

Revisión

Revisión Sistemática sobre la toxicidad derivada de la exposición al Grafeno

Systematic Review of Toxicity Derived from Graphene Exposure

Carina Alves da Silva¹, Daniela Pina¹, Hanna Hernández², Manel Román¹

1. Unidad Docente de Medicina del Trabajo Euskadi. España.
2. Unidad Docente de Medicina del Trabajo Canarias. España.

Recibido: 23-02-2018

Aceptado: 27-02-2018

Correspondencia:

Correo electrónico: graphenehealthy@gmail.com

Este trabajo se ha desarrollado dentro del Programa Científico de la Escuela Nacional de Medicina del Trabajo del Instituto de Salud Carlos III en convenio con la Unidad Docente de Medicina del Trabajo de Euskadi y la Unidad Docente de Medicina del Trabajo de Canarias. España.

Resumen

El grafeno, compuesto de carbono, resistente, flexible, muy ligero y estable a grandes presiones. Conduce calor y electricidad. Por estas propiedades se ha convertido en uno de los materiales más prósperos, cuyas aplicaciones generan una gran inversión de tiempo y recursos económicos; con ello tanto los profesionales industriales como terceras partes se pueden ver expuestos a sus posibles efectos nocivos.

Este trabajo pretende indagar en la existencia de toxicidad del grafeno en el ser humano y en otros mamíferos, revisando la literatura científica concerniente a la exposición al grafeno en los últimos 10 años y los posibles efectos tóxicos para la salud. Identificar también los límites de toxicidad entre dosis-respuesta (si existen), los aparatos de medición y monitorización de la exposición, y en qué órgano y aparatos existe mayor exposición y daño. Finalmente revisar si hay diferencias en cuanto a la toxicidad, entre las formas de grafeno estudiadas.

Para abordar estos objetivos se ha acotado la búsqueda bibliográfica a artículos publicados entre 2007 y 2017 en las siguientes bases de datos; MEDLINE, SCIENCEDIRECT, COCHRANE y SCOPUS. Se seleccionaron por criterios de inclusión-exclusión un total de 17 artículos.

En base a estas referencias, se sugiere la existencia de un potencial efecto tóxico a la exposición a diferentes formas de grafeno de manera dosis-dependiente, principal pero no exclusivamente en la exposición respiratoria. Así mismo, se debe seguir realizando estudios más precisos para llegar a un consenso en relación a los niveles máximos de exposición permitidos, y los requisitos a exigir en medidas de protección individual.

Med Segur Trab (Internet). 2018;64(250):75-88

Palabras clave: Grafeno, toxicidad, exposición, salud ocupacional.



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Abstract

Graphene is an atomic-scale hexagonal lattice made up of carbon atoms. This material exhibits excellent thermal and electrical conductivity, being resistant, flexible, very light and stable at high pressures. It has become due to these properties one of the most prosperous materials, whose applications generate a great investment of time and economic resources. Both industrial professionals and other third parties may be exposed to their possible harmful effects.

This work aims to investigate the existence of graphene toxicity in humans and other mammals, reviewing the scientific literature concerning the exposure to graphene in the last 10 years and the possible adverse effects on human health. To identify as well the dose-response assessment of toxicity (if any), the exposure measurement and monitoring devices, and which organs or apparatus exhibit bigger exposure and damage. To check finally for toxicity differences among the different forms of graphene studied.

To address these objectives, the literature search has been limited to those articles published between 2007 and 2017 in the following databases; MEDLINE, SCIEDIRECT, COCHRANE and SCOPUS. A total of 17 articles were selected using inclusion-exclusion criteria.

Based on these references, a potential health effect to the exposure to different forms of graphene in a dose-dependent manner is suggested, principally but not exclusively in respiratory exposure. Therefore, more precise studies must be carried out to reach a consensus in relation to the maximum permissible exposure limits and the requirements in terms of individual protection measures.

Med Segur Trab (Internet). 2018;64(250):75-88

Keywords: Graphene, toxicity, exposure, occupational health.

INTRODUCCIÓN

La aparición de los materiales compuestos, que permite disminuir el peso mejorando sus prestaciones, ha hecho que Universidades, Centros Tecnológicos y empresas hagan los esfuerzos necesarios para desarrollar y aplicar dichos materiales a productos de nuestro uso cotidiano.

En particular el grafeno se conoce desde la década de los '30, pero por ser considerado inestable su investigación fue abandonada. No fue hasta 2004 cuando los científicos, de origen ruso, Novoselov y Geim consiguieron aislarlo a temperatura ambiente de una forma estable, recibiendo por estas investigaciones el Nobel de Física en el 2010.

A nivel económico, las previsiones del mercado hablan de un crecimiento del 40% anual entre 2012 y 2020, ascendiendo desde los 9 millones de dólares en 2012 hasta los 126 millones en 2020¹. Más de 2.2 billones de euros ya han sido invertidos en investigación, y existen 7,740 patentes registradas entre 2008 y 2012². También remarcar que el European Research Council (ERC) ha garantizado 1 billón de euros para invertir en "Future and Emerging Technologies (FET)", un proyecto de la "Graphene Flagship", y siendo esta la mayor iniciativa de investigación en la historia de la UE³.

En cuanto a las características de este material, está compuesto exclusivamente por carbono y surge cuando los átomos de este se agrupan con una alta densidad en láminas de dos dimensiones muy finas, siendo su estructura hexagonal. Se obtiene a partir del grafito, sustancia abundante en la naturaleza.

Se trata de un material duro, resistente, flexible y muy ligero. Además, conduce muy bien tanto el calor como la electricidad, y permanece en condiciones muy estables cuando se le somete a grandes presiones.

Pese a ser formado principalmente por carbono, al igual que otros muy estudiados en la industria hasta la fecha, el grafeno posee esas propiedades incalculables que hacen que en los últimos años se haya convertido en uno de los materiales más prósperos, cuyas innumerables aplicaciones han generado una gran inversión de tiempo y recursos económicos en el estudio de las mismas.

Las técnicas de extracción son bien conocidas y localizadas. Estas son cuatro; exfoliación de grafito, deposición de átomos de carbono, oxido-reducción de óxido de grafeno, y obtención de grafeno de manera artificial.

En la primera se arranca de forma mecánica mediante algún tipo de material adherente las láminas de un trozo de grafito. El proceso es simple pero crea cantidades ínfimas de grafeno.

En el método por deposición se consiguen mayores cantidades de material pero por contra los costes de producción son mayores. Este procedimiento se basa en el calentamiento del carbono dejando las partículas en suspensión y posteriormente al enfriarse se depositan sobre el sustrato, formándose láminas de grafeno homogéneas.

