

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Grado en Biomedicina

**INTERACCIÓN DE PROTEÍNAS
ALIMENTARIAS CON
NANOPLÁSTICOS: FORMACIÓN
DE CORONAS**

Autor: Aldara Freije Blanco

Villaviciosa de Odón, 23 de mayo
de 2025

Título del Trabajo: Interacción de proteínas alimentarias con nanoplasticos: formación de coronas

Este trabajo ha sido realizado en el Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL) en el grupo de Alergias a Alimentos, en el que se estudia el por qué algunas proteínas se comportan como alérgenos y la influencia que ejerce la matriz alimentaria, factores ambientales y el procesado al que se someten los alimentos con el objetivo de tratar o prevenir la alergia alimentaria.



Tutor académico: Carla Jiménez Jiménez

Tutores externos: Sara Benedé Pérez y Sandra Bargiela Cuevas

ÍNDICE

Resumen del trabajo	4
PALABRAS CLAVE.....	4
1. Introducción	5
2. Objetivos	9
3. Materiales y métodos	10
3.1 Materiales, reactivos y equipos	10
3.2 Ensayo de formación de coronas proteicas	10
3.3 Cuantificación de proteínas no unidas a las coronas de NPs	11
3.4 Caracterización de proteínas unidas mediante electroforesis en gel	11
4. Resultados y discusión	12
4.1 Cuantificación de proteínas no adsorbidas mediante absorbancia a 280 nm	12
4.2 Evaluación mediante absorbancia a 280 nm de la adsorción proteica en condiciones fisiológicas simuladas	14
4.3 Comparación de la adsorción proteica entre diferentes extractos alimentarios	15
4.4 Evaluación de la adsorción proteica en condiciones fisiológicas simuladas mediante ensayo BCA.....	17
4.5 Análisis electroforético de proteínas adsorbidas a nanoplásticos.....	19
5. Conclusiones	22
6. Bibliografía.....	23
Anexos.....	29

Resumen del trabajo

La presencia de microplásticos (MPs), y en particular de nanoplásticos (NPs), en los alimentos es un tema emergente que aún presenta importantes lagunas de conocimiento, especialmente en lo relativo a sus posibles efectos sobre la salud humana. Se ha observado que, cuando los NPs entran en contacto con proteínas, pueden inducir la formación de una corona proteica, lo que podría modificar tanto las propiedades de los NPs como el comportamiento biológico de las proteínas implicadas. Este trabajo se centra en el estudio de la interacción entre NPs de poliestireno y proteínas alimentarias presentes en extractos de clara de huevo (EW) y de gamba (SE).

Se trabajó con distintas relaciones proteína:NPs (140:1, 14:1, 1,4:1 y 0,14:1) en tampones con pH 7 y 3, utilizando NPs de 27 nm. Con el objetivo de analizar cómo se forma la corona proteica y qué parámetros influyen en su formación, se optimizó un modelo experimental que permite cuantificar de forma indirecta las proteínas adsorbidas a los NPs, mediante el ensayo colorimétrico BCA (ácido bicinonínico). Además de la cuantificación, se midió el pH de las muestras y su influencia en la adsorción proteica. Finalmente, las proteínas unidas a los NPs se caracterizaron mediante electroforesis.

Aunque los resultados obtenidos no permiten establecer conclusiones definitivas, el estudio ofrece observaciones relevantes, como la posible presencia de ovotransferrina y ovoalbúmina en las coronas de EW, y plantea la necesidad de continuar investigando en este campo. La comprensión de estos mecanismos resulta esencial para evaluar los posibles riesgos de los NPs en la salud humana y su impacto en la calidad y seguridad alimentaria.

PALABRAS CLAVE: nanoplásticos (NPs), corona proteica, adsorción, clara de huevo (EW), extracto de gamba (SE), cuantificación proteica.

1. Introducción

En las últimas décadas, la producción mundial de plástico ha aumentado de manera exponencial, alcanzando en 2023 una cifra aproximada de 413,8 millones de toneladas métricas (Statista, 2025). Este incremento no ha ido acompañado de un sistema de gestión de residuos eficaz, lo que ha dado lugar a una acumulación masiva de desechos en el medioambiente. Asimismo, los plásticos pueden absorber contaminantes orgánicos persistentes (POP), lo que incrementa su larga vida media, su toxicidad y su capacidad de transporte y acumulación en diversos ecosistemas (Mamun et al., 2023; Janani et al., 2024).

La mayoría de los plásticos que se consumen actualmente son resistentes a la biodegradación, lo que impide su eliminación natural. En condiciones ambientales, sufren procesos de fragmentación inducidos por radiación ultravioleta, oxidación atmosférica o hidrólisis, generando partículas más pequeñas denominadas microplásticos (MPs), de tamaño inferior a 5 mm, y nanoplásticos (NPs), de tamaño inferior a 1 μm (Siddiqui et al., 2023; Vethaak & Legler, 2021). Sin embargo, este proceso no implica una degradación completa, ya que las partículas resultantes persisten en los ecosistemas, y se acumulan en el aire, en el suelo, en el agua y en los seres vivos (**Figura 1A**) (Siddiqui et al., 2023).

Se estima que entre 4 y 12 millones de toneladas métricas de plásticos son vertidas a los océanos cada año, lo que favorece su dispersión en el ambiente y su incorporación a la cadena trófica marina (Siddiqui et al., 2023). Existen grandes limitaciones metodológicas para su identificación, especialmente en el caso de los NPs, ya que algunas de las técnicas utilizadas como la espectroscopía Raman, la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y la microscopía electrónica, presentan dificultades técnicas que complican una cuantificación precisa, especialmente en matrices complejas como alimentos y tejidos humanos (Mariano et al., 2021; Ivleva, 2021). No obstante, a pesar de estas limitaciones, se han detectado MPs y NPs en organismos acuáticos, aguas potables, alimentos, aire y productos de uso diario, lo cual sugiere que estos materiales están presentes prácticamente en todos los entornos (Vethaak & Legler, 2021).

Esta situación ha generado una creciente preocupación por la exposición humana a estas partículas, ya que también se han detectado en muestras biológicas humanas como sangre o heces (Leslie et al., 2022; Feng et al., 2023). Todo ello ha generado un debate activo sobre los riesgos potenciales para la salud, especialmente en lo que respecta al sistema digestivo,

considerado la principal puerta de entrada al organismo (Prata et al., 2020; Campanale et al., 2020).

La ingesta representa el principal punto de exposición humana a MPs y NPs (Krishna de Guzman et al., 2023), seguida de la inhalación y el contacto dérmico (Prata et al., 2020). Estas partículas han sido identificadas en productos alimentarios ampliamente consumidos, como mariscos, pescado, sal, azúcar, frutas, verduras, agua embotellada y bebidas alcohólicas. Por ejemplo, se han estimado concentraciones de hasta 32,27 partículas por litro en bebidas alcohólicas, 1,48 partículas por gramo en marisco y, en un experimento con 259 botellas de agua, se detectaron partículas plásticas en el 93% de las muestras analizadas (Yee et al., 2021). También se ha demostrado que el envasado en plástico puede contribuir significativamente a la contaminación de los alimentos (Zuri et al., 2023). Por ejemplo, una sola bolsa de té de nailon puede liberar hasta 11.600 millones de MPs y 3.100 millones de NPs durante su infusión, una cantidad que evidencia que incluso objetos tan comunes como una bolsa de té pueden ser una fuente importante de exposición a MPs y NPs (Hernández et al., 2019).

En cuanto a la población infantil, estudios recientes han estimado que el uso de biberones de polipropileno puede exponer a los lactantes a entre 1 y 6 millones de partículas por litro de fórmula infantil (Li et al., 2020), lo que representa una exposición muy alta (Mohamed Nor et al., 2021). Este dato adquiere especial relevancia dado el desarrollo inmaduro del sistema inmunológico y digestivo en esta etapa.

Los efectos tóxicos de los MPs y NPs en la salud humana se clasifican en tres categorías: físicos, químicos y biológicos (Blackburn & Green, 2022). Físicamente, pueden producir abrasión del epitelio intestinal, aumento de la permeabilidad intestinal y daño estructural en órganos como el intestino y el hígado (Blackburn & Green, 2022; Qiao et al., 2019). Químicamente, estos materiales actúan como fuente de aditivos tóxicos añadidos durante su fabricación, como ftalatos, bisfenol A (BPA) y retardantes de llama (PBDE). Estos compuestos, incorporados durante la fabricación, al no estar covalentemente unidos a la matriz plástica, pueden liberarse fácilmente y han sido asociados a efectos endocrinos, reproductivos, neurológicos e inmunológicos (Blackburn & Green, 2022; Kannan & Vimalkumar, 2021; Zimmermann et al., 2021). Además, los MPs y NPs también pueden unirse a metales pesados como el arsénico o el mercurio, lo que aumenta su toxicidad y riesgo de efectos adversos severos (Liu et al., 2021; Yang et al., 2022).

