Forschung zu Silika in Lebensmitteln – Ergebnisse aus der Analytik und Forschungsbedarf

Prof. Dr. Doris Marko

Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie
Fakultät für Chemie
Universität Wien

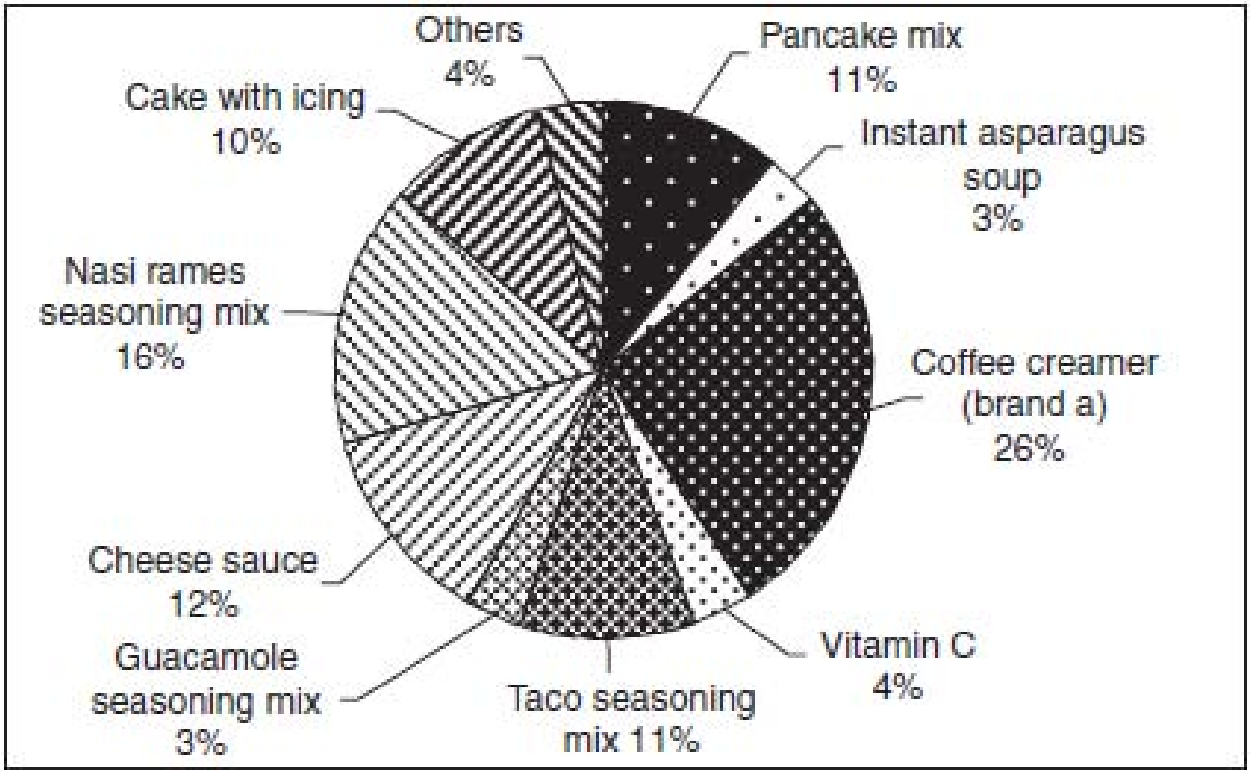
Silika-Nanopartikel in Nahrungsmittelindustrie

- Siliziumdioxid in Lebensmitteln

  - RL Nr. 95/2/EG: **SiO_2 → ”E551”**
  - zugelassen mit bis zu 10 g/kg z. B. in
    - Rieselhilfsmittel in Salz, Gewürzen
    - Trockenlebensmittel in Pulverform (z. B. Instant-Suppen)
    - Schnitt- und Reibekäse