El tercer método consiste en el uso de reacciones red-ox. En estas el óxido de grafeno reacciona con sustancias químicas, por ejemplo que contengan hidrógeno y posteriormente se reduce con elementos compuestos de carbono para rellenar los huecos de su estructura.

Por último, el método de extracción más destacado, aunque el más costoso, es la manera artificial. En este se manipulan moléculas de óxido de grafeno hasta conseguir un material que posea las características mecánicas y eléctricas deseadas.

Entre sus principales aplicaciones se encuentran las nuevas tecnologías, pero también se ambicionan múltiples aplicaciones en industria química e ingeniería biológica, con prometedores usos en medicina.

Se están llevando a cabo investigaciones y fabricando productos en el sector aeroespacial (súper combustibles, lubricantes y aleaciones metálicas más ligeras y duraderas), textil, deportes, automoción y transporte (composites de polímeros de grafeno que aumentan la

resistencia y ligereza de plásticos, electrónica wearable, pinturas anti-rayado y neumáticos más duraderos y flexibles, entre otros), construcción (materiales más resistentes, paneles solares más eficientes, ventanas inteligentes), medicina (nano-detectores de enfermedades en fases primarias), energía (súper baterías y súper capacitadores capaces de cargar en minutos y durar días) y electrónica (súper procesadores más pequeños y rápidos, chips imprimibles, pantallas enrollables), entre otras muchas aplicaciones⁴.

Por otro lado con el avance tecnológico surge la necesidad de encuadrar este material dentro de un marco legislativo que permitirá su inclusión y uso en la industria.

Se están iniciando protocolos y han surgido varias propuestas desde la Comisión Europea sobre la necesidad de avanzar la legislación sobre esta sustancia, a pesar de estar contemplada en el ámbito de los Nanomateriales.

Así mismo, desde el punto de vista de seguridad y salud en el trabajo para los nanomateriales, es de aplicación tanto la normativa general de seguridad y salud en el trabajo, Ley de Prevención de Riesgos Laborales (LPRL) y Reglamento de los Servicios de Prevención (RSP). También las normativas específicas de desarrollo de la LPRL que sean de aplicación en función de sus características de peligrosidad^{5,6,7,8,9,10}.

A la comercialización de sustancias y mezclas, la legislación considera los nanomateriales como sustancias y, por tanto, les será de aplicación el Reglamento REACH sobre Registro, Evaluación y Autorización de sustancias químicas y el Reglamento CLP sobre Clasificación, Envasado y Etiquetado de sustancias y mezclas.

Debido al creciente número de publicaciones, patentes y organizaciones, así como de su comercialización mundial, ha resultado imprescindible la estandarización de la terminología relacionada con el grafeno, lo que está contemplado en la ISO/TS 80004-3, ISO/TS 80004-11 y ISO/TS 80004-6¹¹.

La seguridad y salud en el trabajo con nanomateriales y por ende con el grafeno se enfrenta en la actualidad a una situación en la que casi todos los aspectos a tener en cuenta presentan lagunas de conocimiento debido a una limitada información sobre: la toxicología, los efectos para la salud, la eficacia de los sistemas de ventilación y equipos de protección individual así como falta de Límites de Exposición Profesional (LEP) y de definición de las medidas adecuadas para determinar la exposición a los nanomateriales.

Al ser un material cada vez más usado, tanto los profesionales de la industria, como seres humanos ajenos a la misma, se pueden ver expuestos a sus posibles efectos nocivos. Por un lado, directamente en los trabajadores durante la extracción, producción e investigación; y por otro, en el resto de seres vivos por el impacto ambiental de sus residuos, convirtiéndose así en un potencial riesgo emergente que se debe controlar.

Frente al insuficiente conocimiento de los efectos tóxicos del grafeno, existe un creciente interés social y sanitario por entenderlos y así poder desarrollar sistemas de protección dirigidos a controlar las posibles consecuencias de la exposición al mismo.

De esta forma, con esta revisión sistemática se pretende indagar en la existencia de la toxicidad del grafeno en humanos y otros mamíferos.

OBJETIVOS

Principal

- Revisar la literatura científica concerniente a la exposición al grafeno, en los últimos 10 años y posibles efectos tóxicos para la salud.

Secundarios

- Identificar límites de toxicidad entre dosis-respuesta si los hay.
- Identificar cuales son los aparatos de medición y monitorización de la exposición.

- Identificar en que órgano y aparatos existe mayor exposición y daño.
- Revisar si hay diferencias en cuanto a toxicidad, entre las formas de grafeno estudiadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica exhaustiva de artículos científicos publicados entre 2007 y 2017 (última fecha consultada: 05/12/17). Se utilizaron las ecuaciones de búsqueda que aparecen en la [tabla I](#) y se reprodujeron en distintas bases de datos: MEDLINE, SCIEDIRECT, COCHRANE, LILACS, IBECS, SCIELO y SCOPUS. Las bases de datos LILACS, IBECS y SCIELO no devolvieron ningún resultado con la búsqueda del término “grafeno”.

Tabla I. Bases de datos y ecuaciones de búsqueda.

BASE DE DATOS	ECUACIÓN DE BÚSQUEDA
MEDLINE	“graphene” AND “toxicity” AND “exposure”
	“graphene” AND “occupational health” AND “toxicity” AND “humans”[MeSH Terms]
	“graphene” AND “occupational health”AND “humans” [MeSH Terms]
	“graphene” AND “occupational exposure”
	“graphene” AND “workplaces”
	“graphene” AND “exposure” AND “humans”[MeSH Terms]
SCIEDIRECT	“graphene” AND “toxicity” AND “humans”[MeSH Terms]
	“graphene” AND “toxicity” AND (“human” OR “mammal” OR “rat”)
	“graphene” AND “exposure” AND (“human” OR “mammal” OR “rat”)
	“graphene” AND “occupational exposure”
COCHRANE	“graphene” AND “toxicity” AND (“human” OR “mammal” OR “rat”)
	“graphene” AND “exposure” AND (“human” OR “mammal” OR “rat”)
	“graphene” AND “occupational health” AND (“human” OR “rat” OR “mammal”)
SCOPUS	“graphene” AND “toxicity”
	“graphene” AND “exposure”
	“graphene” AND “toxicity” AND “exposure”
	“graphene” AND “toxicity” AND “humans” AND “exposure”
	“graphene” AND “toxicity” AND “occupational health” AND “humans”
SCOPUS	“graphene” AND “toxicity” AND “occupational exposure”
	“graphene” AND “workplaces”
	“graphene” AND “occupational exposure” AND “humans”

Los artículos fueron, en primer lugar, seleccionados a partir de sus títulos y resúmenes, de acuerdo con los criterios de inclusión y exclusión establecidos previamente ([tablas II y III](#)). Posteriormente, y siguiendo con los criterios de inclusión y exclusión, cada investigador leyó de forma individual cada artículo, revisando conjuntamente las controversias que surgieron.