Biológicamente, se ha descrito que los MPs y NPs pueden formar biopelículas, también denominadas “plastisferas”, albergando microorganismos patógenos, incluyendo bacterias del género *Vibrio* y cepas resistentes a antibióticos (Blackburn & Green, 2022; Jia et al., 2024). Asimismo, se ha observado su capacidad de modular la microbiota intestinal, favoreciendo el crecimiento de bacterias proinflamatorias y disminuyendo la diversidad de especies beneficiosas (Souza-Silva et al., 2022). Además, se ha detectado que algunas bacterias pueden adherirse a las partículas plásticas (Tamargo et al., 2022).

Debido a su reducido tamaño, gran área superficial y alta capacidad de adsorción, los NPs pueden interaccionar con biomoléculas como proteínas, lípidos o ácidos nucleicos en entornos biológicos. Cuando las proteínas se adhieren a su superficie, se forma una estructura conocida como “corona de proteínas” (Zhou, Yu, Luan, & Dai, 2022; Saptarshi, Duschl, & Lopata, 2013; Zanganeh et al., 2016). Una vez que los NPs entran en contacto con el entorno, las proteínas comienzan a recubrirlos. Se ha evidenciado que estas coronas pueden fusionarse entre sí, alterando la forma o la estructura de las propias proteínas. Esta fusión parece estar mediada por las proteínas adheridas, que pueden agregarse hasta bloquear conductos por los que circulan fluidos. El proceso ocurre con la aproximación de dos NPs recubiertos por una corona, favorecida por una atracción proteína-proteína no específica. En una primera etapa, se forma una estructura filamentosa que conecta ambos NPs. A continuación, se produce una reorientación de la corona, lo que provoca un aumento del grosor de la unión hasta producir coalescencia entre los dos NPs. Las partículas fusionadas adquieren una corona con múltiples capas de proteínas. Posteriormente se observa un notable incremento en la dimensión de las partículas como resultado de la coalescencia sucesiva. El tamaño final depende de factores como el tiempo, la cantidad de NPs y la concentración de proteína, pudiendo llegar a multiplicar su tamaño varias veces (Gopinath et al., 2019). La corona proteica confiere a las partículas plásticas una nueva identidad, lo que les permite evadir el sistema inmunológico, prolongar su tiempo de circulación en el organismo, o incluso interferir con procesos moleculares y celulares. Además, pueden inducir toxicidad celular, ya que interrumpen la actividad mitótica y provocan efectos citotóxicos (Gopinath et al., 2019). Asimismo, se ha documentado que, tras una digestión simulada, los MPs pueden adquirir coronas proteicas, alterando su interacción con las células intestinales y la digestibilidad, potenciando efectos proinflamatorios (Liu et al., 2020).

Las coronas proteicas se diferencian en dos tipos: “*soft corona*” o corona blanda, caracterizada por una unión más laxa de proteínas a la superficie de las partículas; y la “*hard corona*” o corona dura, formada por una capa más densa y estable de proteínas fuertemente adheridas (**Figura**

1B) (Kihara et al., 2020). En el caso de la *soft corona*, independientemente del tamaño, carga de los NPs o tipo de proteína, las estructuras secundarias de las proteínas se ven levemente modificadas, lo que sugiere una interacción menos invasiva. En cambio, la *hard corona* induce cambios conformacionales en las proteínas, alterando significativamente su estructura y produciendo modificaciones potencialmente dañinas para las células. Cabe destacar que las partículas más pequeñas provocaron cambios más agresivos que las de mayor tamaño, lo que sugiere un mayor potencial dañino (Kihara et al., 2020; Fleischer & Payne, 2014).

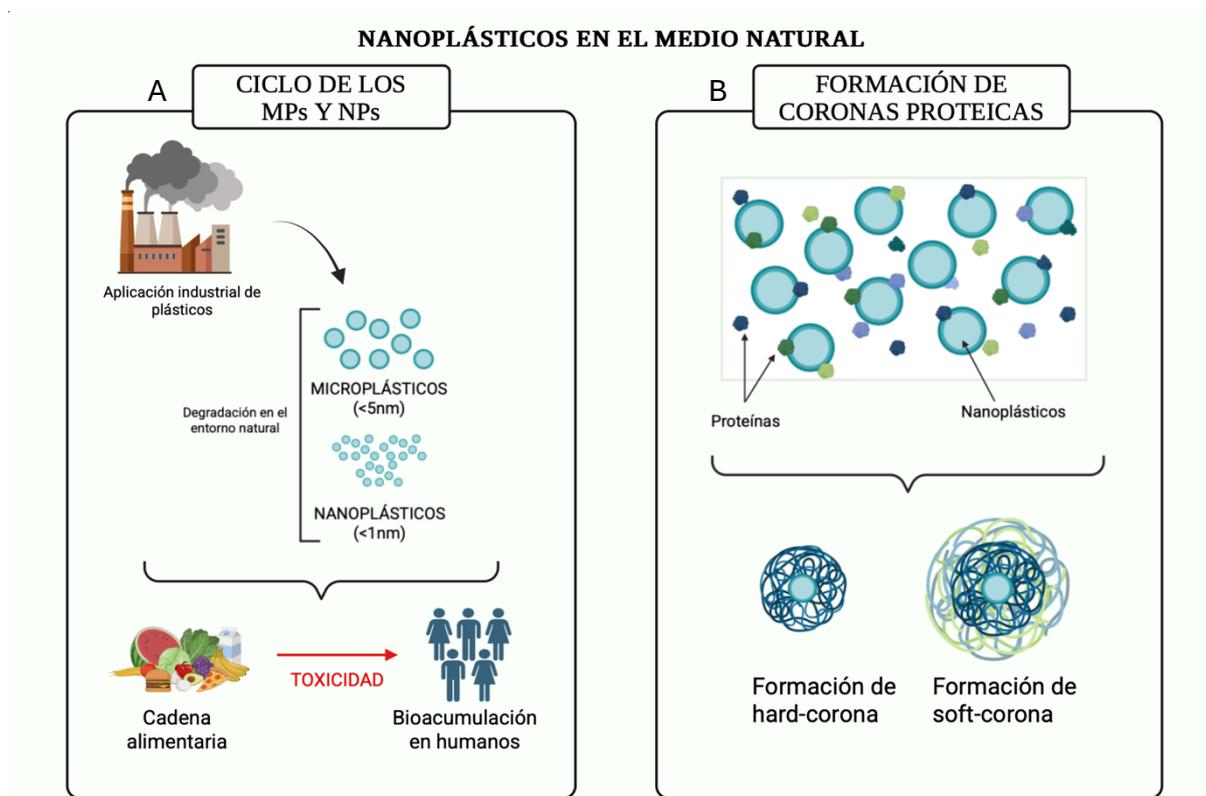


Figura 1. Ciclo de los microplásticos y nanoplásticos en el medio ambiente y formación de coronas proteicas. (A) Se muestra su origen industrial, degradación ambiental, entrada en la cadena alimentaria, bioacumulación en humanos y (B) su interacción con proteínas, que da lugar a la formación de coronas proteicas duras (*hard*) y blandas (*soft*). Elaboración propia con BioRender.com

Por otro lado, los MPs y NPs que se liberan al medio marino suelen ser ingeridos por organismos acuáticos. Estos animales, que pueden convertirse en alimento para los seres humanos, actúan como una de las vías de entrada de las partículas plásticas al cuerpo. Una vez consumidos, las partículas pueden ser internalizadas en nuestro organismo, donde podrían recubrirse con coronas proteicas formadas a partir de proteínas mayoritarias presentes en el

entorno biológico, como el tracto digestivo. Asimismo, las proteínas más abundantes en los alimentos suelen corresponder a los principales alérgenos alimentarios conocidos (Molina & Benedé, 2022; Cui, Su, & Tan, 2022). Este hecho podría modificar la digestibilidad de los alérgenos o podría implicar un aumento en la absorción intestinal de estos, lo que a su vez favorecería una sensibilización del sistema inmunológico. Esta hipótesis coincide con observaciones clínicas que indican una mayor permeabilidad intestinal en pacientes con alergias alimentarias (Molina & Benedé, 2022; Samadi, Klems, & Untersmayr, 2018). Asimismo, se ha descubierto que los NPs recubiertos de coronas proteicas, ya sea antes de ingresar al organismo o tras su exposición al plasma humano, tienen la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica (Abdolahpur Monikh et al., 2024; Kopatz et al., 2023). Esto sugiere que sus efectos podrían extenderse a otros sistemas del cuerpo, lo que recalca la necesidad de una evaluación profunda de sus posibles consecuencias fisiológicas.

Ante esta problemática emergente, este Trabajo de Fin de Grado se centra en analizar la formación de coronas proteicas en nanoplásticos de poliestireno al interactuar con proteínas alergénicas de clara de huevo y gamba, contribuyendo así al conocimiento científico sobre los comportamientos de estas partículas en entornos biológicos de interés alimentario.

