las muestras

En este estudio se utilizaron partículas comerciales de nanopoliestireno (PSNPLs, PP-008-10) con diámetros alrededor de 50-100 nm, y su versión fluorescente (fPSNPLs, FP-00552-2) con diámetros alrededor de 40-90 nm. Estas partículas se compraron en Spherotech (Chicago, IL, USA). De acuerdo con los objetivos del presente estudio, ambas partículas, PSNPLs y fPSNPLs, se sometieron al proceso de digestión *in vitro*, siguiendo el protocolo de Mahler et al. (2009), con ciertas modificaciones. Este proceso simula los componentes de la digestión en el estómago y en la región intestinal. El

protocolo consistió básicamente en disolver 0,40 g de PSNPLs (ó 0,01 g de fPSNPLs) en 10 mL de una solución estéril [NaCl (40 mM), KCl (5 mM), pH=2] y el pH se ajustó a 2 con una solución de HCl (0,10 M). Se añadieron a la muestra 0,50 mL de solución estéril de pepsina porcina (25 mg/mL diluidos en HCl al 0,10 M) y se incubó 1 h a 37 °C. Terminada la incubación, el pH de las muestras se ajustó a 5,5-6 con una solución estéril de 0,10 M NaHCO₃. Se añadieron a la mezcla 0,50 mL de solución estéril de pancreatina-bilis (1,40 mg/mL pancreatina y 8 mg/mL bilis), el pH se ajustó a 6,9-7 utilizando la solución de 0,10 M de NaHCO₃. El resultado del proceso de la digestión fue pesado y ajustado a 15 g, utilizando una solución estéril formada por: NaCl (140 mM), KCl (5 mM) y pH=6,7. Todas las soluciones que simulan los jugos digestivos se prepararon bajo condiciones de esterilidad.

Previo a los tratamientos enzimáticos, las partículas comerciales de poliestireno sin fluorescencia (PSNPLs) y con fluorescencia (fPSNPLs), se dispersaron sólo con vórtex, debido a que presentaban una buena dispersión en la solución en la que se encontraban suspendidas. Sin embargo, debido a que las partículas digeridas tienden a agregarse, éstas se sometieron a ultrasonicación. Las partículas digeridas de nanopoliestireno sin fluorescencia (dPSNPLs) se dispersaron en albúmina de suero bovino (BSA) al 0,05% estéril y 30 µL de etanol al 100%, llegando a una concentración final de 3,125 µg/mL. Estas partículas se dispersaron por ultrasonicación al 10% de amplitud por 16 min en un baño de agua fría. Las partículas de nanopoliestireno digeridas con fluorescencia (dfPSNPL) al final de la digestión terminaron a una concentración de 725 µg/mL. Estas partículas se dispersaron por ultrasonicación al 10% de amplitud por 16 min en un baño de agua fría. Las dfPSNPLs se utilizaron sólo para los ensayos de internalización, mientras que las dPSNPLs se utilizaron en el resto de los ensayos.

3.1.2.2. Caracterización de las partículas de poliestireno digeridas y sin digerir

3.1.2.2.1. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Las partículas dispersadas (PSNPLs, dPSNPLs, fPSNPLs y dfPSNPLs) se diluyeron en agua destilada para obtener una concentración de 200 µg/mL. Las rejillas para el TEM, cubiertas con carbono, se sumergieron dentro de las diluciones con las partículas. La

visualización a través de TEM se realizó con el microscopio JEOL JEM-1400 (JEOL LTD, Tokyo, Japan). Adicionalmente, el programa Image J, suplementado con la extensión Fiji, se utilizó para medir 100 partículas al azar y determinar su rango de tamaño y su distribución.

3.1.2.2.2. Microscopía Electrónica de Escaneo (SEM)

Las partículas dispersadas se diluyeron en agua destilada para obtener una concentración de 200 µg/mL. Una gota de cada dilución se colocó sobre una rejilla de silicio. Las partículas se examinaron con un microscopio SEM Zeiss Merlin (Zeiss, Oberkochen, Germany) acoplado con un sistema EDs X-Max 20 nm (Oxford Instruments, Oxford, UK), los datos se analizaron con el programa INCA Energy.

3.1.2.2.3. Dispersión dinámica de luz (DLS) y potencial Zeta

Una concentración de 100 µg/mL de cada una de las partículas (PSNPLs, dPSNPLs, fPSNPLs y dfPSNPLs) se preparó en agua Milli-Q y se colocó en cubetas DTS1070 para la determinación de la carga de la superficie (potencial zeta). Para la determinación del tamaño hidrodinámico de las partículas se colocaron 1,50 mL de las muestras en cubetas DTS00212 y se realizaron las mediciones de DLS. Para el análisis se utilizó el instrumento Zetasizer® Ultra, de Malvern Panalytical. Todos los parámetros de cada muestra se midieron tres veces.

3.1.2.2.4. Análisis del tamaño de nanopartículas (NTA)

Para realizar estas mediciones, las muestras se prepararon a concentraciones de 10^8 - 10^9 partículas/mL, mediante dilución en agua Millipore. Las muestras se inyectaron en la cámara de la muestra con una jeringa estéril. Las mediciones NTA se realizaron a través del aparato NanoSight LM10 (NanoSight, Amesbury, United Kingdom), equipado con un láser de 532 nm. Para capturar y analizar los datos se utilizó el programa NTA 3.0. Una cámara digital CCD detectó la luz dispersa de las partículas con un objetivo de microscopio 20x. Cada muestra se midió durante 60 s en cinco posiciones diferentes, por triplicado. Las mediciones se realizaron a 25 °C.

3.1.2.2.5. Microscopía confocal Raman (CRM)

Las partículas de poliestireno a una concentración 312,5 µg/mL se secaron en portaobjetos de vidrio y se analizaron utilizando un microscopio Alpha300 R (WITec GmbH, Germany) equipado con un escáner piezoeléctrico (P-500, Physik Instrumente, Karlsruhe, Germany), con una fuente láser de 532 nm, un objetivo 50X (Zeiss, W Plan-Apochromat, apertura numérica 1,0), una fibra multimodo (50 µm de diámetro), una rejilla de 600 g mm⁻¹ y un dispositivo acoplado de carga. Las imágenes y el espectro simple se analizaron usando el programa Project FIVE PLUS (WITec GmbH, Ulm, Germany). Se aplicó un algoritmo para identificar partículas simples y determinar su cantidad de proteína y su nivel de cobertura. Se analizaron un total de 53 partículas, como partículas simples y sus agregados.

3.1.2.3. Líneas celulares y cultivos

Tres líneas celulares de linfocitos humanos se utilizaron en el estudio: THP1 (monocitos), TK6 (linfoblastos) y Raji-B (linfocitos-B). Las tres líneas celulares se adquirieron en Sigma Aldrich (MO, USA) y se cultivaron en suspensión en placas de cultivo celular de 25 cm² con medio de cultivo RPMI (Biowest, France) suplementado con 10% de FBS, 1% de glutamina (Biowest, France) y 2,5 µg/mL de Plasmocin™ (InvivoGen, CA, USA). Las células se mantuvieron en un rango de densidad de 5 × 10⁵ cel/mL a 1 × 10⁶ cel/mL en una atmósfera humidificada de 5% CO₂ y 95% de aire a 37 °C.

3.1.2.4. Viabilidad celular

Las muestras de las tres líneas celulares (THP-1, TK6 y Raji-B) se sembraron en placas de 96 pocillos en U a una densidad de 5 × 10⁵ cel/mL y se expusieron a concentraciones de hasta 200 µg/mL de PSNPLs y dPSNPLs durante 24 y 48 h. Posteriormente a la exposición, las células tratadas se diluyeron en ISOTON 1:100 y se contaron utilizando el equipo Beckman Coulter Counter Z2 (Indianapolis, USA). Tres experimentos diferentes se llevaron a cabo, con tres réplicas para cada uno. El número promedio de células contadas en cada tratamiento se comparó con el número promedio de las células sin tratar. Este ensayo nos permite determinar el rango de concentraciones no tóxicas a utilizar en el resto de los experimentos.

3.1.2.5. Detección de internalización celular por citometría de flujo

A través de citometría de flujo se estudió la capacidad de las células de internalizar fPSNPLs y dFPSNPLs. Las tres líneas celulares se sembraron a una densidad de 5×10^5 cel/mL en placas tipo U de 96 pocillos y se trataron con concentraciones de 1, 5, 10, 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$ de fPSNPLs y dFPSNPLs durante 24 h. Después de los tratamientos las células se centrifugaron y el precipitado se resuspendió en PBS 1X. Las células se analizaron por citometría de flujo en un equipo Beckman Coulter CytoFlex S (Indianapolis, USA) con un espectro de excitación y emisión de 488/585 nm y los datos se analizaron con el programa CytExpert. Tres experimentos independientes, con duplicados, se llevaron a cabo con cada muestra.

3.1.2.6. Localización intracelular de fPSNPLs y dFPSNPLs mediante microscopía confocal

Para confirmar la internalización de los fPSNPLs y dFPSNPLs en las tres líneas celulares se utilizó microscopía confocal laser. Las tres líneas celulares se sembraron a una densidad de 5×10^5 células en placas de 96 pocillos tipo U y se expusieron durante 24 h a 0 $\mu\text{g/mL}$ y 100 $\mu\text{g/mL}$ de fPSNPLs y dFPSNPLs. Tras la exposición, las muestras se centrifugaron a 0,30 rcf durante 8 min, se lavaron en RPMI fresco y se transfirieron a una placa de 8 pocillos ^{high}Glass Bottom (Ibidi, Germany). Las células se tiñeron durante 5 min a temperatura ambiente con Hoechst 33342 (ThermoFisher Scientific, USA) para teñir los núcleos y con CellmaskTM Deep Red plasma (Life Technologies, USA) para teñir las membranas. Para visualizar las partículas en el interior de las células por su fluorescencia se utilizó un espectro de excitación/emisión de 488/585 nm. Las imágenes de las muestras se obtuvieron mediante un microscopio confocal Leica TCS SP5 y se procesaron con la versión de programa 1.8.0_172. Adicionalmente, las imágenes se analizaron mediante el programa IMARIS 9.5 para imágenes en 3D/4D. Las células sin exposición se usaron como control negativo.

3.1.2.7. Cuantificación de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Mediante citometría de flujo se determinó la producción intracelular de ROS a través del ensayo con dihidroetidio (DHE, Calbiochem, USA). Para este objetivo, las tres líneas

celulares se sembraron independientemente a una densidad de 5×10^5 cel/mL en placas tipo U de 96 pocillos y se trataron con concentraciones de 0, 1, 5, 10, 25, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$ de dPSNPLs durante 3 y 24 h. Como control positivo se utilizaron 100 $\mu\text{g/mL}$ de concentrado de humo de cigarrillos (CSC, Murty Pharmaceuticals, USA) en exposiciones de 40 min. Las células se recuperaron en tubos para citometría de flujo (FACS) y se centrifugaron a 200 rcf durante 8 min. El precipitado se resuspendió en 10 μM DHE en PBS 1X para obtener una concentración final de 1×10^6 cel/mL. Las células se incubaron a 37 °C por 30 min y, terminada su incubación, se añadieron 5 nM de BD Via-Probe™ (BD Bioscience, USA) para discriminar las células muertas. Las células se mantuvieron en hielo y finalmente se analizaron en el citómetro de flujo FACSCanto (BD Bioscience, USA). Un total de 10.000 eventos de células vivas se analizaron en tres experimentos independientes, con duplicados de cada muestra por cada condición. La determinación de los niveles de ROS producido por la exposición a PSNPLs se llevó a cabo siguiendo el estudio realizado previamente dentro del grupo (Rubio et al., 2020) y los resultados del citado trabajo se compararon con los del presente estudio.

3.1.2.8. Inducción al daño genotóxico y oxidativo del DNA

El ensayo alcalino del cometa complementado con la enzima formamidopirimidina DNA glycosilasa (FPG) se realizó para evaluar el daño genotóxico y oxidativo (ODD) inducido por los dPSNPLs. Las tres líneas celulares se expusieron a concentraciones de 1, 5, 10, 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$ de dPSNPLs por periodos de 3 y 24 h. Tras la exposición, las células se colectaron y centrifugaron a 0,3 rcf durante 8 min a 4 °C y el precipitado se resuspendió en PBS 1X frío, obteniendo una concentración final de 1×10^6 cel/mL. Posteriormente, 25 μL de la suspensión celular se mezclaron con agarosa de bajo punto de fusión al 0,75% en una proporción 1:10 a 37 °C y se dejaron caer sobre una película de *GelBond film* (GBF) (Life Sciences, Lithuania). Cada muestra se depositó por triplicado. Las células se lisaron durante 24 h a 4 °C con una solución de lisis (2.5 M NaCl, 0,1 M Na_2EDTA , 0,01 M Base Tris, 1% Triton X-100, 1% lauril sarcosinato, 10% DMSO, a pH 10). Terminada la lisis, los GBFs se incubaron con una solución Collins fría (0,04 M HEPES, 0,1 M KCl, 0,5 mM EDTA, 0,2 mg/mL BSA) durante 10 min, seguido de incubación con buffer fresco frío por 50 min. A continuación, los GBFs se incubaron con

solución Collins precalentada, con o sin enzima FPG, a una dilución 1:2500, 30 min a 37 °C. Los GBFs se lavaron con solución de electroforesis (0,3 M NaOH, 1 mM EDTA) por 5 min y después se incubaron con la solución fresca de electroforesis durante 35 min a 4 °C. Terminada la incubación, se realizó la electroforesis a 20 V, 300 mA a 4 °C durante 23 min. Después, se procedió a lavar los GBFs dos veces con PBS frío 1X por 5 min y se colocaron en etanol al 100% durante al menos 1 h. Finalmente, para teñir las células se dejó secar los GBFs a temperatura ambiente durante toda la noche y una vez secos se incubaron 20 min en solución de SYBR Gold 10 X (Life Technologies, CA, USA) en TE (10 mM Tris Base, 1 mM EDTA) al 1:1250. Para el análisis de los cometas los GBFs se visualizaron con un microscopio de epifluorescencia (Olympus BX50) a 20X de magnificación. El daño inducido en el DNA se determinó por el porcentaje de DNA en las colas de los cometas usando el programa Komet 5.5 (Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, UK). Para el análisis, 100 cometas por muestra se seleccionaron al azar y cada muestra se analizó por duplicado. Se realizaron tres experimentos independientes. Como control positivo del daño general genotóxico se utilizó el metanosulfonato de metilo (200 µM MMS, Sigma-Aldrich, Germany), y el bromato de potasio (5 mM KBrO₃, Sigma-Aldrich, Germany) se utilizó como control positivo para el ODD.

3.1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1.3.1. Caracterización de la partícula

3.1.3.1.1. Morfología, distribución de tamaños en estado seco y forma

A través de TEM y SEM se determinaron los tamaños y la morfología de los PSNPLs, dPSNPLs, fPSNPLs y dfPSNPLs. Utilizando microscopía TEM se determinó el diámetro de Martín y la distribución de tamaño mediante la medición por triplicado de 100 imágenes de cada una de las partículas. En la Figura 12 se representa el porcentaje relativo de los diferentes tamaños de partículas. Las imágenes realizadas por TEM y SEM muestran que todas las partículas tienen una forma esférica, y el tamaño promedio de las partículas sin digerir oscila alrededor de los 66,07 nm para las PSNPLs y 51,71 nm las fPSNPLs. Los tamaños están en concordancia con las especificaciones del fabricante. Después de que las partículas se sometieran al proceso de la digestión *in*

vitro, el tamaño promedio varió ligeramente, siendo alrededor de los 60,68 nm para las dPSNPLs y de 54,81 nm para las dfPSNPLs. Adicionalmente, las imágenes de TEM y SEM muestran que las ambas partículas son similares en apariencia y tamaños. Sin

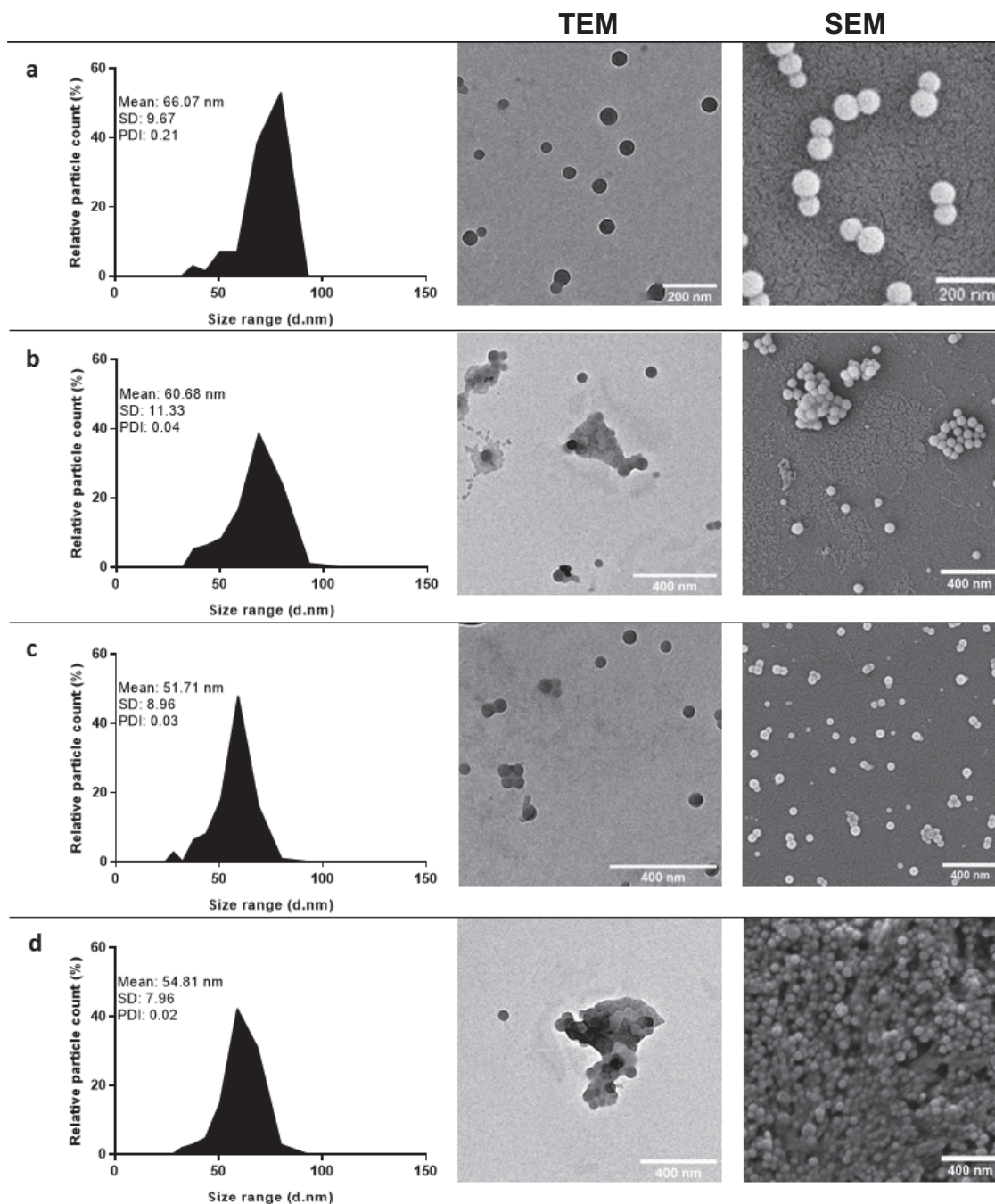


Figura 12. Microscopía electrónica de transmisión (TEM), Los datos muestran la distribución de tamaños, la desviación estándar (SD), y el índice de polidispersidad (PDI), para cada una de las cuatro partículas analizadas, (a) PSNPLs (b) dPSNPLs, (c) fPSNPLs, and (d) dfPSNPLs. Se muestran imágenes representativas de TEM y SEM de cada condición.

embargo, las partículas sometidas a la digestión *in vitro* muestran una importante tendencia a la agregación, formando grandes grupos de partículas.

Los análisis TEM/SEM no son comúnmente utilizados para evaluar los efectos de la digestión *in vitro* sobre las partículas (Liu et al., 2020). Sin embargo, en un estudio reciente Chen et al. (2022) mostraron que no hay cambio en el tamaño o en la forma de las partículas después de la digestión *in vitro*, confirmando nuestros resultados, así también como los resultados obtenidos por Stock et al. (2020) en los cuales se evaluaron diferentes muestras de plásticos ambientales (polietileno, polipropileno, cloruro de polivinilo, tereftalato de polietileno y poliestireno de 1-200 μm) sin obtener un cambio en el tamaño o en la forma de los mismos.

Estos efectos de la digestión *in vitro* pueden diferir de los que se observa en estudios *in vivo* en el intestino de la larva de *Drosophila*. Cuando las larvas se expusieron a tres tamaños de poliestireno MNPLs (50, 200 y 500 nm), se observaron diferencias en los tamaños de las partículas a través de TEM, entre los valores de la dispersión inicial y las partículas del lumen del intestino. Estas diferencias se observaron sólo en las partículas de tamaños mayores (200 y 500 nm), no en las de 50 nm, que es el tamaño que utilizamos en el presente estudio (Alaraby et al., 2022).

3.1.3.1.2. Distribución del tamaño en solución acuosa y potencial Zeta

La Figura 13 muestra el diámetro hidrodinámico medido por DLS de las cuatro condiciones. En general, se observa que las partículas digeridas tienen un mayor tamaño hidrodinámico cuando se comparan con las no digeridas. Además, las partículas no digeridas tienen un mayor número de partículas inferior al tamaño de 100 nm en comparación con las digeridas que muestran un mayor número de partículas sobre los 100 nm de tamaño. Esto está en concordancia con la tendencia de las partículas digeridas a formar agregados. Adicionalmente, estos datos coinciden con los valores del índice de polidispersión (PDI), en los cuales las partículas no digeridas están más dispersas que las digeridas. Esto se evidencia en que los valores cercanos a 0 indican que la muestra es monodispersa. Cambios en el tamaño hidrodinámico después de la digestión *in vitro* también se han observado como consecuencia de la presencia de la

formación de la corona en la superficie de partículas de nanopoliestireno de 100 nm (Liu et al., 2020).

Los resultados de las mediciones del potencial Zeta indican que las partículas sometidas a la digestión *in vitro* presentan una mayor tendencia a la agregación en comparación a las partículas no digeridas. Estos resultados están acorde a los resultados obtenidos a través del DLS.

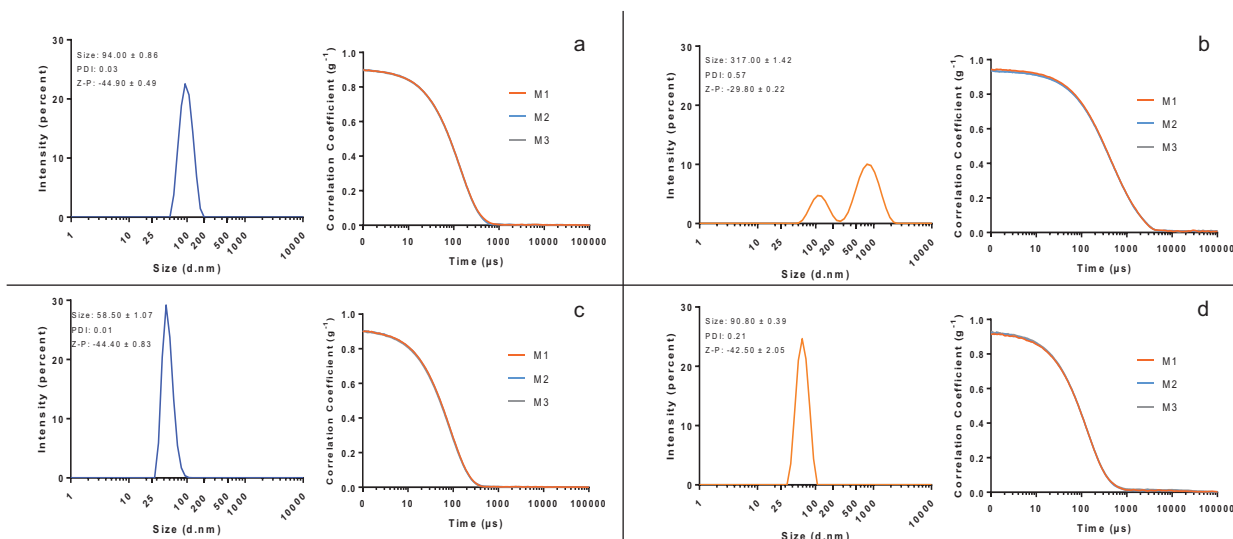


Figura 13. Distribución del diámetro hidrodinámico y coeficiente correlación de para PSNPLs (a), dPSNPLs (b), fPSNPLs (c), y dfPSNPLs (d). M1, M2, y M3 corresponden a tres mediciones independientes. Se visualiza que las tres mediciones coinciden perfectamente.

3.1.3.1.3. Análisis de nanoseguimiento (NTA)

Adicionalmente, la distribución de tamaños de la partícula se analizó por NTA (Figura 14). NTA es una herramienta más confiable para la evaluación de muestras polidispersas, basada en el análisis de partículas simples. Los resultados con NTA revelan valores similares de 75 nm para las partículas digeridas y las sin digerir. Este valor es más alto que el diámetro obtenido por TEM. Esto se debe a que NTA mide el diámetro hidrodinámico, el cual no solo representa el núcleo duro de la partícula sino también las moléculas de disolvente y los iones que las rodean. Por otro lado, las mediciones del DLS ofrecen una distribución ponderada de las partículas, que es más sensible en las partículas de mayor tamaño.

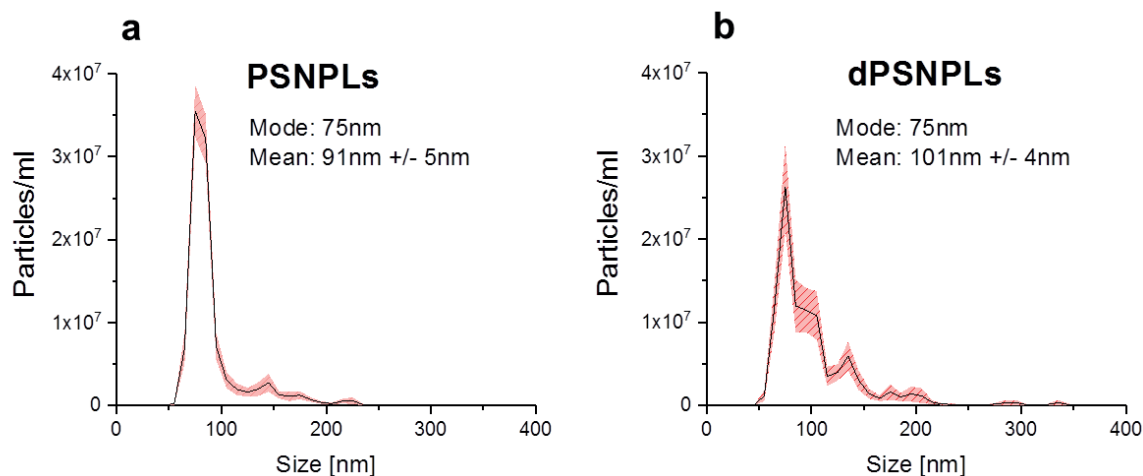


Figura 14. Análisis NTA de las partículas de PS sin digerir (a) y digeridas (b). Al igual que en los análisis con TEM y DLS, los valores NTA muestran una gran polidispersión de las partículas de PS digeridas con la presencia de varias poblaciones agregadas a 140 nm y alrededor de 200 nm, las cuales son cercanas al doble y el triple del tamaño original de las partículas. Las partículas sin digerir muestran solo una pequeña acumulación adicional a 140 nm).

3.1.3.2. Visualización y caracterización de las proteínas en la superficie de las partículas de PS

El espectro Raman de las partículas de PS tiene formas características, como la vibración del anillo a 1001 cm^{-1} , la deformación del CH_2 a 1450 cm^{-1} , el estiramiento del esqueleto del anillo a 1602 cm^{-1} , el modo de estiramiento CH_2 alifáticos simétrico a 2852 cm^{-1} y asimétrico a 2904 cm^{-1} , así como el modo de estiramiento del anillo CH a 3054 cm^{-1} (Hong et al., 1991; Mazilu et al., 2010; Nava et al., 2021). El modo de vibración del anillo PS se ha utilizado para la visualización del dPSNPLs (Figura 15a). La Figura 15b muestra los espectros promedio de PSNPL y dPSNPL que se extrajeron de regiones identificadas como partículas en las imágenes de CRM. Esto asegura que sólo las proteínas localizadas en la superficie de las partículas van a ser analizadas. Comparadas con las partículas sin digerir el espectro de dPSNPLs revela bandas adicionales de proteínas. La intensidad de las bandas relacionadas con la deformación de CH_2 y a la región del estiramiento de proteínas a 1450 cm^{-1} , 2852 cm^{-1} , y 2904 cm^{-1} se incrementó. Además, se han analizado bandas adicionales correspondientes a formas simétricas de proteínas CH_3 a 1450 cm^{-1} y a regiones de proteínas amidas I alrededor de 1660 cm^{-1} (Carey, 2006; Rygula et al., 2013). La superposición de la imagen del mapa de la

distribución de amida I con la de las partículas de PS digeridas visualiza una asociación de proteínas en la superficie de la partícula (Figura 15).

La región de la banda amida I se analizó minuciosamente para obtener información sobre la estructura proteica secundaria en la superficie de las partículas, así como sobre la degradación del polímero PS debido al proceso de digestión *in vitro*. Para ello se sustrajo el espectro de PS no digerido del de dPSNPLs dejando únicamente la señal de la proteína asociada a la partícula.

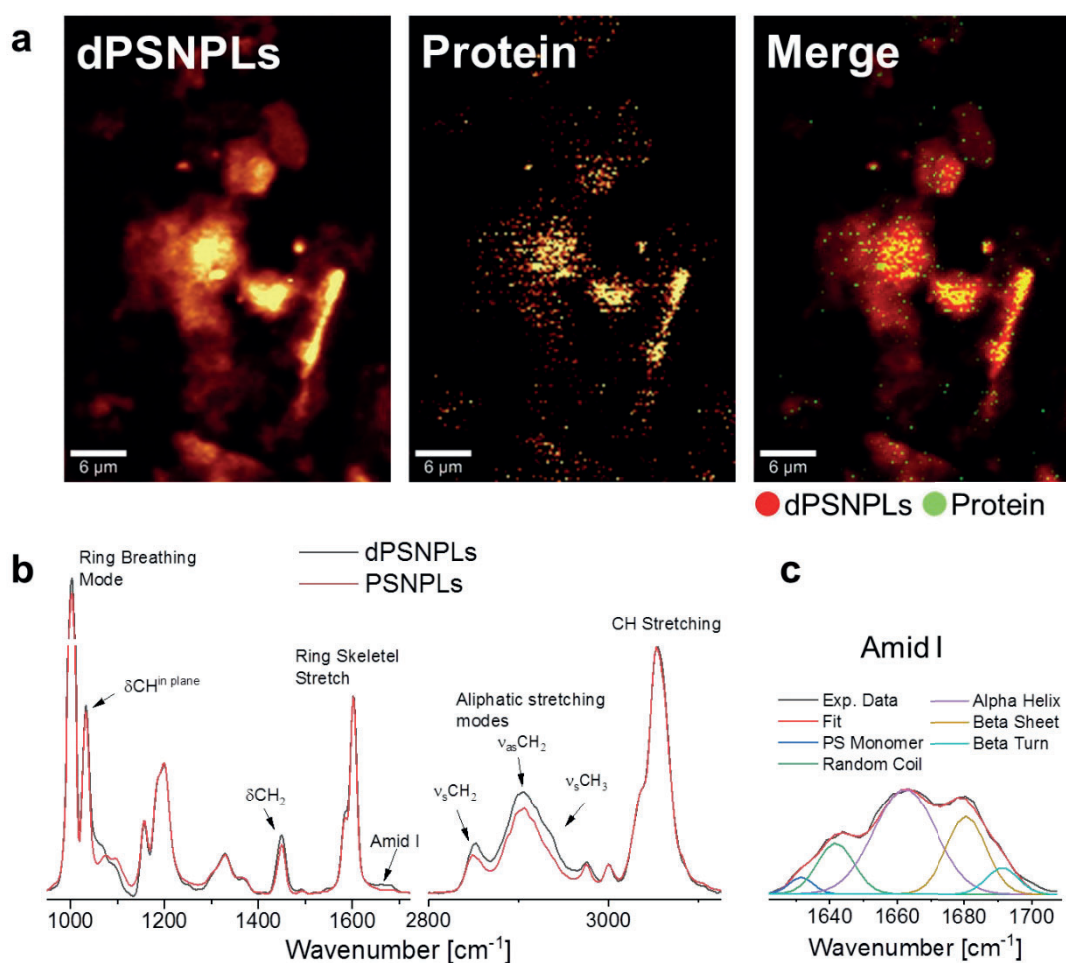


Figura 15. Análisis realizado con CRM de PSNPLs Y dPSNPLs: (a) las imágenes codificadas con color de dPSNPLs (izquierda), proteínas (mitad) y su superposición (derecha); (b) espectro Raman de las partículas digeridas y sin digerir extraídas de la región de interés; (c) ajuste de la banda amida I representa una estructura secundaria de las proteínas en la superficie de las partículas digeridas.

El ajuste de la banda amida I reveló la aparición de espirales aleatorias, hélices alfa y láminas beta a 1640 cm^{-1} , 1660 cm^{-1} y 1680 cm^{-1} , respectivamente (Maiti et al., 2004) (Figura 15c). La gran cantidad de láminas beta podría tener su origen en la pepsina que tiene un 44% de láminas beta y solo un 14% de hélices alfa (Sielecki et al., 1990). Por el contrario, BSA tiene principalmente una estructura de hélice alfa (Lin et al., 1976). El ajuste muestra una banda adicional en 1629 cm^{-1} que está asociada con PS monomérico (Sears et al., 1981; Noda & Sala, 2000). Podría suponerse que se ha generado una pequeña cantidad de monómeros debido a la degradación del polímero provocada por la digestión.

Adicionalmente, las imágenes CRM de las partículas digeridas se analizaron a nivel de partículas simples a través del algoritmo de las líneas divisorias de agua (*Watershed*). El grado de cobertura con proteína y la semi-cuantificación de la cantidad de proteína en la superficie de la partícula en una población de partículas se resume en la Figura 16.

Como se observa, la mayoría de las partículas muestran sólo un pequeño grado de cobertura con proteínas en su superficie. En promedio, el 7,7% de la superficie de las partículas está cubierta por proteínas. Sin embargo, algunas partículas mostraron una cobertura del 20 al 45%, lo que indica fuertes diferencias entre las partículas (Figura 16a). Aproximadamente, alrededor del 30% de las partículas no mostraron asociación con proteínas. La Figura 16b muestra un histograma de semi-cuantificación de proteína en partículas digeridas a través de la población de partículas. La semi-cuantificación se basa en la relación calculada entre la intensidad integral de la banda amida I y la del modo PS a 1001 cm^{-1} para cada partícula. La mayoría de las partículas mostraban sólo pequeñas cantidades de proteína asociada. De manera similar a las distribuciones de cobertura de partículas, hubo grandes diferencias entre las partículas lo que indica una distribución heterogénea de la cantidad de proteína en la superficie de la partícula (Figura 16). La presencia de proteínas en la superficie de las partículas digeridas también se ha encontrado en otros estudios, aunque el contenido estaba modulado por el tamaño, siendo mayor en 100 nm que en PSMNPL de $5\text{ }\mu\text{m}$ (Liu et al., 2020).

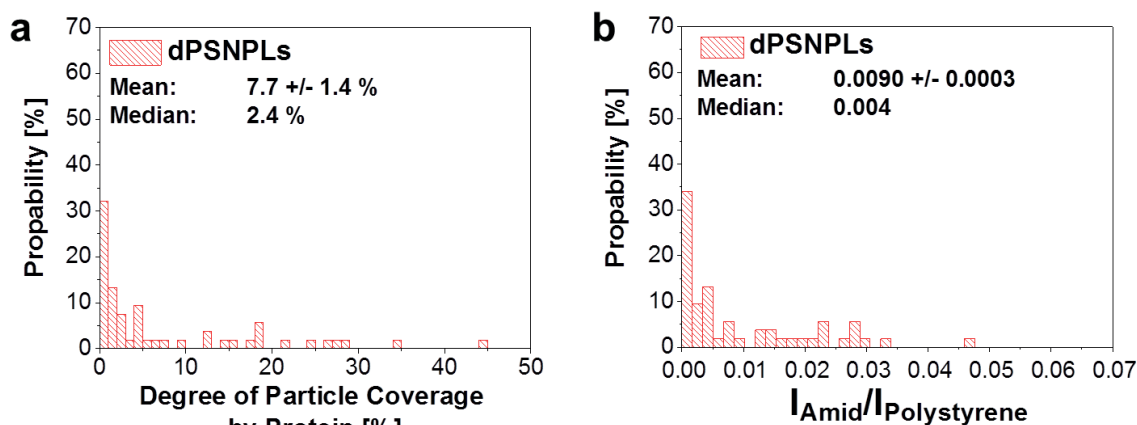


Figure 16. Histograma del grado de cobertura de la proteína (a) y cantidad de la proteína (b) en la superficie de una partícula simple de dPSNPLs a través de la población de partículas.

3.1.3.3. *Detección de internalización celular por citometría de flujo*

A través de citometría de flujo se evaluó la internalización celular de ambas partículas fPSNPLs y dfPSNPLs. El estudio incluyó a las tres líneas celulares y un período de exposición de 24 h a las concentraciones de (1, 5, 10, 25, y 50 $\mu\text{g/mL}$). La Figura 17 indica que para las tres líneas celulares los valores de fluorescencia son mayores en las partículas digeridas que en las partículas sin digerir. Este efecto se observó en las tres líneas celulares a todas las concentraciones. Adicionalmente, a las concentraciones más altas (50 $\mu\text{g/mL}$) de dfPSNPLs, casi el 100% de las tres líneas celulares muestran señales fluorescentes. Con respecto a la internalización del fPSNPLs, se pueden encontrar diferencias entre las tres líneas celulares. Las células Raji-B muestran el mayor grado de internalización, seguidas por THP1 y TK6 que presentan el menor porcentaje de internalización. Cuando se compararon las internalizaciones alcanzadas a la concentración más alta (50 $\mu\text{g/mL}$) de fPSNPLs, en las células Raji-B, casi el 80% de las células mostraron fluorescencia, mientras que los valores observados para las células THP1 y TK6 fueron del 35% y 20% respectivamente. Desafortunadamente, no se han encontrado estudios que evalúen las diferencias en la internalización entre los MNPLs digeridos y los sin digerir.

