



Freely available online - OPEN ACCESS

Revista Española de Nutrición Humana y Dietética

Spanish Journal of Human Nutrition and Dietetics

INVESTIGACIÓN – versión *post-print*

Esta es la versión revisada por pares aceptada para publicación. El artículo puede recibir modificaciones de estilo y de formato.

¿Son seguros los colorantes alimenticios nanoparticulados? Uso del modelo biológico in vivo *Caenorhabditis elegans* para evaluar su toxicidad aguda

Are nanoparticulated food colours safe? Use of the in vivo biological model *Caenorhabditis elegans* to evaluate their acute toxicity

Samuel Furones^a, Raúl Grau^a, José Manuel Barat^a, Samuel Verdú^a

^aDepartamento de Tecnología de Alimentos, Instituto de Ingeniería de Alimentos Food-UPV, Universitat Politècnica de València, València, España

[*sfurher@upv.edu.es](mailto:sfurher@upv.edu.es)

Recibido: 18/10/2024; Aceptado: 25/10/2024; Publicado: 25/10/2024

Editor asignado: Rafael Almendra-Pegueros, Institut de Recerca Sant Pau (IR SANT PAU), Barcelona, España.

CITA: Furones S, Grau R, Barat JM, Verdú S. ¿Son seguros los colorantes alimenticios nanoparticulados? Uso del modelo biológico in vivo *Caenorhabditis elegans* para evaluar su toxicidad aguda. Rev Esp Nutr Hum Diet. 2024; 28(4). doi: 10.14306/renhyd.28.4.2333 [ahead of print]

La Revista Española de Nutrición Humana y Dietética se esfuerza por mantener a un sistema de publicación continua, de modo que los artículos se publiquen antes de su formato final (antes de que el número al que pertenecen se haya cerrado y/o publicado). De este modo, intentamos poner los artículos a disposición de los lectores/usuarios lo antes posible.

The Spanish Journal of Human Nutrition and Dietetics strives to maintain a continuous publication system, so that the articles are published before its final format (before the number to which they belong is closed and/or published). In this way, we try to put the articles available to readers/users as soon as possible.

MENSAJES CLAVE

- Este estudio muestra los efectos toxicológicos agudos de las AgNPs y Fe₂O₃NPs como colorantes alimentarios, evaluando letalidad, estrés oxidativo y apoptosis en *C. elegans*, destacando la importancia de evaluar su seguridad en matrices alimentarias.
- Se observaron cambios fisicoquímicos significativos en las propiedades de las AgNPs y Fe₂O₃NPs al entrar en contacto con medios acuosos, lo que influye en su estabilidad y solubilización.
- Las Fe₂O₃NPs mostraron mayor toxicidad aguda que las AgNPs, con mayor letalidad y estrés oxidativo en *C. elegans*, sugiriendo posibles riesgos para la salud asociados a su uso como aditivos alimentarios.
- La estabilidad e interacciones de las nanopartículas son clave para evaluar su toxicidad, requiriendo más investigación sobre su comportamiento en matrices alimentarias y los riesgos potenciales para la salud.

RESUMEN

Introducción: Este estudio explora los efectos toxicológicos de las nanopartículas de plata (AgNPs) y nanopartículas de óxido de hierro (Fe₂O₃NPs), que se utilizan como colorantes alimentarios (E-174 y E-172, respectivamente), al entrar en contacto con un medio acuoso que simula matrices alimentarias. Para ello se ha empleado el modelo biológico *in vivo* *Caenorhabditis elegans*.

Metodología: Se evaluó el impacto de las NPs en parámetros fisicoquímicos, como el tamaño de partícula, el potencial zeta y la conductividad eléctrica. También se analizaron parámetros biológicos en *C. elegans*, incluyendo letalidad, estrés oxidativo y apoptosis o muerte celular.

Resultados: El análisis fisicoquímico reveló cambios significativos en las propiedades de las NPs en contacto con el medio acuoso. Las AgNPs mostraron una mayor estabilidad, así como un aumento en su solubilización. Las Fe₂O₃NPs mostraron una mayor toxicidad aguda en comparación con las AgNPs, exponiendo tasas de letalidad más altas y mayor estrés oxidativo. El análisis de la apoptosis celular destacó aún más sus efectos tóxicos.

Conclusiones: Los resultados del estudio mostraron el papel crítico de las características fisicoquímicas de las NPs y sus interacciones biológicas. Se demostró que las variaciones en la estabilidad de las NPs pueden aumentar su potencial tóxico cuando se utilizan como aditivos alimentarios. Los hallazgos requieren una investigación exhaustiva para comprender mejor el comportamiento de las NPs en las matrices alimentarias y los riesgos para la salud asociados, garantizando así la seguridad del consumidor.

Financiación: Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia de la Comunidad Valenciana", a través del proyecto "Programa Investigo". Proyecto europeo "NAMS4NANO: Integración de Resultados de Nuevas Metodologías de Enfoque en Evaluaciones de Riesgo Químico: Estudios de Caso que Abordan Consideraciones a Escala Nanométrica", apoyado por la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA).

Palabras clave: aditivos alimentarios; nanopartículas; estabilidad; nematodo; propiedades toxicológicas

ABSTRACT

Introduction: This study explores the toxicological effects of silver nanoparticles (AgNPs) and iron oxide nanoparticles ($\text{Fe}_2\text{O}_3\text{NPs}$), which are used as food colorants (E-174 and E-172, respectively), when they come into contact with an aqueous medium that simulates food matrices. For this purpose, the in vivo biological model *Caenorhabditis elegans* was used.

Methods: The impact of NPs was evaluated on physicochemical parameters, such as particle size, zeta potential, and electrical conductivity. Biological parameters in *C. elegans* were also analyzed, including lethality, oxidative stress, and apoptosis or cell death.