  - Nanofiltration zur Reduktion unerwünschter Verbindungen (Klärung von Wein und Bier)
  - Kontaktoberflächen und Verpackungen von Lebensmitteln

Silika-Nanopartikel in Nahrungsmittelindustrie



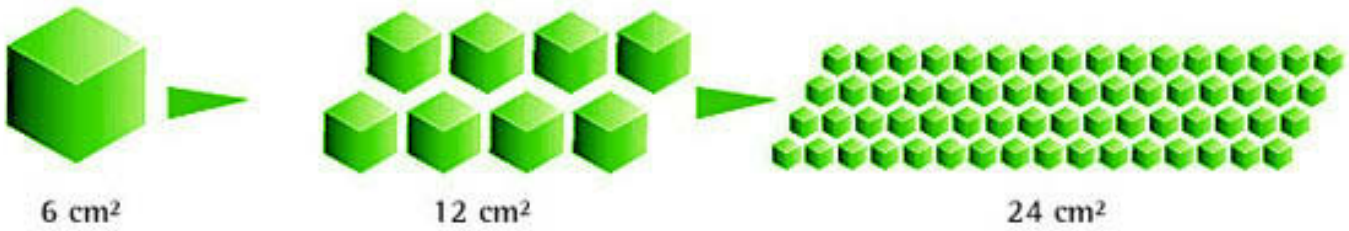
Dekkers *et al.* 2011: (Rounded) percentage contribution of each product to the total nanosilica exposure. The slice others contains products that contribute less than 3% (each).

Dekkers et al. (2011). "Presence and risks of nanosilica in food products." Nanotoxicology **5**(3): 393-405.

Silika-Nanopartikel in Nahrungsmittelindustrie

- Materialien verändern ihre Eigenschaften im Nanometerbereich
- stark vergrößerte Oberfläche mit Abnahme des Partikeldurchmessers

  - erhöhte Reaktivität
  - erhöhte Bioverfügbarkeit



Oberflächenvergrößerung bei gleich bleibendem Gesamtvolumen (BUND)

- spezifische Oberfläche

  - Partikel chemisch gleicher Zusammensetzung weisen ein unterschiedliches toxikologisches Profil auf

BUND: https://www.nanoportal-bw.de/pb/,Lde/242518.html; 15.06.2015

Silika-Nanopartikel in Nahrungsmittelindustrie

- erfasste toxische Effekte stark abhängig von (Mu *et al*. 2012; Tarantini *et al*. 2015, Fruijtier-Pölloth 2012)
    - Partikel-Größe, -Oberfläche, -Protein-Corona
    - umgebendes biologisches Milieu
    - Inkubationskonzentration, -zeit
- VO (EU) Nr. 1169/2011: seit 13.12.2014: **SiO_2 NPs → "E551 (nano)"**
- **Zentrale Fragen:**
    - Suspensions- und Agglomerationverhalten
    - Freisetzung von SiO_2 NPs aus Lebensmitteln
    - **Bioverfügbarkeit**
    - **Biologische/toxikologische Wirkung??**

Fruijtier-Polloth, C. (2012). "The toxicological mode of action and the safety of synthetic amorphous silica-a nanostructured material." Toxicology **294**(2-3): 61-79.
Mu et al. (2012). "Mechanism of cellular uptake of genotoxic silica nanoparticles." Part Fibre Toxicol **9**: 29.
Sabella et al. (2014). "A general mechanism for intracellular toxicity of metal-containing nanoparticles." Nanoscale.
Tarantini et al. (2015). "Toxicity, genotoxicity and proinflammatory effects of amorphous nanosilica in the human intestinal Caco-2 cell line." Toxicology in Vitro **29**(2): 398-407.
Yang et al. (2013). "Evaluation of the toxicity of food additive silica nanoparticles on gastrointestinal cells." J Appl Toxicol.