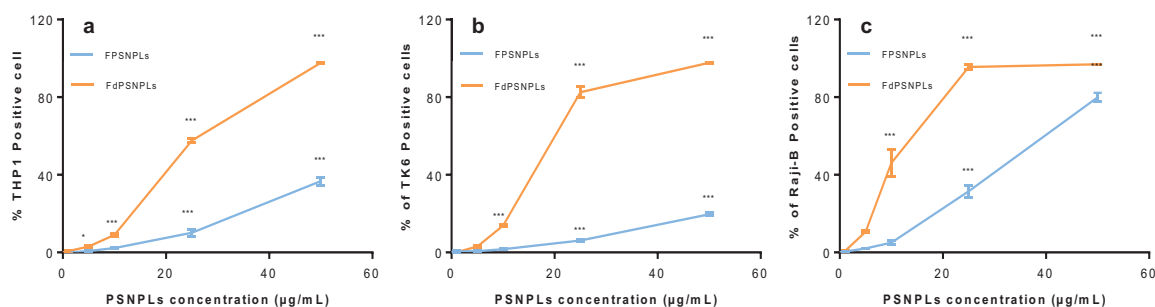


Figura 17. Internalización celular de fPSNPLs y dfPSNPLs en las líneas celulares THP-1 (a), TK6 (b), y Raji-B (c) tras 24 h de exposición. El gráfico representa el porcentaje de células positivas fluorescentes sobre la población total de células. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía con la prueba de Dunnet. La significancia estadística corresponde a * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

3.1.3.4. Detección de internalización por microscopía confocal

La localización celular del fPSNPLs y dfPSNPLs en las tres líneas celulares se determinó por medio de microscopía confocal, posterior a una exposición 100 µg/mL de partículas por 24 h. Como se observa en la Figura 18, ambos tipos de partículas se encontraron en el interior de las tres líneas celulares, lo cual coincide con los resultados observados en la sección previa.

Las partículas de PS no se encontraron asociadas a regiones específicas, y no se observaron diferencias relevantes entre las partículas digeridas y las no digeridas. Las partículas se observaron unidas a las membranas celulares, dispersas en el citoplasma o acumuladas en la región perinuclear. Las partículas también se observaron en el interior del núcleo. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en las mismas líneas celulares (Rubio et al., 2020). La localización de los PSNPLs en el interior de las células se ha observado en células humanas intestinales indiferenciadas Caco-2 (Cortés et al., 2020), así como en cocultivos de células diferenciadas Caco-2 que forman un modelo *in vitro* de barrera intestinal (Domenech et al., 2020).

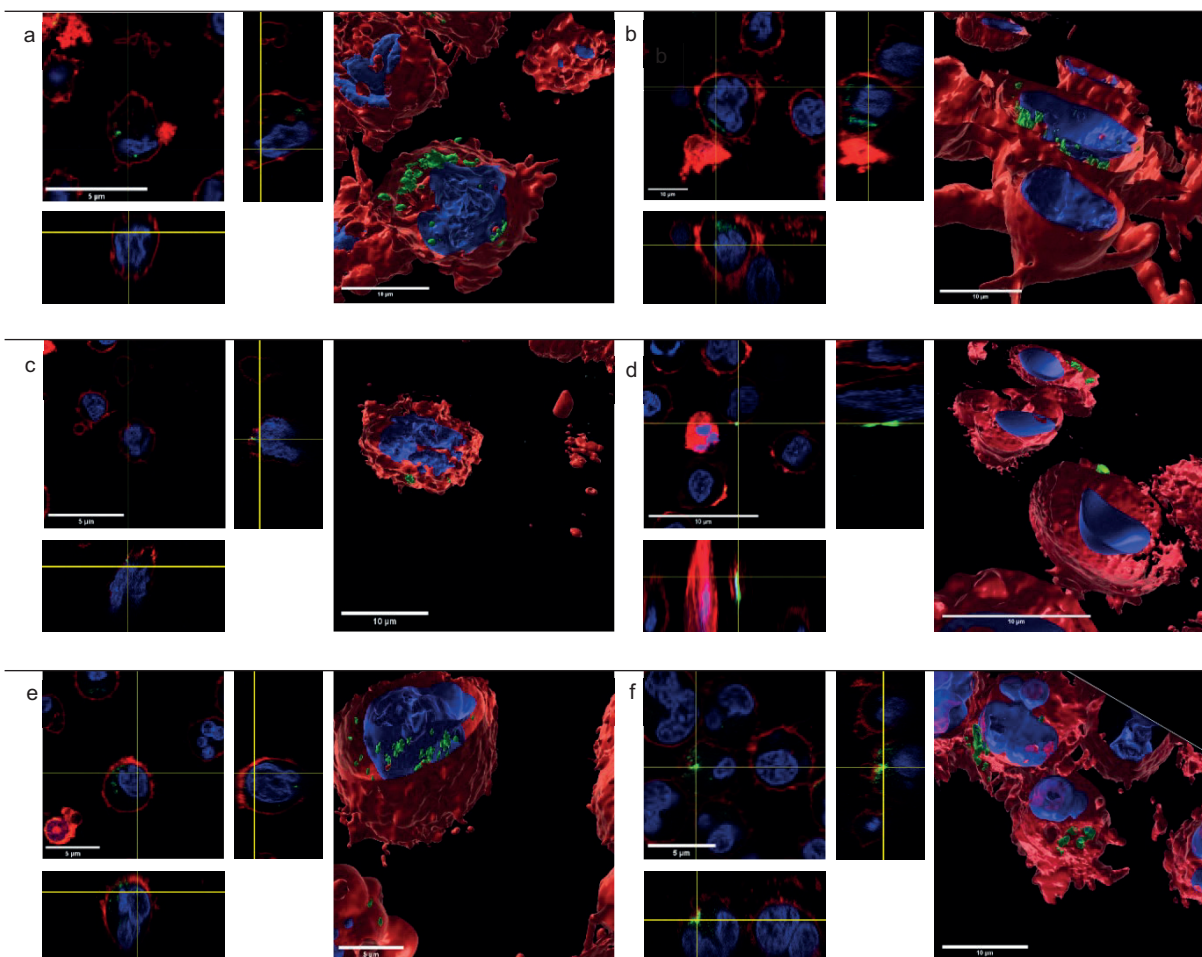


Figura 18. Selección de imágenes tridimensionales de células THP1, TK6, y Raji-B expuestas a 100 µg/mL de dfPSNPLs (izquierda) y fPSNPLs (derecha) por 24 h. (a) y (b) representan células THP1; (c) y (d) representan células TK6; y (e) y (f) representan células Raji-B. Las partículas dfPSNPL y fPSNPL se muestran en verde, el núcleo en azul, y la membrana celular en rojo. Se utilizó el programa limage-J para procesar las figuras, y el Imaris 9.5 para obtener imágenes en 3D/4D.

3.1.3.5. *Ensayo de citotoxicidad*

Se realizó un ensayo de viabilidad sobre las tres líneas celulares TK6, THP1, y Raji-B con el objetivo de medir las concentraciones subtóxicas de PSNPLs y dPSNPLs a aplicar en los distintos ensayos. El rango de concentraciones ensayados osciló desde 0 µg/mL (control negativo) hasta 200 µg/mL en exposiciones de 24 y 48 h. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 19. Los efectos tóxicos se observan a concentraciones de 150/200 µg/mL, las cuales son concentraciones muy altas y, en consecuencia, a exposiciones no reales. Consecuentemente, los PSNPLs se pueden considerar como compuestos no tóxicos, independientemente de si están digeridos o no.

Además, los tiempos de exposición modulan los efectos, los cuales son más pronunciados a las 48 h de exposición. De acuerdo con los datos de toxicidad, y considerando que nuestros objetivos es trabajar a dosis no citotóxicas, se eligieron concentraciones ≤ 50 $\mu\text{g/mL}$ para los ensayos.

La toxicidad potencial de los MNPLs se ha analizado recientemente (Schröter & Ventura, 2022), evidenciándose la falta de citotoxicidad. En estudios realizados en células pulmonares e intestinales humanas se evaluaron tres diferentes tamaños de nanoplásticos de poliestireno evidenciándose la falta de citotoxicidad, independientemente del tamaño (Zhang et al., 2022).

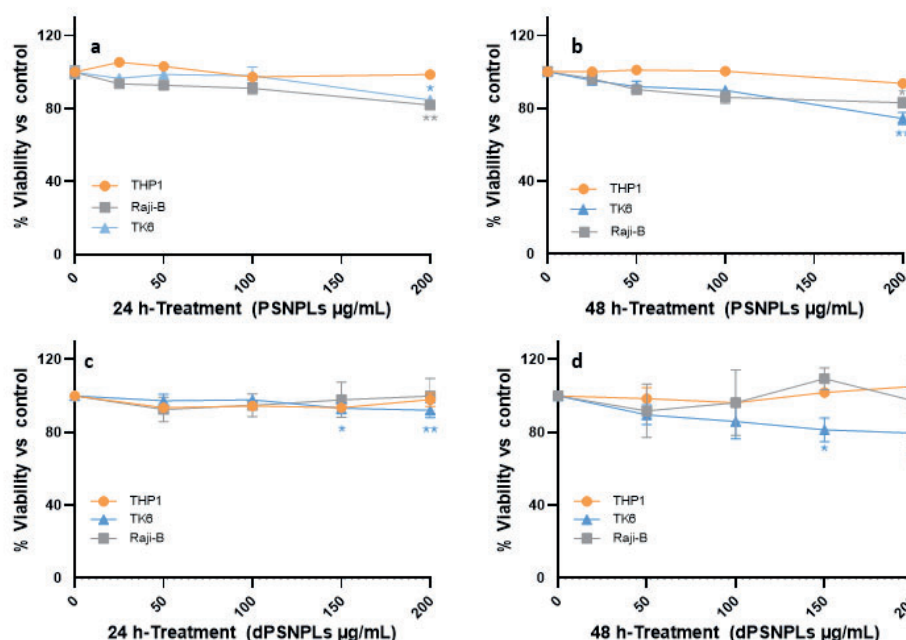


Figura 19. Viabilidad celular relativa de las células Raji-B, TK6 y THP1 después de la exposición a PSNPLs y dPSNPLs a concentraciones que van entre 0 y 200 $\mu\text{g/mL}$, (a) PSNPLs a 24 h (b) PSNPLs a 48 h (c) dPSNPLs a 24 h (d) dPSNPLs a 48 h. Los datos están representados como el porcentaje de células vivas relativas al control no tratado \pm SEM (error estándar). Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA de un factor y el post test de Dunnett. La significación estadística se indica en el gráfico como * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3.1.3.6. Producción intracelular de ROS

Para determinar la producción intracelular de ROS en las tres líneas celulares tras la exposición a dPSNPLs se utilizó el ensayo de DHE (dihidroetidio). El compuesto DHE

transloca fácilmente las membranas celulares y en el citoplasma reacciona con aniones de superóxido, formando un producto rojo fluorescente (2-hidroxietidio), el cual se puede intercalar en el DNA. La Figura 20 representa la producción de ROS intracelular medido con el ensayo DHE a través de citometría de flujo. Las tres líneas celulares se expusieron a diferentes concentraciones que van desde 0 hasta 50 $\mu\text{g/mL}$ por 3 y 24 h. Los gráficos muestran un incremento en la producción de ROS después de las 3 h de exposición, pero sólo a la mayor concentración (50 $\mu\text{g/mL}$) y en las líneas celulares TK6 y Raji-B. Estos efectos se incrementaron en exposiciones de 24 h, pero sólo en la línea TK6, la cual parece ser especialmente sensible a los efectos del PSNPLs. Estos efectos no se observaron cuando las células se expusieron a las mismas concentraciones de dPSNPLs. La inducción de estrés oxidativo provocado por la exposición a las nanopartículas se ha aceptado como un mecanismo generalizado (Li et al., 2022).

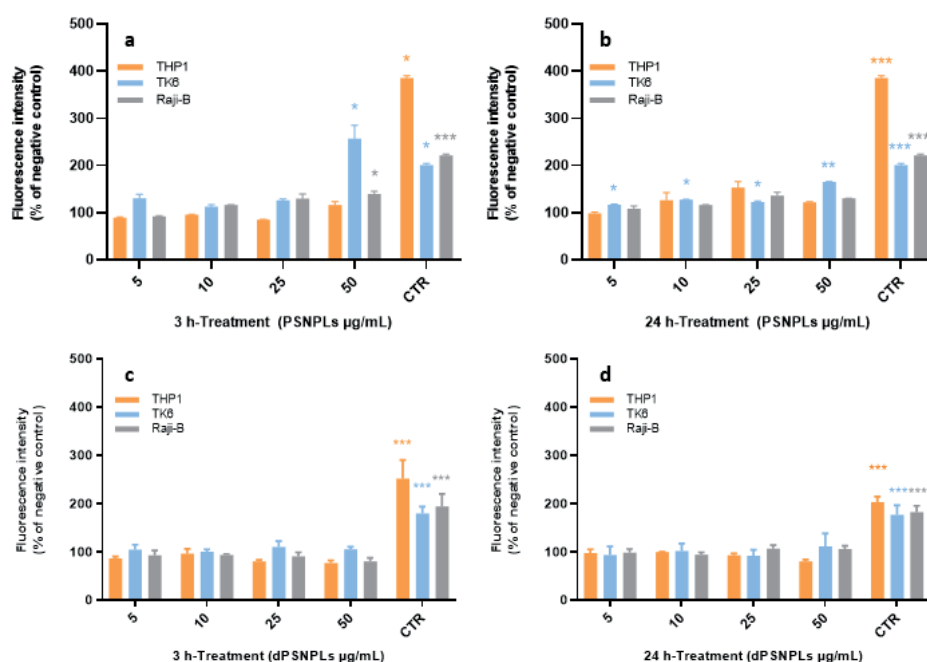


Figura 20. Análisis de la producción de ROS intracelular en células THP1, TK6 y Raji-B expuestas a PSNPLs y dPSNPLs. Las exposiciones fueron de 3 h (a y c) y 24 h (b y d). Exposiciones a 100 $\mu\text{g/mL}$ de CSC se utilizaron como control positivo (CTR). La producción de ROS se extrapoló del promedio de la intensidad media de la fluorescencia de tres experimentos independientes con muestras duplicadas (10.000 eventos tomados de la población de células vivas para cada muestra). Los datos se representan como el porcentaje de la intensidad de la fluorescencia comparada como el control negativo. Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA de un factor con el post-test de Dunnet. La significación estadística se indica en el gráfico como * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, y *** $P < 0.001$.

La inducción positiva, dependiendo del tipo celular, ya fue demostrada previamente (Rubio et al., 2020), así como que la habilidad de inducir estrés oxidativo se asocia con la funcionalización de la superficie de las partículas de PS (He et al., 2020). Desafortunadamente, no se han encontrado estudios que comparen la habilidad de los MNPLs digeridos *in vitro* de inducir estrés oxidativo, lo cual resalta el interés en los resultados aportados en este estudio.

3.1.3.7. Daño genotóxico y oxidativo

Para medir el daño genotóxico y oxidativo del DNA inducido por las diferentes exposiciones, se realizó el ensayo del cometa complementado con el uso de la enzima FPG. Las tres líneas celulares se expusieron a dos diferentes tiempos, 3 y 24 h. La Figura 21 muestra los resultados de las exposiciones a 3 h, en la cual se observa que no hay presencia de daño genotóxico ni oxidativo en las tres líneas celulares. Esto significa que bajo estas condiciones no se observan diferencias entre PSNPLs y dPSNPLs.

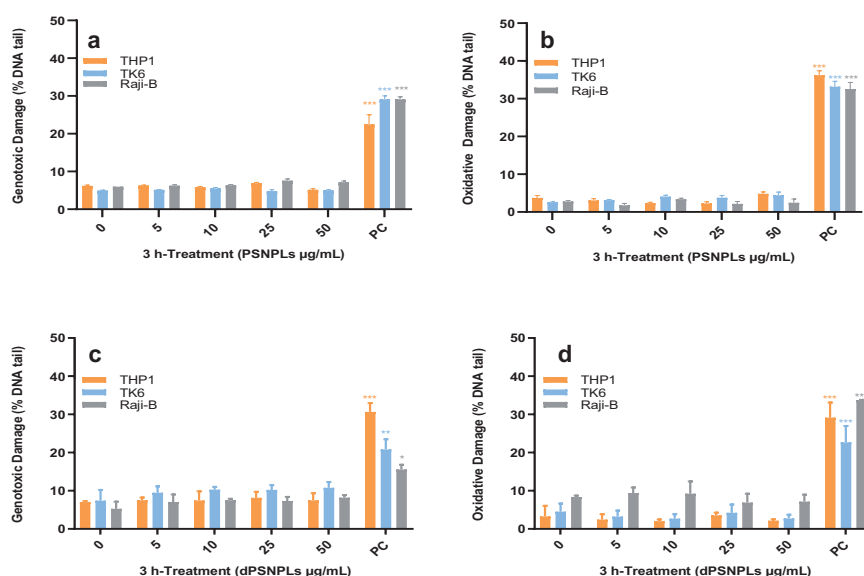


Figura 21. Daño genotóxico y oxidativo detectado por el ensayo cometa luego de 3 h de exposición a: PSNPLs (a, b) y dPSNPLs (c, d). El daño oxidativo (ODD) se detectó utilizando la enzima FPG. La concentración de 200 µM de metanosulfonato de metilo (MMS) se utilizó como control positivo (PC) para la inducción del daño genotóxico, el bromato de potasio (KBrO₃) se utilizó como control positivo para ODD. Se realizaron tres experimentos independientes por duplicado y se seleccionaron al azar 100 células las cuales se analizaron con el programa Komet 5.5. Los datos se representan como la media ± SEM y se analizaron con la prueba ANOVA de un factor y el post-test de Dunnet. La significación estadística se indica en el gráfico como: *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001.

En la Figura 22 se muestran los resultados obtenidos tras las exposiciones a 24 h. Cuando el daño genotóxico se analizó (a, c), se observaron ligeros efectos en ambas exposiciones, PSNPLs y dPSNPLs, con diferencias entre las diferentes líneas celulares. La exposición a PSNPLs indujo efectos sólo en la línea celular Raji-B a las concentraciones más altas (25 y 50 µg/mL). Por otro lado, los dPSNPLs indujeron efectos estadísticamente significativos sólo en la línea celular THP1, aunque también se observó una tendencia a mostrar un elevado daño en el DNA en las células Raji-B.

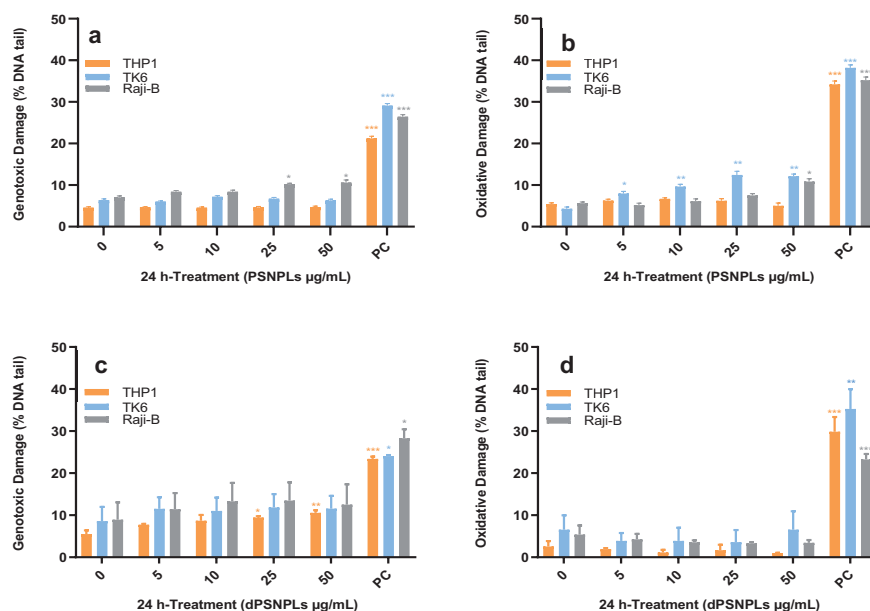


Figura 22. Daño genotóxico y oxidativo en el DNA detectado por el ensayo del cometa luego de 24 h de exposición a PSNPLs (a, b) y dPSNPLs (c, d). El daño oxidativo (ODD) se detectó utilizando la enzima FPG. La concentración de 200 µM de metanosulfonato de metilo (MMS) se utilizó como control positivo (PC) para la inducción del daño genotóxico mientras que el bromato de potasio (KBrO₃) se utilizó como control positivo para ODD. Se realizaron tres experimentos independientes por duplicado y se seleccionaron al azar 100 células, las cuales se analizaron con el programa Komet 5.5. Los datos se representan como la media ± SEM y se analizaron con el ensayo ANOVA de un factor y el post-test de Dunnet. La significación estadística se indica en el gráfico como: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Cuando se determinó la capacidad de inducir daño oxidativo en las bases del DNA, se observaron diferencias entre exposiciones. En la línea celular TK6 se observaron efectos tras la exposición a PSNPLs; sin embargo, estos efectos no suceden después de la exposición a dPSNPL. Interesantemente, estos resultados coinciden con los resultados obtenidos de los experimentos donde se evalúa la inducción intracelular de ROS. En

general, se han observado algunos efectos genotóxicos asociados con la exposición; no obstante, estos efectos se pueden considerar como leves. Es bien conocido el vínculo entre la inducción de ROS y la genotoxicidad (Quezada-Maldonado et al., 2021) lo que respaldaría nuestros hallazgos. Sin embargo, la potencial genotoxicidad de los MNPLs es un tema conflictivo, ya que se han citado resultados contradictorios (Xu et al., 2022). Se pueden asociar diferentes razones para explicar los datos contradictorios de genotoxicidad. En primer lugar, bajo la premisa de que existen MNPLs de una gran variabilidad de tamaños, lo que puede afectar el resultado de la genotoxicidad. Alternativamente, la línea celular usada es otra fuente potencial de variabilidad ya que la internalización de MNPL depende de la célula. Finalmente, está el potencial genotóxico (si existe) de los MNPLs, ya que, si éste es débil, se espera una gran variabilidad, basada únicamente desde un punto de vista probabilístico.

3.1.4. CONCLUSIONES

Una de las principales rutas de ingreso de los MNPLs en el cuerpo humano es a través de la ingestión. Su largo trayecto a través de los diferentes compartimentos del tracto gastrointestinal hasta alcanzar la barrera intestinal puede modificar algunas de sus propiedades como el tamaño y superficie. Estos cambios pueden surgir como consecuencia del proceso de digestión. Por lo tanto, estos cambios pueden modificar su capacidad de internalización y como resultado su distribución a través de todo el cuerpo. En este trabajo hemos explorado si el proceso de digestión *in vitro* de las partículas de nanopoliestireno (PSNPLs) de alrededor de 50 nm pueden modificar algunas de sus propiedades. Primeramente, e independientemente del método utilizado para su caracterización y distribución de tamaño (TEM, DLS y NTA), no se han observado diferencias relevantes en tamaño entre las partículas digeridas y sin digerir. Sin embargo, una mayor tendencia a formar agregados se ha observado en las partículas digeridas, y los análisis de CRM indican la presencia de proteínas diferentes en la superficie de los dPSNPLs.

Es de resaltar que se observaron grandes diferencias en la internalización de ambas partículas, siendo mayor en las partículas digeridas, y en las tres líneas celulares utilizadas. A pesar de estas diferencias en la internalización celular, no se han observado

diferencias importantes en la toxicidad, a excepción de lo que se observa en dosis muy elevadas, que se asumen como exposiciones poco realistas. Cuando el estrés oxidativo y la inducción de genotoxicidad se determinaron, los ligeros efectos observados en las exposiciones a la partícula sin digerir, no se observaron en las partículas digeridas. Esto puede indicar que la mayor habilidad de las partículas digeridas para internalizar no va acompañada por un daño mayor, sino más bien todo lo contrario.

3.2. CAPÍTULO 2: Nanopartículas de poliestireno como vectores de metales. Interacción de las partículas de nanopoliestireno con nanopartículas de plata y nitrato de plata, y sus efectos en las células intestinales humanas Caco-2.

El artículo científico desarrollado en el presente capítulo se ha llevado a cabo con la colaboración de: Josefa Domenech¹, Constanza Cortés¹, Ricard Marcos¹ y Alba Hernández¹.

¹Group of Mutagenesis, Department of Genetics and Microbiology, Faculty of Biosciences, Universitat Autònoma de Barcelona.

3.2.1. JUSTIFICACIÓN

Los desechos plásticos en el ambiente se degradan continuamente generando lo que se denominan micro/nanoplásticos (MNPLs). En el ambiente, los MNPLs coexisten con otros contaminantes como son los compuestos orgánicos (p. ej. los pesticidas), o los metales pesados (p.ej. Pb) (Bradney et al., 2019). La naturaleza hidrofóbica de las partículas de plástico y su gran superficie en relación al volumen facilitan la adsorción de estos contaminantes, actuando como vectores transportadores de diferentes elementos tóxicos (Bradney et al., 2019; Domenech et al., 2021). Así, estas partículas pueden actuar como caballos de Troya transportando y liberando contaminantes entre diferentes ambientes, a través del viento o el agua, pero también pueden transportarlos y liberarlos en el interior de los sistemas biológicos (Ahmad et al., 2022).

El hecho de que los MNPLs puedan actuar como caballos de Troya incrementa la posibilidad de que ingresen en el interior de los organismos expuestos los agentes tóxicos que los MNPLs puedan transportar. Existe incluso la posibilidad de que la combinación de MNPLs y sus contaminantes adsorbidos puedan ser más tóxicos que sus contrapartes por si solos (Jiang et al., 2020). Este tipo de complejo (nanopartícula/contaminante) se han encontrado en fragmentos plásticos ambientales, con concentraciones de más de cien veces superiores a las encontradas en sedimentos, y hasta un millón de veces superiores a las estimadas en el mar (Rodríguez-Hernández et al., 2019). Los mecanismos precisos por los cuales los metales se asocian con los MNPLs no están claros, pero es probable que impliquen la adsorción de iones al polímero

y al revestimientos del mismo, y la adherencia de pequeñas partículas minerales que contienen el metal a la superficie de la partícula plástica (Holmes et al., 2014). El objetivo del presente estudio fue el de analizar la capacidad de los MNPLs de actuar como vectores de metales, y evaluar el efecto biológico de complejos MNPLs/metal sobre la línea celular Caco-2.

Para lograr este objetivo primeramente se formó el complejo MNPLs/metal, a través de la interacción entre nanopoliestireno (PSNPLs) y nanoplata, así como entre PSNPLs y nitrato de plata. A partir de esta unión se evaluó si los PSNPLs modulan la adsorción de las partículas de plata. Para evaluar los diferentes efectos tóxicos y genotóxicos del complejo se utilizó la línea celular Caco-2. Esta línea celular es una línea celular derivada del adenocarcinoma colorrectal humano, la cual se usa como modelo de epitelio intestinal humano (Domenech et al., 2021). Estos efectos en la línea celular Caco-2 se analizaron a través de estudios de toxicidad celular, medición de niveles de ROS y estudios de genotoxicidad. Adicionalmente, para poder visualizar el complejo en el interior de las células se utilizaron PSNPLs marcados con fluorescencia.

3.2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.2.1. *Dispersión y caracterización de los materiales de plata y de las nanopartículas de poliestireno*

Las nanopartículas utilizadas para los diferentes ensayos se caracterizaron mediante microscopia electrónica de transmisión (TEM) y Zeta-sizer. El nanopoliestireno prístino (PSNPLs, PP-008-10) y el nanopoliestireno fluorescente (fPSNPLs, FP-00552-2) se obtuvieron de Spherotech (Chicago, IL, USA). Los PSNPLs con tamaño entre 0,05 a 0,1 μm se utilizaron para todos los ensayos realizados, excepto para los estudios de internalización de las nanopartículas, en los cuales se utilizaron fPSNPLs con un tamaño entre 0,04 a 0,09 μm .

Las dispersiones comerciales se diluyeron en agua destilada para obtener una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$, y en ella se sumergió una rejilla cubierta de carbono para el TEM. La visualización por TEM se realizó a través el equipo JEOL JEM-1400 (JEOL LTD, Tokyo, Japan). Adicionalmente, el programa Image J, suplementado con la

extensión Fiji, se utilizó para medir 100 imágenes seleccionadas al azar y determinar el diámetro medio de los PSNPLs. Así mismo, para analizar el diámetro hidrodinámico y el potencial zeta se utilizó la dispersión dinámica de luz (DLS) y la velocimetría láser Doppler (LDV) en un equipo Malvern Zetasizer Nano ZS zen3600 (Malvern, UK). Todos los parámetros para cada muestra se determinaron tres veces. Las nanopartículas de plata (AgNPs, SEPE5-25M) se adquirieron en nanoComposix (Prague, Czech Republic). Las AgNPs comerciales se diluyeron en albumina de suero bovino (BSA) al 0,05% y etanol al 100%, obteniendo una concentración final de 2,56 mg/mL. Posteriormente, se dispersaron por ultrasonificación a 10% de amplitud durante 16 min en un baño de agua fría. La dispersión obtenida se diluyó a 100 µg/mL para la caracterización con TEM y Z-sizer, siguiendo los pasos indicados previamente. El nitrato de plata (AgNO₃, ref 209139) utilizado en este estudio se obtuvo de Sigma-Aldrich (Germany) como sal. El AgNO₃ se diluyó y dispersó utilizando el mismo protocolo que para las AgNPs, para evitar las diferencias entre los tratamientos debido a los procedimientos de dispersión. Durante este proceso, la sal se diluye, liberándose los iones Ag⁺. Las dispersiones de AgNPs y AgNO₃ obtenidas se utilizaron como soluciones stock para todos los procedimientos experimentales.

3.2.2.2. *Interacciones entre plata/PSNPLs en medios de dispersión*

Para analizar las potenciales interacciones entre la plata y los PSNPLs, las muestras del tratamiento entre AgNPs/PSNPLs, o AgNO₃/PSNPLs se visualizaron por TEM. Para este propósito las muestras de AgNPs o AgNO₃ se incubaron con PSNPLs en una dilución de agua destilada a una concentración final de 5 µg/mL de AgNPs o AgNO₃ y a 10 ó 100 µg/mL de PSNPLs durante 3 h a temperatura ambiente. Las rejillas cubiertas de carbono para TEM se sumergieron dentro de las muestras y se visualizaron en un equipo JEOL JEM-1400 (JEOL LTD, Tokyo, Japan). Para demostrar que los materiales de plata se encuentran en la superficie del poliestireno, las muestras de AgNPs/PSNPLs y AgNO₃/PSNPLs se analizaron por microscopía electrónica de transmisión acoplada con espectroscopia de rayos X de dispersión de energía (TEM-EDX) con el equipo TEM JEOL-2011 (200 kV) (JEOL LTD, Tokyo, Japan), combinado con un detector INCA (Oxford Instruments, United Kingdom).

3.2.2.3. Cultivos celulares y reactivos

La línea celular Caco-2 derivada del adenocarcinoma colorrectal humano fue originalmente proporcionada por la Dra. Isabella de Angelis (Istituto Superiore di Sanità, Italia). Las células Caco-2 indiferenciadas (pase 30-45) se mantuvieron en medio DMEM (Biowest, France), suplementado con 2,5 µg/mL de Plasmocin™ (Invivo Gen, San Diego, CA), 1% de amino ácidos no esenciales (Biowest, France), y 10% de suero fetal bovino (FBS) (Biowest, France) a 37 °C en una atmosfera humidificada de 5% CO₂ y 95% de aire. Las células Caco-2 se subcultivaron dos veces a la semana para mantener una confluencia máxima del 80%. Para despegar las células del frasco de cultivo se utilizó tripsina al 1% en PBS 1X y para inactivar la tripsina, FBS en PBS 1X.

3.2.2.4. Tratamientos de plata y nanopoliestireno

Las células indiferenciadas Caco-2 se expusieron a diferentes concentraciones de AgNPs, AgNO₃, PSNPLs, fPSNPs, AgNPs/PSNPLs, AgNO₃/PSNPLs, AgNPs/fPSNPLs, y AgNO₃/fPSNPLs para estudiar los efectos inducidos. Para este propósito, 150.000 células Caco-2 se sembraron en placas de 12 pocillos por 24 h, permitiendo que las células se uniesen a la superficie del pocillo. El medio de cultivo se eliminó y las células se expusieron a 1 mL de los tratamientos correspondientes durante 24 h. Los diferentes tratamientos se prepararon diluyendo las nanopartículas previamente dispersadas en medio DMEM. En el caso de los cotratamientos, las partículas de plata y PSNPLS (o fPSNPLs) se incubaron juntas durante 15 min antes de añadir el tratamiento al cultivo celular. Todos los experimentos de cotratamientos se realizaron con concentraciones de 0, 0,1, 0,5, 1 y 5 µg/mL AgNPs (o AgNO₃), combinado con 0, 10, y 100 µg/mL de PSNPLs (o fPSNPLs).

3.2.2.5. Ensayo de viabilidad celular

Para realizar el ensayo de viabilidad celular en las células Caco-2 expuestas a PSNPLs, AgNPs, y AgNO₃ se utilizó el equipo Beckman Coulter Counter Z2 (Indianapolis, USA). Para este propósito, las células indiferenciadas se expusieron a 0, 25, 50, 100, 125, 150, 175, y 200 µg/mL de PSNPLs, ó 0, 0,5, 1, 5, 15, 25, y 50 µg/mL de AgNPs o AgNO₃. Los resultados obtenidos se utilizaron para decidir las concentraciones a emplear en los

cotratamientos. Posteriormente, se realizó otro estudio de viabilidad celular para ensayar la citotoxicidad de los cotratamientos en las células indiferenciadas Caco-2. Brevemente, las células sembradas previamente se expusieron a 0, 0,1, 0,5, 1, y 5 $\mu\text{g/mL}$ de AgNPs o AgNO_3 , combinado con 0, 10, y 100 $\mu\text{g/mL}$ de PSNPLs, por 24 h. En todos los experimentos las células se lavaron dos veces con PBS 1X y se despegaron con tripsina 1X durante 5 min a 37 °C, después del tiempo de exposición. A continuación, las células se resuspendieron en 2% FBS en PBS 1X y se diluyeron 1:100 en ISOTON[®], contándose el número de células/mL. Se realizaron tres experimentos independientes con triplicados de cada muestra.

3.2.2.6. Colocalización intracelular de AgNPs y de fPSNPLs

Para analizar si las interacciones observadas entre AgNPs y PSNPLs permanecen durante el tratamiento celular, y para confirmar la internalización de los complejos AgNPs/PSNPLs, la colocalización de AgNPs y fPSNPLs en el interior de las células Caco-2 se visualizó mediante microscopía confocal. Para este propósito, se sembraron células indiferenciadas Caco-2 durante 24 h antes de los ensayos en microplacas con fondo de vidrio (MatTek, Ashland, MA, USA) y se expusieron a 0, 0,5, ó 5 $\mu\text{g/mL}$ de AgNPs combinado con 0, 10, y 100 $\mu\text{g/mL}$ fPSNPLs. Posterior a la exposición, las muestras se lavaron con DMEM fresco, y el núcleo se tiñó durante 15 min a temperatura ambiente con 1:500 de Hoechst 33342 (ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA USA), y las membranas celulares con 1:500 de Cellmask[™] Deep Red plasma (ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA, USA). Los fPSNPLs se visualizaron gracias a su fluoróforo, y las AgNPs se detectaron gracias a sus propiedades reflectivas. Se realizaron dos experimentos diferentes, y dos campos seleccionados al azar por muestra se visualizaron con el microscopio confocal Leica TCS SP5. El programa Imaris 9.5 se utilizó para el procesamiento de las imágenes.

3.2.2.7. Cuantificación de la absorción de plata a través de ICP-MS

Para determinar la cantidad de plata internalizada por las células Caco-2 se utilizó la espectrometría masas por plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). Después de la exposición a 0,5, 5/10, ó 100 $\mu\text{g/mL}$ de AgNPs/PSNPLs o de AgNO_3 /PSNPLs por 24 h,

las células se lavaron tres veces en PBS 1X, usándose tripsina al 1% a 37 °C durante 5 min para despegarlas. Posteriormente, las células se recolectaron en un tubo de vidrio y se centrifugaron a 100 rcf durante 8 min. El sobrenadante se descartó y el precipitado de células se congeló a -20 °C hasta el siguiente paso. Las muestras se digirieron en un bloque de calor en ácido nítrico concentrado (Merck, supra-pure) a 105 °C durante 30 min, y la cantidad de plata en cada muestra se determinó utilizando un ICP-MS 7500 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Se realizaron tres experimentos independientes con duplicados de cada muestra.

3.2.2.8. Producción intracelular de ROS

A través de citometría de flujo se determinó la producción intracelular de ROS a través del ensayo con dihidroetidio (Merck Group, Darmstadt, Germany). Para este propósito, células indiferenciadas Caco-2 se expusieron a AgNPs/PSNPLs o AgNO₃/PSNPLs durante 24 h. Como control positivo se utilizaron 100 µg/mL de concentrado de humo de tabaco (CSC, Murty Pharmaceuticals, USA) durante 40 min. Las células se lavaron 2 veces en PBS 1X, se tripsinizaron, y se recuperaron en tubos para citometría de flujo (FACS), centrifugándose a 200 rcf durante 5 min. Las células se resuspendieron en 10 µM DHE en PBS 1X para obtener una concentración final de 1×10^6 cel/mL, incubándose a 37 °C durante 30 min. Terminada su incubación se colocaron en hielo y se añadió 5 nM de VPR (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) antes del análisis para discriminar las células muertas. Se utilizó el citómetro de flujo BD FACSCanto Flow Cytometer (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) para medir la fluorescencia de 10000 eventos de células vivas, utilizando un espectro de excitación/emisión de 488/515–545 nm. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes con duplicados de cada muestra, y por cada condición.