Tabla II. Criterios de inclusión.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN
Artículos que relacionen la exposición al grafeno con efectos tóxicos para la salud.
Población: humanos, mamíferos, poblaciones celulares humanas sanas.
Artículos publicados en los últimos 10 años (Fecha >2006).
Idioma: español, inglés, portugués, alemán, y francés.

Tabla III. Criterios de exclusión.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN
Duplicados en las diversas bases de datos.
No originales
No disposición del artículo a texto completo.
Artículos que hagan referencia al uso del grafeno como tratamiento de células cancerígenas u otros usos en la práctica clínica.

Tras este primer cribado y a través de la biblioteca Nacional de Ciencias de la Salud del ISCIII, se recuperaron a texto completo aquellos artículos seleccionados para su lectura sistemática. Se diseñó una tabla de captura de la información para la lectura sistemática de los artículos, en la cual se incluyeron los siguientes datos: autor y año, diseño, población de estudio y tamaño muestral, cifras de exposición a grafeno, medio de exposición, técnicas de medición, resultados, posibles sesgos y evidencia científica. La evidencia científica de cada artículo se determinó utilizando los criterios SIGN.

RESULTADOS

Luego de realizar la revisión bibliográfica, en la [Tabla IV](#) se adjuntan las bases de datos consultadas y los artículos seleccionados de cada una, de igual manera, en la [Figura 1](#) mostramos el cribado realizado de los diversos artículos obtenidos.

Figura 1. Flujograma de cribado de artículos.

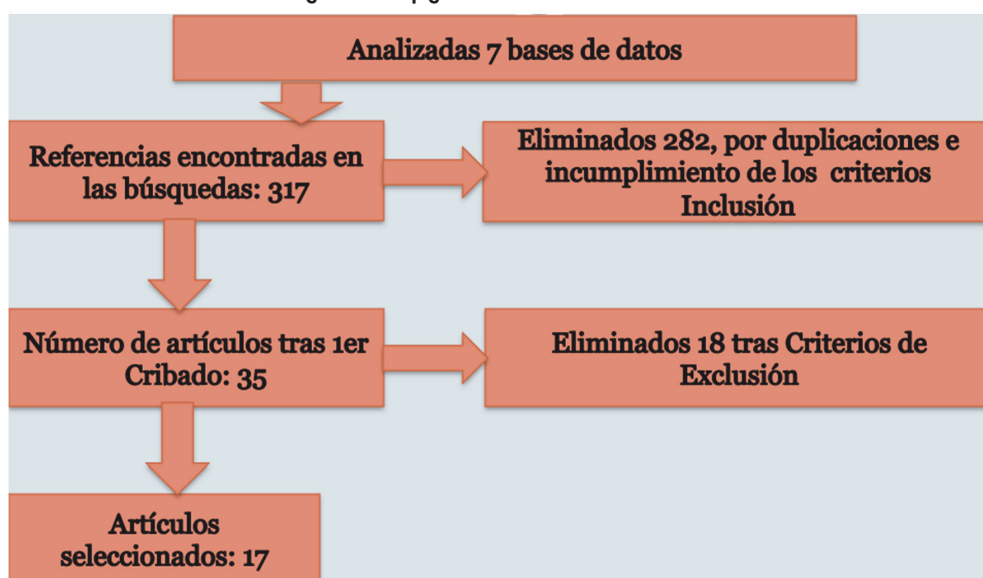


Tabla IV. Bases de datos, artículos obtenidos y seleccionados.

MEDLINE	139	8
SCIENCE DIRECT	92	4
COCHRANE	6	0
LILACS	0	0
IBECS	0	0
SCIELO	0	0
SCOPUS	80	6
TOTAL	317	17

Se obtuvieron 317 referencias tras una primera búsqueda en las distintas bases de datos. Después de haber leído los resúmenes y títulos, se eliminaron 282 artículos por estar duplicados o no cumplir los criterios de inclusión. Se realizó la petición de los artículos completos a la Biblioteca del Instituto de Salud Carlos III y al préstamo interbibliotecario, y se leyeron los 35 artículos restantes, de los cuales 18 artículos fueron eliminados por cumplir criterios de exclusión. Finalmente, como se puede ver en la [Tabla V](#), la revisión bibliográfica contará con el análisis de 17 artículos, que según el tipo de diseño de estudio serán: 3 estudios experimentales, 12 cuasi experimentales y 2 observacionales.

N. V. Srikanth Vallabani y col (2011)¹² caracterizaron el óxido de grafeno junto con los aspectos toxicológicos relacionados con la citotoxicidad y la apoptosis en células normales de pulmón humano (BEAS-2B). Se observó una concentración significativa y una disminución de la viabilidad celular dependiente de concentración (10-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) después de 24 y 48 h de exposición y se observó una proliferación significativa de células apoptóticas tempranas y tardías en comparación con células control. Este estudio demuestra que GO induce citotoxicidad y apoptosis en células de pulmón humano.

Ken-Hsuan Liao y col (2011)¹³ exponen a células de eritrocitos humanos y fibroblastos de piel humana a dos tipos de grafeno: óxido de grafeno y grafeno en láminas a diferentes concentraciones (entre 3,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hasta 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) demostrando que la actividad hemolítica y lítica existente es dosis-dependiente y que se ve influida de manera relevante por la forma del grafeno (óxido o lámina), siendo más tóxico las láminas de grafeno en el fibroblasto humano y a concentraciones > 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Omid Akhavan y col (2012)¹⁴ obtienen como resultado de su estudio la presencia de efectos citotóxicos en células mesenquimales humanas después de 1 h de exposición a ambas formas de grafeno reducido (nanofibras y láminas), necesitando menor concentración de nanofibras para lograr los mismos efectos. El estrés oxidativo se identificó como mecanismo implicado en dicha citotoxicidad, y además, se pudo observar que las nanofibras eran capaces de fragmentar el ADN y provocar aberraciones cromosómicas, incluso a una baja concentración después de un corto tiempo de exposición.

