



Universidad
Zaragoza



Trabajo Fin de Máster en Nanotecnología Ambiental

Título del trabajo:

APLICACIONES DE LA NANOTECNOLOGIA EN
LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Autor

Pedro Usón Colomer

Director

Eduardo Bolea Morales

FACULTAD DE CIENCIAS/UNIVERSIDAD DE
ZARAGOZA Año 2017/2018

ÍNDICE

1) <u>RESUMEN</u>	<u>4</u>
2) <u>INTRODUCCIÓN</u>	<u>5</u>
3) <u>OBJETIVOS</u>	<u>8</u>
4) <u>NANOMATERIALES EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA</u>	<u>9</u>
5) <u>APLICACIONES EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA</u>	<u>12</u>
5.1 <u>SECTOR PRIMARIO</u>	<u>13</u>
5.2 <u>GANADERÍA</u>	<u>13</u>
5.3 <u>ESTAPA DEL PROCESADO</u>	<u>15</u>
5.4 <u>ETAPA DE CONSERVACIÓN</u>	<u>16</u>
5.5 <u>COMERCIALIZACIÓN Y CONSUMO</u>	<u>18</u>
6) <u>EVALUACIÓN DEL RIESGO</u>	<u>19</u>
6.1 <u>IDENTIFICACIÓN DEL PELIGRO</u>	<u>20</u>
6.1.1 <u>TÉCNICAS DE CARACTERIZACION</u>	<u>20</u>
6.1.2 <u>BIOCINÉTICA DE NANOMATERIALES</u>	<u>23</u>
6.2 <u>CARACTERIZACION DEL PELIGRO</u>	<u>27</u>
6.2.1 <u>TOXICODINAMIA</u>	<u>27</u>
6.2.2 <u>CURVA DOSIS-RESPUESTA</u>	<u>28</u>
6.3 <u>EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN</u>	<u>32</u>
6.4 <u>CARACTERIZACIÓN DEL RIESGO</u>	<u>34</u>
7) <u>REGULACIÓN Y ASPECTOS LEGALES</u>	<u>35</u>
8) <u>CONCLUSIONES</u>	<u>37</u>
9) <u>REFERENCIAS</u>	<u>39</u>

1. RESUMEN

El presente trabajo bibliográfico tiene como objetivo revisar el estado actual de las principales aplicaciones de la Nanotecnología en el ámbito de la Industria Alimentaria, desde el Sector Primario: Obtención de productos y aplicaciones en la agricultura y ganadería, como el tratamiento de las aguas, etc; Como de Seguridad Alimentaria: la producción, elaboración, envasado, conservación y transporte de los alimentos; Y en términos de Salud Pública y Bienestar Animal. Para ello se destacan los usos potenciales de los Nanomateriales en función de sus características, agrupando su estudio en relación al proceso productivo donde se pueden aplicar. Por otro lado, con el objetivo de garantizar la seguridad y sostenibilidad del uso de los nanomateriales en la Industria Alimentaria, se ha realizado una revisión sobre las herramientas de evaluación del riesgo, aquellas técnicas que contribuyen a dicha evaluación y, por último, se recoge el marco legal competente que lo regula.

2. INTRODUCCION

A principios de siglo XXI, la National Nanotechnology Initiative of USA, define la Nanociencia como “Aquella que estudia el fenómeno y la manipulación del material a escala atómica, molecular y macromolecular con, al menos, una dimensión comprendida entre 1 y 100 nanómetros”. Sin embargo, en lo referido a Nanotecnología, son muchas las definiciones utilizadas: “Comprende el diseño, caracterización, producción y aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas controlando el tamaño y la forma a escala nanométrica”-Royal Society and the Royal Academy of Engineering, 2004; “Nanotecnología es la creación de materiales funcionales, dispositivos y sistemas a través del control de la materia en la escala nanométrica (1-100nm) y la explotación de nuevos fenómenos y propiedades (físicas, químicas, biológicas, mecánicas, eléctricas, etc.) en esta misma escala”- National Aeronautics and Space Administration (NASA); “Aplicación del conocimiento científico para manipular y controlar la materia a escala nanométrica con el fin de hacer uso de sus propiedades y fenómenos relacionados con su tamaño y estructura, a diferencia de los asociados con átomos o moléculas individuales o con materiales a granel”- Interational Standard Organization (ISO), 2010. En cuanto a los Nanomateriales, la Comisión Europea el 18 de Octubre de 2011, los define como “Un material natural, secundario o fabricado que contenga partículas, sueltas o formando un agregado o aglomerado y en el que el 50% o más de las partículas presente una o más dimensiones externas en el intervalo comprendido entre 1 y 100nm”. Todas estas definiciones aportan diferentes matices alrededor de una idea común, que es el comportamiento excepcional de los materiales a escala nanométrica. Por ello, las diferentes disciplinas científicas realizan su enfoque particular sirviéndose de los nanomateriales para desarrollar novedosas aplicaciones en su beneficio.

El concepto de Industria Alimentaria, es un término complejo que engloba todos los procesos y acciones relacionados con la cadena alimentaria (Figura 1). “De la granja a la mesa” identifica y evalúa todos los pasos comprendidos entre la cría hasta el propio consumo del alimento, regidos por las leyes alimentarias y los manuales de buenas prácticas de higiene (BPH). Tanto abarca la Industria Alimentaria, como posibilidades tiene la Nanotecnología de ofrecer nuevos enfoques y proyectos en sistemas cada vez más intensificados.

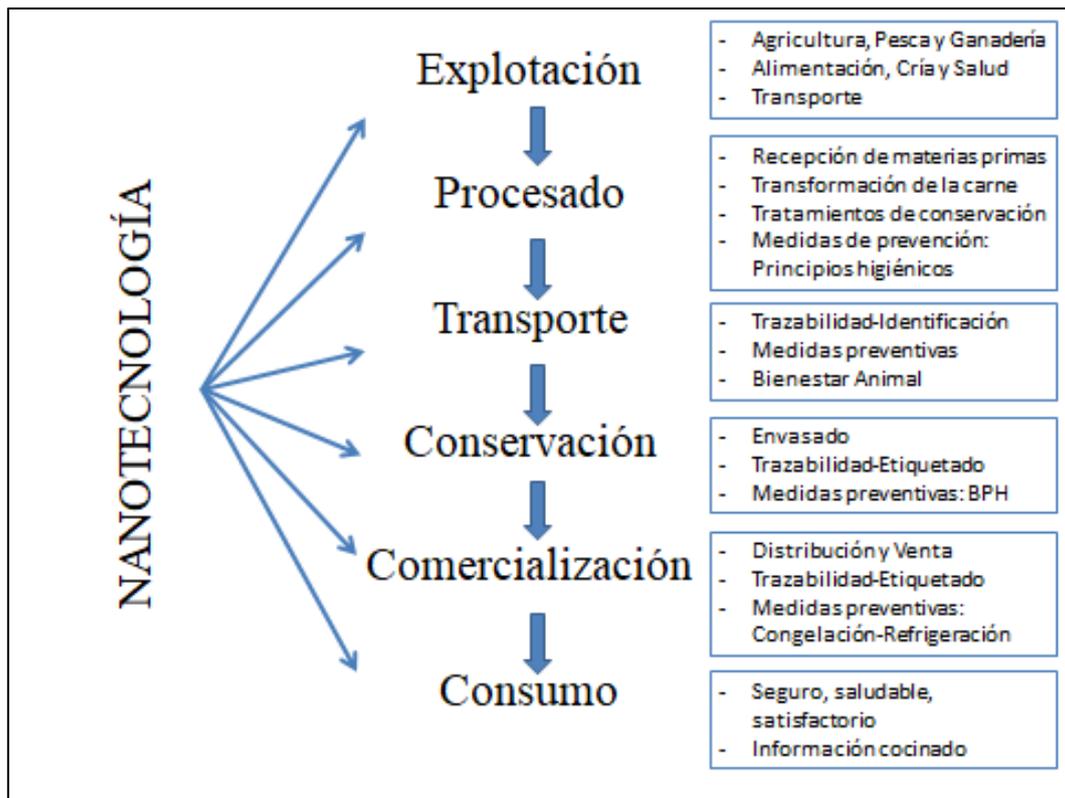


Figura 1. Esquema/Resumen de los procesos de la Industria Alimentaria

El auge y la rápida evolución de la Nanotecnología augura importantes avances en la Industria agroalimentaria, como así lo ha procurado en otras industrias donde quizá está más implantada, como la automoción, la electrónica, la cosmética o la industria textil. Pese a su reciente incorporación, la Nanotecnología propone alternativas en aspectos tan importantes actualmente como: la liberación inteligente de nutrientes, la bioseparación de proteínas, rápido muestreo de contaminantes químicos, el envasado inteligente o la nanoencapsulación de nutraceuticos (Sozer y Kokini, 2009) por poner algunos ejemplos. Es por ello que es tiempo de investigar cómo implantar dichas alternativas e identificar sus ventajas respecto a las tecnologías tradicionales para el contexto de la Industria alimentaria. ¿En qué circunstancias se encuentra? “El sector alimentario se enfrenta a una exigencia y rigurosidad cada vez mayores en materia social, medioambiental y de seguridad alimentaria, unidos a requisitos cada vez más rigurosos por parte de los gobiernos e instituciones” (LRQA, 2016). Es por ello que se tiende a la intensificación en los sistemas de producción: aumentando el volumen de producto, manteniendo un coste sostenible (infraestructuras, alimentación, sanidad y comercialización) y en periodos de tiempo muchas veces límite. Deberá ser en este

contexto, en donde la Nanotecnología y sus aplicaciones, sean capaces de sustituir a las tecnologías tradicionales siempre garantizando la seguridad, salubridad y rentabilidad del alimento.

