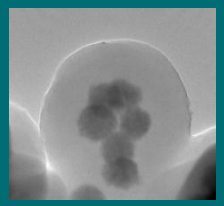
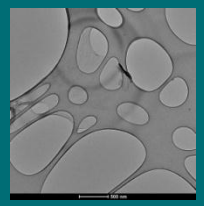
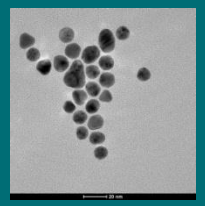
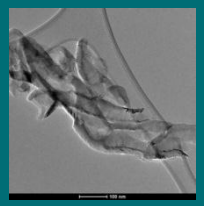
OSALAN- INSTITUTO VASCO DE SEGURIDAD Y SALUD LABORALES

GAIKER
ik4 research alliance

INVINANOTOOL

29|04|2016

HERRAMIENTA DE EVALUACIÓN DE LA PELIGROSIDAD POR INHALACIÓN DE LOS NANOMATERIALES BASADA EN RESULTADOS DE TOXICIDAD OBTENIDOS DE ENSAYOS IN VITRO

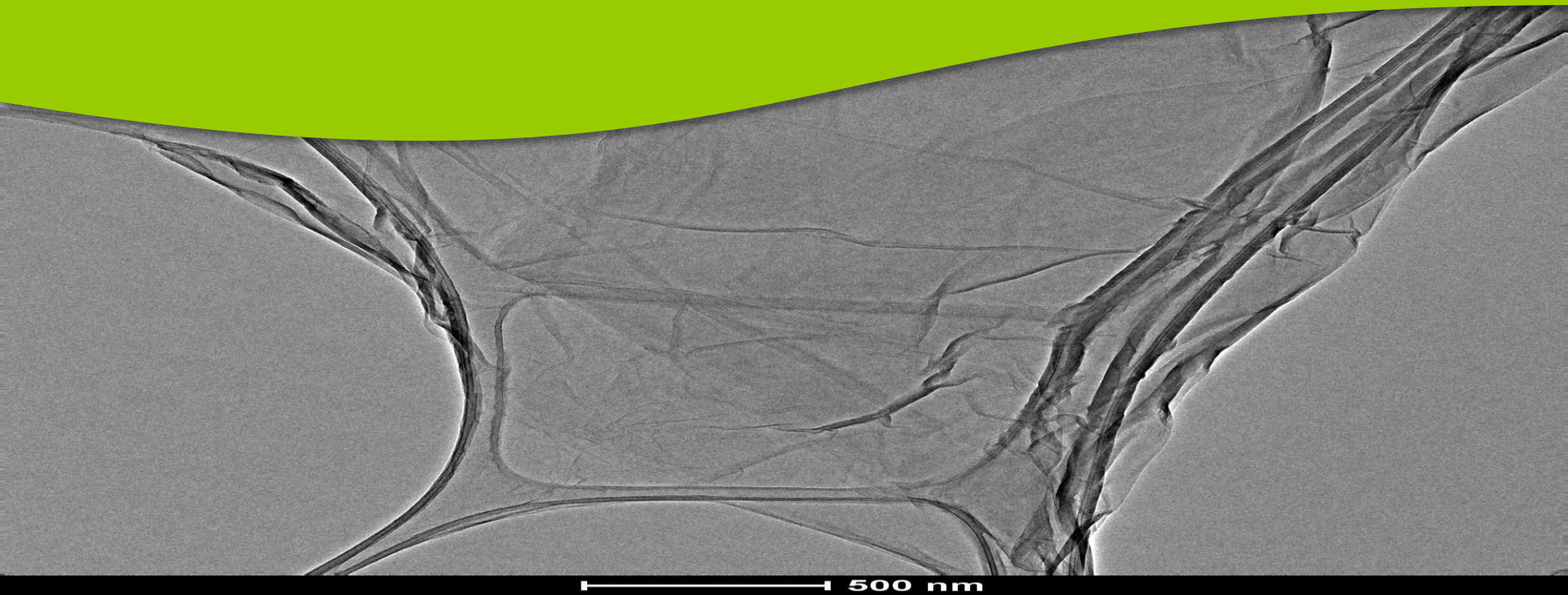
Luis Madariaga

© 2015 GAIKER Centro Tecnológico

ÍNDICE

- Introducción
- Características físico-quimicas de los nanomateriales
- El Proyecto NANoREG y la iniciativa EHS Advance
- Herramientas de Control-Banding
- Estudios de toxicidad IN VITRO
- Desarrollo de una herramienta de evaluación del riesgo
- Resultados y Conclusiones
- Próximos pasos

INTRODUCCIÓN



¿Qué es un nanómetro?

1 nm = 0,000000001 m (10^{-9} m)

ADN
Diámetro ~ 2 nm

x1000 →

Bacteria
Longitud ~ 2 µm

x1000 →

Gota de agua
Diámetro ~ 2 mm

Nanotubo de carbono
Diámetro ~ 1 nm

X100.000 →

Pelo
Diámetro ~ 100 µm

X100.000 →

Casa
Anchura ~ 10 m

Nanopartícula
Diámetro ~ 4 nm

X1.000.000 →

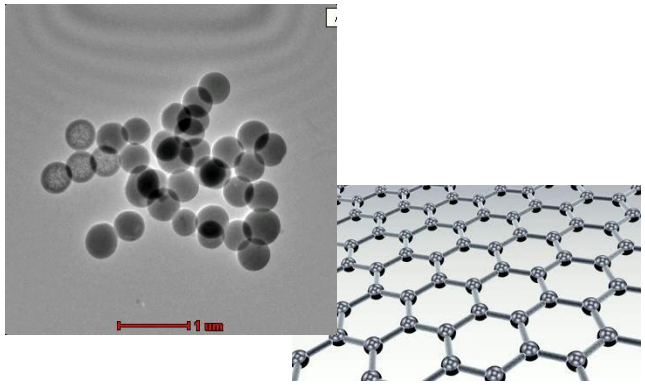
Hormiga
Longitud ~ 4 mm

X1.000.000 →

Circuito Le-Mans
Longitud ~ 4 Km/vuelta

Tipos de nanomateriales según origen

Naturales	Subproductos de actividades humanas (accidentales)	Fabricados o de Ingeniería (ENMs)
• Emisiones volcánicas	•Humos de escape de los motores diesel	• Nano-cápsulas
• Incendios forestales	• Humo del tabaco	• Metales y óxidos metálicos
• Virus	• Procesos de granallado	• Híbridos (orgánicos/inorgánicos)
		• Puntos cuánticos



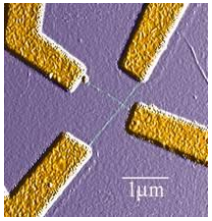
Los nanomateriales aportan mejoras en la funcionabilidad de los nanomateriales tradicionales

Energía

Alimentos, Cosmética

Recubrimientos

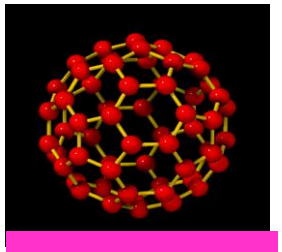
IT



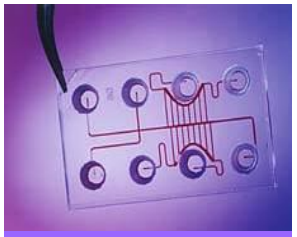
Aplicaciones

Construcción

Militar



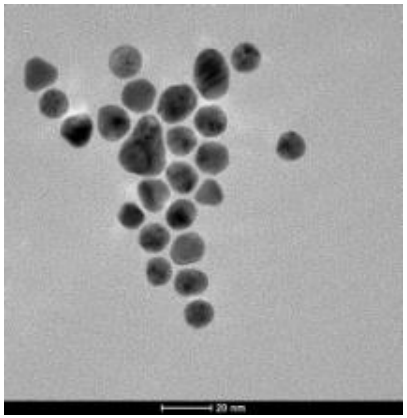
Materiales



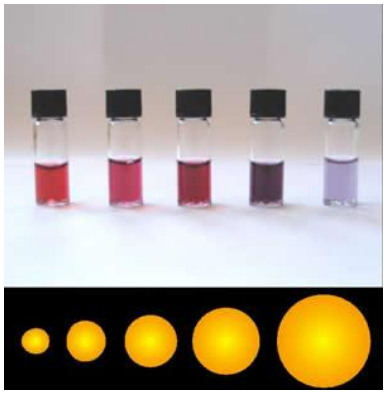
Análisis

Medicina

Oro (~ 10 nm)



Propiedad	Oro	Oro nanométrico
Tª fusión (ºC)	~ 1000	~ 830 (5 nm) ~ 350 (2 nm)
Color	Amarillo	Azul (~70-90 nm) Rojo (~ < 30 nm)
Prop. Magnéticas	Diamagnético	Ferromagnético
Reactividad	Inerte	Propiedades catalíticas



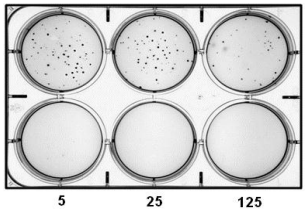
Los NM tienen propiedades físico químicas peculiares respecto a los materiales tradicionales

NANOMATERIALES-VÍAS DE EXPOSICIÓN

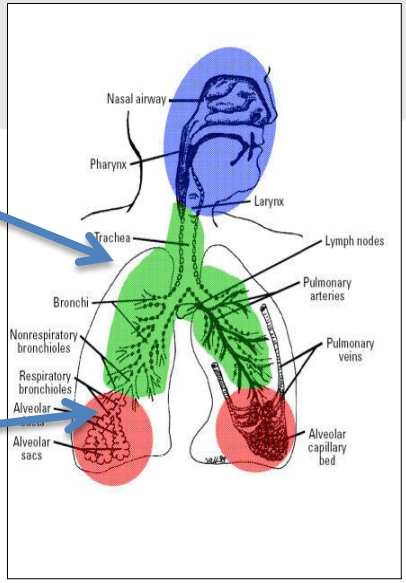
Incluso en labores de investigación en nanotecnología, la inhalación en el ambiente de trabajo es la más importante ruta de exposición a los NM con posibles efectos en:

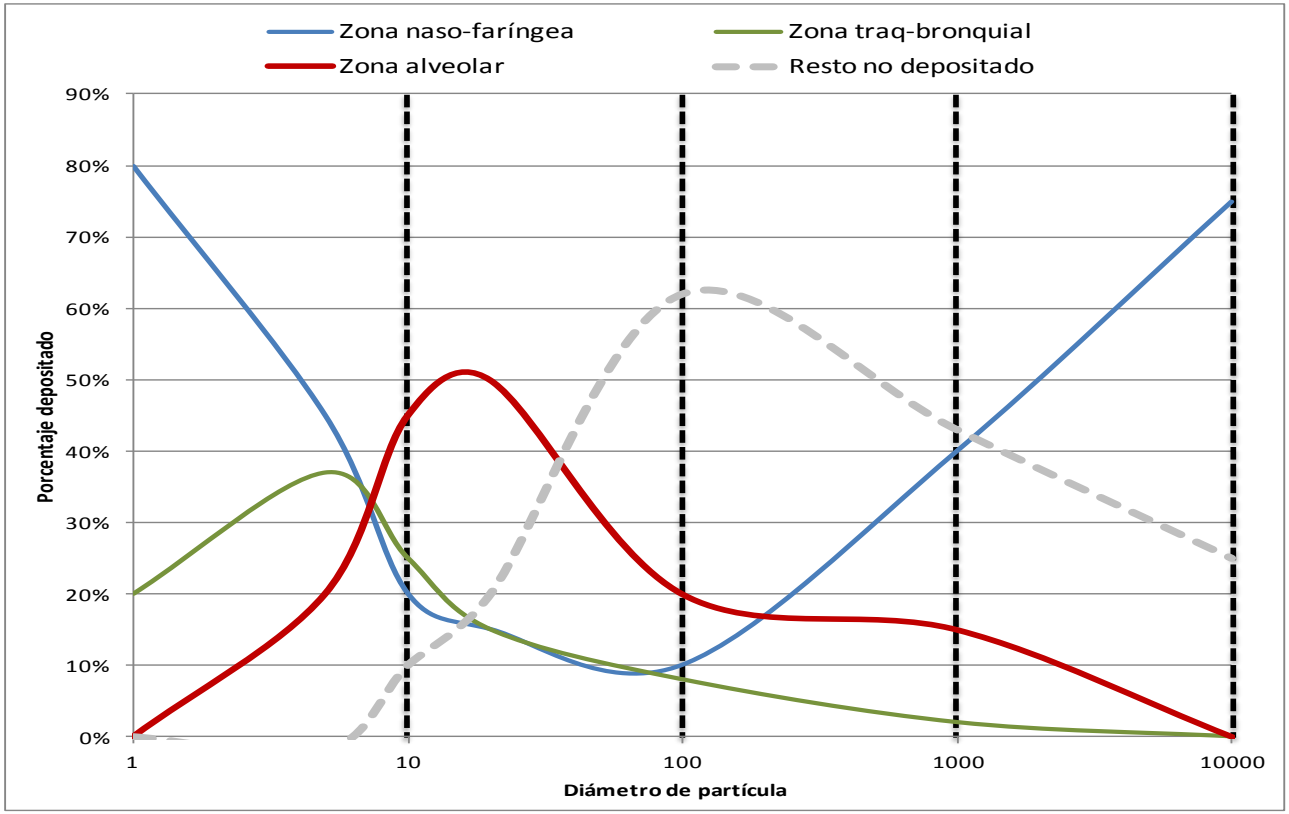
- **Tracto respiratorio**
- **Sistema inmunológico**