Toxizitätsstudien nach oraler Exposition

Fröhlich & Roblegg 2012:

- Einflüsse auf Nanopartikel-Aufnahme sehr komplex aufgrund Unterschiede in:
  - Ernährung
  - Mucus-Dicke, -Zusammensetzung, -Sekretion
  - pH-Wert
  - GIT Transitzeit
  - GIT-Flora

- Nanopartikel können:
  - selbst aufgenommen werden
  - Permeation anderer Substanzen erhöhen od. verringern durch Absorption dieser
    - ➢ Resorption unverdauter bzw. nicht-metabolisierter Substanzen vom GIT
    - ➢ Hinderung der Aufnahme notwendiger Substanzen

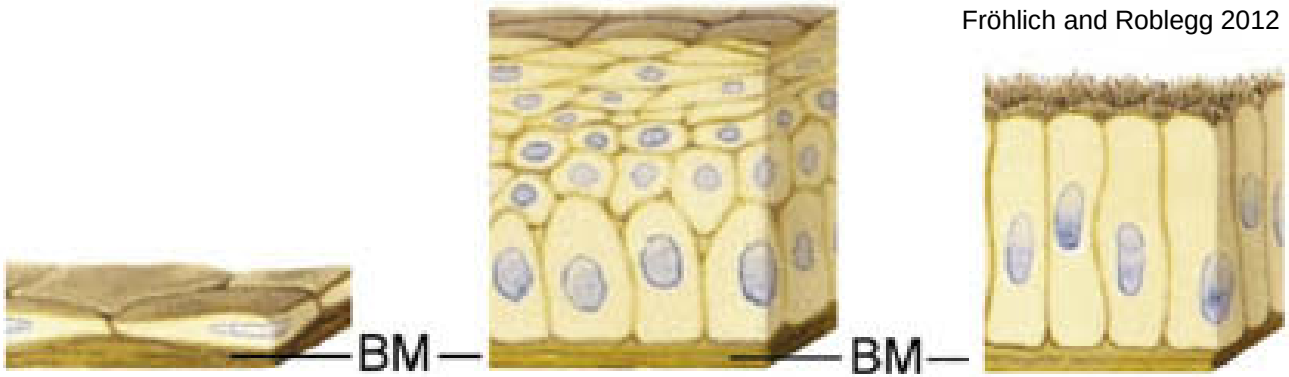
Frohlich, E. and E. Roblegg (2012). "Models for oral uptake of nanoparticles in consumer products." Toxicology **291**(1-3): 10-17.

Orogastrointestinale Permeation

Fröhlich & Roblegg 2012:

- Epithelgewebe bietet größten Widerstand gegen die Passage von Substanzen und Nanomaterialen
- Epithelgewebe des Orogastrointestinaltrakts deutlich dicker als andere Epithele + Mucus

