



MINISTERIO
DE DERECHOS SOCIALES, CONSUMO
Y AGENDA 2030



agencia
española de
seguridad
alimentaria y
nutrición



EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA DE MATERIALES EN CONTACTO CON ALIMENTOS



Ángeles Jos Gallego
Catedrática de Toxicología
Universidad de Sevilla

1ª REUNIÓN RED NACIONAL DE MATERIALES EN CONTACTO CON ALIMENTOS



ÍNDICE

1. Introducción
2. Ensayos de toxicidad requeridos por la EFSA
3. Particularidades en el caso de nanomateriales
4. Ejemplos



1. Introducción

MARCO LEGAL

Reglamento (CE) 1935/2004, de 27 de octubre de 2004, del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos y por el que se derogan las Directivas 80/590/CEE y 89/109/CEE

Reglamento (CE) 2023/2006, de 22 de diciembre de 2006, de la Comisión, sobre buenas prácticas de fabricación de materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos.

[...] no transfieran sus componentes a los alimentos en cantidades que puedan:

- a) Representar un peligro para la salud humana**
- b) Provocar una modificación inaceptable de la composición de los alimentos***
- c) Provocar una alteración de las características organolépticas de éstos***



1. Introducción



NORMATIVAS NACIONALES



2. Ensayos de toxicidad requeridos por la EFSA

MATERIALES PLÁSTICOS (A PARTIR DEL 27/03/21)



ADOPTED: 30 July 2008
UPDATED: 09 September 2020
doi: 10.2903/j.efsa.2008.21r

NOTE FOR GUIDANCE

FOR THE PREPARATION OF AN APPLICATION FOR THE SAFETY ASSESSMENT OF A SUBSTANCE TO BE USED IN PLASTIC FOOD CONTACT MATERIALS

EFSA Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in contact with Food (AFC),
Vittorio Silano, Claudia Bolognesi, Laurence Castle, Jean-Pierre Cravedi, Karl-Heinz Engel, Paul Fowler, Roland Franz, Konrad Grob, Rainer Gürtler, Trine Husøy, Sirpa Kärenlampi, Wim Mennes, Maria Rosaria Milana, André Penninks, Maria de Fátima Tavares Poças, Andrew Smith, Christina Tlustos, Detlef Wölfle, Holger Zorn and Corina-Aurelia Zugravu.

This guidance was originally adopted by the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food (AFC) on 30 July 2008; the last revision was endorsed by the Panel on Food Contact Materials, Enzymes and Processing Aids (CEP) on 9 September 2020¹.



Endorsement date	9 September 2020
Implementation date	27 March 2021



2. Ensayos de toxicidad requeridos por la EFSA

MATERIALES PLÁSTICOS (A PARTIR DEL 27/03/21)

A mayor exposición (migración)



Mayor nº de datos toxicológicos



a) Migración elevada (5-60 mg/kg alimento) → Conjunto de datos completo (full)

b) Migración entre 0,05-5 mg/kg alimento → Conjunto de datos reducido (reduced)

c) Migración baja (<0,05 mg/kg alimento) → Conjunto de datos limitado (limited)





2. Ensayos de toxicidad requeridos por la EFSA

FULL

-2 ensayos de genotoxicidad *in vitro*

- Ensayo de mutación reversa en bacterias
- Ensayo de micronúcleos (MN) en células de mamífero

- Estudio toxicidad oral de 90 días

- Estudios de ADME

- Estudios toxicidad reproductiva y del desarrollo

- Estudios toxicidad a largo plazo / carcinogenicidad

REDUCED

-2 ensayos de genotoxicidad *in vitro*

- Estudio toxicidad oral de 90 días

- Datos que demuestren la ausencia de potencial acumulación en humanos

LIMITED

-2 ensayos de genotoxicidad *in vitro*



2. Ensayos de toxicidad requeridos por la EFSA

ENSAYOS DE GENOTOXICIDAD *IN VITRO*

- Ensayo de mutación reversa en bacterias



Mutaciones génicas

Guía OCDE 471

- Ensayo de MN en células de mamífero



Aberraciones cromosómicas
estructurales y numéricas

Guía OCDE 487

Posibilidad de requerir adicionalmente ensayos *in vivo*



2. Ensayos de toxicidad requeridos por la EFSA

ENSAYOS DE GENOTOXICIDAD *IN VITRO*

● Ensayo de mutación reversa en bacterias

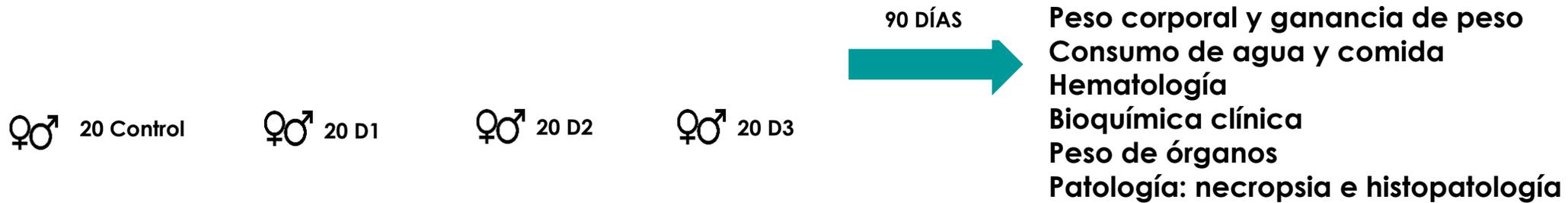
● Ensayo de MN en células de mamífero

- Resultados negativos: la sustancia no tiene potencial genotóxico
- Resultados no concluyentes, contradictorios: hacer tests adicionales *in vitro*
- Resultados positivos: hacer ensayos *in vivo*
 - Ensayo de MN *in vivo* (OCDE 474)
 - Ensayo Cometa *in vivo* (OCDE 489)
 - Ensayo de mutación génica en roedores transgénicos (OCDE 488)