En la actualidad, son diferentes organizaciones y autoridades tanto a nivel europeo como internacional (World Health Organization (WHO), Comisión Europea (CE), Food and Agriculture Organization (FAO), Food and Drug Administration of US (FDA), International Standard Organization (ISO), o el Reglamento de Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de Sustancias Químicas (REACH), etc.) las que se encargan de actualizar un marco legislativo que sea capaz de regular el ambicioso desarrollo nanotecnológico y la creciente utilización de nanomateriales en el mercado. Pese a que la Nanotecnología pueda ofrecer novedosas aplicaciones para la Industria Alimentaria, el marco legislativo europeo actual es limitado en determinados aspectos y es necesario recurrir a reglamentación internacional en materia de Seguridad Alimentaria. Además, diferentes organizaciones y autoridades europeas contribuyen a un marco regulatorio global (al margen del legislativo) ofreciendo normativas, estudios, guías, etc. En este sentido, la principal herramienta reguladora en cuanto a nanomateriales y Seguridad Alimentaria es mediante la Evaluación del riesgo (Guía EFSA, actualizada 2011). Así, durante la evaluación del riesgo, se caracterizará el nanomaterial y se describirá su biocinética, se establecerán los mecanismos por los que desarrolla su toxicidad (toxicodinamia), se estudiarán los aspectos determinantes de la exposición y, finalmente, se valorará si el nanomaterial es seguro y saludable para el individuo y además sostenible para el ecosistema.

3. OBJETIVOS

Realizar una revisión bibliográfica sobre el uso de la Nanotecnología en la Industria Alimentaria, seleccionando las principales aplicaciones en función de las etapas en la cadena de producción.

Hacer una valoración sobre el uso de estos nanomateriales en la actualidad en la Industria Alimentaria mediante las técnicas para su caracterización, determinación y cuantificación y ensayos de toxicidad para una evaluación de riesgos conforme a las normas de Seguridad Alimentaria.

Revisar los aspectos legales, marcos normativos y legislativos relativos al uso de nanomateriales en la Industria Alimentaria.

4. NANOMATERIALES EN LA INDUSTRIA AGROALIMENTARIA.

En la definición de nanomateriales de la Comisión Europea de 2011 se habla de materiales naturales o secundarios. Los nanomateriales de origen natural, son aquellos de origen biológico (producto de microorganismos), mineral o ambiental (combustión natural, erupciones volcánicas, polvo de arena, etc.) y han estado presentes en el medio ambiente prácticamente desde el origen. Los nanomateriales secundarios o fabricados son aquellos de origen antropogénico y cobran protagonismo a partir de la Revolución Industrial. En la actualidad, estos últimos suponen la principal fuente de exposición a nanomateriales para el ser humano, asociados con la existencia de nuevas nanopartículas derivadas de las emergentes aplicaciones de la Nanotecnología.

Los nanomateriales secundarios o antropogénicos son sintetizados a través de dos métodos fundamentalmente (Forough y Farhadi, 2010; Pal et al., 2011):

1. Métodos “Top-Down”: Aquellos que parten de un material voluminoso o micropartículas y se descompone hasta conseguir un tamaño deseado de nanomaterial o nanopartícula. Sistemas de descomposición mecánica (Ej. Molienda), descomposición química (Ej. CVC) y descomposición térmica.
2. Métodos “Bottom-Up”: Aquellos en los que el nanomaterial o nanopartícula resulta del ensamblaje de átomos o moléculas en forma de núcleos primarios. El tamaño final y la velocidad de crecimiento dependerá de tres variables: el número de núcleos primarios, la cantidad total de precursor y su coeficiente de difusión en el medio.
 - 2.1 En fase sólida: PVD, Hidrólisis por llama, hidrólisis por plasma, etc.
 - 2.2 En fase líquida: Bien, Líquido-líquido (Reducción química, Pirólisis-Pulverización, Síntesis solvotermal, etc.) o Sedimentación (Sol-gel, Gel-sol, Método coloidal, Precipitación alcalina, etc.)

En cuanto a la clasificación de nanomateriales según su naturaleza química (Gutierrez-Praena et al., 2009) éstos se pueden agrupar en: Metálicos (nanopartículas metálicas y

de óxidos metálicos y Quantum dots); Derivados del Carbono (Fullerenos, Nanotubos de Carbono (CNT), nanofibras, Grafito, Grafeno, etc.); Nanocompuestos: combinación de nanomateriales con materiales más grandes otorgándoles nuevas propiedades (Nanoarcillas, POSS, etc.); Dendrímeros: polímeros a escala nano sintetizados a partir de unidades ramificadas, lo que permite que sean funcionalizados para realizar acciones específicas.

En la actualidad son multitud de nanomateriales los utilizados en la industria agroalimentaria. RIKILT y JRC en 2014, proponen una clasificación que agrupan estos nanomateriales en función de su naturaleza química (Figura 2):



Figura 2: Tipos de nanomateriales en la Industria Alimentaria.

- Nanomateriales orgánicos: a este grupo pertenecen tanto las estructuras orgánicas o biopolímeros, con al menos una dimensión a escala nano: proteínas, carbohidratos, lípidos, vitaminas, etc. (Morris, 2011). Como aquellas estructuras sintetizadas a expensas de las sustancias del organismo y que actúan como un constituyente más del nanomaterial, las nanocápsulas: micelas, liposomas y nanoesferas (Peters et al., 2011).

El principio fundamental por el que estos nanomateriales son los más utilizados en la industria agroalimentaria es por la similitud que tienen con las estructuras micro y macroscópicas de los organismos, favoreciendo los procesos LADME (Liberación, Absorción, Distribución, Metabolización y Excreción) y la biodisponibilidad. Ejemplos: nanoencapsulación de nutrientes, vitaminas, colorantes, pesticidas, fármacos, etc.

- Nanomateriales combinados (orgánicos-inorgánicos): hacen referencia a nanoestructuras inorgánicas (núcleo) que han sido funcionalizadas en su superficie (corona o coating) por grupos orgánicos. Estas nanoestructuras combinadas adquieren nuevas características y propiedades gracias a la funcionalización. Ejemplo: nanoarcillas funcionalizadas como constituyentes de envases inteligentes; Nanopartículas de plata como agente antimicrobiano funcionalizadas para ser debidamente absorbidas.
- Nanomateriales inorgánicos: nanomateriales basados en metales y óxidos metálicos: Plata, hierro, oro, dióxido de titanio, dióxido de silicio, etc. Sus propias características (capacidad antimicrobiana, antiaglomerantes, colorantes, fotoluminiscencia, etc.) son de interés para su incorporación en el proceso productivo.

En la actualidad la mayoría de nanomateriales utilizados en la industria agroalimentaria se basan en nanocompuestos orgánicos. No obstante, la mayoría de investigaciones en cuanto al desarrollo de aplicaciones e incorporación de nanomateriales en la cadena alimentaria, suceden en torno a nanomateriales inorgánicos y, en especial, a las nanopartículas de plata como veremos más adelante.

5. APLICACIONES DE NANOMATERIALES EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA.

En general el uso de nanomateriales en la cadena alimentaria tiene como objetivo mejorar la calidad y economía de la cadena de producción, bien sea aumentando la vida útil de los alimentos, mejorando la calidad, estabilidad y textura de los productos o favoreciendo la captación y biodisponibilidad de nutrientes (Bouwmeester et al., 2014). En la Tabla 1 se recoge un resumen de las aplicaciones con su referencia.

Proceso productivo	Nanomaterial	Referencia
Agricultura	Nanopesticidas	Kah et al., 2014
	Fertilizantes en forma de Nano-emulsiones	Barati et al., 2010
	Nanofibras de algodón	FAO, 2010
Ganadería	Suspensiones coloidales de partículas metálicas	Park et al., 2006
	Precipitado de Nanopartículas de óxido de Silicio 30-50nm, E551	Athinarayanan et al., 2014
	Compuestos nanoestructurados a base de Óxido de Hierro	Hilty et al., 2011
	Nanoestructurados en base a Selenio	Xu et al, 2007
	Nanotubos de Carbono	Park et al., 2006
Seguridad Alimentaria	Nanopartículas de dióxido de titanio	Weir et al., 2012
	Nanopartículas de Carbón negro	Southampton University, UK.
Tratamiento y Prevención	Nanopirámides de cera	Uriarte y Bald, 2008
	Nanopartículas de plata	De Azeredo et al., 2013
Envasado	Nanopartículas de plata	Martínez Abad et al., 2013
	Nanoarcillas, Montmorillonita	AESAN, 2009
	Nanopartículas de óxido de Zinc	Chaudhry and Castle, 2011
	Nanopartículas de Aluminio	Cacho et al., 2009
	Nanoesferas de Almidón 50-150nm	Ecosynthetix
	Nanosensores biodegradables	Amenta et al., 2014
Etiquetado y Trazabilidad	Nanobarcodes	Oxinica, 2007
	Nanodiscos de oro y níquel	Nam et al., 2003
Comercialización y Consumo	Nanopartículas de dióxido de titanio E171	Weir et al., 2012
	Nanocápsulas micelares/liposomas	Neethirajan, 2009
	Ingredientes nanoestructurados	Neethirajan, 2009

Tabla 1. Aplicaciones de nanomateriales en las distintas etapas del proceso de producción del alimento y productos comercializados en la actualidad

5.1 SECTOR PRIMARIO: PRODUCCIÓN PRIMARIA Y AGRICULTURA

En términos de producción primaria: Producción de materia orgánica a través de la fotosíntesis y quimiosíntesis; Una de las principales aplicaciones es la utilización de nanoencapsulados para la liberación controlada de pesticidas, herbicidas, plaguicidas, fertilizantes y demás agroquímicos. La nanoencapsulación supone la incorporación, absorción o dispersión de compuestos bioactivos en o sobre pequeñas vesículas a escala nano. Otras aplicaciones de interés son los fertilizantes en forma de Nanoemulsiones o la utilización de nanofibras de algodón como adsorbente en procesos de purificación de las aguas y el lavado de los suelos.