Fröhlich and Roblegg 2012



Einschichtiges Plattenepithel in Blutgefäßen

Mehrschichtiges Plattenepithel in Mundhöhle und Ösophagus

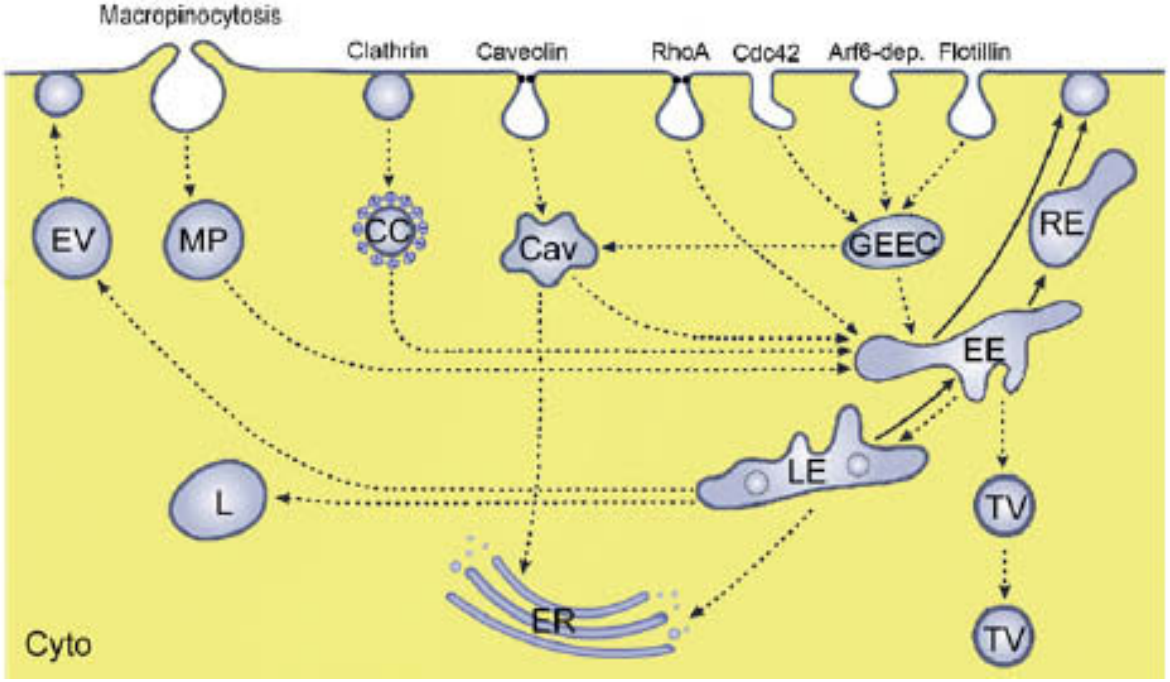
Einfaches Zylinderepithel in Magen, Dünn- und Dickdarm

Frohlich, E. and E. Roblegg (2012). "Models for oral uptake of nanoparticles in consumer products." Toxicology **291**(1-3): 10-17.

Orogastrointestinale Permeation

Fröhlich & Roblegg 2012:

- Aktive Aufnahme-Mechanismen von Nanomaterialen in Zellen:
  - Makropinozytose
  - Clathrin- oder Caveolae-gesteuerte Endozytose
  - Nicht-Clathrin- oder Nicht-Caveolae-gesteuerte Aufnahme



MP: Makropinosomen
CC: Clathrin-coated Vesikel
EE: frühe Endosomen
LE: späte Endosomen
L: Lysosomen
Cav: Caveolosomen
ER: Endoplasmatische Retikulum
EV: Exozytotische Vesikel
RE: Recycling-Endosomen
TV: Transport-Vesikel