Omid Akhavan y col (2012)¹⁵ investigan la cito y genotoxicidad dependiente de tamaño de los rGONP (nanoplacas de óxido de grafeno reducido) en las hMSC (células humanas mesenquimales). La prueba de viabilidad celular mostró destrucciones celulares significativas con 1,0 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de rGONP con dimensiones laterales promedio (ALD) de $11 \pm 4 \text{ nm}$, mientras que las hojas rGO con ALD de $3,8 \pm 0,4 \mu\text{m}$ podrían mostrar un efecto citotóxico significativo solo a una concentración alta de 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$ después de 1 h de tiempo de exposición. Los rGONP mostraron efectos genotóxicos en las hMSC a través de fragmentaciones de ADN y aberraciones cromosómicas, incluso a una concentración baja de 0.1 $\mu\text{g} / \text{mL}$.

Changhui Fu y col (2014)¹⁶ experimentan con ratonas y sus crías, administrando vía oral, concentraciones de óxido de grafeno (0.5 mg/mL y 0.05 mg/mL) y comparándolas con grupo control; como consecuencia hay una disminución del peso ($p < 0,01$) y talla ($p < 0,05$) en las crías expuestas a 0.5 mg/mL de óxido de grafeno, sin alteraciones relevantes del AST, ALT, BUN y Cr en la misma población, sin embargo, con cambios morfológicos significativos en estudio histológico en órganos como pulmón, corazón, riñón y bazo, demostrando atrofia de éstos a los 38 días.

Eun-Jung Park y col (2014)¹⁷ exploran la respuesta toxica del grafeno disponible comercialmente (GNPs). In vivo se han expuesto por instilación intratraqueal los ratones a nanoplacas de 2.5 o 5 mg/kg y que resulta en acumulación de los GNPs hasta 28 post instilación e inducción de respuesta inflamatoria subcrónica. In vitro se han usado BEAS-2B (línea de células epiteliales bronquiales humanas) que tras instilación se observa autofagia y apoptosis por daño en las mitocondrias.

Abhilash Sasidharan y col (2015)¹⁸ evidencian en su estudio la afectación de la viabilidad de células de endotelio de vena umbilical humana con la exposición a grafeno

de pocas capas a partir de concentraciones de 2.5 µg/ml ($p < 0,05$). Asimismo, se confirmó la presencia de estrés oxidativo citosólico y se identificó la capacidad del grafeno para modular negativamente genes que intervienen en la reparación del DNA, y para producir daño del mismo.

Sung Gu Han y col (2015)¹⁹ examinan los efectos pulmonares del GO utilizando ratas macho Sprague-Dawley tras inhalación única de 6 horas, y recuperación de 1, 7 o 14 días. Se comparan tres grupos con diferentes concentraciones con los siguientes resultados: no indujo cambios significativos en los pesos corporales y de órganos, ni en el consumo de alimentos durante los 14 días de recuperación, tampoco se modificaron los niveles de microalbúmina y LDH en BAL (lavado bronco-alveolar). El recuento total de células no se alteró. La histopatología de los pulmones de rata solo mostró macrófagos alveolares con GO (óxido de grafeno) en el grupo de alta concentración en todos los grupos.

Liang Mao y col (2015)²⁰ realizan instilación oral e intratraqueal de FLG (few layer graphene) en ratones. El grafeno fue retenido principalmente en el pulmón con 47% restante después de 4 semanas. Resultados dosis dependiente con lesión aguda pulmonar y edema pulmonar, pero estos efectos fueron aliviando con el tiempo a pesar de la presencia continua de grafeno en los pulmones. El grafeno intratraquealmente instilado era redistribuido al hígado y al bazo al pasar por la barrera aire-sangre, un hallazgo respaldado por los resultados de experimentos de sonda oral que no mostraron una absorción detectable a través del tracto gastrointestinal.

Jae Hoon Shin y col (2015)²¹ sometieron a tres grupos de 20 ratas a: alta dosis, baja dosis y grupo control. Indican que la dosis alta de grafeno ($3.86 \pm 0.94 \text{ mg/m}^3$) está algo asociada con respuestas inmunológicas en la sangre. No obstante, la inhalación a las dosis expuestas, no parece toxicológicamente relevante. El examen histológico mostró un ligero engrosamiento de la pared alveolar y la ingestión de grafeno por los macrófagos alveolares en el grupo expuesto a altas dosis después de 7 días de recuperación con mínimos cambios patológicos. No obstante, las imágenes de campo oscuro revelaron la deposición de grafeno en los pulmones, principalmente en los macrófagos alveolares, en las muestras de ambos grupos durante el período de recuperación.

Nivedita Chatterjee y col (2016)²² estudian diversas formas de la familia del grafeno y el impacto del daño celular que tienen sobre el epitelio del bronquio humano, exponiendo éstas, a diversas concentraciones oscilando entre 10mg/L a 50mg/L y concluyendo que el grafeno carboxilado genera más citotoxicidad comparado con el grafeno de una o varias láminas ($p < 0,031$) y toda esta toxicidad es dosis-dependiente, haciéndose evidente en concentraciones $> 50 \text{ mg/L}$.

Wei Wu y col (2016)²³ exponen cultivos celulares de epitelio corneal y conjuntival humano a diferentes concentraciones de óxido de grafeno, observando toxicidad ($p < 0,01$) y apoptosis celular a las 24h postexposición ($p < 0,05$) cuando son concentraciones $> 50 \text{ µg/ml}$. De la misma forma colocan gotas diluidas en conjuntiva ocular de ratones, concluyendo que no hay reacción aguda inflamatoria, sin embargo, en exposiciones repetidas por 5 días, a concentraciones $> 50 \text{ µg/ml}$ de grafeno existe opacidad corneal e hiperemia conjuntival, reversible con la aplicación de Glutatión.

Ji Hyun Lee y col (2016)²⁴ midieron la exposición potencial, a la que están sometidos los trabajadores de 2 industrias manufactureras del grafeno, en la que usan dos métodos de producción diferentes y para lo cual concluyeron que debido a buen uso de las instalaciones y limpieza de las mismas, así como buenas prácticas de producción, los límites de detección de grafeno son menores a los que pueden ser filtrados y medidos por los diversos métodos, situando la cifra en $< 0,3 \text{ µg/filtros}$.

Anita K. Patlolla y col (2016)²⁵ hallaron una asociación significativa entre la exposición a óxido de grafeno y el aumento de creatinina sérica, BUN y estrés oxidativo en los riñones en ratas ($p < 0,05$ para dosis de 20 y 40 mg/kg). Además, observaron, en la evaluación histopatológica, alteraciones morfológicas significativas en los riñones de las ratas expuestas.

Tabla V. Resultados de la búsqueda bibliográfica.