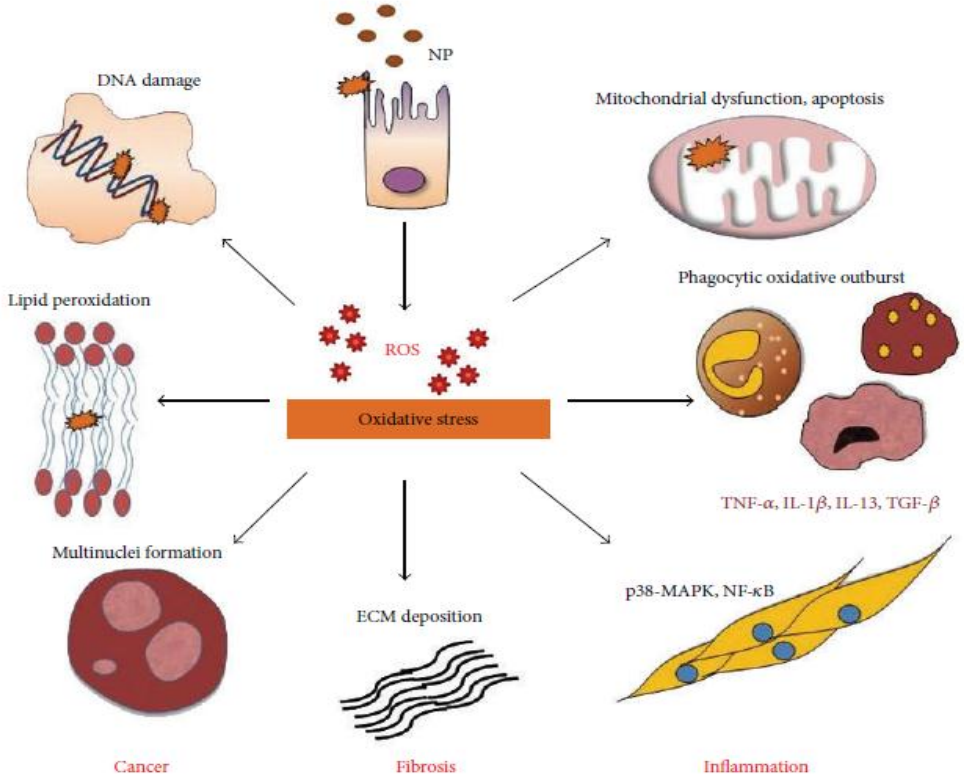
BEAS2



A549

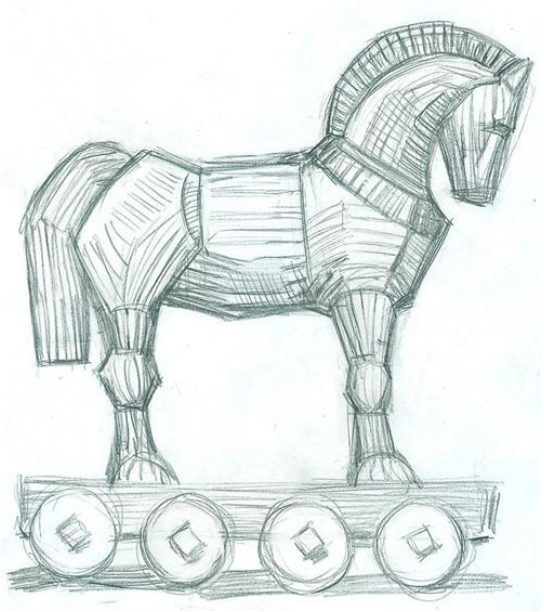


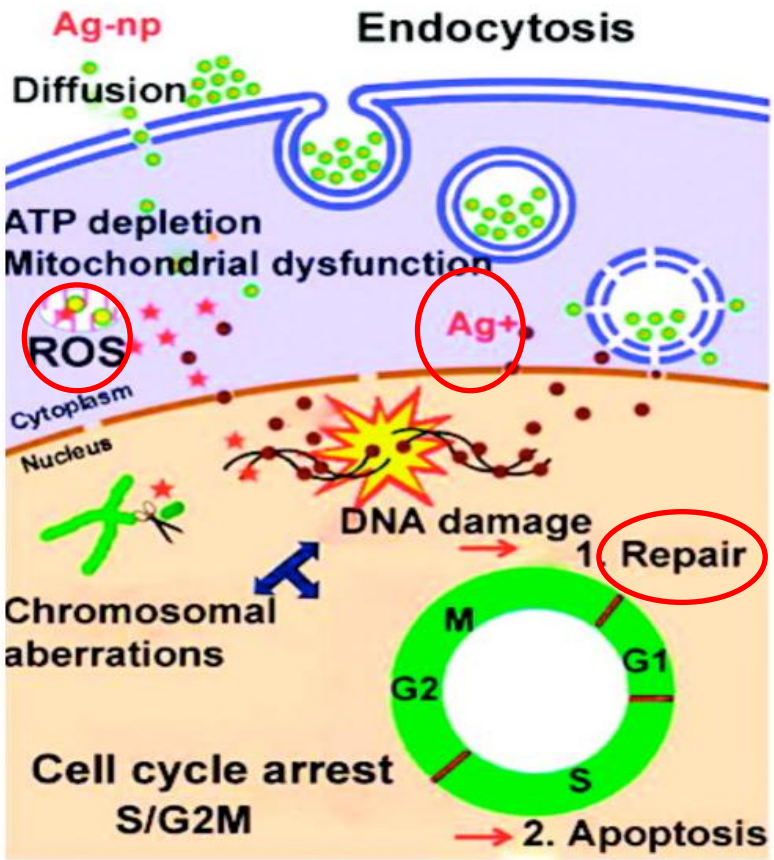




Para la mayoría de los NM, el principal mecanismo de daño celular es el estrés oxidativo: GENERACIÓN DE ROS (especies con oxígeno reactivo que reaccionan con el ADN)

Los NM metálicos actúan como “troyanos” favoreciendo el acceso y generación de iones metálicos en el interior de las células

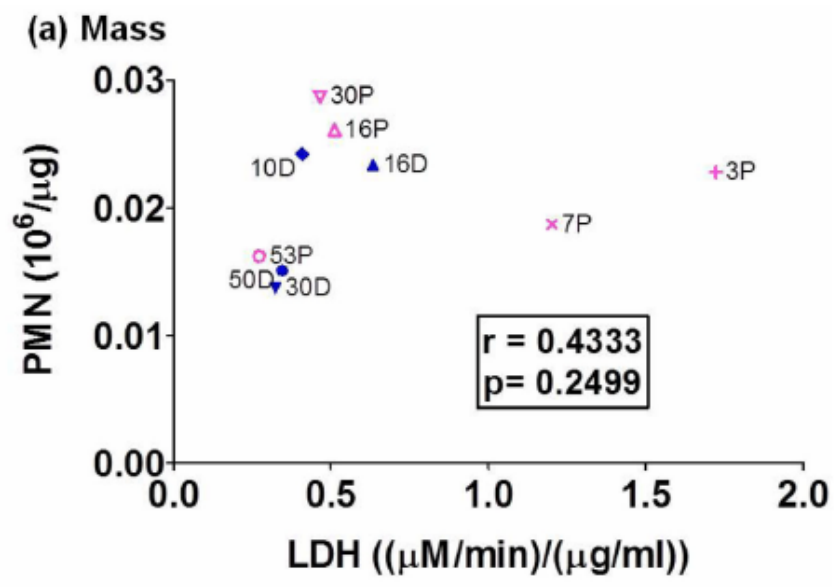




Realizados numerosos estudios toxicológicos in vitro con resultados dispares. Validez de la métrica y de los métodos de ensayo habituales. Homogeneidad y estabilidad

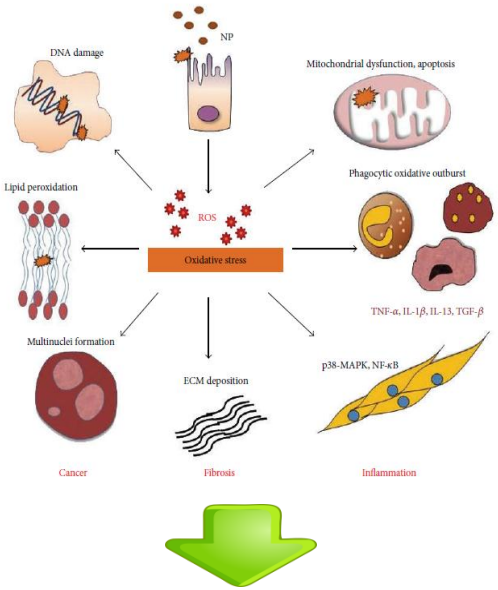
Falta de correlación

(cuando se utiliza unidades de dosis másica)



Uso de concentraciones excesivas

Exceso de ROS oxidativo generado de manera irreal

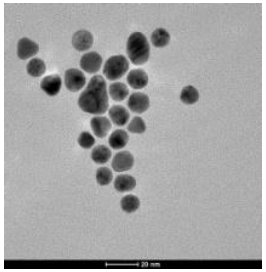


GENOTOXICIDAD IRREAL

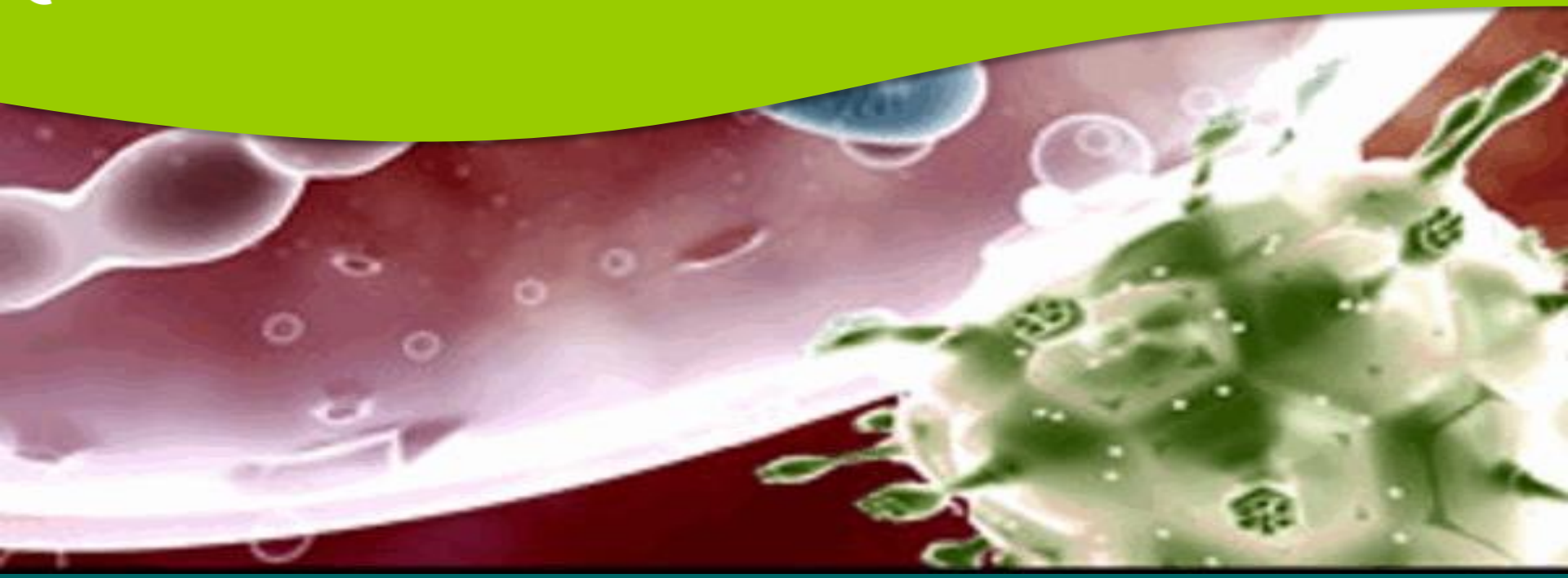
All things are poison, and nothing is without poison; only the dose permits something not to be poisonous.“

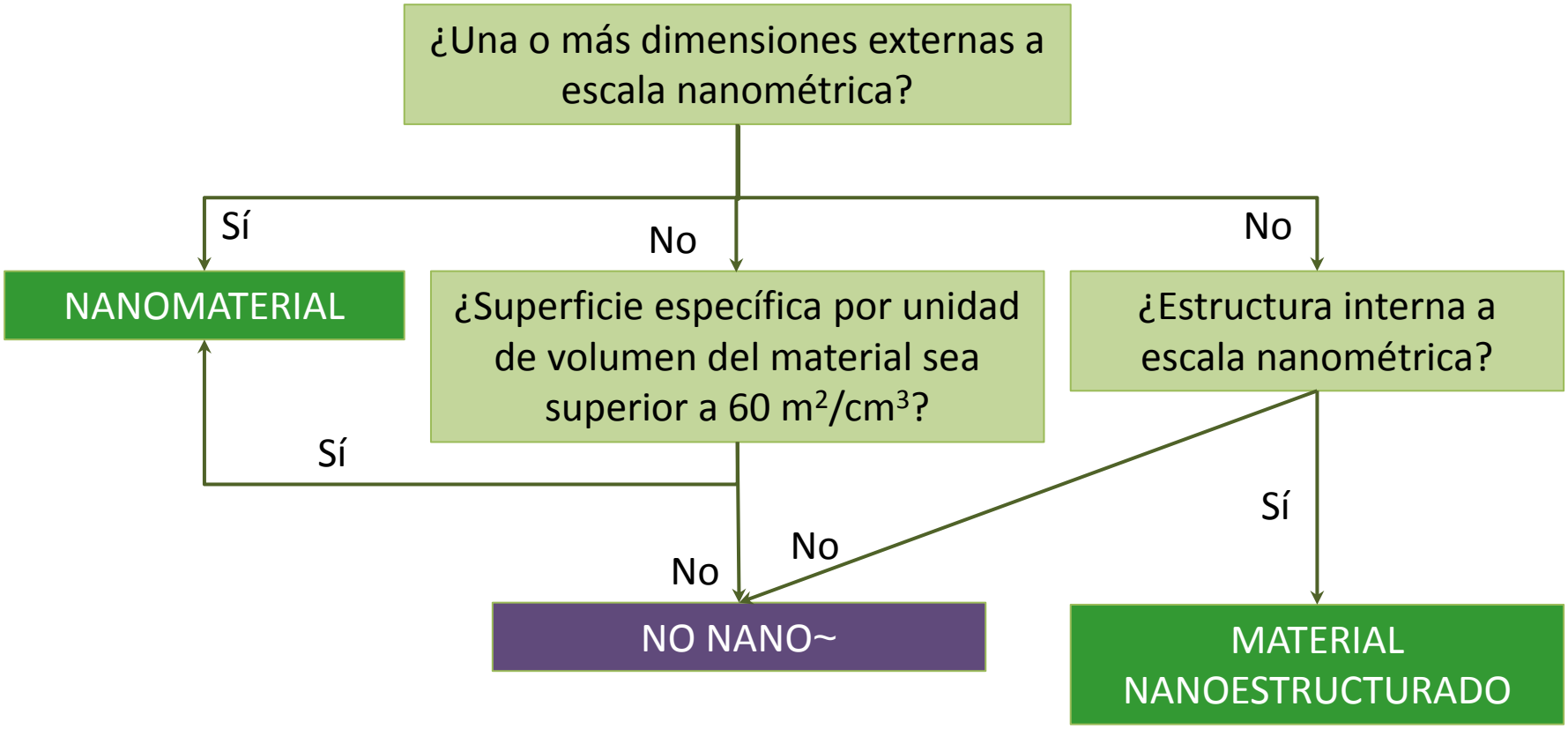
"The dose makes the poison."

Paracelsus 1493-1541

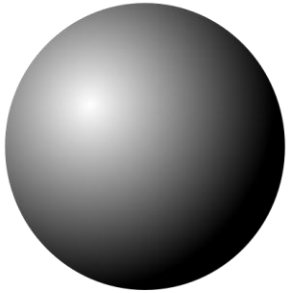


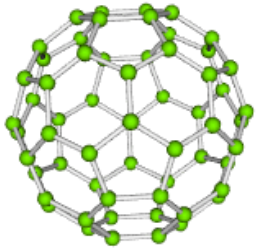
CARACTERÍSTICAS FÍSICO QUÍMICAS DE LOS NANOMATERIALES

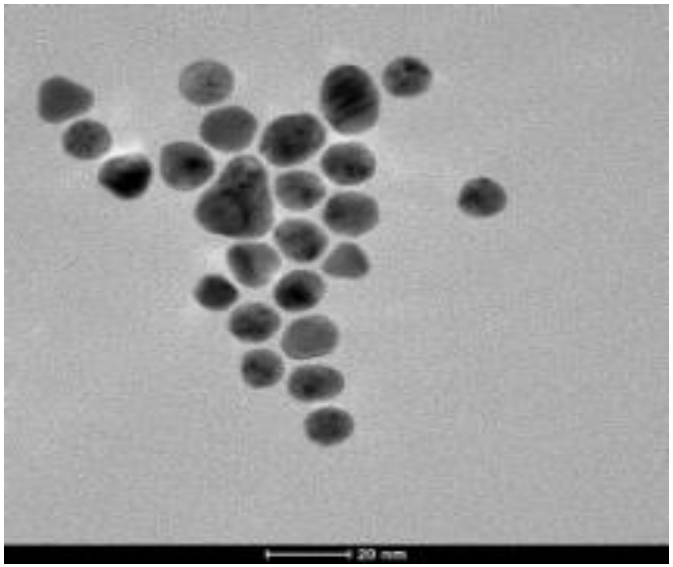


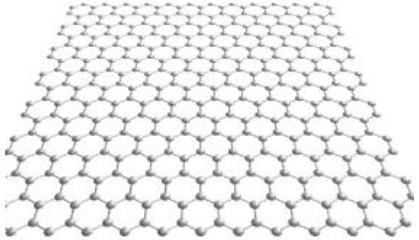

¿Una o más dimensiones externas a escala nanométrica?
Sí
No
No
NANOMATERIAL
¿Superficie específica por unidad de volumen del material sea superior a 60 m²/cm³?
¿Estructura interna a escala nanométrica?
Sí
Sí
No
No
NO NANO~
MATERIAL NANOESTRUCTURADO