5.1.1 AGRICULTURA

- 1) Nanopesticidas (Kah et al., 2014): Estructura nanocapsular que regula la liberación de pesticida en el medio, permitiendo un mayor control sobre su destino y comportamiento. Mediante la composición de la cápsula (coating) se consigue una adsorción selectiva evitando su acción tóxica por acumulación. Pese a las expectativas, la realidad es que las investigaciones sobre el destino ambiental de los nanoplaguicidas es escasa, y el estado actual de los conocimientos no parece ser suficiente para hacer una evaluación confiable de los riesgos y beneficios asociados.
- 2) Fertilizantes en forma de Nano-emulsiones (Barati et al., 2010): Composición de un polímero superabsorbente de nanocompuestos (NC-SAP) que encapsula fertilizantes y demás productos nutritivos para la planta. Por un lado potencia la acción del fertilizante y sus principios activos, reduciendo en consideración la cantidad a utilizar, ya que ocurre de forma más localizada.
- 3) Nanofibras de algodón (FAO, 2010): Actúan como adsorbentes en procesos de purificación de las aguas y lavado de los suelos. Siendo una alternativa en la gestión de los residuos agrarios.

5.1.2 GANADERÍA: ALIMENTACIÓN, CRÍA Y SALUD

La aplicación más importante sería el empleo de nanomateriales en piensos para la alimentación animal, ya sean en forma de aditivos: conservación, tratamiento antimicrobiano, liberación de nutrientes aumentando biodisponibilidad; O en forma de

suplemento: aumentar el valor nutritivo del pienso (Fe, Se, Cu, etc.). Pese a las importantes ventajas que supondría su utilización en la Industria Agroganadera, los exigentes controles en materia de Seguridad Alimentaria y la falta de información en cuanto al comportamiento y el destino de estos nanomateriales en la cadena trófica y en el medio, supone que en la actualidad muchas de las aplicaciones estén aún en fase de desarrollo.

- 1) Suspensiones coloidales de partículas metálicas: Ag, Cu, Au, Pt (Park et al., 2006): Utilizadas como suplementos alimenticios, los coloides metálicos son reactivos, pueden actuar como agentes reductores y son eficaces bactericidas en formulaciones tópicas. Pese a que no existe un consenso absoluto sobre la falta de efectos adversos, muchas de estas nanoestructuras son utilizadas y recomendadas en amplia gama de fármacos debido a sus propiedades químicas y físicas.
- 2) Precipitado de Nanopartículas de Óxido de Silicio 30-50nm, E551 (Athinarayanan et al., 2014): Utilizados como agentes antiaglomerantes en productos alimenticios en polvo y pienso para animales. Estas SiO₂NPs habitualmente aparecen en forma de agregado de 100nm-100µm en las muestras utilizadas.
- 3) Compuestos nanoestructurados a base de Óxido de Hierro con magnesio o calcio (w): Utilizados como suplemento alimenticio para compensar la deficiencia de hierro. Estos compuestos nanoestructurados son altamente solubles en ácido diluido por lo que es probable que se absorban bien en el digestivo, problema que otras formulaciones no han sido capaces de solventar.
- 4) Nanoestructurados en base a Selenio (Xu et al, 2007): Utilizados como suplemento alimenticio como agente anticarcinogénico y preventivo de la Enfermedad del músculo blanco o Distrofia muscular de los rumiantes.
- 5) Nanotubos de Carbono (Park et al., 2006): Nanoestructuras con potencial para aplicaciones biomédicas como, por ejemplo, la administración de fármacos. No obstante estudios revelan la citotoxicidad de los CNT a nivel mitocondrial (Yang et al., 2010) y la importancia de una funcionalización de los mismos para su aplicación en células eucariotas (Chen et al., 2011). En la

actualidad, su principal aplicación es como agente formador de imagen (diagnóstico).

5.2 ETAPA DEL PROCESADO

En cuanto a la etapa de procesado y transformación, la utilización de nanomateriales está dirigida a garantizar las medidas de seguridad y los niveles higiénicos (BPH) exigidos durante el proceso. Es por ello que la principal aplicación está relacionada con su capacidad antimicrobiana, formando parte de recubrimientos de utensilios utilizados en esta etapa y como constituyentes en desinfectantes para sistemas de refrigeración y aspiración. También son utilizados para la detección de procesos de degradación por acción bacteriana y manipulaciones no autorizadas.

5.2.1 SEGURIDAD ALIMENTARIA

- 1) Nanopartículas de dióxido de titanio (Weir et al., 2012): Por su capacidad antimicrobiana, son utilizadas para la desinfección de los sistemas de filtración de frigoríficos y sistemas de aspiración.
- 2) Nanopartículas de dióxido de titanio en tinta sensitiva de oxígeno (Universidad de Sthraathclyde, Escocia): Mediante la activación por luz UV, permite detectar manipulaciones no autorizadas.
- 3) Nanopartículas de Carbón negro (Southampton University, UK; Deutches Kunststoff Institut, Deutschland): Nanopartículas de tamaños 50nm capaces de producir un cambio en la coloración en presencia de fenómenos de degradación bacteriana.

5.2.2 TRATAMIENTOS DE CONSERVACIÓN Y MEDIDAS PREVENTIVAS

- 1) Nanopirámides de cera (Uriarte y Bald, 2008): Utilizadas como recubrimiento de superficies de materiales utilizados en la industria alimentaria para mantener los niveles higiénicos. De naturaleza hidrofóbica, provocan el lavado de la suciedad al repeler el agua.
- 2) Nanopartículas de plata (De Azeredo et al., 2013): Debido a sus propiedades antimicrobianas, son utilizadas como constituyentes de utensilios de la industria alimentaria.

5.3 ESTAPA DE LA CONSERVACIÓN: ENVASADO Y TRAZABILIDAD

Continuando con los procesos de la cadena alimentaria, en la etapa de conservación, es donde hay un mayor registro de utilización de nanomateriales en la actualidad. Las aplicaciones de la Nanotecnología en los materiales en contacto con el alimento, otorgándoles propiedades antimicrobianas, barreras mecánicas, frente a gases y radiaciones ultravioleta, variaciones de temperatura, modificando su estructura (resistencia, transparencia óptica, espesor, flexibilidad, peso, etc.) supone una realidad. Además, la incorporación de nanosensores biodegradables que permiten obtener información específica sobre el estado del alimento (T^a y HR) y procesos de degradación; Y su seguimiento, resultando importantes ventajas para desarrollar la trazabilidad del producto.

5.3.1 ENVASADO

- 1) Nanopartículas de plata (Martínez Abad et al., 2013): Son las más utilizadas debido a sus propiedades antimicrobianas, evitan la degradación del alimento por acción bacteriana y fúngica. Suelen encontrarse en forma de NP dispersas incrustadas en recipientes y recubrimientos.
- 2) Nanoarcillas, Montmorillonita (AESAN, 2009): Utilizadas como capas impermeables en materiales de envasado, especialmente de plásticos. Debido a su característica morfología de plaquetas, proporciona resistencia mecánica haciendo de barrera frente a gases, elementos volátiles o a la humedad.
- 3) Nanopartículas de óxido de Zinc (Chaudhry and Castle, 2011): Utilizadas por sus propiedades antimicrobianas en “envasados activos”; Constituyentes en superficies de contacto con el alimento, previene el crecimiento microbiano y prolonga la frescura del alimento.
- 4) Nanopartículas de Aluminio (Cacho et al., 2009): Utilizadas principalmente en envases flexibles para alimentos, también actúa como barrera para gases y radiación ultravioleta.
- 5) Nanoesferas de Almidón 50-150nm (Ecosynthetix): tienen la especial característica de su elevada superficie específica (400 veces la de una partícula de almidón natural), son utilizadas como adhesivo del material constituyente del envase.
- 6) Biosensores basados en nanotubos de múltiples paredes (Georgia Tech, USA). Debido, principalmente, a sus propiedades ópticas: alta absorción en

el infrarrojo (NIR), fotoluminiscencia y fuerte efecto Raman; Los convierten en excelentes agentes para la detección de microorganismos y toxinas por imagen en los alimentos envasados.

- 7) Nanosensores biodegradables (Amenta et al., 2014): Como constituyentes del “envase inteligente”: Control de las condiciones del envasado (T^a /HR) y detección de agentes químicos producto de la degradación del alimento. Cualquier variación en las condiciones deseadas provocará un cambio en la coloración del nanosensor, que servirá como dato informativo para el consumidor. Además, los envases inteligentes más sofisticados serían capaces de liberar sustancias protectoras para el alimento al detectar estas variaciones no deseadas.

5.3.2 ETIQUETADO-TRAZABILIDAD

- 1) “Nanobarcodes” (Oxinica, 2007): Se trata de códigos de barras compuestos por nanopartículas de Au, Ag y Pt; Basándose en las variaciones de reflectividad, se pueden crear diferentes códigos que serán asignados al producto alimenticio, proporcionando marca y autenticidad en su seguimiento.
- 2) Nanodiscos de oro y níquel (Nam et al., 2003): Funcionalizadas con un cromóforo con capacidad de absorber a un espectro determinado, son utilizadas como etiquetas biológicas en aplicaciones como la detección de DNA o rastreo de productos alimenticios.

5.4 COMERCIALIZACIÓN Y CONSUMO:

Respecto a las últimas etapas del proceso productivo, la comercialización y el consumo, muchas empresas en la actualidad están invirtiendo para conseguir alimentos: más saludables, con mayor valor nutritivo, de más sabor, coloración y texturas innovadoras, etc. En este sentido, el nanomaterial sería incorporado como aditivo alimentario, una vez se haya sometido a la rigurosidad de las medidas de la seguridad alimentaria. Si bien es cierto que hoy en día existe una falta de consenso sobre el empleo de nanomateriales para el consumo humano, ya sea por estudios contradictorios o simplemente por falta de investigación, algunos de ellos continúan siendo utilizados en multitud de productos.