Autor y año	Tipo de diseño	Población de estudio	Cifra de exposición	Medición de exposición	Medio de exposición	Resultados
N. V. Srikanth y col. (2011)	Cuasi experimental	Cel. normales de pulmón humano (BEAS-2B).	10-100 µm/ml (OG)	Citometría de flujo.	Exposición en medios de cultivo celular	Inducción de citotoxicidad y apoptosis [50 µm/ml] (p<0.05).
Ken-Hsuan Liao y col (2011)	Cuasi experimental	Cel. Eritrocitos humanos Cel. fibroblastos de piel humana (6 x 10 ⁴ cells).	3,125 - 200 µg/mL (OG y GS)	MO. Espectroscopía Raman.	Exposición in vitro a óxido de grafeno y láminas de grafeno	Actividad hemolítica dosis y forma dependiente (>12,5 µg/ml).
Omid Akhavan y col (2012)	Cuasi experimental	Cel. madre mesenquimales humanas (1*10 ⁵ /ml).	0,01 - 100 µg/mL (rGONR y rGOS)	Ensayo Comet. Giensa y MO.	Exposición in vitro a nanofibras y láminas de óxido de grafeno reducidas	Citotoxicidad: rGOS[100 µg/ml], y rGONR [10 µg/ml] (p<0.05). Genotoxicidad de rGONR [1 µg/ml] (p< 0.05).
Omid Akhavan y col (2012)	Cuasi experimental	Cel. hMSCs. (1*10 ⁵ /mL).	0,01 - 100 µg/mL (rGO y rGONF)	Microscopio de fluorescencia.	Cultivos celulares expuestos a nanoplaquetas de grafeno	Citotoxicidad de rGO [100 µg/mL] y GONP [1.0 µg/mL] (p<0.05). Genotoxicidad de rGONP a 0.1 µg/mL. (p<0.05).
Changhui Fu y col (2014)	Cuasi experimental	Cría de ratones (12). Madres ratones (18).	0.5 y 0.05 mg/mL (OG)	Espectrofotómetro. Difractómetro de rayos X. Microscopio electrónico.	Vía oral. Suspensión de OG.	Disminución de peso. [0.5 mg/mL] (p<0.01). Disminución de talla. [0.5 mg/mL] (p<0.05). Cambios morfológicos en órganos.
EunJung Park y col (2014)	Cuasi experimental	3 grupos de 10 ratones (1*10 ⁴ y 5*10 ³ cel BEAS-2B).	2.5 y 5 mg/kg (GNPs)	M.E. Espectrofotometría. Espectroscopía de Raman.	Instilación intratraqueal de GNPs.	GNPs acumulados pulmones hasta 28 días post instilación única. Respuesta inflamatoria subcrónica [>5 mg/kg]. Autofagia y apoptosis por daño en mitocondrias (cel BEAS-2B).
Abhilash Sasidharan y col (2015)	Cuasi experimental	Cel. de endotelio de vena umbilical humana (2x10 ⁴).	0-10 µg/ml (FLG)	Ensayo Comet. Análisis de microarray ADNc	Exposición in vitro a grafeno de pocas capas.	< viabilidad celular [> 2.5 µg/ml] (p<0.05). Apoptosis/necrosis celular. Alteración en la reparación y potencial daño del ADN.
Sung Gu Han y col. (2015)	Cuasi experimental	3 grupos de 12 ratas.	0,3 y 3 mg/m ³ (OG)	Microscopía de campos de emisión transmisión de electrones. Espectrómetro. MO.	Inhalación.	BAL con marcadores de daño inflamatorio: IL18, y TGF-B1 a los 7 días en alta concentración (vs control p<0.05). [>3 mg/m ³]. Histopatología con macrófagos alveolares.
Liang.Mao y col (2015)	Experimental	Ratones macho.	14G-FLG de 0,001 a 100 µg	Espectroscopía Raman. MO. H-E.	Instilación intratraqueal. Sonda nasogástrica.	Edema pulmonar y reacción inflamatoria transitoria (p< 0,05) [>50 µg]. Retención en pulmones en el 47% luego de 4 semanas.
Jae Hoon Shin y col (2015)	Cuasi experimental	60 ratas macho.	Baja (0,68 ± 0,14 mg/m ³) y alta (3,86 ± 0,94 mg/m ³) (OG)	Microscopía electrónica. Espectrofotometría. Microscopio de campo oscuro.	Inhalación.	Altas concentraciones: alteración inmunológica no toxicamente relevante. No degradación del nanomaterial tras semanas postexposición.
Nivedita Chatterjee y col (2016)	Cuasi experimental	Cel. epiteliales de bronquio humano (2.5 x 10 ⁴ cells/mL).	10 µg/L y 50 µg/L (OG, FLGO, SLGO, GNP-COOH)	Microscopía de fuerza atómica. Espectroscopía Raman	Exposición in vitro a 6 placas de cultivo durante 24 h.	Citotoxicidad y alteraciones del ADN según la propiedad físico química del tipo de grafeno (p<0.051). GNP-COOH > FLGO > SLGO > GO

Tabla V. Resultados de la búsqueda bibliográfica. (Continuación.)

Autor y año	Tipo de diseño	Población de estudio	Cifra de exposición	Medición de exposición	Medio de exposición	Resultados
Wei Wu y col (2016)	Experimental	Epitelio de la córnea y conjuntiva humana (in vitro). Conjuntiva ocular de ratones (in vivo).	12,5 a 100 µg/mL (OG)	Microscopía de fuerza atómica. Espectroscopía Raman.	Baños diluidos sobre 96 placas. Gotas diluidas sobre epitelio conjuntival.	Toxicidad en epitelio de córnea y conjuntiva [50 µg/mL] ($p < 0,01$). Apoptosis a las 24 h. Irritación ocular por exposición reiterada [50 µg/mL] ($p < 0,05$).
Ji Hyun Lee y col (2016)	Observacional	Muestras de aire de 2 empresas de fabricación de grafeno.		Microscopio de transmisión electrónica. Espectrómetro.	Muestras de aires en 2 fábricas productoras de grafeno.	Detección de límites $< 0,3$ µg/filtro
Anita K. Patilola y col (2016)	Experimental	Ratas Sprague-Dawley macho adultas: 15 ratas (+5 control).	10, 20, 40 mg / kg. 5 dosis por grupo, (OG)	Análisis bioquímico. Tinción HE y MO.	Vía oral.	Aumento de estrés oxidativo > 20 mg/kg ($p < 0,05$). Aumento de creatinina y BUN > 20 mg/kg ($p < 0,05$). Alteraciones morfológicas significativas en los riñones de ratas expuestas.
Waseem Asghar y col (2016)	Cuasi experimental	Muestras de esperma humano.	1, 5 y 25 µg/mL durante 0.5 y 3 h. (rGO)	Microscopía de luz de campo brillante. Microscopía de fluorescencia. Citometría de flujo.	Exposición in vitro.	No cambios significativos en la viabilidad ($p > 0,05$). Disminución de la velocidad a concentraciones más altas y tiempo de incubación más largo.
Andrea Spinazzè y col (2016)	Observacional	Trabajadores expuestos directa e indirectamente.	DSC: 103-106 partículas/cm ³ ; CPC: 0,01-1mm; OPC: 0,3-30 mm	Espectroscopía Raman. Técnicas de radiomarcado.	Partículas aerotransportadas.	Existen diferencias entre la exposición real de trabajadores expuestos directamente a los expuestos indirectamente ($p < 0,05$).
Santhakumar Syama y col (2017)	Cuasi experimental	20 ratones albinos	10 mg / Kg (PrGO)	Microscopía de fluorescencia.	Inyección intravenosa e intraperitoneal.	PrGO almacenado cerebro, hígado, bazo y riñón causando hepatotoxicidad ($p < 0,05$).