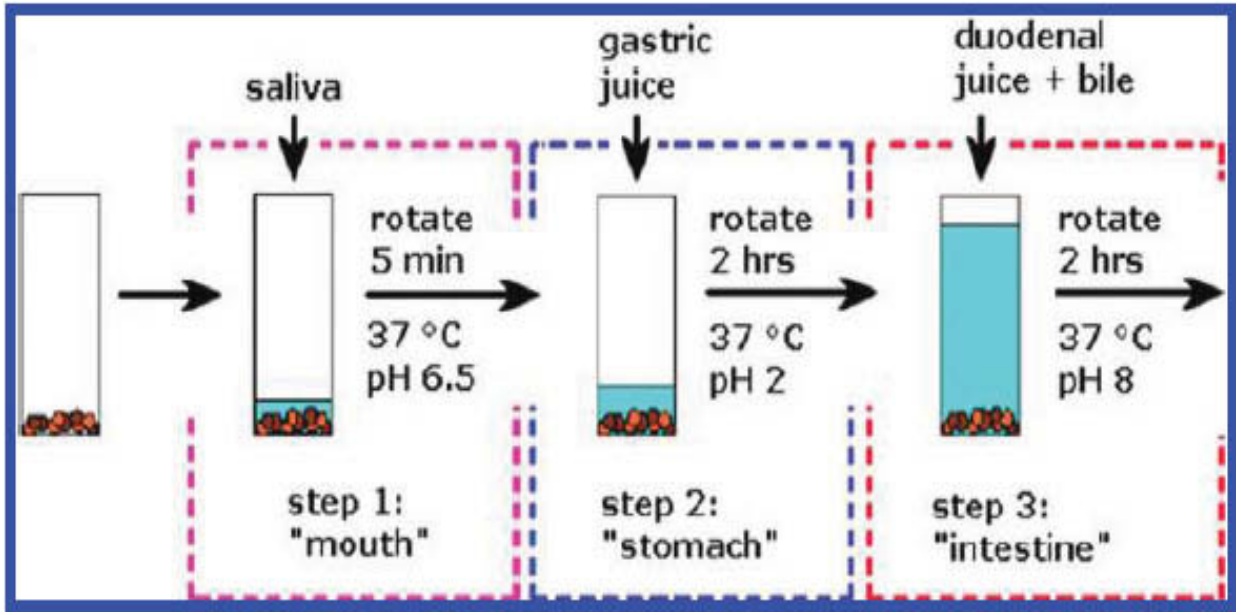
Fröhlich and Roblegg 2012

Frohlich, E. and E. Roblegg (2012). "Models for oral uptake of nanoparticles in consumer products." Toxicology **291**(1-3): 10-17.

Verhalten von LM-Nanosilika im Verdauungstrakt

Peters *et al.* 2012: *in vitro* Nachahmung der menschlichen Verdauung

- Untersuchung verschiedener LM mit E551 als Additiv in verschiedenen Verdauungsstufen
  - Kaffee mit Kaffeeweißer
  - Instant-Suppe
  - Pancakes



Schematic presentation of the *in vitro* digestion procedure. Peters *et al.* 2012

Peters et al. (2012). "Presence of nano-sized silica during in vitro digestion of foods containing silica as a food additive." ACS Nano **6**(3): 2441-2451.

Verhalten von LM-Nanosilika im Verdauungstrakt

Peters *et al.* 2012: *in vitro* Nachahmung der menschlichen Verdauung

- **Magen:**
  - keine SiO_2 NPs aus Kaffee od. Instant-Suppen detektierbar, geringe Mengen bei Pancakes
  - Vermutete Ursachen → geringer pH + hohe Elektrolytkonzentration
  - Ausbildung großer Partikel-Agglomerate und –Aggregate

- **Darm:**
  - Erhöhung des pH-Wert
  - Wiederauftreten der SiO_2 NPs sogar in höheren Mengen als im Mundmodell