2. Ensayos de toxicidad requeridos por la EFSA

ENSAYOS DE TOXICIDAD ORAL 90 DÍAS (OECD 408)



Hematología				Bioquímica clínica			Ca ⁺⁺
RBC	MCH	PT	LY	GLUC	CHOL	ALKP	
HGB	MCHC	PTT	MO	UREA	TRIGL	TOT PROT	
HCT	PLT	WBC	EO	CREAT	AST	Na ⁺	
MCV	RDW	NE	BA	BILI-T	ALT	K ⁺	

BMD ← NOAEL ←



2. Ensayos de toxicidad requeridos por la EFSA

**MATERIALES
ACTIVOS/INTELIGENTES
(A PARTIR DEL 27/03/21)**



SIMILAR



EFSA Journal (2009) 1208

**Opinion of the Panel on
food contact materials, enzymes, flavourings and processing aids (CEF)**

**Guidelines on submission of a dossier for safety evaluation by the EFSA of
active or intelligent substances present in active and intelligent
materials and articles intended to come into contact with food**

This guidance was originally adopted by the Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing aids (CEF) on 21 July 2009. The present revision was endorsed by the Panel on Food Contact Materials, Enzymes and Processing Aids (CEP) on 09 September 2020¹.



Endorsement date	9 September 2020
Implementation date	27 March 2021



2. Ensayos de toxicidad requeridos por la EFSA

PLÁSTICOS RECICLADOS (A PARTIR DEL 27/03/21)



The EFSA Journal (2008) 717

Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on

Guidelines on submission of a dossier for safety evaluation by the EFSA of a recycling process to produce recycled plastics intended to be used for manufacture of materials and articles in contact with food

This guidance was originally adopted by Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on 21 May 2008. The present revision was endorsed by the Panel on Food Contact Materials, Enzymes and Processing Aids (CEP) on 09 September 2020¹.



Endorsement date	9 September 2020
Implementation date	27 March 2021



2. Ensayos de toxicidad requeridos por la EFSA

PLÁSTICOS RECICLADOS (A PARTIR DEL 27/03/21)

Los riesgos asociados al uso de materiales plásticos reciclados proceden de la posible migración de compuestos químicos:

-Contaminantes a la entrada del proceso:

- Contaminantes que se han podido introducir a partir de materiales no aptos para contacto alimentario

- Contaminantes accidentales procedentes de usos anteriores, incluido un posible uso indebido

-Compuestos químicos usados en el proceso de reciclado

-Productos de degradación del polímero o de los aditivos plásticos



2. Ensayos de toxicidad requeridos por la EFSA

PLÁSTICOS RECICLADOS (A PARTIR DEL 27/03/21)

- Calidad de la materia prima
- Eficacia del proceso para eliminar contaminantes
- Uso previsto

- 1.Proceso de reciclado
- 2.Caracterización de la materia prima
- 3.Determinación de la eficiencia de la descontaminación
- 4.Caracterización del plástico reciclado
- 5.Uso previsto
- 6.Cumplimiento de las disposiciones
- 7.Evaluación

SCIENTIFIC OPINION

efsa JOURNAL

Safety assessment of the process Lietpak, based on the EREMA MPR technology, used to recycle post-consumer PET into food contact materials

SCIENTIFIC OPINION

efsa JOURNAL

Safety assessment of the process Shinkong, based on the EREMA Basic technology, used to recycle post-consumer PET into food contact materials

SCIENTIFIC OPINION

efsa JOURNAL

Safety assessment of the process Reliance Industries, based on the ProTec technology, used to recycle post-consumer PET into food contact materials



3. Particularidades en el caso de nanomateriales

GUIDANCE



ADOPTED: 30 June 2021

doi: 10.2903/j.efsa.2021.6768

Guidance on risk assessment of nanomaterials to be applied in the food and feed chain: human and animal health

EFSA Scientific Committee,

Simon More, Vasileios Bampidis, Diane Benford, Claude Bragard, Thorhallur Halldorsson, Antonio Hernández-Jerez, Susanne Hougaard Bennekou, Kostas Koutsoumanis, Claude Lambré, Kyriaki Machera, Hanspeter Naegeli, Søren Nielsen, Josef Schlatter, Dieter Schrenk, Vittorio Silano (deceased), Dominique Turck, Maged Younes, Jacqueline Castenmiller, Qasim Chaudhry, Francesco Cubadda, Roland Franz, David Gott, Jan Mast, Alicja Mortensen, Agnes G. Oomen, Stefan Weigel, Eric Barthelemy, Ana Rincon, José Tarazona and Reinhilde Schoonjans