2. Objetivos

Objetivo general:

Dada la frecuente presencia de NPs en alimentos y bebidas, la ingestión representa una de las principales vías de exposición humana a estos. Sin embargo, el conocimiento actual sobre sus interacciones con proteínas alimentarias específicas, así como sobre su impacto en la estructura y funcionalidad de dichas proteínas, sigue siendo limitado. Este Trabajo de Fin de Grado tiene como objetivo principal contribuir al entendimiento científico de esta problemática emergente, mediante el análisis de la formación de coronas proteicas sobre NPs de poliestireno en contacto con proteínas presentes en alimentos de consumo habitual. Para alcanzar este objetivo general, se plantean los siguientes objetivos específicos que permitirán abordar la problemática desde una perspectiva experimental y aplicada:

- Optimizar un modelo experimental para cuantificar y caracterizar la formación de coronas proteicas sobre nanoplásticos de poliestireno de 27 nm, utilizando proteínas alimentarias comunes, como las presentes en clara de huevo y en gamba.

- Evaluar la influencia del pH en la formación y composición de coronas proteicas
- Analizar la influencia del tipo de proteína en la formación de la corona, comparando proteínas procedentes de alimentos comúnmente contaminados como el huevo y la gamba.

3. Materiales y métodos

3.1 Materiales, reactivos y equipos

En todos los experimentos se utilizaron nanoplasticos de poliestireno de 27 nm suministrados por Bangs Laboratories (PS02001).

El fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4 , P5379) y fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4 , S9390), glicina (G7126; PM: 75,05 g/mol), clorhidrato de Trizma® (Tris-HCl pH 6.8, T3253-1kg), β -mercaptoetanol (M3148) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich. Dodecilsulfato sódico (SDS, 151-21-3) y azul de bromofenol (1081220005) se compraron en Merck. La glicerina (141339) fue obtenida en Panreac. El colorante BlueSafe (MB15201) fue suministrado por Nzytech.

El kit de ensayo BCA Pierce™ (Cat. no. 23225) fue obtenido en Thermo Fisher Scientific. Los geles Criterion™ XT Bis-Tris al 12% (#3450117), el tampón 20x XT MOPS (Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico) Running Buffer Kit (#1610793) y el marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Dual Xtra Prestained Protein Standards (#1610377) fueron proporcionados por Bio-Rad.

Los equipos utilizados fueron: Nanodrop obtenido a través de Thermo Fisher Scientific y el lector de placas BioTek Cytation 5 procedente de Agilent Technologies.

El liofilizado de clara de huevo (Egg White, EW), al 77% de proteína, y el extracto de gamba (Shrimp Extract, SE), al 76% de proteína, fueron preparados previamente y no formaron parte del trabajo experimental desarrollado en este Trabajo de Fin de Grado.

3.2 Ensayo de formación de coronas proteicas

Con el fin de estudiar el efecto de la relación proteica en la formación de coronas, se prepararon mezclas de EW y SE con nanoplasticos en agua Milli-Q, tampón fosfato 20 mM a pH 7 (468 mg de NaH_2PO_4 y 1,63 g de Na_2HPO_4 en 500 mL H_2O Milli-Q) y tampón de glicina 20 mM a

pH 3 (0,75 g de glicina en 500 mL H₂O Milli-Q), a diferentes relaciones proteína:NPs (140:1, 14:1, 1,4:1 y 0,14:1). Además, se incluyeron controles de proteína sin NPs y de NPs sin proteína en cada ensayo. Las muestras se incubaron a 25 °C a 250 rpm durante 30 minutos, 1, 2, 4, 6 y 24 horas. Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron a 33.000 g durante 15 minutos a 25 °C. A continuación, se recogió el sobrenadante para su posterior análisis mediante espectrofotometría a 280 nm y ensayo BCA. Con respecto a los pellets, se realizaron tres lavados con 500 µL de H₂O Milli-Q y se centrifugaron bajo las mismas condiciones que el resto de las muestras. Los pellets se resuspendieron en tampón de carga de electroforesis (1 mL 0,5M Tris-HCl, 1,6 mL SDS 10%, 0,8 mL de glicerol, 0,32 mL β-mercaptoetanol, 0,4 mL 0,05% azul de bromofenol y 3,8 mL H₂O Milli-Q) y se conservaron para su posterior análisis por electroforesis.

3.3 Cuantificación de proteínas no unidas a las coronas de NPs

Para la cuantificación de proteínas unidas a los NPs se empleó un enfoque indirecto, basado en la determinación de la fracción de proteínas no unidas a las coronas. Cuantificando las proteínas presentes en el sobrenadante, se estimó por diferencia la cantidad de proteínas adsorbidas a los NPs. Para ello, se midió la absorbancia a 280 nm utilizando un espectrofotómetro de microvolumen (Nanodrop). Además, se empleó el método del BCA, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para el ensayo, se prepararon diluciones seriadas de cada muestra previamente obtenida. A continuación, se transfirieron 25 µL de cada dilución a una placa de 96 pocillos, y se añadieron 200 µL de solución de reacción a cada pocillo. La placa se incubó a 37 °C durante 30 minutos para permitir el desarrollo de la reacción colorimétrica. Finalmente, se midió la absorbancia a 562 nm utilizando el lector de placas BioTek Cytation 5.

3.4 Caracterización de proteínas unidas mediante electroforesis en gel

Para la caracterización de las proteínas adsorbidas a los nanoplásticos, se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida.

Los pellets obtenidos en el ensayo de formación de coronas proteicas, previamente disueltos en tampón de carga para electroforesis, se calentaron a 95 °C durante 10 minutos para favorecer la desnaturalización de las proteínas. Junto a las muestras experimentales, se incluyeron tres controles: uno con NPs (20.000 ng/mL), y dos con los liofilizados de las proteínas alimentarias (EW y SE) a una concentración de 1 mg/mL cada una.

Se cargaron 10 μL del marcador de peso molecular y 20 μL de cada muestra en un gel de poliacrilamida al 12 %. Se añadió tampón de electroforesis preparado con 25 mL de 20x XT MOPS Running Buffer y 475 mL H_2O Milli-Q hasta cubrir completamente el gel y se realizó la electroforesis. Una vez finalizada, el gel fue teñido con el colorante BlueSafe mediante agitación suave a 40 rpm durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, el gel se lavó 5 veces con H_2O Milli-Q para eliminar el exceso de colorante y se adquirió una imagen digital del mismo.

3.5 Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando GraphPad Prism v10.1 y Microsoft Excel. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media (SEM). Para las comparaciones entre cada grupo experimental y su respectivo control, se aplicó la prueba t de Student para muestras independientes. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas aquellas con un valor de $p < 0,05$.

4. Resultados y discusión

4.1 Cuantificación de proteínas no adsorbidas mediante absorbancia a 280 nm

Estudios previos han confirmado que los NPs son capaces de interactuar con proteínas presentes en entornos biológicos, formando coronas proteicas (Kihara et al., 2020). Este fenómeno puede modificar el comportamiento biológico y toxicológico de las partículas, ya que les confiere una nueva identidad biológica (Zhou et al., 2022).

Con el objetivo de estimar la cantidad de proteína unida a los nanoplásticos, se emplearon NPs de poliestireno de tamaño muy reducido (27 nm), dado que se ha descrito que su toxicidad aumenta a medida que disminuye el tamaño (Kihara et al., 2020).

Inicialmente, se establecieron cuatro relaciones proteína:NPs utilizando liofilizado de EW disuelto en H_2O Milli-Q. Las proporciones se redujeron en potencias de 10. La relación 140:1, se eligió como punto de partida por su equivalencia con una ingesta diaria estimada de 100 gramos de proteína y 0,71 g de NPs (Wu, 2016; Senathirajah et al., 2021). A partir de esta relación, se probaron las proporciones de 14:1, 1,4:1 y 0,14:1, siendo esta última una relación muy elevada, pero seleccionada por su similitud con la empleada por Gligorijevic et al. (2024)

en estudios con microplásticos (1:10). Se incluyó también un control sin la adición de NPs. Además, se analizó el efecto del tiempo de incubación sobre la cantidad de proteína adsorbida, evaluando las muestras a 30 minutos, 1, 2, 4, 6 y 24 horas.

El pH de las mezclas de proteína:NP se encuentra recogido en el **Anexo 1**. El liofilizado de EW disuelto en H₂O Milli-Q presentaba un pH inicial de 10. Tras la adición de los NPs, se observó una disminución del pH, especialmente en las muestras con mayores concentraciones de NPs. Para comprobar el origen de este efecto, se midió el pH de dos diluciones independientes de NPs en agua, correspondientes a las concentraciones utilizadas en las relaciones 1,4:1 y 0,14:1, confirmando que el efecto acidificante era atribuible a los NPs. Estos pueden portar distintos grupos funcionales, como carboxilos (-COOH) o aminos (-NH₂), que otorgan una carga superficial positiva o negativa a las partículas (Wang et al., 2024). Aunque no se conoce la carga exacta de los NPs utilizados, se ha descrito que los NPs con carga positiva pueden inducir efectos tóxicos, estrés oxidativo y daño mitocondrial (Teng et al., 2022; Xia et al., 2006).

A continuación, para cuantificar la concentración de proteína libre en los sobrenadantes obtenidos tras la incubación, se midió la absorbancia a 280 nm mediante el espectrofotómetro Nanodrop, como método rápido de estimación. Dado que la absorbancia a esta longitud de onda es directamente proporcional a la concentración de proteínas, esta técnica permitiría estimar indirectamente la cantidad de proteína no unida. La diferencia entre la concentración inicial de proteína añadida y la que no se unió a los NPs proporcionaría una estimación de la proteína que se unió adecuadamente a los NPs.

