

Nanomateriais ingeridos: impacto biológico em relação com as suas características físico-químicas

Ingested nanomaterials: biological impact in relation to their physicochemical characteristics

Ana Catarina Gramacho^{1,2}, Maria João Silva¹⁻³, Henriqueta Louro¹⁻³

henriqueta.louro@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P., Lisboa, Portugal;

(2) Centro de Toxicogenómica e Saúde Humana (ToxOmics), NOVA Medical School/Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal;

(3) PTO-NANO, Lisboa, Portugal

_Resumo

A utilização de nanomateriais (NMs) em setores variados, designadamente, agricultura e indústria alimentar, encontra-se amplamente disseminada. Assim, muitos produtos alimentares contêm NMs, sendo provável a sua ingestão pelo homem. Torna-se, pois, essencial garantir que esses NMs ingeridos não produzem efeitos adversos, nomeadamente, genotoxicidade que se relaciona com carcinogénese. Neste estudo, pretendemos avaliar uma possível associação entre as propriedades físico-químicas de NMs com a mesma constituição química, dióxido de titânio (TiO₂), e os seus efeitos biológicos em células humanas e, por outro lado, identificar as propriedades que determinam a sua toxicidade. Para tal, analisou-se a citotoxicidade de um conjunto de quatro NMs de TiO₂ tendo-se observado que apenas um deles induzia morte celular. Relativamente aos efeitos genotóxicos, apesar de nenhum NM ter induzido alterações cromossómicas (ensaio do micronúcleo), observou-se que apenas os NMs na forma cristalina anatase (mas não rutilo) induziam efeitos lesivos no DNA (ensaio do cometa). Neste último ensaio, verificou-se ainda a existência de uma correlação inversa entre o tamanho do NM em meio de cultura e a sua genotoxicidade. Futuramente, investigaremos o efeito do processo de digestão nas características destes NMs, bem como nos seus efeitos genotóxicos *in vitro*, visando a tradução dos resultados em potenciais implicações na saúde humana.

_Abstract

The use of nanomaterials (NMs) in a variety of sectors, e.g., agriculture and the food industry, is widely disseminated. Thus, many food products contain NMs that are likely to be consumed by humans. It is therefore essential to ensure that these ingested NMs do not produce adverse effects, namely genotoxicity which is related to carcinogenesis. In this study, we intended to evaluate a possible association between the physicochemical properties of NMs with the same chemical constitution, titanium dioxide (TiO₂), and their biological effects on human cells and, on the other hand, to identify the properties that determine their toxicity. For this purpose, the cytotoxicity of a set of four TiO₂ NMs was analysed and the results showed that only one of them was able to induce cell death. Regarding the genotoxic effects, although none of them induced chromosomal changes (micronucleus assay), the NMs in the anatase (but not rutile) crystalline form were able to induce DNA damage (comet assay). In the latter assay the existence of an inverse correlation between the NM size in culture medium and its genotoxicity was also verified. In the future, we will investigate the effect of the digestion process on the characteristics of these NMs, as well as on their genotoxic effects *in vitro*, with the goal of translating the results into potential implications for human health.

_Introdução

A tecnologia baseada nos nanomateriais (NMs) é uma tecnologia-chave facilitadora, com potencial para melhorar a qualidade de muitos tipos de produtos e processos com aplicações variadas, designadamente, na agricultura e na indústria alimentar (1). Muitos produtos de consumo atualmente disponíveis contêm NMs, por exemplo, na forma de nano-encapsulados ou de aditivos alimentares com dióxido de titânio (TiO₂) ou sílica amorfa sintética na forma nanoparticulada (1). Para além destes, muitos outros NMs estão em desenvolvimento, como a nanocelulose (2) e nanoformulações de pesticidas (3). A exposição humana a NMs por via oral pode ocorrer quer diretamente, através do consumo de produtos ou medicamentos que os contêm, quer indiretamente, através da ingestão de alimentos contaminados com NMs provenientes do meio ambiente ou cedidos por materiais de embalagem (4).