OG: óxido de grafeno. NC: No consta. FLG: Few layer graphene. rGONPS: reduced graphene oxide nanoplatelets. ROS: reactive oxygen species. FLGO: few layer graphene oxide. hMSCs: human mesenchymal stem cells. SOD: superóxido dismutasa. rGO: reduced oxide graphene. BAL: lavado broncoalveolar. SLGO: single layer graphene oxide. FDA: GPx: Glutatión peroxidasa. ALDs: average lateral dimensions. rGONR: reduced Graphene Oxide Nanoribbons. GS: graphene sheets. DCFHDA. GNPS: graphene nanoplatelets. RGOS: reduced Graphene Oxide Sheets.

Waseem Asghar y col (2016)²⁶ no encontraron una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de óxido de grafeno reducido en concentraciones de 1 a 25 µg/mL y la viabilidad de los espermatozoides humanos ($p > 0.05$). La velocidad de los espermatozoides disminuyó después de la exposición a concentraciones más altas (5, 25 µg/mL) y un tiempo de incubación más largo (3 horas); sin embargo, no demostró iniciar la producción de especies reactivas en los mismos.

Andrea Spinazzè y col (2016)²⁷ evaluaron la exposición ocupacional al grafeno. Obtuvieron datos de la medición de lectura directa en filtros, que se usaron luego para estimar la exposición media ponderada en el tiempo de 8 h para trabajadores involucrados en diferentes tareas laborales. El estudio sugiere que los trabajadores que están directamente involucrados en alguna tarea de trabajo específica (muestreo de materiales para control de calidad) tienen un mayor potencial de exposición ocupacional que los operadores que están a cargo del trabajo de producción de rutina.

Santhakumar Syama y col (2017)²⁸ investigaron la distribución de órganos, el aclaramiento y la toxicidad del nanografeno reducido pegilado (PrGO) en ratones Swiss Albino después de la administración intraperitoneal e intravenosa. Tras ser absorbido por la circulación sistémica después de la inyección, son fagocitados por macrófagos presentes en retículoendotelial sistema (RES) (hígado, bazo, médula ósea). El PrGO se distribuyó en los principales órganos tales como cerebro, hígado, riñón, bazo y médula ósea. Una pequeña cantidad de PrGO inyectado se excreta por la orina. La administración repetida de PrGO indujo lesión aguda en hígado, congestión en el riñón y aumento de la proliferación de esplenocitos en los días posteriores a la exposición. Por lo tanto, el resultado del estudio recomendó que PrGO se someta a una evaluación de seguridad intensiva antes de su aplicación clínica o que se valide para que sea seguro para uso médico.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los resultados de los estudios analizados en esta revisión sistemática revelan en cierta medida los potenciales efectos citotóxicos del grafeno, su almacenamiento, las distintas vías de exposición, la exposición a las distintas formas de grafeno utilizadas en la industria, así como las diferencias entre estas formas en su potencial efecto nocivo.

Al contrario de lo presupuesto al iniciar esta revisión, existen numerosos estudios sobre la exposición a este nuevo material, revelando la gran preocupación existente justificada por la cantidad de recursos destinados a la investigación sobre sus aplicaciones.

De los 17 estudios revisados, 11 de ellos revelaron potenciales efectos sobre la salud. En ninguno de los estudios revisados se hace referencia a sesgos o medidas de enmascaramiento, salvo tres ensayos que especifican estar aleatorizados. El nivel de evidencia es 2- según escala SIGN.

Aunque la exposición humana a los nanomateriales puede ocurrir a través de múltiples rutas, como inhalación, ingestión, inyección, implantación y absorción cutánea, la principal vía de exposición humana al grafeno, es a través de la inhalación.

Se ha detectado una gran heterogeneidad en los artículos revisados, por lo que se ha intentado relacionarlos entre ellos según el tipo de experimentación, y siendo esta una de las mayores dificultades a la hora de realizar la discusión.

Dos estudios^{24,27} evalúan la potencial exposición ocupacional de trabajadores de la industria del grafeno. Sugieren que podría existir exposición a partículas aerotransportadas, con distintos niveles de exposición según la tarea desempeñada por el trabajador. Además se hace alusión a la reducción de esta exposición con buenas prácticas en la producción, buen uso de las instalaciones, su limpieza adecuada, así como controles de niveles límite de exposición²⁴.

Seis de los artículos revisados analizan exposición^{12,17,19,20,21,22} a partículas y/o nanopartículas aerotransportados de distintas formas de grafeno. Se someten animales a exposición in vivo, mientras que las células pulmonares humanas BEAS-2B^{12,17} y distintas líneas celulares animales se someten a exposición in vitro. Se evidencian potenciales efectos citotóxicos e inducción de apoptosis^{12,13}, daño mitocondrial o autofagia¹⁷. La exposición a diferentes concentraciones parece revelar respuestas dosis-dependientes^{19,20,22}. En relación a esto sería recomendable hacer mediciones de los niveles de exposición mediante filtros con sistemas estandarizados aún no establecidos, análisis de los equipos de protección individual, y en paralelo establecer niveles límite para realizar vigilancia de la salud.