3.2.2.9. Inducción de daño genotóxico y oxidativo en el DNA

La detección del daño genotóxico y oxidativo (ODD) se llevó a cabo mediante el ensayo alcalino del cometa, complementado con la enzima formamidopirimidina DNA glycosilasa (FPG), después de exponer a las células Caco-2 a los tratamientos con AgNPs/PSNPLs o AgNO₃/PSNPLs durante 24 h. Para este propósito, después de eliminar los

tratamientos, las células se lavaron en PBS 1X y se despegaron con tripsina 1% a 37 °C durante 5 min. Las células se colectaron, y centrifugaron a 0.3 rcf por 8 min a 4 °C y el precipitado se resuspendió en PBS 1X frío, obteniendo una concentración final de 1×10^6 cells/mL. Posteriormente, 25 μ L de la suspensión celular se mezclaron con agarosa de bajo punto de fusión al 0,75% en una proporción 1:10 a 37 °C y se depositaron sobre un film de GelBond (GBF) (Life Sciences, Lithuania), colocando tres muestras por cada condición a analizar. Las células se lisaron durante 24 h a 4 °C con una solución de lisis (2.5 M NaCl, 0,1 M Na₂EDTA, 0,01 M Base Tris, 1% Triton X-100, 1% lauril sarcosinato, 10% DMSO, a pH 10). Terminada la lisis, los GBFs se incubaron con la solución Collins fría (0,04 M HEPES, 0,1 M KCl, 0,5 mM EDTA, 0,2 mg/mL BSA) durante 10 min, seguido de otra incubación con buffer fresco frío durante 50 min. A continuación, los GBFs se incubaron con solución Collins precalentada, con o sin enzima FPG a una dilución 1:2500 por 30 min a 37 °C. Los GBFs se lavaron con solución de electroforesis (0,3 M NaOH, 1 mM EDTA) durante 5 min y después se incubaron con solución fresca de electroforesis durante 35 min a 4 °C. Terminada la incubación se realizó la electroforesis a 20 V, 300 mA a 4 °C durante 23 min. Después, se procedió a lavar los GBFs dos veces con PBS frío 1X durante 5 min y se mantuvieron en etanol al 100% durante al menos 1 h. Finalmente, para teñir las células se dejaron secar los GBFs al ambiente durante toda la noche y una vez secos se incubaron por 20 min en una solución de SYBR Gold 10 X (Life Technologies, CA, USA) en TE (10 mM Tris Base, 1 mM EDTA) al 1:1250. Para el análisis de los cometas los GBFs se visualizaron con un microscopio de epifluorescencia (Olympus BX50) a 20X de magnificación. El daño en el DNA se determinó según el porcentaje de DNA en las colas de los cometas usando el programa Komet 5.5 (Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, UK). Para el análisis, se evaluaron 100 cometas por muestra seleccionados al azar, y cada muestra se analizó por duplicado, realizándose tres experimentos independientes. Como control positivo del daño general genotóxico se utilizó el metanosulfonato de metilo (200 μ M MMS, Sigma-Aldrich, Germany), mientras que el bromato de potasio (5 mM KBrO₃, Sigma-Aldrich, Germany) se utilizó como control positivo para el ODD.

3.2.2.10. Análisis estadístico

Todos los resultados obtenidos son el promedio de tres experimentos diferentes con duplicados, al menos que se especifique de otra manera. Los datos se analizaron con el programa GraphPad Prism 5 y los diferentes análisis estadísticos, especificados en cada sección de los resultados para cada ensayo, se utilizaron dependiendo de las características de los datos. El significado estadístico se definió como * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$. El asterisco sobre cada columna indica la significación estadística relacionado con el control negativo (sin tratamiento), sin plata y sin plástico. Los asteriscos sobre los corchetes se refieren a la significación estadística entre las columnas indicadas por el corchete, al menos que se indique de otra manera.

3.2.3. RESULTADOS

3.2.3.1. Caracterización de AgNPs y PSNPLs

Las partículas de AgNPs y PSNPLs se visualizaron por TEM para determinar su morfología y tamaño. La Figura 23 muestra que los PSNPLs están compuestos de partículas esféricas electrodensas de alrededor de 40 nm de diámetro. Por el contrario, las AgNPs son partículas esféricas, mucho más pequeñas de alrededor de 5 nm de diámetro.

La Tabla 1 resume el tamaño medio de las partículas de PSNPLs, fPSNPLs, y AgNPs, medidas por Image J a partir de las imágenes del TEM; adicionalmente se resumen los datos obtenidos a través del análisis con el Zeta-sizer. Mientras los PSNPLs y fPSNPLs son similares en apariencia y tamaño respecto a los análisis TEM, los tamaños parecen ser mayores cuando se analiza el radio hidrodinámico a través de DLS. Lo mismo sucede cuando se analizan las AgNPs. Además, los valores del índice de polidispersidad (Pdl) indican que las muestras de PSNPLs muestran dispersiones más consistentes que las muestras de fPSNPLs, ya que los valores de Pdl están cercanos a 0, indicando que la muestra es más monodispersa. Al contrario, los valores de Pdl para las AgNPs muestran un rango de tamaño de partícula más amplio. Aun así, los resultados de las mediciones del potencial Zeta muestran que todas las dispersiones son estables y no tienden a

agregarse. De manera general estos datos concuerdan con las observaciones realizadas en el TEM.

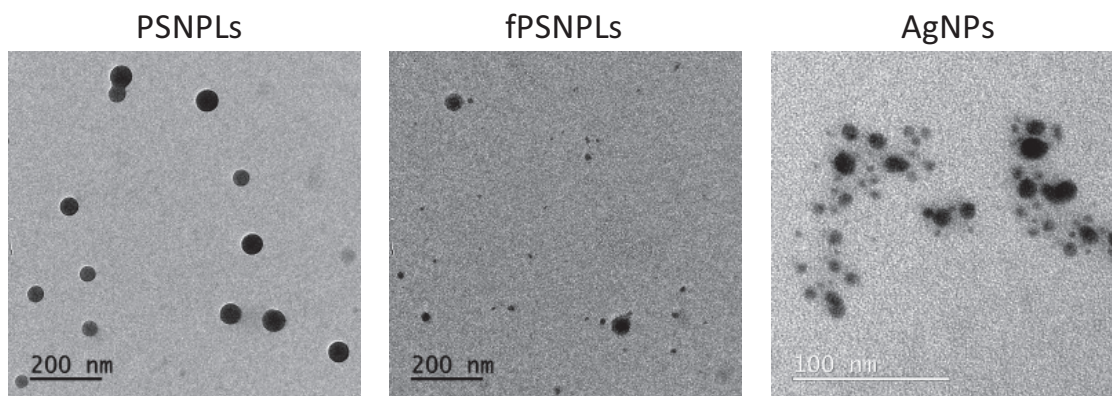


Figura 23. Imágenes representativas de TEM de los nanomateriales de PS (PSNPLs y fPSNPLs) y de AgNPs. Para la visualización se utilizaron diluciones de 100 $\mu\text{g/mL}$ en agua destilada de cada material.

Tabla 1. Nanomateriales de PS y AgNPs caracterizados por TEM (tamaño medio) y Zetasizer Nano ZS (media \pm SD)

	PSNPLs	fPSNPLs	AgNPs
Median size (nm) (TEM)	45,91	42,42	4,48
Size (nm) (DLS)	$86,33 \pm 10,20$	$112,87 \pm 3,11$	$137,30 \pm 0,25$
PdI (DLS)	$0,10 \pm 0,09$	$0,35 \pm 0,02$	$0,76 \pm 0,01$
Z-potential (mV) (DLV)	$-36,00 \pm 7,88$	$-45,97 \pm 3,84$	$-16,80 \pm 0,76$
Mobility ($\mu\text{m cm/Vs}$) (DLV)	$-2,29 \pm 0,10$	$-3,76 \pm 0,38$	$-1,32 \pm 0,06$

3.2.3.2. Determinación de la interacción entre plata/PSNPLs en dispersión

A través de TEM se visualizó la interacción entre las partículas de AgNPs y PSNPLs en dispersión. En la Figura 24 se observa como las partículas electrodensas de la plata se encuentran en la superficie de los PSNPLs. Para demostrar que las partículas electrodensas son plata, y para validar la potencial colocalización de los iones plata y las partículas de poliestireno, la plata elemental se rastreó mediante TEM-EDX. La detección de los picos de la transición de electrones de plata, como se muestra en los diagramas de la Figura 25, demuestra la colocalización de partículas de plata o iones de plata y

PSNPLs. Para este ensayo, 5 $\mu\text{g/mL}$ de AgNPs o AgNO_3 se incubaron con 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$ de PSNPLs. Esto se indica en la Figura 25 como 5/10 ó 5/100 $\mu\text{g/mL}$.

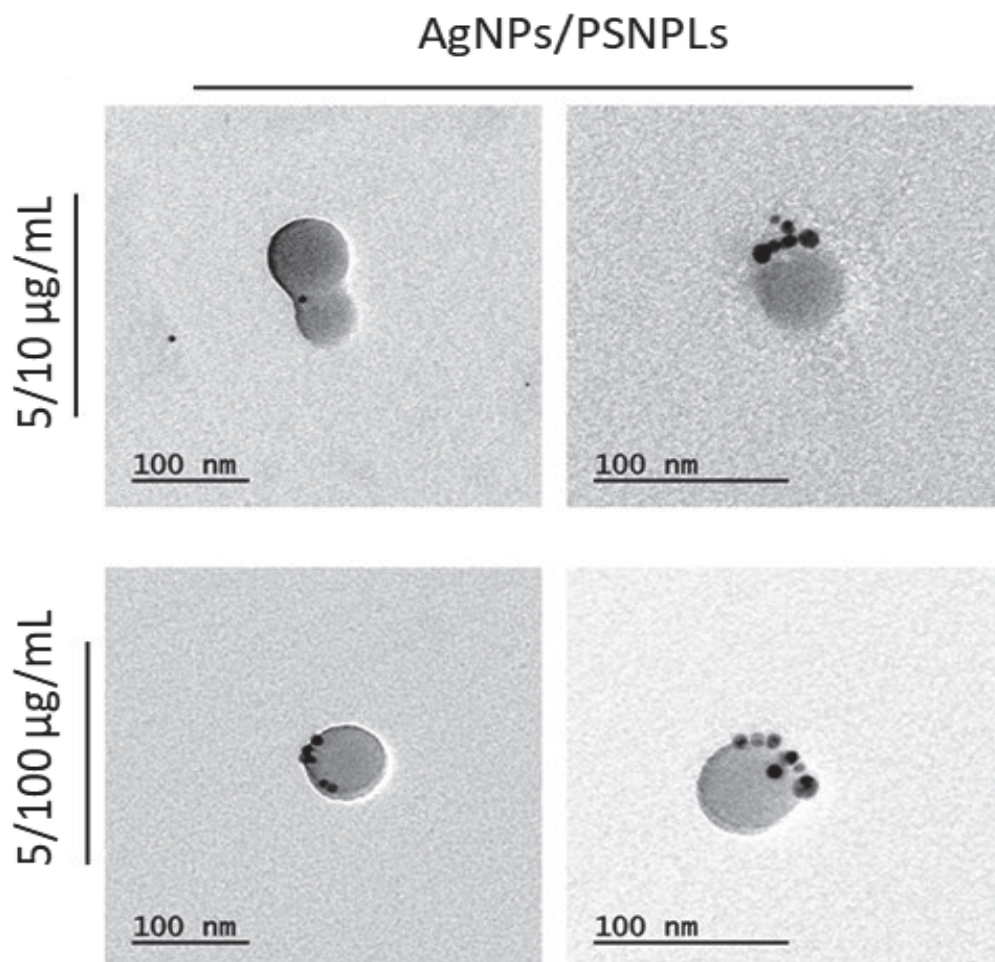


Figura 24. Imágenes representativas de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de 5 $\mu\text{g/mL}$ de AgNPs mezcladas con 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$ de PSNPLs. Los cotratamientos visualizados se indican en la figura como 5/10 ó 5/100 $\mu\text{g/mL}$.

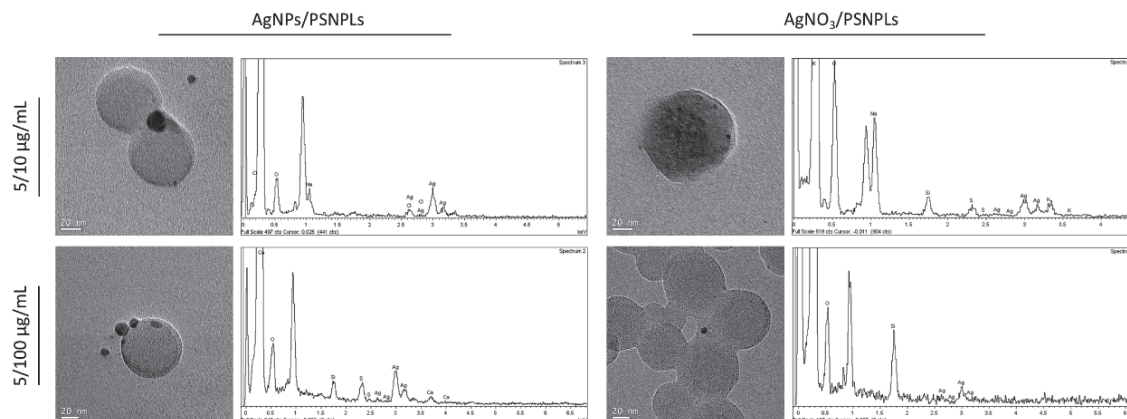


Figura 25. Imágenes representativas de microscopía electrónica de transmisión (TEM) asociadas con sus espectros de espectroscopia de rayos X de dispersión de energía (EDX), que muestran la caracterización química elemental. Las imágenes TEM representativas y sus espectros EDX corresponden a 5 µg/ml de AgNPs o AgNO₃ mezclados con 10 o 100 µg/mL de PSNPLs (indicados en la figura como 5/10 ó 5/100 µg/mL, respectivamente).

3.2.3.3. *Ensayo de citotoxicidad*

Se llevaron a cabo ensayos de viabilidad para evaluar las concentraciones citotóxicas de la plata, nanopoliestireno, y los cotratamientos de plata/PSNPLs en las células indiferenciadas Caco-2 tras exposiciones de 24 h. Como se muestra en la Figura 26A, hay un descenso significativo en la viabilidad de las células después de la exposición a AgNO₃, comenzando por la concentración de 5 µg/mL. Además, este decrecimiento en la viabilidad celular es ligeramente más bajo cuando las células Caco-2 se han expuesto a AgNPs, alcanzando valores significativos desde los 25 µg/mL de tratamiento. En consecuencia, las células Caco-2 indiferenciadas son más susceptibles al tratamiento con AgNO₃ que al AgNPs, aunque se observa una disminución por debajo del 75% de la viabilidad celular a partir de la concentración de 5 µg/mL en ambos tratamientos. Los PSNPLs no muestran citotoxicidad en las células Caco-2 (Figura 26B), ya que la viabilidad celular permaneció inalterada a exposiciones de 150 µg/mL de PSNPLs. Además, aunque las células tratadas a la concentración más alta muestran una disminución de la viabilidad celular, ésta no alcanza valores estadísticamente significativos. Por otro lado, los resultados obtenidos para los cotratamientos

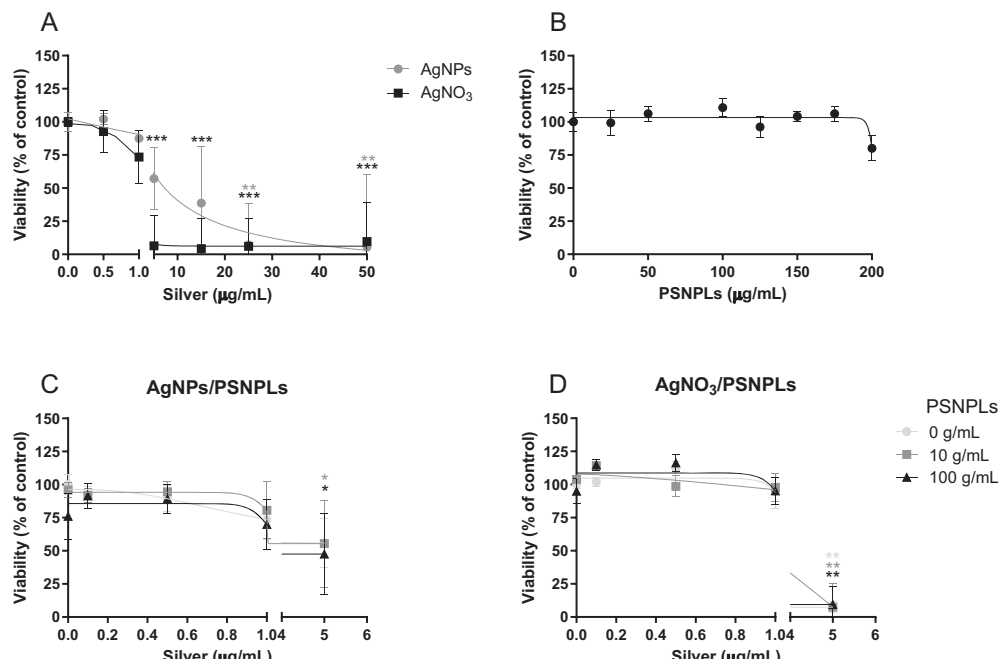


Figura 26. Viabilidad relativa de células Caco-2 no diferenciadas después de 24 h de exposición a AgNPs o AgNO₃ (A), PSNPLs (B), AgNPs/PSNPLs (C) y AgNO₃/PSNPLs (D) a concentraciones que oscilan entre 0 y 50 µg/mL para materiales de plata y concentraciones de PSNPLs que oscilan entre 0 y 200 µg/mL. Los porcentajes de viabilidad se calcularon promediando el número de células contadas para cada condición en tres experimentos independientes. La viabilidad celular se representa como el porcentaje de células contadas en comparación con el control no tratado \pm SEM (error estándar). Los datos se analizaron comparando cada condición con el control no tratado mediante la prueba t de Student. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

AgNPs/PSNPLs o AgNO₃/PSNPLs se representan en la Figuras 26C y 26D, respectivamente. En ambos casos, la viabilidad celular se mantiene constante a las concentraciones de 0,1, 0,5 y 1 µg/mL de plata mezclada sin o con 10 ó 100 µg/mL de PSNPLs. Sin embargo, se observa una reducción significativa en la viabilidad de las células a una concentración de 5 µg/mL de materiales de plata, independientemente del PSNPLs, siendo más pronunciado en tratamientos AgNO₃/PSNPLs. La adición de PSNPLs no parece ejercer un efecto diferencial en ninguno de los tratamientos ensayados, ya que los resultados de viabilidad celular para las células Caco-2 no varían, independientemente de si los materiales de plata se mezclan o no con PSNPLs.

3.2.3.4. Colocalización intracelular de complejos AgNPs/fPSNPLs

Para determinar la colocalización y ubicación celular de AgNPs y PSNPLs dentro de las células Caco-2 después de la exposición, se utilizó microscopía confocal. Por un lado, la plata y los PSNPLs se encontraron individualmente dentro de las células en las diferentes condiciones analizadas, lo que indica que existe internalización de las partículas en todas

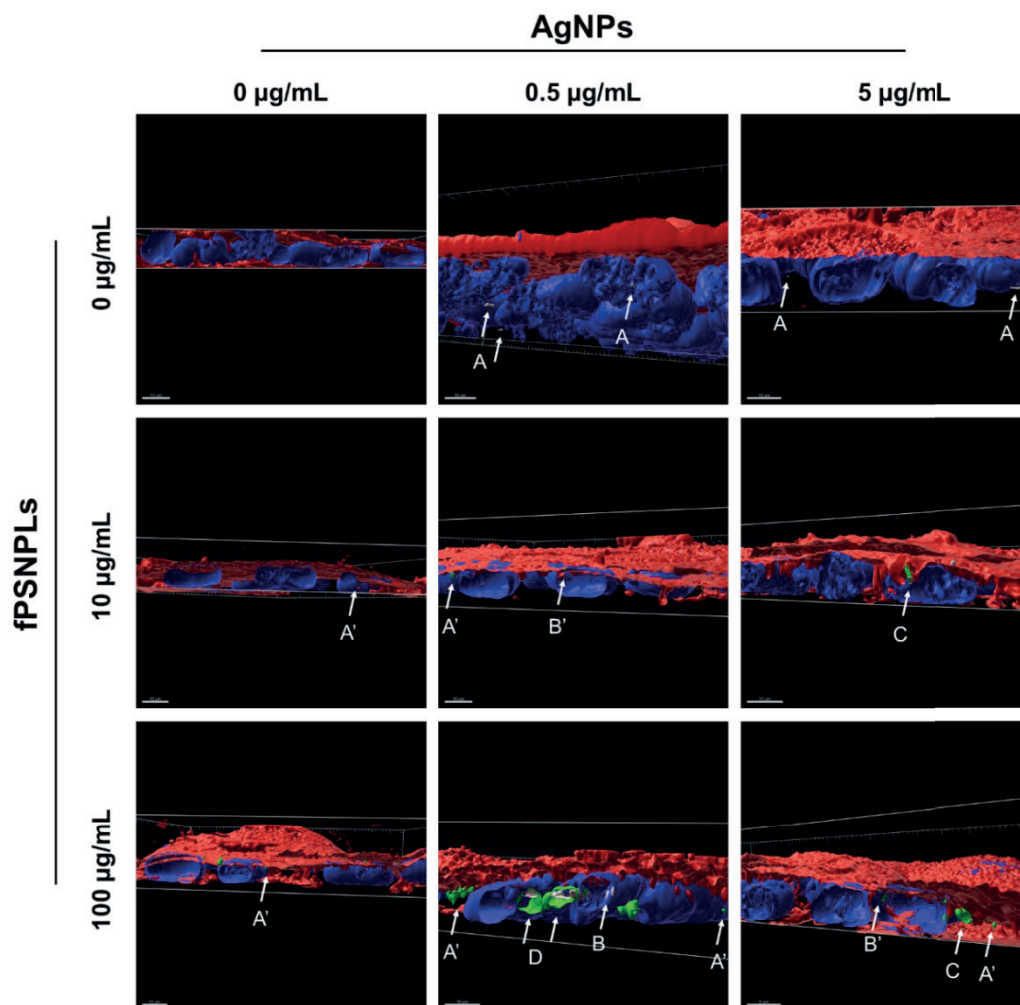


Figura 27. Selección de imágenes tridimensionales representativas de las células Caco-2 expuestas a 0, 0,5 ó 5 µg/mL de AgNPs combinadas con 0, 10 y 100 µg/mL de fPSNPLs durante 24 h. Los núcleos y las membranas celulares están teñidos con Hoechst (azul) y CellMask (rojo), respectivamente. Las partículas fPSNPLs se muestran en verde y las AgNPs en gris. Las flechas señalan: AgNPs y fPSNPLs ubicadas dentro de las células (indicados como A y A', respectivamente); AgNPs y fPSNPLs ubicadas dentro de los núcleos (indicados como B y B', respectivamente); complejos AgNPs/fPSNPLs ubicados dentro de las células (indicados como C); y complejos AgNPs/fPSNPLs ubicados dentro de los núcleos (indicados como D). Se utilizó el programa Imaris 9.5 para procesar las imágenes y tomar las instantáneas mostradas. Se llevaron a cabo dos experimentos diferentes y se analizaron dos campos diferentes elegidos al azar.

las concentraciones evaluadas, tanto para la plata como para los PSNPLs (Figura 27A, A').

Además, las AgNPs y las fPSNPLs pudieron ingresar en los núcleos en las diferentes condiciones (Figura 27B,B'). Los complejos AgNPs/fPSNPLs también se encontraron dentro de las células en las condiciones de 0,5+100, 5+10 y 5+100 $\mu\text{g/mL}$ AgNPs/fPSNPLs (Figura 27, indicador C). Además, los complejos AgNPs/fPSNPLs se visualizaron dentro del núcleo celular, como se observa en la figura 27D, en la condición de 0,5 + 100 $\mu\text{g/mL}$ AgNPs/fPSNPLs. En resumen, las AgNPs y las fPSNPLs pueden permanecer asociadas, formando complejos durante su captación por las células Caco-2 e incluso llegar al núcleo celular.

3.2.3.5. *Cuantificación de la captación de plata*

Después de la exposición de las células Caco-2 a AgNPs/PSNPLs o AgNO_3 /PSNPLs, la internalización de plata se cuantificó mediante ICP-MS. La cantidad de plata detectada dentro de las células Caco-2 después del tratamiento con AgNPs/PSNPLs (Figura 28 A) mostró un aumento significativo dependiente de la dosis, en todas las concentraciones de poliestireno. Además, al comparar los resultados obtenidos para cada concentración de AgNPs a las diferentes dosis de PSNPLs, se observa una ligera tendencia a aumentar la internalización de plata cuando se incrementan las concentraciones de PSNPLs. En cuanto a los tratamientos AgNO_3 /PSNPLs (Figura 28 B), se puede observar un aumento dependiente de la dosis de AgNO_3 significativo de la plata internalizada en todas las concentraciones de poliestireno, alcanzando valores significativos en todas las concentraciones de PSNPLs. Este aumento es mucho más pronunciado que el observado para los tratamientos con AgNPs/PSNPLs. Nuevamente, se muestra una tendencia ligeramente creciente en la cantidad de plata internalizada a medida que aumenta la dosis de poliestireno cuando las células se exponen a 5 $\mu\text{g/mL}$ de AgNO_3 .

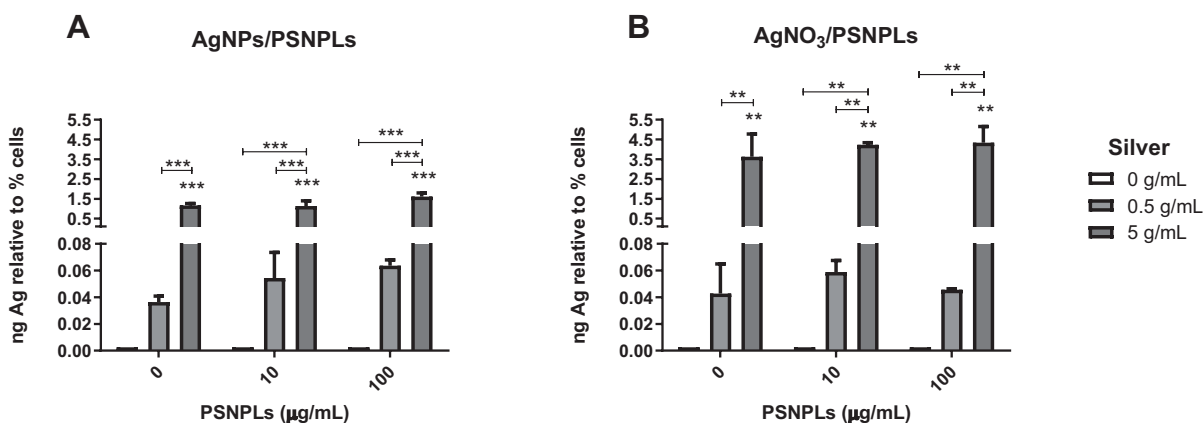


Figura 28. Cuantificación de la plata internalizada por las células Caco-2 tras la exposición a 0, 0,5 y 5 µg/mL/0, 10 y 100 µg/mL de AgNPs/PSNPLs (A) o AgNO₃/PSNPLs (B). Los datos se obtuvieron promediando tres experimentos independientes realizados por duplicado. Se promediaron los duplicados de cada experimento y se utilizó el porcentaje de células viables para normalizar los resultados. El dispositivo ICP-MS no detectó plata en aquellas muestras tratadas sin plata, por lo que estos resultados se representan arbitrariamente como 0,0025 ng de plata. Los datos se representan como media ± SEM (error estándar) y se analizaron mediante ANOVA de un factor con la prueba post-hoc de comparación múltiple de Tukey, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$.

3.2.3.6. Producción de ROS intracelular

El ensayo DHE se usó para determinar la producción intracelular de ROS en células Caco-2 después de la exposición a los cotratamientos de AgNPs/PSNPLs y AgNO₃/PSNPLs durante 24 h. Los resultados muestran que los cotratamientos AgNPs/PSNPLs y AgNO₃/PSNPLs en células Caco-2 muestran resultados similares, independientemente de la concentración de PSNPLs (Figura 29A,B, respectivamente). A pesar de ello, existe una tendencia a aumentar la producción de ROS en las muestras tratadas con la mayor concentración de AgNPs (5 µg/mL), alcanzando valores significativos próximos a los del control positivo. De manera similar, la producción de ROS intracelular alcanzó valores estadísticamente significativos a la concentración más alta de AgNO₃ en todos los cotratamientos con PSNPLs, que son comparables con el control positivo. Los datos se muestran como el porcentaje de intensidad de fluorescencia con respecto al control positivo en la Figura 29A,B. Según lo evaluado en el ensayo de viabilidad, la concentración más alta de AgNO₃ ejerce un efecto citotóxico en las células Caco-2 de modo que el número de células analizadas en las condiciones

que contienen 5 $\mu\text{g/mL}$ de AgNO_3 es menor en comparación con las otras condiciones. Sin embargo, las células restantes muestran valores de intensidad de fluorescencia similares a los del control positivo.

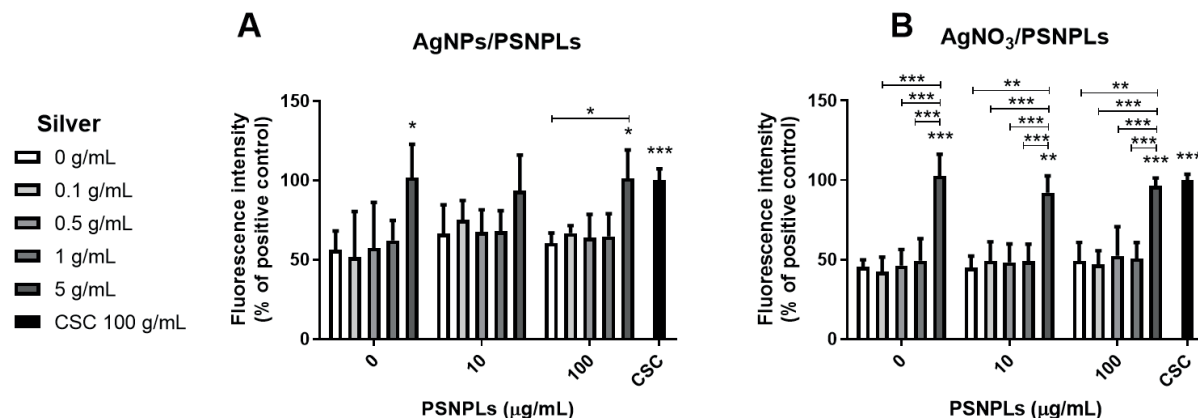


Figura 29. Análisis de producción de ROS intracelular en células Caco-2 indiferenciadas expuestas a AgNPs/PSNPLs (A) o AgNO_3 /PSNPLs (B) durante 24 h. Se utilizó la exposición a 100 $\mu\text{g/mL}$ de CSC como control positivo. La producción de ROS se extrapoló del promedio de la intensidad de fluorescencia media de tres experimentos independientes con muestras duplicadas (10.000 eventos tomados de la población de células vivas de cada muestra). Los datos se representan como el porcentaje de intensidad de fluorescencia en comparación con el control positivo \pm SEM (error estándar) y se analizan mediante ANOVA de un factor con la prueba post-hoc de comparación múltiple de Tukey, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$

3.2.3.7. Determinación de la genotoxicidad y el daño oxidativo del DNA

Se realizó el ensayo del cometa, complementado con la enzima FPG, para cuantificar el daño genotóxico y oxidativo en el DNA inducido por las diferentes exposiciones. Como se muestra en la Figura 30A, hay un aumento en los niveles de daño genotóxico relacionado con la concentración de AgNPs. Esta tendencia se mantiene independientemente de las dosis de PSNPLs. Sin embargo, la genotoxicidad alcanza valores significativos de tendencia lineal sólo cuando las células se tratan con AgNPs mezcladas con 100 $\mu\text{g/mL}$ de PSNPLs (* $P \leq 0.05$). Del mismo modo, la tendencia a aumentar el daño genotóxico a la mayor concentración de plata se mantiene cuando las células se tratan con AgNO_3 /PSNPLs (Figura 30B) pero, en este caso, el tratamiento ejerce un efecto genotóxico más pronunciado, alcanzando valores estadísticamente

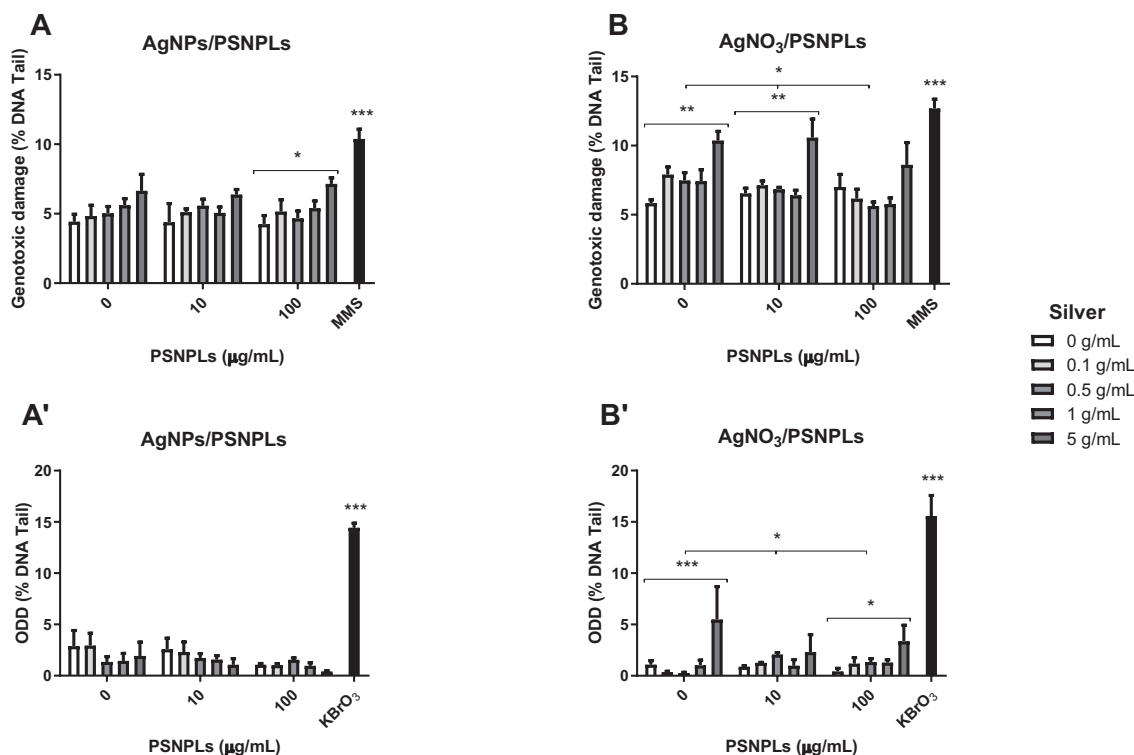


Figura 30. Daño genotóxico detectado con el ensayo del cometa después de 24 h de exposición a AgNPs/PSNPLs (A) o AgNO₃/PSNPLs (B), usando MMS 200 μM como control positivo. Daño oxidativo en el DNA (ODD) detectado usando la enzima FPG después de 24 h de exposición a AgNPs/PSNPLs (A') o AgNO₃/PSNPLs (B'), usando KBrO₃ 5 mM como control positivo. Se realizaron tres experimentos independientes con duplicados y el programa analizó 100 células seleccionadas al azar. El daño genotóxico y oxidativo del DNA se extrapola del porcentaje de DNA en la cola de los cometas. Los datos representados son el promedio de tres experimentos. Para el cálculo de ODD restamos el daño genotóxico del daño general para cada experimento y promediamos los valores resultantes. Los datos se representan como media ± SEM y se analizan mediante ANOVA de un factor con prueba post-hoc de tendencia lineal. Los corchetes indican el grupo de muestras para las que se muestra una tendencia lineal significativa. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

significativos de tendencia lineal cuando las células se tratan con AgNO₃ sólo o mezclado con 10 μg/mL de PSNPLs (** $P \leq 0,01$, en ambos casos).

La falta de una tendencia significativa en los efectos genotóxicos observados con AgNO₃/100 μg/mL de PSNPLs puede explicarse debido al efecto citotóxico mostrado anteriormente de la combinación de 5/100 μg/mL de AgNO₃/PSNPLs. Por lo tanto, la mayoría de las células con daño en el DNA no sobrevivieron al tratamiento y, en consecuencia, no se incorporaron al análisis. Además, se encuentran valores estadísticamente significativos de forma dependiente del poliestireno a 0,5 μg/mL de AgNO₃ (* $P \leq 0,05$). En cuanto a la inducción de ODD, no encontramos daño oxidativo en

el DNA de las células Caco-2 tratadas con AgNPs/PSNPLs (Figura 30A'). Por el contrario, los efectos más marcados del ion plata se vuelven a observar al analizar el ODD en células expuestas a AgNO₃/PSNPLs, donde se observa una tendencia creciente dependiente de la dosis de AgNO₃ que alcanza valores significativos cuando las células se tratan solo con AgNO₃ ($***P \leq 0,001$), o combinado con 100 µg/mL de PSNPLs ($*P \leq 0,05$). Además, se encuentran cambios estadísticamente significativos de manera dependiente del poliestireno. La exposición de las células Caco-2 a concentraciones bajas (0,5 µg/mL) de AgNO₃ combinadas con las diferentes dosis de PSNPLs muestra una tendencia significativa a medida que aumenta la concentración de PSNPLs (Figura 30B').

3.2.4. DISCUSIÓN

La omnipresencia de desechos plásticos hace que sus derivados, los micro y nanoplásticos (MNPL), se consideren como contaminantes emergentes. Por lo tanto, se requieren esfuerzos sustanciales para evaluar su riesgo potencial para la salud, tanto de los organismos expuestos como de los humanos. Dada la falta de estudios de biomonitorio en humanos, y la escasez de estudios en modelos de mamíferos *in vivo*, el uso de estudios *in vitro* con modelos de líneas celulares humanas y de mamíferos se ha convertido en la forma estándar de evaluar el riesgo potencial que plantean los nanoplásticos (Rubio et al., 2020). Debido a la falta de nanoplásticos disponibles comercialmente, además del nanopoliestireno, la mayoría de los estudios publicados hasta el momento han utilizado este nanoplástico como modelo. Esto constituye un sesgo evidente en los estudios que buscan los riesgos potenciales que los nanoplásticos ambientales, resultado de la degradación de los residuos plásticos, representan para los humanos.