- 5.4.1 Nanopartículas de dióxido de titanio E171 (Weir et al., 2012): Es frecuentemente utilizado como aditivo alimentario para conseguir una pigmentación blanca de los alimentos y como potenciador del sabor. En el análisis de la muestra de alimento, es habitual encontrarlas en forma de aglomerado (200-300 μm), aunque en porcentajes superiores al 30% puedan encontrarse nanopartículas de tamaño inferior a los 100 μm .
- 5.4.2 Suplementos alimenticios en nanocápsulas micelares/liposomas (Neethirajan, 2009): Formando un sistema de liberación del suplemento, se consigue un tratamiento del sabor y una protección frente a la degradación del alimento durante el procesado.
- 5.4.3 Ingredientes nanoestructurados (Neethirajan, 2009): Estructura orgánica (proteica, lipídica, etc.) constituyente del alimento como aditivo. Utilizados como potenciadores de la textura, sabor o flavor, reducción de la cantidad de azúcar, sal y aumento de la biodisponibilidad.

6. EVALUACIÓN DEL RIESGO DE NANOMATERIALES EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA.

El desarrollo tecnológico emergente en la Industria Alimentaria, hace necesario desarrollar de forma complementaria un marco legislativo de garantías, basado en la información y la experiencia, hasta llegar al conocimiento del consumidor (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, 2014). En esta dirección, las diferentes autoridades como la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), Comunidad Europea (CE), Organización para Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD) o la International Standard Organization (ISO), etc. realizan un seguimiento sobre el estado actual de los conocimientos en esta materia y proponen medidas para facilitar, tanto la evaluación práctica como las metodologías, agilizando los procesos de evaluación de los riesgos en el empleo de nanomateriales en la Industria Agroalimentaria (Ávalos et al., 2016).

Para realizar la evaluación del riesgo que supone el empleo de nanomateriales, es aceptado un modelo convencional (SCENIHR, 2007; SCPP, 2007; FDA, 2007; FSAI, 2008) basado en: la identificación y caracterización del peligro, la evaluación de la exposición y la caracterización del riesgo (Figura 3). Pero aplicar estos estudios de evaluación en el caso de los nanomateriales resulta complicado, principalmente por las propiedades y fenómenos que ocurren en la escala nano: complejidad de las técnicas para la detección, caracterización y cuantificación de los nanomateriales, biocinética desconocida, realización de ensayos de toxicidad a largo plazo, determinación de exposición en humanos y ambiente, información sobre la presencia en productos de consumo, entre otros. (Ávalos et al., 2016). Es por ello que es necesario profundizar en este tipo de estudios pues actualmente se están realizando mediante extrapolación de datos de sus equivalentes en escalas superiores a la nanométrica (EFSA 2011), además de revisar y actualizar las herramientas de evaluación conforme se incremente la utilización de nanomateriales emergentes (EFSA 2016, reevaluación de TiO₂ NPs como aditivo).

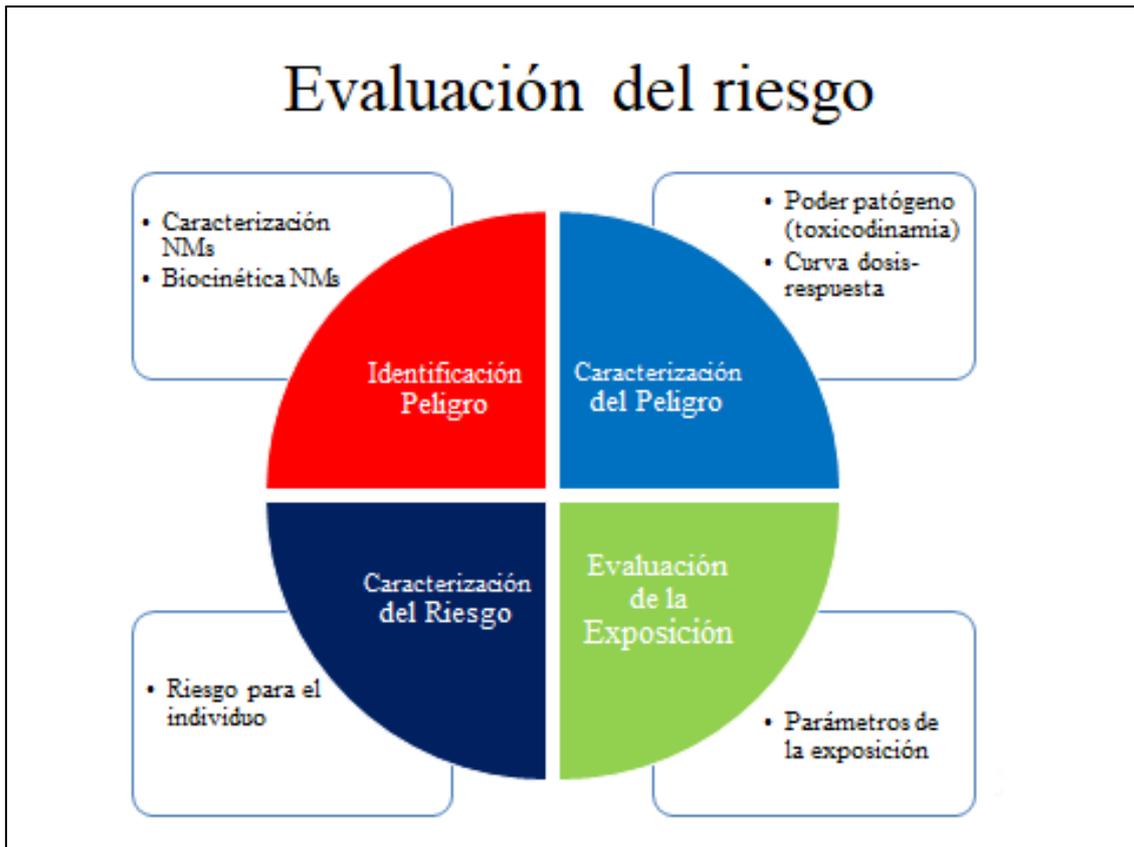


Figura 3. Esquema del modelo convencional para la evaluación del Riesgo.

6.1 IDENTIFICACIÓN DEL PELIGRO:

6.1.1 TÉCNICAS PARA LA DETECCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE NMs

El conocimiento de las características estructurales y físico-químicas de un determinado nanomaterial: tamaño, composición, concentración, solubilidad, superficie específica, porosidad, carga, etc. resultan de especial interés para identificar y comprender las propiedades y las interacciones de los nanomateriales con los distintos organismos biológicos. “Dos nanomateriales de idéntica estructura química pero diferente tamaño, pueden suponer toxicidad diferente en un mismo organismo”; Por ello la exigencia y la dificultad de la utilización de estas técnicas para la evaluación de riesgos, es que deben aportar toda la información posible entre tantas variables. “Así pues, la selección de la técnica dependerá del nanomaterial y del entorno de medición y esta deberá ser elegida caso por caso” (EFSA, 2011).

A continuación se recoge una clasificación categórica (Bouwmeester et al., 2014) de las técnicas para la detección, caracterización y cuantificación de nanomateriales más empleadas:

Categoría	Técnica	Fundamento	Objetivo	Características
Imagen	TEM	Recoge la dispersión selectiva que se produce al colisionar un haz de electrones con una muestra de grosor y estructura atómica determinada, a través de un sistema de modulación y lentes que formará la imagen.	- Tamaño, forma y estructura. - Morfología y estado de agregación.	- Técnica de "conteo" muestra representativa. - Preparación de la muestra: secado y grosor limitantes.
	SEM	Utilización de un haz de electrones para realizar un barrido superficial de la muestra. Diferentes receptores acoplados (SE, BSE, EDS, BSED, etc) recogerán la información.	-Tamaño y forma. -Información de la superficie.	- Técnica de "conteo" muestra representativa. - Preparación de la muestra: grosor limitantes, superficie conductora.
	AFM	Registro de las fuerzas electrostáticas de la superficie de una muestra mediante medición por sonda/punta.	-Tamaño y forma. -Topografía de superficie.	- Técnica de "conteo" muestra representativa. - Sensibilidad baja
Espectrometría	ICP-MS	Técnica de análisis inorgánico elemental e isotópico capaz de determinar y cuantificar la mayoría de los elementos presentes en una muestra.	-Composición elemental del bulk. - La concentración total en masa.	- Acoplamiento a sistemas de separación. - Detección a bajas concentraciones. - Conocimiento de la muestra.
	SP-ICP-MS	Técnica de análisis inorgánico elemental que permite detectar y cuantificar las NPs de forma individual.	- Concentración en número. - Contenido en masa por NP. - Distribuciones de tamaño y número.	- Acoplamiento a sistemas de separación. - Detección a bajas concentraciones. - Diámetros superiores a los 10-20nm y 100 nm para los óxidos.

Dispersión de luz	DLS	Medida del movimiento browniano de las NPs en una suspensión a causa de las fluctuaciones de intensidad de radiación dispersada.	- Diámetro hidrodinámico. Distribución de tamaños. - Sencilla preparación y rapidez de resultados.	- Conocimiento del líquido disolvente. - Interferencias en muestras con elevada polidispersidad.
	NTA	Medida del trayecto recorrido por la NP (movimiento browniano) a causa de la radiación dispersada mediante microscopía en video.	- Distribución de tamaños en función a su diámetro hidrodinámico. - Información sobre agregación.	- Detección de NPs con diámetros inferiores a los 20nm. - Interferencias en muestras con elevada polidispersidad.
Separación	HDC	Retención de distintas especies debido al efecto hidrodinámico y electrostático que ocurre en un sistema con diferentes fases (estacionaria y móvil/acuosa).	- Distribución de tamaños.	- Interacciones no deseadas por causa del coating. - Pobre resolución.
	FFF	La separación tiene lugar en un canal fino y alargado, sin fase estacionaria, por la acción de un campo externo aplicado perpendicularmente a un flujo laminar. Las partículas de menor tamaño tienen mayor facilidad para difundir, ocurriendo la separación a diferentes tiempos de retención.	- Distribución de tamaños	- Adaptación de la solución portadora. - Posibles interacciones con membrana de ultrafiltración. - Volúmenes muy pequeños.
	GE	Separación de especies cargadas mediante la acción de un campo eléctrico en una red tridimensional (Gel) que además actúa de tamiz molecular.	- Separación de partículas por carga.	- Interacciones con grupos cargados. - Resolución limitada - Tamaños inferiores a los 10 nm.
	CE	Separación de especies cargadas mediante acción de un campo eléctrico utilizando tubos capilares como celdas electroforéticas.	- Separación de partículas por carga.	- Interacciones con grupos cargados. - Resolución limitada.