En la experimentación in vivo, se insinúa el potencial acúmulo de partículas de grafeno en células pulmonares tras tiempo postexposición, produciendo reacciones inflamatorias agudas o subcrónicas¹⁷. Enuncian un probable engrosamiento de la pared alveolar, ingestión de grafeno por macrófagos alveolares y acumulación tras diferentes tiempos post-exposición²¹, con supresión de la reacción aguda posteriormente y mínimos cambios patológicos²¹. Sugieren también el potencial traspaso aire-sangre al hallar partículas en hígado y bazo. Manifiestan que no se indujeron cambios en pesos corporales y de órganos¹⁹. Existe un ensayo con un nuevo enfoque experimental, excluido de esta revisión, realizado por Wei-Chung Suy col en 2016²⁹, que sugiere que estas partículas aerotransportadas, parecen depositarse en vías aéreas respiratorias humanas en maquetas 3D a tamaño real. Esta línea de investigación parece prometedora con probable importancia en futuras revisiones.

Omid Akhahan y col en 2012^{14,15} analizan en dos estudios distintos poblaciones de células mesenquimales humanas expuestas a diferentes formas, tamaños y concentraciones de grafeno, sugiriendo una mayor toxicidad a partículas de menor tamaño a mayor concentración, con potencial efecto genotóxico por fragmentación de ADN, aberraciones cromosómicas y estrés oxidativo.

Otro artículo sugiere afectación a la exposición de eritrocitos y fibroblastos de la piel humana¹³ con mayor reactividad a láminas de grafeno (en contraposición al GO) en concentraciones elevadas (>50ug/ml). Así como toxicidad y apoptosis en epitelio corneal y conjuntival a >50ug/ml de concentración de GO, aunque reversible con aplicación de glutatión. Por otro lado, Waseem Asghar y col (2016)²⁶ no evidencian asociación significativa en la exposición a rGO con la viabilidad de espermatozoides. Esta diferencia en toxicidad, mayor en diferentes formas, tamaños y concentraciones del grafeno, haría necesario el establecimiento de niveles de vigilancia de la salud más exigentes conforme a estas variables.

Otros grupos de investigación^{16,25} contraponen resultados, ambos con significación estadística, al someter a animales a GO vía oral. Uno de ellos resultó sin alteración de Cr sérica y BUN con disminución de peso y talla¹⁶. El otro resultó con aumento de Cr sérica, BUN y alteraciones histomorfológicas significativas en los riñones. En este sentido se investiga la distribución y aclaramiento de PrGO tras exposición intravenosa e intraperitoneal²⁸ evidenciando fagocitosis por RES de hígado, médula ósea y bazo, con distribución del PrGO a principales órganos y excreción renal mínima, recomendando, por su gran toxicidad, someter a esta forma de grafeno a una evaluación intensiva previo uso médico.

Como conclusiones podemos referir que los estudios sugieren un potencial efecto tóxico a la exposición a diferentes formas de grafeno de manera dosis-dependiente, principal pero no exclusivamente, en la exposición respiratoria. Esto haría necesario llegar a un consenso en niveles límite de exposición y establecer los requisitos a exigir en las medidas de protección individual.

A pesar de existir diversos ensayos procedentes de distintos países, parece necesario continuar realizando estudios de más homogeneidad y de mayor calidad estadística, con consenso internacional y así, a largo plazo, poder llegar a conclusiones sólidas sobre los potenciales efectos tóxicos agudos y crónicos en los trabajadores expuestos. Existe un

proyecto a nivel europeo, Graphene Flagship³⁰ con financiación europea multimillonaria, dedicado a la investigación de las aplicaciones. Sin embargo, no hemos encontrado información acerca la investigación sobre toxicidad, o proyecciones de investigación en lo que respecta la vigilancia de la salud, resultando necesario un plan paralelo que se ocupe de estas cuestiones.

El potencial incremento del uso de este material en el futuro y dada la gran inversión actual de recursos, resulta necesario realizar un seguimiento a los trabajadores de esta industria, para establecer medidas preventivas a la exposición a la espera de conclusiones solventes para diseñar un plan/protocolo de vigilancia de la salud. Dado el registro histórico de enfermedades profesionales en relación a nanopartículas, resulta primordial la tarea de los Servicios de Prevención para adelantarnos a los posibles efectos sobre la salud de los numerosos trabajadores de la industria del grafeno.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Search | Lux Research [Internet]. [citado 30 de noviembre de 2017]. Disponible en: <http://www.luxresearchinc.com/search/node/graphene>
2. Graphene: first 'wonder material' products hit the market | The University of Manchester | School of Physics and Astronomy [Internet]. [citado 24 de enero de 2018]. Disponible en: <http://www.physics.manchester.ac.uk/our-research/research-impact/graphene/>
3. Advanced Materials The graphene revolution Business Innovation Observatory Contract No 190/PP/ENT/CIP/12/C/N03C01 - Buscar con Google [Internet]. [citado 30 de noviembre de 2017]. Disponible en: https://www.google.es/search?client=safari&rls=en&q=Advanced+Materials+The+graphene+revolution+Business+Innovation+Observatory+Contract+No+190/PP/ENT/CIP/12/C/N03C01&ie=UTF-8-&oe=UTF-8&gfe_rd=cr&dcr=0&ei=_M8fWvKQO_OJ8QeP4KbQCw
4. TheGrapheneBox - FAQ [Internet]. [citado 24 de enero de 2018]. Disponible en: <https://www.thegraphenebox.com/es/faq/faq-25>
5. Real Decreto 374/2001, de 6 de abril sobre la protección de la salud y seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con los agentes químicos durante el trabajo. BOE nº 104. 01-05-2001. [Internet]. [citado 24 de enero de 2018]. Disponible en: http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Normativa/TextosLegales/RD/2001/374_01/PDFs/realdecreto3742001de6deabrilsobrelaprotecciondelasaludTxtAnt.pdf
6. Real Decreto 665/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes cancerígenos durante el trabajo. BOE nº 124, de 24 - 05 - 1997. [Internet]. [citado 24 de enero de 2018]. Disponible en: <http://www.boe.es/buscar/pdf/1997/BOE-A-1997-11145-consolidado.pdf>
7. Real Decreto 349/2003, de 21 de marzo, por el que se modifica el Real Decreto 665/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes cancerígenos durante el trabajo, y por el que se amplía su ámbito de aplicación a los agentes mutágenos. BOE nº 82 05-04-2003. [Internet]. [citado 24 de enero de 2018]. Disponible en: http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Normativa/TextosLegales/RD/2003/349_03/PDFs/realdecreto3492003de21demarzoporelquesemodificaelrea.pdf
8. Guía técnica INSHBT: atmósferas explosivas en el lugar de trabajo [Internet]. [citado 24 de enero de 2018]. Disponible en: <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Normativa/GuiasTecnicas/Ficheros/ATM%C3%93SFERAS%20EXPLOSIVAS.pdf>
9. Real Decreto 1215/1997, de 18 de julio por el que se establecen las disposiciones mínimas de seguridad y salud para la utilización por los trabajadores de los equipos de trabajo. BOE nº 188 07-08-1997 [Internet]. [citado 24 de enero de 2018]. Disponible en: http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Normativa/TextosLegales/RD/1997/1215_97/PDFs/realdecreto12151997de18dejulioporelqueseestablecenlas.pdf
10. INSHBT - Seguridad y salud en el trabajo con nanomateriales - Año 2015 [Internet]. [citado 24 de enero de 2018]. Disponible en: <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FICHAS%20DE%20PUBLICACIONES/EN%20CATALOGO/Higiene/2015%20Seguridad%20y%20salud%20en%20el%20trabajo%20con%20nanomateriales/SST%20con%20nanomateriales.pdf>
11. ISO/TS 80004-13:2017(en), Nanotechnologies — Vocabulary — Part 13: Graphene and related two-dimensional (2D) materials [Internet]. [citado 30 de noviembre de 2017]. Disponible en: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:ts:80004-13:ed-1:v1:en:fig:1>
12. Toxicity of Graphene in Normal Human Lung Cells (BEAS-2B): Ingenta Connect [Internet]. [citado 29 de noviembre de 2017]. Disponible en: <http://www.ingentaconnect.com/content/asp/jbn/2011/00000007/00000001/art00054;jsessionid=5up43imgljds.x-ic-live-01>