Los resultados obtenidos (**Figura 2**) reflejan la evolución temporal de la absorbancia de proteínas no adsorbidas para cada relación proteína:NPs. Las relaciones 140:1 y 14:1 no mostraron variaciones significativas respecto al control, presentando valores relativamente constantes. La proporción 1,4:1 registró valores ligeramente superiores al control, mientras que la relación 0,14:1 presentó absorbancias significativamente más elevadas, incluso superiores al doble del valor del control. Esta tendencia coincide con el descenso del pH, lo que sugiere que un ambiente más ácido podría estar interfiriendo en la adsorción proteica a los NPs

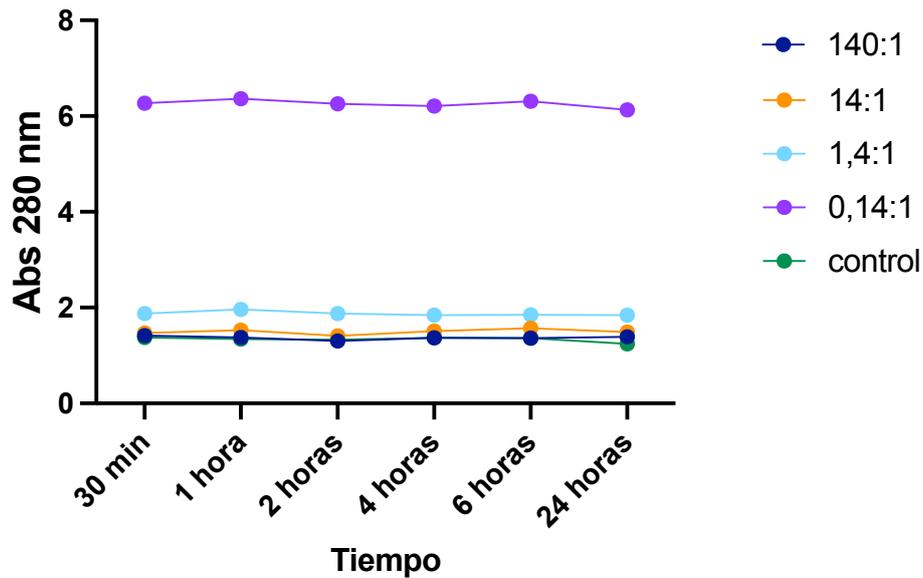


Figura 2 . Cuantificación de proteínas no adsorbidas tras la incubación con nanoplasticos. Evolución temporal de la concentración de proteínas no adsorbidas en el sobrenadante, tras la incubación de clara de huevo con nanoplasticos de poliestireno (27 nm) a diferentes relaciones proteína:NPs (140:1, 14:1, 1,4:1 y 0,14:1). La cuantificación se realizó mediante absorbancia a 280 nm utilizando el espectrofotómetro Nanodrop. El control corresponde a muestras de proteína sin adición de nanoplasticos. Las mediciones se realizaron a 30 minutos, 1, 2, 4, 6 y 24 horas.

4.2 Evaluación mediante absorbancia a 280 nm de la adsorción proteica en condiciones fisiológicas simuladas

Posteriormente, se llevó a cabo un segundo ensayo utilizando el medio tamponado a pH 7, con el objetivo de simular el pH del intestino delgado. En este experimento, se midió el pH antes y después de la incubación para evaluar la estabilidad del medio, observándose que el tampón fosfato fue capaz de mantener el pH constante, incluso a concentraciones elevadas de NPs (**Anexo 2**), por lo que no fue necesario ajustarlo.

En la **Figura 3** se muestran los resultados obtenidos del ensayo de formación de coronas con EW en tampón fosfato, donde las absorbancias de los sobrenadantes mostraron una tendencia lineal en las muestras con relaciones 140:1 y 14:1, siendo prácticamente idénticas al grupo control. Al igual que en el ensayo anterior, las muestras con menores concentraciones de proteínas (1,4:1 y 0,14:1) presentaron valores de absorbancia más elevados que el control, especialmente la relación 0,14:1. Esto podría indicar que, a concentraciones elevadas de NPs, estos interfieren en la medición espectrofotométrica, posiblemente debido a que permanecen en suspensión en el sobrenadante.

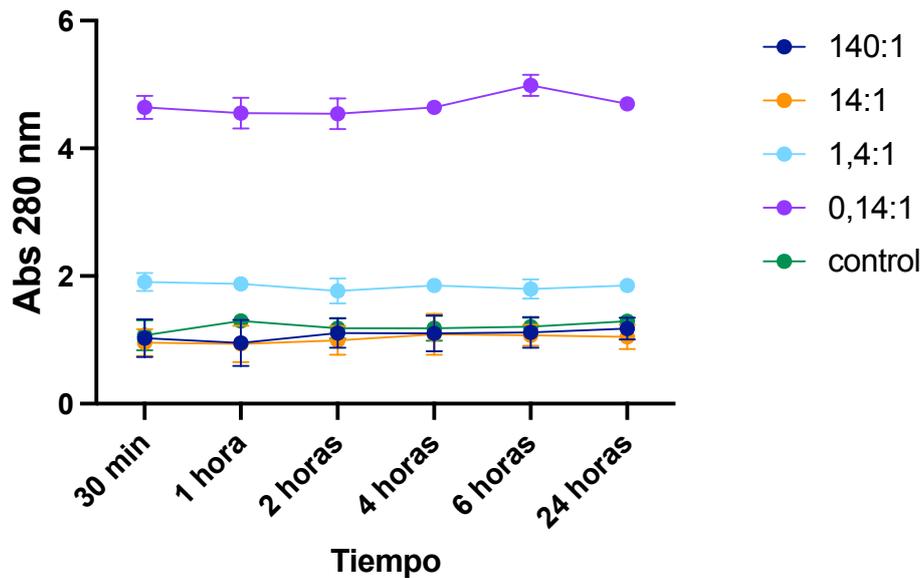


Figura 3. Cuantificación de proteínas no adsorbidas en coronas formadas con EW y nanoplásticos en tampón fosfato (pH 7). Sobrenadantes obtenidos tras la incubación con distintas relaciones proteína: NPs (140:1, 14:1, 1,4:1, 0,14:1) y control sin NPs, medidos a 280 nm para cuantificar proteínas no adsorbidas. Las muestras fueron incubadas durante 30 minutos, 1, 2, 4, 6 y 24 horas. Los datos representan la media \pm SEM de dos experimentos.

Para comprobar la posible interferencia de las NPs, se realizaron mediciones de absorbancia utilizando dos diluciones: una de 1/50 y otra de 1/5. La dilución 1/50 corresponde a la concentración de NPs añadida en las muestras con relación 1,4:1, mientras que la concentración 1/5 corresponde a la utilizada en la muestra 0,14:1. En el caso de la concentración 1/50, tanto el espectro como el valor de absorbancia fueron similares a los observados en la muestra 1,4:1. Lo mismo se observó entre la concentración 1/5 y la muestra 0,14:1 (ver espectros en el **Anexo 3**), lo que confirma la presencia de NPs en el sobrenadante.

4.3 Comparación de la adsorción proteica entre diferentes extractos alimentarios

Tras estas observaciones, se decidió modificar algunos parámetros del ensayo de equilibrado de coronas. En primer lugar, se estableció un tiempo de incubación único de 4 horas para todas las muestras. Esta decisión se fundamentó en dos razones principales. Por un lado, los datos obtenidos en ensayos previos (**Figura 2** y **Figura 3**) mostraron que, a partir de las 4 horas, la absorbancia se estabilizaba sin variaciones significativas. Por otro lado, este tiempo corresponde aproximadamente a la duración de los procesos digestivos en el intestino delgado y en el estómago, lo que permite una simulación fisiológica. En segundo lugar, se optó por

eliminar la relación 0,14:1 de los ensayos posteriores, ya que generaba interferencias en las mediciones de absorbancia.

Además, se incorporó el uso de tampón glicina a pH 3, con el fin de simular condiciones ácidas similares a las del estómago. En el nuevo diseño experimental, los liofilizados de EW y SE, se disolvieron tanto en tampón fosfato como en tampón glicina. No obstante, al intentar disolver EW en el tampón glicina a pH 3, se observó que la proteína no se solubilizaba adecuadamente y precipitaba, por lo que esta condición fue descartada. De este modo, los ensayos finales se realizaron con las siguientes combinaciones: EW en tampón fosfato a pH 7, SE en tampón fosfato a pH 7 y SE en tampón glicina a pH 3.

Una vez preparadas las soluciones proteicas en los respectivos tampones, se observó que la mezcla de SE con tampón glicina provocaba una elevación del pH, por lo que fue necesario ajustarlo nuevamente a pH 3 para mantener las condiciones experimentales.