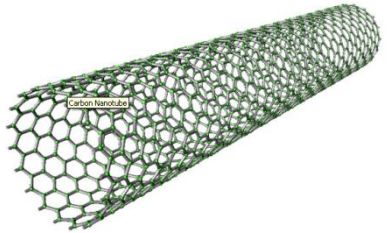
CARACTERÍSTICAS FÍSICO QUÍMICAS DE LOS NANOMATERIALES
FORMA

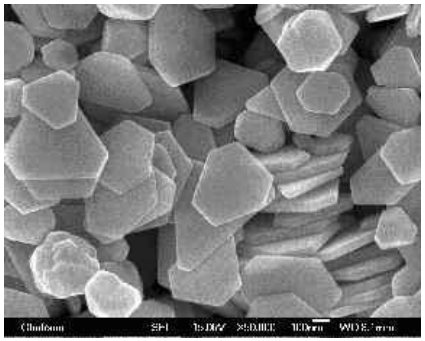


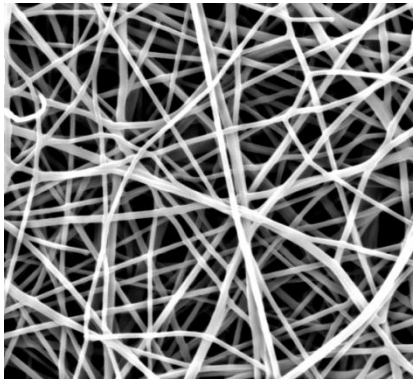


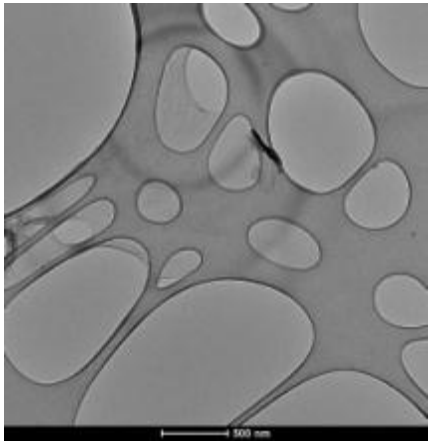


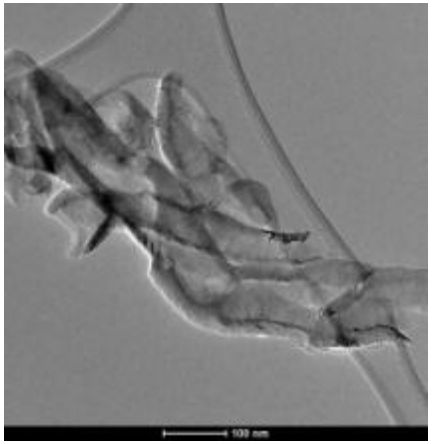




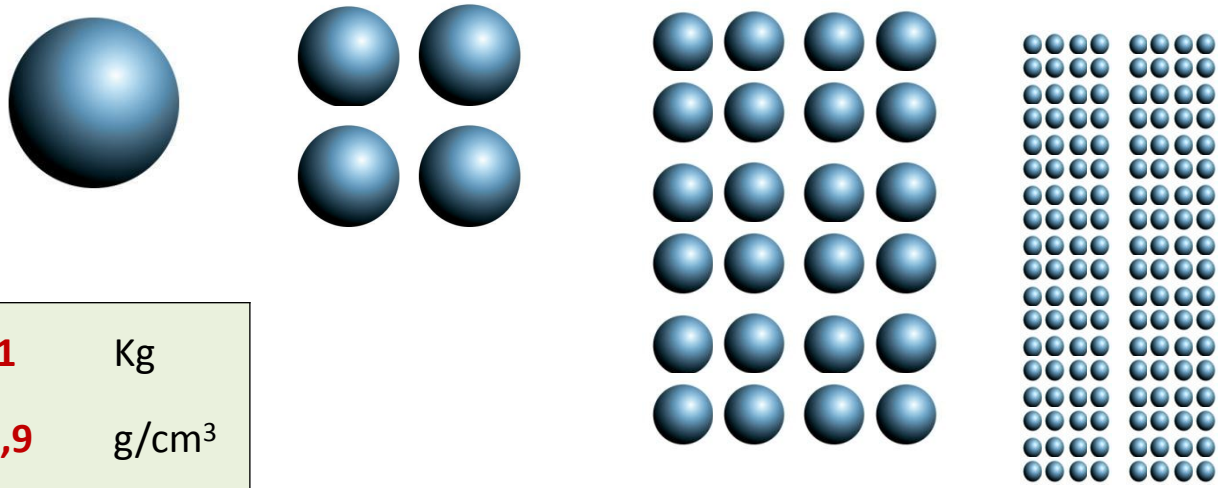








AREA SUPERFICIAL

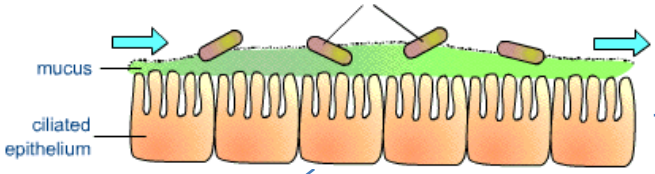


Masa	**1**	Kg
densidad	**3,9**	g/cm^3
Volumen	**2,56E+05**	mm^3

Diametro particula	7,88E+01	mm	1,00E+00	mm	1,00E-03	mm	1,00E-06	mm
Nº partículas	1,00E+00		4,90E+05		4,90E+14		4,90E+23	
Areas superficial	**1,95E+04**	**mm^2**	**1,54E+06**	**mm^2**	**1,54E+09**	**mm^2**	**1,54E+12**	**mm^2**

SOLUBILIDAD (BIOPERSISTENCIA)

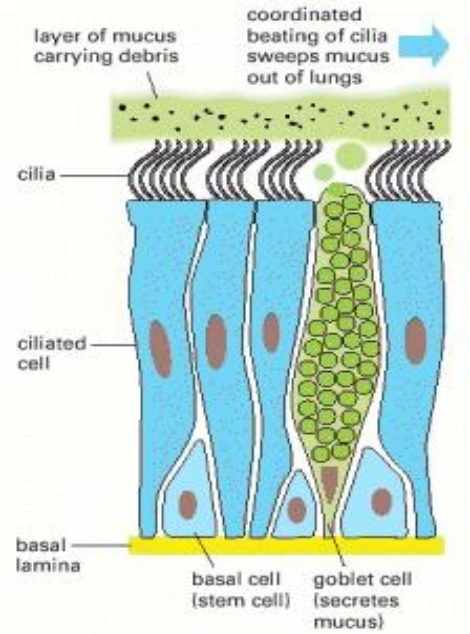
NM solubles



Metabolismo

Torrente sanguíneo → Acumulación → Excreción

NM insolubles



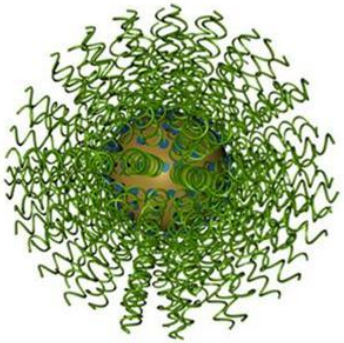
- Expulsadas por células ciliadas y tragadas

- Se acumulan en la región alveolar
- Son fagocitadas
- Interaccionan con otras células del sistema inmune

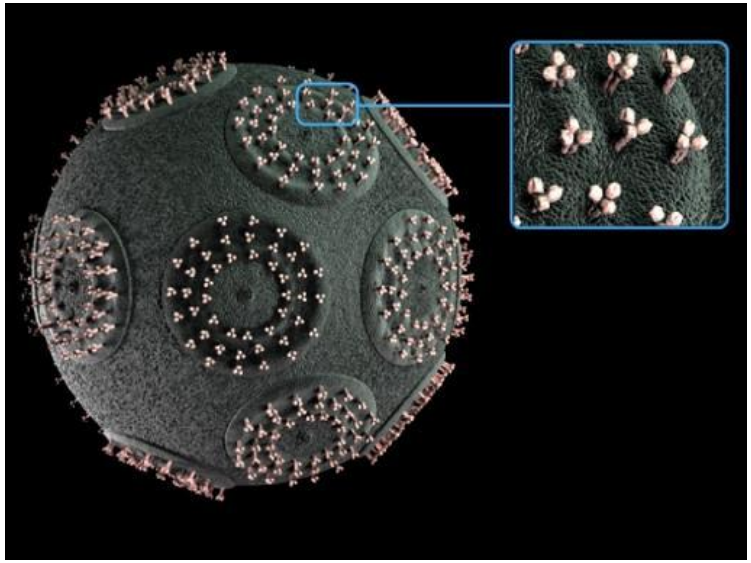
COMPOSICIÓN QUÍMICA, ESTRUCTURA Y RECUBRIMIENTO SUPERFICIAL

Más allá del tamaño y la forma, existen infinitas posibilidades adicionales basadas en nuevas modificaciones o funcionalizaciones superficiales que permiten ajustar tanto la estructura como las propiedades de los nanomateriales

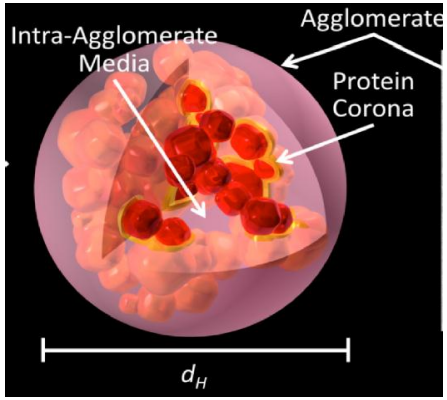
El mecanismo de daño se ve influenciado por la corona proteica que recubre a los NM en el interior de las células



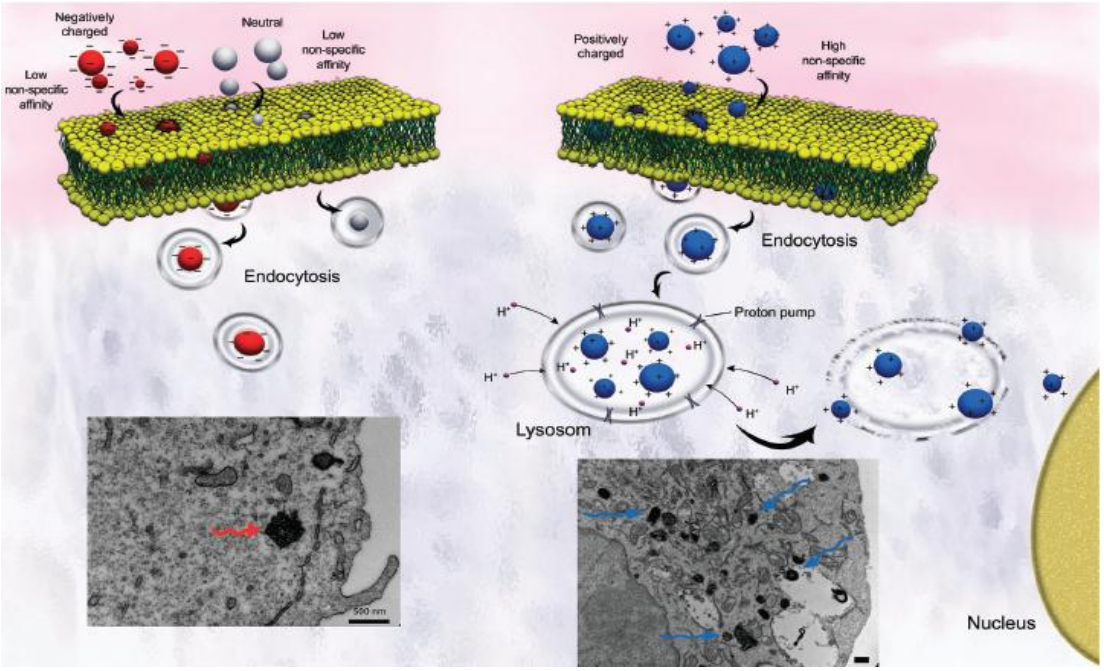
http://www.psmicrographs.co.uk/blog/



http://www.nanotech-now.com/news.cgi?story_id=37127



Los NM con carga superficial positiva interactúan con los lisosomas y pueden acceder más fácilmente al interior de la célula



Sample Description	BET S. A. (m^2/g) (Micromeritics Analytical Services)	Calculated Avg. Particle Size from BET	Mean Particle Size Diameter by Volume Measured using TEM (MVA Scientific Consultants)	Mean Particle Size by DLS
Tantalum	89.73	8 nm	6.8 nm	316 nm
$TiSi_2$	97.25	19 nm	12.6 nm	157 nm
Nickel	26.3	35 nm	23.6 nm	1.3 micrometers
Carbon	62.05	45 nm	31 nm	Not Available

Diámetros medios de partícula **EFECTIVOS:**

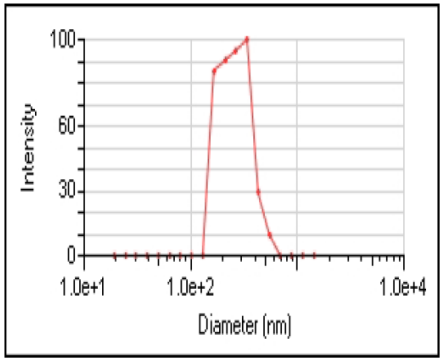
NOAA: nano-objetos y sus agregados o aglomerados

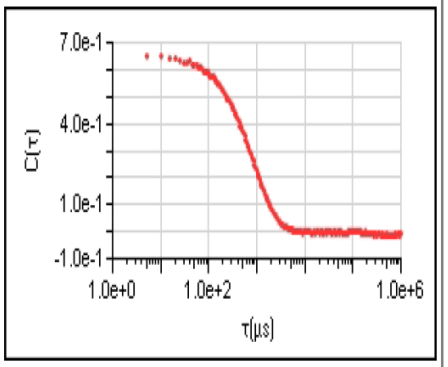
ESTADO DE AGLOMERACIÓN (NOAA) Y DISTRIBUCIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA

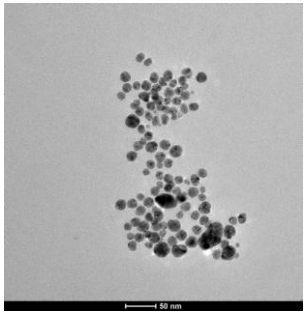
Brookhaven Instruments

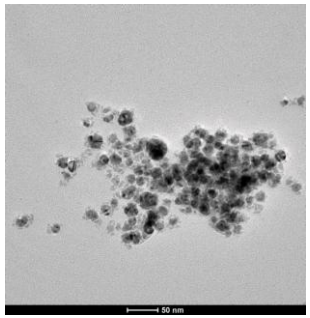
Basic DLS Report

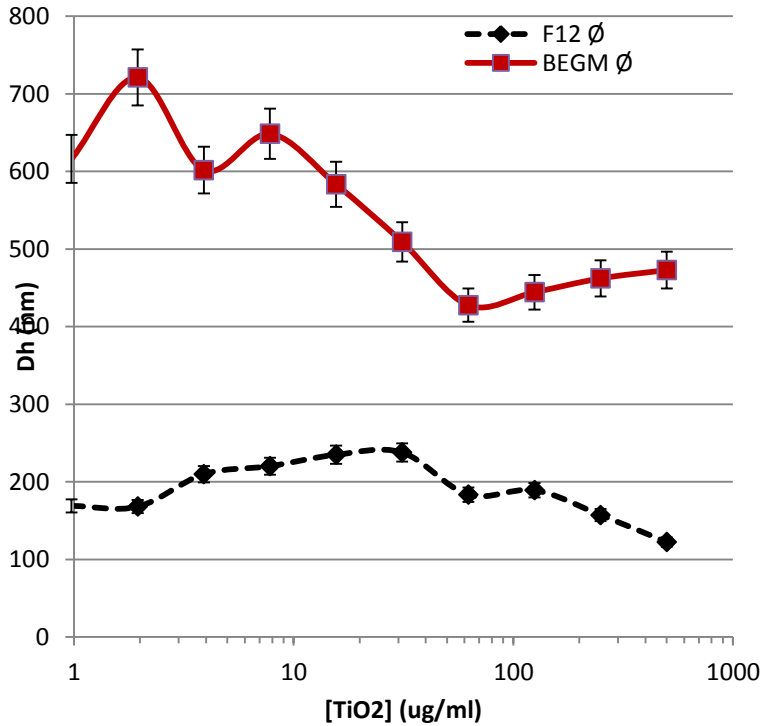
Sample		Results	
Type:	DLS	Eff. Diam. (nm):	279.17
Sample ID:	TiO2+H20 C7	Polydispersity:	0.176
Operator ID:	Unknown Operator		
SOP ID:	X1053		
Start Date/Time:	10/10/2013 18:02:57		
Notes:			