GUIDANCE



ADOPTED: 30 June 2021

doi: 10.2903/j.efsa.2021.6769

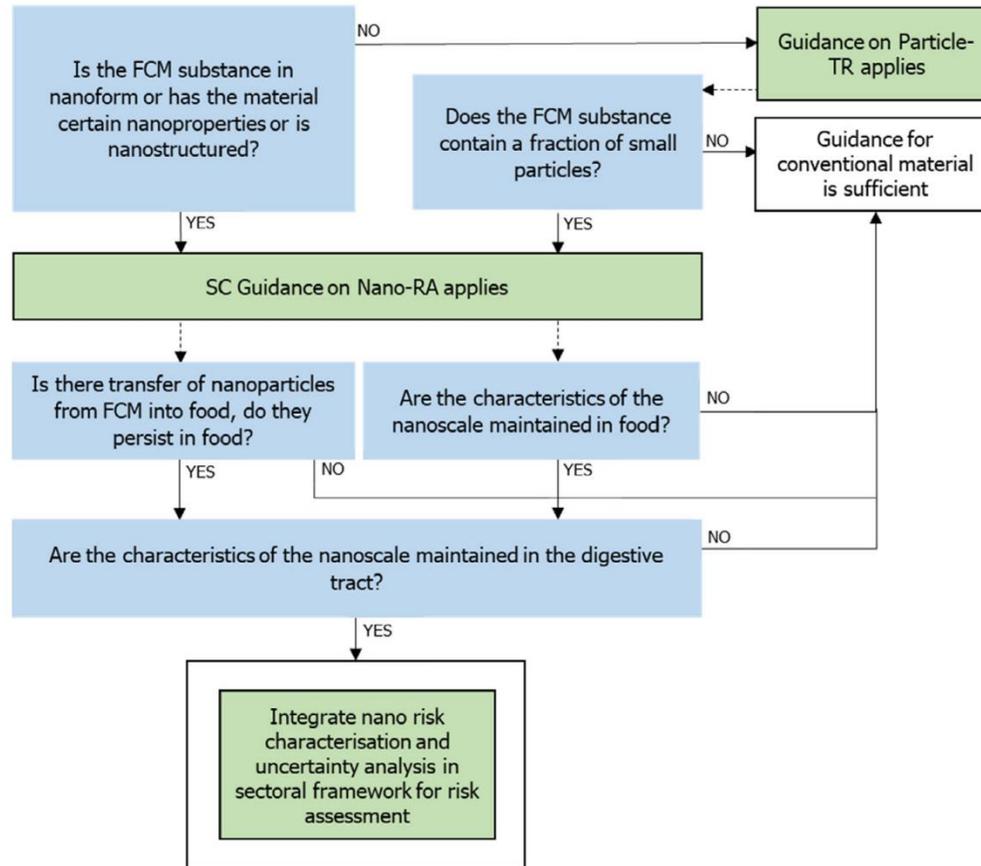
Guidance on technical requirements for regulated food and feed product applications to establish the presence of small particles including nanoparticles

EFSA Scientific Committee,

Simon More, Vasileios Bampidis, Diane Benford, Claude Bragard, Thorhallur Halldorsson, Antonio Hernández-Jerez, Susanne Hougaard Bennekou, Kostas Koutsoumanis, Claude Lambré, Kyriaki Machera, Hanspeter Naegeli, Søren Nielsen, Josef Schlatter, Dieter Schrenk, Vittorio Silano (deceased), Dominique Turck, Maged Younes, Jacqueline Castenmiller, Qasim Chaudhry, Francesco Cubadda, Roland Franz, David Gott, Jan Mast, Alicja Mortensen, Agnes G. Oomen, Stefan Weigel, Eric Barthelemy, Ana Rincon, Jose Tarazona and Reinhilde Schoonjans



3. Particularidades en el caso de nanomateriales



- Caracterización f-q del NM usado como FCM
- Caracterización f-q del NM tal y como está presente en el FCM y cuando se libera
- Potencial transferencia debido a hinchamiento, tensión mecánica o desintegración física
- Técnicas para determinar la migración



3. Particularidades en el caso de nanomateriales

SCIENTIFIC OPINION



ADOPTED: 6 July 2021

doi: 10.2903/j.efsa.2021.6790

Safety assessment of the substance silver nanoparticles for use in food contact materials