Uma das maiores preocupações para a saúde pública assenta no facto de alguns dos NMs ingeridos poderem produzir efeitos adversos (*Adverse Outcome*, AO) no organismo, tais como genotoxicidade, que se relaciona com o seu potencial de induzir o desenvolvimento de processos cancerígenos. Embora os potenciais efeitos deletérios dos NMs tenham sido alvo de investigação alargada nos últimos anos, os resultados gerados têm sido contraditórios, possivelmente devido a diferenças nas suas propriedades físico-químicas primárias que influenciam a sua toxicidade, ou nos testes e condições experimentais utilizados. Para além desses fatores, deverá ter-se ainda em conta que as propriedades dos NMs podem ser modificadas por influência da matriz circundante, por exemplo, o seu conteúdo em proteínas, sendo que as denominadas propriedades secundárias dos NMs são, por esse motivo, consideradas como dependentes do contexto (5).

_Objetivo

O presente estudo integra-se no Projeto INGESTnano, recentemente iniciado, cujo objetivo principal consiste em investigar as interações nano-bio através da elucidação de acontecimentos-chave ao nível celular e molecular despoletados por NMs de dióxidos de titânio (TiO_2) utilizados em alimentos – na cadeia de relação entre a exposição e o AO, de acordo com o enquadramento perspetivado pelo “Adverse Outcome Pathway” da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico OCDE (6). Assim, pretende-se avaliar se NMs com a mesma constituição química, mas propriedades físico-químicas distintas, podem produzir efeitos biológicos distintos em células humanas e identificar qual/ quais dessas propriedades serão determinantes para o efeito toxicológico observado.

_Materiais e métodos

Selecionou-se um grupo de nanomateriais de TiO_2 (fornecidos pelo *Joint Research Centre*, JRC: NM-101, NM-102; ou *Fraunhofer Institute*: NM-100, NM-103) de propriedades físico-químicas previamente descritas (7). Dispersaram-se estes NMs em meio aquoso (8), analisou-se a distribuição de tamanhos dos NMs nesse meio por *dynamic light scattering* (DLS). Expuseram-se as células humanas aos NMs para análise dos

efeitos citotóxicos (ensaio MTT) e genotóxicos *in vitro* (ensaio do cometa e ensaio do micronúcleo), conforme descrito em Louro *et al.* (2019) (9).

_Resultados e discussão

A análise da dispersão dos NMs demonstrou que, para todos os NMs à exceção do NM-103, se obtiveram dispersões homogêneas, mesmo após diluição em meio de cultura onde, para além das partículas, se detetaram também agregados do NM (10).

Por sua vez, através do ensaio do MTT não se verificou alteração da viabilidade celular, após exposição a cada NM durante 24h, com exceção do NM-102 que induziu morte celular em relação direta com a sua concentração no meio de cultura (gráfico 1). Embora não se tenham também observado alterações nos cromossomas, isto é, efeitos clastogénicos/aneugénicos, através do ensaio do micronúcleo (9), o ensaio do cometa permitiu a deteção de lesões na molécula do DNA, em células expostas apenas durante 3h aos NMs na forma cristalina anatase (NM-100, NM-101 e NM-102), mas não nas expostas à forma rutilo (NM-103; gráfico 2). Assim, a fase cristalina do NM de TiO_2 poderá ser determinante do seu efeito genotóxico, no que diz respeito à indução de quebras de cadeia dupla e simples no DNA.

Gráfico 1: Efeitos citotóxicos dos NMs de TiO_2 em estudo, expressos em termos da viabilidade celular relativa ao valor do controlo, caracterizados através do ensaio de MTT em células expostas por 24h.