EL PROYECTO NANOREG Y LA INICIATIVA EHS ADVANCE

NANOREG

A common European approach to the regulatory testing of nanomaterials

EHS advance

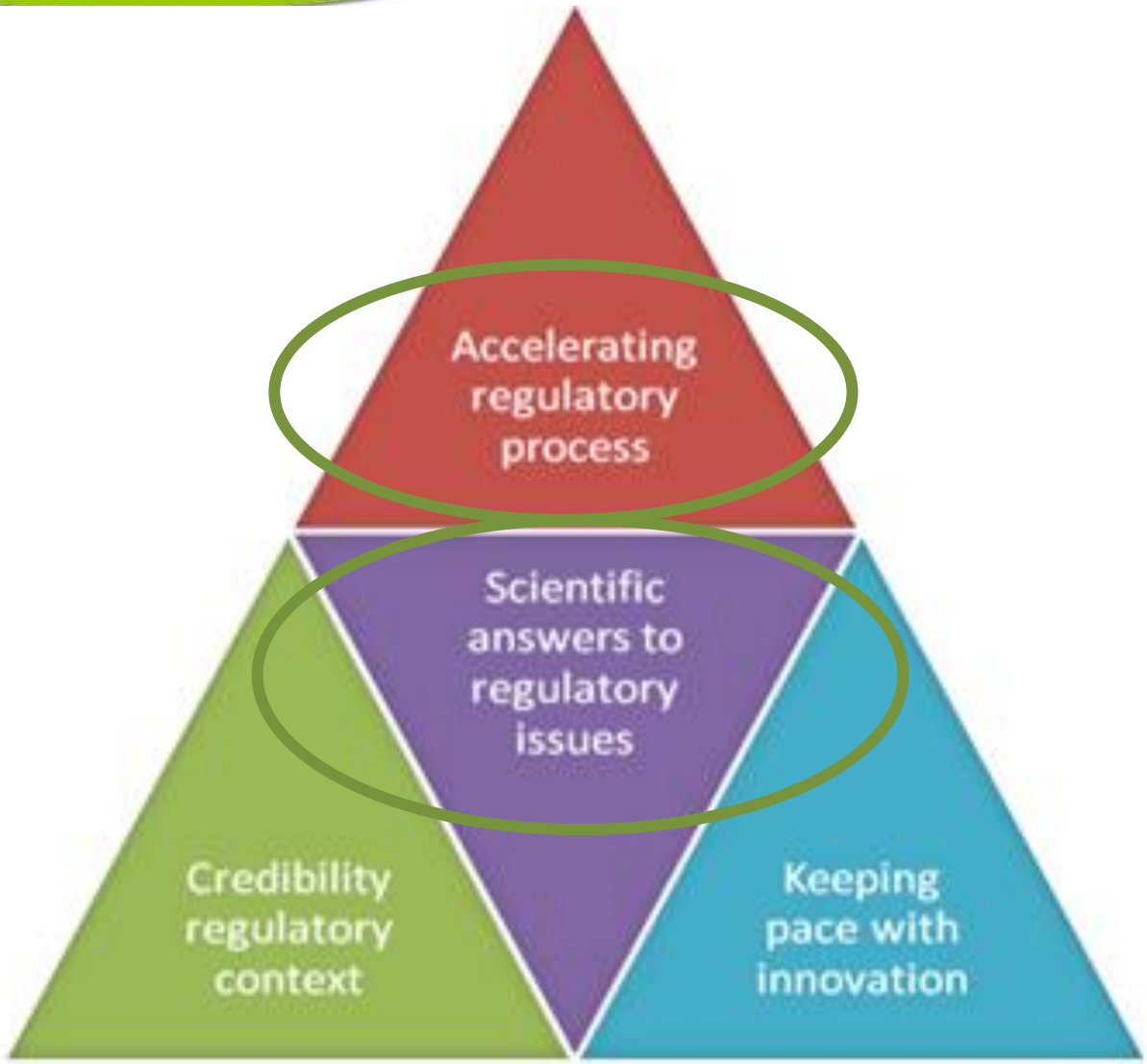
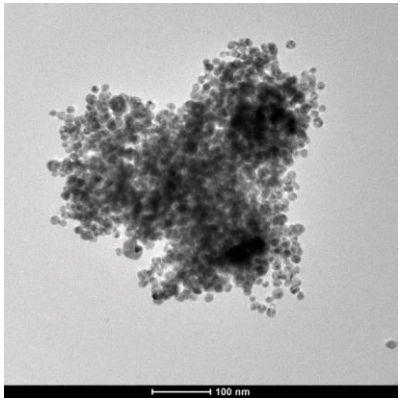

Accelerating regulatory process
Scientific answers to regulatory issues
Credibility regulatory context
Keeping pace with innovation

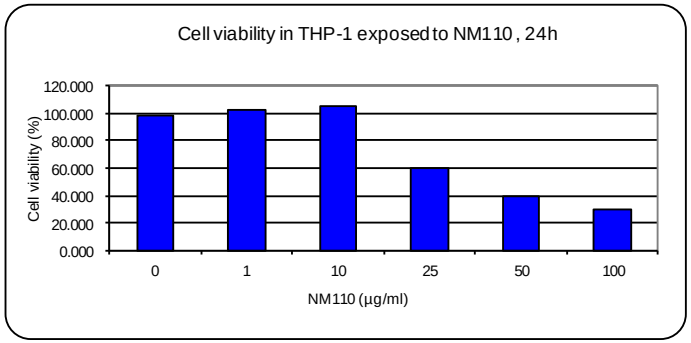
Table 2: List of selected NM representative Nanomaterials in the JRC NM Repository.

NM-Code	Label code	
NM-100	Titanium dioxide	anatase, pigment
NM-101	Titanium dioxide	anatase
NM-102	Titanium dioxide	anatase
NM-103	Titanium Dioxide	thermal hydrophobic
NM-104	Titanium Dioxide	thermal hydrophilic
NM-105	Titanium dioxide	rutile-anatase
NM-110	Zinc oxide	uncoated
NM-111	Zinc oxide	coated Triethoxycaprylylsilane
NM-200	Synthetic Amorphous Silica	PR-A-02
NM-201	Synthetic Amorphous Silica	PR-B-01
NM-202	Synthetic Amorphous Silica	PY-AB-03
NM-203	Synthetic Amorphous Silica	PY-A-04
NM-204	Synthetic Amorphous Silica	PR-A-05
NM-211	Cerium (IV) Oxide	
NM-212	Cerium (IV) Oxide	
NM-300	Silver, < 20 nm	
NM-300DIS	Silver dispersant	matrix control
NM-300K	Silver, < 20 nm	
NM300K DIS	Silver dispersant	matrix control
NM-400	Multi-Walled Carbon Nanotubes	
NM-401	Multi-Walled Carbon Nanotubes	
NM-402	Multi-Walled Carbon Nanotubes	
NM-403	Multi-Walled Carbon Nanotubes	
NM-600	Bentonite	

NM estudiados:

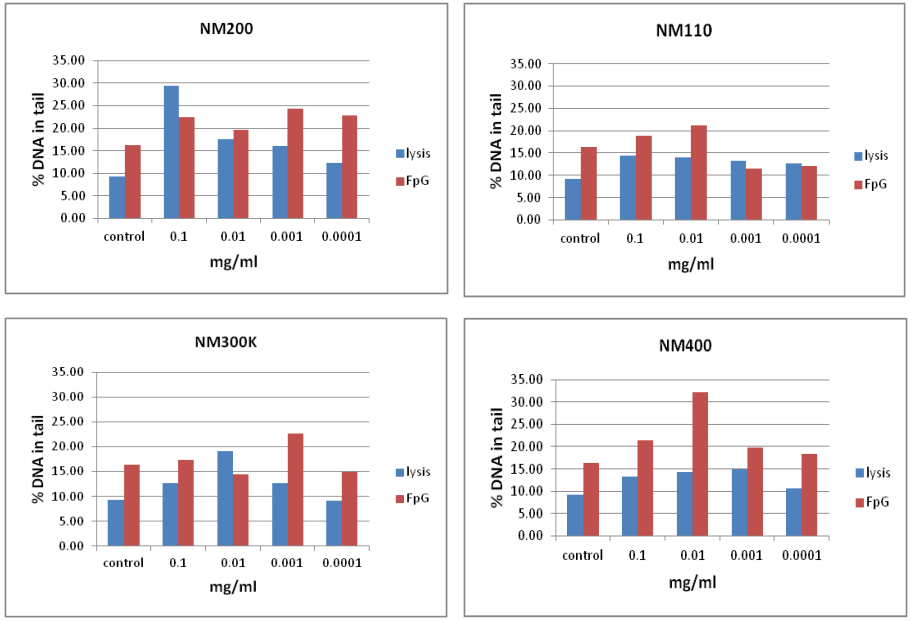
- TiO_2 (NM100, NM101)
- ZnO (NM 110)
- SiO_2 (NM 200, NM 203)
- CeO_2 (NM 212)
- Ag (NM 300k NM 302)
- Nanotubos de carbono (NM 400, NM 401, NM 402, NM 403)





Ensayos realizados:

- Citotoxicidad MTS, Apoptosis / necrosis
- Genotoxicidad Micronúcleos
- ROS
- Inflamación, Apoptosis / necrosis



Sistemas experimentales:

- A549 (alveolar)
- BEAS2 (Bronquial)
- Thp1 (Sistema inmune)
- HepG2 (hígado)
- caCO2 (intestino)
- 3T3 (Fibroblastos)

NANOMATERIALES-MECANISMOS DE DAÑO CELULAR

	3T3		CACO2		A549		HEGP2	
	Average	Desvest	Average	Desvest	Average	Desvest	Average	Desvest
CONTROL	7.70	2.11	13.67	2.24	6.71	0.39	10.51	2.41
H2O2	**51,51****	**3.49**	**24,74***	**3.02**	**29,11****	**1.87**	**24,43****	**1.93**
NM110	**65,12****	**4.92**	**39,01****	**3.45**	**31,31****	**2.71**	11.50	0.51
NM110 0,5	**69,52****	**2.32**	**35,41****	**2.29**	**26,20****	**1.68**	14.09	0.45
NM300k	13.08	1.87	**39,81****	**5.91**	4.37	0.41	10.15	0.04
NM300k 0,5	5.07	1.14	**35,74****	**7.17**	3.87	0.50	11.28	0.32
NM100	2.24	0.43	6.95	2.85	5.01	0.76	15.50	1.92
NM101	2.43	0.21	13.59	4.50	5.21	0.28	10.13	2.41
NM400	**22,8***	**1.35**	**31,425****	**10.58**	5.18	0.53	**23,01****	**2.03**
NM401	5.87	1.01	15.24	3.83	7.99	2.21	17.13	3.64
NM402	**51,63****	**2.05**	**34,25****	**3.02**	**13,67***	**4.62**	**29,63****	**7.76**
NM200	6.60	0.25	**20,80***	**4.86**	3.28	0.68	**19,50***	**1.76**
NM203	**14,25***	**1.90**	**19,25***	**2.99**	**10,29***	**1.18**	**24,35****	**2.76**
NM212	3.34	0.64	16.32	0.54	7.07	2.40	4.62	1.05
NM220	9.42	3.50	14.30	0.60	6.19	2.21	7.26	2.71

* 0,05

** 0,005

MISIÓN

Centro de competencia **distribuido, basado en la RVCTI**, para dar servicio y respuesta a todas las cuestiones relacionadas con la **seguridad, salud, y medio ambiente de los nanomateriales** desde la industria, centros de I+D y universidades, buscando el efecto sinérgico de hacer confluir las capacidades de evaluación, análisis, ensayos y la existencia de infraestructuras específicas en Euskadi, con una fuerte interrelación con organismos con las mismas inquietudes a nivel europeo

UN ÚNICO PUNTO DE CONSULTA DE ASPECTOS nano EHS

SERVICIOS A TERCEROS: EMPRESAS, AGENTES CIENTÍFICO-TECNOLÓGICOS

- Estudios, análisis y ensayos sobre toxicología y ecotoxicología
- Evaluación y control de riesgos en procesos
- Implantación de guías metodológicas
- Formación
- Vigilancia

INICIATIVA EHS ADVANCE
GUÍAS

EHS advance

Regulaciones y Políticas
Guía práctica sobre normativas específicas para nanomateriales en la industria

EHS advance

ÍNDICE

1. GUÍA DE SIGLAS 1
2. INTRODUCCIÓN 2
3. NORMATIVAS, GUÍAS, INFORMES Y RECOMENDACIONES 3
3.1. SUSTANCIAS Y PREPARADOS QUÍMICOS 3
3.2. MANIPULACIÓN Y PROCESADO (SEGURIDAD Y SALUD OCUPACIONAL) 6
3.3. PRODUCTO 8
3.3.1. Productos Biocidas 8
3.3.2. Productos Cosméticos 10
3.3.3. Productos Alimentarios 12
3.3.3.1. Aditivos alimentarios 12

EHS advance

GUIA EHS – SEGURIDAD Y SALUD OCUPACIONAL

EHS advance

ÍNDICE

GUÍA DE SIGLAS 3
RESUMEN EJECUTIVO 4
INTRODUCCIÓN 6
OBJETO Y ALCANCE DE ESTA GUÍA 7
1. CONCEPTO DE NANOMATERIAL, CATEGORÍAS Y SECTORES INDUSTRIALES 8
1.1. CONCEPTO DE NANOMATERIAL Y TERMINOLOGÍA BÁSICA 8
1.2. CATEGORÍAS DE NANOMATERIALES 11
1.2. UTILIZACIÓN DE LOS NANOMATERIALES Y SECTORES INDUSTRIALES 12
2. LOS PELIGROS DE LOS NOAA 14
2.1. TOXICOLOGÍA BÁSICA 14
2.2. RUTAS DE EXPOSICIÓN OCUPACIONAL 16
2.3. PELIGROS RELACIONADOS CON INCENDIOS Y EXPLOSIONES 17

EHS advance

GUÍA PARA LA EVALUACIÓN DE RIESGOS PARA EL MEDIO AMBIENTE APLICADA A EMPRESAS QUE INCORPORAN NANOMATERIALES EN SUS PROCESOS

ÍNDICE

1. RESUMEN EJECUTIVO 3
2. GLOSARIO 5
3. ASPECTOS GENERALES DEL METODO 6
3.1. OBJETIVO DE LA GUÍA: AUDIENCIA Y ALCANCE DEL ESTUDIO 6
3.2. CONTEXTO LEGISLATIVO DE LA GUÍA 6
3.3. ANÁLISIS MEDIOAMBIENTAL E IDENTIFICACIÓN DE ASPECTOS AMBIENTALES A CONSIDERAR 15
3.4. CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LOS ASPECTOS MEDIOAMBIENTALES Y SU NIVEL DE IMPACTO 21
4. ANALISIS DEL PROCESO 23
4.1. RECOPILACIÓN DE INFORMACIÓN GENERAL DE LA EMPRESA 23
4.2. DESCRIPCIÓN DE LOS PROCESOS Y OPERACIONES EXISTENTES 25
4.3 IDENTIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN DE ASPECTOS AMBIENTALES ASOCIADOS A CADA OPERACIÓN DEL PROCESO Y SU IMPACTO 26
5. EVALUACIÓN DEL RIESGO AMBIENTAL 28
5.1. INTRODUCCIÓN 28
5.2. EVALUACIÓN DE RIESGO AMBIENTAL DE LAS EMISIONES ATMOSFÉRICAS 29
5.3. EVALUACIÓN DEL RIESGO AMBIENTAL DE LOS VERTIDOS AL AGUA 32
5.4. EVALUACIÓN DEL RIESGO AMBIENTAL DE LOS VERTIDOS AL SUELO 35
5.5. EVALUACIÓN DEL RIESGO AMBIENTAL DE LOS RESIDUOS 37
5.6. EVALUACIÓN DE RIESGO AMBIENTAL EN CONDICIONES DE EMERGENCIA 42
6. MEDIDAS DE PREVENCIÓN 45
6.1. CONTROL DE LA EXPOSICIÓN 45
6.2. CONTROLES TÉCNICOS: EQUIPAMIENTO E INSTALACIONES 45
6.3. CONTROLES ORGANIZACIONES 55
7. BIBLIOGRAFÍA 61
8. ANEXO I. REGLAMENTACIÓN Y NORMATIVA DE APLICACIÓN 63
9. ANEXO II. FRASES PARA LA CLASIFICACION SEGÚN DIRECTIVA 67/548/CE 73
10. ANEXO III. EJEMPLOS DE ECOTOXICIDAD DE VARIOS NANOMATERIALES 124

® 2014 EHS Advance 2

HERRAMIENTAS DE CONTROL BANDING

						1
BANDA DE EXPOSI	2	3	3	2	2	1
	3	3	2	**2**	1	1
	4	2	1	1	1	1

MEDIDAS EXPOSICIÓN VS CONTROL BANDING

¿Por qué no hacer medidas directas de exposición?