-Aprobada: las NP-Ag permanecen embebidas en el polímero y no migran

SCIENTIFIC OPINION



ADOPTED: 26 January 2022

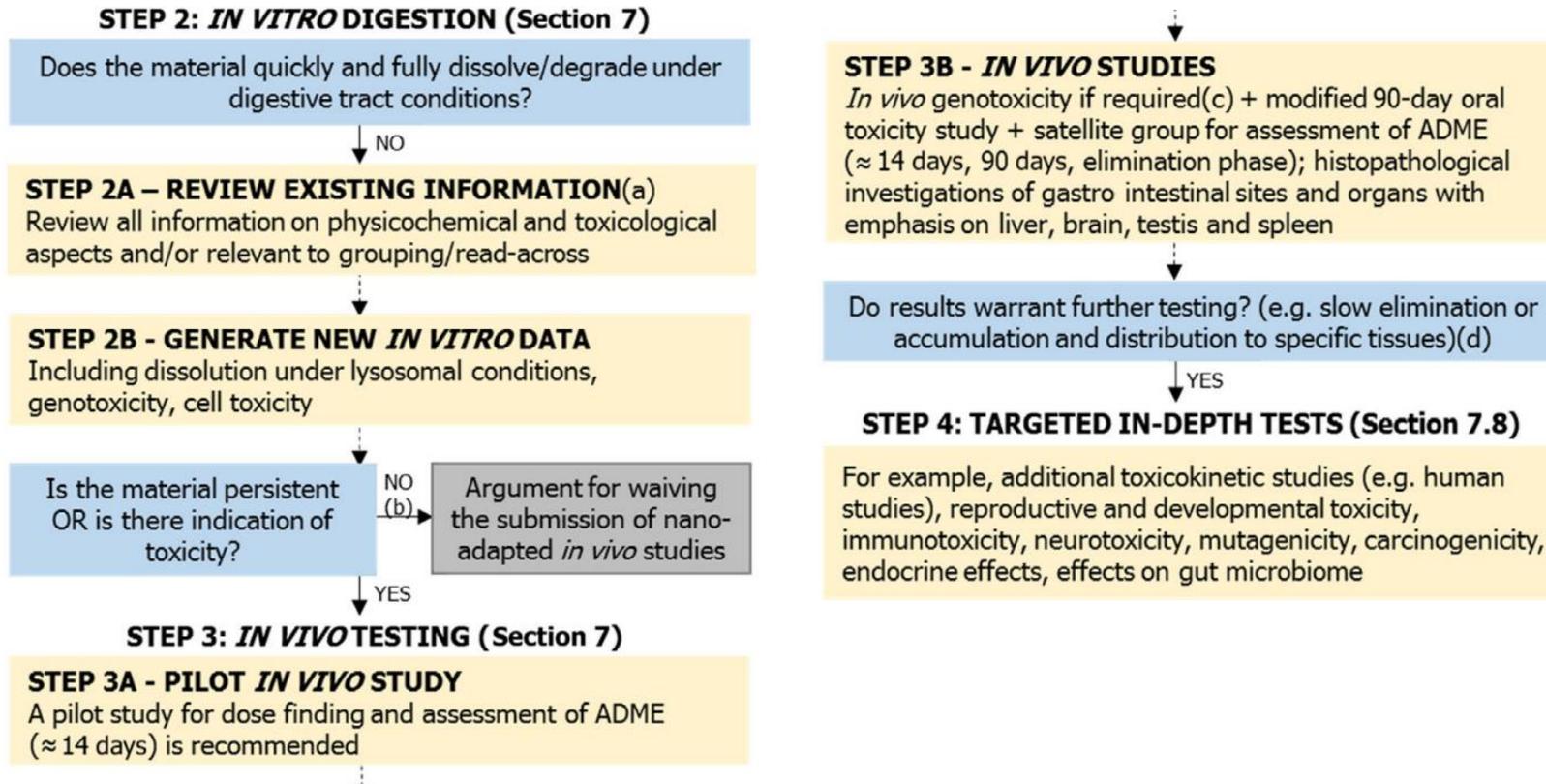
doi: 10.2903/j.efsa.2022.7135

Safety assessment of the substance nano precipitated calcium carbonate for use in plastic food contact materials

-Aprobada: la forma particulada se disuelve rápidamente a las condiciones gástricas



3. Particularidades en el caso de nanomateriales





3. Particularidades en el caso de nanomateriales

GENOTOXICIDAD *IN VITRO*

-Test de Ames (OCDE 471) no apto para NM

- (OCDE 476) Ensayo de mutación génica en células de mamífero *in vitro* con los genes Hprt y xprt

- (OCDE 490) Ensayo de linfoma de ratón (MLA)

- (OCDE 487) Ensayo de MN

- Se recomiendan periodos de exposición largos

- Retrasar la adición de CytB

- Posibles interferencias con citometría de flujo

- Valorar caso por caso el empleo de S9



3. Particularidades en el caso de nanomateriales

ESTUDIOS *IN VIVO*

- La exposición debe ser similar a la prevista en humanos
- La dispersión del NM extemporánea. Datos de estabilidad y grado de aglomeración
- Confirmación de exposición sistémica. Cuantificación en tejidos
- Asegurar la completa administración de la dosis



4. Ejemplos

Propil-propano tiosulfonato (PTSO)

Test de Ames

Table 1

Results of Ames test conducted with PTSO for three independent experiments. Milli Q water was used as negative control (for exposure concentrations) and pure DMSO (10 μ L) as solvent for positive controls. Data are given as mean \pm SD revertants/plate for three replicates for each concentration in each experiment. Positive controls without S9 for TA 97A/TA98/TA102/TA104: 2-NF (0.1 μ g/plate) and for TA100: NaN₃ (1 μ g/plate). Positive control for all strains with S9: 2-AF (20 μ g/plate).** $P < 0.01$ significant differences from controls.