Results: Physicochemical analysis revealed significant changes in the properties of the NPs upon contact with the aqueous medium. The AgNPs exhibited greater stability, as well as an increase in their solubilization. $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{NPs}$ exhibited higher toxicity compared to AgNPs, showing higher lethality rates and increased oxidative stress. The analysis of cell apoptosis further highlighted their toxic effects.

Conclusions: The results of the study demonstrated the critical role of the physicochemical characteristics of NPs and their biological interactions. Variations in the stability of NPs can increase their toxic potential when used as food additives. These findings require thorough investigation to better understand the behaviour of NPs in food matrices and the associated health risks, thereby ensuring consumer safety.

Funding: Recovery, Transformation and Resilience Plan of the Valencian Community, through the "Investigo Program" project. European project "NAMS4NANO: Integration of Results from New Approach Methodologies in Chemical Risk Assessments: Case Studies Addressing Considerations at the Nanometric Scale", supported by the European Food Safety Agency (EFSA).

Keywords: food additives, nanoparticles, stability, nematode; toxicological properties

INTRODUCTION

Los aditivos alimentarios son sustancias añadidas para mejorar la calidad, seguridad, vida útil o modificar características como color, sabor o textura. Entre ellos, los nanomateriales (NMs), especialmente las nanopartículas (NPs), son cada vez más utilizados en campos como la biomedicina, tecnología de la información, cosmética e industria alimentaria, gracias a sus propiedades específicas como su pequeño tamaño, naturaleza química y gran superficie de contacto. Las NPs, conocidas como nanoaditivos, tienen aplicaciones en la industria alimentaria, ya sea como ingredientes o en materiales de envasado. Se ha demostrado que pueden mejorar la seguridad alimentaria al prolongar la vida útil de los productos^{2,3,4}.

Sin embargo, cuando las NPs se incorporan a matrices alimentarias acuosas, sus propiedades pueden cambiar, afectando su estabilidad y aumentando su potencial tóxico, como el estrés oxidativo y el daño celular^{5,6}. Por ello, es fundamental estudiar cómo las matrices alimentarias influyen en su comportamiento, especialmente para NPs autorizadas como aditivos alimentarios. Entre ellos están el óxido de hierro (Fe_2O_3 , E172) y la plata (Ag, E174), que son colorantes alimentarios autorizados en la Unión Europea según el Reglamento (CE) 1333/2008 sobre aditivos alimentarios. El E174 se utiliza en la decoración de confitería, chocolates y licores, mientras que el E172 se encuentra en productos como pescado ahumado y crustáceos¹. A pesar de su aprobación, la genotoxicidad y citotoxicidad de estos aditivos se ha demostrado en diferentes estudios⁷⁻¹⁰. En vista de estas preocupaciones, la EFSA ha publicado dos opiniones científicas señalando que la información disponible es insuficiente para garantizar su seguridad, subrayando la necesidad de más datos sobre los riesgos potenciales de estos nanoaditivos^{11,12}.

Uno de los modelos experimentales sugeridos para estudiar la toxicidad aguda de las NPs es *Caenorhabditis elegans*, un nematodo no parásito ampliamente utilizado en bioensayos toxicológicos. Este organismo tiene características ventajosas, como su fácil mantenimiento, ciclo de vida rápido (3 días) y pequeño tamaño (1 mm en su etapa adulta), lo que permite realizar experimentos rápidos con mínimas muestras¹³. Además, su transparencia facilita el estudio de procesos celulares mediante colorantes bioquímicos y proteínas fluorescentes¹⁴. Además, comparte funciones biológicas con los mamíferos,

incluyendo genes y vías de señalización, lo que lo convierte en un modelo útil para estudiar mecanismos toxicológicos que pueden extrapolarse a organismos superiores, proporcionando un primer paso en la identificación de peligros toxicológicos¹⁵.

Este estudio tiene como objetivo específico examinar los cambios en las propiedades de las AgNPs y Fe₂O₃NPs durante su contacto con medios acuosos. Dichos cambios pueden afectar significativamente a su funcionalidad y seguridad, lo que potencialmente puede resultar en efectos adversos para la salud. Para abordar esto, se empleó el modelo *in vivo* *Caenorhabditis elegans* para evaluar la exposición aguda en ambos tipos de NPs, centrándose en varios parámetros biológicos del nematodo, incluida la letalidad, el estrés oxidativo y la apoptosis o muerte celular.

METODOLOGÍA

Preparación de la dispersión de nanopartículas

En este estudio se utilizaron AgNPs (Sigma Aldrich, St. Louis, EE. UU., nanopolvo, tamaño <100 nm, 99,5 % de trazas en base a metales, referencia: 576832-5G) y Fe₂O₃NPs (Sigma Aldrich, St. Louis, EE. UU., nanopolvo, tamaño <50 nm, referencia: 544884-5G).

Ambas NPs se suspendieron en agua desionizada a concentraciones de 12,5, 25 y 50 µg/mL. Luego, fueron sometidas a sonicación en un baño de ultrasonidos durante 2 minutos a 20°C para evitar la aglomeración. Por último, las dispersiones se almacenaron a 80°C para generar un proceso acelerado de desestabilización, utilizando un baño termostático durante diferentes tiempos de exposición (0, 3, 6, 24, 72, 192, 336 y 456 horas). Las dispersiones se sonicaron nuevamente, durante 2 minutos a 20°C, antes de testar sus características fisicoquímicas y toxicológicas a cada tiempo de exposición.

Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas

Ambas NPs fueron caracterizadas midiendo sus principales características fisicoquímicas: tamaño de partícula promedio, potencial zeta y conductividad eléctrica. Estas características se estudiaron para obtener una mejor comprensión del comportamiento de las NPs durante el tiempo de exposición. Para mantener las mismas condiciones de la prueba, las dispersiones de NPs prepararon en medio K⁺ (32 mM KCl, 51 mM NaCl), manteniendo el pH en un rango de 6,0 a 6,5 (Sigma Aldrich, St. Louis, EE. UU.). Este es el

medio líquido estándar de mantenimiento para *C. elegans*, y también se utilizó en las pruebas toxicológica.

Las tres mediciones fisicoquímicas se realizaron en un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido). Los tamaños de las partículas se midieron mediante la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) y los resultados se presentaron como el tamaño promedio de las partículas, expresado en nanómetros (nm), y se resumieron como medias.

Preparación y mantenimiento de *C.elegans*

La cepa silvestre Bristol N2 de *Caenorhabditis elegans* fue utilizada como organismo modelo. La población de nematodos se mantuvo en placas de agar con medio de crecimiento de nematodos (NGM), sembradas con la cepa OP50 de *Escherichia coli* a 20°C, como fuente de alimento para los nematodos. Antes de los ensayos, las poblaciones de nematodos se sincronizaron para obtener poblaciones de la misma edad adulta y reducir la variación¹⁶.

Procedimiento de exposición aguda

El efecto de la exposición aguda a NPs en *C. elegans* se evaluó utilizando diferentes parámetros biológicos. Las pruebas se llevaron a cabo en medio K⁺, como medio líquido para el mantenimiento de los nematodos. Los nematodos adultos sincronizados en la etapa L4 fueron expuestos a las NPs siguiendo los tiempos de exposición acuosa y a tres concentraciones probadas (ver sección 2.1). La exposición aguda fue de 24 horas en un incubador a 20°C. Después de este tiempo, se realizaron evaluaciones toxicológicas. También se incluyeron controles negativos (C), que consistieron únicamente en medio K⁺ sin exposición a NPs. Todos los grupos se probaron por duplicado, y el número de nematodos varió según el ensayo. Los datos obtenidos se expresaron como medias.

Evaluaciones de toxicidad aguda utilizando *C. elegans*

Prueba de letalidad

La prueba de letalidad se realizó para determinar el efecto de las NPs en la viabilidad de *C. elegans*. La prueba se llevó a cabo con un volumen final de 250 µL. La población estudiada fue de alrededor de 200 nematodos adultos. Tras la exposición, el número de nematodos vivos y muertos se contó visualmente usando una lupa estereoscópica. Se consideró que

los nematodos estaban muertos si no respondían cuando se les tocaba con una punta esterilizada¹⁶. Los resultados se expresaron como el porcentaje de nematodos muertos sobre el número total de nematodos en cada tubo (tasa de mortalidad), considerando las muestras de control.

Ensayo de ROS

El objetivo de este ensayo fue cuantificar las especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelulares generadas bajo estrés oxidativo causado por la exposición a NPs, midiendo la fluorescencia de los nematodos con el tinte 2',7'-diclorofluorescina diacetato (H₂DCF-DA, 0,5 mM) (Fisher Scientific, Schwerte, Alemania). Se evaluaron al menos 200 nematodos adultos sincronizados (L4). Tras la exposición a NPs, los nematodos se trataron con la solución de H₂DCF-DA y se midió la fluorescencia a 490 nm (excitación) y 510-570 nm (emisión) usando un lector VANTASTAR (BMG Labtech, Ortenberg, Alemania). Los resultados se expresaron como unidades de fluorescencia ROS (ROSFU), comparando las muestras con los controles.

Análisis de apoptosis en la línea germinal

La medición de la apoptosis en la línea germinal se realizó utilizando el protocolo descrito por Lant y Derry¹⁷. En este método, el daño celular se midió analizando la intensidad de fluorescencia mediante la tinción con naranja de acridina (AO, 1 mg/mL) (Sigma Aldrich, St. Louis, EE. UU.). Tras la exposición a NPs, los nematodos fueron tratados con la solución de AO durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pasos posteriores y la medida de la intensidad de fluorescencia se llevaron a cabo de la misma manera que en el ensayo de ROS. Los resultados se expresaron como unidades de fluorescencia de AO (AOFU).

Análisis estadístico

Los resultados de la caracterización de las NPs y los datos obtenidos de las pruebas de toxicidad aguda en *C. elegans* fueron examinados mediante un estudio de varianza (ANOVA), empleando un procedimiento de comparación múltiple para identificar cuáles medias eran significativamente diferentes con un nivel de significancia del 95 %. En aquellos casos en los que el efecto fue significativo (valor de $P < 0,05$), las medias se compararon utilizando el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

RESULTADOS

Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas

Tamaño promedio de partícula

En este estudio, ambas NPs mostraron disminuciones en los tamaños promedio durante la exposición térmica hasta 6 horas, siendo más notables en Fe₂O₃NPs, debido a la solubilización de partículas, ocurriendo más rápido para las pequeñas. A las 6 horas, la sobresaturación crítica indujo nucleación, incrementando el tamaño promedio total.

A medida que el tiempo de exposición aumentó, el tamaño promedio de partículas disminuyó por solubilización, aumentando la energía libre superficial y las fuerzas de cohesión, lo que facilitó la coalescencia con los núcleos e incrementó el tamaño total^{18,19}. La mayoría de las partículas más pequeñas sufrieron este proceso, mientras que una minoría persistió en solubilizarse sin coalescencia. Mientras que en las AgNPs más concentradas (50 µg/mL) el tamaño promedio aumentó más que en las diluidas (12,5 y 25 µg/mL), ocurrió lo contrario con las Fe₂O₃NPs.