Tabla 2. Técnicas para la detección, caracterización y cuantificación de nanomateriales.

Cada técnica ofrece información de uno o varios parámetros de interés para la caracterización de un nanomaterial. No obstante en la práctica, los nanomateriales son constituyentes de sistemas complejos que frecuentemente interfieren en su análisis. En términos analíticos, cada nanomaterial o analito

englobados en una determinada matriz. Cuanto más compleja sea la matriz y menor sea la concentración de nanomaterial, es decir, conforme se avance en el proceso productivo y se aleje de las condiciones de síntesis, más complicado resultará el análisis del nanomaterial en cuestión (figura 4). Por estas razones el procedimiento seguido habitualmente consiste en la combinación de técnicas, tratando a su vez de reducir lo máximo posible la complejidad de la matriz para obtener unos resultados de garantías y acumular el máximo número de datos para una caracterización precisa.



Figura 4. Posibles escenarios para el análisis de nanopartículas sintéticas a lo largo de todo su ciclo, (Laborda et al., 2016)

Un ejemplo de este procedimiento es el acoplamiento de una técnica de espectrometría a una de separación: “Caracterización y cuantificación de nanopartículas de plata en bebidas y alimentos nutracéuticos por 4AF-ICP-MS” (K.Ramos et al., 2014).

6.1.2 BIOCINÉTICA DE LOS NMS

La biocinética es la rama de la toxicología que estudia cómo y en qué medida son procesadas determinadas sustancias en el organismo. Para ello engloba cinco procesos: Liberación, Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción (LADME); definiendo

así el potencial tóxico en el caso de un nanomaterial. Pero determinar la toxicocinética de un determinado nanomaterial es una cuestión complicada por la falta de información en cuanto a los fenómenos que sufren las estructuras a escala nano en un organismo: Las interacciones con proteínas plasmáticas (presentes en sangre) que pueden influir en la distribución final del nanomaterial, la interacción con proteínas transmembrana que facilitarían el paso por la membrana citoplasmática, la agregación de nanopartículas metálicas en presencia de ácidos de la digestión influiría en la absorción y/o excreción final, nanomateriales poliméricos biodegradables o el riesgo de bioacumulación en diversos tejidos de nanomateriales metálicos/óxidos de lenta disolución, nanomateriales inorgánicos insolubles o inertes (EFSA, 2009) son algunos ejemplos. Así pues, conocer la mayor cantidad posible de características de un nanomaterial facilitará la determinación de su biocinética: estado, características físico-químicas, la concentración, características de la superficie, el estado de agregación, etc.

1. Fase de Liberación: hace referencia a las circunstancias en que los nanomateriales entran en contacto con el organismo. En caso de la Industria Alimentaria, los nanomateriales contactarán principalmente por tres vías:
 - a. Vía Oral (más importante): Ya sea por ingesta directa por su presencia en alimentos o agua en forma de suplementos y/o aditivos; O vía terapéutica por administración de fármacos con componentes nanoestructurados.
 - b. Vía Respiratoria: Inhalación de nanomateriales suspendidos, aerosoles, etc.
 - c. Vía Percutánea: Contacto a través de la piel.

2. Fase de Absorción: Una vez ocurrido el contacto, el nanomaterial es absorbido y se distribuye por el organismo debiendo atravesar diferentes barreras (espacio intravascular, espacio intercelular, membrana citoplasmática, membrana nuclear, etc.) pudiendo sufrir procesos previos de biotransformación y/o acumulación en determinados órganos. El nanomaterial atravesará dichas membranas por diferentes mecanismos:
 - a. Difusión pasiva a través de la membrana lipídica
 - b. Difusión a través de poros de membrana
 - c. Transporte activo (unión a proteínas transportadoras)

d. Endocitosis (pinocitosis y fagocitosis).

3. Fase de Distribución: Una vez es absorbido el nanomaterial transcurre a través del torrente circulatorio por el organismo hasta su destino: órgano diana. Para ello sufrirá modificaciones que le permitan adaptarse al entorno (por ejemplo: unión a proteínas plasmáticas). Todavía falta información por conocer en cuanto al destino preferente de determinados nanomateriales, aunque diversos estudios defienden que, al tratarse de órganos que procesan amplios volúmenes de sangre, el hígado y el bazo (presencia de la proteína metalotioneína) son destinos frecuentes, en particular para los nanomateriales metálicos (Johnston et al., 2010). No obstante procesos como la agregación, la formación de coronas proteicas o la intervención del sistema inmune, etc. afectarán por completo al comportamiento del nanomaterial en el organismo pudiendo afectar a su destino final incluso quedar acumulado en órganos secundarios como sistema nervioso, pulmón, tejido adiposo, hueso o placenta (Baeza, Squiban y Lenone, 2011)). Independientemente de estas modificaciones el comportamiento del nanomaterial se puede predecir en función a la vía de exposición:

- a. En caso de que la absorción haya sucedido por vía oral, el nanomaterial se trasladará al sistema gastro-intestinal donde sufrirá las primeras transformaciones. En caso de no ser absorbido, será eliminado vía fecal. Si ocurre la absorción, llegará a la circulación sistémica y finalmente al órgano diana.
- b. Si el contacto ha ocurrido por vía respiratoria su destino será el sistema respiratorio. En general, salvo para las nanopartícula de tamaños muy pequeños, cuanto mayor sea el tamaño de la partícula menor profundidad obtendrá en el sistema respiratorio. Es decir, las partículas de tamaños grandes (5-10 μ m) quedarán en las vías respiratorias altas siendo eliminadas por exudado nasal o finalmente deglutidas. Sin embargo para tamaños inferiores a los 5 μ m, profundizarán hacia bronquios y alveolos, pudiendo incorporarse a la circulación pulmonar o linfática y de allí a la circulación sistémica para concluir su trayecto en el órgano diana. No obstante, a tamaños

inferiores de 100nm, no ocurre la sedimentación en los tejidos pulmonares y suelen ser eliminadas con el aire espirado.

- c. Si el contacto ha ocurrido por vía percutánea, el nanomaterial pasará de la circulación periférica y/o linfática hasta la circulación sistémica, finalizando en el órgano diana.

4. Fase de Biotransformación (Metabolismo): Tras la absorción y distribución de una sustancia, ocurre su eliminación a través de los procesos de transformación metabólica y excreción. Las reacciones del sistema de biotransformación tienen como objetivo que los metabolitos resultantes puedan ser eliminados de forma más rápida y sencilla, ocurren principalmente en el hígado y pueden dividirse en dos grandes grupos (Niesink et al., 1996):

- a. Fase I: Oxidación, reducción e hidrólisis
- b. Fase II: reacciones de conjugación: Glucoración, Sulfatación, Conjugación con glutatión, con aminoácidos, etc.

Por ejemplo al aumentar la hidrosolubilidad se consigue un mayor rendimiento en la excreción renal. Así pues, se forman metabolitos consiguiendo: reducir la cantidad de sustancia inicial disminuyendo así la actividad y/o la intensidad de los efectos de ésta. No obstante las reacciones de biotransformación pueden producir el efecto adverso: productos con mayor toxicidad que el original, denominándose estas reacciones como bioactivación o toxicación.

5. Fase de Excreción: Esta etapa supone la salida del producto derivado de la biotransformación fuera del organismo. Las vías más frecuentes:

- a. Excreción renal: A través del ultrafiltrado glomerular de la sangre.
- b. Excreción biliar: Absorción intestinal, sistema portal, biotransformación y secreción en vesícula biliar.
- c. Excreción pulmonar: a través del aire espirado o vía circulación pulmonar.
- d. Leche, placenta y huevos.
- e. Sudor, saliva, pelo, uñas (menos frecuente)

6.2 CARACTERIZACIÓN DEL PELIGRO

6.2.1 TOXICODINAMIA: PODER PATÓGENO

La toxicodinamia estudia los mecanismos íntimos de toxicidad, es decir, cómo desarrollan los nanomateriales su acción patógena sobre el organismo, sus tejidos y sus células. Principalmente dependerá de tres factores (Ávalos et al., 2016):

- a) Toxicidad intrínseca del nanomaterial: Su estado, composición, propiedades físico-químicas, propiedades de superficie, estado de agregación (tamaño), concentraciones, etc. determinarán unos mecanismos patogénicos propios de cada nanomaterial. En general estos mecanismos se pueden agrupar en tres tipos:
1. Nanomateriales ocupando un espacio celular o mediante cambios de pH: alteración de las concentraciones de la biofase acuosa, alteración de la fase lipídica de la membrana celular e impedimento estérico reduciendo las funciones celulares.
 2. Nanomateriales bioactivados:
 - Producción de moléculas electrofílicas y radicales libres (ROS):
 - Estrés oxidativo letal para la célula (agotamiento de equivalentes reductores)
 - Alteración de la homeostasis celular del calcio: aumento del Ca intracelular, degradación de las membranas celulares, liberación de Ez lisosomales y destrucción celular.
 - Activación de mecanismos de apoptosis.
 - Nucleófilos:
 - Alteración de la membrana nuclear
 - Compromiso de la integridad del DNA
 - Genotoxicidad
 3. Sustitución de moléculas endógenas: Interferencia con la funcionalidad celular.
 - Alteración de rutas metabólicas
 - Alteración de la actividad celular especializada: canales iónicos, excitabilidad de membrana, alteración neurotransmisores y receptores, etc.