- No existen límites de exposición regulados (tan sólo a nivel de recomendación)
- Dificultad en la realización de medidas (fondo/background de NM, caracterización de NM aspirado)
- Coste económico de las medidas y análisis asociados

Control banding
- Stoffenmanager nano
- ISO PDTS 12901-2

BANDAS DE CLASIFICACIÓN

BANDA DE PELIGROSIDAD

La Norma ISO PDTS 12901-2 indica que para valorar la peligrosidad se puede hacer uso de un número limitado de ensayos de screening de toxicidad, si bien no indica qué ensayos deberían utilizarse

		BANDA DE PELIGROSIDAD				
		A	B	C	D	E
BANDA DE EXPOSICIÓN	1	3	3	3	2	1
	2	3	3	2	2	1
	3	3	2	2	1	1
	4	2	1	1	1	1

BANDA DE EXPOSICIÓN

- Esquemas de clasificación de la Norma ISO/PDTS 12901-2 → BANDA DE CONTROL (CB)
- Fundamentos de la herramienta Stoffenmanager nano. Aspectos considerados:
  - Presentación del nanomaterial
  - Características del mismo
  - Condiciones de operación
  - Controles técnicos
  - EPI utilizados

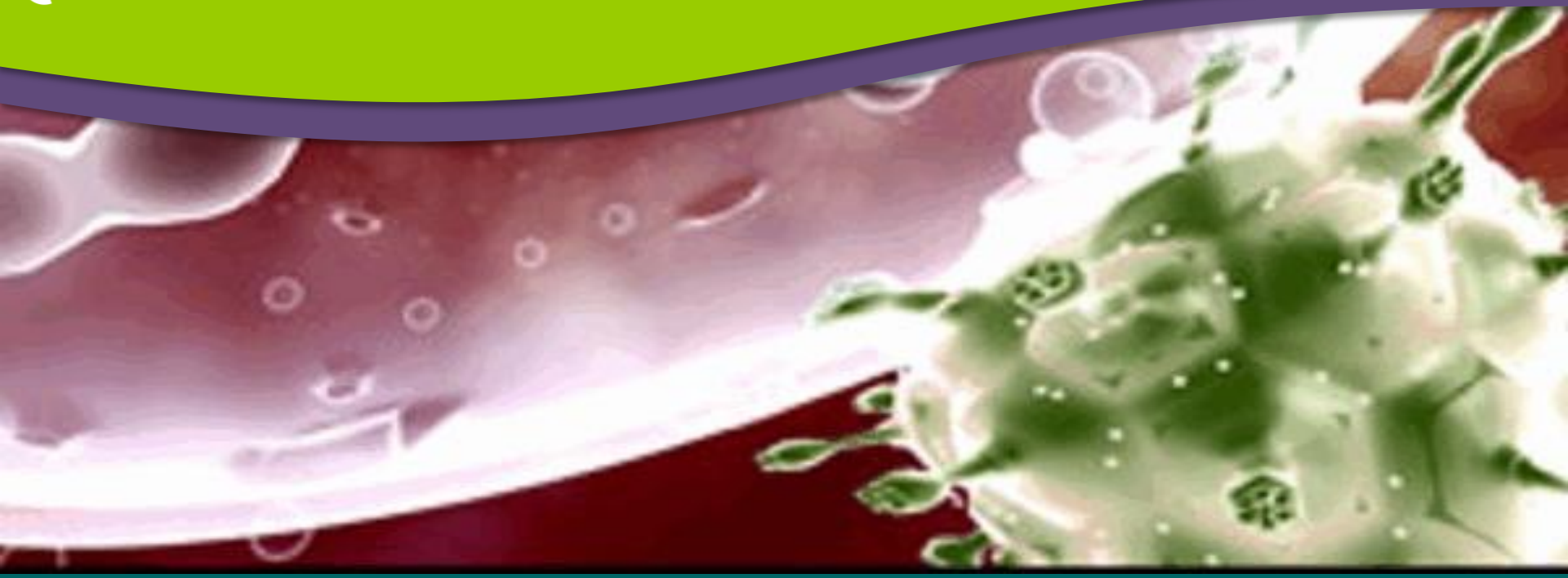
E → T → I → NIVEL DE RIESGO

BANDA DE PELIGROSIDAD. DEFINICIÓN DE NIVELES

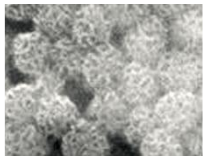
Stoffenmanager nano

Nivel de peligrosidad	Descripción	Características	OEL (mg/m^3)
A	No existe un riesgo significativo para la salud		1-10
B	Ligeramente peligroso / tóxico	• Ligeras reacciones alérgicas	0,1-1,0
C	Peligrosidad moderada	• **Reacciones alérgicas moderadas/fuertes** • Irritante severo • Sin efectos crónicos • Ciertas evidencias de efectos carcinogénicos en animales • Efectos crónicos posibles	0,01-0,10
D	Alta Peligrosidad	• Reprotóxico • Efectos crónicos probables	<0,01
E	Peligrosidad severa	• **Mutagénico** • Carcinogenicidad confirmada en animales/humanos	

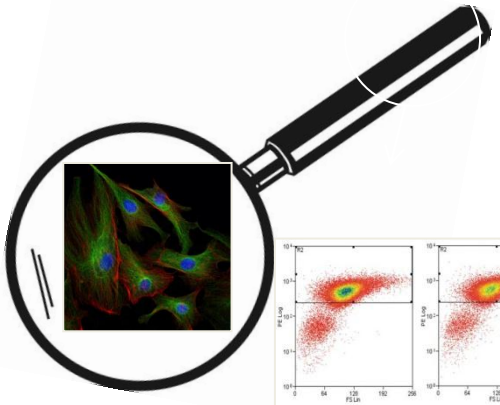
ESTUDIOS DE TOXICIDAD IN VITRO

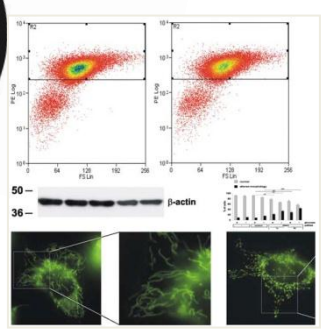


Efecto sobre Sistemas biológicos

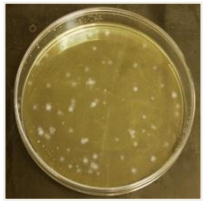


Internalización celular

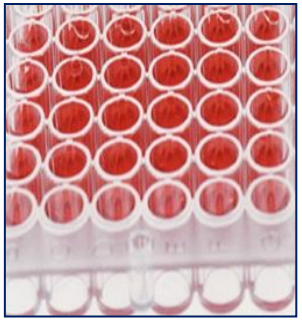




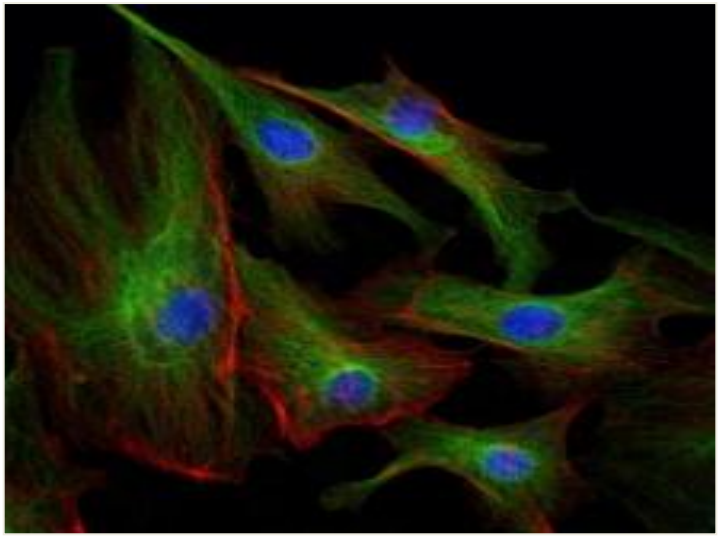
Localización subcelular

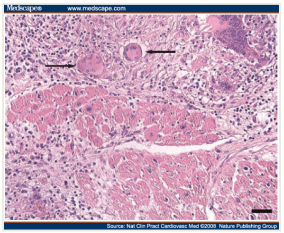


Genotoxicidad



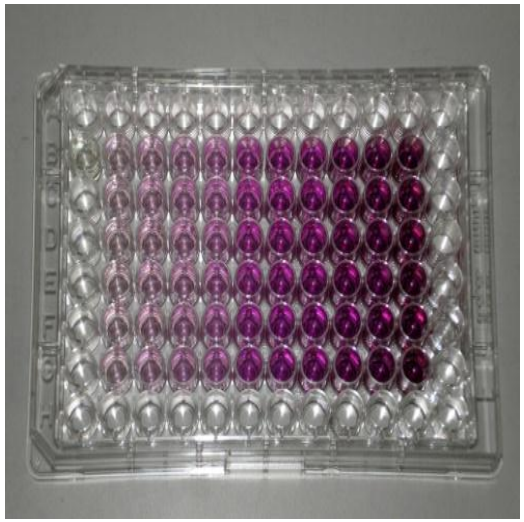
Citotoxicidad y ROS

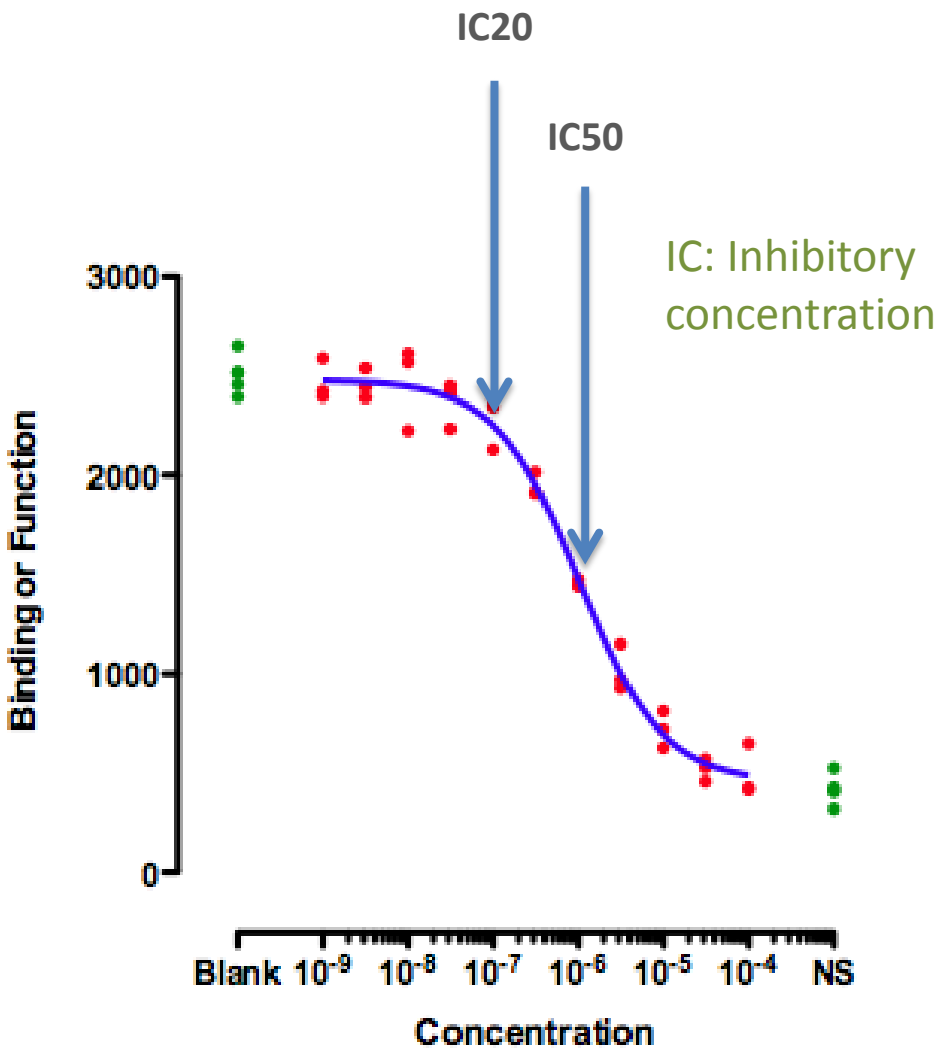




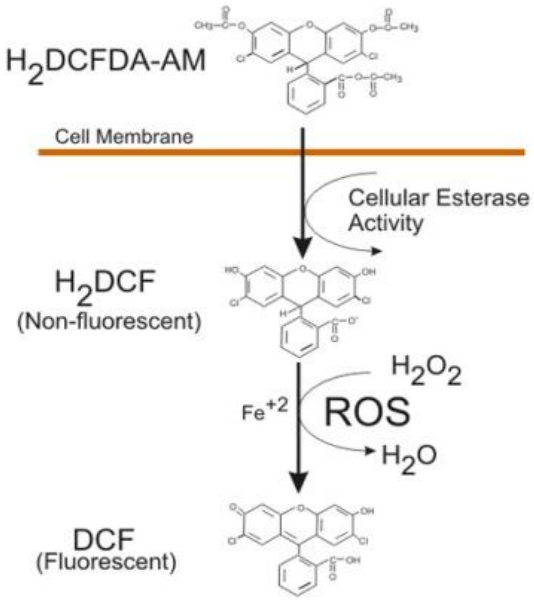
Inflamación

MTS

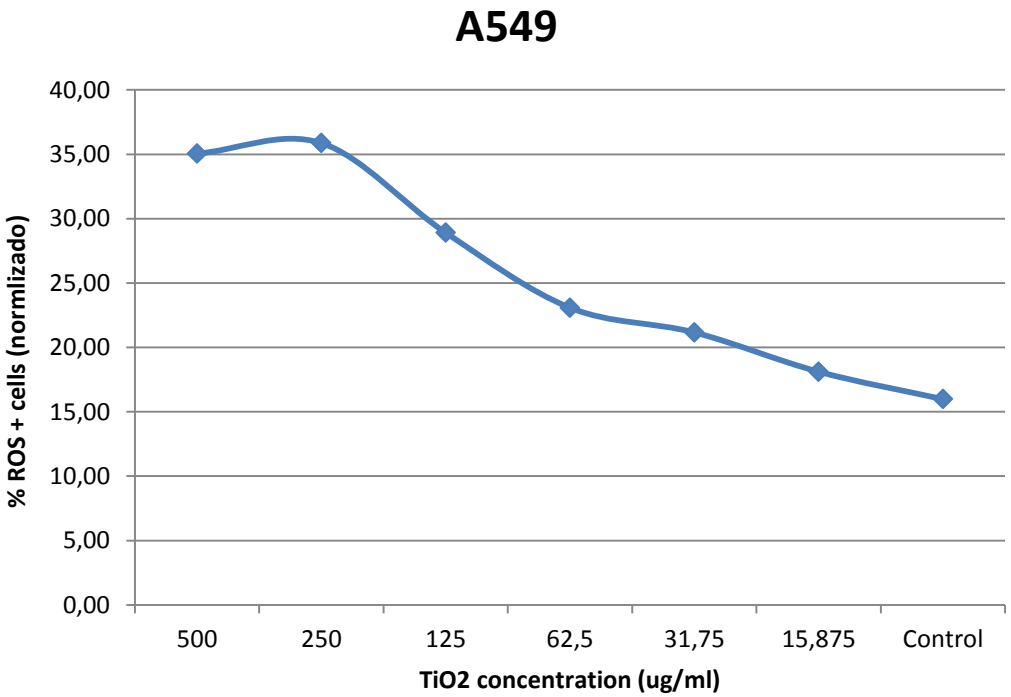



IC20
IC50
IC: Inhibitory concentration
3000
2000
1000
0
Binding or Function
Blank
10^{-9}
10^{-8}
10^{-7}
10^{-6}
10^{-5}
10^{-4}
NS
Concentration