Para comparar diferentes extractos alimentarios, se midió la absorbancia a 280 nm de los sobrenadantes, tras diluir las muestras 1/8 con el fin de reducir la interferencia de los NPs, aunque continuaron afectando la lectura. En el caso del extracto de EW a pH 7 (**Figura 4A**), las absorbancias correspondientes a las relaciones 140:1 y 14:1 fueron menores que las del control, mientras que la relación 1,4:1 fue considerablemente más elevada. Un patrón similar se observó en el extracto de SE a pH 7 (**Figura 4B**), donde las muestras con relaciones más altas de proteína fueron comparables al control, pero la muestra con mayor concentración de NPs mostró una desviación notable. En el extracto de SE a pH 3 (**Figura 4C**), las absorbancias fueron más bajas en comparación con los demás ensayos, y en este caso, la relación 1,4:1 no mostró una diferencia tan pronunciada respecto al control, aunque seguía siendo más elevada.

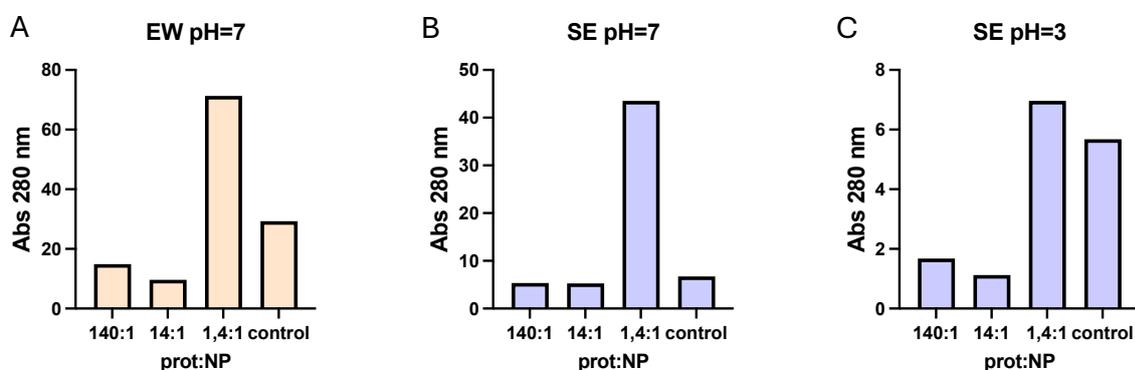


Figura 4. Comparación de la absorbancia de proteínas no adsorbidas en condiciones de digestión simuladas. Concentraciones de proteína ($\mu\text{g}/\text{mL}$) estimadas en los sobrenadantes tras incubación con nanoplasticos de poliestireno (27 nm) durante 4 horas. (A) Clara de huevo en tampón fosfato (pH 7); (B) Extracto de gamba en

tampón fosfato (pH 7); (C) Extracto de gamba en tampón glicina (pH 3). Los valores fueron obtenidos a partir de las absorbancias a 280 nm, tras diluir las muestras 1/8 para reducir la interferencia óptica de los NPs.

A pesar de la dilución previa y la exclusión de la condición 0,14:1, se observaron concentraciones anómalamente elevadas en las muestras 1,4:1, especialmente en los extractos de EW y SE a pH 7. Estos resultados sugieren que las NPs continuaron interfiriendo en la lectura espectrofotométrica, lo que limita la fiabilidad del método para la cuantificación proteica en presencia concentraciones elevadas de NPs.

4.4 Evaluación de la adsorción proteica en condiciones fisiológicas simuladas mediante ensayo BCA

Debido a estas limitaciones de la absorbancia a 280 nm, se optó por emplear el método BCA como alternativa para cuantificar las proteínas presentes en los sobrenadantes. Este método bioquímico permite determinar la concentración de proteínas mediante una reacción en dos etapas: en primer lugar, los enlaces peptídicos de las proteínas reducen los iones Cu^{2+} del sulfato de cobre (II) a Cu^+ , y posteriormente, dos moléculas de ácido bicinonínico quelan cada ion Cu^+ , formando un complejo de color púrpura con máxima absorbancia a 562 nm. Se trata de una técnica colorimétrica sencilla, sensible y reproducible, adecuada para la cuantificación fiable de proteínas (Cortés-Ríos et al., 2020).

Cabe destacar que, en el caso específico de las muestras de SE a pH 3, fue necesario ajustar el pH a 7 antes de aplicar el método BCA, ya que el medio ácido interfiere en la reacción colorimétrica, impidiendo la reducción del cobre, generando interferencias con el reactivo y alterando los resultados de la medición (Smith et al., 1985).

A partir de los resultados obtenidos, se observó un patrón de adsorción dependiente del pH y del tipo de extracto proteico. En el ensayo con EW a pH 7 (**Figura 5A**), los valores oscilaron entre 11,90 y 14,169 $\mu\text{g/mL}$, sin diferencias significativas respecto al control. En contraste, el ensayo con SE mostró una reducción significativa de proteína libre en dos condiciones específicas. A pH 7 (**Figura 5B**), la relación 14:1 presentó una diferencia estadísticamente significativa frente al control; sin embargo, la magnitud de esta diferencia fue baja. A pH 3 (**Figura 5C**), la muestra 1,4:1 mostró una disminución significativa, lo que sugiere una mayor adsorción proteica en condiciones ácidas.

Para descartar una posible interferencia de los NPs en el método BCA, se analizaron dos diluciones de NPs correspondientes a las muestras de 14:1 y 1,4:1. Las concentraciones obtenidas fueron bajas y variables, tanto en las proporciones equivalentes a EW como a SE en ambos pH, lo que indica que su contribución a las lecturas fue mínima (**Figura 5D**)

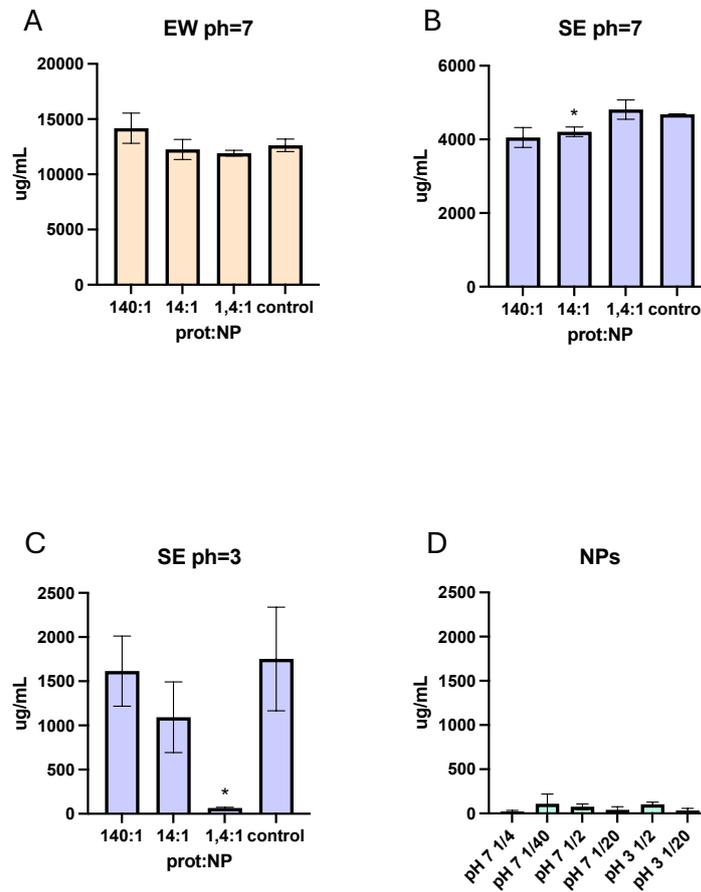


Figura 5. Concentración de proteínas no absorbidas en sobrenadantes cuantificados mediante el método de BCA. Los valores representan la concentración de proteínas ($\mu\text{g/mL}$) obtenida tras 4 horas de incubación con nanoplasticos de poliestireno (27 nm), en diferentes condiciones de pH y tipo de extracto proteico. (A) Clara de huevo en tampón fosfato (pH 7); (B) Extracto de gamba en tampón fosfato (pH 7); (C) Extracto de gamba en tampón glicina (pH 3); (D) Diluciones de NPs en diferentes condiciones de pH, utilizadas como control para evaluar posibles interferencias en el ensayo. Todos los datos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes. Se realizó el análisis estadístico mediante T-Student y la significancia fue $*p < 0,05$ con respecto al control.

En conjunto, los datos indican una interacción significativa entre los NPs y las proteínas únicamente en SE a pH ácido, particularmente en la condición 1,4:1.

4.5 Análisis electroforético de proteínas adsorbidas a nanoplasticos

A partir de estos resultados, se seleccionaron las muestras de EW a pH 7 y SE a pH 7 y 3 para su posterior análisis mediante electroforesis. Con el fin de caracterizar las proteínas adsorbidas a los NPs, los pellets obtenidos tras centrifugación fueron sometidos a tres lavados consecutivos con H₂O Milli-Q, con el objetivo de eliminar las proteínas débilmente unidas (*soft corona*) y conservar únicamente las proteínas firmemente adsorbidas (*hard corona*). Se analizaron muestras con EW y SE, además de controles adecuados para cada extracto: el liofilizado disuelto en tampón de carga, el control sin NPs y un control con solo NPs.