Se han observado efectos tóxicos del nanopoliestireno en células humanas cerebrales (T98G) y epiteliales (HeLa) (Schirizzi et al., 2017), así como en células THP-1 de macrófagos humanos (Stock et al., 2019) y células del trofoblasto placentario (BeWo b30) (Hesler et al., 2019). De manera similar, se han publicado efectos negativos en células Caco-2 no diferenciadas (Wu et al., 2019; Cortés et al., 2020), así como en células

diferenciadas que forman parte de los modelos complejos de bicultivo (Caco-2/HT29) y tricultivo (Caco-2/HT29 /Raji-B) (Stock et al., 2019; Hesler et al., 2019; Domenech et al., 2020). Además, se ha detectado citotoxicidad en células epiteliales de pulmón humano BEAS-2B (Lim et al., 2019) y en tres líneas celulares leucocitarias humanas diferentes (Raji-B, TK6 y THP-1). En este último estudio se observó captación celular, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y genotoxicidad, aunque con diferencias sustanciales entre las líneas celulares seleccionadas (Rubio et al., 2020). Estos resultados se confirmaron en exposiciones *ex vivo* usando glóbulos blancos de sangre completa de diferentes donantes. En estos estudios, se observaron claras diferencias entre los diferentes tipos de células para la absorción y daño en el DNA, así como para la expresión de varias citoquinas (Ballesteros et al., 2020).

Cabe señalar que la mayoría de estos estudios se realizaron utilizando muestras de nanopoliestireno prístino, que son significativamente diferentes de las presentes en el medio ambiente (MNPLs secundarios). Por lo tanto, evaluar los efectos tóxicos de las muestras ambientales de MNPLs es un desafío futuro. Sin embargo, según lo informado por Zhu et al. (2019), los microplásticos esféricos, entre otros, se encuentran en ambientes acuáticos y terrestres. Esto puede explicarse por el uso de perlas de micro y nanoplástico en la producción de cosméticos como productos exfoliantes, que terminan como desechos plásticos en ambientes marinos (Gouin et al., 2015). Según dichos autores, la producción total de productos cosméticos asociados al uso de micro/nanoesferas para 2012 en Europa fue de 6.88×10^8 L, lo que representa alrededor de 4130 toneladas de micro/nanoesferas. Dado que los niveles de producción han ido en aumento, esto nos da una idea de la exposición a micro/nanoesferas y su relevancia como desechos plásticos ambientales.

Independientemente de su tamaño y composición, los nanoplásticos ambientales pueden interactuar con otros contaminantes ambientales, debido a su naturaleza hidrofóbica y su gran superficie, lo que facilita la adsorción de diferentes contaminantes como bifenilos policlorados, hidrocarburos aromáticos policíclicos y metales pesados. Así, los nanoplásticos podrían actuar como vectores de otros elementos más tóxicos presentes en el ambiente, afectando potencialmente sus perfiles toxicológicos (Bradney et al.,

2019). Sin embargo, esta atractiva propuesta ha sido mal evaluada hasta ahora. Por lo tanto, se necesitan estudios más realistas, que tengan en cuenta la capacidad potencial de adsorción de los nanoplásticos para los contaminantes ambientales (Wang et al., 2020). En este contexto, hemos evaluado las posibles interacciones entre el nanopoliestireno y compuestos de plata, como modelos de contaminantes metálicos ambientales. Desde este punto de vista, utilizar partículas pristinas comerciales tienen la ventaja de que permiten fijar las bases de los métodos, técnicas y ensayos adecuados para analizar las interacciones entre nanoplásticos y otros contaminantes ambientales con un enfoque homogéneo, pero también un modelo realista de las partículas de nanoplástico que se encuentran en el ambiente.

Se sabe que los nanomateriales pueden disolverse en diferentes condiciones. Esto también ocurre con las AgNPs que pueden liberar iones Ag^+ en solución. Hemos estudiado en paralelo esta liberación de iones, usando ICP-MS, observándose que alrededor del 12% de las AgNPs usadas (a la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$) se disolvió a las 24 h. Curiosamente, esta liberación se mantuvo estable al menos hasta las 72 h. Sin embargo, esto no afecta nuestro estudio porque incluimos AgNO_3 como modelo de agentes liberadores de iones. Así, esta comparación permite la discriminación de los efectos inducidos por partículas (AgNPs) de los generados por iones (AgNO_3). Teniendo en cuenta esta pequeña liberación, no llevamos a cabo más estudios de solubilidad cuando las AgNPs se combinan, suponiendo que no hay cambios significativos en la solubilidad de las AgNPs.

Nuestro estudio muestra claramente, mediante el uso de microscopía TEM, que las nanopartículas de plata se asocian con el nanopoliestireno. Este dato refuerza el interés por utilizar plata u otros metales en su forma nanoparticulada como una forma de detectar/visualizar este tipo de interacción. Las nanopartículas de plata, en particular, han atraído la atención de muchas industrias, especialmente aquellas que buscan efectos antisépticos, debido a sus propiedades únicas. Estas características antisépticas son particularmente deseables en alimentos, textiles, construcción, medicina, cosmetología, farmacia, y otras industrias. En cuanto al impacto ambiental de los compuestos de plata, cabe señalar que su mercado para 2020 fue de unas 600 toneladas

y se espera que para el 2025 alcance las 800 toneladas, lo que indica que abundantes cantidades de materiales de plata se liberan constantemente al ambiente (Davranche et al., 2019; Hasnain et al., 2023).

Además, las imágenes TEM también mostraron una forma granulada de nanopoliestireno cuando se incubó con nitrato de plata. La confirmación de la adsorción de nitrato de plata por el nanopoliestireno se obtuvo cuando se complementó TEM con la metodología EDX, donde los espectros obtenidos mostraron la caracterización química elemental de la plata. Todos estos resultados confirman, por primera vez, la utilidad de las metodologías TEM-EDX para visualizar asociaciones de nanoplástico/metal.

Actualmente, no existe un acuerdo general sobre si los nanoplásticos pueden intensificar la toxicidad de los contaminantes ambientales, aunque, teóricamente, una mayor adsorción podría dar como resultado una mayor bioacumulación (Wang et al., 2020). Nuestros resultados con las dos formas de plata no parecen indicar diferencias en la toxicidad de ambos materiales de plata solos o asociados con exposiciones a nanopoliestireno. De los dos estudios existentes sobre interacciones metal/nanoplástico, el estudio de Davranche et al. (2019) muestra la unión de metales usando nanoplásticos producidos a partir de microplásticos recolectados en la playa, y plomo como modelo de metal. Desafortunadamente, no realizaron estudios de toxicidad, aunque sugirieron el interés de evaluar los efectos tóxicos de los metales adsorbidos en el nanopoliestireno. En otro estudio realizado por Yan et al. (2022), los autores evaluaron la toxicidad del cadmio, plomo y zinc (junto con nanopoliestireno) en peces marinos, aunque no presentaron confirmación de la interacción metal/plástico. Los datos publicados indican una potencial interacción, aumentando la toxicidad sobre el microbiota intestinal, ya que el tratamiento con metal/nanopoliestireno causó una mayor cantidad de contaminación en el intestino. Sin embargo, no se observaron efectos de interacción cuando se evaluaron las alteraciones reproductivas a través de mediciones en el desarrollo gonadal, así como alteraciones en el patrón de expresión génica relacionado con la eje hipotálamo-pituitario-gonadal (HPG) (Yan et al., 2020). En consecuencia, nuestros datos y los citados no parecen respaldar un posible aumento de la toxicidad cuando los metales se unen a los nanoplásticos.

La interacción entre compuestos de plata y nanopoliestireno, detectada en la dispersión también se observaron en el interior de las células. En este escenario, el uso de nanopartículas de poliestireno fluorescentes, junto con las propiedades reflectantes de las nanopartículas de plata, permitieron su detección dentro de las células cuando se utilizó microscopía confocal. Gracias a la colocalización de ambas señales, se confirmó que las nanopartículas de plata y las nanopartículas de poliestireno permanecen asociadas durante su captación por las células Caco-2. Curiosamente, estos complejos también se observaron en el núcleo celular. Todos estos datos apoyan la utilidad de la microscopía confocal para visualizar el destino de estos complejos dentro de las células. Además, cabe señalar que nuestro enfoque es novedoso y hasta ahora nunca se había utilizado.

Ante la pregunta de si tales complejos aumentan la absorción de metales por parte de las células, determinamos los niveles de plata dentro de las células por ICP-MS cuando las células se trataron con materiales de plata solos o en combinación con nanopoliestireno. Los resultados obtenidos indican que a bajas concentraciones hay una tendencia a aumentar la adsorción de materiales de plata dependiendo de la concentración de nanopartículas de poliestireno, pero no se llegan a alcanzar valores significativos. La falta de diferencias observadas en los niveles más altos de concentración probados podría indicar que se ha alcanzado un posible umbral de saturación a dicha concentración. Teniendo en cuenta que las concentraciones ambientales de materiales de plata (o metales) deben ser bajas, la presencia de nanoplásticos podría aumentar la absorción de dichos metales y, potencialmente, aumentar sus efectos tóxicos.

Una vez comprobada la internalización celular de los complejos de nanopartículas de plata/nanopoliestireno, se evaluó la potencial activación de marcadores toxicológicos relevantes, como la inducción del estrés oxidativo y la genotoxicidad. La inducción del estrés oxidativo es un mecanismo general asociado con la exposición a nanomateriales (Dugershaw et al., 2020) y se ha demostrado que los metales, y específicamente las nanopartículas de plata, pueden inducir altos niveles de ROS intracelulares en células humanas cultivadas *in vitro* (Vila et al., 2017). Considerando el papel de la inducción del

estrés oxidativo como un mecanismo involucrado en los efectos nocivos de la exposición a micro y nanoplásticos, se ha propuesto este efecto como el principal mecanismo que afecta a los organismos marinos expuestos (Alimba y Faggio, 2019). Sin embargo, su papel en células humanas expuestas *in vitro* no es suficientemente concluyente. Los resultados observados en líneas celulares cerebrales y epiteliales (Schirizzi et al., 2017), y en fibroblastos dérmicos humanos y macrófagos de ratón (Wu et al., 2019) no se han observado en la línea celular de adenocarcinoma de colon humano Caco-2, donde no se detectaron efectos ni en células Caco-2 no diferenciadas (Cortés et al., 2020) ni diferenciadas (Domenech et al., 2020). En este último estudio, la falta de inducción de ROS se evaluó utilizando dos ensayos diferentes pero complementarios (DCFH-DA y DHE) y los resultados negativos se confirmaron al no detectar cambios en los niveles de expresión de los genes *SOD2* y *GSTP1*, ambos relacionados con la vía del estrés oxidativo. Esta disparidad en la respuesta celular podría deberse a las características intrínsecas de cada tipo de línea celular utilizada. Estas diferencias se demostraron recientemente en un estudio que evaluó el efecto de los nanoplásticos en diferentes líneas de células hematopoyéticas humanas, donde las exposiciones a nanopoliestireno no indujeron ROS intracelular en células THP1, aunque sí que se observó un ligero aumento en células Raji-B, y se mostró una respuesta clara en las células TK6 (Rubio et al., 2020). En nuestro caso, hemos confirmado que el nanopoliestireno no produjo ROS intracelular en las células Caco-2 indiferenciadas. Sin embargo, debe señalarse que el DHE detecta específicamente la formación del anión superóxido y especies de peróxido de hidrógeno, pero no radicales hidroxilos. Por lo tanto, extrapolamos la producción intracelular de ROS a partir de la medición del anión superóxido y peróxido de hidrógeno. Aunque la concentración más alta de ambas formas de plata aumentó la producción de ROS, la asociación con nanopoliestireno no modificó los efectos observados con los materiales de plata por sí solos de una manera estadísticamente significativa.

Toda evaluación de los efectos nocivos de los contaminantes ambientales debe incluir una evaluación de su daño potencial en el DNA, ya que se ha demostrado que la inducción de daño en el DNA conlleva consecuencias relevantes para la salud humana (Carbone et al., 2021). Sin embargo, y a pesar de la relevancia de este biomarcador, sólo unos pocos estudios sobre nanoplásticos incluyen entre sus evaluaciones la

genotoxicidad. En consecuencia, nuestro estudio ha investigado el potencial efecto genotóxico asociado con la presencia de complejos de materiales de plata/nanoplásticos. Los resultados obtenidos con el ensayo del cometa, confirmaron que el nanopoliestireno por sí solo no es genotóxico en células Caco-2, como se informó en estudios previos en la misma línea celular (Cortés et al., 2020) donde no se observaron efectos genotóxicos mediante el uso del ensayo del cometa (que mide principalmente roturas en el DNA), o el ensayo de micronúcleos (que mide roturas cromosómicas y/o pérdidas cromosómicas). No obstante, y como ya se ha indicado para otros biomarcadores, los efectos genotóxicos del nanopoliestireno pueden depender de la línea celular utilizada. Esto se comprobó utilizando tres líneas de células hematopoyéticas humanas diferentes (TK6, Raji-B y THP1), donde se observaron niveles significativamente altos de daño en las células Raji-B, mientras que no se detectaron efectos ni en las células TK6 ni en THP1 (Rubio et al., 2020). De manera similar, diferentes subconjuntos de leucocitos de sangre periférica (linfocitos, monocitos y polimorfonucleares), obtenidos usando citometría de flujo, mostraron diferente sensibilidad cuando se expusieron a nanopoliestireno. Así, elevados niveles de roturas en el DNA (medidas con el ensayo del cometa) se detectaron en células PMN, mientras que se observaron efectos moderados para los monocitos y ningún efecto para los linfocitos (Ballesteros et al., 2020). En nuestro estudio, hemos confirmado la falta de genotoxicidad de las nanopartículas de poliestireno en células Caco-2, y el diferente potencial genotóxico de los dos compuestos de plata evaluados, donde el nitrato de plata indujo mayor genotoxicidad que las NPs de plata. Usando este biomarcador, los efectos de los complejos de materiales de plata/PSNP no son evidentes cuando se evaluaron los efectos genotóxicos directos, en comparación con los efectos de la exposición a los compuestos de plata por sí solos. Sin embargo, cabe señalar que se observó una tendencia estadísticamente significativa del efecto genotóxico de los complejos de plata NPs/nanopoliestireno cuando ambos compuestos se evaluaron simultáneamente a la concentración más alta, así como cuando se evaluó AgNO_3 en combinación con la concentración más baja de PSNPLs. Curiosamente, una tendencia significativa al aumento del daño genotóxico se encontró a bajas concentraciones de AgNO_3 en el poliestireno de manera dependiente de la dosis. Este hallazgo debe destacarse ya que esta baja concentración de plata imita las condiciones

ambientales. Por otro lado, los efectos sobre el daño oxidativo al DNA provocado por los compuestos de plata/complejos de nanopoliestireno fueron más evidentes cuando se evaluaron los niveles de daño oxidativo a las bases del DNA usando nitrato de plata. En este caso, se observó una tendencia significativa a aumentar los niveles de daño oxidativo en el DNA de manera dependiente a la dosis de poliestireno, cuando las concentraciones más bajas del nitrato de plata se combinaron con las diferentes concentraciones de nanopoliestireno. Nuevamente, este es un hallazgo ambientalmente relevante. Por lo tanto, nuestros resultados sugerirían que, a bajas concentraciones de plata, la presencia de nanoplásticos aumentarían tanto la absorción de metal como su concentración y los efectos del daño oxidativo y genotóxico sobre el DNA.

Cabe señalar que, aunque no se han incluido estudios de cinética de interacción, hemos podido demostrar la capacidad de los PSNPLs para adsorber contaminantes ambientales, utilizando materiales de plata. Desde este punto de vista, el objetivo está cumplido, ya que se ha demostrado la interacción entre los PSNPLs y las AgNPs. Además, y en cuanto a la estabilidad de la interacción, nuestros resultados indican que la visualización observada por TEM después de 3 h de "incubación" se confirma 24 h más tarde mediante el uso de microscopía confocal. En este último caso, el complejo de nanopartículas de plata/PSNPLs habría "viajado" al interior de las células sin perder su interacción, indicando que dicha interacción se mantuvo estable.

Un tema interesante se refiere al comportamiento (cinética de agregación y estabilidad) de los PSNPLs en aguas naturales. Este tema ha sido objeto de estudios que muestran que, aunque las concentraciones de CaCl_2 pueden afectar su estabilidad, los PSNPLs se mantienen más estables que otros nanoplásticos como el nanopoliétileno. Tal estabilidad puede atribuirse a la superficie funcionalizada (presencia de grupos funcionales carboxilo). Además, la presencia de materia orgánica natural (ácido húmico) en el agua mejoró la estabilidad de los PSNPLs, principalmente por repulsiones estéricas. En consecuencia, un transporte acuoso significativo de PSNPLs es posible en aguas superficiales naturales (Shams et al., 2020). De esta forma, interacciones como las presentadas en este estudio podrían ser posibles en condiciones naturales.

3.2.5. CONCLUSIONES

Nuestro estudio proporciona evidencias metodológicas de que los nanoplásticos, al menos el nanopoliestireno, pueden unirse a metales como la plata. Los complejos formados pueden modular la captación de nanopartículas de plata y modificar ligeramente algunos efectos tóxicos de los compuestos de plata, como la capacidad de inducir daños genotóxicos y oxidativos en el DNA. Idealmente, estos resultados deberían confirmarse usando otras líneas celulares diferentes, debido a las evidencias que indican que existen diferencias significativas según la línea celular utilizada (Rubio et al., 2020). Además, también se debería explorar el papel que juegan los tiempos de exposición de los tratamientos, más allá de las 24 h, aunque los efectos del tiempo de exposición en la absorción de PSNPLs sólo fueron evidentes a concentraciones bajas (Rubio et al., 2020).

3.3.CAPÍTULO 3: Obtención de nanopartículas de PET dopadas con titanio, de origen ambiental, como modelo realista de nanoplástico.

El artículo científico desarrollado en el presente capítulo se ha llevado a cabo con la colaboración de: Aliro Villacorta^{1,2}, Michelle Morataya-Reyes¹, Raquel Llorens-Chiralt³, Laura Rubio¹, Mohamed Alaraby^{1,4}, Ricard Marcos¹ y Alba Hernández¹.

¹Group of Mutagenesis, Department of Genetics and Microbiology, Faculty of Biosciences, Universitat Autònoma de Barcelona.

²Facultad de Recursos Naturales Renovables, Universidad Arturo Prat, Iquique, Chile.

³AIMPLAS, Plastics Technological Centre, Valencia, Spain.

⁴Zoology Department, Faculty of Sciences, Sohag University, Sohag, Egypt.

3.3.1. JUSTIFICACIÓN

La excesiva producción y consumo de material de plástico lo ha convertido en uno de los mayores contaminantes ambientales (Cortés et al., 2020). Propiedades como su bajo costo de producción, ligereza, robustez, durabilidad, resistencia a la corrosión y como aislante térmico y eléctrico hacen que sea utilizado para una amplia gama de aplicaciones (Ahmad et al., 2022). Sin embargo, debido al exceso de producción, mal uso y falta de programas de reciclaje, se ha incrementado la cantidad de desechos plásticos que ingresan constantemente en el ambiente. Estos desechos plásticos se encuentran presentes en todos los ecosistemas, incluyendo lugares remotos que no han sido habitados por el hombre (Wright & Kelly, 2017; Yee et al., 2021).

Una vez que los plásticos se encuentran en el ambiente, estos sufren una degradación continúa por las condiciones ambientales, especialmente por el viento, la luz UV y las corrientes marinas, pudiendo alcanzar tamaños que se encuentran dentro de la micro y nano escala, a los cuales se los denomina como micro/nanoplásticos (Rodríguez-Hernández et al., 2019). Los tipos más comunes de MNPLs que se han encontrado en condiciones ambientales, de acuerdo al tipo de polímero son: polietileno, tereftalato de

polietileno (PET), polipropileno, poliestireno, policloruro de vinilo y poliamida (Ebrahimi et al., 2022). Estos MNPLs en condiciones ambientales pueden variar sus características fisicoquímicas y también sus efectos sobre los diferentes sistemas biológicos dependiendo de las condiciones en las que se encuentren, en comparación con los MNPLs vírgenes.

Otro aspecto importante es que, durante el proceso de producción de plástico, varios aditivos orgánicos e inorgánicos se añaden a los polímeros plásticos para lograr propiedades únicas como el color, la transparencia o para mejorar las propiedades mecánicas, térmicas, y la resistencia. Por ejemplo, los aditivos inorgánicos como el dióxido de silicio se incorporan comúnmente a los termoplásticos para mejorar su resistencia a la deformación y resistencia física. El aluminio y el silicio son antioxidantes que reducen la oxidación de los materiales plásticos (Ebrahimi et al., 2022). Históricamente, muchos aditivos y catalizadores que se utilizan en la fabricación de los plásticos están basados en compuestos de metales tóxicos y metaloides como el arsénico, cadmio, cromo VI y plomo. A pesar de las recientes restricciones, los aditivos peligrosos permanecen en los plásticos debido a la omnipresencia de muchos productos y a la contaminación de los productos reciclados.

Es poco conocido el efecto que pueden tener en el ambiente y más aún sobre la salud humana. Sin embargo, estos aditivos pueden liberarse de los compuestos plásticos, quedar en el ambiente, y ejercer su potencial tóxico (Bouwmeester et al., 2015; Turner, 2021). Aunque la mayor parte de los estudios se han enfocado en los MNPLs como vectores de metales, son pocos los dedicados a evaluar los efectos provocados por la unión entre plásticos y metales desde su fabricación. En la actualidad, una importante limitación respecto a las muestras de MNPLs que se utilizan para la evaluación del riesgo, es que la mayoría de los estudios disponibles utilizan MNPLs prístinos disponibles comercialmente en una amplia gama de tamaños, modificaciones químicas de la superficie y marcados con fluorescencia, como son las nanoesferas de poliestireno PSMNPLs; sin embargo, éstos no se pueden considerar muestras representativas ambientales (Rodríguez-Hernández et al., 2019; Villacorta et al., 2022).

Debido a la dificultad de obtener muestras ambientales representativas, especialmente en la nanoescala, se ha propuesto la obtención de éstas a través de protocolos de degradación de material plástico como el desarrollado por Villacorta et al. (2022) en el cual se obtuvieron muestras de nano PET a través del método de abrasión mecánica en condiciones ácidas a partir de botellas de agua fabricadas con PET. A través de este método se pueden obtener nanoplásticos de potencialmente cualquier fuente de material plástico.

En los últimos años se ha introducido al mercado botellas de PET opaco las cuales poseen pigmentos en su estructura que actúan como aditivos absorbentes de la luz UV previniendo la difusión del oxígeno. Entre los pigmentos minerales se adicionan dióxido de titanio (TiO_2) para aplicaciones alimentarias, especialmente la industria láctea, como un bloqueador de la luz UV en concentraciones relativamente altas, que varían dependiendo de la aplicación, pero podrían superar el 15% en peso (Matxinandiarena et al., 2019; Tramis et al., 2021).

El objetivo del presente estudio fue la obtención de MNPLs a partir de botellas de PET opaco, las cuales contienen embebidas en su estructura nanopartículas de dióxido de titanio (TiO_2NPs). Estas partículas ambientalmente representativas nos pueden ayudar a entender la complejidad de los MNPLs que se encuentran en condiciones ambientales y a evaluar el peligro potencial de estos para la salud. Por lo tanto, para cumplir con el objetivo del presente estudio se realizó la obtención y caracterización de MNPLs obtenidos a partir de botellas de leche de plástico opaco. Adicionalmente se evaluó su perfil toxicológico en tres líneas celulares leucocíticas humanas diferentes: Raji-B (linfocitos B), TK6 (linfoblastos) y THP-1 (monocitos). Por otro lado, para analizar su internalización celular las partículas se tiñeron con fluorescencia y adicionalmente, debido al componente metálico que contiene la nanopartícula también se pudo evaluar su internalización a través de la presencia de las partículas de TiO_2NPs .

3.3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.2.1. *Obtención de nanoplásticos de PET(Ti)*

Hemos utilizado botellas PET opacas disponibles comercialmente para producir nanoplásticos de PET que contienen dióxido de titanio [PET(Ti)NPLs]. El procedimiento utilizado se basó en la metodología recientemente publicada, diseñada para obtener PETNPLs de botellas de agua (Villacorta et al., 2022). El proceso se esquematiza en la Figura 31. En resumen, se cortaron piezas de unos 12 cm² de la botella de PET opaca original y se lijaron con un accesorio de fresa rotativa de diamante. Los residuos de PET opaco obtenidos se pasaron por un tamiz de 0,20 mm y 4 g del material resultante se dispersaron en 40 mL de ácido trifluoroacético (TFA) recalentado a 50 °C en una placa de agitación a 100 rpm durante 2 h, y luego se mantuvo bajo agitación continua a temperatura ambiente durante toda la noche. Al día siguiente se añadieron 40 mL de TFA (20%, v/v) y la mezcla se mantuvo en agitación constante durante 24 h más. La suspensión se pasó por un tamiz de 0,20 mm, para eliminar los fragmentos más grandes, y se centrifugó a 2500 rcf durante 1 h, para luego distribuirlos en seis tubos de vidrio de 10 mL. Los pellets obtenidos se resuspendieron en 400 mL de una solución de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0,5%, mezclada vigorosamente, y distribuido en dos vasos de precipitación de 200 mL. Posteriormente, se ultrasonicó en un sonicador SSE-1 Branson (Branson Ultrasonics Co., Brookfield, CT, EE. UU.) durante 2 min a 25% de amplitud, en 9/9 s ciclos de sonicación. El contenido de cada vaso de precipitados se transfirió a un cilindro graduado para que sedimente por 1 h, para eliminar la fracción mayor. Los 100 mL superiores de cada cilindro se colectaron y centrifugaron para eliminar el SDS. Los pellets se lavaron dos veces con agua Milli-Q y dos veces con etanol puro, y se secaron bajo flujo laminar de aire estéril. A continuación, los pellets se pesaron y resuspendieron en agua Milli-Q a concentraciones de 10 mg/mL y las suspensiones se sonicaron durante 16 min a 10% de amplitud en un baño de agua fría. Finalmente, se alicuotó la solución madre en criotubos de 1 mL, que se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenaron a -80 °C para su uso posterior.

3.3.2.2. Caracterización de las partículas de PET(Ti)NPLs

3.3.2.2.1. Caracterización del PET(Ti)NPLs mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectroscopía de rayos X de dispersión de energía (EDS)

A partir de la solución madre, se preparó una solución de trabajo de 200 µg/mL descongelandola en un baño tibio a 37 °C y diluido en agua Milli-Q. La solución de trabajo se agitó vigorosamente y 10 µL de la suspensión se colocaron sobre un soporte de sílice. La muestra se examinó en un SEM Zeiss Merlin (Zeiss, Oberkochen, Alemania) junto con un sistema EDS X-Max de 20 mm (Oxford Instruments, Oxford, Reino Unido). Además de recolectar imágenes SEM, un área que incluyera la superficie de las nanopartículas se seleccionó para el análisis EDX, la señal se recolectó y analizó mediante el programa INCA Energy (INCA, Grinnell, IA, EE. UU.).

3.3.2.2.2. Caracterización de PET(Ti)NPLs por dispersión de luz dinámica y multiángulo (DLS MADLS), y el potencial Zeta

El tamaño indicativo de las estructuras coloidales en la suspensión de PET(Ti)NPL se determinó utilizando un dispositivo Zetasizer® Ultra de Malvern Panalytical (Cambridge, Reino Unido). Para ello se utilizó una solución de trabajo de 100 µg/mL de PET(Ti)NPLs. Adicionalmente, para investigar la influencia de los medios de cultivo en el nanoplástico, se preparó la misma concentración usando la dispersión Nanogenotox (Nanogenotox, 2011) y se evaluó su comportamiento tanto en agua Milli-Q como en medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10%, glutamina al 1% (Biowest, Francia) y 2.5 µg/mL de Plasmocin™ (InvivoGen, CA, EE. UU.).

3.3.2.2.3. Caracterización de PET(Ti)NPLs por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Para detectar grupos funcionales e identificar muestras como PET, se analizaron los materiales obtenidos en diferentes etapas del proceso de producción. Así, piezas de materiales originales (botellas transparentes y opacas), material lijado de producción

intermedia antes de la exposición al ácido, y muestras de nanopartículas del final del proceso se analizaron y compararon. Para el PET(Ti)NPLs de las soluciones stock (10 mg/mL), se colocó una gota en un espejo de oro y se dejó secar durante una semana dentro de una placa de Petri. Para las muestras sólidas se cortaron piezas de 3 x 3 cm directamente de las botellas, para ambos tipos de botellas de PET. Para los materiales descritos anteriormente (muestras en suspensión y sólidos), el análisis se realizó en un dispositivo Vertex 80, mientras que el polvo del polímero obtenido del material lijado se analizó mediante un dispositivo Tensor 27. Ambos tipos de equipos eran de Bruker (Bruker Corporation, Billerica, Massachusetts, EE. UU.). Para evaluar la composición, los interferogramas obtenidos se analizaron y contrastaron con datos de la literatura.

3.3.2.2.4. Caracterización de PET(Ti)NPLs por espectroscopia de masas

Para determinar el contenido de Ti de la fuente de PET original, se usaron 0,10 g de la película de PET(Ti), pesados en una balanza analítica Mettler Toledo XP205DR (Mettler-Toledo S.A.E., Barcelona, España). Esta cantidad se dispersó en agua Milli-Q a la misma concentración que el stock de PET(Ti) (10 mg/mL). De forma independiente, 0,25 mL de las dos dispersiones se agitaron vigorosamente y se digirieron en 5 mL de una mezcla [4 mL HNO₃ al 65% (p/v) y 1 mL de HF al 40% (p/v)] en un horno microondas por 20 min a 260 °C (rampa de 25 min para alcanzar los 260 °C). Las muestras se diluyeron en HNO₃ (1% v/v) antes de la inyección. El contenido de Ti de las muestras se determinó a través de espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado ICP-OES Agilent 5900 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.).

3.3.2.3. Marcado de PET(Ti)NPL y visualización por microscopía confocal

Para visualizar/identificar PET(Ti)NPL por microscopía confocal, se utilizó la propiedad de reflexión para la detección de Ti. Para visualizar PET, separadamente de Ti, las muestras se tiñeron con iDye Poly Pink (iDye), siguiendo una adaptación de los protocolos publicados para teñir microplásticos (Karakolis et al., 2019; Nguyen & Tufenkji, 2021). Brevemente, una solución de 1 mL de PET(Ti)NPLs a una concentración de 5 mg/mL se preparó a partir de la dispersión stock (10 mg/mL) y se transfirió a un tubo de 1,5 mL que contenía 0,01 g del tinte textil (iDye) utilizado para fibras sintéticas. La mezcla

se agitó vigorosamente, se colocó en un tubo de vidrio y se incubó durante 2 h a 70 °C. Después de enfriar a temperatura ambiente, se agregaron 9 mL de agua Milli-Q a la suspensión y luego se centrifugó a 4000 rpm en un filtro Amicon® Ultra-15 centrifugo Ultracel® -100K 1x10 5 MWCO durante 15 min. Este paso se realizó dos veces para eliminar el exceso de iDye. Las partículas lavadas se colectaron y suspendieron en un volumen final de 1 mL de agua Milli-Q y se almacenaron protegidas de la luz a 4 °C hasta su uso. A estos PET(Ti)NPLs teñidos se les denomina como iDyePET(Ti)NPLs. Para su visualización en el microscopio confocal, la suspensión de partículas se diluyó en agua Milli-Q a una concentración final de 400 µg/mL y se colocaron dos gotas de 20 µL en un portaobjetos, se cubrió con un cubreobjetos y se dejó secar dentro de la cabina de bioseguridad con flujo laminar de aire. Los PET(Ti)NPLs se prepararon de manera similar para ser utilizados como control. Ambas muestras se examinaron por microscopía confocal utilizando un microscopio confocal Leica TCS SP5. La longitud de onda de excitación de 561 nm se fijó en un filtro sintonizable óptico acústico (AOTF 561) y los espectros de emisión se recopilaron entre 580 y 700 nm (ancho de banda de inicio de exploración lambda 575,00 – 585,00 nm a ancho de banda de finalización de exploración lambda 691,00 - 701,00 nm). La emisión se analizó utilizando la aplicación Leica Suite X 3.7.5.24914 (Leica Microsystems CMS GmbH Wetzlar, Alemania). Las imágenes se recogieron bajo las mismas condiciones.

3.3.2.4. Cultivo de células

Para determinar la capacidad de internalización celular de los PET(Ti)NPLs, se utilizaron tres líneas celulares hematopoyéticas humanas. Se seleccionaron monocitos THP-1, linfoblastos TK6 y linfocitos Raji-B como modelos de linfoblastos humanos ampliamente distribuidos y aceptados. Las tres líneas celulares se compraron en Sigma Aldrich (MO, EE. UU.). Las células se cultivaron en frascos T-25 con medio RPMI (Biowest, Francia) suplementado con 10% de FBS, glutamina al 1% (Violes, Francia) y 2,5 µg/mL de Plasmocina (InvivoGen, CA, EE.UU.). Los cultivos se mantuvieron con una densidad que va desde 5×10^5 a 1×10^6 de células, a 37 °C en atmósfera humidificada al 5% de CO₂.

3.3.2.5. Internalización celular de PET(Ti)NPL (complejidad interna), determinada por citometría de flujo

Para cuantificar la internalización celular, se utilizó la complejidad interna de las células expuestas como indicador de la incorporación de MNPLs y se determinó por citometría de flujo. Las tres líneas celulares seleccionadas (TK6, Raji-B y HTP-1) se cultivaron en una placa de 96 pocillos con fondo en U a una densidad celular de 5×10^5 cel/mL en un volumen final de 0,20 mL y se trataron con concentraciones de 25, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$ durante un período de 24 h. Una vez se produce la internalización de PET(Ti)NPL, se evaluó la dispersión de luz ortogonal -comúnmente conocida como Side Scatter (SSC) utilizando un citómetro de flujo Cytoflex S (Beckman Coulter CytoFLEX S). Un total de 10.000 eventos (células individuales) se evaluaron con el programa CytExpert y los datos se procesaron con el programa GraphPad Prism 7.0. (GraphPad, San Diego, CA.)

3.3.2.6. Determinación de la internalización celular de PET(Ti)NPLs por microscopía confocal

Para la visualización de PET(Ti)NPLs internalizados en las células, se utilizó microscopía confocal. Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33342 (excitación de 405 nm y emisión en 415-503), y las membranas celulares se tiñeron usando Cellmask (excitación de 633 nm y emisión en 645-786). Para iDyePET(Ti)NPLs, se utilizó una longitud de onda de excitación de 561 nm y de emisión de 570-630. Para la localización de Ti, se obtuvieron imágenes de reflexión en paralelo. Las imágenes de cada muestra se obtuvieron utilizando un microscopio confocal Leica TCS SP5 y las imágenes se procesaron con los programas ImageJ y de análisis versión 265 1.8.0_172.

3.3.2.7. Perfil toxicológico de PET(Ti)NPLs en las líneas celulares utilizadas

Para evaluar la viabilidad celular de las tres líneas hematopoyéticas, después de la exposición, las células se sembraron en las mismas condiciones descritas con anterioridad a una densidad celular de 5×10^5 cel/mL en un volumen final de 0,20 mL en placas de 96 pocillos con fondo en U y se las trató con concentraciones que oscilaban entre 0 y 100 $\mu\text{g/mL}$ durante un periodo de 24 h en condiciones estándar. A continuación, las células se mezclaron y diluyeron 1:100 en ISOFLOW y se contaron con el contador

ZTM Coulter (Beckman Coulter INC., CA, EE. UU.). El número medio de células contadas en cada tratamiento se comparó con el número medio del control sin tratar. Las células y los datos se evaluaron usando el programa GraphPad Prism 7.0 (GraphPad, San Diego, CA).

3.3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las muestras de PET(Ti)NPLs obtenidas de acuerdo con el protocolo descrito en la Figura 31 se utilizaron para una mejor caracterización. Cabe destacar la gran cantidad de material obtenido en el proceso de extracción descrito anteriormente. Los 10 viales resultantes de 1 mL de la dispersión stock (10 mg/mL) se almacenaron a -80°C . Se prepararon soluciones de trabajo siguiendo el protocolo Nanogenotox y se alicuotaron en 10 viales que contienen 0,2 mL a una concentración de $5000\text{ }\mu\text{g/mL}$. Esto significa que una producción estándar de PET(Ti)NPLs genera 100 viales de la dispersión de trabajo, que se almacenan en las mismas condiciones hasta que se las use. Esta es una gran cantidad de material que permite realizar varias rondas de estudios con el propósito de realizar una caracterización completa y evaluación de riesgos. El proceso original (Villacorta et al., 2022) se ha utilizado varias veces a partir de botellas de agua PET para obtener más material para ser difundido entre el consorcio PlasticHeal, mostrando una muy alta reproducibilidad.

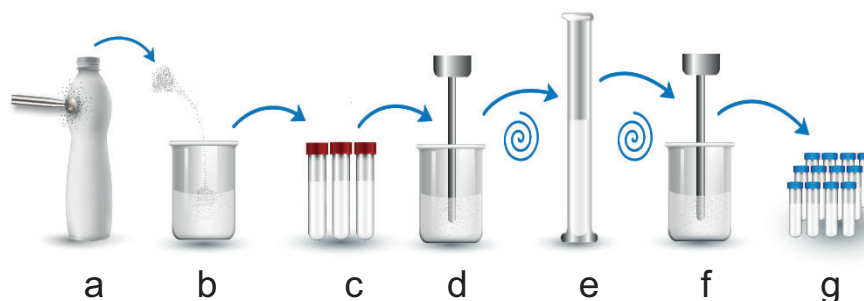


Figura 31. Representación esquemática de la producción de PET(Ti)NPLs. Los fragmentos de botellas opacas de PET se molieron hasta obtener un polvo, este se pasó por el tamiz (a), se agitó, suspendió, y calentó a diferentes concentraciones de TFA (b), se distribuyó en tubos de vidrio y centrifugó (c), se resuspendió en SDS, y sonicó (d), se transfirió a un cilindro para sedimentación (e) y luego se recolectó, lavó, pesó, resuspendió y sonicó (f), se prepararon alícuotas y se almacenaron congeladas hasta que se necesitaron (g).