Concentration (μ M)		TA97A		TA98		TA100		TA102		TA104	
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
PTSO	Negative controls	169 \pm 24	165 \pm 17	22 \pm 3	15 \pm 6	108 \pm 9	107 \pm 12	252 \pm 54	224 \pm 18	236 \pm 17	255 \pm 40
	1	298 \pm 53	239 \pm 26	24 \pm 6	23 \pm 6	133 \pm 7	138 \pm 13	271 \pm 46	380 \pm 19	320 \pm 28	331 \pm 48
	5	196 \pm 40	222 \pm 41	25 \pm 6	22 \pm 4	142 \pm 15	155 \pm 21	292 \pm 26	327 \pm 68	279 \pm 26	266 \pm 44
	10	209 \pm 17	225 \pm 56	19 \pm 4	17 \pm 4	136 \pm 19	120 \pm 5	210 \pm 35	288 \pm 55	157 \pm 15	244 \pm 48
	15	180 \pm 15	172 \pm 33	21 \pm 4	22 \pm 2	117 \pm 7	98 \pm 12	187 \pm 25	188 \pm 5	327 \pm 5	328 \pm 42
	20	127 \pm 18	87 \pm 6	20 \pm 3	16 \pm 6	102 \pm 10	101 \pm 6	199 \pm 48	139 \pm 28	253 \pm 52	359 \pm 88
	Positive controls	680 \pm 71**	617 \pm 25**	>1000**	586 \pm 49**	362 \pm 6**	322 \pm 22**	591 \pm 13**	661 \pm 29**	638 \pm 28**	752 \pm 6**
	DMSO	228 \pm 15	210 \pm 46	17 \pm 3	20 \pm 4	120 \pm 7	131 \pm 7	228 \pm 21	236 \pm 30	258 \pm 22	212 \pm 15

Mellado-García et al. FCT 86 (2015) 365-73



4. Ejemplos

Propil-propano tiosulfonato (PTSO)

Test de MN

Table 2

Percentage of binucleated cells with micronuclei (BNMN) and the nuclear division index (NDI) in cultured mouse lymphoma cells treated with PTSO in the absence or presence of the metabolic fraction S9. Values are expressed as mean \pm SD.*** $P < 0.001$ significantly different from negative control.

Test substance	Absence of S9				Presence of S9			
	Treatment time (h)	Concentrations	BNMN (%) \pm SD	NDI \pm SD	Treatment time (h)	Concentrations	BNMN (%) \pm SD	NDI \pm SD
Negative control	24	–	2.3 \pm 0.9	1.7 \pm 0.1	3–6	–	0.8 \pm 0.3	1.8 \pm 0.1
Positive control	24	Mitomycin C 0.0625 μ g/mL	6.5 \pm 0.9***	1.7 \pm 0.1	3–6	Cyclophosphamide 8 μ g/mL	3.3 \pm 1.5***	1.8 \pm 0.3
PTSO	24	5 μ M	1.9 \pm 0.9	1.7 \pm 0.1	3–6	2.5 μ M	0.7 \pm 0.5	1.8 \pm 0.0
	24	10 μ M	2.1 \pm 0.7	1.7 \pm 0.0	3–6	5 μ M	0.6 \pm 0.3	1.8 \pm 0.4
	24	20 μ M	2.2 \pm 0.8	1.7 \pm 0.1	3–6	10 μ M	1.1 \pm 0.1	1.8 \pm 0.1
	24	30 μ M	1.6 \pm 0.9	1.7 \pm 0.1	3–6	15 μ M	2.2 \pm 0.16***	1.6 \pm 0.1
	24	40 μ M	2.6 \pm 0.7	1.6 \pm 0.1	3–6	20 μ M	3.8 \pm 1.5***	1.5 \pm 0.2

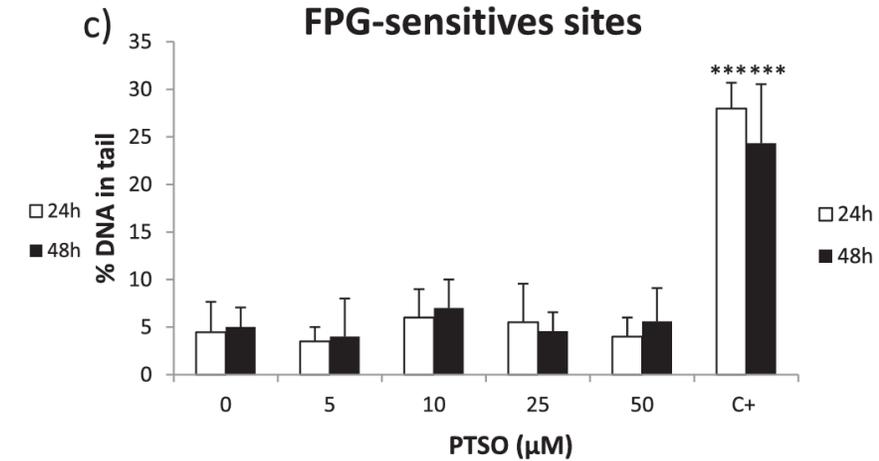
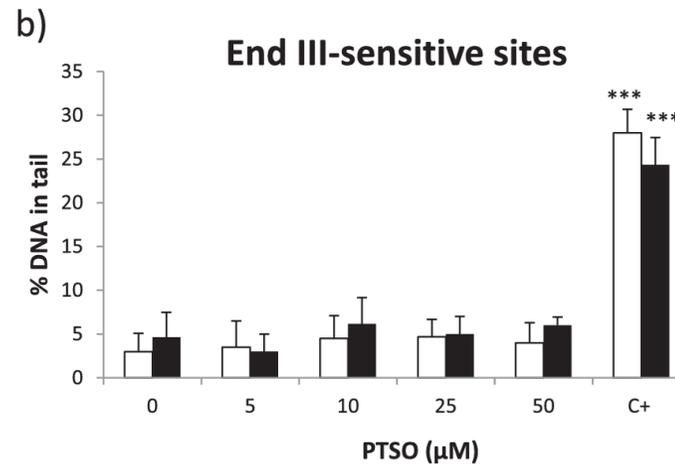
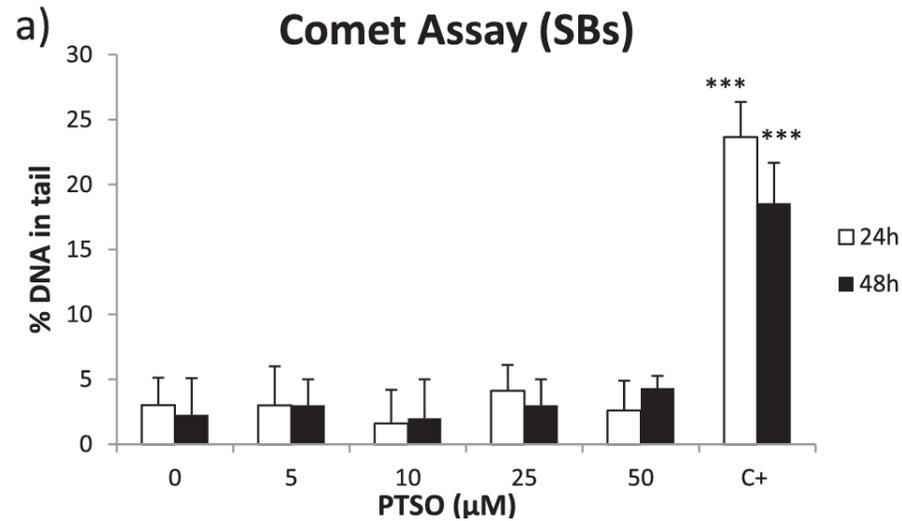
Mellado-García et al. (2015)