ROS: especies con oxígeno reactivo

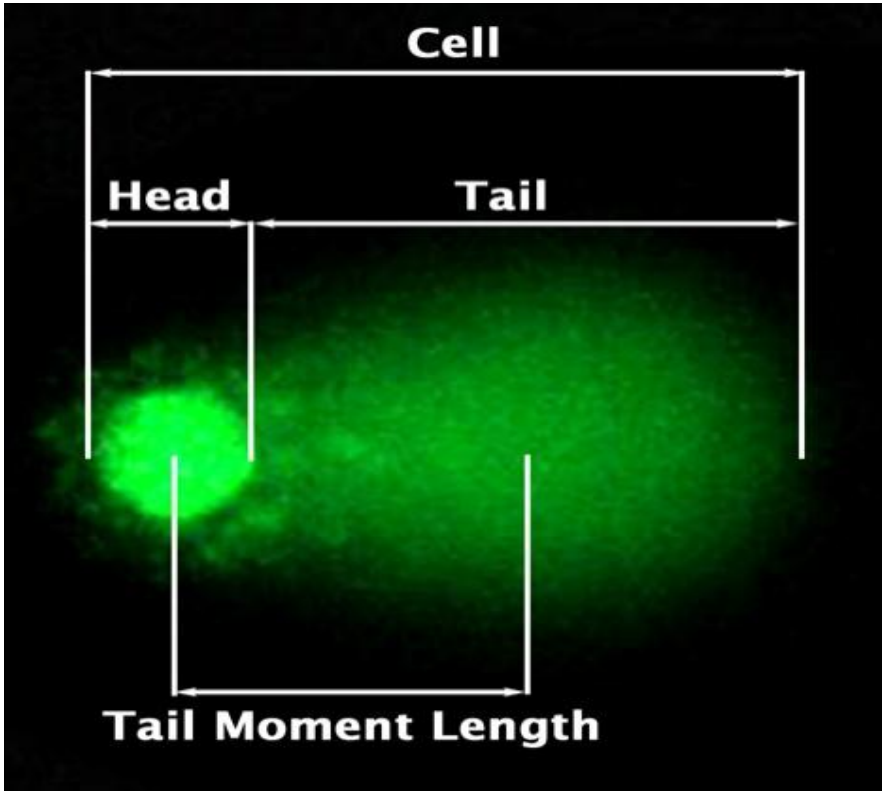


Dosis de ensayo: IC_{10} - IC_{20}



COMET ASSAY

Dosis de ensayo: IC_{10} - IC_{20}



Detección de expresion de interleukinas

Incubación células-NM (24h)

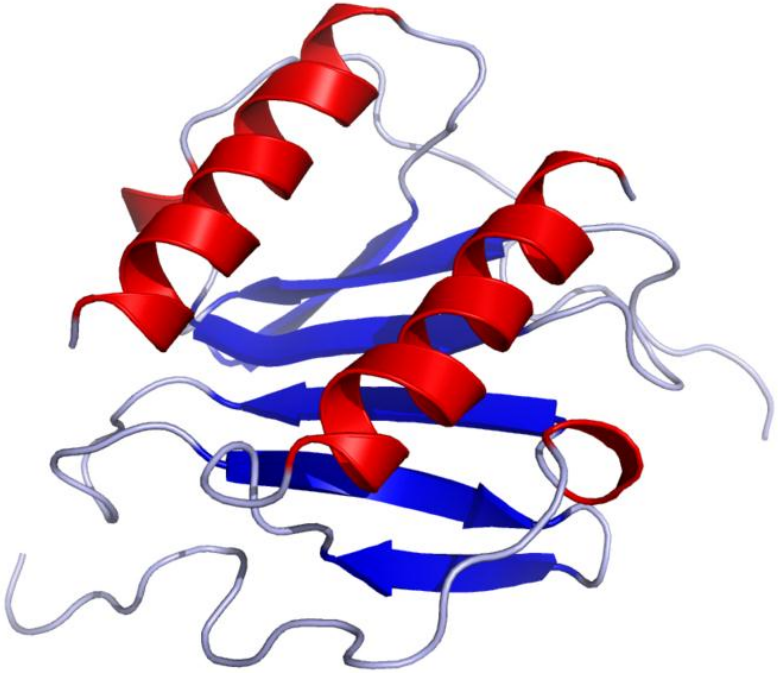
Obtención de sobrenadante a analizar

Incubación con anti-ILX biotinilado

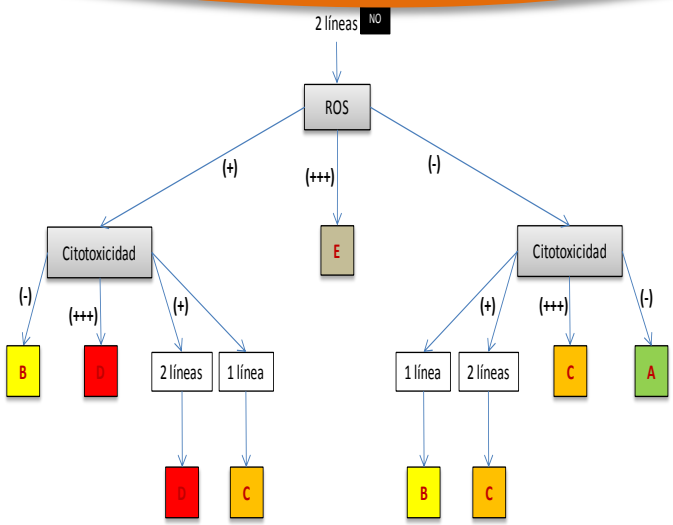
Incubación con Streptavidina marcada

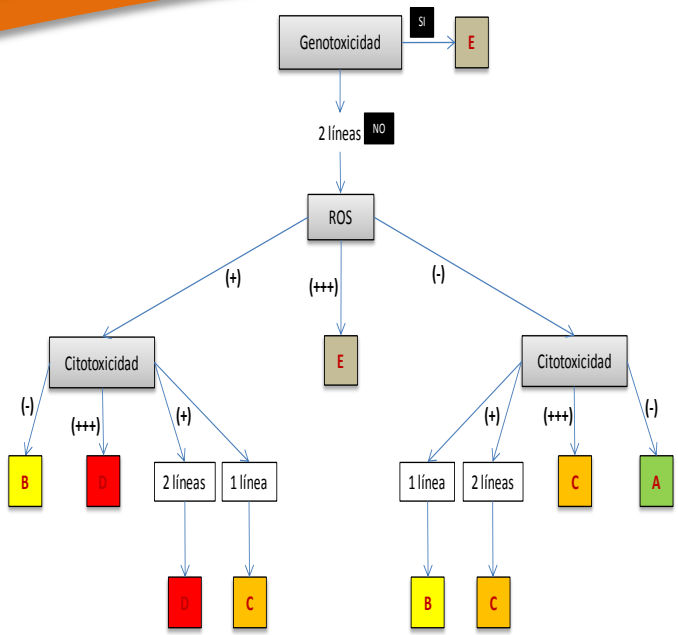
Detección a 450 nm de IL de interés

Dosis de ensayo: IC_{10} - IC_{20}



VALORACIÓN COMBINADA DE PELIGROSIDAD





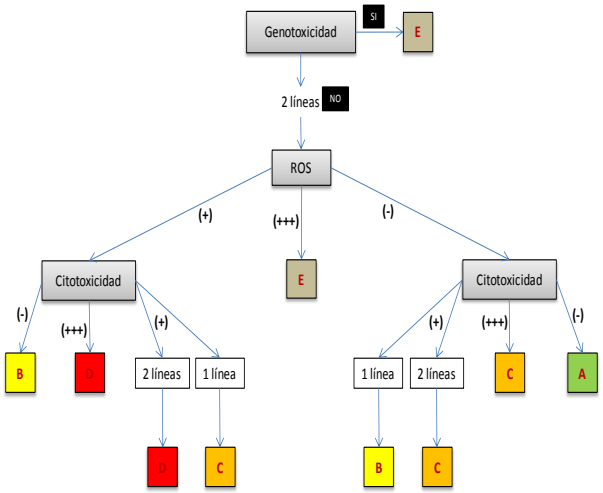
SELECCIÓN DE LA BANDA MÁS SEVERA

Ensayos sobre dos sistemas experimentales:

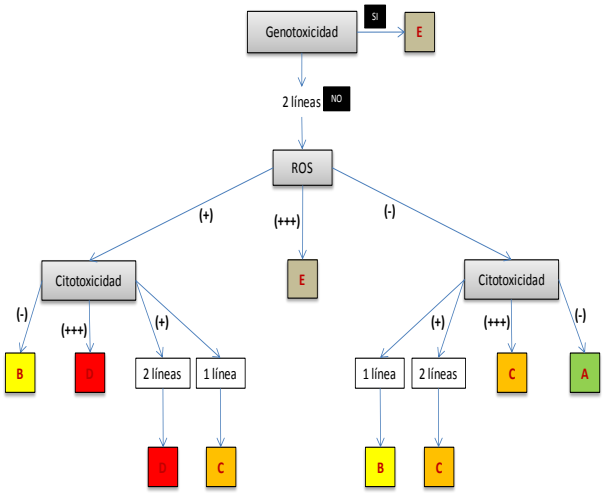
- El más expuesto al NM (A549, BEAS2)
- El correspondiente al sistema inmune

Elección de la clasificación más restrictiva entre los dos sistemas

TOXICIDAD AGUDA



INMUNOTOXICIDAD

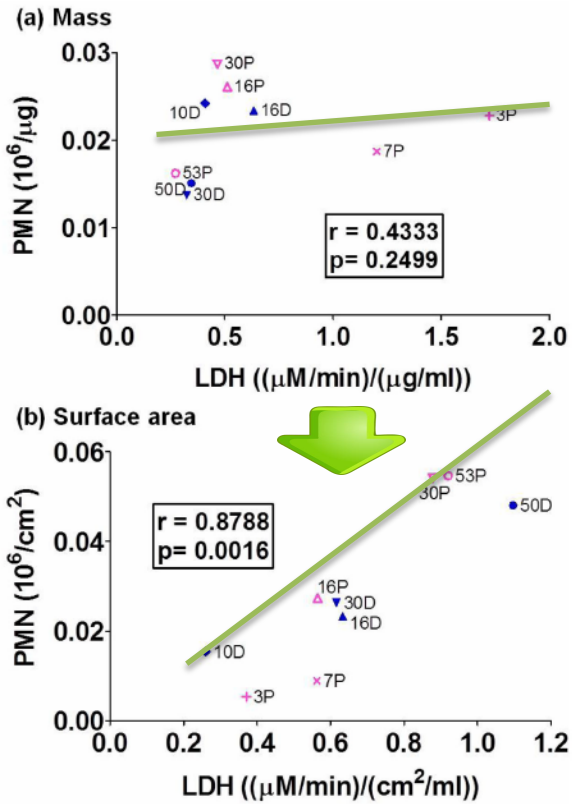


BANDA DE CLASIFICACIÓN POR RESULTADOS CITOTOXICIDAD

- **CITOTOXICIDAD**

- Cambio de métrica a superficie de la cantidad de NM añadido/ Superficie células expuestas → Mejora significativa de la correlación *in vitro- in vivo*

Clasificación	Límite de exposición por inhalación trabajador	Comentarios
A	10	
B	1	
C	0,1	
D	0,01	
E	---	NM clasificados como genotóxicos, carcinogénicos o mutagénicos



- Valores IC_{50} obtenidos se extrapolan a DNEL en humano aplicando un factor de incertidumbre de 100

BANDA DE CLASIFICACIÓN POR RESULTADOS ROS, EFECTO INFLAMATORIO, GENOTOXICIDAD

- **ROS**

VALORACIÓN ROS	CAMBIO ESTADO
<1,50	+0
<<2,50	+1
<4,00	+2
<10,00	+3

- **EFECTO INFLAMATORIO**

Si tiene efecto inflamatorio, se aplica un **mínimo de clasificación C** al nanomaterial. Si la escala ya era superior, se mantiene la existente

>=C

- **GENOTOXICIDAD (si resulta genotóxico)**

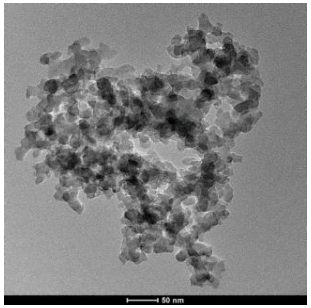
E

DESARROLLO DE UNA HERRAMIENTA DE EVALUACION DEL RIESGO

CONTENIDOS DE LA HERRAMIENTA

- Clasificación y archivo del Nanomaterial ensayado

--- o ---



- Selección del Nanomaterial. Banda de Peligrosidad

- Evaluación del nivel de exposición: Banda de exposición

- Matriz de banda de riesgos / banda de control

		BANDA DE PELIGROSIDAD				
		A	B	C	D	E
BANDA DE EXPOSICIÓN	1	3	3	3	2	1
	2	3	3	2	2	1
	3	3	2	2	1	1
	4	2	1	1	1	1

CLASIFICACIÓN Y ARCHIVO DE NM ENSAYADOS (I)

Características físico-químicas

Verificación condición de NM

Características partícula inhalada y estimación fracciones de deposición en el tracto respiratorio

ASIGNACION DE LA BANDA DE PELIGROSIDAD PARA NANOMATERIALES EN BASE A RESULTADOS DE ENSAYOS IN VITRO

NM seleccionado		Plata	
Nuevo acrónimo asignado al NM		Plata	
Codigo normalizado (NM Code) o comercial			
Referencia de la información			
Grupo NM		Plata	
Forma		Esférica	
Tamaño partícula primaria	d	nm	15
Longitud media de la fibra	L	nm	
Diámetro de la fibra	df	nm	
Ratio L/df	L/df		—
Consideración como fibra			No fibra
Forma final asignada			Esférica
Peso específico	γ	g/cm³	10,50
Area superficial		m²/g	
Superficie específica por unidad de volumen		m²/cm³	0
Solubilidad		g/L	< 0,1 g/L
Verificación de la condición de nanomaterial		Es Nanomaterial	
Carga superficial (Potencial Z)		mV	
Grado de agregación			
Diámetro partícula inhalada		nm	
Diámetro partícula inhalada para cálculo	d_{ae}	nm	15
Límites establecidos			

LIMPIAR DATOS DEL FORMULARIO

RECUPERAR DATOS DEL NANOMATERIAL SELECCIONADO

SOBREESCRIBIR DATOS Y RESULTADOS DEL NANOMATERIAL

BORRAR EL NANOMATERIAL DE LA BASE DE DATOS

NUEVO NANOMATERIAL GRABAR DATOS

Estimación de la fracción depositada en cada zona del tracto respiratorio

Zona naso-faríngea	17,5%	N/A
Zona traq-bronquial	20,0%	BEAS 512
Zona Alveolar	47,5%	A549
Total depositado respecto a inhalado	85,0%	

CLASIFICACIÓN Y ARCHIVO DE NM ENSAYADOS (II)

Definición de características hidrodinámicas

Introducción de resultados de ensayos

Definición de condiciones de ensayo

Cambio de métrica resultado

CARACTERÍSTICAS HIDRODINÁMICAS DEL NANOMATERIAL EN EL MEDIO DE ENSAYO

			Zona Alveolar	Sistema inmune
Diámetro hidrodinámico (DLS)	dh	nm	298	576
Densidad efectiva nanoagregado o aglomerado	ρ_E	g/cm^3		1,35
Densidad efectiva estimada		g/cm^3	1,61	1,61
densidad efectiva usada en el cálculo	ρ_E	g/cm^3	**1,613**	**1,35**

RESULTADOS IN VITRO			Zona Alveolar	Sistema inmune
Efecto inflamatorio a la concentración de IC_{20}			**NO**	**NO**
Genotóxico			**NO**	**NO**
			Toxicidad aguda (IC_{50})	
Zona de análisis			**Zona Alveolar**	**Sistema inmune**
End Point			IC_{50}	IC_{50}
Sistema experimental			**A549**	**Thp1**
Concentración en masa en el end-point		µg/mL	100,0	100,0
Volumen del pocillo	V_{well}	mL	0,2	0,2
Diámetro del pocillo	d_{well}	mm	6,4	6,4
Area del pocillo	**A_{well}**	**cm^2**	**0,322**	**0,322**
Concentración a convertir	C	µg/mL	100,00	100,00
Masa de nanomaterial en el end point	$M= C.V_{well}$	µg	20	20
Nº total de NOAA	$N = M/(V_H. \rho_E)$		894.845.820	894.845.820
Area superficial de NM dosificado	**$SA = N.S_H$**	**cm^2**	**2,496**	**2,496**
Dosis superficial aplicada de NM	**SA/ A_{well}**	**cm^2_{NM} / cm^2_{well}**	**7,760**	**7,760**