- Alteración de la regulación celular a causa del daño en la estructura DNA.
- b) Interacciones con la matriz alimentaria: Cambios en la toxicodinamia de un determinado nanomaterial al producirse alteraciones en la matriz alimentaria y viceversa (AESAN, 2009).
- c) Susceptibilidad del individuo:
 - Duración y frecuencia a la exposición de un determinado nanomaterial (biotransformación/acumulación)
 - Situación del sistema inmunitario.

Pero la realidad es que la información disponible acerca de la toxicodinamia de determinados nanomateriales no alcanza para establecer conclusiones generales, debido a la cantidad de variables que pudieran producirla y a la complejidad de su análisis. De aquí surge la necesidad de elaborar estudios caso por caso, extremando las precauciones (Ávalos et al., 2016).

6.2.2 CURVAS DOSIS-RESPUESTA

El concepto de relación dosis-respuesta hace referencia a la cantidad de nanomaterial que provoca efectos adversos para el organismo. La resolución gráfica es una curva sigmoidea o acumulativa, que relaciona la cantidad/concentración de nanomaterial con un parámetro que implique toxicidad (letalidad, mortalidad, viabilidad celular, permeabilidad de membrana, etc.). Se trata de la representación de la Ley de Haber: “La intensidad del efecto tóxico es directamente proporcional a la concentración y al tiempo de exposición”. Resulta una herramienta que aporta datos fundamentales para la caracterización de un peligro:

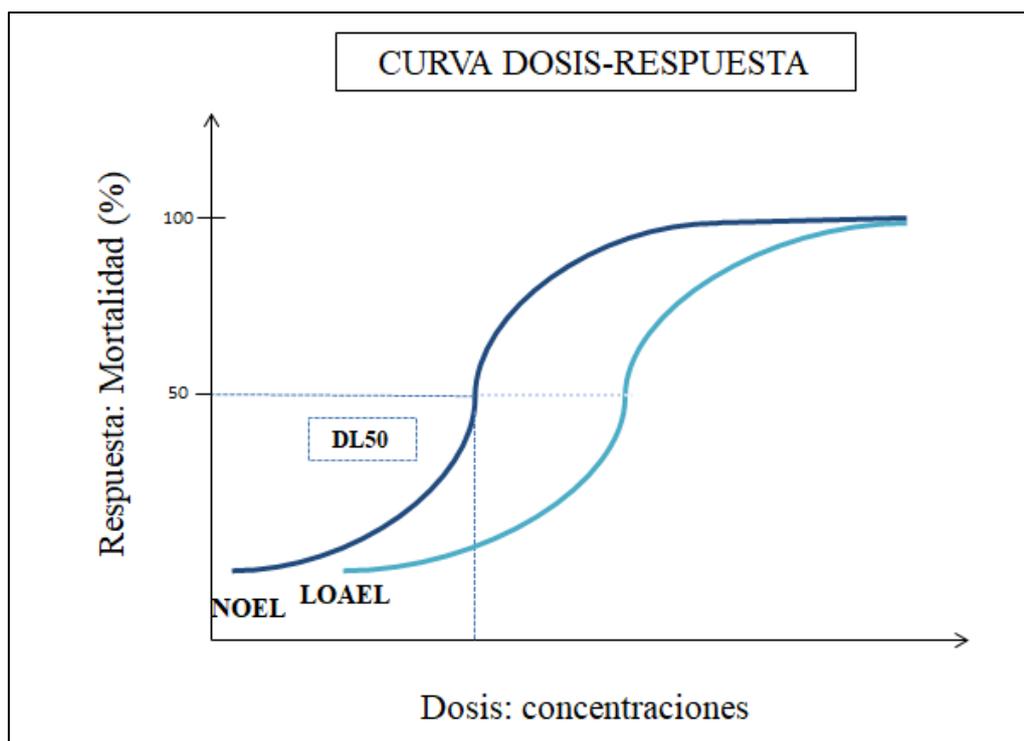


Figura5. Representación gráfica: Curva dosis-respuesta.

- * Umbral: concentración que debe alcanzar el tóxico en su órgano diana para provocar efectos nocivos.
- * NOEL: concentración más elevada que no produce efecto significativo.
- * LOAEL: mínima concentración que provoca efectos nocivos.
- * Cuanto menor sea la concentración mínima que produce un efecto, mayor toxicidad-peligro. Ej. Figura 5 separación entre curvas.
- * DL50: concentración que ejerce daño letal a la mitad de la población.
- * Ingesta diaria aceptable (ADI): concentraciones de nanomaterial administradas diariamente y que no provocan efectos nocivos (NOEL-parámetro de seguridad).
- * Límite de residuo máximo (MRL): Determinar límites legales para concentraciones de nanomaterial en alimentación (muy por debajo de LOAEL).

Sin embargo obtener estos datos resulta muy complicado debido a la gran variedad de nanomateriales que son utilizados en el mercado actual y a la complejidad del análisis (Tanarro et al., 2011). Para realizar de forma adecuada la relación dosis-respuesta son necesarios tres requisitos:

1. Métodos de administración de dosis que garanticen que la medida de la respuesta sea debida a la concentración de nanomaterial. Asegurarse de que el nanomaterial es el agente causal de la respuesta.
2. Que el parámetro o magnitud de la respuesta esté relacionada con la dosis.
3. Métodos capaces de medir o cuantificar la respuesta: análisis de los modelos cinéticos, análisis de los cambios físico-químicos, etc.

Es por ello que una de las estrategias para evaluar la toxicidad de determinados nanomateriales, hoy en día, es la de establecer relaciones con sus materiales macroscópicos (SAR: relaciones estructura-actividad). Otras estrategias son las de evaluar el nanomaterial de forma específica en ambientes determinados como las pruebas de toxicidad in vitro e in vivo:

A continuación se muestran las principales pruebas de toxicidad in vitro (tabla 3):

Ensayos citotoxicidad in vitro	Medida	Ventajas	Inconvenientes
<i>MTT</i>	Proliferación celular	Sencillez, rapidez y coste.	Alteración en la lectura de absorbancia. Resultados en viabilidad celular (%): dependiente de muchos factores.
<i>Azul Alamar</i>	Proliferación celular	Sensibilidad. Reactivos inocuos.	Enzimas responsables desconocidas: subestimación. Alteración en la lectura de absorbancia.
<i>Clonogénicos</i>	Proliferación celular	Viabilidad celular	Lento y minucioso.
<i>División celular</i>	Proliferación celular	Viabilidad celular. Más rápido que clonogénico.	Costes. Reactivo citotóxico (CFSE).
<i>Proliferación EdU</i>	Proliferación celular	Rápido y de confianza informa sobre el ciclo celular	Reactivo citotóxico. Pobre sensibilidad.
<i>Azul Tripán</i>	Permeabilidad de membrana	Rápido, sencillo y de bajo requerimiento.	Técnica de conteo.
<i>Diacetato de Fluoresceína</i>	Permeabilidad de membrana	Rapidez y sencillez.	Técnica de conteo . Requiere citómetro de flujo.
<i>Calcein-AM</i>	Permeabilidad de membrana	Integridad de membrana y su actividad.	Coste del reactivo. Tiempo de ensayo.
<i>Lactato deshidrogenasa</i>	Integridad de membrana	Rapidez y Sencillez.	Interferencias por la actividad Ez del medio de cultivo: sensibilidad.
<i>Annexin-V</i>	Mecanismos de muerte celular	Identificación apoptosis.	Diferenciación entre necrosis y apoptosis en procesos tempranos.
<i>Aparición de ROS</i>	Mecanismos de muerte celular	Medida del mecanismo toxicodinámico más frecuente. Buena sensibilidad.	Límites de ROS toreadbles por la célula. Medida a tiempos prolongados. Control de otros parámetros (membrana)
<i>Potencial de la Mb mitocondrial</i>	Mecanismos de muerte celular	Sencillez y reactivos inocuos. Información sobre otros procesos: Ca, ROS, ATP, apoptosis, etc.	Sobreestimación a elevadas concentraciones
<i>Cometa</i>	Genotoxicidad	Rapidez y sensibilidad.	Electroforesis en gel.

Tabla 3. Ensayos de citotoxicidad in vitro más utilizados para NMs.

Pruebas de toxicidad in vivo: La realización de este tipo de pruebas se encuentra bajo la regulación de estrictos requisitos, protocolos de actuación y control específicos (OCDE, CE, OMS, etc.) donde se contemplan los numerosos factores, procedimientos y objetivos que se deben de satisfacer. La especie del animal de laboratorio, número de animales por prueba, número de grupos de tratamiento, métodos de administración del tóxico, tipos de observaciones, valoraciones clínicas, hematológicas, etc. Las vías de exposición resultan un factor fundamental para la interpretación de los

resultados: oral, inhalatoria o percutánea; Así como el tiempo de exposición que diferenciará las pruebas en: Aguda (24h-2semanas), Subaguda (1 semana-3meses) y Crónica (más de 6 meses). En el caso de estudio de la toxicidad de nanomateriales en la industria alimentaria, los estudios suelen centrarse en administración oral, a bajas concentraciones y elevados tiempos de exposición, simulando condiciones de ingesta controlada, y así determinar los límites tolerables y la ingesta diaria admisible. En la Tabla 4 se detallan algunos de los estudios realizados *in vivo* para la evaluación de la toxicidad de nanomateriales administrados por vía oral.