En el gel correspondiente a EW (**Figura 6A**), se utilizó el liofilizado de EW disuelto en tampón de carga como control del perfil proteico. Este gel proporcionó referencias cualitativas importantes, ya que se observó una banda intensa en torno a ~14 kDa, correspondiente a la lisozima, en el control de EW sin NPs. Esta banda también estaba presente con gran intensidad en las muestras 140:1 y 14:1, especialmente en esta última. En la muestra 1,4:1 la banda fue visible, aunque con menor intensidad. Cabe destacar que la lisozima es una proteína con un punto isoeléctrico muy elevado (>10), lo que puede influir en su comportamiento (Yao et al., 2022). Por otro lado, se observó una banda muy intensa en torno a ~77 kDa, correspondiente a la ovotransferrina, tanto en el liofilizado de EW disuelto en el tampón como en las muestras 14:1 y 1,4:1. Asimismo, se detectaron bandas intensas correspondientes a la ovalbúmina (~45 kDa) en las mismas muestras: liofilizado de EW, 14:1 y 1,4:1.

Estos resultados sugieren que la lisozima podría haber precipitado durante la incubación en tampón fosfato. Gligorijevic et al. (2024) describió la unión de la lisozima a los MPs, señalando su alta afinidad por las partículas. No obstante, el estudio realizado en este trabajo se llevó a cabo con MPs, no con NPs, y se centró específicamente en la interacción de las partículas con la ovoalbúmina, aunque posteriormente también analizaron el comportamiento de las coronas con extracto de EW. Además, no sometieron los controles a las mismas condiciones experimentales que sus muestras, lo que impide asegurar si la detección de la lisozima se debió a una unión específica a los MPs o a una posible precipitación. Aunque no puede descartarse completamente su adsorción, la intensidad de la banda en el control sin NPs sugiere que su presencia en el pellet podría deberse principalmente a una precipitación inespecífica, y que probablemente no forme parte principal de la *hard corona*.

Por otro lado, las bandas correspondientes a ovotransferrina y ovalbúmina, además de estar presentes en el liofilizado, aparecen principalmente en las muestras con mayor proporción de NPs. Esto sugiere que dichas proteínas podrían estar uniéndose activamente a las partículas, ya

que sus bandas en el control sin NPs son prácticamente inexistentes. Esta interacción podría estar mediada por características como el tamaño, la estructura o la afinidad superficial de las proteínas.

En la electroforesis del SE (**Figura 6B**), se observaron diversas bandas características, entre las cuales destacaron dos en la región de 35–50 kDa, atribuibles a tropomiosina y arginina quinasa, dos de los principales alérgenos presentes en la gamba (Li et al., 2020; Xu et al., 2022). No obstante, las bandas fueron similares en todos los carriles, tanto a pH 7 como a pH 3, por lo que no es posible extraer conclusiones firmes respecto a la adsorción proteica. Esto sugiere que, si bien no puede descartarse una cierta adsorción de proteínas a la superficie, también es probable que se haya producido una precipitación inespecífica durante la incubación y la centrifugación.

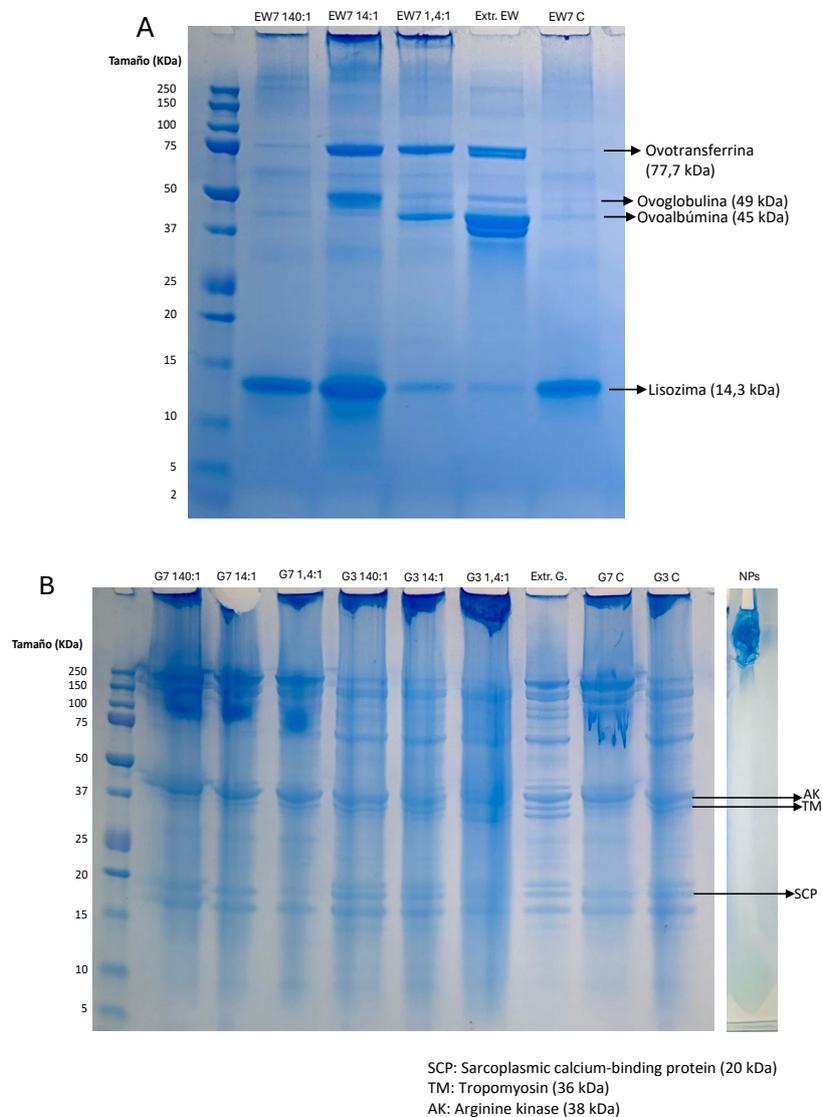


Figura 6. Análisis electroforético de proteínas adsorbidas a nanoplasticos. (A) Gel de electroforesis con muestras de clara de huevo (EW) incubadas con nanoplasticos en tampón fosfato (relaciones 140:1, 14:1, 1,4:1), junto con el extracto proteico completo y controles (sin NPs y NPs solos). (B) Gel de electroforesis con muestras de extracto

de gamba incubadas con NPs en tampón fosfato (pH 7) y glicina (pH 3), en relaciones proteína:NPs de 140:1, 14:1 y 1,4:1, incluyendo los respectivos controles y un pocillo con NPs sin proteína. Las imágenes muestran el perfil de proteínas firmemente adsorbidas (hard corona) tras eliminación de la soft corona mediante lavados. (Desert et al., 2001; Zhao et al., 2021). EW7: EW a pH 7; Extr. EW: liofilizado EW disuelto en tampón de carga; EW7 C: control de EW a pH 7; SE7: SE a pH 7; SE3: SE a pH3; SE: extracto de gamba disuelto en tampón de carga; SE7 C: control SE a pH 7; SE3 C: control SE a pH 3; NPs: nanoplásticos disueltos en tampón de carga.

Se incluyó un control de NPs sin proteína. Aunque no se observaron bandas proteicas, sí se detectó acumulación en la parte superior del pocillo, indicando que los NPs no migraron en el gel. Este efecto también se observó en algunas muestras de SE, posiblemente debido a la presencia de NPs o a dificultades en la resuspensión completa de los pellets, especialmente a pH 3. Dado que este método no permite distinguir con certeza entre proteínas adsorbidas y precipitación, se recomienda repetir la electroforesis con optimización adicional.

El extracto de gamba sigue siendo de especial interés, ya que, aunque no se dispone de estudios previos sobre coronas proteicas formadas con este alimento, se reconoce ampliamente su alergenicidad (Su et al., 2024). Profundizar en la interacción entre proteínas alergénicas y NPs resulta relevante por sus posibles implicaciones en la absorción intestinal y en la respuesta inmunológica.

Los resultados experimentales, junto con la escasa bibliografía disponible sobre la formación de coronas proteicas en nanoplásticos, especialmente en relación con las proteínas utilizadas en este estudio, evidencian una importante laguna de conocimiento en este campo. Por ello, se requiere una investigación más profunda para comprender mejor las dinámicas de adsorción, composición y posibles implicaciones biológicas de estas coronas proteicas.

4.6 Contribución del estudio a los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS)

El análisis de esta problemática se enmarca, además, dentro del compromiso con los **Objetivos de Desarrollo Sostenible** establecidos por la Organización de las Naciones Unidas. Este trabajo contribuye de manera directa a los siguientes objetivos:

- ODS 3: Salud y bienestar Este estudio evalúa la posible exposición humana a nanoplásticos a través de la dieta, así como sus implicaciones en la absorción intestinal y en la respuesta inmunológica, factores clave para la salud pública.
- ODS 12: Producción y consumo responsable. Los resultados ponen en relieve la necesidad de implementar políticas más estrictas sobre el uso de plásticos y fomentar

alternativas sostenibles, destacando el vínculo entre la contaminación plástica y la seguridad alimentaria.

- ODS 14: Vida submarina. Al considerar la presencia de nanoplásticos en productos de origen marino y su paso a lo largo de la cadena trófica, este trabajo contribuye a la comprensión del impacto de la contaminación marina en la salud humana.