CLASIFICACIÓN Y ARCHIVO DE NM ENSAYADOS (III)

Extrapolación a niveles de inhalación en humano

Area superficial de NM dosificado		**cm^2_{NM} / cm^2_{PAR}**	**38,802**	**18,237**
Area broncoalveolar afectada en humanos		cm^2	35.000	35.000
Area superficial inhalada de nanomaterial		**cm^2_{NM}**	1.358.060	638.288
Cantidad de NM inhalada		mg	10879,73	5113,47
nº días			1	1
tRV humano		m3/día	10,00	10,00
Dosis depositada	Cd	mg/m3 work day	1087,97	511,35
Zona del tracto respiratorio			Zona Alveolar	Zona Alveolar
% depositado en la zona	p_z	%	18,9%	18,9%
Dosis inhalable calculada en base a IC50	**C_{inh} = Cd/ P_z**	**mg/m3 work day**	**5.760**	**2.707**
Factor de incertidumbre (Assessment factor)	AF		100	100
Derived No Effect Level	**DNEL**	**mg/m3 work day**	**57,60**	**27,07**
Indice de la banda de peligrosidad			1	1
Indice preliminar de peligrosidad			**A**	**A**

Valoración combinada de resultados de ensayos y asignación de la banda de peligrosidad

VALORACION ROS (Incremento de banda de peligrosidad)	2	1
Indice corregido	3	2
Indice preliminar CITO+ROS	**C**	**B**
Inclusión Valoración Efecto Inflamatorio	**3**	**2**
Indice corregido	**C**	**B**
Inclusión Valoración Genotoxicidad	3	2
Indice corregido	**C**	**B**

BANDA DE PELIGROSIDAD ASIGNADA C

EVALUACIÓN DEL NIVEL DE EXPOSICIÓN: BANDA DE EXPOSICIÓN (I) EMISIÓN

Descripción resumida

ADICION DE UN NM EN POLVO EN LA TOBERA DE ALIMENTACIÓN DE UNA INYECTORA

Emisión intrínseca del material por sus características

Potencial de emisión de la operación realizada

EMISION

E	**Emisión intrínseca del material**	**E**	**0,3**	
	Tipo de material	Tipo	**polvo**	
				Score
	fracción en peso	β	10%-50%	0,3
	Polvo			**Score**
	Potencial de generación de nieblas de polvo	DST	Muy alto(> 500 mg/Kg)	1
	% humedad relativa	%HR	<5%	1

H	**Potencial de emisión de la operación**	**H**	**1**	**EB3**
	Tipo de operación	Manejo de polvos		
	Clasificación de la operación	Manejo de productos con baja velocidad/fuerza, con un bajo potencial de generacion de polvo en suspensión (Cant NOAA > 1 Kg)		
	ejemplos aplicables a la clasificación seleccionada	*vaciado manual de sacos, mezclado manual, tamizado*		

EVALUACIÓN DEL NIVEL DE EXPOSICIÓN: BANDA DE EXPOSICIÓN (I) TRANSMISIÓN …

Transmisión de las emisiones hacia la ubicación del trabajador. Diluciones y Controles técnicos aplicados

Inhalación del trabajador considerando EPIs y frecuencia y duración de la exposición

TRANSMISIÓN

Limitaciones establecidas a la transmisión		
en la zona del puesto de trabajo	**$\eta_{lc\ nf}$**	**0,30**
en otro puesto más alejado	**$\eta_{lc\ ff}$**	**1,00**
Controles aplicados y localizados en la fuente de emisión		**Ventilación local, que renueva el aire en la fuente de emisión, capturando las nanos**
Controles aplicados y localizados en la fuente de emisión lejana al área de trabajo		**Sin ningún control asociado**
Dilución de la emisión		
en la zona del puesto de trabajo	**$\eta_{gv\ nf}$**	**3,00**
en otro puesto más alejado	**$\eta_{gv\ ff}$**	**1,00**
Volumen del area de trabajo	V_{zona}	100-1000 m3
Tipo de ventilación (seleccionar mecánica o natural si estamos a cielo abierto)	$Tipo_{vent}$	Sin ventilación concreta (0,3-1 renovaciones de aire / hora)
Separación de la zona de trabajo al puesto analizado	**η_{inm}**	**1**
		El trabajador no realiza su función en una cabina aislada del proceso
Contaminación de la zona de trabajo (emisión de fondo)	**a**	**0,01**
		Se realiza una inspección y mantenimiento periodico de máquinas y equipos. No se realiza limpieza diaria

INMISION

Equipos para minimizar la inmisión	**η_{ppe}**	**0,4**
Equipos de Protección individual utilizados		Máscara autofiltrante FFP3 (EN-149)

FRECUENCIA Y DURACIÓN DE LA EXPOSICIÓN

Duración de la exposición	**4 - 8 horas al día**
Frecuencia de la exposición	**4-5 días a la semana**

EVALUACIÓN DEL NIVEL DE EXPOSICIÓN: BANDA DE EXPOSICIÓN (II)

Banda de exposición Stoffenmanager.nano

Banda de emisión ISO PTS

Cálculo de nivel de exposición y asignación de la banda de exposición

BANDA DE EXPOSICIÓN		**3**	**EB3**
CALCULO DEL NIVEL DE EXPOSICIÓN = $C.\eta_{imm}.\eta_{ppe}.t_h.f_h$	B	**0,2292**	
Nivel de emisión total en el puesto = Cnf+Cff+Cds	**C**	**0,573**	
Por el puesto de trabajo = E.H. $\eta_{lcnf}.\eta_{gv}$	Cnf	0,27000	
Por otros puestos más alejados = E.H. $\eta_{lcff}.\eta_{gv}$	Cff	0,30000	
Por la emisión de fondo = E.a	Cds	0,00300	
Separación de la zona de trabajo al puesto analizado	**η inm**	**1**	
Equipos de Protección individual utilizados	**η ppe**	0,4	
Duración de la exposición	**t_h**	1	
Frecuencia de la exposición	**f_h**	1	

MATRIZ DE BANDA DE CONTROL (CB) ISO PTS

MATRIZ DE BANDAS DE CONTROL (CB) DE EMISIONES

OPERACIÓN ADICION NM LIQ

ADICION DE UN NM DISPERSO EN LÍQUIDO EN LA TOBERA DE ALIMENTACIÓN DE UNA EXTRUSORA REACTIVA

Banda de exposición calculada: **EB3**

Banda de peligrosidad calculada: **B**

BANDA DE EMISIÓN	BANDA DE PELIGROSIDAD				
	A	B	C	D	E
EB1	CB1	CB1	CB2	CB3	CB4
EB2	CB1	CB1	CB3	CB4	CB5
EB3	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5
EB4	CB2	CB3	CB4	CB5	CB5

		Ejemplos de controles recomendados
CB1	Ventilación natural o ventilación mecánica general	
CB2	Ventilación localizada (LEV)	
CB3	Ventilación confinada	
CB4	Confinamiento total	
CB5	Confinamiento total y revisión por un especialista en la materia	

MATRIZ DE BANDAS DE RIESGOS

OPERACIÓN ADICION NM LIQ

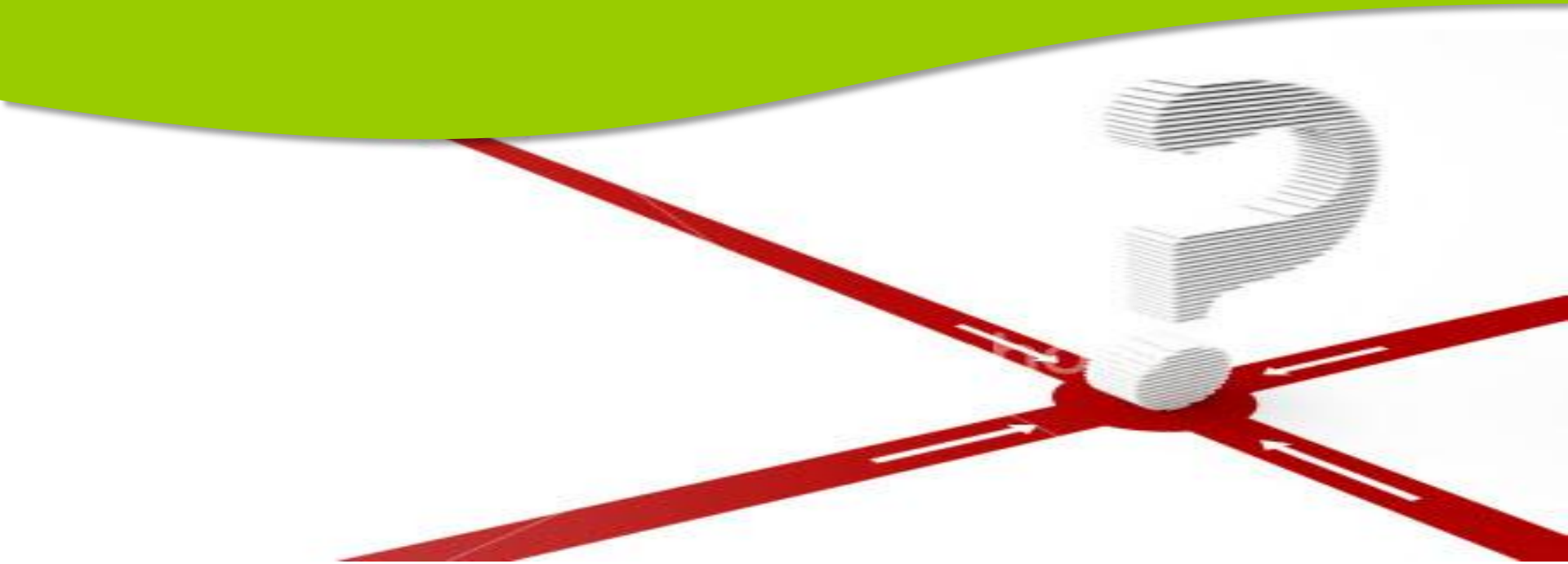
ADICION DE UN NM DISPERSO EN LÍQUIDO EN LA TOBERA DE ALIMENTACIÓN DE UNA EXTRUSORA REACTIVA

Banda de exposición calculada:	2
Banda de peligrosidad calculada:	B

BANDA DE EXPOSICIÓN	BANDA DE PELIGROSIDAD				
	A	B	C	D	E
1	Bajo	Bajo	Bajo	Medio	Medio
2	Bajo	**Bajo**	Medio	Medio	Alto
3	Bajo	Medio	Medio	Alto	Alto
4	Medio	Alto	Alto	Alto	Alto

Alto	Nivel de riesgo considerado de alta prioridad
Medio	Nivel de riesgo de prioridad media
Bajo	Nivel de riesgo de baja prioridad

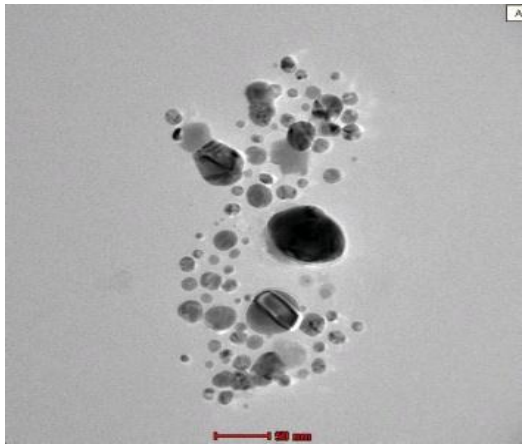
RESULTADOS Y CONCLUSIONES

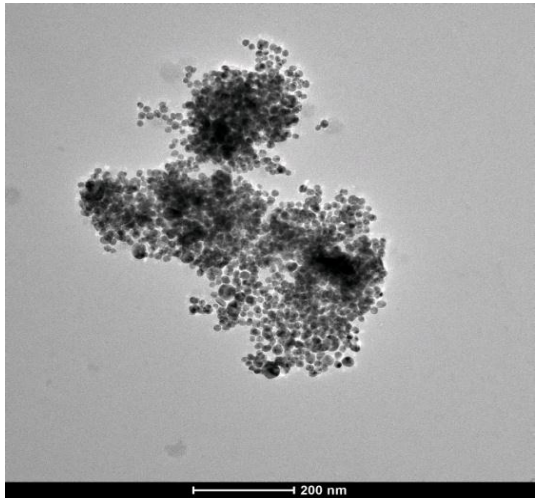


CONCLUSIONES

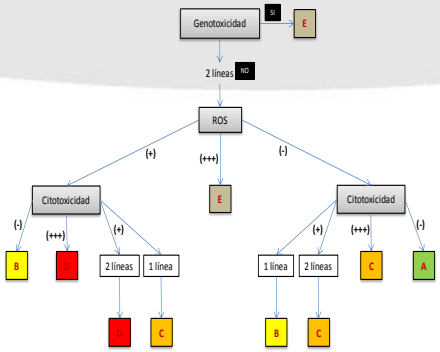
•La herramienta propuesta se ha utilizado para el análisis de 3 operaciones realizadas en la transformación de plásticos y se han obtenido **resultados de riesgo inferiores a los utilizados mediante otras herramientas de control banding**

•Este hecho tampoco es extraño dado que, por el criterio de prudencia, **la categoría mínima** de peligrosidad aplicada en otras herramientas para NM (por ejemplo, Stoffenmanager nano) es **C**, incluso en aquellos casos en los que no existe información toxicológica negativa respecto al NM y el material base de partida se hubiera clasificado en la categoría A.