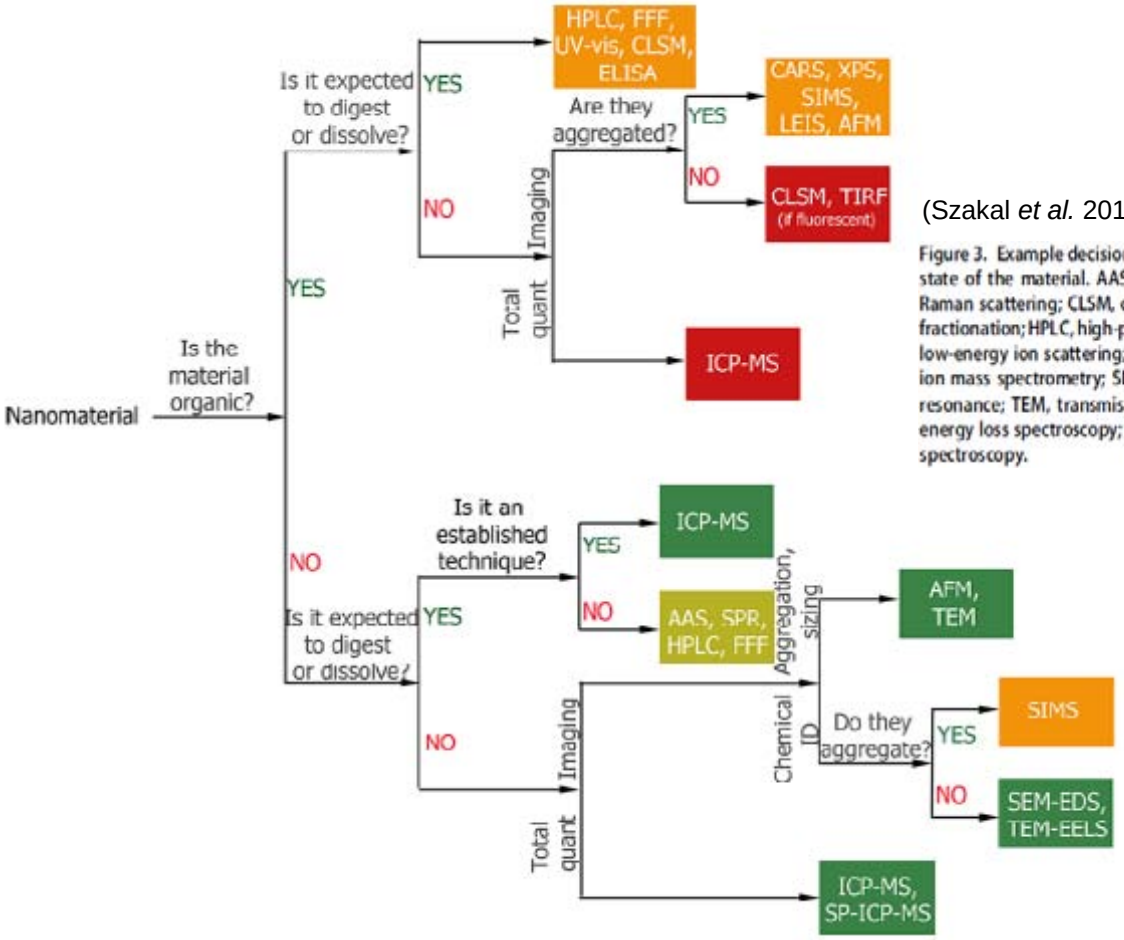
- Anteil nanoskaliges Silika nach vollständiger Verdauung:
  - Kaffee: ca. 80%
  - Suppe u. Pancakes: ca. 15% (mehr partikuläres + faserförmiges Silika enthalten)

→ **nach Verzehr von E551-haltigen Lebensmittelnscheint am ehesten das Darmepithel SiO_2 NPs ausgesetzt zu sein**

Peters et al. (2012). "Presence of nano-sized silica during in vitro digestion of foods containing silica as a food additive." ACS Nano **6**(3): 2441-2451.

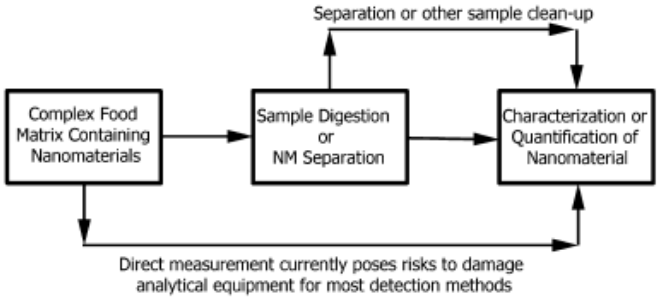
Forschung zu Silika in Lebensmitteln – Ergebnisse aus der Analytik und Forschungsbedarf

Erfassung von Nanomaterial in Lebensmitteln



(Szakal *et al.* 2014)