5. Conclusiones

1 -. Para optimizar un modelo experimental que permita cuantificar las proteínas unidas a las coronas mediante la medición indirecta de las proteínas no adsorbidas, se identificó el ensayo BCA como el método más adecuado. Se descartó la medición por absorbancia a 280 nm debido a la interferencia provocada por los NPs, los cuales presentan limitaciones asociadas a su tamaño, ya que no pueden ser eliminados eficazmente mediante métodos convencionales de separación.

2 -. Se observó una influencia significativa del pH en las proteínas del extracto de EW, que tienden a precipitar en medios ácidos. Los ensayos con EW y SE a pH 7 pudieron llevarse a cabo correctamente, al igual que el ensayo con SE a pH 3. No obstante, se detectaron diferencias en los resultados en función del tampón utilizado. En el caso de SE a pH 3, la muestra con relación 1,4:1 parece ser la única en la que se evidencia una adsorción significativa de proteínas a los NPs.

3 -. La ovotransferrina y la ovoalbúmina parecen ser las principales proteínas del extracto de EW que se adsorben a los NPs, formando parte de la corona proteica, ya que se detectan en las muestras con mayor concentración de nanopartículas. Por el contrario, otras proteínas no se unen a las partículas, sino que precipitan posiblemente debido a su inestabilidad en las condiciones del medio.

6. Bibliografia

1. Abdolahpur Monikh, F., Lehtonen, Š., Kekäläinen, J., Karkossa, I., Auriola, S., Schubert, K., Zanut, A., Peltonen, S., Niskanen, J., Bandekar, M., von Bergen, M., Leskinen, J. T. T., Koistinen, A., Bogialli, S., Guo, Z., Kukkonen, J. V. K., Chen, C., & Lynch, I. (2024). Biotransformation of nanoplastics in human plasma and their permeation through a model in vitro blood-brain barrier: An in-depth quantitative analysis. *Nano Today*, 59(102466), 102466. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2024.102466>
2. Blackburn, K., & Green, D. (2022). The potential effects of microplastics on human health: What is known and what is unknown. *Ambio*, 51(3), 518–530. <https://doi.org/10.1007/s13280-021-01589-9>
3. Campanale, C., Massarelli, C., Savino, I., Locaputo, V., & Uricchio, V. F. (2020). A Detailed Review Study on Potential Effects of Microplastics and Additives of Concern on Human Health. *International journal of environmental research and public health*, 17(4), 1212. <https://doi.org/10.3390/ijerph17041212>
4. Chen, Y., Liu, Q., Yang, F., Yu, H., Xie, Y., & Yao, W. (2022). Submicron-size polystyrene modulates amyloid fibril formation: From the perspective of protein corona. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 218, 112736. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112736>
5. Cortés-Ríos, J., Zárate, A. M., Figueroa, J. D., Medina, J., Fuentes-Lemus, E., Rodríguez-Fernández, M., Aliaga, M., & López-Alarcón, C. (2020). Protein quantification by bicinchoninic acid (BCA) assay follows complex kinetics and can be performed at short incubation times. *Analytical biochemistry*, 608, 113904. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113904>
6. Cui, G., Su, W., & Tan, M. (2022). Formation and biological effects of protein corona for food-related nanoparticles. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 21(2), 2002–2031. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12838>
7. Desert, C., Guérin-Dubiard, C., Nau, F., Jan, G., Val, F., & Mallard, J. (2001). Comparison of different electrophoretic separations of hen egg white proteins. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(10), 4553–4561. <https://doi.org/10.1021/jf001423n>
8. Feng, Y., Tu, C., Li, R., Wu, D., Yang, J., Xia, Y., Peijnenburg, W. J. G. M., & Luo, Y. (2023). A systematic review of the impacts of exposure to micro- and nano-plastics on

- human tissue accumulation and health. *Eco-Environment & Health*, 2(4), 195–207.
<https://doi.org/10.1016/j.eehl.2023.08.002>
9. Fleischer, C. C., & Payne, C. K. (2014). Nanoparticle-cell interactions: molecular structure of the protein corona and cellular outcomes. *Accounts of chemical research*, 47(8), 2651–2659. <https://doi.org/10.1021/ar500190q>
 10. Gligorijevic, N., Lujic, T., Mutic, T., Vasovic, T., de Guzman, M. K., Acimovic, J., Stanic-Vucinic, D., & Cirkovic Velickovic, T. (2024). Ovalbumin interaction with polystyrene and polyethylene terephthalate microplastics alters its structural properties. *International journal of biological macromolecules*, 267(Pt 2), 131564. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.131564>
 11. Gopinath, P. M., Saranya, V., Vijayakumar, S., Mythili Meera, M., Ruprekha, S., Kunal, R., Pranay, A., Thomas, J., Mukherjee, A., & Chandrasekaran, N. (2019). Assessment on interactive prospectives of nanoplastics with plasma proteins and the toxicological impacts of virgin, coronated and environmentally released-nanoplastics. *Scientific reports*, 9(1), 8860. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45139-6>
 12. Hernandez, L. M., Xu, E. G., Larsson, H. C. E., Tahara, R., Maisuria, V. B., & Tufenkji, N. (2019). Plastic Teabags Release Billions of Microparticles and Nanoparticles into Tea. *Environmental science & technology*, 53(21), 12300–12310. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b02540>
 13. Ivleva N. P. (2021). Chemical Analysis of Microplastics and Nanoplastics: Challenges, Advanced Methods, and Perspectives. *Chemical reviews*, 121(19), 11886–11936. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00178>
 14. Janani, R., Bhuvana, S., Geethalakshmi, V., Jeyachitra, R., Sathishkumar, K., Balu, R., & Ayyamperumal, R. (2024). Micro and nano plastics in food: A review on the strategies for identification, isolation, and mitigation through photocatalysis, and health risk assessment. *Environmental Research*, 241, 117666. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.117666>
 15. Jia, J., Liu, Q., Zhao, E., Li, X., Xiong, X., & Wu, C. (2024). Biofilm formation on microplastics and interactions with antibiotics, antibiotic resistance genes and pathogens in aquatic environment. *Eco-Environment & Health*, 3(4), 516–528. <https://doi.org/10.1016/j.eehl.2024.05.003>
 16. Kannan, K., & Vimalkumar, K. (2021). A Review of Human Exposure to Microplastics and Insights Into Microplastics as Obesogens. *Frontiers in endocrinology*, 12, 724989. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.724989>

17. Kihara, S., Ghosh, S., McDougall, D. R., Whitten, A. E., Mata, J. P., Köper, I., & McGillivray, D. J. (2020). Structure of soft and hard protein corona around polystyrene nanoplastics-Particle size and protein types. *Biointerphases*, 15(5), 051002. <https://doi.org/10.1116/6.0000404>
18. Krishna de Guzman, M., Stanic-Vucinic, D., Gligorijevic, N., Wimmer, L., Gasparyan, M., Lujic, T., Vasovic, T., Dailey, L. A., Van Haute, S., & Cirkovic Velickovic, T. (2023). Small polystyrene microplastics interfere with the breakdown of milk proteins during static in vitro simulated human gastric digestion. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 335, 122282. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.122282>
19. Kopatz, V., Wen, K., Kovács, T., Keimowitz, A. S., Pichler, V., Widder, J., Vethaak, A. D., Hollóczki, O., & Kenner, L. (2023). Micro- and Nanoplastics Breach the Blood-Brain Barrier (BBB): Biomolecular Corona's Role Revealed. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 13(8), 1404. <https://doi.org/10.3390/nano13081404>
20. Leslie, H. A., van Velzen, M. J. M., Brandsma, S. H., Vethaak, A. D., Garcia-Vallejo, J. J., & Lamoree, M. H. (2022). Discovery and quantification of plastic particle pollution in human blood. *Environment international*, 163, 107199. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107199>
21. Li, D., Shi, Y., Yang, L., Xiao, L., Kehoe, D. K., Gun'ko, Y. K., Boland, J. J., & Wang, J. J. (2020). Microplastic release from the degradation of polypropylene feeding bottles during infant formula preparation. *Nature food*, 1(11), 746–754. <https://doi.org/10.1038/s43016-020-00171-y>
22. Li, J., Li, Z., Kong, D., Li, S., Yu, Y., & Li, H. (2020). IgE and IgG4 responses to shrimp allergen tropomyosin and its epitopes in patients from coastal areas of northern China. *Molecular medicine reports*, 22(1), 371–379. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11084>
23. Liu, S., Shi, J., Wang, J., Dai, Y., Li, H., Li, J., Liu, X., Chen, X., Wang, Z., & Zhang, P. (2021). Interactions Between Microplastics and Heavy Metals in Aquatic Environments: A Review. *Frontiers in microbiology*, 12, 652520. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.652520>
24. Mamun, A. A., Prasetya, T. A. E., Dewi, I. R., & Ahmad, M. (2023). Microplastics in human food chains: Food becoming a threat to health safety. *The Science of the total environment*, 858(Pt 1), 159834. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159834>
25. Mariano, S., Tacconi, S., Fidaleo, M., Rossi, M., & Dini, L. (2021). Micro and Nanoplastics Identification: Classic Methods and Innovative Detection Techniques. *Frontiers in toxicology*, 3, 636640. <https://doi.org/10.3389/ftox.2021.636640>