3.3.3.1. Distribución de tamaño y forma en estado seco

Se utilizó TEM para determinar la morfología y el tamaño de los PET(Ti)NPLs obtenidos. Las figuras obtenidas se compararon con las obtenidas previamente de botellas PET transparentes (Villacorta et al., 2022). En la Figura 32 se indica la morfología de PETNPLs (a) en comparación con PET(Ti)NPLs (b y c). Como se observa, es relativamente fácil de detectar diferencias en la electrodensidad de la muestra cuando el dióxido de titanio está presente. La presencia de TiO_2NPs da como resultado puntos de alta densidad. Obviamente, el grado de aglomeración también puede ser un factor modulador de la densidad. Cuando el diámetro de Martin (diámetro de una partícula con forma irregular) fue medido en más de cien figuras de PET(Ti)NPLs se obtuvo un tamaño

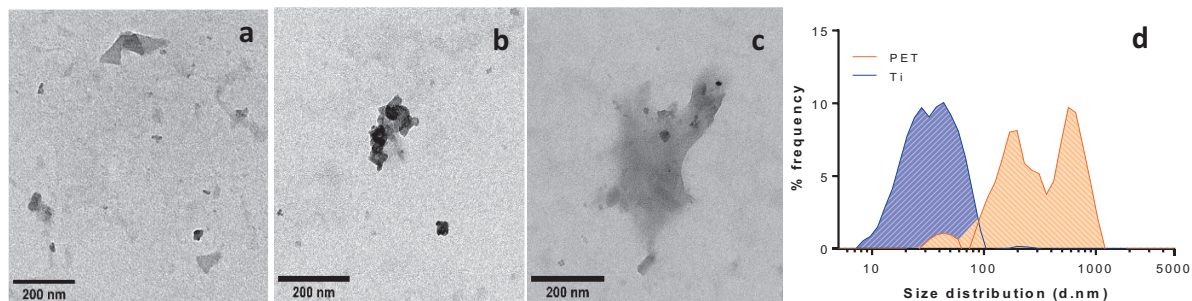


Figura 32. Figuras de TEM de PETNPLs secundarios internos (a) en comparación con PET(Ti)NPLs (b, c). La presencia de TiO_2NPs se detecta como puntos de alta densidad. Cuando se determinó la distribución de tamaños de PET(Ti)NPLs, se observó una distribución bimodal. Debido a la buena detección de TiO_2NPs , también se determinó su distribución de tamaño (d).

medio de 382,07 nm con un índice de polidispersidad de 0,37. Curiosamente, la alta electrodensidad de TiO_2NPs también permitió determinar su distribución de tamaño dentro del complejo PET(Ti)NPLs, como se indica en la Figura 32.

De la distribución de tamaño es evidente que el promedio excede el rango de la definición de nanopartículas (o por extensión de un nanoplástico). La última recomendación de la Comisión Europea establece que, al menos el 50% de las partículas contenidas en una dispersión debe estar en el rango nano, y al menos una dimensión debe estar en el rango de 1-100 nm (CE, 2022). Sin embargo, esta definición parece apropiada para los nanomateriales generados por la nanotecnología, y por extensión para los nanoplásticos primarios, pero no parece adecuado para los nanoplásticos secundarios resultantes de

la degradación de macroplásticos, en donde se espera una amplia gama de tamaños y formas. Para describir la nueva realidad de los nanoplásticos obtenidos proponemos tomar en consideración la propuesta de (Hartmann et al., 2019). Estos autores proponen categorizar las MNPLs de acuerdo con las normas convencionales en unidades de tamaño: nano (1-1000 nm) y micro (1-1000 μ m). Aunque los autores dividen el rango de nano entre nanoplásticos (1-100 nm) y plásticos submicrónicos (100-1000 nm), esta división añade más oscuridad que luz. Así, desde nuestro punto de vista operativo nuestras muestras de PET(Ti)NPLs se encuentran distribuidas en el rango nano.

3.3.3.2. Morfología y composición en estado seco

Para identificar mejor la morfología y composición de los PET(Ti)NPLs, se utilizaron metodologías SEM-EDS. Las Figuras 32a y b muestran las morfologías observadas. Cabe señalar que, debido a la alta electrodensidad del dióxido de Ti, la visualización morfológica de PET se ve afectada y las definiciones de las figuras no son las óptimas. Es importante observar la morfología de las TiO₂NPs que se muestran como nanorods. Teniendo en cuenta la longitud media de los nanorods de TiO₂NPs presente en las PET(Ti)NPLs es asumible la distribución de tamaño determinada por TEM, ya que es difícil encontrar estructuras PET no asociadas al TiO₂NPs.

Como se indicó anteriormente, diferentes metales y metaloides como el arsénico, cadmio, cromo (VI) y el plomo se utilizan normalmente como aditivos plásticos y, en consecuencia, se pueden encontrar en sus MNPLs derivados (Turner, 2021). No obstante, los niveles de dióxido de titanio presentes en los MNPLs resultantes de botellas opacas, como el obtenido en este estudio, son mucho más altos e impregnan los MNPLs resultantes. Esto podría suponer un riesgo de exposición asociado para este tipo de MNPLs. Cabe recordar que el dióxido de Ti compuesto y, por extensión, las TiO₂NPs, es un aditivo alimentario reconocido (E171), ampliamente utilizado en muchas matrices alimentarias (Cornu et al., 2022), en donde la letra E codifica para sustancias que se pueden utilizar como aditivo alimentario. Además de los múltiples estudios que buscan potenciales peligros asociados con el uso de E171, una publicación reciente del panel sobre aditivos alimentarios y saborizantes de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) indica que, “basado en toda la evidencia disponible, el E171 ya no

puede considerarse seguro cuando se usa como un aditivo alimentario” (Younes et al., 2021).

Sin embargo, las muestras de PET(Ti)NPLs pueden resultar muy útiles para fines específicos. La necesidad de detectar el destino de los MNPLs en matrices ambientales complejas ha representado un especial desafío. De la misma manera, para determinar el destino de los MNPLs en organismos complejos como los mamíferos es otro desafío importante. Para superar este problema, se ha propuesto el uso de nanoplásticos dopados con metales (Mitrano et al., 2019; Clark et al., 2022). Sin embargo, este tipo de nanoplásticos están lejos de ser MNPLs secundarios representativos presentes en el ambiente. Desde este punto de vista, nuestros PET(Ti)NPLs cubriría dos aspectos principales, i) son MNPLs que contienen metales que se pueden usar para determinar su destino en modelos experimentales de mamíferos, y ii) son MNPLs ambientalmente representativos.

3.3.3.3. *Distribución de tamaños de PET(Ti)NPL y potencial Zeta en solución acuosa*

El comportamiento hidrodinámico de los PET(Ti)NPLs dispersos en agua Milli-Q, o siguiendo el protocolo Nanogenotox, muestra leves diferencias entre ellos. Independientemente de estas leves diferencias, muestran que hay una necesidad de estandarizar procedimientos cuando se trata de dispersiones de nanoplásticos. En este punto es relevante señalar que, independientemente de la dispersión utilizada, todos los valores obtenidos no difieren significativamente de los valores obtenidos cuando se utilizaron aproximaciones TEM (382,07 nm).

Como se observa en la Figura 33a-d, en términos de distribución de tamaños, las curvas ya sea en agua o en medios suplementados con RPMI casi se superponen, y el promedio Z no muestra diferencias significativas excepto por el comportamiento de PET(Ti)NPL en medio RPMI, en comparación con el del agua. Estos datos indican que el recubrimiento superficial de las partículas es relevante en términos de comportamiento hidrodinámico cuando se utilizan matrices complejas. Esto no sólo se aplica a los estudios *in vitro*, sino principalmente a estudios *in vivo*, señalando la necesidad de establecer protocolos de

dispersión de nanoplásticos como una buena práctica en términos de mantener los nanoplásticos dispersos en el rango de nanoescala. Este es un factor clave cuando diferentes criterios de valoración biológica se deben analizar. Las diferencias en el promedio Z cuando se agrega el BSA a la dispersión de PET(Ti)NPLs, y se analiza en medio de cultivo RPMI suplementado, puede resultar en una estabilización electrostática y esto se puede visualizar no sólo en los cambios ya descritos sino también en las diferencias de potencial Z (Figura 33 g), en donde la carga superficial de la partícula se desplaza dramáticamente. En términos de significación, y con respecto a los valores de potencial Z, sólo el PET(Ti)NPLs disperso en RPMI con o sin protocolo Nanogenotox no muestra valores significativamente diferentes. Cuando los valores de dispersión en agua

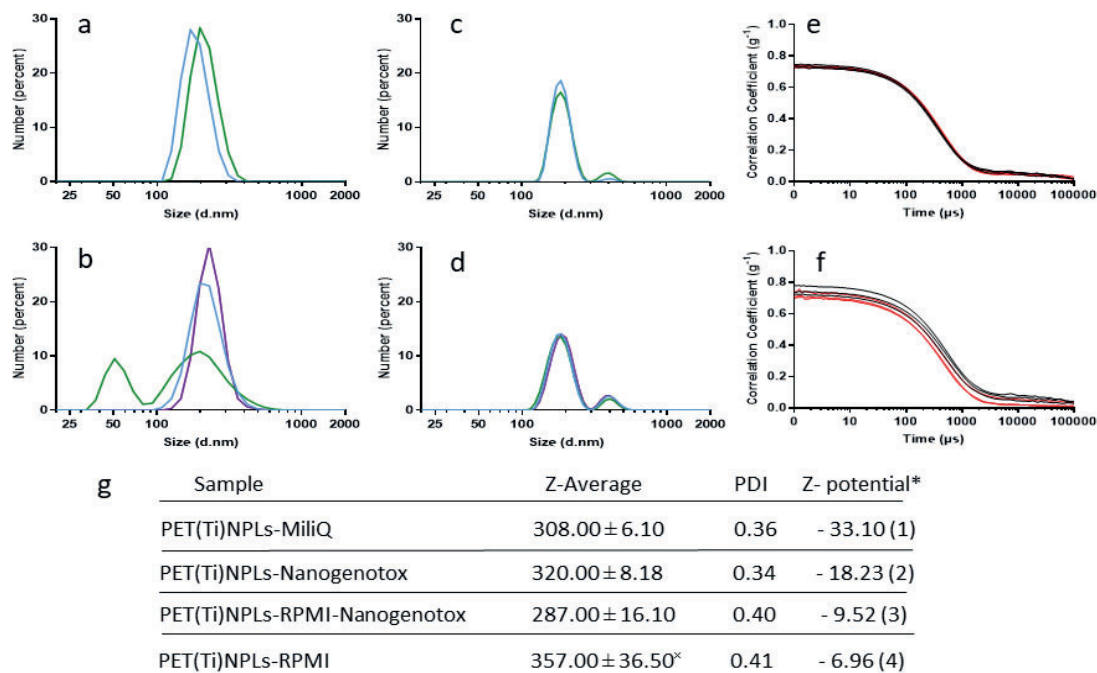


Figura 33. Análisis de distribución de tamaños de PET(Ti)NPLs. Las líneas azul claro indican partículas preparadas en agua, mientras que las líneas verdes se prepararon según el protocolo Nanogenotox. Estas partículas se dispersaron en agua Milli-Q (a, b) y en medios RPMI suplementados (c, d) y se evaluaron por DLS como se muestra en (a, c) y por MADLS (b, d). Además, se muestran múltiples medidas superpuestas (líneas moradas en b y d). Todas las medidas de correlación se muestran en el lado derecho de la línea correspondiente (e, f). Todos los valores para el promedio Z, índice de polidispersidad (PDI) y potencial Z se muestran en la tabla (g). Diferencias significativas para el potencial Z (análisis ANOVA unidireccional, con una prueba de comparación múltiple de Tukey). Las comparaciones fueron establecidas entre las condiciones de dispersión (1–4) de la siguiente manera: (1–2**), (1–3***), (1–4***), (2–3*), (2–4*), y (3–4^{ns}). [ns: no-significativo; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$]. ^x significativo ($P < 0.05$) en comparación con la dispersión en agua Milli-Q.

se comparan con los de otros protocolos de dispersión, se observan diferencias muy significativas para los valores del potencial Z. Las partículas dispersas en matrices complejas tienden a presentar un mayor valor de heterogeneidad, lo que se puede confirmar observando que los valores de este tipo de dispersión están por encima de 0,40 en cuanto al índice de polidispersidad (PDI), mientras que las dispersiones en agua no superan este valor. En ambos casos, los valores no son excesivamente bajos.

3.3.3.4. Determinación química del PET(Ti)NPLs y cuantificación del contenido de Ti

Dado que la metodología FTIR es adecuada para el análisis de películas, suspensiones y polvos, hemos utilizado esta herramienta para confirmar la identidad química de nuestro PET(Ti)NPLs. Este enfoque se utilizó no sólo para la caracterización del producto final, sino también para el material comercial original (películas PET opacas) y para el polvo de PET(Ti) obtenido en la parte intermedia del proceso de nuestra generación PET(Ti)NPLs. La razón principal de este análisis secuencial fue demostrar que no se produjeron cambios en la naturaleza química del PET producida por el proceso de obtención del nano PET. Como se observa en la Figura 34 no se observan diferencias significativas en los espectros obtenidos, confirmando que los diferentes pasos realizados en el proceso no modifican la naturaleza química del PET. Así, podemos observar cómo la determinación simultánea de los componentes orgánicos de la muestra es consistente y corresponden con los espectros de PET citados previamente en la literatura (Chen et al., 2013; Lim et al., 2019; Johnson et al., 2021) así como en nuestro trabajo previo (Villacorta et al., 2022).

Como control, se presentan muestras regulares de PET disponibles en el mercado, así como las nanopartículas producidos a partir de su degradación (Figuras 34a,b). Asumimos que durante el proceso de degradación se pierde una fracción del material original. Nosotros específicamente nos preguntamos si el contenido de dióxido de titanio se perdió principalmente durante el proceso. A tal fin hemos determinado el porcentaje de dióxido de titanio en la película original y en el nanoplástico resultante. Como se indica en la Figura 34, el contenido de dióxido de titanio de las películas de PET opacas fue de 3,83%, que se redujo al 2,60 % en los NPL de PET(Ti) resultantes. Suponemos que

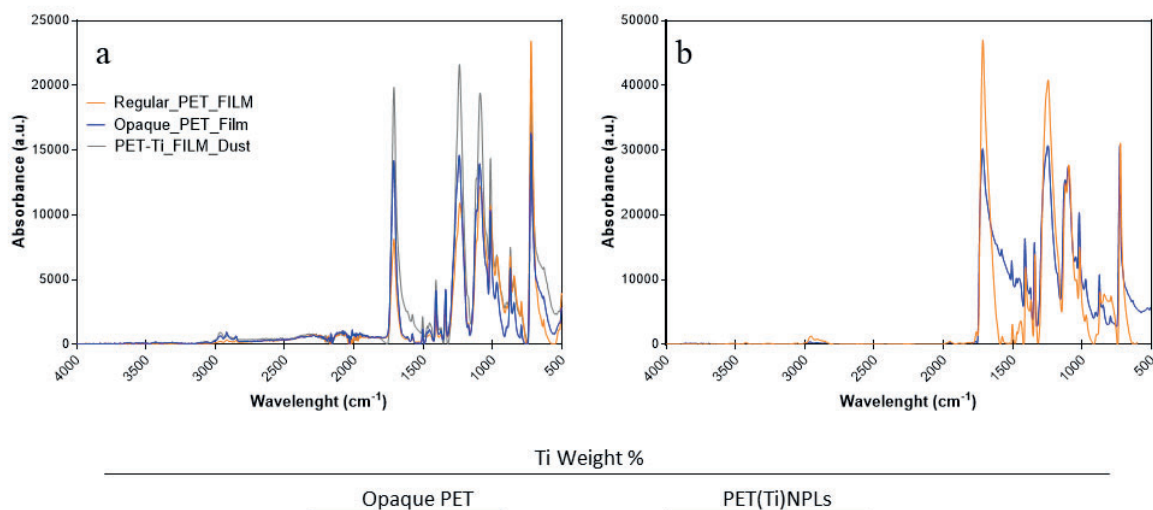


Figura 34. Espectros FTIR de los principales picos del interferograma. En el gráfico de la izquierda (a) PET regular (naranja), película de PET opaco (azul) y polvo de PET opaco producido a partir del proceso de degradación (negro). En el gráfico de la derecha se muestra (b) película de PET regular PETNPLs (naranja) y PET(Ti)NPLs proveniente de PET opaco (azul). La tabla en la parte inferior muestra la cantidad de Ti presente en el PET opaco (película) y en los PET(Ti)NPLs resultantes del proceso.

durante los diferentes pasos de ultracentrifugación, se pierde algo de dióxido de titanio (posiblemente debido a su alto peso). Sin embargo, una fracción muy importante permanece asociada al producto final del proceso de degradación. Aunque no hay suficiente información sobre la posible fuga de dióxido de titanio de las botellas de PET opaco, dicho plástico puede suponer muchos problemas al entrar en los procesos de reciclaje (Tramis et al., 2021).

3.3.3.5. *Marcaje de PET(Ti)NPL y visualización a través de microscopía confocal*

Para proveer de fluorescencia a los MNPLs utilizados que carecen de la misma, hemos ensayado previamente con varias tinciones (Rodamina B, Rojo Nilo, Opticol, iDye Poli Pink y Amarillo luminoso), siendo la tinción con iDye Poli Pink la que mejor marcaje nos ha permitido obtener en los MNPLs estudiados en el laboratorio (Anexo 1). Estudios realizados en nuestro laboratorio por Tavakolpournegari et al. (2023) y Annangi et al. (2023) en PSNPLs de 50, 200 y 500 nm, han demostrado la funcionalidad de la tinción al permitir observar las partículas en el interior de las células estudiadas.

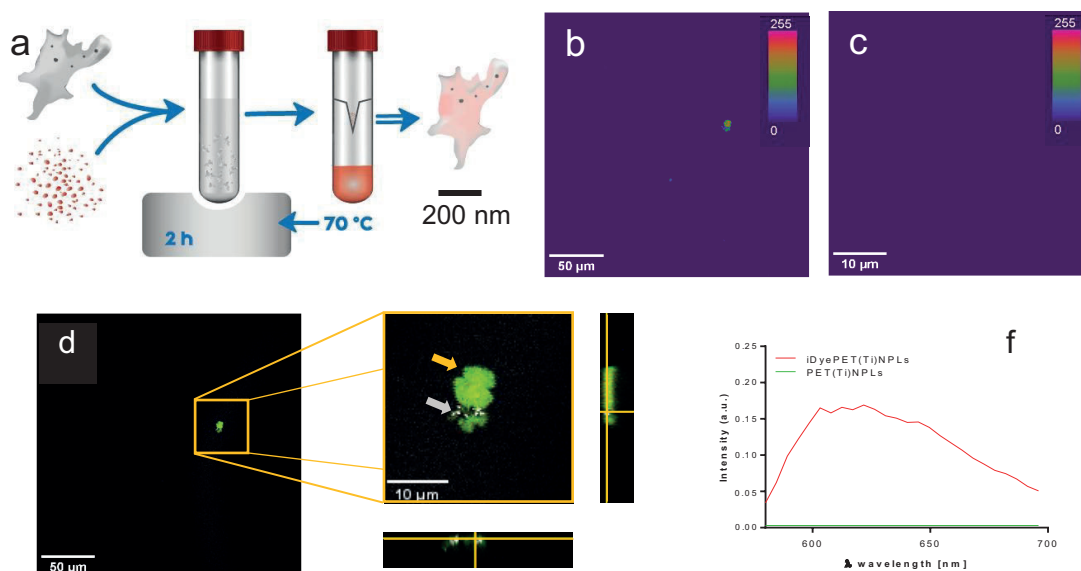


Figura 35. a) Procedimiento de tinción: se mezclaron PET(Ti)NPLs con iDye Poly pink y se calentaron a 70 °C durante 2 h, luego fue filtrado y finalmente resuspendido. El marcaje se evaluó mediante microscopía confocal, las imágenes adquiridas de la fluorescencia fueron aglomerados de iDyePET(Ti)NPL y PET(Ti)NPL (b,c, respectivamente). d) Cuando ambas señales para iDye (flecha amarilla) y para Ti (flecha gris) son usadas, ambas señales aparecen juntas como indicativas de la identificación de PET(Ti)NPLs. f) Se recopilaron y compararon los espectros de emisión para ambas partículas (la señal verde se superpone al eje X).

En este estudio, de igual manera teñimos con éxito el PET(Ti)NPLs con el tinte textil comercialmente disponible iDye Poly Pink. A través de calentar la mezcla de nanoplástico/tinte se permite la hinchazón del polímero al tiempo que permite el ingreso del colorante a la matriz polimérica, logrando que dentro de la matriz polimérica podemos encontrar tanto el dióxido de titanio como el iDye. Las partículas se resuspendieron y lavaron con agua Milli-Q para eliminar el exceso de pigmento no unido a las partículas, como se muestra en la Figura 35a el iDyePET(Ti)NPLs muestra una cantidad significativa de fluorescencia fácilmente observable por microscopía confocal en donde se localizaron campos con importantes aglomerados de partículas y la emisión fue recolectada (Figura 35 b,c,d). De acuerdo con informes anteriores (Karakolis et al., 2019) la fluorescencia en PET se observó fácilmente mediante este enfoque de tinción con la diferencia principal que en nuestro estudio usamos nanoplásticos en lugar de microplásticos. En un estudio reciente, los autores muestran que un tinte comercialmente disponible (Atto 647N) también puede usarse para enfoques similares para teñir diferentes NPLs prístinos (Nguyen & Tufenkji, 2021). Es necesario señalar que en nuestro enfoque los nanoplásticos obtenidos en el laboratorio, los cuales son una aproximación más cercana

a la realidad, se han utilizado mostrando la idoneidad de nuestro método no sólo por el tipo de polímero sino también por diferencias de tamaño, debido a la naturaleza polidispersa de nuestro material. Como se muestra en la Figura 35d, las señales correspondientes a PET y Ti colocalizan, lo que demuestra la naturaleza mixta del PET(Ti)NPLs. Finalmente, no se detectó ninguna señal de fluorescencia para iDye en los campos en donde el PET(Ti)NPLs era el único componente.

3.3.3.6. *Evaluación de la internalización celular*

Los posibles efectos nocivos inducidos por la exposición a MNPL requieren su previa internalización. Existen diferentes enfoques para medir dicha internalización, y en este estudio hemos utilizado tanto la citometría de flujo como la microscopía confocal. Mediante el uso de citometría de flujo, la intensidad de la luz dispersada lateralmente reveló que las partículas fueron absorbidas por las células, como se propuso inicialmente (Suzuki et al., 2007). Este método se ha utilizado para detectar la internalización de diferentes nanomateriales, incluidas nanopartículas de dióxido de titanio, a través de la medición de la complejidad de las células BEAS-2B (Vales et al., 2015). En nuestro estudio, este método se ha aplicado a diferentes líneas celulares hematopoyéticas para determinar posibles diferencias derivadas del tipo de célula utilizada. Si los MNPLs pueden cruzar las barreras primarias del organismo, se moverían hacia los compartimentos generales (sangre), interactuando con sus respectivos componentes. Por lo tanto, las células sanguíneas pueden ser consideradas como un blanco general para ser utilizado en la determinación de los efectos potenciales de cualquier exposición incluyendo MNPLs y más específicamente PET(Ti)NPLs.

Los resultados obtenidos se indican en la Figura 36, para las tres líneas celulares leucocitarias: linfocitos TK6 linfoblásticos, linfocitos Raji-B y células monocíticas THP-1. Como se observa, la internalización del PET(Ti)NPLs difiere entre las diferentes líneas celulares, mostrando que los monocitos leucémicos (THP-1) presentan el aumento más alto en la complejidad celular después de exposiciones que duran 24 h, y en todas las concentraciones ensayadas. Por el contrario, las células linfoblásticas TK6 no presentan prácticamente internalización. Esta diferencia en la internalización también se reportó en el nanopoliestireno utilizando la misma línea celular leucocitaria (Rubio et al., 2020) así

como para tres diferentes tipos de glóbulos blancos periféricos (linfocitos, monocitos y células polimorfonucleares) (Ballesteros et al., 2020). En consecuencia, la complejidad de la respuesta a la internalización debe ser considerada en la selección de las células a ser utilizadas en cualquier ensayo que tenga como objetivo evaluar los efectos peligrosos de los MNPLs.

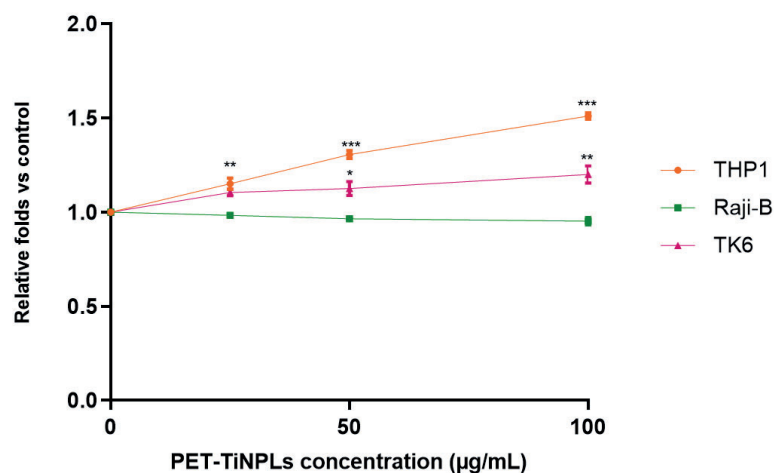


Figura 36. Internalización celular de PET(Ti)NPLs por las células Raji-B, TK6 y THP-1 después de exposiciones durante 24 h. Los gráficos muestran la media \pm SEM de tres experimentos diferentes realizados por duplicado. La complejidad se comparó con las células no tratadas utilizando un análisis ANOVA unidireccional con el post-test de comparaciones múltiples de Dunnett. (** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

Como se indicó, la internalización celular también se puede determinar mediante el uso de microscopía confocal, como se puede observar en la Figura 37. Para este enfoque ponemos nuestra atención en las células THP-1 ya que esta línea celular mostró la internalización más alta en el análisis por citometría de flujo. Es interesante el hecho de que podemos localizar tanto la señal procedente de la emisión del iDye sobre los iDyePET(Ti)NPLs y la señal de Ti. Esto se observa cuando se comparan las Figuras 37b y c, indicando la composición híbrida de los PET(Ti)NPLs obtenidos. Las vistas ortogonales confirman las estructuras complejas observadas previamente mediante el uso de microscopía electrónica (ya sea de transmisión o de escaneo) pero esta vez dentro de una célula, corroborando los resultados de complejidad obtenidos a través de citometría de flujo. Es necesario señalar que no todo el Ti permanece adherido a los PET MNPL, ya que una fracción del total se pierde durante el proceso de obtención, tal y como se ha descrito anteriormente, y tal y como indica su cuantificación mediante ICP-OES.

Sin embargo, las señales de colocación brindan información relevante que respalda la naturaleza mixta de los PET(Ti)NPLs obtenidos.

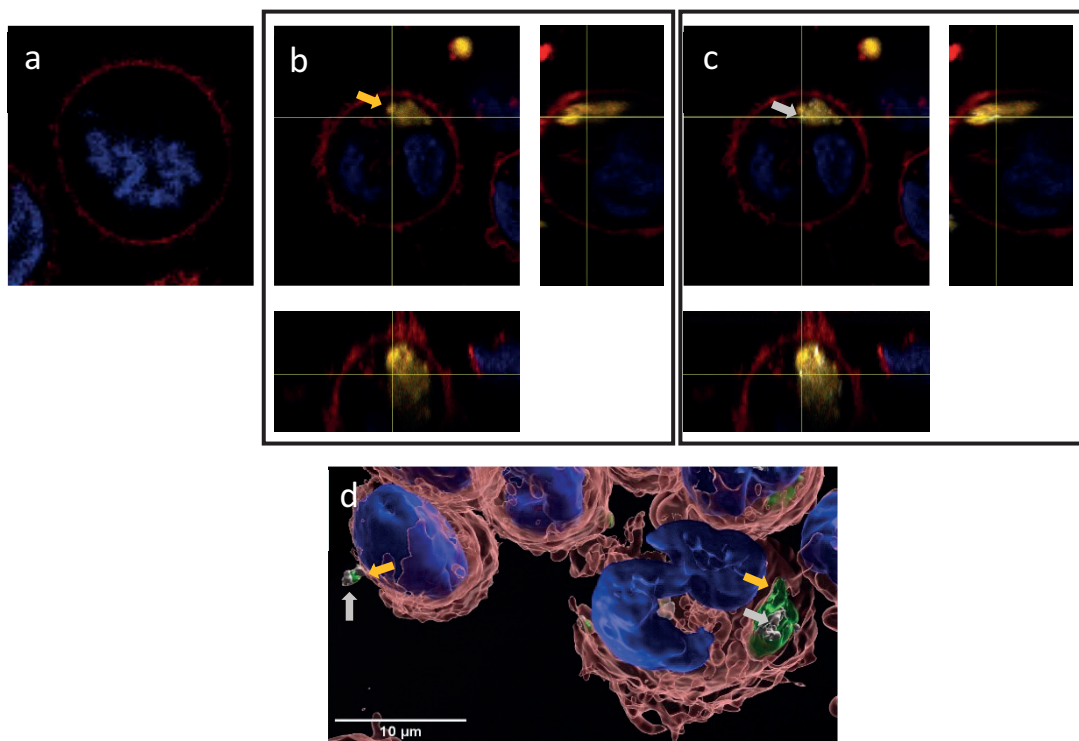


Figura 37. Microscopía confocal de la detección de la internalización de iDyePET(Ti)NPLs en células THP-1, después de 24 h de exposición a 100 $\mu\text{g/mL}$. a) Control, células no tratadas. b) Vista ortogonal de células THP1 con el canal para las nanopartículas de Ti apagado y mostrando solo la señal iDye (flecha amarilla). c) Colocalización de la señal de Ti (flecha gris) con la emisión de PETNPLs. Las flechas indican las señales iDye y Ti. d) Reconstrucción de imagen con el programa Imaris.

Como aproximación final en la evaluación exhaustiva de las características de los PET(Ti)NPLs, se determinó la toxicidad potencial en líneas celulares humanas. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 38. A pesar de los resultados anteriores, en los cuales se muestran notorias diferencias en la internalización entre las diferentes líneas celulares seleccionadas, no se observan disminuciones significativas en la viabilidad celular para ninguna concentración ensayada ni en las líneas celulares. Esto confirmaría que los NPLs obtenidos no son tóxicos, al menos en las líneas de células hematopoyéticas utilizadas. Esto estaría de acuerdo con los estudios previos en los que se expusieron estas líneas celulares a nanopartículas de poliestireno, donde no se observaron efectos en ese rango de exposiciones que duraron 24 h, y solo efectos leves cuando las concentraciones alcanzan niveles altos, como 200 $\mu\text{g/mL}$ (Rubio et al., 2020).

La falta de toxicidad de los PET(Ti)NPLs coincide con los resultados obtenidos por Villacorta et al. (2022), en donde se obtuvieron PETNPLs reales a partir de botellas de agua PET, y en otros estudios en donde se obtuvieron partículas secundarias de nano PET siguiendo otros procedimientos de degradación (Magri et al., 2018; Dacca et al., 2022). Aunque el componente PET no se considera como potencialmente tóxico, el componente TiO₂NPs podría serlo. Se debe recordar que el TiO₂NPs fue autorizado como aditivo alimentario (E171) en la UE, pero una revisión reciente realizada por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) sobre la seguridad del TiO₂NP utilizado como aditivo alimentario lo identificó como no tóxico/dañino, pero no se puede descartar una preocupación sobre su potencial genotoxicidad (Younes et al., 2021). En consecuencia, nuestros datos estarían de acuerdo con los supuestos efectos no peligrosos de la exposición a PET(Ti)NPLs. Sin embargo, se requieren estudios más extensos, utilizando un amplio conjunto de biomarcadores, para descartar la existencia de cualquier tipo de efectos asociados a los MNPLs secundarios resultantes de la degradación de los materiales de plástico opaco.

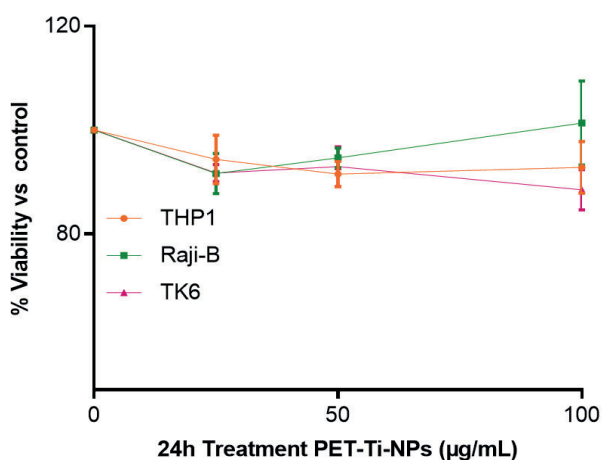


Figura 38. Viabilidad de las células hematopoyéticas THP-1, TK6 y Raji-B después de la exposición a PET(Ti)NPLs a concentraciones que oscilan entre 0 y 100 µg/mL durante 24 h. El gráfico representa la viabilidad relativa comparado con las células no tratadas. Los gráficos muestran la media \pm SEM de tres experimentos diferentes realizados por duplicados. Se realizó el análisis ANOVA unidireccional con el post-test de comparaciones múltiples de Dunnett con un nivel de confianza del 95%.

3.3.4. CONCLUSIONES

La creciente presencia ambiental de los MNPL derivados de la degradación de los residuos plásticos, está demandando estudios para determinar sus posibles riesgos para la salud. A pesar de que en los últimos años se han llevado a cabo una importante actividad investigadora, la mayoría de los estudios se han realizado utilizando materiales prístinos (generalmente micro/nano poliestireno) que no pueden ser considerados como un MNPLs secundario representativo de los que se encuentran en el ambiente. En consecuencia, se requieren MNPLs representativos reales resultantes de la degradación de los residuos plásticos ambientales para ser utilizados como modelo para determinar sus peligros potenciales. En este contexto, el contenido de este estudio presenta la obtención y caracterización de MNPLs resultantes de la degradación de botellas plásticas opacas de leche [PET(Ti)NPLs] las cuales contienen TiO₂NPs. Este es el primer estudio que cita la obtención/caracterización de este tipo de MNPLs. Además de los múltiples ensayos fisicoquímicos que determinan la naturaleza química híbrida del material obtenido, el tamaño y la forma confirmaron su rango de tamaño nano. Los estudios preliminares sobre sus efectos biológicos muestran una internalización importante pero variable, dependiendo de la línea celular utilizada. Además, no se determinaron efectos generales tóxicos. Se necesitan estudios adicionales y complejos para tener una idea clara de sus riesgos potenciales para la salud. Cabe señalar que las imágenes de microscopía confocal mostraron que ambas señales, PET y Ti colocalizan, tanto en el medio de dispersión o internalizan dentro de las células. Esto ofrece una importante ventaja a los NPLs obtenidos ya que se pueden utilizar en estudios *in vivo* para demostrar su destino dentro del organismo, gracias a la fácil identificación/localización del Ti internalizado.

4. DISCUSIÓN

4. DISCUSIÓN

Nuestra alta dependencia del plástico ha provocado un continuo aumento de su producción mundial. Así, propiedades como su bajo costo, durabilidad, ligereza y resistencia a la degradación son factores que explican los aumentos en su producción y consumo observados en los últimos años (Llorca & Farré, 2021). Como consecuencia, también se ha incrementado la cantidad de residuos plásticos generados y su acumulación generalizada en el medio ambiente. Se estima que alrededor de un tercio de los plásticos usados en Europa y en los Estados Unidos son de un solo uso, lo que explica los cada vez mayores niveles de residuos plásticos generados (Paul et al., 2020). Esta acumulación de residuos plásticos en el ambiente supone que su exposición a diversos factores ambientales como la radiación ultravioleta, el viento, la acción de las olas y la abrasión los degraden en fragmentos plásticos más pequeños, conocidos como micro y nanoplásticos (MNPLs).

Esta reducción en tamaño de las partículas puede inducir características únicas en su interacción con los seres vivos, las cuales pueden influenciar su potencial tóxico (Wright & Kelly, 2017). Se conoce que las partículas en la nanoescala usualmente exhiben propiedades físicas y químicas diferentes a las observadas en las de mayor tamaño (Lehner et al., 2019). Estas partículas al tener un tamaño pequeño poseen una gran área de superficie específica y una fuerte penetración biológica, por lo que pueden alcanzar y penetrar los órganos de los organismos, incluidos la placenta y el cerebro, y generar impactos negativos en las funciones biológicas (Shi et al., 2021).

Desde la primera cita sobre la presencia de fragmentos minúsculos de plásticos en el medio natural en la década de 1970, se han publicado numerosos estudios sobre los MNPLs en diferentes ecosistemas, biota y productos alimenticios. La ingestión de MNPLs se ha observado en distintos tipos de organismos, desde especies tróficas que se encuentran en niveles inferiores hasta grandes mamíferos, incluyendo a los humanos (Bhagat et al., 2022). Estudios realizados *in vitro* e *in vivo* indican que los MNPLs pueden ingresar en el cuerpo humano y superar las barreras tisulares permitiendo la interacción con células individuales de órganos y tejidos. Efectos adversos de las nanopartículas *in*

vivo incluyen citotoxicidad, (pro-)inflamación o producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Varios estudios *in vitro* usando líneas celulares humanas han revelado que los MNPLs tienen el potencial de activar el sistema inmunitario, inducir respuestas inflamatorias o mediar el estrés oxidativo (Lehner et al., 2019). Sin embargo, la mayoría de los estudios han utilizado muestras de plástico prístino, lejos de los MNPLs que se pueden encontrar en el ambiente y, por lo tanto, alejados de los tipos de MNPLs a los que los organismos se encuentran expuestos ambientalmente. Esto indica que es necesario realizar estudios en los que se apliquen diferentes materiales plásticos provenientes de fuentes representativas ambientales, los cuales posean diferentes tamaños y/o formas, así como estudios sobre las potenciales interacciones de éstos con otros contaminantes ambientales. Este tipo de estudios se requiere para llenar los vacíos de conocimiento existentes sobre el riesgo de la exposición a los MNPLs.

La presencia generalizada de los MNPLs en el ambiente y en productos de consumo hace que la exposición humana a estas partículas se de a través de tres vías principales: inhalación, ingestión y a través de la piel. Específicamente, la presencia de MNPLs en la cadena alimenticia ha incrementado la preocupación sobre los efectos que pudiera tener la ingestión de estos MNPLs sobre la salud humana. Adicionalmente, la capacidad que poseen los MNPLs de actuar como vectores de metales pesados, aditivos plásticos u otros contaminantes orgánicos persistentes incrementan la preocupación acerca de su riesgo potencial para los seres humanos (Tamargo et al., 2022). Entre las rutas de exposición indicadas, se considera que la ingestión es la principal ruta de ingreso de los MNPLs en los seres humanos (Abbasi, 2021). Hay que recordar que el tracto gastrointestinal posee diferentes fluidos biológicos, que pueden afectar a las propiedades fisicoquímico y características de la superficie de las partículas como: carga, forma, superficie que, además de afectar la superficie de las partículas, pueden incrementar su toxicidad (Stock et al., 2020).