Nanomaterial	Resultado del estudio	Referencia
<i>AgNPs (4,7-42nm)</i> y <i>AuNPs (30nm)</i>	Sin toxicidad en condiciones de ensayo	Ávalos et al., 2015
<i>AuNPs (13,5nm)</i>	Concentraciones > 1100 µg/kg pv: Disminución peso corporal y del índice del timo y bazo. También recuento de hematíes.	Zang et al., 2010
<i>Fe₂O₃NPs (30nm)</i>	Cambios histopatológicos en hígado, riñón y bazo. Afección de la transmisión sináptica en tejido nervioso.	Kumari et al., 2012
<i>CuNPs (23,5nm)</i>	DL50= 413mg/kg. Órganos afectados con procesos inflamatorios y degenerativos: Hígado, riñón y bazo.	Chen et al., 2006
<i>Nanoarcillas (montmorillonita 10-60nm)</i>	Sin toxicidad en condiciones de ensayo	Shi et al., 2006
<i>ZnO (100nm)</i>	Alteración de análisis bioquímico y hematológico. Signos patológicos en estómago, páncreas, ojo y próstata.	Kim et al., 2014

Tabla 4. Estudios de toxicidad *in vivo* de nanomateriales por vía oral Ávalos et al., 2016.

6.3 EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN:

La siguiente etapa para la evaluación del riesgo que supone la utilización de nanomateriales en la industria alimentaria es la evaluación de la exposición. El objetivo será establecer una relación entre los resultados obtenidos en las etapas de identificación y caracterización del peligro, con los parámetros referentes a la evaluación de la exposición. Los parámetros de exposición cualitativos son aquellos que pretenden caracterizar las circunstancias de la exposición de un determinado producto, mientras que los parámetros de exposición cuantitativos pretenden

realizan una estimación cuantitativa de la exposición. En la Tabla 5 se muestran ambos tipos de parámetros de exposición:

Parámetros de exposición cualitativos	Parámetros de exposición cuantitativos
Identificación nanomaterial	Concentración NM en producto
Categoría del producto	Volúmen utilizado (NM-producto)
Diseño del empaquetado del producto	Tasa de retención del producto
Matriz para el material	Grado de liberación del NM
Manipulación del producto durante procesado	Área específica del producto en contacto
Consideraciones sobre el mal uso previsible	Duración de la exposición
Identificación de las vías de exposición específicas	Frecuencia de la exposición
Uso directo/indirecto: exposición humana	
Vías de exposición secundarias durante utilización	
Grupos específicos (edades, profesiones, etc.)	

Tabla 5. Tipos de parámetros para la evaluación de la exposición según el Danish Ministry of the Environment, 2015

Pero la dificultad del análisis de nanomateriales en matrices complejas (alimento, pienso, envase, etc) se debe principalmente a las interacciones que ocurren entre ambos: tendencia a la agregación del nanomaterial, modificaciones durante el procesado, almacenado, envasado, interacciones con grupos orgánicos, transformación durante la digestión, etc. Todo ello supone una complicación añadida a la evaluación de la exposición a los nanomateriales (AESAN, 2009). No obstante, en la actualidad y debido a la creciente utilización de nanomateriales en diferentes mercados, existen diferentes herramientas para la evaluación de la exposición (Ávalos et al., 2016). Algunos ejemplos como ECETOC Nano TF, TRA o NANORISK realizan la evaluación de la exposición mediante una serie de protocolos de pruebas, catalogando el riesgo de exposición en diferentes niveles. De

esta forma obtienen una base de datos que servirá como medida preventiva conforme el riesgo que suponga la exposición a un nanomaterial determinado.

6.4 CARACTERIZACIÓN DEL RIESGO: RIESGO PARA EL INDIVIDUO

La etapa final para la evaluación del riesgo que supone la utilización de nanomateriales en la industria alimentaria es la caracterización del riesgo. Es decir, realizar una estimación cualitativa y cuantitativa de la incidencia de efectos nocivos, asociados a la utilización y consumo de nanomateriales, en el individuo. También debería constituir el marco legal sobre la utilización de un determinado nanomaterial en la industria alimentaria. No obstante, debido a las dificultades que se encuentran a lo largo de todas las etapas para la evaluación del riesgo, es prácticamente imposible determinar el nivel de riesgo, sin adoptar factores de incertidumbre muy elevados, en la industria alimentaria (Ávalos et al., 2016). A pesar de ello, algunos autores han establecido valores límite para determinados nanomateriales en circunstancias específicas (Ejemplos: 0,01 mg/m³ TiO₂NPs para un humano en contacto por vía inhalatoria, The National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH); 1100 µg/kg pv AuNPs mediante ingestión por vía oral, Zang et al., 2010; 413 mg/kg CuNPs vía oral.)

7. REGULACIÓN Y ASPECTOS LEGALES

Con el objetivo de definir un marco legislativo que garantice la seguridad y regulación para la fabricación, importación y utilización de nanomateriales en la industria agroalimentaria, diferentes autoridades e instituciones tanto a nivel europeo como internacional, recogen una serie de directrices que implican a los nanomateriales directa o indirectamente. A continuación se recoge un listado de reglamentos europeos (Tabla 6) que regulan la utilización de nanomateriales en la industria alimentaria (Ávalos et al., 2016):

Legislación	Materia
Reglamento (CE) N° 1907/2006; Parlamento y Consejo Europeo, 2006	Definición de Nanociencia, Nanotecnología, Nanomaterial, Nanopartícula y demás aspectos relacionados.
Reglamento (UE) N° 450/2009; Parlamento y Consejo Europeo, 2009	Materiales y objetos activos e inteligentes.
Reglamento (UE) N° 528/2012; Parlamento y Consejo Europeo, 2012	Etiquetado de productos biocidas con nanoestructurados contenidos mediante la palabra “nano” después del nombre de la sustancia en la lista de ingredientes.
Reglamento (UE) N° 2015/2283; Parlamento y Consejo Europeo, 2015	Regulación en lo relativo a nuevos alimentos. Se consideran como “nuevos alimentos” aquellos que contengan nanomateriales. Además, deberá aparecer dicha información en el etiquetado (UE, 528/2012).
Reglamento 10/2011 (Comisión Europea)	Materiales plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos.
Reglamento 1169/2011 (Comisión Europea)	Suministro de información alimentaria facilitada al consumidor.

Tabla 6. Marco legislativo europeo general.

En cuanto al panorama internacional, la situación es similar y son las diferentes agencias gubernamentales las que toman competencias jurídicas en cuanto a los nanomateriales en la industria alimentaria, tal y como se recoge en la Tabla 7 (Amenta et al., 2015):

Organización responsable	Legislación	País
US Food and Drug Administration (FDA) Environmental Protection Agency (EPA)	Federal Food, Drug, and Cosmetic Act (FFDCA) Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act (FIFRA)	USA
Canadian Food Inspection Agency (CFIA) Public Health Agency of Canada (PHAC)	Food and Drugs Act	Canadá
Ministry of Health, Labour and Welfare	Food Sanitation Law	Japón
Swiss Federal Office of Public Health (FOPH) Federal Office for the Environment (FOEN)		Suiza
Ministry of Agriculture Ministry of Health National Institute of Metrology	Food Safety Law of China, 2009	China
The Federal Service for the Protection of Consumer Rights and Human Well-Being of the Ministry of Health and Social Development (Rospotrebnadzor)	Sanitary Rules and Regulations (“SanPiN”)	Rusia
Food Standards Agency (FSA)		Reino Unido

Tabla 7. Regulación internacional de la Nanotecnología en la Industria Alimentaria

No obstante, pese a que el marco legislativo (tanto europeo como internacional) en relación a los nanomateriales en la industria agroalimentaria es abordada por diferentes instituciones, el carácter específico de sus normativas provoca que aun queden muchos ámbitos por regular y determinar su validez jurídica. Más aún conforme evoluciona el desarrollo de la Nanotecnología y sus aplicaciones. Para complementar dicho marco legislativo, diferentes organizaciones y autoridades ejercen sus reglamentaciones: Comité Científico EFSA, 2011 y 2018 “Guía para la evaluación del riesgo de la Nanociencia y Nanotecnología en los alimentos y cadena alimentaria”, ISO 10808/2010: “Garantizar que los resultados de pruebas cuidadosamente monitorizadas para establecer la toxicidad por inhalación de nanopartículas, sean fiables y equiparables a nivel internacional”, UK-FSA, 2013 “Listado de nanomateriales autorizados para su utilización en los alimentos o en materiales en contacto con los mismos”, Guía REACH, 2012 (Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de Químicos) “Requisitos de información y Evaluación de la Seguridad”, etc.

8. CONCLUSIONES

La Nanotecnología ofrece novedosas aplicaciones a la Industria Agroalimentaria. En la actualidad, dentro del proceso productivo del alimento, es en la etapa de procesado (higiene de utensilios, equipos y equipamientos) y en la de conservación (envasado, etiquetado y trazabilidad) donde mayor número de NMs se han incorporado debido a sus excelentes propiedades. Sin embargo, la utilización de muchos de ellos, con sus aplicaciones futuras, queda limitada debido a los riesgos potenciales y sobre todo, a la dificultad a la hora de evaluarlos. Por un lado, ésta evaluación se encuentra limitada por la falta de procedimientos validados que permitan la caracterización de los NMs tanto en el propio material como de los productos generados a lo largo de su ciclo de vida útil. Por otro lado, la dificultad para evaluar su toxicidad que dependerá tanto del propio nanomaterial (estado, forma, tamaño, superficie, carga, etc.) como de las interacciones con la matriz alimentaria y, por último, del propio individuo. Es por ello que se requiere mayor información, con investigaciones y estudios concretos, sobre NMs utilizados en determinados ámbitos de la Industria Alimentaria y, en especial, de aquellos productos destinados a consumo humano y así superar la normativa de Seguridad Alimentaria.

Por otro lado, es necesario establecer un marco regulador global, transparente y actualizado a la creciente utilización de Nanotecnología, para garantizar un uso de nanomateriales seguro y sostenible.