26. Mohamed Nor, N. H., Kooi, M., Diepens, N. J., & Koelmans, A. A. (2021). Lifetime Accumulation of Microplastic in Children and Adults. *Environmental science & technology*, 55(8), 5084–5096. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c07384>
27. Molina, E., & Benedé, S. (2022). Is There Evidence of Health Risks From Exposure to Micro- and Nanoplastics in Foods?. *Frontiers in nutrition*, 9, 910094. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.910094>
28. Prata, J. C., da Costa, J. P., Lopes, I., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. (2020). Environmental exposure to microplastics: An overview on possible human health effects. *The Science of the total environment*, 702, 134455. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134455>
29. Qiao, R., Deng, Y., Zhang, S., Wolosker, M. B., Zhu, Q., Ren, H., & Zhang, Y. (2019). Accumulation of different shapes of microplastics initiates intestinal injury and gut microbiota dysbiosis in the gut of zebrafish. *Chemosphere*, 236, 124334. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.07.065>
30. Samadi, N., Klems, M., & Untersmayr, E. (2018). The role of gastrointestinal permeability in food allergy. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*, 121(2), 168–173. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2018.05.010>
31. Saptarshi, S. R., Duschl, A., & Lopata, A. L. (2013). Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. *Journal of nanobiotechnology*, 11, 26. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-11-26>
32. Senathirajah, K., Attwood, S., Bhagwat, G., Carbery, M., Wilson, S., & Palanisami, T. (2021). Estimation of the mass of microplastics ingested - A pivotal first step towards human health risk assessment. *Journal of hazardous materials*, 404(Pt B), 124004. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124004>
33. Siddiqui, S. A., Khan, S., Tariq, T., Sameen, A., Nawaz, A., Walayat, N., Oboturova, N. P., Ambartsumov, T. G., & Nagdalian, A. A. (2023). Potential risk assessment and toxicological impacts of nano/micro-plastics on human health through food products. *Advances in food and nutrition research*, 103, 361–395. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2022.07.006>
34. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*, 150(1), 76–85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)

35. Souza-Silva, T. G., Oliveira, I. A., Silva, G. G. D., Giusti, F. C. V., Novaes, R. D., & Paula, H. A. A. (2022). Impact of microplastics on the intestinal microbiota: A systematic review of preclinical evidence. *Life sciences*, 294, 120366. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120366>
36. Statista. (2025, 28 febrero). Global plastic production 1950-2023. <https://www.statista.com/statistics/282732/global-production-of-plastics-since-1950/>
37. Stevens L. (1991). Egg white proteins. *Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry*, 100(1), 1–9. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(91\)90076-p](https://doi.org/10.1016/0305-0491(91)90076-p)
38. Su, B. B., Blackmon, W., Xu, C., Holt, C., Boateng, N., Wang, D., Szafron, V., Anagnostou, A., Anvari, S., & Davis, C. M. (2024). Diagnosis and management of shrimp allergy. *Frontiers in allergy*, 5, 1456999. <https://doi.org/10.3389/falgy.2024.1456999>
39. Tamargo, A., Molinero, N., Reinoso, J. J., Alcolea-Rodriguez, V., Portela, R., Bañares, M. A., Fernández, J. F., & Moreno-Arribas, M. V. (2022). PET microplastics affect human gut microbiota communities during simulated gastrointestinal digestion, first evidence of plausible polymer biodegradation during human digestion. *Scientific reports*, 12(1), 528. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04489-w>
40. Teng, M., Zhao, X., Wu, F., Wang, C., Wang, C., White, J. C., Zhao, W., Zhou, L., Yan, S., & Tian, S. (2022). Charge-specific adverse effects of polystyrene nanoplastics on zebrafish (*Danio rerio*) development and behavior. *Environment international*, 163, 107154. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107154>
41. Vethaak, A. D., & Legler, J. (2021). Microplastics and human health. *Science (New York, N.Y.)*, 371(6530), 672–674. <https://doi.org/10.1126/science.abe5041>
42. Wang, Y., Xu, K., Gao, X., Wei, Z., Han, Q., Wang, S., Du, W., & Chen, M. (2024). Polystyrene nanoplastics with different functional groups and charges have different impacts on type 2 diabetes. *Particle and fibre toxicology*, 21(1), 21. <https://doi.org/10.1186/s12989-024-00582-w>
43. Wu G. (2016). Dietary protein intake and human health. *Food & function*, 7(3), 1251–1265. <https://doi.org/10.1039/c5fo01530h>
44. Xia, T., Kovochich, M., Brant, J., Hotze, M., Sempf, J., Oberley, T., Sioutas, C., Yeh, J. I., Wiesner, M. R., & Nel, A. E. (2006). Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano letters*, 6(8), 1794–1807. <https://doi.org/10.1021/nl061025k>

45. Xu, L. L., Gao, H. Y., Yang, F., Wen, Y. Q., Zhang, H. W., Lin, H., Li, Z. X., & Gasset, M. (2022). Major shrimp allergen peptidomics signatures and potential biomarkers of heat processing. *Food chemistry*, 382, 132567. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132567>
46. Yang, W., Jannatun, N., Zeng, Y., Liu, T., Zhang, G., Chen, C., & Li, Y. (2022). Impacts of microplastics on immunity. *Frontiers in toxicology*, 4, 956885. <https://doi.org/10.3389/ftox.2022.956885>
47. Yee, M. S., Hii, L. W., Looi, C. K., Lim, W. M., Wong, S. F., Kok, Y. Y., Tan, B. K., Wong, C. Y., & Leong, C. O. (2021). Impact of Microplastics and Nanoplastics on Human Health. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 11(2), 496. <https://doi.org/10.3390/nano11020496>
48. Zanganeh, S., Spitler, R., Erfanzadeh, M., Alkilany, A. M., & Mahmoudi, M. (2016). Protein corona: Opportunities and challenges. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 75, 143–147. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.01.005>
49. Zhao, J., Li, Y., Xu, L., Timira, V., Zhang, Z., Chen, G., Zhang, L., Lin, H., & Li, Z. (2022). Improved protein extraction from thermally processed shrimp (*Litopenaeus vannamei*) for reliable immunodetection via a synergistic effect of buffer additives. *Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie [Food Science and Technology]*, 154(112790), 112790. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112790>
50. Zhou, J., Yu, Y., Luan, Y., & Dai, W. (2022). The Formation of Protein Corona by Nanoplastics and Horseradish Peroxidase. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 12(24), 4467. <https://doi.org/10.3390/nano12244467>
51. Zimmermann, L., Bartosova, Z., Braun, K., Oehlmann, J., Völker, C., & Wagner, M. (2021). Plastic Products Leach Chemicals That Induce In Vitro Toxicity under Realistic Use Conditions. *Environmental science & technology*, 55(17), 11814–11823. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c01103>
52. Zuri, G., Karanasiou, A., & Lacorte, S. (2023). Microplastics: Human exposure assessment through air, water, and food. *Environment international*, 179, 108150. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2023.108150>

Anexos

Anexo 1. Tabla de pH de ensayo equilibrado de coronas con H₂O Milli-Q

	140:1	14:1	1,4:1	0,14:1	Control	NPs 1/50	NPs 1/5
30 min	7,56	6,7	7,3	2,89	6,95	3,05	1,7
1 h	7,85	7,24	7,2	2,43	7,58		
2 h	7,47	7,54	6,16	2,74	7,17		
4 h	7,55	7,68	6,5	2,59	6,52		
6 h	6,88	7,38	6,9	2,99	6,7		
24 h	7,28	7,22	7,07	3,35	6,77		

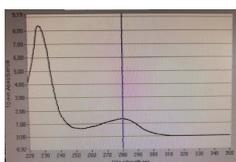
Anexo 2. Tabla de pH de ensayo equilibrado de coronas con tampón fosfato (pH 7)

	140:1	14:1	1,4:1	0,14:1	Control
30 min	7,34	6,9	7,27	6,64	7,06
1 h	7,17	7,37	6,6	7,1	7,05
2 h	7,15	7,1	5,94	6,81	7,43
4 h	6,89	7,07	6,75	6,77	6,82
6 h	6,99	7,35	6,84	6,4	7,11
24 h	6,94	7,1	6,85	6,68	7,37

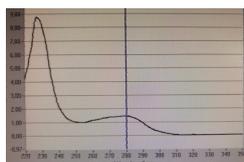
Anexo 3. Ejemplo de espectros de la absorbancia de las muestras del ensayo equilibrado de coronas con EW y tampón fosfato (pH 7)

EW:NP

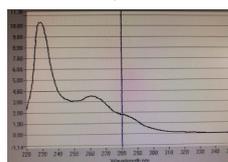
140:1



14:1



1,4:1

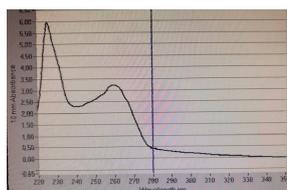


0,14:1



Controles NP

Dilución 1/50



Dilución 1/5