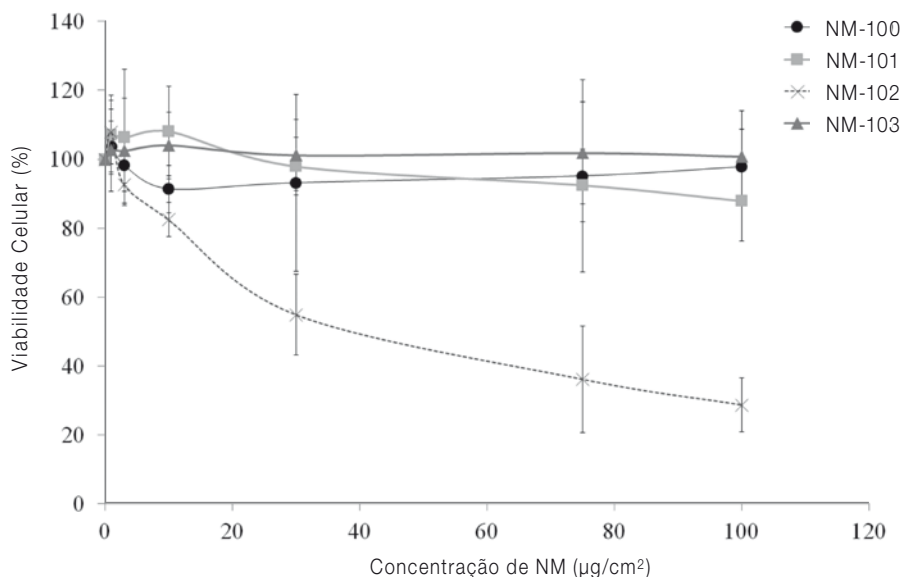
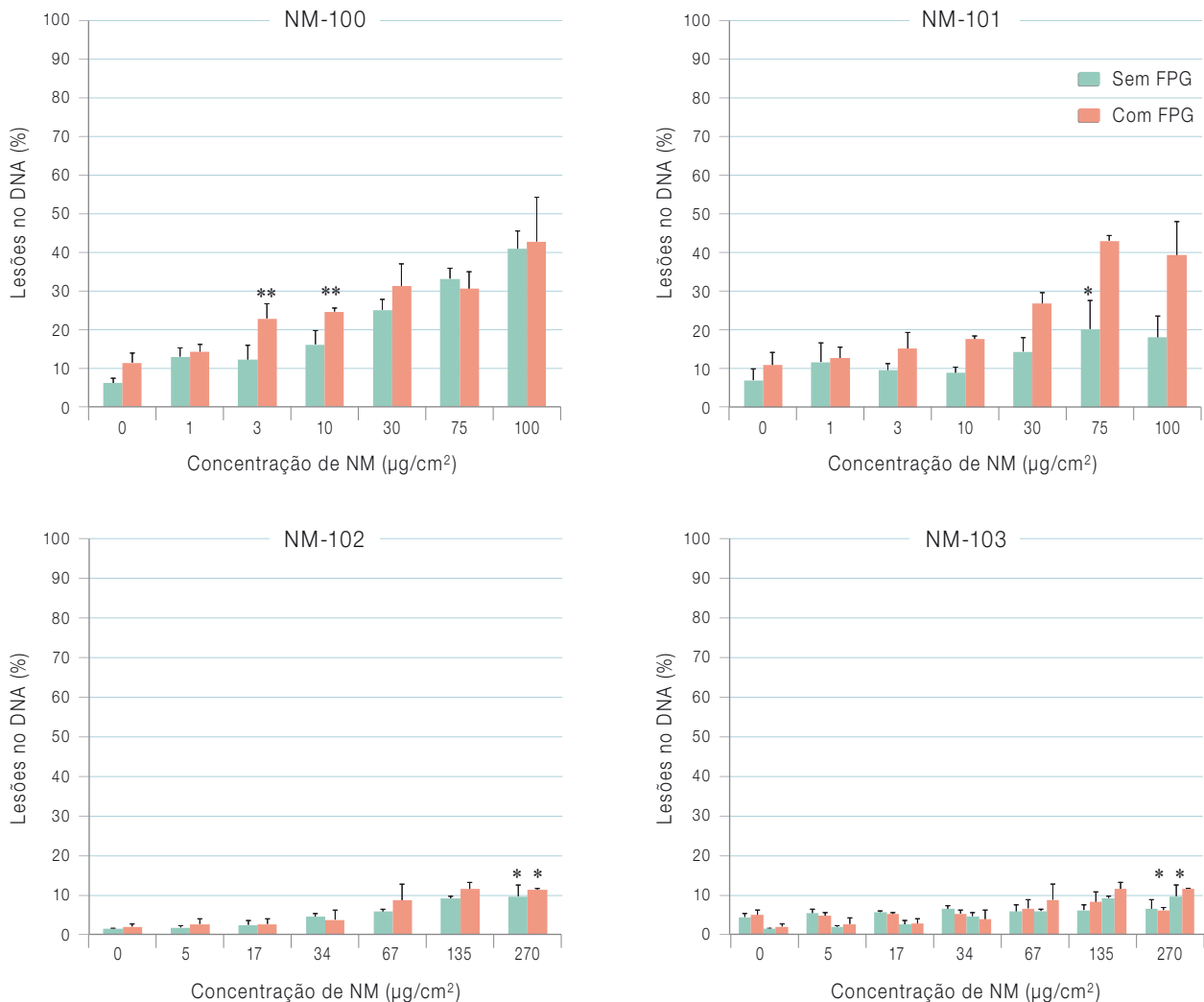


Gráfico 2: ↓ Lesões no DNA (quebras de cadeia simples e dupla) quantificadas através do ensaio do cometa em células expostas por 3h a cada NM de TiO₂.