9. REFERENCIAS

1. Abolfazl Barati “Nano-composite superabsorbent containing fertilizer nutrients used in agriculture” Patent Application Publication Jun. 10, 2010 Sheet 1 of 2 US 2010/0139347 A1
2. Alicia Ávalos Fúnez, Ana Isabel Haza Duaso y Paloma Morales Gómez “NANOTECHNOLOGY IN THE FOOD INDUSTRY I: APPLICATIONS” Revista Complutense de Ciencias Veterinarias 2016 10(2):1-17
3. Alicia Ávalos Fúnez, Ana Isabel Haza Duaso y Paloma Morales Gómez “NANOTECHNOLOGY IN FOOD INDUSTRY II: RISK ASSESSMENT AND LEGISLATION” Revista Complutense de Ciencias Veterinarias 2016 10(2):18-40
4. Anthony Hardy, Diane Benford, Thorhallur Halldorsson, Michael John Jeger, Helle Katrine & Knutsen, Simon More, Hanspeter Naegeli, Hubert Noteborn, Colin Ockleford, Antonia Ricci, 9 Guido Rychen, Josef R. Schlatter, Vittorio Silano, Roland Solecki, Dominique Turck, Maged 10 Younes, Qasim Chaudhry, Francesco Cubadda, David Gott, Agnes Oomen, Stefan Weigel, 11 Melpo Karamitrou, Reinhilde Schoonjans and Alicja Mortensen. “Guidance on risk assessment of the application of 3 nanoscience and nanotechnologies in the food and feed 4 chain: Part 1, human and animal health” EFSA Scientific Committee, ADOPTED: xx 2018
5. AntonioMartínez-Abad, José M.Lagarón, María J.Ocio “Characterization of transparent silver loaded poly(l-lactide) films produced by melt-compounding for the sustained release of antimicrobial silver ions in food applications” Food Control Volume 43, September 2014, Pages 238-244
6. Caroline Sunyong Lee, Hyo-Jin Nam, Young-Sik Kim, Won-Hyeog Jin, Seong-Moon Cho, and Jong-uk Bu “Microcantilevers integrated with heaters and piezoelectric detectors for nano data-storage application” Appl. Phys. Lett. 83, 4839 (2003).
7. RIKILT “Characterisation of Engineered Nanomaterials Needed for Hazard Assessment in Biological Matrices (2011)”. Institute of Food

Safety, Wageningen UR, P.O. Box 230, 6700 AE Wageningen, The Netherlands

8. Claudia Coll, Dominic Notter, Fadri Gottschalk, Tianyin Sun, Claudia Som & Bernd Nowack “Probabilistic environmental risk assessment of five nanomaterials (nano-TiO₂, nano-Ag, nano-ZnO, CNT, and fullerenes)” Pages 436-444 | Received 18 Dec 2014, Accepted 10 Jul 2015, Published online: 10 Nov 2015
9. Francisco Laborda, Eduardo Bolea, Gemma Cepria, María T. Gomez, María S. Jimenez, Josefina Perez-Arantegui, Juan R. Castillo “Detection, characterization and quantification of inorganic engineered nanomaterials: A review of techniques and methodological approaches for the analysis of complex samples” *Analytica Chimica Acta* 904 (2016) 10e32
10. Gutiérrez-Praena D, Jos A, Pichardo S, Puerto M, Sánchez-Granados E, Grilo A, Cameán AM “Nuevos riesgos tóxicos por exposición a nanopartículas” *Rev. Toxicol.* (2009) 26: 87-92
11. Hans Bouwmeester, Puck Brandhoff Hans, J.P. Marvin, Stefan Weigel, Ruud J.B. Peters “State of the safety assessment and current use of nanomaterials in food and food production” *Trends in Food Science & Technology* Volume 40, Issue 2, December 2014, Pages 200-210
12. Henriette M.C.de Azeredo “Antimicrobial nanostructures in food packaging” *Trends in Food Science & Technology* Volume 30, Issue 1, March 2013, Pages 56-69
13. Jeff Morris, Jim Willis, Domenico De Martinis, Bjorn Hansen, Henrik Laursen, Juan Riego Sintes, Peter Kearns & Mar Gonzalez “Science policy considerations for responsible nanotechnology decisions” *Nature Nanotechnology* volume 6, pages 73–77 (2011)
14. Jeff Morris, Jim Willis, Domenico De Martinis, Bjorn Hansen, Henrik Laursen, Juan Riego Sintes, Peter Kearns, Mar Gonzalez “Science policy considerations for responsible nanotechnology decisions” *Nature Nanotechnology* volume 6, pages 73–77 (2011)
15. Jegan Athinarayanan, Vaiyapuri Subbarayan Periasamy, Mohammed A. Alsaif, Abdulrahman A. Al-Warthan, Ali A. Alshatwi “Presence of nanosilica (E551) in commercial food products: TNF-mediated oxidative

- stress and altered cell cycle progression in human lung fibroblast cells” *Cell Biology and Toxicology*, April 2014, Volume 30, Issue 2, pp 89–100
16. Jinsong Zhang, Xufang Wang, Tongwen Xu “Elemental Selenium at Nano Size (Nano-Se) as a Potential Chemopreventive Agent with Reduced Risk of Selenium Toxicity: Comparison with Se-Methylselenocysteine in Mice” *Toxicological Sciences*, Volume 101, Issue 1, 1 January 2008, Pages 22–31
 17. Katja Knauer et al., “Nanomaterials in Plant Protection and Fertilization: Current State, Foreseen Applications, and Research Priorities” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* · September 2012
 18. Lara Lacerda, Alberto Bianco, Maurizio Prato, Kostas Kostarelos “Carbon nanotubes as nanomedicines: From toxicology to pharmacology” *Advanced Drug Delivery Reviews* 58 (2006) 1460–1470.
 19. Mahmoud M., Berekaa “Nanotechnology in Food Industry; Advances in Food processing, Packaging and Food Safety” *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* (2015) 4(5): 345-357
 20. M. Fondevila, R. Herrer , M.C. Casallas, L. Abecia, J.J. Duchá “Silver nanoparticles as a potential antimicrobial additive for weaned pigs” *Animal Feed Science and Technology* 150 (2009) 259–269.
 21. Mehrdad Forough y Khalil Farhadi “Biological and green synthesis of silver nanoparticles” *Turkish Journal of Engineering and Environmental Sciences* 34(4):281-287.
 22. Melanie Kah Thilo Hofmann “Nanopesticide research: Current trends and future priorities” *Environment International* Volume 63, February 2014, Pages 224-235.
 23. Melanie Kah, Thilo Hofmann “Nanopesticide research: Current trends and future priorities” *Environment International* Volume 63, February 2014, Pages 224-235
 24. Ms Kate Seear, Professor Alan Petersen and Dr Diana Bowman “The Social and Economic Impacts of Nanotechnologies: A Literature Review” Final Report February 2009 Prepared for the Department of Innovation, Industry, Science and Research Monash University Victoria, Australia

25. Park Hae-Jun; Kim Sung-Ho; Kim Hwa-Jung; Choi Seong-Ho “A New Composition of Nanosized Silica-Silver for Control of Various Plant Diseases” *The Plant Pathology Journal*, Volume 22, Issue 3, 2006, pp.295-302,
26. Rona M. Silva, Christel TeeSy, Lisa Franzi, Alex Weir, Paul Westerhoff, James E. Evans & Kent E. Pinkerton “Biological Response to Nano-Scale Titanium Dioxide (TiO₂): Role of Particle Dose, Shape, and Retention” *Journal of Toxicology and Environmental Health* (2013), Part A, 76:16, 953-972
27. Ruud J.B. Peters, Hans Bouwmeester, Stefania Gottardo, Valeria Amenta, Maria Arena, Puck Brandhoff, Hans J.P. Marvin, Agnieszka Mech, Filipa Botelho Moniz, Laia Quiros Pseudo , Hubert Rauscher, Reinhilde Schoonjans, Anna K. Undas, Maria Vittoria Vettori , Stefan Weigel, Karin Aschberger “Nanomaterials for products and application in agriculture, feed and Food” *Trends in Food Science & Technology* 54 (2016) 155e164.
28. Ruud Peters, Puck Brandhoff, Stefan Weigel, Hans Marvin, Hans Bouwmeester “Inventory of Nanotechnology applications in the agricultural, feed and food” EFSA supporting publication 2014 EN 621
29. SCENIHR “The appropriateness of existing methodologies to assess the potential risks associated with engineered and adventitious products of nanotechnologies” Adopted by the SCENIHR during the 10th plenary meeting of 10 March 2006 after public consultation
30. Sozer N, Kokini JL. “Nanotechnology and its applications in the food sector.” *Trends Biotechnol.* 2009 Feb;27(2):82-9
31. Suresh Neethirajan & Digvir S. Jayas “Nanotechnology for the Food and Bioprocessing Industries” *Food Bioprocess Technol* (2011) 4:39–47
32. Thea Kinga, Megan J. Osmond-McLeod, Lesley L. Duffy “Nanotechnology in the food sector and potential applications for the poultry industry” *Trends in Food Science & Technology* 72 (2018) 62–73
33. Valeria Amenta, Karin Aschberger, Maria Arena, Hans Bouwmeester ,Filipa Botelho Moniz, Puck Brandhoff, Stefania Gottardo, Hans J.P. Marvin, Agnieszka Mech, Laia Quiros Pseudo, Hubert Rauscher,

Reinhilde Schoonjans Maria Vittoria Vettori, Stefan Weigel, Ruud J. Peters “Regulatory aspects of nanotechnology in the agri/feed/food sector in EU and non-EU countries” *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 73 (2015) 463e476

34. Wilson Rolando Chalco Sandoval “Nanotecnología en la industria alimentaria” Universidad Politécnica de Madrid Madrid – España 2010 – 2011