4. Ejemplos

Propil-propano tiosulfonato (PTSO)

Ensayo Cometa

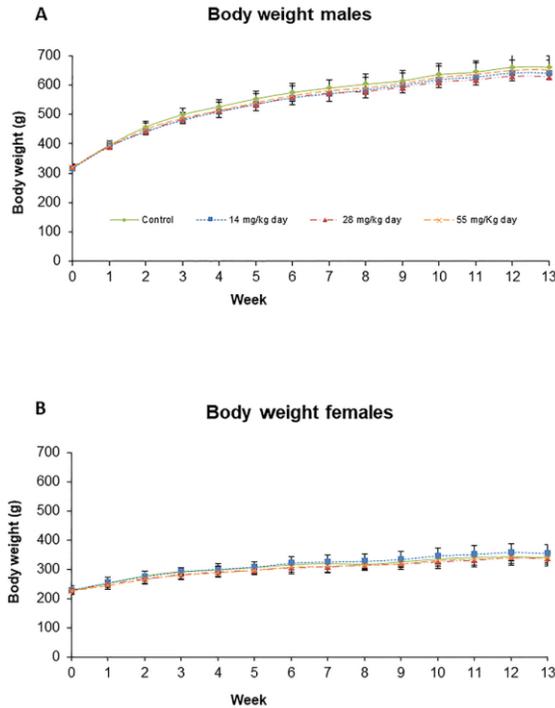


Mellado-García et al. (2015)



4. Ejemplos

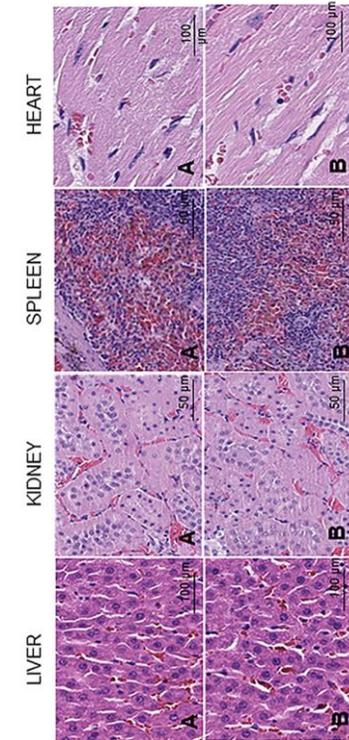
Propil-propano tiosulfonato (PTSO)