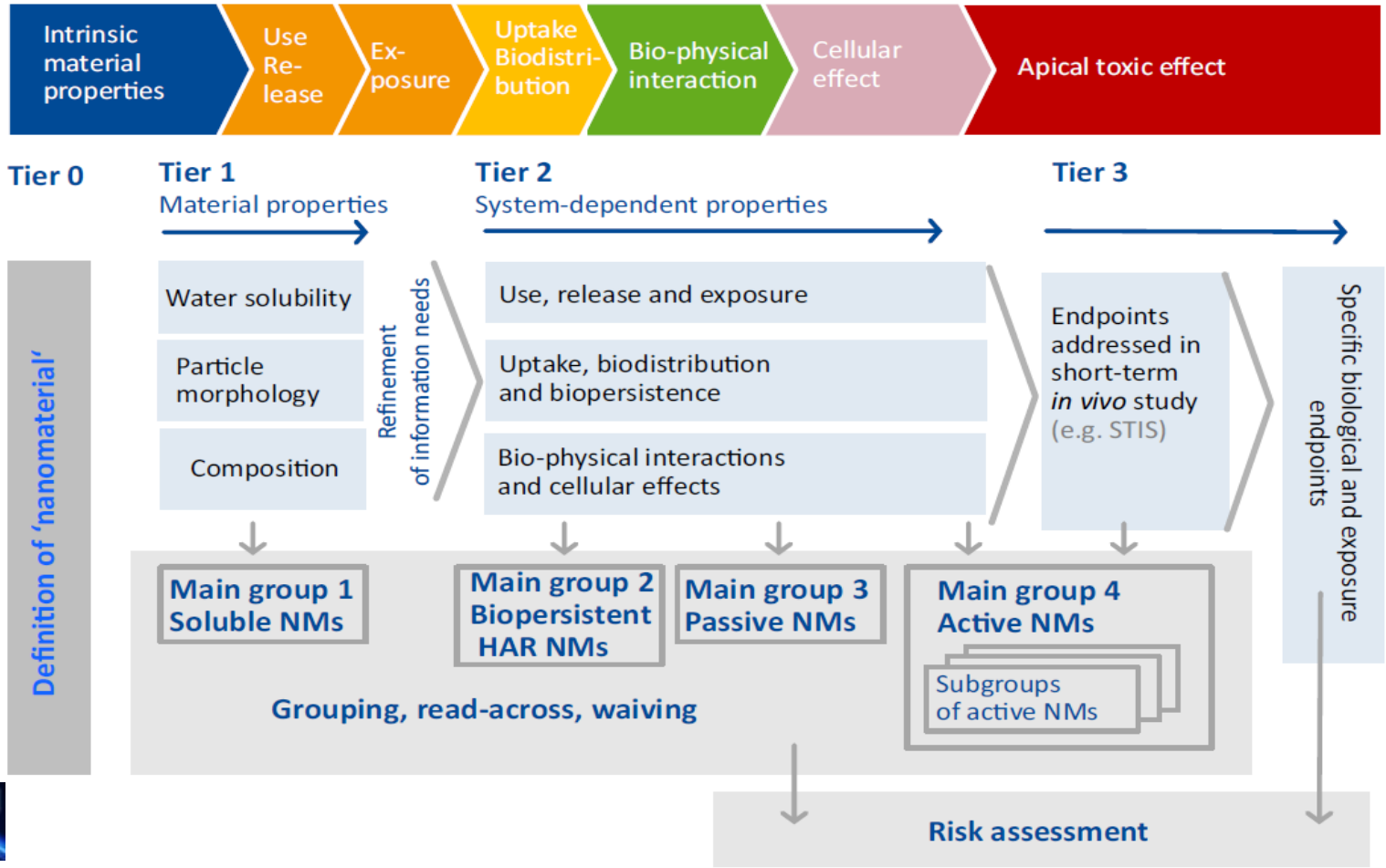
PRÓXIMOS PASOS



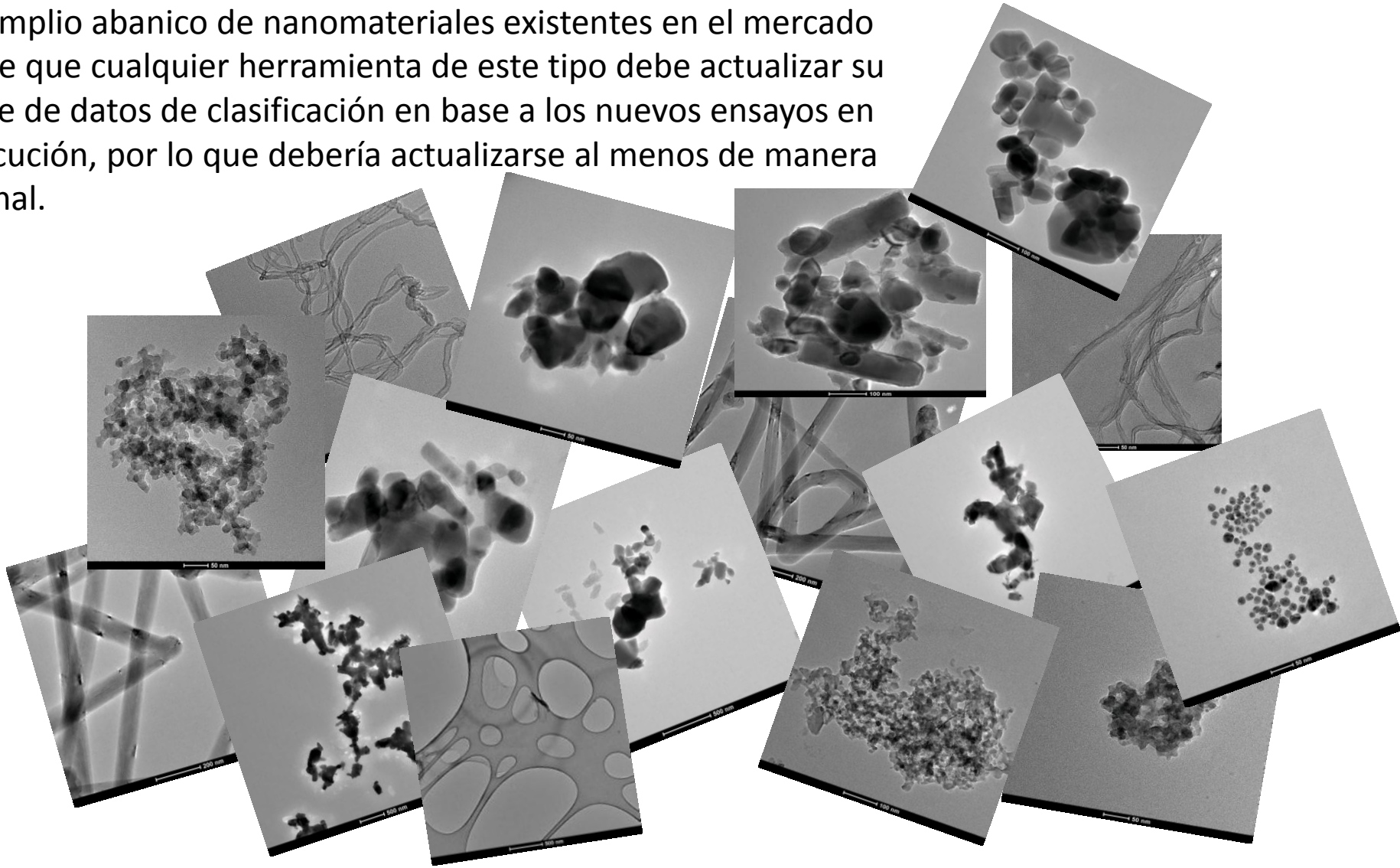
Enriquecimiento del modelos en función de los próximos hallazgos científicos

Hallazgos	Modelo propuesto	Propiedades fundamentales
Toxicidad influenciada por propiedades del material	Modelos QSAR	Composición química, Reactividad, Tamaño, Forma, Recubrimiento…
Toxicidad influenciada por dónde se deposita y acumula el NM y su efecto sobre el organismo	Ensayos in vitro / In vivo	Sistema celular / órgano diana Diametros y superficies efectivas de exposición
Toxicidad influenciada fundamentalmente por los efectos primarios inmediatos	Modelo QBAR	Sistema celular / órgano, Generación de ROS, Liberación de iones, Citotoxicidad, Genotoxicidad
Toxicidad influenciada por los efectos desencadenantes	Ensayos in vitro / In vivo	Sistema celular / órgano, Inflamación Apoptosis/Necrosis, Cronicidad

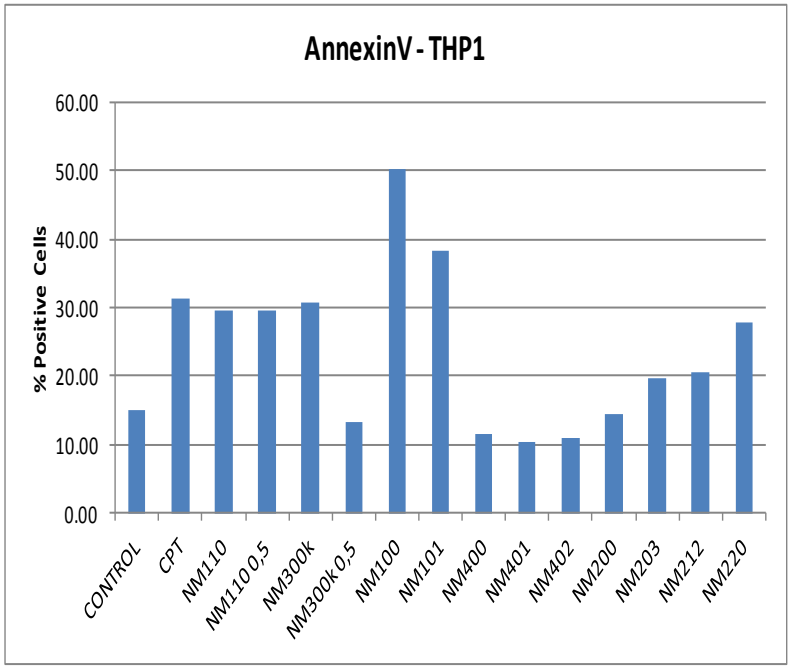
PRÓXIMOS PASOS
NANOREG II



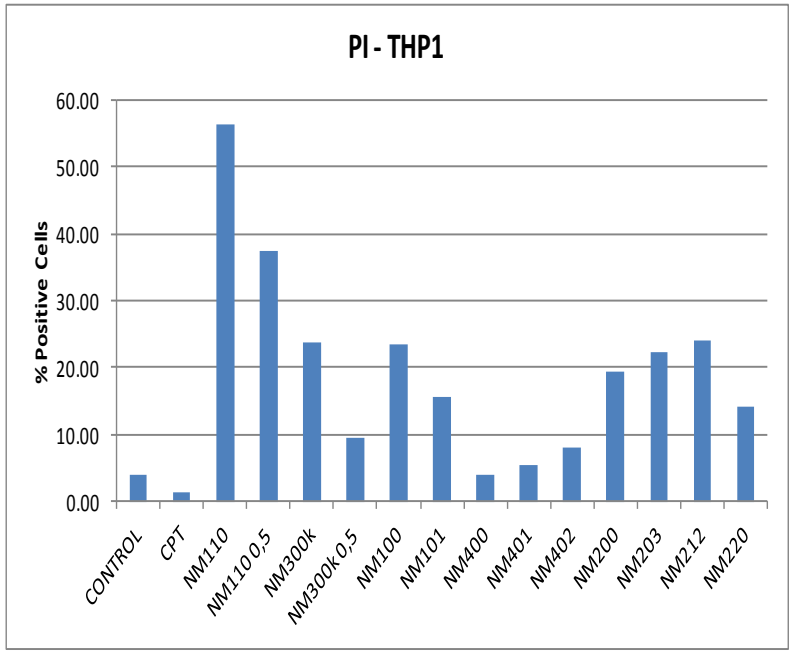
El amplio abanico de nanomateriales existentes en el mercado hace que cualquier herramienta de este tipo debe actualizar su base de datos de clasificación en base a los nuevos ensayos en ejecución, por lo que debería actualizarse al menos de manera bienal.



El desarrollo en curso de resultados más exhaustivos de toxicidad in vitro dentro del proyecto NANoREG permitirá afinar la herramienta de valoración de la peligrosidad así como en la metodología utilizada.

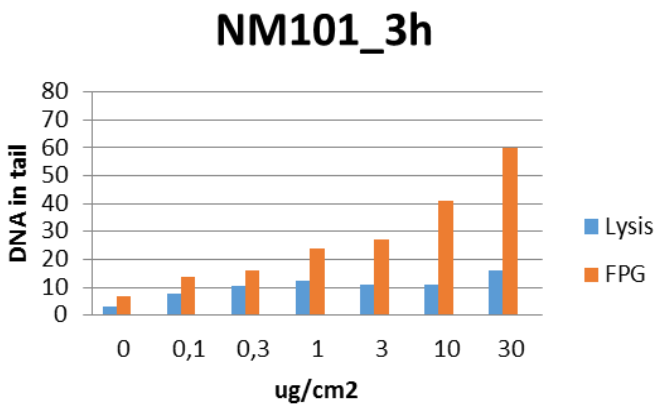


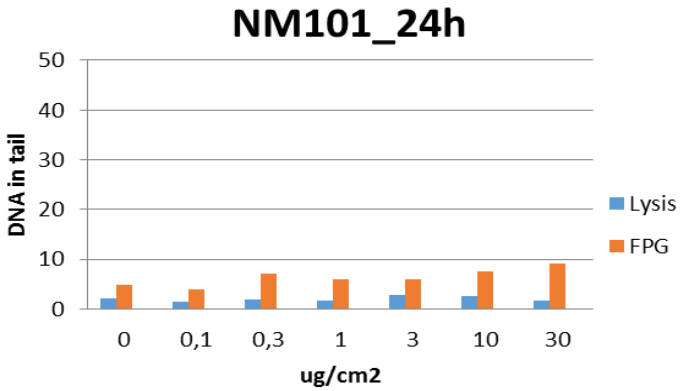
Apoptosis

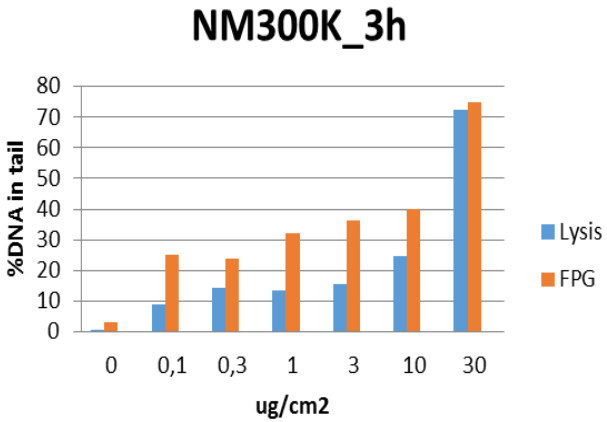


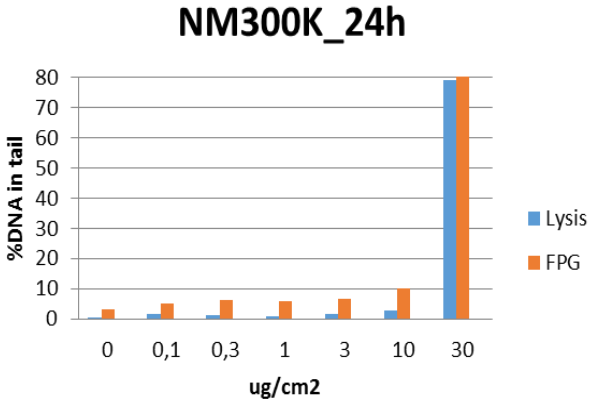
Necrosis

Confirmar las condiciones de ensayo

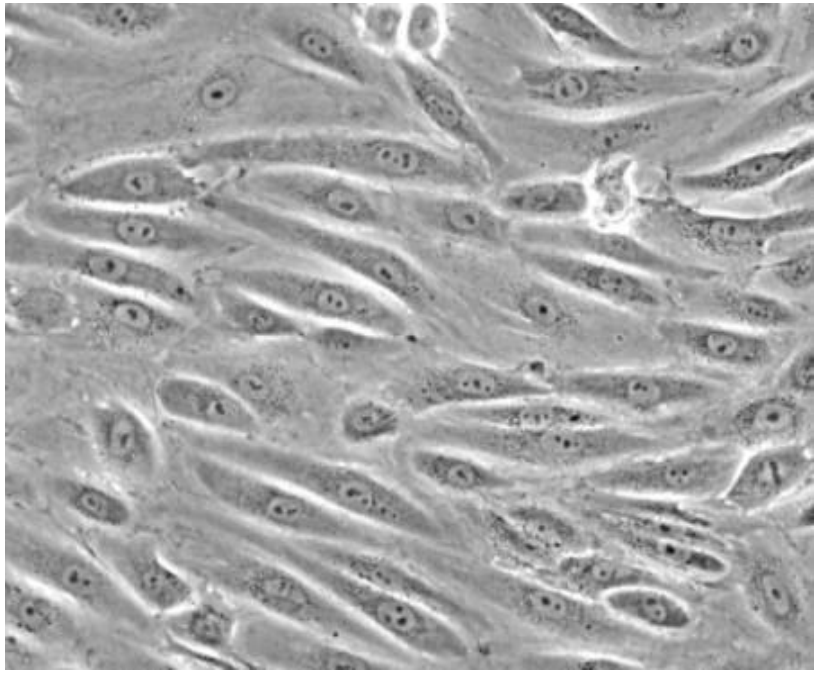








El factor de incertidumbre aplicado a la extrapolación a dosis de inhalación humana es elevado, motivado fundamentalmente por el punto final considerado (IC_{50}) y las limitaciones de los ensayos in vitro actuales, debiéndose potenciar las investigaciones tendentes a evaluar in vitro dosis de toxicidad crónica (subletales) en modelos más representativos: **epitelio pulmonar**



Cultivo celular

Epitelio pulmonar reconstruido

AGRADECIMIENTOS

OSALAN

EHS advance

NANOREG
A common European approach to the regulatory testing of nanomaterials

thank you

bedankt

cám òn qúi vi rhât

谢谢

eskerrik asko

grazie

eskerrik asko

شكرا

evgaristó

go raibh maith agaibh

Shokrán

arigato

gracias

matu suksama

gracias

spaisíva

danke

gracias

khrap

moltes gràcies

merci

ありがとうございます

Xié Xie

thank you

eskerrik asko

Luis Madariaga

Parque Tecnológico de Bizkaia, Edificio 202
48170 Zamudio | Bizkaia | Spain
T. 0034 94 6002323
mark@gaiker.es | www.gaiker.es