Así, las modificaciones que ocurren tras su ingestión por los seres vivos pueden jugar un papel importante en la modificación y determinación de las características de las partículas luego de ingresar en el organismo. Los componentes del sistema digestivo, fundamentalmente el pH y las enzimas digestivas, pueden modular la internalización de

los MNPLs como consecuencia de las modificaciones inducidas en las propiedades químicas de su superficie (Wright & Kelly, 2017; Liu et al., 2020). Otros posibles efectos resultantes de la interacción de los MNPLs con los fluidos del tracto digestivo podrían incluir la descomposición de las partículas, lo que resultaría en partículas de menor tamaño, y cambios en sus formas. Estos cambios en el tamaño y forma se esperaría que pudieran tener importancia en la evaluación de biodisponibilidad y el impacto toxicológico en comparación a los cambios químicos que se puedan producir en las mismas (Stock et al., 2020).

Hasta el momento, son pocos los estudios que han investigado las alteraciones de las características fisicoquímicas de los MNPLs debido a las condiciones del sistema digestivo y su consecuente efecto en la toxicidad. Estudios realizados en otros nanomateriales como en el grafeno y el óxido de grafeno encontraron que la ingestión oral simulada en estos materiales aumentó considerablemente su estado de agregación, pero disminuyó su bioaccesibilidad hacia la capa intestinal (Guarnieri et al., 2018). Sin embargo, se desconoce la influencia del proceso digestivo sobre la toxicidad intestinal de los MNPLs. Teniendo en cuenta esta limitada información, se necesitan más estudios sobre las potenciales transformaciones que pueden ocurrir en el tracto digestivo para un mejor entendimiento de los riesgos que la exposición a los MNPLs pueden suponer para los humanos (Liu et al., 2020).

Así, el principal objetivo del primer capítulo de esta Tesis se enfocó en evaluar si la digestión *in vitro* altera las características fisicoquímicas del nanopoliestireno (como modelo de MNPLs), así como sus efectos biológicos en líneas celulares linfocíticas humanas. Dentro de los resultados de nuestro estudio, después de que los PSNPLs se sometieran al proceso de la digestión *in vitro*, el tamaño promedio varió ligeramente, siendo algo menor en las dPSNPLs y ligeramente mayor en las dfPSNPLs. Aunque las imágenes de TEM y SEM muestran que las partículas digeridas y sin digerir son similares en apariencia y tamaños, y sin cambios visibles en la superficie, las partículas sometidas a la digestión *in vitro* muestran una importante tendencia a la aglomeración. Un estudio reciente realizado por Chen et al. (2022) en el que distintos MNPLs (PS, PE, PP, PET y PVC) se sometieron al proceso de digestión *in vitro*, no encontró cambios en el tamaño

o en la forma de las partículas después del proceso, confirmando nuestros resultados. Adicionalmente, en otro estudio realizado por Stock et al. (2020) en el que se investigó el impacto de la digestión artificial en diferentes tamaños y formas de los MNPLs, tampoco se observaron alteraciones ni en el tamaño ni en la forma de los MNPLs. Sin embargo, este estudio no investigó el efecto tóxico que se podría ser inducido por los componentes de la digestión artificial.

En estudios realizados por Chen et al. (2022) en diferentes MNPLs sometidos a digestión *in vitro*, no se encontraron cambios físicos observables ni cambios químicos importantes en las partículas luego de ser sometidas al tratamiento de la digestión. En otro estudio realizado por Liu et al. (2020) en donde se utilizaron PSNPLs de 100 y 5000 nm para estudiar la influencia del proceso digestivo en la toxicidad intestinal, utilizando el modelo *in vitro* de células Caco-2, se observó que el proceso digestivo no alteró la composición química de la partícula. Sin embargo, en el estudio se indica que el diámetro hidrodinámico de la partícula de 100 nm analizado por DLS presentó un incremento en su tamaño promedio de 100 nm a 440,2 nm. Adicionalmente, el proceso de la digestión *in vitro* incrementó ligeramente el valor del potencial Z en ambas partículas estudiadas. De la misma manera en el estudio realizado por Wang et al. (2020) en partículas de PS también observaron un incremento en el diámetro hidrodinámico y en el potencial Z de la partícula digerida. Nuestros resultados concuerdan con los estudios previos, en donde también se evidencia incremento en el diámetro hidrodinámico de la partícula y en el potencial Z luego del proceso de digestión *in vitro*. Este incremento en los valores de potencial Z reducen aún más la repulsión electrostática entre las partículas, lo cual incrementa la agregación de las partículas (Liu et al., 2020).

Estudios previos han informado que la repulsión electrostática se disminuye a pH bajo, y esto puede conducir a un aumento significativo en el diámetro hidrodinámico de las partículas de poliestireno (Lu et al., 2018), este cambio de pH puede venir dado por los componentes de la digestión y esto podría explicar el aumento del diámetro hidrodinámico de las partículas digeridas observado en nuestro estudio. Sin embargo, estudios previos no han revelado como los ácidos del estómago cambian las

características fisicoquímicas de los MNPLs, ni como esta transformación puede influenciar en la toxicidad de éstos en órganos secundarios.

Otro factor importante a tener en cuenta es la formación de una corona de proteínas en la superficie de los MNPLs. En los estudios realizados por Liu et al. (2020) la corona disminuyó los valores de potencial Zeta de los PSNPLs digeridos en comparación con los PSNPLs sin digerir, lo que podría reducir la repulsión electrostática entre las partículas y facilitar la aglomeración. Esta aglomeración redujo la posibilidad de interacción e internalización entre el PSNPLs digerido y la monocapa de células Caco-2. Adicionalmente, en el estudio realizado por Wang et al. (2020) en donde se colocó PS sin digerir y digerido en medio de cultivo celular y en agua, se observó que en medio de cultivo aumentó ligeramente la medida de los diámetros hidrodinámicos, en comparación con las partículas que se encontraban en agua. Las biomoléculas presentes en los medios de cultivo, como las proteínas séricas, se adsorben por la superficie de las nanopartículas para formar una corona proteínica. Así, además de la repulsión electrostática reducida, la posible formación de corona de proteínas también podría contribuir al aumento de los diámetros hidrodinámicos de las partículas de poliestireno (Wang et al., 2020).

En los fluidos biológicos, las proteínas se unen a la superficie de las nanopartículas para formar la corona de proteínas, lo que puede afectar de manera crítica la interacción de las nanopartículas con las células (Jiang et al., 2010). Así, Walczak et al. (2015) demostraron en modelos gastrointestinales *in vitro*, que simulan la digestión humana, que las nanopartículas de poliestireno, dependiendo de las condiciones en las que se encuentren, van a formar diferentes coronas y esto puede incrementar el ingreso y translocación de éstas. En nuestro estudio con microscopía Raman hemos podido observar que hay diferentes proteínas asociadas en las partículas digeridas y sin digerir. Así mismo, al estudiar regiones específicas como la región de la banda Amida I se observa la presencia de hélices alfa y láminas beta. La gran cantidad de láminas beta podría tener su origen en la pepsina que tiene un 44 % de láminas beta y un 14 % de hélices alfa cuyo origen podría ser del BSA (Lin et al., 1976; Sielecki et al., 1990; Berman et al., 2020). Walczack (2015) en su estudio realizado en PS con superficies

funcionalizadas y sin funcionalizar ilustraron que la digestión tiene un efecto importante en la composición de las proteínas de la corona de tal forma que hay un cambio en las proteínas de mayor tamaño presentes en la partícula sin funcionalizar hacia proteínas de bajo peso molecular luego de la digestión.

La formación de la corona proteica depende de varios factores, pero uno de los más importantes es la composición química de la partícula. El tamaño también es importante, ya que las nanopartículas tienen un área superficial relativamente grande por unidad de masa para la adsorción de compuestos orgánicos del ambiente que las rodea. Diversos estudios han demostrado que los componentes de la secreción intestinal, principalmente las endoproteínas, las bacterias y los antígenos alimentarios no absorbidos, se adsorben en la superficie de las micropartículas. Dada la superficie hidrofóbica de los microplásticos es probable que los componentes digestivos se acumulen en la superficie de las partículas formando la corona proteínica. Estas proteínas dan una identidad biológica a la partícula y puede alterar la tasa de internalización en las células y su translocación hacia órganos secundarios (Wright & Kelly, 2017; Stock et al., 2020).

En nuestro estudio hemos evidenciado que las partículas digeridas muestran una mayor internalización, comparadas con las no digeridas y, adicionalmente, se observa una diferencia en el grado de internalización celular de las diferentes líneas celulares, siendo THP1 la que registra una mayor internalización, tanto para las partículas digeridas como para las sin digerir. En un estudio realizado por Koner et al. (2023) en el que se estudia el efecto de las partículas de nanopoliéstereno de un tamaño menor a 450 nm se ha observado una disminución en la viabilidad celular; sin embargo, estos estudios se realizaron usando concentraciones elevadas y la disminución se observó a concentraciones superiores a 100 µg/mL. De igual manera dicho estudio indica un aumento en la inducción de estrés oxidativo y una disminución de la proliferación celular a concentraciones de 500 µg/mL (Koner et al., 2023). Estas concentraciones son muy elevadas y, en consecuencia, las exposiciones no son realistas.

Para realizar una evaluación correcta de la internalización celular y de la toxicidad de los MNPLs se debe tener en cuenta no sólo los componentes que modifican la formación de la corona proteínica, sino también otros factores como la línea celular, la funcionalización

de las partículas plásticas en su superficie, la densidad celular, el tiempo de exposición necesario para que las células internalicen y la dosis administrada (Shi et al., 2021). En el estudio de Liu et al. (2020) los autores encontraron que la digestión *in vitro* formó una corona en las partículas estudiadas, y en las partículas de 100 nm se observó un incremento en la toxicidad, comparado con las de 5 μ m. Las partículas de mayor tamaño presentaron un cambio en la morfología de las partículas luego de la digestión, lo que podría proporcionar una posible explicación de la reducción de la toxicidad.

En nuestro estudio, la aglomeración observada en las partículas de nanopoliestireno digerido pudo haber reducido la posibilidad de interacción e internalización en la monocapa de células Caco-2. Además, las proteínas u otros componentes adsorbidos en la corona provenientes de los componentes de la digestión podrían ayudar a la repulsión de la membrana celular debido a la respuesta inmunitaria. Las interacciones entre los MNPLs digeridos y la membrana celular podrían verse alteradas, provocando un cambio en la toxicidad de los MNPLs en las células expuestas (Walczak et al., 2015). Así, en el estudio realizado en hepatocitos por Wang et al. (2020) se observó un incremento en el daño de la membrana celular y en la generación de ROS con el nanopoliestireno digerido. Sin embargo, en nuestro estudio no hemos podido evidenciar aumentos ni en la generación de ROS ni en la toxicidad tras la exposición a las partículas digeridas, a pesar de que se evidenció que existe un aumento en la internalización de éstas. Esto puede indicar que la mayor habilidad de internalización de las partículas digeridas no va acompañada de un mayor riesgo.

Cabe señalar que todos los MNPLs utilizados en este primer capítulo son MNPLs prístinos comerciales. Los MNPLs reales que se encuentran en la naturaleza pueden tener un peso molecular diferente, aditivos químicos añadidos como son los plastificantes, tener diferentes modificaciones en sus superficies o estar asociados a contaminantes o metales en sus superficies (Chen et al., 2022), y estas características pueden tener un efecto diferente sobre la toxicidad de las células. Así, en el segundo y tercer capítulo de esta Tesis enfocamos nuestro trabajo al estudio de materiales que simulan una realidad más cercana a lo que ocurre con los MNPLs secundarios presentes en el medio ambiente.

Dentro de nuestro segundo capítulo nuestro objetivo fue determinar si las partículas de nanopoliestireno actúan como vectores de metales, específicamente de plata (AgNO_3 y AgNPs), y evaluar si esta relación entre metal y polímero incrementa la citotoxicidad en la línea intestinal humana Caco-2.

Los MNPLs presentes en el ambiente pueden interactuar con otros contaminantes antes, durante, y después de su liberación a los ambientes naturales. Estas interacciones ocurren como resultado de la formulación misma del producto, por la adición de plastificantes y conservantes, pero también ocurren de una manera involuntaria al interactuar con los componentes de las aguas residuales y los lixiviados de vertederos que contienen mezclas complejas de distintos contaminantes (Nanna et al., 2017). Los MNPLs pueden adsorber sustancias químicas del medio ambiente y, en consecuencia, transportarlas y transferirlas a diferentes organismos a través de la ingestión, inhalación y contacto con la piel. Debido a su superficie hidrofóbica, los MNPLs pueden fácilmente adsorber y concentrar una gama de contaminantes químicos, incluyendo hidrocarburos aromáticos policíclicos, bifenilos policlorados y metales traza como: aluminio, cadmio, cobalto, cromo, cobre, hierro, níquel, plomo, y zinc. Las evidencias indican que algunos productos químicos pueden adsorberse más fácilmente a los plásticos, en comparación con otras partículas del ambiente (Lancôt et al., 2018). Adicionalmente, las propiedades físicas y químicas de las partículas plásticas como son: tipo de polímero, tamaño, área superficial, carga superficial, y fragmentación, pueden modular la adsorción de los contaminantes, pero ésta también puede variar dependiendo de distintas condiciones ambientales como son la salinidad y el pH del medio en el cual se encuentran (Holmes et al., 2014; Yu et al., 2019).

Diversos estudios indican que la fragmentación que lleva a la génesis de los MNPLs afecta a sus propiedades fisicoquímicas afectando al tamaño, la cristalinidad, o los grupos que contienen oxígeno y, por lo tanto, cambia el perfil de adsorción de los contaminantes en los MNPLs (Liu et al., 2020). Por ejemplo, los MNPLs con superficies erosionadas contienen más grupos oxígeno en la superficie comparadas con las partículas prístinas, lo que lleva a una mayor adsorción de contaminantes, especialmente por los contaminantes más hidrofílicos. Además, después de la exposición a la radiación

UV, el área de superficie específica y el volumen de poro de los MNPLs aumentan, por la formación de nano-huecos y grietas más grandes en la superficie, lo que también favorece el proceso de adsorción de contaminantes (Li et al., 2018; Velez et al., 2018). Así, Kleinteich & Seidensticker (2018) encontraron que la biodisponibilidad de contaminantes en el suelo disminuyó en función de la unión a MNPLs (Kleinteich et al., 2018). Por lo tanto, los MNPLs pueden servir como fuente y sumidero para otros contaminantes (Fournier et al., 2021).

En nuestro estudio hemos evaluado las posibles interacciones entre el nanopoliestireno prístino y el material de plata (en forma de nanoplata y de nitrato de plata). Dado que la plata tiene un gran interés en la industria por sus propiedades antisépticas ésta es liberada constantemente al ambiente. De la misma manera, el poliestireno es uno de los polímeros más utilizados principalmente para el envasado. Así, estos dos materiales constituyen un modelo de contaminantes ambientales los cuales pueden coexistir e interactuar en condiciones ambientales, modulando su toxicidad. Mediante el uso de microscopía TEM, hemos podido confirmar las asociaciones entre las partículas de nanopoliestireno y la nanoplata, así como la asociación entre el nitrato de plata y el nanopoliestireno. De igual manera, los espectros obtenidos a través de TEM-EDX nos indican la presencia de la plata asociada al nanopoliestireno. Estos resultados nos confirman, la formación de los complejos AgNPs/PSNPLs y AgNO₃/PSNPLs. Adicionalmente, se ha podido confirmar que esta asociación permanece estable hasta horas después de su formación y, más importante aún, que estos complejos pueden ingresar al interior de las células e inclusive alcanzar el núcleo de éstas. Esto lo hemos podido confirmar a través del uso de microscopía confocal.

La adsorción de metales pesados generalmente se debe a las interacciones electrostáticas que se establecen entre iones metálicos y sitios polares en la superficie plástica. Hay varios factores que generan un incremento en la interacción entre metales trazas y los MNPLS. Uno de estos factores es el envejecimiento o erosión de los MNPLs. Diversos estudios han evidenciado que los MNPLs erosionados o envejecidos contienen más metales pesados que sus contrapartes prístinas (Holmes et al., 2012; Wang et al., 2019). El proceso de envejecimiento genera oxidación de la superficie de la partícula, lo

cual incrementa la afinidad por los metales (Andrady, 2011). Adicionalmente, se ha demostrado que las partículas plásticas, en especial las envejecidas, muestran una mayor afinidad por la materia disuelta orgánica (DOM) y, por lo tanto, estas partículas se pueden encontrar mayormente adheridas al DOM en el medio ambiente. Cuando los MNPLs están adheridos al DOM, es probable que haya una mayor interacción y retención de elementos traza que en el caso de partículas prístinas (Turner & Holmes, 2015; Fournier et al., 2021).

La composición química del polímero también juega un papel importante en la adsorción de elementos traza. La tasa de adsorción de elementos traza puede diferir para cada tipo de polímero debido a diversas propiedades físicas y químicas, como el área superficial (que afecta la difusividad) y la hidrofobicidad (que afecta la polaridad). En un estudio realizado por Brennecke et al. (2016), se evidenció que la adsorción de cobre fue menor en las partículas de poliestireno que en las de cloruro de polivinilo. Estas diferencias de adsorción entre los dos tipos de plásticos probablemente se debieron al área de superficie más pequeña del poliestireno (forma esférica del poliestireno en comparación con la forma irregular del cloruro de polivinilo), así como a la polaridad del cloruro de polivinilo. Por lo tanto, el tamaño es un factor importante. Los plásticos de partículas más pequeñas tienen un área de superficie específica más grande (área de superficie por unidad de masa) y, a su vez, una mayor capacidad para absorber elementos traza (Fournier et al., 2021). Otro factor que podría afectar a la adsorción es la porosidad, en donde partículas con superficies envejecidas o porosas acumulan mayor cantidad de metales en comparación a partículas con superficies prístinas (Brennecke et al., 2016).

Un estudio realizado por Rochman et al. (2014) con cinco tipos de polímeros diferentes, no evidenció diferencias en la adsorción de distintos metales. Sin embargo, las partículas plásticas que se encontraron en condiciones ambientales mostraron una mayor capacidad de adsorción que los gránulos prístinos (Holmes et al., 2012; Turner & Holmes, 2014), probablemente debido al aumento del área superficial y los sitios activos aniónicos como consecuencia de la meteorización y la contaminación con la materia orgánica a lo largo del tiempo (Holmes et al., 2014; Brennecke et al., 2016).

En nuestro estudio, las partículas utilizadas han sido partículas prístinas, tanto el nanopoliestireno como las partículas de plata. Sin embargo, a pesar de que estas partículas no han estado bajo condiciones ambientales, y por lo tanto no han sufrido modificaciones en su superficie que pueden incrementar las uniones con los metales, hemos confirmado la formación del complejo polímero/metal. Adicionalmente, se ha observado que esta asociación no sólo afecta a la adsorción las propiedades de los polímeros sino también a las características de los metales trazas. La carga superficial de los elementos trazas, el estado de oxidación y los óxidos generados pueden afectar la adsorción de estos (Turner & Holmes, 2015), al igual que las condiciones ambientales como agua con alta demandas de oxígeno, como es el caso de aguas residuales urbanas y agua de riesgo, en donde se ha visto incrementada la adsorción de contaminantes (Godoy et al., 2020).

Otro punto importante a tener en cuenta es que estos elementos contaminantes que se encuentran unidos a las partículas plásticas pueden liberarse en los ecosistemas o en el interior de los organismos expuestos a ellos, causando toxicidad y bioacumulación en los organismos (Bradney et al., 2019). Así, factores como la temperatura, el pH, el tamaño de las partículas y el medio que lo rodea pueden favorecer esta liberación (Anderson et al., 2016). Sin embargo, son muy pocos los estudios que se han enfocado en el estudio del proceso de desorción de los contaminantes unidos a los MNPLs.

En nuestra investigación hemos medido la cantidad de plata internalizada en las células Caco-2 después del tratamiento con AgNPs/PSNPLs y AgNO₃/PSNPLs, detectando que la cantidad de plata (nanoplatea y plata iónica) aumenta significativamente conforme aumentan las concentraciones de nanopoliestireno. Siendo la internalización de la plata mucho más pronunciada en el caso del nanopoliestireno con AgNO₃. Por tanto, factores como el tipo de metal, de polímero, o incluso el tipo celular pueden estar afectando la cantidad de polímero/metal que ingresa a la célula, pero también la cantidad de metal que se puede liberar en su interior.

Teuten et al. (2009) observaron que las condiciones ácidas, como las que se encuentran en el jugo gástrico durante la digestión, pueden promover la liberación de los metales ligados a los MNPLs. En otro estudio realizado por Godoy et al. (2020) se investigó la

bioaccesibilidad y biodisponibilidad de cromo y plomo a partir de microplásticos de polietileno y polipropileno previamente contaminados con dichos metales. Los resultados mostraron que aproximadamente el 23% de dichos metales presentes en los microplásticos pudieron cruzar la membrana tubular del tracto gastro intestinal simulado, imitando así la fase de absorción intestinal.

En otro estudio realizado por Liao & Yang (2020) en el que se ensayó la adsorción/desorción del cromo en cuatro tipos de microplásticos no degradables de uso común: polietileno, polipropileno, cloruro de polivinilo y poliestireno, y un microplástico degradable (ácido poliláctico) en un modelo digestivo *in vitro* que incluyó las fases digestivas de la boca, el estómago, el intestino delgado y el intestino grueso el cromo fue el metal más bioaccesible en el ambiente gástrico que en las fases del intestino delgado o grueso, ya que las condiciones ácidas favorecieron la desorción de las especies aniónicas de cromo (Fournier et al., 2021).

Poco se conoce sobre el aumento de la toxicidad relacionada con la asociación entre MNPLs y metales. Davranche et al. (2019) mostraron la unión de metales (plomo) y microplásticos recolectados en la playa aunque, desafortunadamente, no realizaron estudios de toxicidad. En otro estudio realizado por Yan et al. (2020) se evaluó la toxicidad del cadmio, plomo, y zinc con nanopoliestireno en peces marinos. En dicho estudio no se confirmó la interacción metal/plástico; sin embargo, los datos obtenidos indicaron un aumento de la toxicidad sobre la microbiota intestinal ya que el tratamiento con el complejo metal/nanopoliestireno causó una mayor cantidad de contaminación en el intestino.

A pesar de haber comprobado la internalización de la plata dentro de las células Caco-2, tanto por microscopia confocal como a través de la cuantificación por ICP-MS, los resultados muestran que en ambos complejos AgNPs/PSNPLs y AgNO₃/PSNPLs no incrementan la producción de ROS, dependiendo de la concentración de nanopoliestireno. Así, el aumento de ROS en esta línea celular viene principalmente dado por la concentración aplicada de AgNPs y de AgNO₃ más que por las concentraciones de nanopoliestireno. De hecho, ya se conocía que las nanopartículas de plata pueden inducir altos niveles de ROS intracelulares en células cultivadas

humanas (Vila et al., 2017), mientras que los estudios previos realizado por Cortés et al. (2020) en células Caco-2 no diferenciadas, y por Domenech et al. (2020), en células Caco-2 diferenciadas, no se evidenciaron incrementos en la producción de ROS tras la exposición a nanopoliestireno. Sin embargo, estos resultados podrían variar en función de la línea celular estudiada ya que en líneas celulares hematopoyéticas humanas (como Raji-B y TK6) se ha observado un aumento en la producción de ROS tras la exposición a partículas de nanopoliestireno (Rubio et al., 2020).

Al igual que la ausencia de ROS observada por la exposición a diferentes concentraciones de nanopoliestireno, también hemos evidenciado la falta de genotoxicidad tras su exposición en células Caco-2. Lo que sí que es evidente en nuestro estudio es el diferente potencial genotóxico de los dos compuestos de plata evaluados, siendo el nitrato de plata el que presenta una mayor genotoxicidad. Lo que podemos resaltar es que las concentraciones más altas de nanoplata, junto con la concentración más alta de nanopoliestireno, incrementó el daño genotóxico. Finalmente, también se evidenciaron incrementos en los niveles de daño oxidativo generado por las diferentes concentraciones de nanopoliestireno, indicando que las concentraciones más altas de AgNO_3 incrementan el daño oxidativo en las células Caco-2. Como ya se indicó previamente, diferentes condiciones como son: tipo y tamaño de polímero, tipo de metal, condiciones ambientales y/o biológicas, y tipos de células estudiadas, entre otras, pueden estar provocando un mayor adsorción y desorción de los metales en los polímeros y con ello provocar una mayor o menor toxicidad en los organismos. De nuestros resultados se evidencia que es necesario estudiar MNPLs más cercanos a la realidad, los cuales pueden contener contaminantes o partículas metálicas como parte de su fabricación, o por la interacción de éstos en condiciones ambientales, ya que puede ser probable que bajo estas condiciones su toxicidad varíe.

Es así, que acercándonos un poco más a la realidad de los MNPLs ambientales, en nuestro tercer capítulo nos enfocamos en la obtención de MNPLs provenientes de fuentes ambientales más reales, como son los MNPLs obtenidos de botellas de PET opacas. El objetivo de nuestro trabajo fue la obtención de micro nanoplásticos partir de botellas de PET opacas que contienen titanio, como modelo representativo de los MNPLs

secundarios presentes en el ambientales, y la determinación de sus posibles efectos biológicos en líneas celulares linfocíticas humanas.

El tereftalato de polietileno (PET) es principalmente utilizado para el envasado de bebidas, debido a su reciclabilidad, alta resistencia mecánica, química, inercia y baja permeabilidad al oxígeno. Estas propiedades hacen que sean altamente utilizados como contenedores de agua, bebidas no alcohólicas, aceite, vino, y jugos. En el caso de los productos lácteos, como leche y yogures, se descarta el uso de PET debido a su transparencia a la luz visible, ya que no ofrece una protección óptima de las vitaminas y del sabor (Saffert et al., 2006). Para poder evitar estos efectos negativos en estos productos se ha adicionado pigmentos al PET, los cuales actúan como aditivos absorbentes de la luz UV previniendo la difusión del oxígeno. De esta manera se logra mantener las vitaminas y el sabor del producto contenido en el envase y adicionalmente, se puede disminuir el costo de producción al fabricarlo con un menor espesor (Tramis et al., 2021).

Entre los pigmentos minerales, los fabricantes de botellas de productos lácteos usan dióxido de titanio (TiO_2) en forma nanoparticulada para aplicaciones alimentarias como un bloqueador de la luz UV en concentraciones relativamente altas (aproximadamente un 4% en peso) (Werink et al., 2012). Estas botellas de PET opacas son muy comunes en los supermercados y al igual que la mayoría de los plásticos también son desechados al ambiente. Existe un gran desconocimiento sobre el papel que juegan los contaminantes y aditivos que transportan los plásticos en el cuerpo humano. Este hecho puede provocar un aumento en la toxicidad de los MNPLs dada por la posible lixiviación de los metales en condiciones ambientales, pero también por su comportamiento en diferentes condiciones fisicoquímicas, como los ambientes ácidos que se encuentran en el aparato digestivo de muchos animales, cuando los MNPL se ingieren involuntariamente (Villacorta et al., 2023). Su toxicidad en humanos depende de muchos factores, incluyendo la dosis y el nivel de exposición, la edad, el sexo, genética, etc. Sin embargo, se ha demostrado que altas concentraciones de metales pueden causar daño celular y tisular, así como reacciones estrogénicas (Godoy et al., 2020).

En nuestro estudio hemos podido obtener nanopartículas de PET opaco, conteniendo nanopartículas de titanio en su estructura [PET(Ti)NPLs]. Usando el método descrito previamente por Villacorta et al. (2022) para obtener MNPLs de PET a partir de botellas de agua, hemos verificado que dicho método permite obtener MNPLs de otros materiales plásticos de uso diario, como es el caso de los envases plásticos de leche. El hecho de obtener estos MNPLs que son más cercanos a la realidad nos permite estudiar de mejor manera el comportamiento de los MNPLs ambientales y los efectos que pueden tener los mismos en los sistemas biológicos.

A través de TEM y SEM hemos comprobado el tamaño nanométrico de las partículas y su morfología es similar a la morfología de los MNPLs que se encuentran en el ambiente (formas irregulares). Además, claramente se puede observar la presencia de Ti junto las partículas de PET, y partículas de Ti solas. Hemos comprobado que durante el proceso de producción del PET(Ti)NPLs no se separa completamente el Ti del PET, y por lo tanto estos pueden seguir interactuando aún en la escala nanométrica. A través de ICP-MS hemos comprobado que hay un pequeño porcentaje de Ti que se pierde en el proceso, que pasa de 3,83% a 2,60%. Esta misma pérdida de Ti puede suceder bajo condiciones ambientales, en donde el plástico de mayor tamaño pasa a convertirse en MNPLs, liberando al ambiente partículas metálicas, incrementando la concentración y accesibilidad de éstas. De igual manera, el Ti que queda retenido en las partículas plásticas puede ser liberados en el ambiente por efecto de factores como la temperatura, el pH, la salinidad, y el tamaño de las partículas (Anderson et al., 2016), o incluso ingresar a los organismos y ser liberados en su interior, dependiendo de las condiciones biológicas, incrementando su toxicidad.

Es conocido que el dióxido de titanio es comúnmente utilizado como aditivo alimentario. Aunque los efectos biológicos y los mecanismos de respuesta celular aún no están claros, se considera que el potencial mecanismo de toxicidad involucra la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que podría resultar en inflamación, genotoxicidad, apoptosis, cambios metabólicos y potencialmente carcinogénesis (Baranowska-Wójcik et al., 2020). Sin embargo, en nuestro estudio no se han podido demostrar incrementos de la toxicidad celular asociados a las partículas de PET(Ti)NPLs,

a pesar de que ambas partículas estudiadas se internalizan fácilmente en el interior de las células.

A través de microscopía confocal y de citometría de flujo hemos evidenciado que los PET(Ti)NPLs internalizan en las tres líneas celulares estudiadas. Sin embargo, hay diferencias en la internalización entre las diferentes líneas celulares usadas, siendo las células THP1 las que más internalizan. En los diferentes estudios realizados dentro de esta Tesis, en los que se ha utilizado esta línea celular, se ha demostrado su habilidad para fagocitar diferentes tipos de partículas plásticas y bajo diferentes condiciones biológicas. Los macrófagos, como es el caso de THP1, tienen la capacidad de ingerir otras células, patógenos, y muchas otras partículas microscópicas colectivamente. Al ingerir y procesar partículas extrañas, los macrófagos juegan un papel crucial para hacerlos reconocibles por los linfocitos, que controlan el sistema inmunológico (Koner et al., 2023). A pesar de observar una buena internalización de las partículas usadas, no hemos podido evidenciar una disminución en la viabilidad celular o un incremento de ROS bajo las diferentes condiciones aplicadas.

El tipo de polímero y el tamaño de la partícula puede ser un factor importante que altere las condiciones biológicas es este tipo celular. En un estudio realizado por Beijer et al. (2022) en el que se analizó el efecto de diferentes tipos y tamaños de MNPLs en la producción de citoquinas en células THP1 derivadas de macrófagos, se evidenció que el tamaño de la partícula tenía una mayor influencia sobre las respuestas de citoquinas en comparación con el tipo de polímero, de tal manera que partículas más pequeñas y a una menor concentración indujeron a la producción de más citoquinas (Beijer et al., 2022).

Debido a que las investigaciones con MNPLs se enfocan en estudiar el destino, transporte, interacciones biológicas y los efectos de los MNPLs sobre los organismos, es necesario utilizar materiales plásticos reales de uso diario que finalmente terminan como contaminantes ambientales. Es así como estas partículas de PET(Ti)NPLs se pueden aprovechar no sólo para la realización de estudios toxicológicos sino también como una herramienta para conocer el destino final de los MNPLs dentro de los organismos complejos, como pueden ser los mamíferos. El disponer de partículas dopadas con un

marcador, como un metal, pueden ser una forma eficiente de rastrear las partículas que son difíciles de analizar a bajas concentraciones, dado que las técnicas analíticas existentes para detectar MNPLs en matrices complejas son bastante limitadas (Mitrano et al., 2019).

Nuestras partículas de PET dopadas con nanopartículas de TiO_2 poseen una huella digital metálica atrapada en la estructura del plástico, esto puede ser de gran ayuda en los estudios para comprender los mecanismos, procesos, comportamiento y destino final de los MNPLs. Adicionalmente, otra ventaja que nos presentan estas partículas es que el PET también se marcó con fluorescencia usando el tinte denominado iDye Pink, ampliamente utilizado como tinte en la industria textil. Este marcaje nos permite observar a las partículas de PET(Ti)NPLs en el interior de las células, de tal forma que a través de microscopía confocal se puede evidenciar la colocación de las partículas metálicas junto con partículas plásticas. A través de este marcaje podemos dotar de fluorescencia a MNPLs comerciales que no están disponibles en su versión fluorescente, pero también a una variedad de MNPLs de origen ambiental.

A pesar de su amplia presencia en el ambiente, la investigación sobre los efectos potenciales de los MNPLs aún está en sus inicios. Los estudios de exposición utilizando concentraciones ambientales realistas de MNPLs, por lo general, no muestran suficientes cambios fenotípicos en las células humanas estudiadas, sin embargo, dicha exposición supone una preocupación pública creciente. La elevada diversidad de los MNPLs presente en el ambiente hace que el análisis de los posibles efectos en la salud sea un desafío. Así pues, se necesitan nuevas herramientas y enfoques para investigar los efectos biológicos de los MNPLs. Para ello, es necesario desarrollar nuevas metodológicas que permitan evaluar aspectos como: los efectos de una potencial acumulación de los MNPLs en los organismos, la lixiviación de aditivos/impurezas y sus efectos a largo plazo resultantes, las toxicidades específicas dependiendo del tipo celular, así también los efectos de los MNPLs en el microbioma (Bredeck et al., 2022).

En este contexto, la aplicación de nuevas tecnologías puede ayudar a mejorar las aproximaciones en el estudio de los efectos de los MNPLs. Tecnologías como las basadas en el uso y desarrollo de organoides son prometedoras para analizar los efectos

de MNPLs en estructuras similares a tejidos, los cuales pueden ayudar a descubrir reacciones nuevas y más complejas iniciadas por los MNPLs. Así, también los modelos de órgano en un chip pueden proporcionar información más confiable sobre las concentraciones relevantes que pueden desencadenar efectos biológicos. Finalmente, estudios basados en enfoques ómicos, como la transcriptómica, la proteómica, la microbiómica, y la metabolómica, pueden ayudar a mejorar nuestro conocimiento de la toxicidad relacionada con la exposición a los MNPLs (Singh et al., 2021). La integración de las multiómicas puede proporcionar una comprensión más profunda de los mecanismos implicados, vías de toxicidad y el verdadero peligro para la salud humana, lo que ayudaría a crear políticas públicas que ayuden a limitar el uso y consumo de plástico.

5. CONCLUSIONS

5. CONCLUSIONS

In accordance with the proposed objectives, the results obtained, and the analysis of the discussion presented in this Thesis, we conclude that:

- 1) Regarding the first objective: *To evaluate if the in vitro digestion modifies the physicochemical characteristics of nanopolystyrene, as well as its biological effects in human lymphocytic cells*, we conclude that:
 - a) The *in vitro* digestion plays an important role in modifying and determining the characteristics of the MNPLs. Thus, changes occurring in the digestive tract (changes in pH, ionic strength, and digestive enzymes) affect their cell internalization through modifications of the chemical characteristics of the MNPL surface.
 - b) The *in vitro* digestion does not generate physical changes on the particle surface. However, there is a greater tendency to form agglomerates.
 - c) The presence of different proteins on the surface of the dPSNPLs (protein corona) alters the possibility of interaction and internalization in the different treated cells.
 - d) The *in vitro* digestion process generates a greater internalization of the particles in the three studied cell lines. Despite these differences in the cell internalization, no significant differences in toxicity were found.
- 2) PSNPLs particles can act as carriers of AgNPs and Ag⁺, forming AgNPs/PSNPLs and AgNO₃/PSNPLs complexes that modulate the uptake of silver nanoparticles and modify the toxic effects of adsorbed metals (Chapter 2).
 - a) AgNPs/PSNPLs and AgNO₃/PSNPLs complexes internalize in the undifferentiated Caco-2 cells, reaching the cell nucleus.
 - b) The increase in the concentration of polystyrene nanoparticles increases the adsorption of silver nanoparticles at low concentrations.
 - c) The AgNPs/PSNPLs complex increases the genotoxic damage at high concentrations of PSNPLs in the undifferentiated Caco-2 cell line.

- d) The AgNPs/PSNPLs complex induces oxidative damage to DNA when AgNO₃ is at low concentration and in a dose-dependent manner of PSNPLs.
- 3) Through the degradation of opaque PET plastic bottles, which contain TiO₂NPs in their structure, it has been possible to obtain and characterize PET(Ti)NPLs particles, which we can consider as environmentally representative samples of MNPLs. (Chapter 3).
- a) The PET(Ti)NPLs particles are internalized by all the studied cell lines, even reaching the cell nucleus.
 - b) Despite the internalization of these particles, there is no increase in cell toxicity given by the PET(Ti)NPLs.
 - c) During the production process of PET(Ti)NPLs, Ti is not completely separated from PET. Therefore, these particles can act as tool to determine the final fate of MNPLs inside the organisms.
 - d) These MNPLs labeled with fluorescence through iDye Pink textile dye allow us to provide fluorescence to commercial MNPLs that are not available in their fluorescent version, and to MNPLs of environmental origin.