ORGAN WEIGHT DATA SUMMARY											
MALE					FEMALE						
		Group 1	Group 2	Group 3	Group 4			Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
		(0 mg/Kg/day)	(14 mg/Kg/day)	(28 mg/Kg/day)	(55 mg/Kg/day)			(0 mg/Kg/day)	(14 mg/Kg/day)	(28 mg/Kg/day)	(55 mg/Kg/day)
		N = 10	N = 10	N = 10	N = 10			N = 10	N = 10	N = 10	N = 10
BODY W. (g)	MEAN	633.80	623.10	611.5	625.90	BODY W. (g)	MEAN	326.80	338.00	321.10	321.30
	ST. DEV.	38.25	28.71	26.50	48.14		ST. DEV.	11.50	29.08	23.81	18.31
		F(36.3) = 0.19 p = 0.90; N.S.						F(36.3) = 1.34 p = 0.29; N.S.			
BRAIN (g)	MEAN	2.09	2.13	2.12	2.07	BRAIN (g)	MEAN	1.96	2.03	2.01	2.06
	ST. DEV.	0.21	0.14	0.17	0.23		ST. DEV.	0.21	0.10	0.12	0.15
		KW = 0.09 p = 0.99; N.S.						KW = 2.35 p = 0.50; N.S.			
LIVER (g)	MEAN	21.06	18.49	18.40	18.41	LIVER (g)	MEAN	8.41	9.54	8.90	8.48
	ST. DEV.	4.86	1.45	1.77	2.40		ST. DEV.	1.36	1.09	1.08	0.83
		F(36.3) = 1.99 p = 0.13; N.S.						F(36.3) = 2.21 p = 0.10; N.S.			
HEART (g)	MEAN	2.14	1.98	1.82*	1.99	HEART (g)	MEAN	1.21	1.28	1.20	1.22
	ST. DEV.	0.18	0.19	0.19	0.32		ST. DEV.	0.13	0.13	0.14	0.16
		F(36.3) = 3.11 *p < 0.05						F(36.3) = 0.67 p = 0.59; N.S.			
SPLEEN (g)	MEAN	1.17	1.16	1.16	1.45	SPLEEN (g)	MEAN	0.80	0.86	0.74	0.75
	ST. DEV.	0.10	0.15	0.14	0.93		ST. DEV.	0.11	0.19	0.07	0.09
		KW = 0.2426 p = 0.9704; N.S.						F(36.3) = 1.71 p = 0.18; N.S.			
KIDNEYS (g)	MEAN	4.05	4.10	3.99	4.06	KIDNEYS (g)	MEAN	2.13	2.30	2.15	2.06
	ST. DEV.	0.30	0.41	0.37	0.28		ST. DEV.	0.23	0.23	0.20	0.14
		F(36.3) = 0.17 p = 0.92; N.S.						F(36.3) = 2.48 p = 0.08; N.S.			

Cascajosa-Lira et al. FCT 144 (2020) 111612

Ensayo 90 días oral



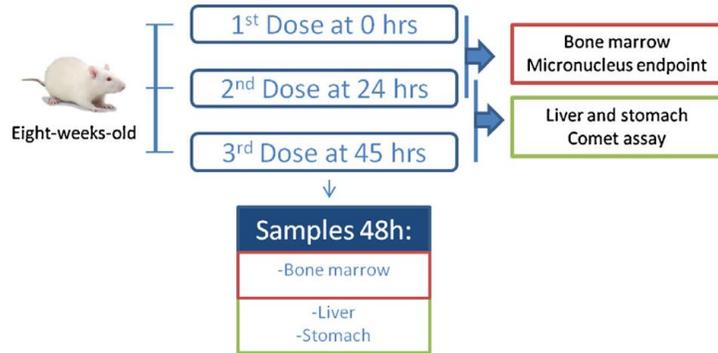


4. Ejemplos

Ensayo genotoxicidad *in vivo*

Propil-propano tiosulfonato (PTSO)

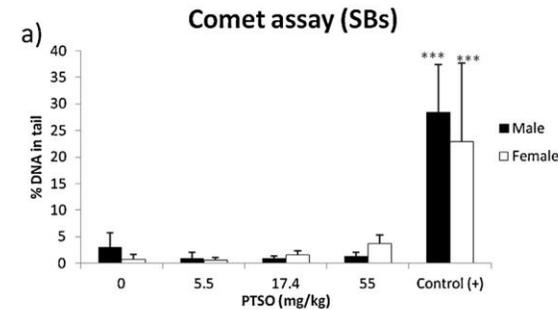
Combination Micronucleus and Comet Assay Design



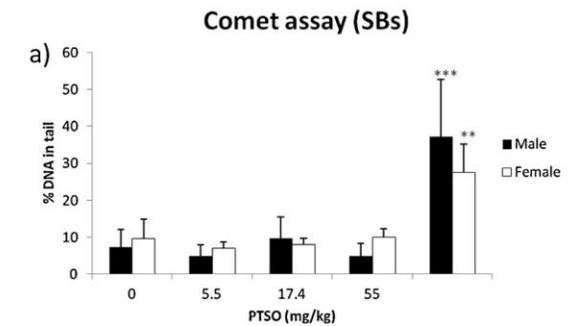
Groups	N	Doses	Sex	PCE/Total	% MN
Control (-)	5	-	Male	0.67 ± 0.16	0.18 ± 0.09
	5		Female	0.65 ± 0.00	0.25 ± 0.24
Control (+)	3	200 mg/Kg	Male	0.47 ± 0.10	1.98 ± 0.88 ^a
EMS	3		Female	0.62 ± 0.12	1.88 ± 0.19 ^a
PTSO	5	5.5 mg/Kg	Male	0.67 ± 0.17	0.23 ± 0.03
	5		Female	0.64 ± 0.00	0.25 ± 0.22
	5	17.4 mg/kg	Male	0.66 ± 0.19	0.41 ± 0.32
	5		Female	0.64 ± 0.17	0.24 ± 0.31
5	55 mg/kg	Male	0.76 ± 0.12	0.54 ± 0.49	
5		Female	0.65 ± 0.16	0.30 ± 0.05	

^a Significantly different from negative control (p < 0.001).