13. Liao K-H, Lin Y-S, Macosko CW, Haynes CL. Cytotoxicity of Graphene Oxide and Graphene in Human Erythrocytes and Skin Fibroblasts. *ACS Appl Mater Interfaces* [Internet]. 27 de julio de 2011 [citado 27 de noviembre de 2017];3(7):2607-15. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1021/am200428v>
14. Akhavan O, Ghaderi E, Emamy H, Akhavan F. Genotoxicity of graphene nanoribbons in human mesenchymal stem cells. *Carbon* [Internet]. 1 de abril de 2013 [citado 23 de noviembre de 2017];54(Supplement C):419-31. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008622312009499>
15. Akhavan O, Ghaderi E, Akhavan A. Size-dependent genotoxicity of graphene nanoplatelets in human stem cells. *Biomaterials* [Internet]. 1 de noviembre de 2012 [citado 27 de noviembre de 2017];33(32):8017-25. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961212008356>
16. Fu C, Liu T, Li L, Liu H, Liang Q, Meng X. Effects of graphene oxide on the development of offspring mice in lactation period. *Biomaterials* [Internet]. 1 de febrero de 2015 [citado 27 de noviembre de 2017];40(Supplement C):23-31. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961214011740>
17. Park E-J, Lee G-H, Han BS, Lee B-S, Lee S, Cho M-H, et al. Toxic response of graphene nanoplatelets in vivo and in vitro. *Arch Toxicol* [Internet]. 1 de septiembre de 2015 [citado 27 de noviembre de 2017];89(9):1557-68. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00204-014-1303-x>
18. Sasidharan A, Swaroop S, Chandran P, Nair S, Koyakutty M. Cellular and molecular mechanistic insight into the DNA-damaging potential of few-layer graphene in human primary endothelial cells. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med* [Internet]. 1 de julio de 2016 [citado 23 de noviembre de 2017];12(5):1347-55. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1549963416000848>
19. Han SG, Kim JK, Shin JH, Hwang JH, Lee JS, Kim T-G, et al. Pulmonary Responses of Sprague-Dawley Rats in Single Inhalation Exposure to Graphene Oxide Nanomaterials [Internet]. *BioMed Research International*. 2015 [citado 27 de noviembre de 2017]. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/376756/>
20. Mao L, Hu M, Pan B, Xie Y, Petersen EJ. Biodistribution and toxicity of radio-labeled few layer graphene in mice after intratracheal instillation. *Part Fibre Toxicol*. 2016;13(1).
21. Shin JH, Han SG, Kim JK, Kim BW, Hwang JH, Lee JS, et al. 5-Day repeated inhalation and 28-day post-exposure study of graphene. *Nanotoxicology*. 2015;9(8):1023-31.
22. Chatterjee N, Yang J, Choi J. Differential genotoxic and epigenotoxic effects of graphene family nanomaterials (GFNs) in human bronchial epithelial cells. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen* [Internet]. 1 de marzo de 2016 [citado 27 de noviembre de 2017];798-799(Supplement C):1-10. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383571816300262>
23. Wu W, Yan L, Wu Q, Li Y, Li Q, Chen S, et al. Evaluation of the toxicity of graphene oxide exposure to the eye. *Nanotoxicology*. noviembre de 2016;10(9):1329-40.
24. Lee JH, Han JH, Kim JH, Kim B, Bello D, Kim JK, et al. Exposure monitoring of graphene nanoplatelets manufacturing workplaces. *Inhal Toxicol*. 2016;28(6):281-91.
25. Toxicity Evaluation of Graphene Oxide in Kidneys of Sprague-Dawley Rats. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 27 de noviembre de 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27043588>
26. Asghar W, Shafiee H, Velasco V, Sah VR, Guo S, El A, et al. Toxicology Study of Single-walled Carbon Nanotubes and Reduced Graphene Oxide in Human Sperm. *Sci Rep*. 2016;6.
27. Spinazzè A, Cattaneo A, Campagnolo D, Bollati V, Bertazzi PA, Cavallo DM. Engineered nanomaterials exposure in the production of graphene. *Aerosol Sci Technol*. 2016;50(8):812-21.
28. Syama S, Paul W, Sabareeswaran A, Mohanan PV. Raman spectroscopy for the detection of organ distribution and clearance of PEGylated reduced graphene oxide and biological consequences. *Biomaterials*. 2017;131:121-30.
29. Su W-C, Ku BK, Kulkarni P, Cheng YS. Deposition of graphene nanomaterial aerosols in human upper airways. *J Occup Environ Hyg*. 2016;13(1):48-59.
30. P. Wick, M. Kucki, K. Dawson, Deliverable 2.5: Assessment of GFN translocation rate and of the biological responses induced at placental cell levels and evaluation of GFN impact on other barrier models. 2016. [citado 25 de enero de 2018]. Disponible en: <https://graphene-flagship.eu/Lists/Deliverables/FP7%20D2.5%20Assessment%20of%20GFN%20translocation%20rate%20and%20of%20the%20biological%20responses%20induced%20at%20placental%20cell%20levels%20and%20evaluati.pdf#search=Deliverables%20%2E5>