Figure 3. Example decision tree for the selection of analysis methods for nanomaterials in foods depending on the type and state of the material. AAS, atomic absorption spectroscopy; AFM, atomic force microscopy; CARS, coherent anti-Stokes Raman scattering; CLSM, confocal laser scanning microscopy; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FFF, field flow fractionation; HPLC, high-performance liquid chromatography; ICP-MS, inductively coupled plasma mass spectrometry; LEIS, low-energy ion scattering; SEM-EDS, scanning electron microscopy with energy-dispersive spectroscopy; SIMS, secondary ion mass spectrometry; SP-ICP-MS, single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry; SPR, surface plasmon resonance; TEM, transmission electron microscopy; TEM-EELS, transmission electron microscopy coupled with electron energy loss spectroscopy; TIRF, total internal reflection fluorescence; UV–vis, ultraviolet–visible; XPS, X-ray photoelectron spectroscopy.



Strategie zur Methodenentwicklung zur Detektion oder Quantifizierung von Nanomaterial (NM) in komplexen Nahrungs- und biologischen Matrices (Szakal *et al.* 2014)

Szakal, C., S. M. Roberts, et al. (2014). "Measurement of nanomaterials in foods: integrative consideration of challenges and future prospects." ACS Nano **8**(4): 3128-3135.

Forschung zu Silika in Lebensmitteln – Ergebnisse aus der Analytik und Forschungsbedarf

Resorption von LM-Nanosilika

Dekkers *et al.* 2011: Risikobewertung anhand Vorkommen, Partikelgröße- u. Konzentration

- Verwendung experimentell-analytischer Daten zur Abschätzung der Aufnahme von Nano-Silika aus LM
- **Problem:** GIT-Absorption von Nano-Silika unklar
- **Lösungansätze:**
  a) SiO_2 Partikel Absorption in gelöster Form basierend auf Tox-Daten der Nicht-Nanoform → keine adversen Effekte erwartet
  b) Absorption von SiO_2 in Partikelform basierend auf Tox-Date der Nanoform → zu viele Unsicherheiten für angemessene Risikobewertung

HDC-ICPMS zur Bestimmung von Partikelgröße und –konzentration von SiO_2 NPs

- <0.1-1.0 mg/g
- 50-200 nm

Table I. Silica and nanosilica concentration in food products with and without E551. Peters *et al.* 2012

Code	Product description	Total silicon in mg/g	Total silica* in mg/g	Nanosilica in mg/g (50–200 nm)	Percentage silica in nano-form
Products with E551					
F1	Mix for lasagne sauce	2.5	5.4	0.3	5%
F2	Instant noodles	-	-	<0.1	-
F3	Minced meat seasoning mix	1.2	2.6	0.2	7%
F4	Pancake mix	1.3	2.8	<0.1	<4%
F5	Instant asparagus soup	0.3	0.6	0.2	33%
F6	Spicy pepper rub	0.5	1.1	<0.1	<12%
F7	Sweets sticky rub	2.8	6.0	0.4	7%
F8	Steak house rub	2.0	4.3	0.2	4%
F9	Roasted vegetable rub	2.3	4.9	0.6	12%
F10	Sea food rub	2.2	4.7	0.5	11%
F11	Burrito seasoning mix	3.3	7.1	0.3	5%
F12	Coffee creamer (brand a)	2.4	5.1	1.0	19%

*Total silica (SiO_2, molecular weight 60 g/mol) was calculated from the total silicon content (Si, molecular weight: 28 g/mol) by multiplying with 60/28. - Not measured.

Dekkers et al. (2011). "Presence and risks of nanosilica in food products." Nanotoxicology **5**(3): 393-405.

Resorption von LM-Nanosilika

Dekkers *et al.* 2011: Risikobewertung anhand Vorkommen, Partikelgröße- u. Konzentration

- Expositionsabschätzung:

Table II. Estimated intake of nanosilica based on consumption of food products analysed for their nanosilica (F1–F12) or silica (F13–F27) concentration.