6. REFERENCIAS

6. REFERENCIAS

- Abbasi S. (2021). Toxicology routes of human exposure to micro(nano)plastics. *Current Opinion in Toxicology*, 27: 41–46. doi: 10.1016/j.cotox.2021.08.004.
- Ahmad M, Kadir B, Gaga EO. (2022). Atmospheric micro(nano)plastics : future growing concerns for human health. *Air Quality, Atmosphere & Health*, 17: 1-30. doi: 10.1007/s11869-022-01272-2.
- Alaraby M, Abass D, Domenech J, Hernández A, Marcos R. (2022). Hazard assessment of ingested polystyrene nanoplastics in Drosophila larvae. *Environmental Science: Nano*, 9: 1845–1857. doi: 10.1039/d1en01199e.
- Alimba CG, Faggio C. (2019). Microplastics in the marine environment: Current trends in environmental pollution and mechanisms of toxicological profile. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 68: 61–74. doi: 10.1016/j.etap.2019.03.001.
- Anderson JC, Park BJ, Palace VP. (2016). Microplastics in aquatic environments: Implications for Canadian. *Environmental Pollution*, 218: 269–280. doi: 10.1016/j.envpol.2016.06.074.
- Andrady AL. (2011). Microplastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 62(8): 1596–1605. doi: 10.1016/j.marpolbul.2011.05.030.
- Annangi B, Villacorta A, López-Mesas M, Fuentes-Cebrian V, Marcos R, Hernández A. (2023). Hazard assessment of polystyrene nanoplastics in primary human nasal epithelial cells, focusing on the autophagic effects. *Biomolecules*, 13: 220. doi:10.3390/biom13020220.
- Baensch-Baltruschat B, Kocher B, Stock F, Reifferscheid G. (2020). Tyre and road wear particles (TRWP) - A review of generation, properties, emissions, human health risk, ecotoxicity, and fate in the environment. *Science of the Total Environment*, 733: 137823. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.137823.
- Balakrishnan G, Dénier M, Nicolai T, Lagarde F. (2019). Towards more realistic reference microplastics and nanoplastics: preparation of polyethylene micro/nanoparticles with a biosurfactant. *Environmental Science Nano*, 6: 315–324. doi: 10.1039/c8en01005f.
- Ballesteros S, Domenech J, Barguilla I, Cortés C, Marcos R, Hernández A. (2020). Genotoxic and immunomodulatory effects in human white blood cells after ex vivo exposure to polystyrene nanoplastics. *Environmental Science: Nano*, 7(11): 3431–

3446. doi: 10.1039/d0en00748j.
- Banerjee A, Shelver WL. (2021). Micro- and nanoplastic induced cellular toxicity in mammals: A review. *Science of the Total Environment*, 755: 142518. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.142518.
- Baranowska-Wójcik E, Sz wajgier D, Oleszczuk P, Winiarska-Mieczan A. (2020). Effects of titanium dioxide nanoparticles exposure on human ealth -a Review. *Biological Trace Element Research*, 193: 118–129. doi: 10.1007/s12011-019-01706-6.
- Beijer NRM, Dehaut A, Carlier MP, Wolter H, Versteegen RM, Pennings JLA, de la Fonteyne L, Niemann H, Janssen HM, Timmermans BG, Mennes W, Cassee FR, Mengelers MJB, Amaral-Zettler LA, Duflos G, Staal YCM. (2022). Relationship between particle properties and immunotoxicological effects of environmentally-sourced microplastics. *Frontiers in Water*, 4: 1–16. doi: 10.3389/frwa.2022.866732
- Bhagat J, Zang L, Nishimura N, Shimada Y. (2022). Trends in analytical chemistry application of omics approaches for assessing microplastic and nanoplastic toxicity in fish and seafood species. *Trends in Analytical Chemistry*, 154: 116674. doi:10.1016/j.trac.2022.116674.
- Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research* 2000, 28: 235-242. doi: 10.1093/nar/28.1.235.
- Bouwmeester H, Hollman PCH, Peters RJB. (2015). Potential health impact of environmentally released micro- and nanoplastics in the human food production chain: experiences from Nanotoxicology. *Environmental Science and Technology*, 49(15): 8932–8947. doi: 10.1021/acs.est.5b01090.
- Bradney L, Wijesekara H, Palansooriya KN, Obadamudalige N, Bolan NS, Ok YS, Rinklebe J, Kim K H, Kirkham MB. (2019). Particulate plastics as a vector for toxic trace-element uptake by aquatic and terrestrial organisms and human health risk. *Environment International*, 131: 104937. doi: 10.1016/j.envint.2019.104937.
- Bredeck G, Halamoda-Kenzaoui B, Bogni A, Lipsa D, Bremer-Hoffmann S. (2022). Tiered testing of micro- and nanoplastics using intestinal *in vitro* models to support hazard assessments. *Environment International*, 158: 106921. doi: 10.1016/j.envint.2021.106921.

- Brennecke D, Duarte B, Paiva F, Caçador I, Canning-Clode J. (2016). Microplastics as vector for heavy metal contamination from the marine environment. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 178: 189–195. doi: 10.1016/j.ecss.2015.12.003.
- Bucknall DG. (2020). Plastics as a materials system in a circular economy. *Philosophical Transactions of the Royal Society A*, 378: 20190268. doi: 10.1098/rsta.2019.0268.
- Caldwell J, Lehner R, Balog S. (2021). Fluorescent plastic nanoparticles to track their interaction and fate in physiological environments. *Environmental Science Nano*, 8: 502–513. doi: 10.1039/d0en00944j.
- Cao J, Yang Q, Jiang J, Dalu T, Kadushkin A, Singh J, Fakhrullin R, Wang F, Cai X, Li R. (2022). Coronas of micro/nano plastics: a key determinant in their risk assessments. *Particle and Fibre Toxicology*, 19(1):55. doi: 10.1186/s12989-022-00492-9.
- Capolungo C, Genovese D, Montalti M, Rampazzo E, Zaccheroni N, Prodi L. (2021) Photoluminescence-based techniques for the detection of micro- and nanoplastics. *Chemistry -A European Journal*, 27: 17529–17541. doi: 10.1002/chem.202102692.
- Carbone M, Arron ST, Beutler B, Bononi A, Cavenee W, Cleaver JE, Croce CM, Andrea AD, Foulkes WD, Groden JL, Henske EP, Hickson ID, Hwang PM, Kolodner RD, Mak TW, Malkin D, Jr RJM. (2021). Tumour predisposition and cancer syndromes as models to study gene-environment interactions. *Nature Reviews Cancer*, 20(9): 533–549. doi: 10.1038/s41568-020-0265-y.
- Carey PR. (2006). Raman crystallography and other biochemical applications of Raman microscopy. *Annual Review. of Physical Chemistry*, 57: 527-554. doi: 10.1146/annurev.physchem.57.032905.104521.
- Chang X, Hang X, Xue Y, Li J, Zou L, Tang M. (2019). Potential health impact of environmental micro - and nanoplastics pollution. *Journal of Applied Toxicology*, 40(1): 4-15. doi: 10.1002/jat.3915.
- Chen H, Chen H, Nan S, Liu H, Chen L, Yu L. (2022). Investigation of microplastics in digestion system: effect on surface microstructures and probiotics. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 109(5): 882–892. doi: 10.1007/s00128-022-03571-x.
- Chen Z, Hay JN, Jenkins MJ. (2013). The thermal analysis of poly (ethylene

- terephthalate) by FTIR spectroscopy. *Thermochimica Acta*, 552: 123–130. doi: 10.1016/j.tca.2012.11.002.
- Chiu H, Xia T, Lee Y, Chen C, Tsai J, Wang Y. (2014). Cationic polystyrene nanospheres induce autophagic cell death through the induction of endoplasmic reticulum stress. *Nanoscale*, 7(2): 736-746. doi: 10.1039/c4nr05509h.
- Clark NJ, Khan FR, Mitrano DM, Boyle D, Thompson C. (2022). Demonstrating the translocation of nanoplastics across the fish intestine using palladium-doped polystyrene in a salmon gut-sac. *Environment International*, 159: 106994. doi: 10.1016/j.envint.2021.106994.
- Çobanoğlu H, Belivermiş M, Sıkdokur E, Kılıç Ö, Çayır A. (2021). Genotoxic and cytotoxic effects of polyethylene microplastics on human peripheral blood lymphocytes. *Chemosphere*, 272: 129805. doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.129805.
- Cole M. (2016). A novel method for preparing microplastic fibers. *Scientific Reports*, 6: 34519. doi: 10.1038/srep34519.
- Cornu R, Béduneau A, Martin H. (2022). Ingestion of titanium dioxide nanoparticles: a definite health risk for consumers and their progeny. *Archives of Toxicology*, 96: 2655–2686 doi: 10.1007/s00204-022-03334-x.
- Cortés C., Domenech J, Salazar M, Pastor S, Marcos R, Hernández A. (2020). Nanoplastics as a potential environmental health factor: Effects of polystyrene nanoparticles on human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Environmental Science: Nano*, 7(1): 272–285. doi: 10.1039/c9en00523d.
- Davranche M, Veclin C, Pierson-Wickmann AC, El Hadri H, Grassl B, Rowenczyk L, Dia A, Ter Halle A, Blancho F, Reynaud S, Gigault J. (2019). Are nanoplastics able to bind significant amount of metals? The lead example. *Environmental Pollution*, 249: 940–948. doi: 10.1016/j.envpol.2019.03.087.
- Domenech J, Cortés C, Vela L, Marcos R, Hernández A. (2021). Polystyrene nanoplastics as carriers of metals. interactions of polystyrene nanoparticles with silver nanoparticles and silver nitrate, and their effects on human intestinal Caco-2 cells. *Biomolecules*, 11: 859-877. doi: 10.3390/biom11060859.
- Domenech J, Hernández A, Rubio L, Marcos R, Cortés C. (2020). Interactions of polystyrene nanoplastics with *in vitro* models of the human intestinal barrier. *Archives*

- of Toxicology*, 94 (9): 2997–3012. doi: 10.1007/s00204-020-02805-3.
- Dugershaw BB, Aengenheister L, Hansen SSK, Hougaard KS, Buerki-Thurnherr T. (2020). Recent insights on indirect mechanisms in developmental toxicity of nanomaterials. *Particle and Fibre Toxicology*, 17 (1): 1–22. doi: 10.1186/s12989-020-00359-x.
- Ebrahimi P, Abbasi S, Pashaei R, Bogusz A, Oleszczu P. (2022). Investigating impact of physicochemical properties of microplastics on human health: A short bibliometric analysis and review. *Chemosphere*, 289: 133146. doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.133146.
- Fedi A, Vitale C, Ponschin G, Ayehunie S, Fato M, Scaglione S. (2021). *In vitro* models replicating the human intestinal epithelium for absorption and metabolism studies: A systematic review. *Journal of Controlled Release*, 335: 247–268. doi: 10.1016/j.jconrel.2021.05.028.
- Forte M, Iachetta G, Tussellino M, Carotenuto R, Prisco M, De Falco M, Laforgia V, Valiante S. (2016). Polystyrene nanoparticles internalization in human gastric adenocarcinoma cells. *Toxicology in Vitro*, 31: 126–136. doi: 10.1016/j.tiv.2015.11.006.
- Fournier E, Etienne-Mesmin L, Grootaert C, Jelsbak L, Syberg K, Blanquet-Diot S, Mercier-Bonin, M. (2021). Microplastics in the human digestive environment: A focus on the potential and challenges facing *in vitro* gut model development. *Journal of Hazardous Materials*, 415: 125632. doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.125632.
- Gangadoo S, Owen S, Rajapaksha P, Plaisted K, Cheeseman S, Haddara H, Truong VK, Ngo ST, Vu, VV, Cozzolino D, Elbourne A, Crawford R, Latham K, Chapman J. (2020). Nano-plastics and their analytical characterisation and fate in the marine environment: From source to sea. *Science of the Total Environment*, 732: 138792. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.138792.
- Gao Z, Wontor K, Cizdziel JV. (2022). Labeling microplastics with fluorescent dyes for detection, recovery, and degradation experiments. *Molecules*, 27: 7415. doi: 10.3390/molecules27217415.
- Gigault J, Baudrimont M, Pascal P. (2018). Current opinion: What is a nanoplastic?. *Environmental Pollution*, 235: 1030-1034. doi: 10.1016/j.envpol.2018.01.024.

- Godoy V, Martínez A, Martín A, Vellido J, Calero M, Blázquez G. (2020). Microplastics as vectors of chromium and lead during dynamic simulation of the human gastrointestinal tract. *Sustainability*, 12(11): 4792. doi:10.3390/su12114792.
- Gouin T, Avalos J, Brunning I, Brzuska K, Graaf JDe, Kaumanns J, Koning T, Meyberg M, Rettinger, K, Schlatter H, Thomas J, Welie R, Van Wolf T. (2015). Use of microplastic beads in cosmetic products in Europe and their estimated emissions to the North sea environment. *SOFW Journal*, 141: 40–46.
- Guarnieri D, Sánchez-Moreno P, Del Rio Castillo AE, Bonaccorso F, Gatto F, Bardi G, Martín C, Vázquez E, Catelani T, Sabella S, Pompa PP. (2018). Biotransformation and biological interaction of graphene and graphene oxide during simulated oral ingestion. *Small*, 14 (24): 1800227. doi:10.1002/sml.201800227.
- Hartmann NB, Hu T, Thompson RC, Hassello M, Verschoor A, Daugaard AE, Rist S, Karlsson T, Brennholt N, Cole M, Herrling MP, Hess MC, Ivleva NP, Lusher AL, Wagner M. (2019). Are we speaking the same language ? Recommendations for a definition and categorization framework for plastic debris. *Environmental. Science and Technology*, 53 (3): 1039–1047. doi: 10.1021/acs.est.8b05297.
- Hasnain M, Munir N, Abideen Z, Dias DA, Aslam F, Mancinelli R. (2023). Applying silver nanoparticles to enhance metabolite accumulation and biodiesel production in new algal resources. *Agriculture (Switzerland)*, 13(1): 73. doi: 10.3390/agriculture13010073.
- He Y, Li J, Chen J, Miao X, Li G, He Q, Xu H, Li H, Wei Y. (2020). Cytotoxic effects of polystyrene nanoplastics with different surface functionalization on human HepG2 cells. *Science of the Total Environment*, 723: 138180. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.138180.
- Hesler M, Aengenheister L, Ellinger B, Drexel R, Straskraba S, Jost C, Wagner S, Meier F, von Briesen H, Büchel C, Wick P, Buerki-Thurnherr T, Kohl Y. (2019). Multi-endpoint toxicological assessment of polystyrene nano- and microparticles in different biological models *in vitro*. *Toxicology in Vitro*, 61: 104610. doi: 10.1016/j.tiv.2019.104610.
- Holmes LA, Turner A, Thompson RC. (2012). Adsorption of trace metals to plastic resin pellets in the marine environment. *Environmental Pollution*, 160: 42–48.

- doi:10.1016/j.envpol.2011.08.052.
- Holmes LA, Turner A, Thompson RC. (2014). Interactions between trace metals and plastic production pellets under estuarine conditions. *Marine Chemistry*, 167: 25–32. doi: 10.1016/j.marchem.2014.06.001.
- Hong PP, Boerio FJ, Clarson SJ, Smith SD. (1991). An investigation of the interdiffusion of polystyrene and deuterated polystyrene using surface-enhanced Raman scattering. *Macromolecules*, 24(17): 4770–4776. doi: 10.1021/ma00017a007.
- Jiang B, Kauffman AE, Li L, McFee W, Cai B, Weinstein J, Lead JR, Chatterjee S, Scott GI, Xiao S. (2020). Health impacts of environmental contamination of micro- and nanoplastics: A review. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 25 (1): 25-29. doi: 10.1186/s12199-020-00870-9.
- Jiang X, Weise S, Hafner M, Ro C. (2010). Quantitative analysis of the protein corona on FePt nanoparticles formed by transferrin binding. *Journal of the Royal Society Interface*, 7: 5-13. doi:10.1098/rsif.2009.0272.focus.
- Joksimovic N, Selakovic D, Jovicic N, Jankovic N, Pradeepkumar P, Eftekhari A, Rosic G. (2022). Nanoplastics as an invisible threat to humans and the environment. *Journal of Nanomaterials*, 22: 6707819. doi: 10.1155/2022/6707819.
- Karakolis EG, Nguyen B, You JB, Rochman CM, Sinton D. (2019). Fluorescent dyes for visualizing microplastic particles and fibers in laboratory-based studies. *Environmental Science and Technology Letters*, 6(6): 334–340. doi: 10.1021/acs.estlett.9b00241.
- Kleinteich J, Seidensticker S. (2018). Microplastics reduce short-term effects of environmental contaminants . Part II : Polyethylene particles decrease the effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on microorganisms. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 15(2): 287. doi: 10.3390/ijerph15020287.
- Koner S, Florance I, Mukherjee A, Chandrasekaran N. (2023). Cellular response of THP-1 macrophages to polystyrene microplastics exposure. *Toxicology*, 483: 153385. doi: 10.1016/j.tox.2022.153385.
- Kumar R, Manna C, Padha S, Verma A, Sharma P, Dhar A, Ghosh A, Bhattacharya P. (2022). Micro(nano)plastics pollution and human health: How plastics can induce carcinogenesis to humans?. *Chemosphere*, 298: 134267. doi:

- 10.1016/j.chemosphere.2022.134267
- Johnson L, Mecham J, Krovi S, Moreno M, Aravamudhan S, Kovach A, Fennell T, Mortensen N. (2021). Fabrication of polyethylene terephthalate (PET) nanoparticles with fluorescent tracers for studies in mammalian cells. *Nanoscale Advances*, 3: 339–346. doi: 10.1039/d0na00888e.
- Lanctôt CM, Al-sid-cheikh M, Catarino AI, Cresswell T, Danis B, Karapanagioti HK, Mincer T, Oberhänsli F, Swarzenski P, Tolosa I, Metian M. (2018). Application of nuclear techniques to environmental plastics research. *Journal of Environmental Radioactivity*, 192: 368–375. doi: 10.1016/j.jenvrad.2018.07.019.
- Legan F, Rosal R, Verd I, González M, Fern F. (2021). Microplastics can act as vector of the biocide triclosan exerting damage to freshwater microalgae. *Chemosphere*, 266: 129193. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.129193.
- Lehner R, Weder C, Petri-Fink A, Rothen-Rutishauser B. (2019). Emergence of nanoplastic in the environment and possible impact on human health. *Environmental Science and Technology*, 53(4): 1748–1765. doi: 10.1021/acs.est.8b05512.
- Li B, Zhang T, Tang M. (2022). Toxicity mechanism of nanomaterials: Focus on endoplasmic reticulum stress. *Science of the Total Environment*, 834: 155417. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.155417.
- Li J, Zhang K, Zhang H. (2018). Adsorption of antibiotics on microplastics. *Environmental Pollution*, 237: 460–467. doi: 10.1016/j.envpol.2018.02.050.
- Liao Y, Yang J. (2020). Microplastic serves as a potential vector for Cr in an *in-vitro* human digestive model. *Science of the Total Environment*, 703: 134805. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.134805.
- Lim SL, Ng CT, Zou L, Lu Y, Chen J, Bay BH, Shen HM, Ong CN. (2019). Targeted metabolomics reveals differential biological effects of nanoplastics and nano ZnO in human lung cells. *Nanotoxicology*, 13(8): 1117–1132. doi: 10.1080/17435390.2019.1640913.
- Liu S, Wu X, Gu W, Yu J, Wu B. (2020). Influence of the digestive process on intestinal toxicity of polystyrene microplastics as determined by *in vitro* Caco-2 models. *Chemosphere*, 256: 127204. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.127204.
- Llorca M, Farré M. (2021). Current insights into potential effects of micro-nanoplastics on

- human health by *in vitro* tests. *Frontiers in Toxicology*, 3: 752140. doi: 10.3389/ftox.2021.752140.
- Lu S, Zhu K, Song W, Song G, Chen D, Hayat T, Alharbi NS, Chen C, Sun Y. (2018). Impact of water chemistry on surface charge and aggregation of polystyrene microspheres suspensions. *Science of the Total Environment*, 630: 951–959. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.02.296.
- Magri D, Sánchez-Moreno P, Caputo G, Gatto F, Veronesi M, Bardi G, Catelani T, Guarnieri D, Athanassiou A, Pompa PP, Fragouli D. (2018). Laser ablation as a versatile tool to mimic polyethylene terephthalate nanoplastic pollutants: Characterization and toxicology assessment. *ACS Nano*, 12(8): 7690–7700. doi: 10.1021/acsnano.8b01331.
- Mahler GJ, Shuler ML, Glahn RP. (2009). Characterization of Caco-2 and HT29-MTX cocultures in an *in vitro* digestion/cell culture model used to predict iron bioavailability. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 20(7): 494–502. doi: 10.1016/j.jnutbio.2008.05.006.
- Maiti NC, Apetri MM, Zagorski MG, Carey PR, Anderson VE. (2004). Raman spectroscopic characterization of secondary structure in natively unfolded proteins: α -synuclein. *Journal of the American Chemical Society*, 126(8): 2399–2408. doi: 10.1021/ja0356176.
- Malafaia G, Marinho T, Ahmed M, Ahmed I, Karthi S, Pereira A. (2022). When toxicity of plastic particles comes from their fluorescent dye: a preliminary study involving neotropical *Physalaemus cuvieri* tadpoles and polyethylene microplastics. *Journal of Hazardous Materials Advances*, 6: 100054. doi:10.1016/j.hazadv.2022.100054.
- Matxinandiarena E, Múgica A, Zubitur M, Yus C, Sebastián V, Irusta S, Loaeza AD, Santana O, Maspoc, ML, Puig C, Müller AJ. (2019). The effect of titanium dioxide surface modification on the dispersion, morphology, and mechanical properties of recycled PP/PET/TiO₂ PBNANOs. *Polymers*, 11(10): 1692. doi:10.3390/polym11101692.
- Mazilu M, De Luca AC, Riches A, Herrington CS, Dholakia K. (2010). Optimal algorithm for fluorescence suppression of modulated Raman spectroscopy. *Optics Express*, 18(11): 11382. doi: 10.1364/oe.18.011382.

- Mitrano DM, Beltzung A, Frehland S, Schmiedgruber M, Schmidt F. (2019). Synthesis of metal-doped nanoplastics and their utility to investigate fate and behavior in complex environmental systems. *Nature Nanotechnology*, 14(4): 362–368. doi: 10.1038/s41565-018-0360-3.Synthesis.
- Mitrano D, Wick P, Nowack B. (2021). Placing nanoplastics in the context of global plastic pollution. *Nature Nanotechnology*, 16(5): 491–500. doi: 10.1038/s41565-021-00888-2.
- Nanna B, Søgaaard LH, Schmidt N. (2017). Microplastics as vectors for environmental contaminants: exploring sorption, desorption, and transfer to biota microplastics as vectors for environmental contaminants. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 13(3): 488-493. doi: 10.1002/ieam.1904.
- Nanogenotox.2011.http://www.nanogenotox.eu/files/PDF/Deliverables/nanogenotox%20755deliverable%203_wp4_%20dispersion%20protocol.pdf.
- Nava V, Frezzotti ML, Leoni B. (2021). Raman spectroscopy for the analysis of microplastics in aquatic systems. *Applied Spectroscopy*, 75: 1341-1357. doi: 10.1364/AS.75.001341.
- Nguyen B, Tufenkji N. (2021). Single-particle resolution fluorescence microscopy of nanoplastics. *Environmental Science and Technology*, 56(10): 6426–6435. doi: 10.1021/acs.est.1c08480.
- Noda LK, Sala O. (2000). Resonance Raman investigation on the interaction of styrene and 4-methyl styrene oligomers on sulphated titanium oxide. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 56(1): 145–155. doi: 10.1016/S1386-1425(99)00128-6.
- OECD (2022), Global Plastics Outlook: Economic Drivers, Environmental Impacts and Policy Options, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/de747aef-en>.
- Paget V, Dekali S, Kortulewski T, Grall R, Gamez C. (2015). Specific uptake and genotoxicity induced by polystyrene nanobeads with distinct surface chemistry on human lung epithelial cells and macrophages. *Plos One*, 10(4): e0123297. doi: 10.1371/journal.pone.01232971–20.
- Patrício AL, Prata JC, Walker TR, Duarte AC, Ouyang W, Barcelò D, Rocha-Santos T. (2021). Increased plastic pollution due to COVID-19 pandemic: Challenges and

- recommendations. *Chemical Engineering Journal*, 405: 126683. doi: 10.1016/j.cej.2020.126683.
- Paul MB, Stock V, Cara-Carmona J, Lisicki E, Shopova S, Fessard V, Braeuning A, Sieg H., Böhmert L. (2020). Micro- and nanoplastics-current state of knowledge with the focus on oral uptake and toxicity. *Nanoscale Advances*, 2(10): 4350–4367. doi: 10.1039/d0na00539h.
- PlasticsEurope, (2020). Plastics- the facts 2020. <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2020/>.
- PlasticsEurope, (2022). Plastics- the facts 2022: an analysis of European plastics production, demand and waste data. <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2022/>.
- Poma A, Vecchiotti G, Colafarina S, Zarivi O, Aloisi M, Arrizza L, Chichiriccò G, Di Carlo P. (2019). *In vitro* genotoxicity of polystyrene nanoparticles on the human fibroblast hs27 cell line. *Nanomaterials*, 9(9): 1299. doi: 10.3390/nano9091299.
- Quezada-Maldonado EM, Sánchez-Pérez Y, Chirino YI, García-Cuellar CM. (2021). Airborne particulate matter induces oxidative damage, DNA adduct formation and alterations in DNA repair pathways. *Environmental Pollution*, 287: 117313. doi: 10.1016/j.envpol.2021.117313.
- Ragusa A, Svelato A, Santacroce C, Catalano P, Notarstefano V, Carnevali O, Papa F, Ciro M, Rongioletti A, Baiocco F, Draghi S, Amore ED, Rinaldo D, Matta M, Giorgini E. (2021). Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta. *Environment International*, 146: 106274. doi: 10.1016/j.envint.2020.106274.
- Rochman CM, Hentsche BT, The SJ. (2014). Long-term sorption of metals is similar among plastic types: implications for plastic debris in aquatic environments. *Plos One*, 9(1): e85433. doi: 10.1371/journal.pone.0085433.
- Rodríguez-Hernández AG, Muñoz-Tabare JA, Aguilar-Guzmán JC, Vazquez-Duhalt R. (2019). A novel and simple method for polyethylene terephthalate (PET) nanoparticle production. *Environmental Science: Nano*, 6(7): 2031–2036. doi: 10.1039/c9en00365g.
- Rubio L, Barguilla I, Domenech J, Marcos R, Hernández A. (2020). Biological effects, including oxidative stress and genotoxic damage, of polystyrene nanoparticles in

- different human hematopoietic cell lines. *Journal of Hazardous Materials*, 398: 122900. doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.122900.
- Rubio L, Marcos R, Hernández A. (2020). Potential adverse health effects of ingested micro- and nanoplastics on humans. Lessons learned from *in vivo* and *in vitro* mammalian models. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews*, 23(2): 51–68. doi: 10.1080/10937404.2019.1700598.
- Rygula A, Majzner K, Marzec KM, Kaczor A, Pilarczyk M, Baranska M. (2013). Raman spectroscopy of proteins: A review. *Journal of Raman Spectroscopy*, 44(8): 1061–1076. doi: 10.1002/jrs.4335.
- Saffert BA, Pieper G, Jetten J. (2006). Effect of package light transmittance on the vitamin content of pasteurized whole milk. *Packaging Technology and Science*, 19: 211–218. doi: 10.1002/pts.724.
- Schirizzi GF, Pérez-Pomeda I, Sanchís J, Rossini C, Farré M, Barceló D. (2017). Cytotoxic effects of commonly used nanomaterials and microplastics on cerebral and epithelial human cells. *Environmental Research*, 159: 579–587. doi: 10.1016/j.envres.2017.08.043.
- Schröter L, Ventura N. (2022). Nanoplastic toxicity: insights and challenges from experimental model systems. *Small*, 18(31): e2201680. doi: 10.1002/smll.202201680.
- Sears WM, Hunt JL, Stevens JR. (1981). Raman scattering from polymerizing styrene. 1 Vibrational-mode analysis. *Journal of Chemistry and Physics*. 75: 1589-1598. doi: 10.1063/1.442262.
- Shams M, Alam I, Chowdhury I. (2020). Aggregation and stability of nanoscale plastics in aquatic environment. *Water Research*, 171: 115401. doi: 10.1016/j.watres.2019.115401.
- Shi Q, Tang J, Liu R, Wang L. (2021). Toxicity *in vitro* reveals potential impacts of microplastics and nanoplastics on human health: A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 52(21), 1–33. doi: 10.1080/10643389.2021.1951528.
- Singh N, Bhagat J, Tiwari E, Khandelwal N, Darbha GK, Shyama SK. (2021). Metal oxide nanoparticles and polycyclic aromatic hydrocarbons alter nanoplastic's stability and

- toxicity to zebrafish. *Journal of Hazardous Materials*, 407: 124382. doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.124382.
- Sielecki AR, Fedorov AA, Boodhoo A, Andreeva NS, James MNG. (1990). Molecular and crystal-structures of monoclinic porcine pepsin refined at 1.8-Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 214: 143-170. doi: 10.1016/0022-2836(90)90153-D.
- Stock V, Böhmert L, Lisicki E, Block R, Cara-Carmona J, Pack LK, Selb R, Lichtenstein D, Voss L, Henderson CJ, Zabinsky E, Sieg H, Braeuning A, Lampen A. (2019). Uptake and effects of orally ingested polystyrene microplastic particles *in vitro* and *in vivo*. *Archives of Toxicology*, 93(7): 1817–1833. doi: 10.1007/s00204-019-02478-7.
- Stock V, Fahrenson C, Thuenemann A, Dönmez MH, Voss L, Böhmert L, Braeuning A, Lampen A, Sieg H. (2020). Impact of artificial digestion on the sizes and shapes of microplastic particles. *Food and Chemical Toxicology*, 135: 111010. doi: 10.1016/j.fct.2019.111010.
- Tamargo A, Molinero N, Reinoso JJ, Rodríguez VA. (2022). PET microplastics affect human gut microbiota communities during simulated gastrointestinal digestion, first evidence of plausible polymer biodegradation during human digestion. *Scientific Reports*, 12: 528. doi: 10.1038/s41598-021-04489-w.
- Tavakolpournegari A, Annangi B, Villacorta A, Banaei G, Martin J, Pastor S, Marcos R, Hernández A. (2023). Hazard assessment of different-sized polystyrene nanoplastics in hematopoietic human cell lines. *Chemosphere*, 325: 138360. doi: 10.1016/j.chemosphere.2023.138360.
- Teuten EL, Saquing JM, Knappe DRU, Rowland SJ, Barlaz MA, Jonsson S, Bjo A, Thompson RC, Galloway TS, Yamashita R, Ochi D, Watanuki Y, Moore C, Viet PH, Tana TS. (2009). Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 364: 2027–2045. doi: 10.1098/rstb.2008.0284.
- Tramis O, Garnier C, Yus C, Irusta S, Chabert F. (2021). Enhancement of the fatigue life of recycled PP by incorporation of recycled opaque PET collected from household milk bottle wastes. *Waste Management*, 125: 49–57. doi: 10.1016/j.wasman.2021.02.006.
- Turner A, Holmes L. (2015). Adsorption of trace metals by microplastic pellets in fresh

- water. *Environmetal Chemistry*, 12(5): 600-610. doi: 10.1071/EN14143.
- Turner A. (2021). Hazardous metal additives in plastics and their environmental impacts. *Environment International*, 156: 106622. doi: 10.1016/j.envint.2021.106622.
- Vales G, Rubio L, Marcos R. (2015). Long-term exposures to low doses of titaniumx dioxide nanoparticles induce cell transformation, but not genotoxic damage in BEAS-2B cells. *Nanotoxicology*, 9(5): 568–578. doi: 10.3109/17435390.2014.957252.
- Velez JFM, Shashoua Y, Syberg K, Khan FR. (2018). Considerations on the use of equilibrium models for the characterisation of HOC-microplastic interactions in vector studies. *Chemosphere*, 210: 359–365. doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.07.020.
- Vila L, Marcos R, Hernández A. (2017). Long-term effects of silver nanoparticles in Caco-2 cells. *Nanotoxicology*, 11(6): 771–780. doi: 10.1080/17435390.2017.1355997.
- Villacorta A, Rubio L, Alaraby M, López-Mesas M, Fuentes-Cebrian V, Moriones OH, Marcos R, Hernández A. (2022). A new source of representative secondary PET nanoplastics. Obtention, characterization, and hazard evaluation. *Journal of Hazardous Materials*, 439: 129593. doi: 10.1016/j.jhazmat.2022.129593.
- Walczak AP, Kramer E, Hendriksen PJM, Helsdingen R, Van Der Zande M, Rietjens I, Bouwmeester H. (2015). *In vitro* gastrointestinal digestion increases the translocation of polystyrene nanoparticles in an *in vitro* intestinal co-culture model. *Nanotoxicology*, 9(7): 886–894. doi: 10.3109/17435390.2014.988664.
- Wang L, Wang Y, Xu M, Ma J, Zhang S, Liu S, Wang K, Tian H, Cui J. (2020). Enhanced hepatic cytotoxicity of chemically transformed polystyrene microplastics by simulated gastric fluid. *Journal of Hazardous Materials*, 410: 124536. doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.124536
- Wang T. (2019). Nanoparticles : current understanding and future directions. *Nanoscale*, 11: 11048. doi: 10.1039/c9nr03025e.
- Wang W, Gao H, Jin S, Li R, Na G. (2019). The ecotoxicological effects of microplastics on aquatic food web, from primary producer to human: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 173: 110–117. doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.01.113.
- Wang YL, Lee YH, Chiu IJ, Lin YF, Chiu HW. (2020). Potent impact of plastic nanomaterials and micromaterials on the food chain and human health. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5): 1727. doi: 10.3390/ijms21051727.

- Wright SL, Kelly FJ. (2017). Plastic and human health: a micro issue? *Environmental Science and Technology*, 51(12): 6634–6647. doi: 10.1021/acs.est.7b00423.
- Wu B, Wu X, Liu S, Wang Z, Chen L. (2019). Size-dependent effects of polystyrene microplastics on cytotoxicity and efflux pump inhibition in human Caco-2 cells. *Chemosphere*, 221: 333–341. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.01.056.
- Xu JL, Lin X, Wang JJ, Gowen AA. (2022). A review of potential human health impacts of micro- and nanoplastics exposure. *The Science of the Total Environment*, 851: 158111. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.158111.
- Yan W, Hamid N, Deng S, Jia PP, Pei DS. (2020). Individual and combined toxicogenetic effects of microplastics and heavy metals (Cd, Pb, and Zn) perturb gut microbiota homeostasis and gonadal development in marine medaka (*Oryzias melastigma*). *Journal of Hazardous Materials*, 397: 122795. doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.122795.
- Yee MSL, Hii LW, Looi CK, Lim WM, Wong SF, Kok YY, Tan BK, Wong CY, Leong CO. (2021). Impact of microplastics and nanoplastics on human health. *Nanomaterials*, 11(2): 1–23. doi: 10.3390/nano11020496.
- Younes M, Aquilina G, Castl L, Engel K, Fowler P, Gundert-Remy U, Rainer G, Husøy T, Jose M, Fernandez F, Peter F, Manco M, Mennes W, Moldeus P, Passamonti S, Shah R, Corsini E, Cubadda F, Groot DDe, Wright M. (2021). Safety assessment of titanium dioxide (E171) as a food additive. *EFSA Journal*, 19: 13463. doi: 0.2903/j.efsa.2021.6585.
- Yu F, Yang C, Zhu,Z, Bai X, Ma J. (2019). Adsorption behavior of organic pollutants and metals on micro/nanoplastics in the aquatic environment. *Science of the Total Environment*, 694: 133643. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.133643.
- Zhang YX, Wang M, Yang L, Pan K, Miao AJ. (2022). Bioaccumulation of differently-sized polystyrene nanoplastics by human lung and intestine cells. *Journal of Hazardous Materials*, 439: 129585. doi: 10.1016/j.jhazmat.2022.129585.
- Zhu F, Zhu C, Wang C, Gu C. (2019). Occurrence and ecological impacts of microplastics in soil systems: a review. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 102(6): 741–749. doi: 10.1007/s00128-019-02623-z.

7. ANEXOS

7. ANEXOS

7.1. Alternatives for Fluorescent Nanoplastic labelling for biological applications with focus on time optimization & True to life MNPLs tracking

Borrador del artículo científico que está siendo desarrollado en colaboración dentro del Grupo: Alternatives for Fluorescent Nanoplastic labelling for biological applications with focus on time optimization & True to life MNPLs tracking

Aliro Villacorta ^{a,b}, Montserrat López-Mesas ^c, Victor Fuentes-Cebrian ^c, Lourdes Vela ^{a,d}, Michelle Morataya ^a, Ricard Marcos ^{a,*}, Alba Hernández ^a

^a *Group of Mutagenesis, Department of Genetics and Microbiology, Faculty of Biosciences, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Spain.*

^b *Facultad de Recursos Naturales Renovables, Universidad Arturo Prat, Iquique, Chile.*

^c *GTS-UAB Research Group, Department of Chemistry, Faculty of Science, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Cerdanyola del Vallès, Spain.*

^d *Faculty of Health Sciences Eugenio Espejo, Universidad UTE, Quito, Ecuador.*

^e *Institut Català de Nanociència i Nanotecnologia (ICN2-UAB-CSIC-BIST), Campus UAB, Bellaterra, 08193 Barcelona, Spain.*

INTRODUCTION

Production of synthetic organic polymers at large scale can be traced back to the 50's. Plastic production has increased progressively and steadily and even though there are policies that tend to reduce it, to date it is difficult to imagine how this reality could change in the near future. It is equally difficult to imagine that due to degradation processes, whether chemical, physical or biological, and therefore the logical steps from macro (MaPLs) to meso (MeNPLs), from meso to micro (MPLs) that are defined as fragments ranging from 5 cm to 1 µm and from micro to nanoplastics (NPLs) which definition is still a matter of discussion as well as how this could be harmless to human health specially

when characteristics as their ability to trespass biological barriers and the fact that toxicity has been previously reported.

The last two mentioned types of pollutants have gained awareness in the last decades, which is reflected on the numbers of research and publications due not only to their intrinsic possible toxicity and properties but also to the possibility of acting as carriers for other pollutant from different origins. With this reality it comes big challenges, mainly since NPLs have been and still are difficult to detect, track and characterize not only at environmental, but also at organismal, organ, tissue, cellular or even subcellular level. This not only due to the logical size limitation derived from the physical barriers of traditional light-based microscopy methods but also due to the carbon-based backbone composition of the polymers. There are two main types of fluorescent particles used for biological applications mainly focussed on internalization experiments: fluorescent labelled particles and fluorescent dyed particles, which differentiate in the moment where the fluorescence is added and the type of interaction between the particle and fluorophore. Fluorescent labelled particles are synthesized in-situ with the fluorophore which creates strong bonds between both compounds, ensuring a high stability of the particle fluorescence and no leaching but scarce in matter of material variety and size range. On the other hand, fluorescent dyed particles are put in contact with a fluorescent component, dye, or optical brightener, which is weakly bonded to the particle by adsorption, in case of low temperature methods, or absorbed, in case of high temperature methods, which offer the possibility of dying any type of material and size range of NPLs needed. For the purposes of this article both terms will be used indistinctly.

Nevertheless, there is a lack of harmonized and established protocols for NPLs staining which leads to a lack of coherence and comparability between research results. Therefore, this study presents a protocol of NPLs staining for cell internalization studies.