LIVER



STOMACH



Mellado-García et al. Mut Res 800 (2016) 1-11



4. Ejemplos

Ensayo de linfoma de ratón

Óxido de grafeno reducido (rGO)

a) In absence of S9 (4 h)										
Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Relative total growth		Percent plating efficiency		Mutant frequency ($\times 10^{-6}$)		MF (S/L) ^a		IMF (MF-SMF) ($\times 10^{-6}$)	
	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 1	Experiment 2
0	100	100	104	74	116	124	63/53	50/74	–	–
15.6	78	94	85	106	203	191	107/96	75/116	87	67
31.2	58	84	102	80	155	235	84/71	87/148	39	111
62.5	46	80	135	82	250	205	189/61	126/79	134	81
125	35	54	118	159	220	336**	133/87	205/131	105	212
250	36	51	95	121	271	447***	227/44	349/98	156	323
MMS (10 $\mu\text{g/mL}$)	56	84	88	77	606**	609***	331/275	306/303	491	485
b) In absence of S9 (24 h).										
Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Relative total growth		Percent plating efficiency		Mutant frequency ($\times 10^{-6}$)		MF (S/L) ^a		IMF (MF-SMF) ($\times 10^{-6}$)	
	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 1	Experiment 2
0	100	100	113	113	149	115	81/68	65/50	–	–
15.6	93	64	80	100	212	72.8	157/55	30/42	62.5	–42.3
31.2	91	53	116	113	253	152	169/84	102/50	104	37.4
62.5	86	50	111	84	260	219	189/71	147/72	111	104
125	43	50	96	47	285	275	181/104	140/135	135	160
250	23	38	106	59	443	377	283/160	246/131	294	262
MMS (10 $\mu\text{g/mL}$)	39	30	32	27	2840***	3160***	1491/1349	1457/1703	2690	3040

*** $p < 0.001$.

Cebadero et al.
Chem-Biol Int 372
(2023) 110367



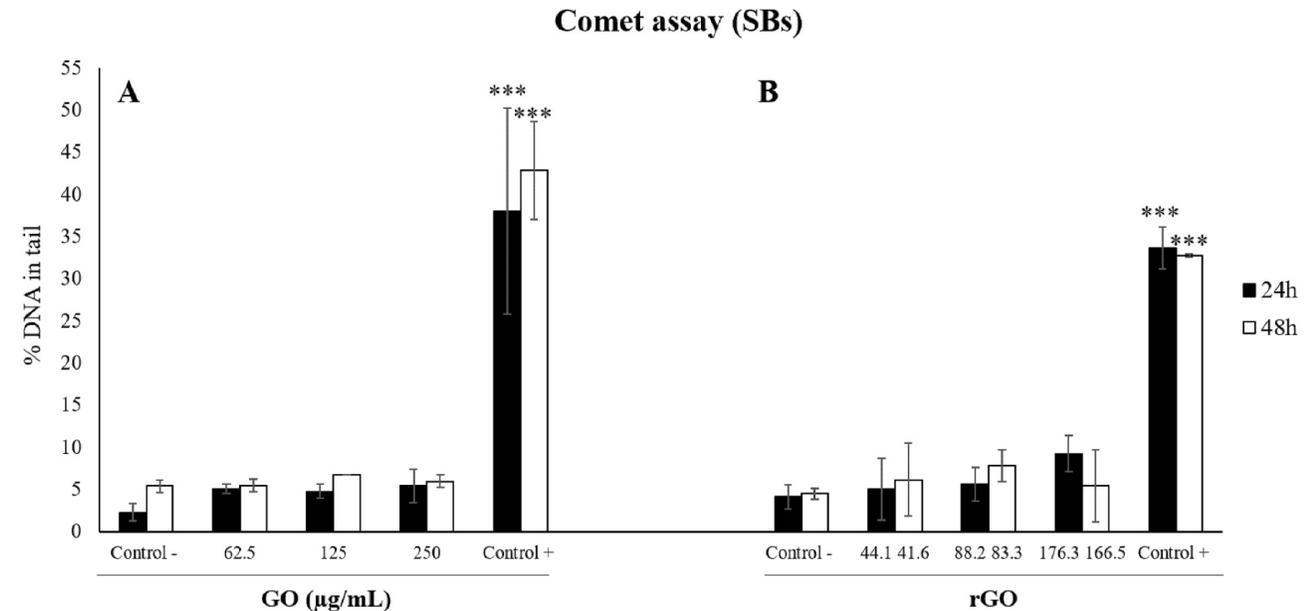
4. Ejemplos

Óxido de grafeno reducido (rGO)

Ensayo Cometa

Ensayo de MN

b)	Exposure Time	BNMN (%) ± SD	NDI ± SD
Control -	24 h	0.97 ± 0.23	1.59 ± 0.02
rGO			
15.6 µg/mL	24 h	1.60 ± 0.43	1.59 ± 0.04
31.3 µg/mL		1.15 ± 0.1	1.55 ± 0.03
62.5 µg/mL		1.60 ± 0.63	1.56 ± 0.02
125.0 µg/mL		0.70 ± 0.26	1.65 ± 0.05
250.0 µg/mL		0.55 ± 0.34	1.59 ± 0.04
Mit C (0.0625) µg/mL	24 h	6.10 ± 0.95 ***	1.50 ± 0.04
Colch (0.0125 µg/mL)		6.60 ± 0.28 ***	1.72 ± 0.04



Cebadero et al. Chem-Biol Int 372 (2023) 110367