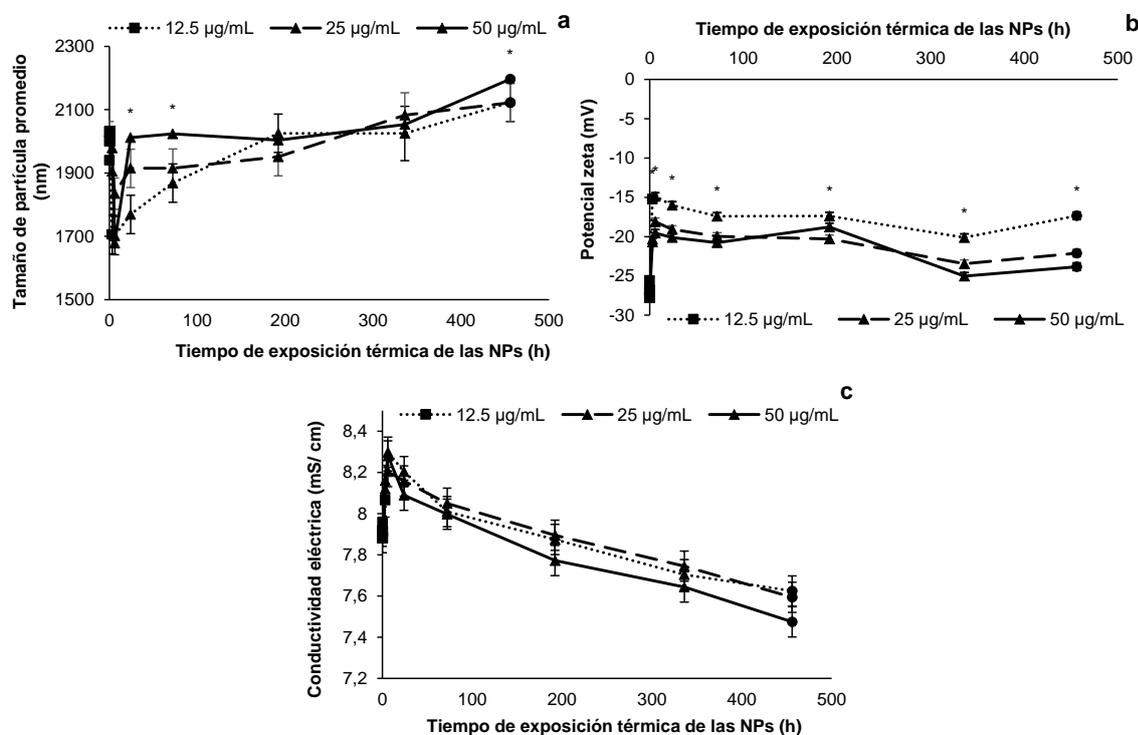


Figura 1. Evolución del tamaño de partícula promedio, potencial zeta y conductividad eléctrica de AgNPs durante la exposición térmica. Resultados expresados como medias con barras de desviación estándar. $p \leq 0,05$ indica diferencias significativas.

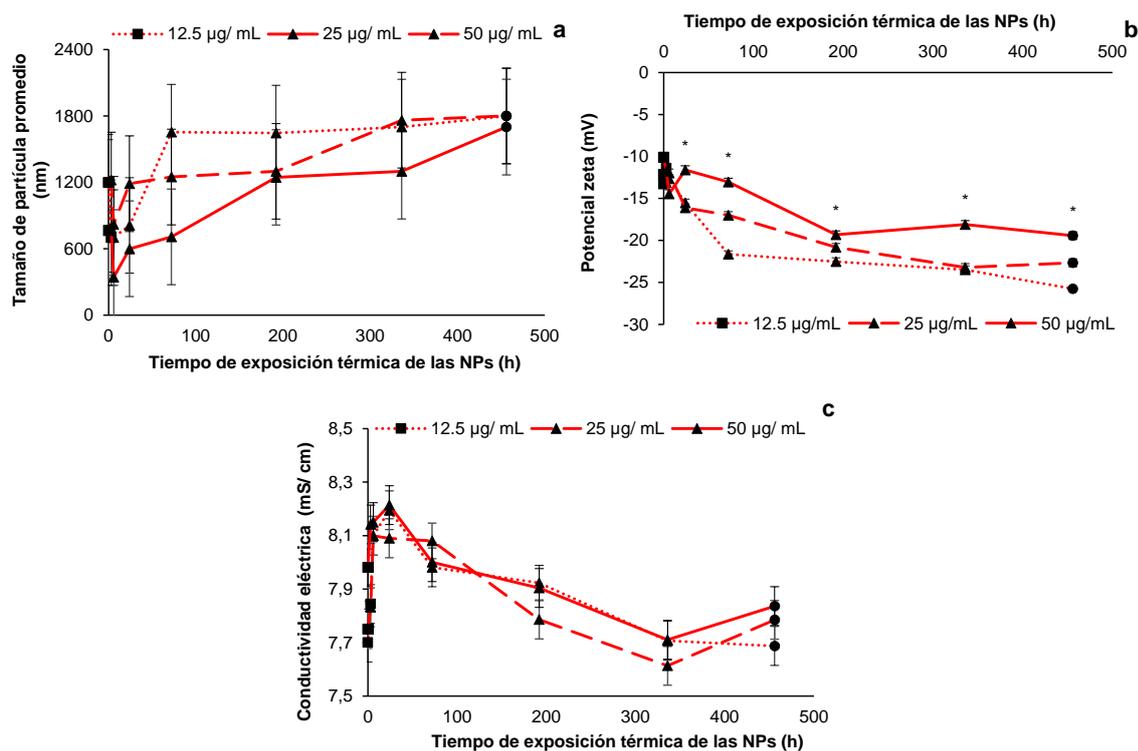


Figura 2. Evolución del tamaño de partícula promedio, potencial zeta y conductividad eléctrica de Fe₂O₃NPs durante la exposición térmica. Resultados expresados como medias con barras de desviación estándar. $p \leq 0,05$ indica diferencias significativas.