Materials and Methods

Reagents and standards

Latex polystyrene spheres PSNPLs were obtained from FEDELCO S.I. Madrid, Spain. The standard nanospheres had SEM/TEM certified size of 170 ± 9 nm and were provided

in 10 mL of an aqueous stabilized suspension at a concentration of 0.1% (w/v). Nile Blue A Oxazone commonly known as Nile Red (NR) and rhodamine B (RhB) were purchased on Merck KGaA (Darmstadt, Germany), Amarillo Luminoso (AL) and Opticol (O) were purchased on Colorcenter (Terrasa, Spain). IDye PolyPink (P) was purchased from Jacquard products Rupert, Gibbon & Spider, Inc. (California, USA).

Labelling solution preparation

All preparations were done by separately weighting NR, RhB, AL, O and P and then to a final concentration of 20000 ppm. NR and RhB solutions were prepared on EtOH 96% Sharlab. Barcelona, Spain. For AL, O and P, the suspensions were prepared on “Ultrapure Type 1” 18.2 mScm^{-1} water also known as Mili-Q purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany).

Labelling procedure

A fixed concentration of 40 ppm of PSNPLs were exposed to concentrations of 400, 200, 100 and 50 ppm of each of the labelling solutions diluted whether on water (AL, O and P) or 96% ethanol as previously described. Different mixtures were heated at 65 °C for 30 minutes minutes on glass vials with permanent movement on an orbital agitator at 150 rpm. Particles-stain mixtures were then cleaned performing a total of 10 ultra-centrifugations for 45 minutes at 13200 rpm. The supernatant was then separated from the pellet by decantation and then further washed were performed with Mili-Q water. For concentrations higher than 1000 ppm falcon membrane filtration using Amicon® Ultra-15 centrifugal Ultracel®-100K filter 1x10 5 MWCO Merck KGaA (Darmstadt, Germany) was performed for 15 at 3500 rpm.

Ultra-Centrifugation Optimization

To achieve the highest centrifugation efficiency, 40 ppm of not labelled PSNPLs was prepared on MiliQ water. The suspension was then ultra- centrifuged for 5, 15 30 and 45 minutes at 13200 rpm on a 5415 R Eppendorf centrifuge, Eppendorf AG. (Hamburg, Germany). A blank for the experiment with no centrifugation was used as a control.

The centrifugation yield was calculated by comparing the intensity of absorbance at 250 nm. The characteristic polystyrene wavelength with no disturbances from the not centrifuged suspension was used to compare using the following formula (equation 1). Where $A_{250\text{nm}}$, is the absorbance at 250nm.

$$\text{Centrifugation Yield (\%)} = 100 - \frac{A_{250\text{ nm}}(\text{Supernatant of Centrifugation } X \text{ min})}{A_{250\text{ nm}} 40 \text{ ppm Standard}} \cdot 100$$

Equation 1. Centrifugation Yield Equation

Membrane Centrifugation Efficiency Study

To achieve a better cleaning procedure a calibration curve was prepared using concentrations ranging from 150 ppt to 50 ppb of 50 nm PSNPLs to calculate the remaining PSNPLs presents on the eluent. Moreover, four replicates of the centrifugation procedure performed with the Amicon® Ultra-15 centrifugal Ultracel®-100K filter 1×10^5 MWCO Merck KGaA (Darmstadt, Germany), and for 15 min at 3500 rpm for 15 min. The separation yield was calculated by measuring the absorbance in the membrane eluent and interpolating in the values on the NPLs calibration curve.

Labelling and cleaning efficiency

UV-Vis spectroscopy analysis

The supernatant and resuspended pellet were analysed by UV-Vis Spectrophotometer ATI-UNICAM UV2 Analytical Technologies, Currently Thermo Fischer (Braunschweig, Germany). with the following parameters: Full Scan (190-1100nm), band width of 2nm, lamp change at 340 nm, scan rate of 1200 nm/min and a light path of 10mm.

Fluorimetry Analysis

Firstly, several concentrations of the stains were analysed to find the experimental wavelength of excitation and emission. To do so, excitation fluorimetry analysis in Cary Eclipse Agilent (California, United States of America), with the following setup: scan from 190 nm to 800 nm, excitation split of 5 nm, emission slit of 5 nm and a scan rate of 600 nm/min. Moreover, the emission fluorimetry analysis was performed with the same

parameters as the excitation analysis but the initial scan wavelength was the excitation wavelength.

To study the cleaning efficiency, the supernatant of the before-explained parameters was studied to achieve the lowest fluorescence possible. Furthermore, to study the staining efficiency the resuspended pellet of NPLs was analysed with the same conditions as before explained but the scan ranged from the excitation wavelength to 800 nm.

Confocal Fluorescence Analysis

Following the results from the fluorimetry analysis of the labelled PSNPLs. A 20 μ L drop of the 2000 ppm suspensions was placed on a previously methanol VWR Avantor® Inc. (Philadelphia , United States of America) and dried 76x26 mm microscope slide Gerhard Menzel GmbH-Thermo Scientific (Braunschweig, Germany) and covered with a 24x50 mm borosilicate cover glass VWR Avantor® Inc. (Philadelphia , United States of America). Particles were the analysed using a Leica TCS SP5 (Leica Microsystems CMS GmbH. Mannheim, Germany).

Aggregation and Resuspension Study

To ensure that the aggregation state of the stained NPLs remains useful, PSNPLs were heated at 65 °C for 45 min to later be ultra-centrifugated for 45 min at 13200 rpm a total of 10 times, reproducing the staining procedure. Later, different resuspension procedures were applied to each of the NPLs aliquot: no agitation (BC), orbital agitation (O) for 16 min at 350 rpm, vortex (V) for 16 min, ultrasonic bath (BU) for 16 min and ultrasonic probe (SU), model SSE-1 Branson sonicator, Branson Ultrasonics Co. (Brookfield, CT, USA)., at 10% of amplitud for 16 minutes in cold bath. The average size of the resuspended aliquots was analysed using a Zetasizer® Ultra from Malvern Panalytical (Cambridge, United Kingdom) to be compared with freshly prepared standard of 170 nm polystyrene nanospheres at 40 ppm (B).

In vitro evaluation and labelled particles usefulness

Cell culture

THP1 leukemic monocyte cell line (Sigma Aldrich. MO, USA) were maintained on filtered cap T-25 flasks (SPL, life sciences. Pocheon-si, Gyeonggi-do, Republic of Korea). Cellular suspensions were maintained at constant concentration ranged from 0.50×10^6 to 1.00×10^6 cells/mL at a maximum volume of 5 mL on RPMI (Roswell Park Memorial Institute) medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% glutamine (Biowest, Nuaille, France), and 2.5 $\mu\text{g/mL}$ of PlasmocinTM 226 (InvivoGen, CA, USA) at standard growing conditions of 37°C, on humidified atmosphere with 5% CO₂ (Carbueros Metálicos, Cornellà de Llobregat, Spain) on a ICO150med CO₂ incubator (Mettmert GmbH + Co KG Schwabach, Germany).

Particle, staining and percolate preparation for in vitro assays

Particles working suspensions were prepared from stocks 2000 $\mu\text{g/mL}$ at working concentrations of 200 $\mu\text{g/mL}$. Similarly, samples were prepared with no addition of PS nanoparticles, from now on only staining suspensions (OS). From the particle preparation (Membrane Centrifugation Efficiency Study), percolate was collected for each particle suspension and working solution were prepared like particle working solution and use as negative control when needed.

Cell exposition to PS-Labelled particles

From cellular stock suspension, required volume at concentrations of 1.00×10^6 cell/mL were distributed seeding 100 μL per well on U-type 96 well plate (SPL, life sciences. Pocheon-si, Gyeonggi-do, Republic of Korea). Particle working suspensions prepared as previously explained, were mixed on previously seeded cells by gently pipetting 10 times. Exposed cells were kept in same conditions as the maintenance procedure for 24 h period protected from light.

Cell viability test

Two times by triplicate, THP1 cells were exposed to 100 µg/mL of the different stained particles following the above-described procedure. Cells viability was then investigated using a 1:100 ISOFLOW dilution on a ZTM coulter counter (Beckman Coulter INC., CA. USA). Average cell count was contrasted with untreated controls and values were analysed using GraphPad Prism Software 7.0 (GraphPad, San Diego, CA) using a One-way ANOVA contrasted to both control and pristine PS treated cells. For both cases Dunnett post-test with 95% confidence interval with p values of 0.12 (ns), 0.033(*), 0.02(**), 0.01(***) was used.

Flow Cytometry

Cells treated with labelled particles and particles labelling percolate, resulting from the (Membrane Centrifugation Efficiency Study) were cultured as previously described on section (Cell viability test number). Cells on the 96 U-typeswell plates were washed twice by centrifuge at room temperature on a 5810R (Eppendorf Hamburg, Germany) and resuspend on PBS 1X. Samples were then kept on ice and immediately investigated by flow cytometry using a Cytoflex LX flow cytometer (Beckman Coulter INC., CA. USA). The setting condition were set as standard, and the array/gain of detectors can be found on S1. 5000 alive cells events were recorded at a flow rate of 60 µL/min. data was analysed and data from positive signal channels is analysed and contrasted with the controls.

Confocal Microscopy

THP1 cells treated with labelled particles and particles labelling percolate, as previously described were cultured on U-type 96 well plates for 24 h. Cells were then washed twice using 200 µL of phosphate-Buffered Saline (PBS 1X), purchased on gibco, Thermo Fischer scientific (Braunschweig, Germany). Final pellet resuspension was done on previously described pre-warmed RPMI supplemented medium, and 300 µL of cell suspension were transferred to a well on a µ-Slide, 8 well high Glass bottom, purchased on ibidi GmbH (Gräfelfing, Germany). Cells were then studied on a Leica TCS SP5 confocal microscope (Leica Microsystems CMS GmbH. Mannheim, Germany).

Compatibility was tested using CellMask™ deep red and trihydrochloride trihydrate Hoechst 3334 solution both diluted 1:10,000 for all labels except for Opticol labelled PSNPLs where the compatibility was changed to CellMask Orange and DRAQ5 all purchased on Thermo Fischer scientific (Braunschweig, Germany).

Simplified Protocol & Proof of concept

Fast Protocol

True to life MNPLs obtained as described on our previous work (Villacorta et al., 2023) were prepared following an adaptation of the hereby presented protocol. Briefly, on deem illumination, PET-Ti NPLs were labelled by mixing 0.5 mL at a concentration of 10,000 ug/mL of the nanoparticle suspension with 0.001 g of Idye PolyPink resuspended on 0.5 mL of MiliQ water on a 10 mL glass tube. Mixture was then vigorously agitated by vortex and incubated for two hours with short vortex mixture every 30 minutes on a Multi-purpose, high wattage, constant temperature digital block heater, VWR® Avantor® Inc. (Philadelphia , United States of America). Particle-Label mix was then resuspended on 9 mL of MiliQ water and transferred onto a Amicon® Ultra-15 centrifugal Ultracel®-100K filter 1x10 5 MWCO Merck KGaA (Darmstadt, Germany). A 15 min centrifugation was performed at 2,400 rcf. 9 mililiters of MiliQ water was added to the V-shape well and the wash was repeated 4 times. After the washes, a volume ranging from 100 to 160 µL containing the labelled particles was recovered from the V-shape well and then aliquoted filling to 1,000 µL and particles were maintained covered from light at 4° C degrees. Full description and detailed steps available on supplementary.

Cell culture, treatment & visualization

Immortalized, epithelial-like tumorigenic hepatic Huh-7 cell line were cultured and seeded on filtered cap T-25 flasks (SPL, life sciences. Pocheon-si, Gyeonggi-do, Republic of Korea), on Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% Fetal bovine Serum (FBS) both purchased on Biowest, France, and Plasmocin (InvivoGen, CA, USA). Then, 7,000 cells were seeded and cultured on µ-Slide 8 well high Glass bottom, purchased from ibidi GmbH (Gräfelfing, Germany) for 24 h prior to treatments. Media was removed by aspiration and replaced with 0.20 mL of freshly prepared idye-PET-Ti particle

suspension (100 µg/mL) on previously described medium, pre warmed at 37°C and incubated for 24 h at standard growing conditions of 37°C, on humidified atmosphere with 5% CO₂ (Carbueros Metálicos, Cornellà de Llobregat, Spain) on a ICO150med CO₂ incubator (Mettler GmbH + Co KG Schwabach, Germany).

After the 24 h incubation with idye-PET-Ti particle suspension, cells were washed twice with 250 µL of pre-warmed medium. 300 µL of pre-warmed medium was added to each well and the plates were investigated immediately after 5 minutes of incubation with CellMask™ deep red and trihydrochloride trihydrate Hoechst 3334 solution both diluted 1:10,000, on a Leica TCS SP5 confocal microscope (Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim, Germany).

RESULTS AND DISCUSSION

Ultracentrifugation Optimization

As expected, the results from the centrifugation showed a remarkable decrease of the characteristic absorbance of PSNPLs when the centrifugation time was increased (Figure 1), which indicated a decrease of PSNPLs present in the supernatant. Therefore, this correlates the increase in the centrifugation time with the agglomeration of PSNPLs which would increase at the same time the separation efficiency of the centrifugation.

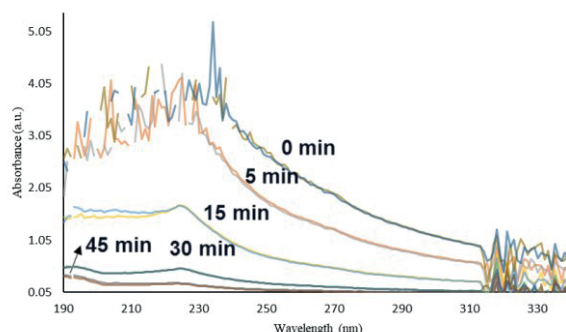


Figure 1. UV spectrum of each supernatant resulted from 0 min to 45 min of ultra-centrifugation time at 13200 rpm.

This is sound with the results shown in

, where the average intensity (Av. I) decreased as the centrifugation time increased, ranging from a 65% of average loss (Av. Loss) with a 5 min centrifugation to an 5 % average loss at 45 min of centrifugation time (t). These results agree with the previously

mentioned tendency, in which the increase of centrifugation time decreases the average loss of the particles in the supernatant. Therefore, the centrifugation time chosen to clean the stained NPLs from the free stain was 45 min.

Table 1. Centrifugation Yield at several centrifugation times

t (min)	Av. I (a.u.)	SD (a.u.)	Av. Loss (%)	SD (%)
0	2.69	0.05	100	-
5	1.79	0.02	66	1
15	0.74	0.01	27	0.5
30	0.22	0.002	8	0.1
45	0.10	0.01	4	0.4

Membrane Centrifugation Efficiency Study

The calibration curve showed a linear tendency from 125 ppb to 50 ppm. For tested values over above 50 ppm (data not shown), the absorbance at 250 nm did not have a linear behaviour or was above the detection range. The results from the 4 replicates performed with the Amicon® tubes showed an average interpolated concentration of -0.03 ± 0.4 ppm which indicate a non-significant concentration of PSNPLs in the eluent. This clearly indicates a 100% efficiency on the membrane separation. On the other hand, when the absorbance of the resuspended PSNPLs recovered from this process was studied. An average loss of $17 \pm 8\%$ is observed. Considering that particle agglomeration does not usually affect the UV spectrum., this observation may be attributed to the loss of PSNPLs stuck on the membrane or filter walls which can lead to underestimation for biological assays which may lead to underestimation of important parameters as nanoparticle internalization which compared with the inverse problem of overestimation may not be a critical issue. As a final remark, the result of membrane centrifugation study indicate that this type of separation has a high efficiency but a significant loss if the handling of the

sample is not appropriate. For the scope of this study, the membrane centrifugation is appropriate to ensure the proper cleanse of the PSNPLs free of stain, as we will observe on the biological test further on the manuscript.

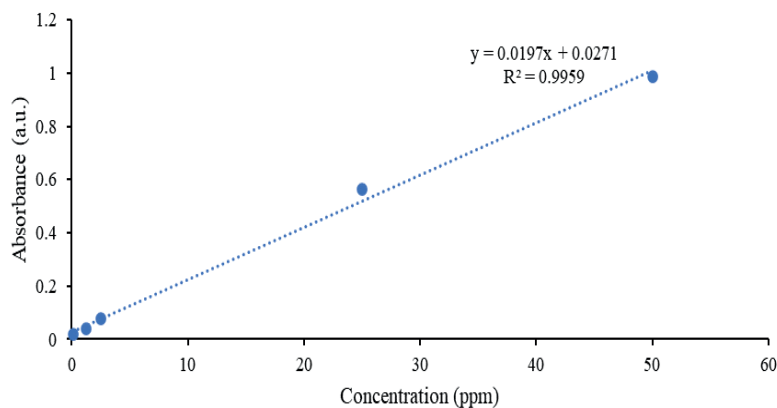


Figure 2. (a) Calibration Curve of PS Latex Nanospheres in Water by UV-Vis Spectroscopy.

UV-vis Spectroscopy analysis

The resulted supernatants of all stained PSNPLs were colourless at naked eye except for NR and RhB which presented a light red colour but as observed on figure 3a they presented absorbances at noise level when analysed by UV spectrometry. This indicates that for the previously mentioned staining conditions, the ultracentrifugation cleaning procedure is reliable, and no free stain is to be detected on in the visible spectrum or that the technique did not have enough sensitivity to detect the adsorbed concentration of the fluorophores in the PSNPLs.

Fluorimetry Analysis

Nile Red presented excitation and emission wavelength similar to previous literature reports, on the other hand, RhB excitation wavelength differs from wavelengths previously studied but 552 nm presented a significantly higher intensity at the same referenced emission wavelength and, on the other hand, none of textile stains nor the Opticol wavelengths were comparable to any references found in the literature, except for few reports presented for microplastics (kakarolis article) and the use of idye PolyPink for detection of nanoplastic articles recently published (Tavakolpournegari et al. (2023) and Annangi et al. (2023)). Moreover, regarding the fluorescence yield, the chemical stains

(NR & RhB) showed a significantly higher fluorescence intensity with a lower concentration than the textile stains and the optical brightener (Figure 3 b), which indicated that chemical stains presented a higher fluorescent yield than textile stains or Opticol. Moreover, regarding the fluorescence yield, the chemical stains showed a significantly higher fluorescence intensity with a lower concentration than the textile stains and the optical brightener (Figure 3c), which indicated that chemical stains presented a higher fluorescent yield than textile stains or Opticol. Regarding the several ratios proposed to label PSNPLs, the best ratio was the one corresponding to the highest concentration of stain (10:1), as when the 10:1 ratio was applied to the staining procedure, a significantly higher intensity in all the resuspended NPLs was observed. This increasing tendency might be due to the possibility of an adsorption process occurring between stain and nanoplastic, which would agree with a positive relation between stain concentration and nanoplastic till a plateau is reached. Therefore, it would mean that the ratio could be further increased, by an adsorption process study, in order to improve the fluorescence of the stained PSNPLs. When it comes to the fluorescence yield, the same tendency observed in the standards excitation spectra noticed in the stained NPLs (Figure 3b), in which the chemical stains shown a significantly higher fluorescence intensity (140 a.u. - 150 a.u.) compared to the highest textile stain intensity of 70 a.u. and the optical brightener intensity of 62 a.u. Finally, concerning the cleaning of the free stain, all cleaning procedures were effective as the intensity observed in the 10th wash supernatant was, at t, ten times lower than the stained NPLs intensity, all of them being under 20 a.u. (data not shown).

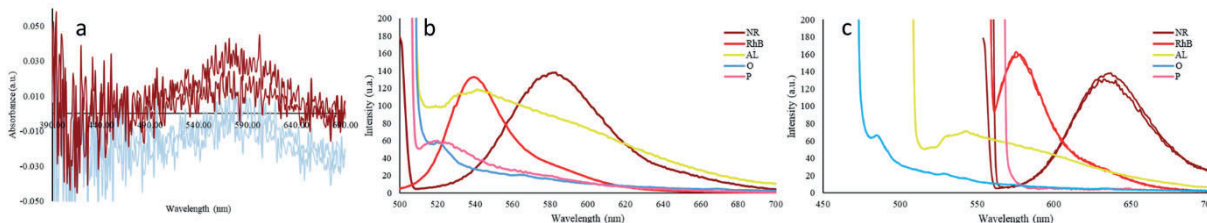


Figure 3. (a) Absorbances of supernatants after 10 water washes. (b) Excitation spectra of all the stains at 200 ppm for textile stains and optical brightener and 3.13 ppm for RhB and NR. (c) Excitation spectrum of Polystyrene Nanospheres stained at 400 ppm.

Confocal Fluorescence Analysis

As observed on Figure 4, all the fluorescent PSNPLs agglomerates were observable by confocal microscopy. Moreover, the fluorescence emission was captured on the expected wavelengths range, NR-PSNPLs presented a higher intensity compared with the other labels and a low background noise was detectable. RhB-PSNPLs showed similar fluorescent characteristics as NR-PSNPLs but with a slightly mild intensity. Same behaviour was to be observed with AL and O-PSNPLs as they present lower intensity signal but enough to work at average conditions of a regular confocal microscopy. The lower intensity signal was observable for P-PSNPLs which is sound with previous fluorescence analysis. Nevertheless, no problems were to be found to acquire a good fluorescent signal and working with more confocal optic aperture was a fast solution to this issue.

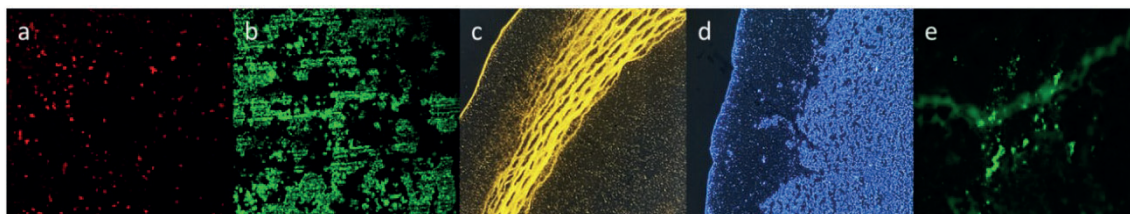


Figure 4. Confocal images for labelled PSNPLs with NR (a), RhB (b), AL (c), Opticol (d) and i-Dye Poly Pink (e).

Aggregation and Resuspension Study

The results obtained in this study, graphically represented on figure 5 a, shows that the highest number of particles in all the resuspension techniques was between 125.6 nm – 169.9 nm, which agreed with the results obtained in the blank studied by DLS and by asymmetric field flow fractionation (AF4). Taking into account the previously mentioned blanks histograms as reference of the size distribution of a non-aggregated standard, as shown in Figure 5a letter B , the resuspension treatment which had the lowest histogram size distribution deviation (Figure 5 b) was the ultrasonic probe (SU), followed, in increasing order, by the ultrasonic bath (BU), orbital (O) and vortex (V), obtaining the highest deviation the non-resuspended aliquot, the centrifugation blank (BC).

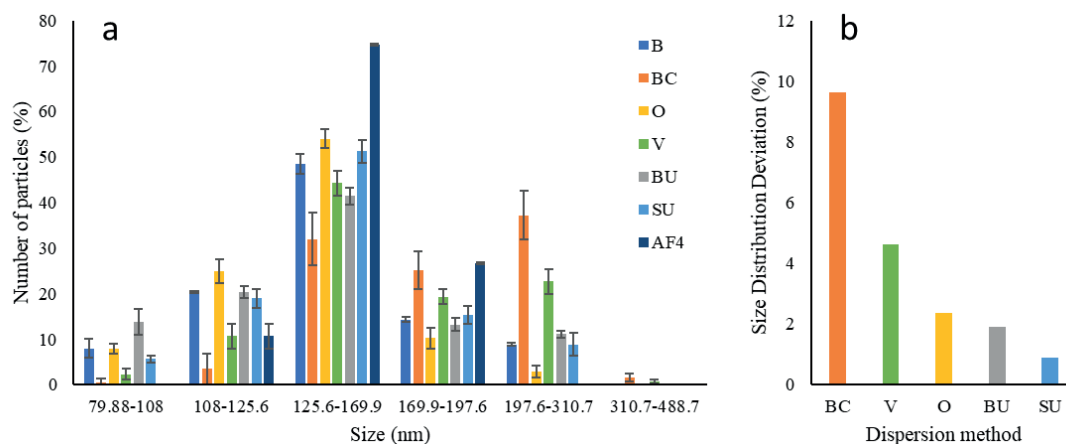


Figure 5. (a) Size distribution histogram of nanospheres diameter obtained by DLS after different resuspension treatments and by AF4 for blank. (B) Size distribution deviation expressed in percentage of the different resuspension techniques compared to the blank size distribution obtained by DLS.

Cell viability

No significant decrease on cell viability was found for any of the tested stainings. Nevertheless, the lowest variability of the data observed compared with pristine or control was to be found for Opticol (O) and i-Dye Poly Pink (P) (Figure G1). Moreover, the curve described for the cell population was far to be on regular shape (Normal distribution) compared with the control for AL staining (data not shown).

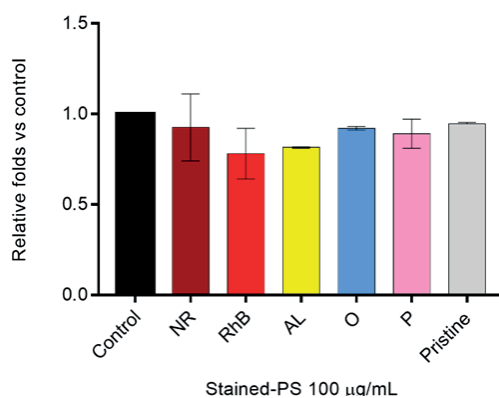


Figure 6. Cell viability for THP1 cells after 24 h exposition to stained-PS. Nile Red (NR), Rhodamine B (RhB), Amarillo Luminoso (AL), Opticol (O) and i-Dye Poly Pink (P) nanoparticles at concentrations of 100 ug/mL compared with untreated cells (Control) and treated with pristine PS.

Flow Cytometry

The population corresponding to alive THP1 cells was investigated by flow cytometry. The shifts on the histograms corresponding to each channel detailed on (S1) are to be found on S2 a to f for particles labelling percolate and g to l for particles. An overview is detailed on figure G2. Nile Red emits on the expected wavelengths, but it is also remarkable that only in the presence labelled particles a high intensity of emission can be observed at 660 and 763 nm when excited with violet beam and at 675 when excited with near UV beam. None of the other percolates produced during the particle labelling show any fluorescent signal on the experimental conditions. For AL-PSNPLs treated cells, emission was observed on all channels and the signal was never mild (less than 25%), except for NUV450 where the shift on the histogram rounded the 13%. Moreover, the shift was for more than 60% of the detectors higher than 50%. The presented data is coherent when the experiment is repeated on adherent growing HeLa cells (S3 a, b and c and summarized on d). From now on AL-NPLs suitability is compromise, not only for the cytometry data but also due to the difference on curve shape when viability was evaluated. It is also remarkable that NR-NPLs percolate can label the cells even on the absence of particles and after 10 washes plus 1 Amicon® centrifugation. This may be a major drawback when it comes to the use of this chemical stain. Even for concentrations

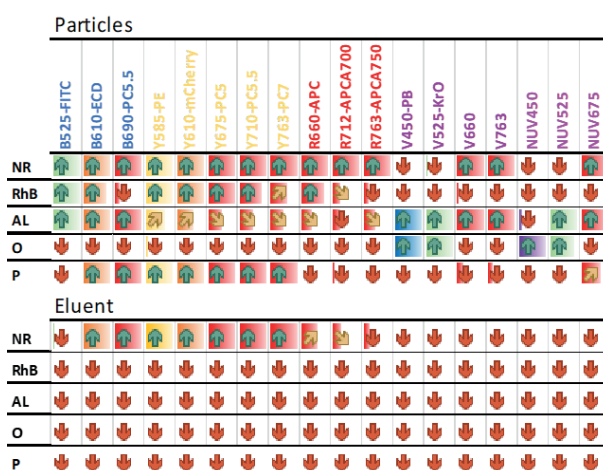


Figure 7. Percentage of shift (Channel v/s Counts) for each channel investigated for THP1 cells exposed for 24 h to labelled-PS. Nile Red (NR), Rhodamine B (RhB), Amarillo Luminoso (AL), Opticol (O) and i-Dye Poly Pink (P) nanoparticles at concentrations of 100 ug/mL compared with untreated cells (Control). Arrows indicate shifts $0 > x < 25$ (↓); $25 > x < 50$ (↯); $50 > x < 75$ (↲) and $75 > x < 100$ (↑). Colour guidance for intensity and wavelength (bar filling from 0 to 100% for each cell) is indicated on the background for each stain/laser/detector intersection.

as little as the ones on the eluent are producing interference for regular basis analysis as it is flow cytometry, therefore are considered not suitable for the scope of this study and are not to be included in further examinations.

Confocal microscopy

Internalization of labelled nanoparticles was assessed. Emission at expected wavelengths was found to be easily observed. Nevertheless, and as expected, not all the labelling were suitable for further studies. Even considering that what can be considered as background signal is to be found even on commercially available labelled NPLs Fig 3a. There is an intrinsic difficulty when it comes to the distinction of signals from small NPLs agglomerates, which, according to the hereby presented data may be perfectly the case, this may be due to the not agglomerated particles emission. In the case of NR-PSNPLs figure 3b, result particularly difficult to rely in the images, since the eluent is able to label the cells as it is shown on figure 6. Non-specific staining is not to be observed by any of the other labelling process this may be because Nile red was and is still used due to its goodness and usefulness as a vital stain backdated to 1985 (Greenspan et al., 1985), it is still used in relatively up-to-date studies (Ashrafi et al, 2003). However, since Nile Red present an excitation wavelength shifted from 450 to 560 nm by solvatochromism, it may result difficult to use for combined staining or simultaneous scanning with B- and G- excitation filters. This combined with the background signal resulting from non-specific interactions with lipophilic sites different to the lipid droplets (Tatenaka et al., 2019) may represent a concerning drawback and therefore no further experiments were carried out for this method. This concern even considering the similar way of preparation and or the similar fluorescence characteristics should not be present according to literature (Magrì, et al., 2018) and congruently is not to be observed on this study. When this characteristic was evaluated by this very same technic for PSNPLs free RhB staining for 20000 ppm, 100ppm and for the eluent, we can observe that it results on cell dead, non-specific staining, and no signal at all to be observed on figure 8: a1, a2 and a3 respectively. These last characteristics are repeated and depicted on figure 8: b1, b2 and b3 for THP1 PSNPLs free O-staining for 20000 ppm, 100ppm and for the eluent respectively. As previously explained, the only remarkable difference is due to the

compatibility of the O-PSNPLs with the regular staining, and therefore DRAQ5 and CellMask orange were to be used. It is important to notice that what seems to be enormous aggregates inside and outside the cells are observed for this procedure as observed on figure 7 d. The problems described for the last two staining, are not observed for iDye PolyPink stained PSNPLs where not only the signal of the particles is clearly observed (figure 7e) but also the direct addition of the staining even at maximum concentrations 20000 ppm produce not detectable fluorescence signal figure 8 C1, nor the dilution figure 8 C2 nor the supernatant figure 8 C3. Finally, it is clear that the addition of AL-PSNPLs at the studied concentration cause cell damage, as observed on figure 7f and therefore no further experiments were to be carried out with this labelling.

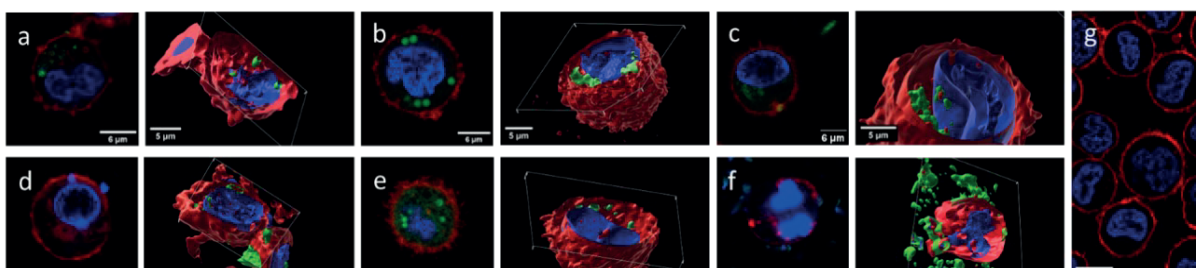


Figure 8. Confocal Images of THP1 cell exposed for 24 h to: (a) commercially available Fluorescein labelled-PS and (b) Nile Red (NR), (c) Rhodamine B (RhB), (d) Opticol, (e) i-Dye Poly Pink (P) and (f) Amarillo Luminoso (AL) NPLs at concentrations of 100 ug/mL compared with untreated cells (Control).

In Figure 9. THP1 cell were exposed for 24 h to Rhodamine B, Opticol and idye PolyPink pigments with no particles at 2000 and 20 ppm and to the eluent.

Simplified protocol for staining & proof of concept

As observed on figure 10 a1, and the 3D reconstruction 10 a2, the colocalization of signals emitted by the labelling with iDye Poly pink and the reflection the Ti both from the same composite nanoparticle are visible at the interior of Huh-7 cultured cells with neglectable background signal. With this short assay we have confirmed the goodness of the simplified protocol for labelling different kinds of polymers and how it works on different cell types.

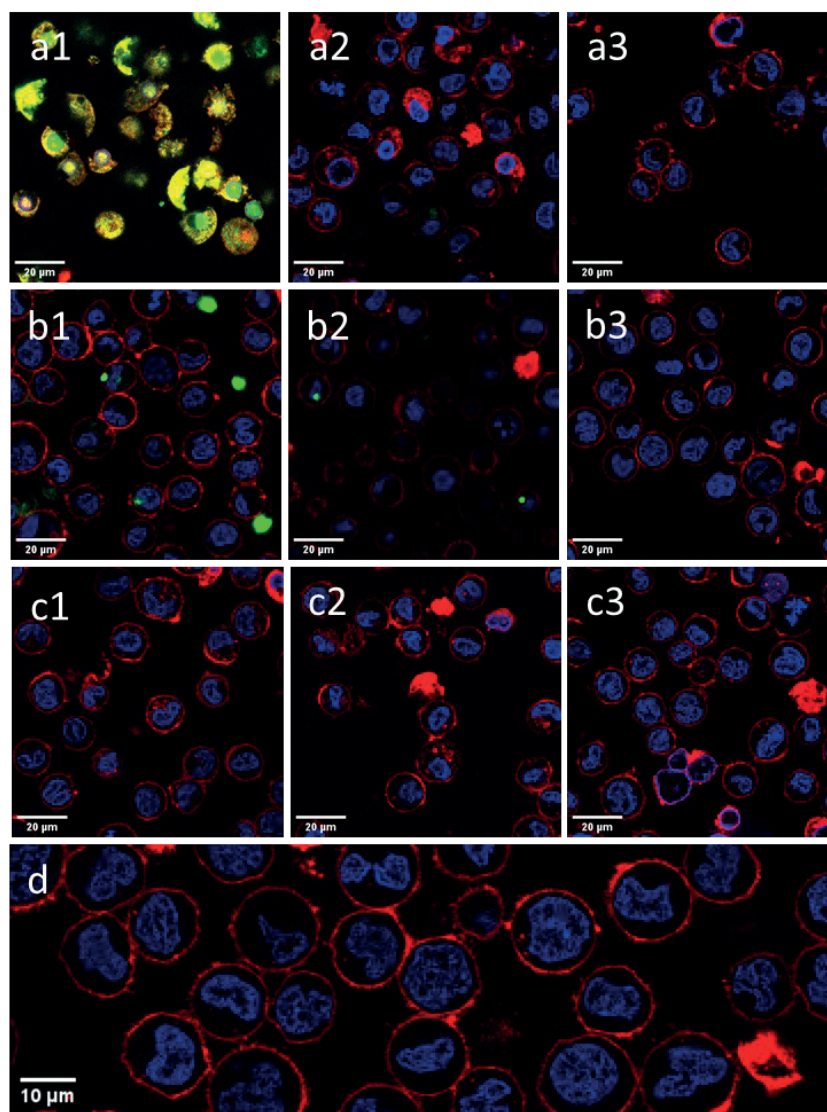


Figure 9. Confocal Images of THP1 cell exposed for 24 h to pigments with no particles: (a1) 2000 ppm of Rhodamine B, (a2) 20 ppm of Rhodamine B (a3) Rhodamine B eluent; (b1) 2000 ppm of Opticol, (b2) 20 ppm of Opticol (b3) Opticol eluent and (c1) 2000 ppm of idye PolyPink, (c2) 20 ppm of idye PolyPink (c3) idye PolyPink eluent. Finally (d) Untreated THP1 cells.

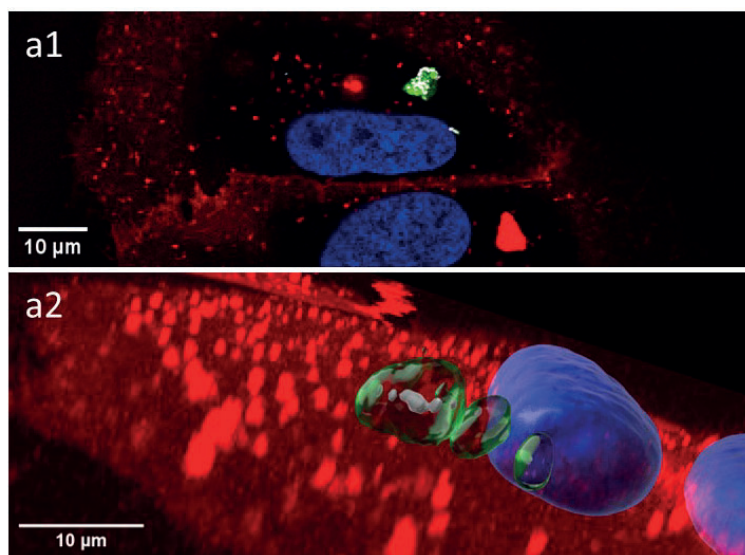


Figure 10. PET(Ti)NPLs labelling with iDye Poly pink. (a1) image without 3D reconstruction, (a2) image with 3D reconstruction in Huh-7 cultured cells.

Acknowledgments

A. Villacorta was supported by PhD fellowships from the National Agency for Research and Development (ANID), CONICYT PFCHA/DOCTORADO BECAS CHILE/2020-72210237. L. Vela was supported by PhD fellowships from the Fundación Carolina. M. Morataya-Reyes hold a Ph.D. FI fellowship from the Generalitat de Catalunya, A. Hernández was granted an ICREA ACADEMIA award. This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 965196. This work was partially supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (PID2020-116789, RB-C43) and the Generalitat de Catalunya (2021-SGR-00731).

We thank the Molecular Inorganic Nanoparticles Group at the Institut Català de Nanociència i Nanotecnologia (ICN2-UAB-CSIC-BIST) at the UAB campus for using their premises.