FPG - enzima formamidopirimidina DNA glicosilase que permite a deteção de lesões oxidativas no DNA.

* Significativamente diferentes do controlo (p < 0,05); ensaio sem FPG; ** Significativamente diferentes do controlo: ensaio com FPG.

No entanto, uma exposição de 24h não evidenciou lesões significativas no DNA, possivelmente devido à reparação das lesões imediatamente induzidas (detetadas às 3h de exposição), através da atuação dos mecanismos de reparação nesta janela temporal.

A aplicação de uma análise de correlação entre as propriedades físico-químicas de cada NM e os seus efeitos genotóxicos (quebras no DNA) sugeriu que o tamanho médio dos NMs em meio de cultura, um meio complexo com elevado conteúdo proteico, se relaciona inversamente com a sua genotoxici-

dade, podendo considerar-se também como um determinante relevante da genotoxicidade de cada NM ($r=0.721$, $p=0.004$; análise de correlação de Pearson). Nesta perspetiva, um aumento do tamanho médio dos NMs de TiO₂, favorecerá a sua segurança.

Futuramente, os novos estudos a desenvolver incluirão a aplicação de um modelo de digestão simulada (11) para investigar o efeito do processo de digestão nas características dos NMs de TiO₂, bem como nos seus efeitos genotóxicos in vitro, por forma a inferir as suas implicações na saúde humana.

Agradecimento:

Trabalho realizado com o apoio financeiro da FCT/MCTES através de fundos nacionais (PIDDAC), PTDC/SAU-PUB/29481/2017 e através do Centre for Toxicogenomics and Human Health (ToxOmics), UID/BIM/00009/2013.

Referências bibliográficas:

- (1) Peters R, Weigel S, Marvin H, et al. Inventory of Nanotechnology applications in the agricultural, feed and food sector. Parma: European Food Safety Authority, 2014. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2014.EN-621>
- (2) Gómez HC, Serpa A, Velásquez-Cock J, et al. Vegetable nanocellulose in food science: a review. *Food Hydrocoll.* 2016. 57:178-86. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.01.023>
- (3) Kumar S, Bhanjana G, Sharma A, et al. Development of nanoformulation approaches for the control of weeds. *Sci Total Environ.* 2017;586:1272-78.
- (4) Mercier-Bonin M, Despax B, Raynaud P, et al. Mucus and microbiota as emerging players in gut nanotoxicology: The example of dietary silver and titanium dioxide nanoparticles. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2018;58(6):1023-32.
- (5) Lynch I, Weiss C, Valsami-Jones E. A strategy for grouping of nanomaterials based on key physico-chemical descriptors as a basis for safer-by-design NMs. *Nano Today.* 2014;9(3):266-70.
- (6) Organisation for Economic Cooperation and Development. Users' Handbook supplement to the Guidance Document for developing and assessing Adverse Outcome Pathways. Paris: OCDE, 2016. <https://dx.doi.org/10.1787/5jiv1m9d1g32-en>
- (7) Rasmussen K, Mast J, Temmerman P, et al. Titanium Dioxide, NM-100, NM-101, NM-102, NM-103, NM-104, NM-105: characterisation and Physico- Chemical Properties. Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2014. <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/titanium-dioxide-nm-100-nm-101-nm-102-nm-103-nm-104-nm-105-characterisation-and-physico>
- (8) Jensen KA, Kembouche Y, Christiansen E, et al. Final protocol for producing suitable manufactured nanomaterial exposure media: report. NANOGENOTOX Joint Action, 2011. https://www.anses.fr/en/system/files/nanogenotox_deliverable_5.pdf
- (9) Louro H, Saruga A, Santos J, et al. Biological impact of metal nanomaterials in relation to their physicochemical characteristics. *Toxicol In Vitro.* 2019;56:172-183.
- (10) Louro H. Relevance of Physicochemical Characterization of Nanomaterials for Understanding Nano-cellular Interactions. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1048:123-42.
- (11) Brodkorb A, Egger L, Alminger M, et al. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nat Protoc.* 2019;14(4):991-1014.