Potencial zeta

El potencial zeta es una propiedad física que indica la carga superficial neta de las NPs, afectando la fuerza repulsiva entre las partículas y, por lo tanto, su tendencia a aglomerarse o nuclearse. Los criterios de estabilidad de las NPs se evalúan considerando valores de potencial zeta dentro del rango de más de +30 mV a menos de -30 mV²⁰. Los valores de zeta potencial de las AgNPs no tratadas térmicamente fueron de $-25,6 \pm 0,47$ mV, $-26,89 \pm 0,47$ mV y $-27,71 \pm 0,47$ mV para las concentraciones de 12,5, 25 y 50 µg/mL, respectivamente. Estos valores indican una fuerte carga superficial, relacionada con la alta concentración de Ag⁺, generando fuerzas repulsivas que previenen la aglomeración y garantizan la estabilidad de la dispersión.

En el caso de las Fe₂O₃NPs no tratadas térmicamente, los valores de zeta potencial fueron menores: $-13,29 \pm 0,46$ mV, $-12,18 \pm 0,46$ mV y $-10,09 \pm 0,46$ mV en concentraciones de 12,5, 25 y 50 µg/mL, respectivamente, sugiriendo una mayor inestabilidad por la menor concentración de Fe³⁺, lo que resultó en repulsión más débil y mayor aglomeración de las NPs.

Conductividad eléctrica

La conductividad eléctrica de las dispersiones de NPs refleja su capacidad para conducir corriente, influenciada por el tamaño, forma, superficie y iones de las partículas, lo cual puede afectar a su aglomeración²¹.

La conductividad de ambas NPs aumentó hasta las 6 horas de exposición, debido a la disolución de partículas y reducción del tamaño promedio, resultando en una mayor energía libre de superficie. El aumento en la concentración de Ag⁺ y Fe³⁺ facilitó un flujo de corriente eficiente. Tras la nucleación a las 6 horas, los tamaños de los núcleos aumentaron y la concentración de iones disminuyó, estableciendo barreras para el flujo de corriente eléctrica. A lo largo del tiempo de exposición, a pesar de una concentración constante de iones, el tamaño promedio de las partículas creció, reduciendo aún más la conductividad.

Evaluaciones toxicológicas usando *C.elegans*

Ensayo de letalidad

El efecto de la exposición aguda a AgNPs y Fe₂O₃NPs en la mortalidad de *C. elegans* se ilustra en las Figuras 3a y 4a, donde se observa que las tres concentraciones provocaron un aumento significativo en las tasas de mortalidad a medida que se prolongó el tiempo de exposición a ambas NPs. Estas tendencias sugieren que la solubilización de ambas NPs, antes y después de la nucleación, afectó significativamente la mortalidad de los nematodos. A pesar de la solubilización más lenta después de la nucleación, las partículas que no sufrieron coalescencia redujeron progresivamente su tamaño y se solubilizaron, lo que llevó a su ingestión por parte de *C. elegans* y resultó ser más perjudicial en términos de mortalidad.

En el caso de las Fe₂O₃NPs, la concentración de iones Fe³⁺ en dispersión, tras la nucleación, fue más alta que la de las AgNPs. Esto sugiere una correlación con la toxicidad aguda aumentada, especialmente a medida que se extendía el tiempo de exposición térmica, lo que llevó a una mayor tasa de mortalidad de los nematodos.

Ensayo de ROS

La exposición aguda a AgNPs mostró un efecto significativo en función del tiempo de exposición y la concentración de partículas, mientras que este efecto no se observó en las Fe₂O₃NPs, como se puede ver en las Figuras 3b y 4b, respectivamente. Inicialmente, las Fe₂O₃NPs no tratadas térmicamente produjeron más ROS que las AgNPs, pero tras 72 horas en medios acuosos, su producción se estabilizó. Aunque las AgNPs generaron altas cantidades de ROS, su toxicidad aguda no alcanzó los niveles de las Fe₂O₃NPs, posiblemente debido a la mayor concentración de iones Fe³⁺. Factores como el tamaño de las partículas y el estado de aglomeración también influyen en la toxicidad aguda.

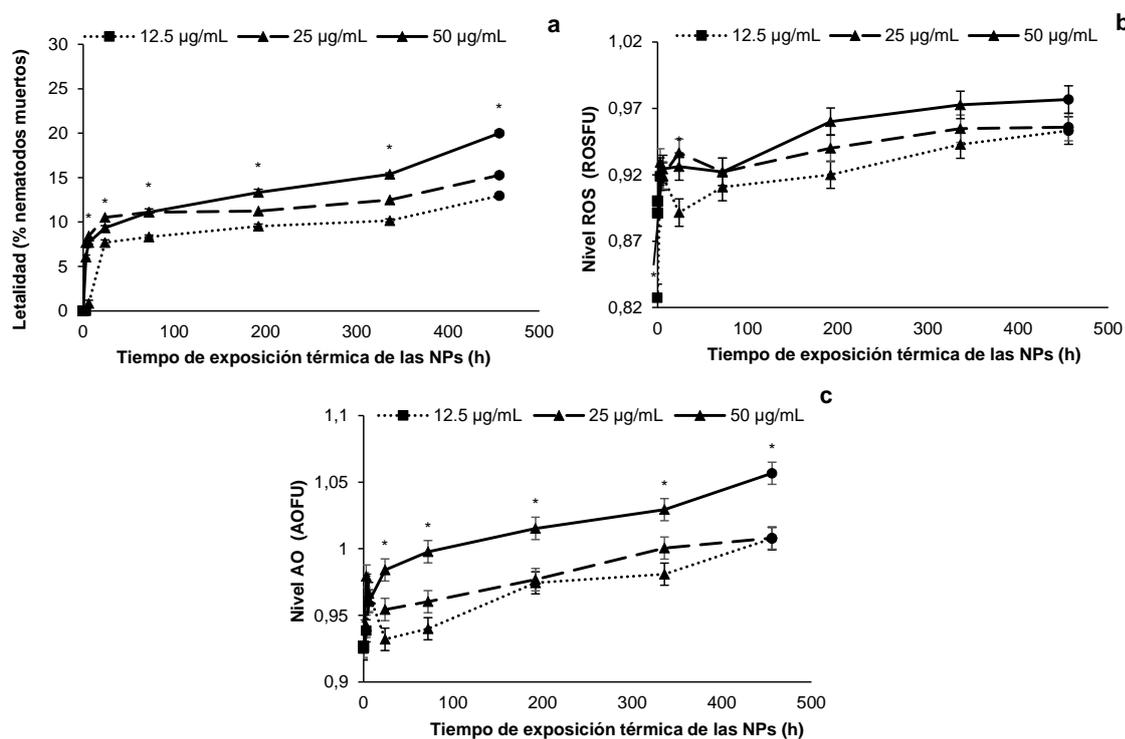


Figura 3. Evolución de la toxicidad aguda de AgNPs en *C. elegans* durante la exposición térmica: letalidad, daño por estrés oxidativo y daño celular a diferentes concentraciones. Resultados expresados como medias con barras de desviación estándar. $p \leq 0,05$ indica diferencias significativas.

Análisis de apoptosis en línea germinal

Las figuras 3c y 4c muestran el impacto de las AgNPs y las Fe₂O₃NPs en la muerte celular de *C. elegans*, respectivamente. La exposición aguda a AgNPs mostró un efecto significativo relacionado con el tiempo de exposición y la concentración de NPs, especialmente a 50 µg/mL. Por otro lado, la exposición de Fe₂O₃NPs también tuvo un efecto significativo, pero los tiempos de exposición superiores a 6 horas no aumentaron la muerte celular. En general, la toxicidad aguda de ambas NPs fue similar, aunque las Fe₂O₃NPs provocaron más muerte celular que las AgNPs antes de la nucleación, lo que indica que son más perjudiciales debido a su composición química.

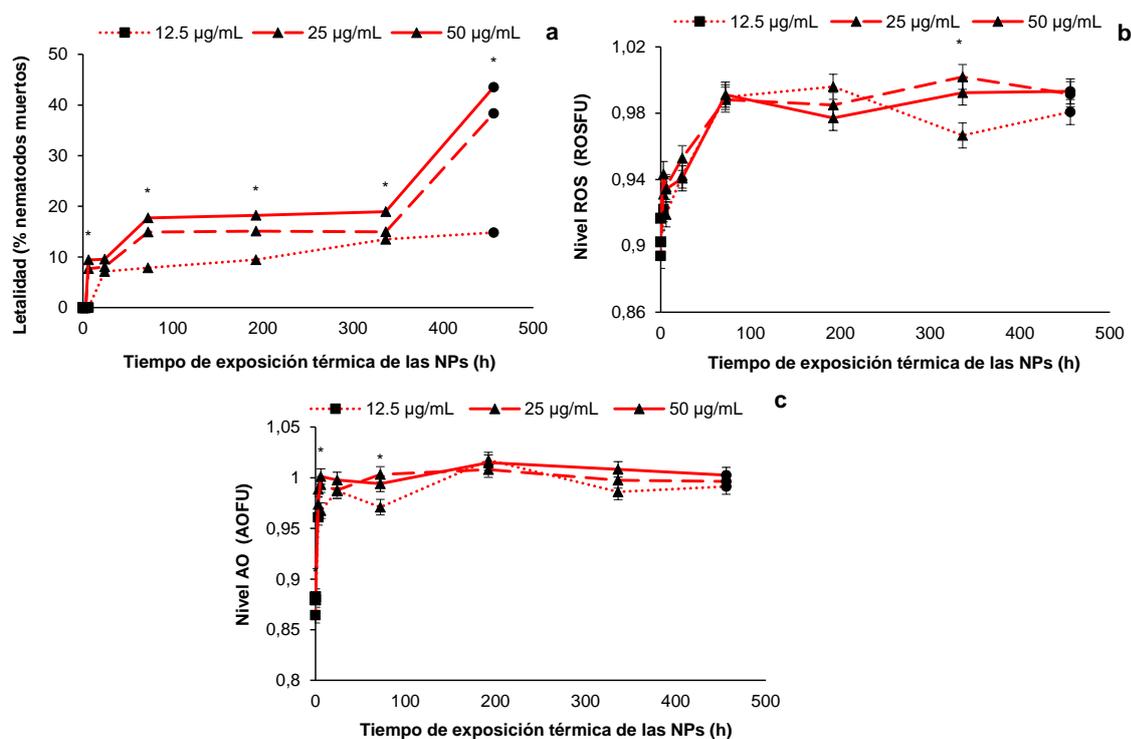


Figura 4. Evolución de la toxicidad aguda de Fe₂O₃NPs en *C. elegans* durante la exposición térmica: letalidad, daño por estrés oxidativo y daño celular a diferentes concentraciones. Resultados expresados como medias con barras de desviación estándar. p ≤ 0,05 indica diferencias significativas.

4. DISCUSIÓN

Ambas NPs experimentaron cambios significativos en tamaño, estabilidad y carga superficial, afectando a parámetros que se relacionan con la toxicidad. Los resultados fisicoquímicos observados siguen el mecanismo de LaMer, que explica cómo la concentración de monómeros en solución provoca una nucleación explosiva cuando se supera la sobresaturación crítica²¹. Posteriormente, las partículas crecen a través de la maduración de Ostwald, donde los núcleos sufren coalescencia con partículas más pequeñas²². Zhang et al.²³ reportaron un patrón similar en AgNPs, con una reducción inicial del tamaño por solubilización, seguido de un aumento debido a la nucleación. Además, las concentraciones de las NPs influyen en la disolución y coalescencia²⁴.

El potencial zeta de las AgNPs mostró una fuerte carga superficial que previno la aglomeración²⁵. Sin embargo, con la exposición térmica se disminuyó la carga superficial, desestabilizando las NPs²⁶. Las Fe₂O₃NPs eran inicialmente más inestables, pero se estabilizaron tras la nucleación debido a la alta concentración de Fe³⁺²⁷.

Los resultados toxicológicos mostraron, que la toxicidad aguda de las AgNPs en *C. elegans* está relacionada con el tamaño y la solubilidad de las partículas, siendo las de menor tamaño más tóxicas²⁸. Rosbach et al.²⁹ destacaron que la composición química y la concentración de iones también influyen en la toxicidad. El ensayo de ROS llevado a cabo por Luo et al.³⁰ reveló una toxicidad dosis-dependiente para las AgNPs, con una mayor generación de ROS. En general, la toxicidad aguda de ambas NPs fue similar, aunque las Fe₂O₃NPs resultaron más perjudiciales antes de la nucleación, debido a su composición química²⁹.

5. CONCLUSIONES

Este estudio destaca el uso eficaz de *C. elegans* como modelo para evaluar la toxicidad aguda de NPs en un corto tiempo. Aunque los niveles de exposición humana de las NPs a través de alimentos son considerablemente más bajos, *C. elegans* proporciona una valiosa herramienta inicial para la investigación. Uno de los objetivos clave fue sentar las bases para comprender los efectos de las AgNPs y Fe₂O₃NPs en un modelo biológico, lo cual es un paso crucial hacia la evaluación de su seguridad.

Dada la falta de información biológica y toxicológica sobre las NPs, especialmente E172 y E174 utilizadas como aditivos alimentarios, es urgente que la EFSA y la comunidad científica amplíen las investigaciones sobre los riesgos potenciales de estos compuestos. Futuras investigaciones deberán enfocarse en pruebas en matrices acuosas con diferentes niveles de pH para simular mejor las condiciones alimentarias reales. Además, la incorporación de técnicas avanzadas como SEM, TEM, XRD y EDS permitirá un análisis detallado de la morfología, estructura y composición de las NPs.

Paralelamente, se necesitan más estudios de toxicidad en *C. elegans*, que incluyan ensayos de funciones corporales e intestinales, junto con evaluaciones a largo plazo para entender mejor los riesgos asociados con la exposición continua a NPs en alimentos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen sinceramente el apoyo financiero proporcionado por el "Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia de la Comunidad Valenciana", a través del proyecto "Programa Investigo". También apreciamos la financiación del proyecto europeo "NAMS4NANO: Integración de Resultados de Nuevas Metodologías de Enfoque en Evaluaciones de Riesgo Químico: Estudios de Caso que Abordan Consideraciones a Escala Nanométrica", apoyado por la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA).

CONTRIBUCIÓN DE AUTORÍA

Yo, S.F.H., he sido responsable de la redacción del artículo, la búsqueda de literatura, la realización de los análisis experimentales y el procesamiento de los datos, así como de la elaboración del primer borrador. Junto a S.V.A., diseñamos la idea del estudio, realizamos el análisis de datos, creamos y diseñamos el estudio, establecimos el plan estadístico e interpretamos los datos. R.G.M. y J.M.B.B. han contribuido con revisiones críticas del artículo, así como en la financiación y apoyo al proyecto.

FINANCIACIÓN

Obra bajo financiación del "Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia de la Comunidad Valenciana", a través del proyecto "Programa Investigo". Además de la

financiación aportada por el proyecto europeo "NAMS4NANO: Integración de Resultados de Nuevas Metodologías de Enfoque en Evaluaciones de Riesgo Químico: Estudios de Caso que Abordan Consideraciones a Escala Nanométrica", apoyado por la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA).

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores expresan que no existen conflictos de interés al redactar el manuscrito.

DISPONIBILIDAD DE DATOS

Los datos se dispondrán en bancos de datos.

REFERENCIAS

- (1) EUR-Lex - 02008R1333-20231029 - EN - EUR-Lex. [Citado 15 de agosto 2024] Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2008/1333/2023-10-29>
- (2) Boey A, Ho HK All Roads Lead to the Liver: Metal Nanoparticles and Their Implications for Liver Health. *Small*. 2020;16(21), doi: 10.1002/smll.202000153.
- (3) Jafarizadeh-Malmiri H, Sayyar Z, Anarjan N, Berenjian A Nanobiotechnology in food: Concepts, applications and perspectives. *Nanobiotechnology in Food: Concepts, Applications and Perspectives*. 2019:1-155, doi: 10.1007/978-3-030-05846-3.
- (4) Kravanja G, Primožič M, Knez Ž, Leitgeb M Chitosan-based (Nano)materials for Novel Biomedical Applications. *Molecules*. 2019;24(10), doi: 10.3390/MOLECULES24101960.
- (5) Levard C, Hotze EM, Lowry G V., Brown GE Environmental Transformations of Silver Nanoparticles: Impact on Stability and Toxicity. *Environ Sci Technol*. 2012;46(13):6900-14, doi: 10.1021/es2037405.
- (6) Xuan L, Ju Z, Skonieczna M, Zhou P, Huang R Nanoparticles-induced potential toxicity on human health: Applications, toxicity mechanisms, and evaluation models. *MedComm (Beijing)*. 2023;4(4), doi: 10.1002/mco2.327.

(7) Kawata K, Osawa M, Okabe S In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells. *Environ Sci Technol.* 2009;43(15):6046-51, doi: 10.1021/ES900754Q/SUPPL_FILE/ES900754Q_SI_001.PDF.

(8) Hackenberg S, Scherzed A, Kessler M, Hummel S, Technau A, Froelich K, et al. Silver nanoparticles: Evaluation of DNA damage, toxicity and functional impairment in human mesenchymal stem cells. *Toxicol Lett.* 2011;201(1):27-33, doi: 10.1016/J.TOXLET.2010.12.001.

(9) Könczöl M, Ebeling S, Goldenberg E, Treude F, Gminski R, Gieré R, et al. Cytotoxicity and genotoxicity of size-fractionated iron oxide (magnetite) in A549 human lung epithelial cells: Role of ROS, JNK, and NF- κ B. *Chem Res Toxicol.* 2011;24(9):1460-75, doi: 10.1021/TX200051S/ASSET/IMAGES/MEDIUM/TX-2011-00051S_0003.GIF.

(10) Kim YS, Kim JS, Cho HS, Rha DS, Kim JM, Park JD, et al. Twenty-Eight-Day Oral Toxicity, Genotoxicity, and Gender-Related Tissue Distribution of Silver Nanoparticles in Sprague-Dawley Rats. *Inhal Toxicol.* 2008;20(6):575-83, doi: 10.1080/08958370701874663.

(11) Scientific opinion on the re-evaluation of silver (E 174) as food additive. *EFSA Journal.* 2016;14(1), doi: 10.2903/j.efsa.2016.4364.

(12) Scientific Opinion on the re-evaluation of iron oxides and hydroxides (E 172) as food additives. *EFSA Journal.* 2015;13(12), doi: 10.2903/j.efsa.2015.4317.

(13) Gubert P, Gubert G, Oliveira RC de, Fernandes ICO, Bezerra IC, Ramos B de, et al. *Caenorhabditis elegans* as a Prediction Platform for Nanotechnology-Based Strategies: Insights on Analytical Challenges. *Toxics.* 2023;11(3), doi: 10.3390/TOXICS11030239.

(14) Lee KH, Aschner M A Simple Light Stimulation of *Caenorhabditis elegans*. *Curr Protoc Toxicol.* 2016;67(1), doi: 10.1002/0471140856.tx1121s67.

(15) Hunt PR The *C. elegans* model in toxicity testing. *Journal of Applied Toxicology.* 2017;37(1):50-9, doi: 10.1002/jat.3357.

(16) Fuentes C, Verdú S, Fuentes A, Ruiz MJ, Barat JM Effects of essential oil components exposure on biological parameters of *Caenorhabditis elegans*. *Food and Chemical Toxicology.* 2022;159:112763, doi: 10.1016/J.FCT.2021.112763.

- (17) Lant, B, Derry, W-B Fluorescent Visualization of Germline Apoptosis in Living *Caenorhabditis Elegans*. Cold Spring Harb. 2014;8–20, doi:10.1101/pdb.prot080226
- (18) Kaptay G On the size and shape dependence of the solubility of nanoparticles in solutions. Int J Pharm. 2012;430(1-2):253-7, doi: 10.1016/j.ijpharm.2012.03.038.
- (19) Polte J Fundamental growth principles of colloidal metal nanoparticles – a new perspective. CrystEngComm. 2015;17(36):6809-30, doi: 10.1039/C5CE01014D.
- (20) H. Muller R, Shegokar R, M. Keck C 20 Years of Lipid Nanoparticles (SLN & NLC): Present State of Development & Industrial Applications. Curr Drug Discov Technol. 2011;8(3):207-27, doi: 10.2174/157016311796799062.
- (21) Mer VK La Nucleation in Phase Transitions. Ind Eng Chem. 1952;44(6):1270-7, doi: 10.1021/ie50510a027.
- (22) Ostwald W Über die vermeintliche Isomerie des roten und gelben Quecksilberoxyds und die Oberflächenspannung fester Körper. Zeitschrift für Physikalische Chemie. 1900;34U(1):495-503, doi: 10.1515/zpch-1900-3431.
- (23) Zhang X-F, Liu Z-G, Shen W, Gurunathan S Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. Int J Mol Sci. 2016;17(9):1534, doi: 10.3390/ijms17091534.
- (24) Wang YQ, Liang WS, Geng CY Coalescence Behavior of Gold Nanoparticles. Nanoscale Res Lett. 2009;4(7):684, doi: 10.1007/s11671-009-9298-6.
- (25) Lu GW, Gao P Emulsions and Microemulsions for Topical and Transdermal Drug Delivery. Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems. Elsevier; 2010. p. 59-94.
- (26) Liu H, Zhang H, Wang J, Wei J Effect of temperature on the size of biosynthesized silver nanoparticle: Deep insight into microscopic kinetics analysis. Arabian Journal of Chemistry. 2020;13(1):1011-9, doi: 10.1016/j.arabjc.2017.09.004.
- (27) Baalousha M Aggregation and disaggregation of iron oxide nanoparticles: Influence of particle concentration, pH and natural organic matter. Science of The Total Environment. 2009;407(6):2093-101, doi: 10.1016/j.scitotenv.2008.11.022.

(28) Choi O, Hu Z Size Dependent and Reactive Oxygen Species Related Nanosilver Toxicity to Nitrifying Bacteria. Environ Sci Technol. 2008;42(12):4583-8, doi: 10.1021/es703238h.

(29) Rossbach LM, Oughton DH, Maremonti E, Coutris C, Brede DA In vivo assessment of silver nanoparticle induced reactive oxygen species reveals tissue specific effects on cellular redox status in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Science of The Total Environment. 2020;721:137665, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.137665.

(30) Luo X, Xu S, Yang Y, Zhang Y, Wang S, Chen S, et al. A novel method for assessing the toxicity of silver nanoparticles in *Caenorhabditis elegans*. Chemosphere. 2017;168:648-57, doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.11.011.