Code*	Food product	Mean concentration (mg nanosilica/g powder)**	Portion size (g powder/ portion)	Exposure per portion (mg nanosilica/portion)	Consumption (portion/day)	Exposure per day (mg nanosilica/day)
F1	Mix for lasagne sauce	0.3	32.5	8.5	0.2	1.7
F2□	**Instant noodles**	0.1	20	2.0	1	2.0
F3	Minced meat seasoning mix	0.2	10	1.7	0.2	0.3
F4	Pancake mix	0.1	133.3	13	1	13
F5▫	**Instant asparagus soup**	0.2	20	4.2	1	4.2
F6•	Spicy pepper rub	0.1	3	0.39	0	
F7•	Sweets sticky rub	0.4	3	1.3	0	
F8•	Steak house rub	0.2	3	0.57	0	
F9•	**Roasted vegetable rub**	0.6	3	1.7	0.2	0.3
F10•	Seafood rub	0.5	3	1.6	0	
F11	Burrito seasoning mix	0.3	13.3	3.9	0.2	0.8
F12a◇	**Coffee creamer (brand a)*** **	2.2	2.5	5.5	6	33

Peters *et al.* 2012

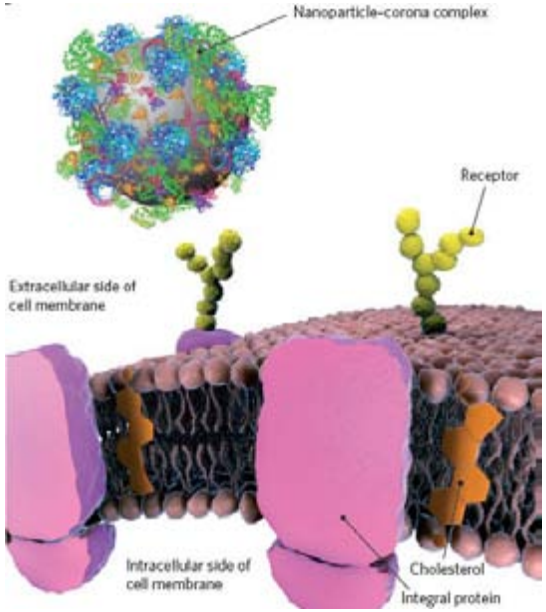
- Kinetik:
  - Mechanismen der GIT-Absorption von Nicht-Nano-Silika unklar
  - Exkretion v. a. via Urin, teilweise via Faeces
  - Fütterungsstudien an Nagern: Nano-Silika scheint nach oraler Aufnahme tw. bioverfügbar zu sein u. kann zu toxischen Effekten in der Leber führen
  - unklar welche Form absorbiert wird (NPs, gelöst oder beides)

Dekkers et al. (2011). "Presence and risks of nanosilica in food products." Nanotoxicology **5**(3): 393-405.

Protein-Corona

- Nanopartikel werden nach Kontakt mit biologischen Medien, z. B. Zellserum, durch Proteine beeinflusst
  - Ausbildung einer Protein-Schicht (Corona) auf der Partikeloberfläche
  - Änderung der physiko-chemischen Eigenschaften von Partikeln

- Beeinflussung der Interaktionen mit Zellen:
  - serumfreie SiO_2 NPs zeigen stärkere Zellmembran-Adhesion und höhere Internalisierung-Effizienz im Vergleich zu Prä-formierten Coronen aus serumhaltigen Medium (Lesniak *et al.* 2012)
  - Reduktion adverser Effekte von SiO_2 NPs infolge einer Corona-Ausbildung (Docter *et al.* 2014)



Monopoli *et al.* 2012

Lesniak et al. (2012). "Effects of the presence or absence of a protein corona on silica nanoparticle uptake and impact on cells." ACS Nano **6**(7): 5845-5857.
Docter, D., C. Bantz, et al. (2014). "The protein corona protects against size- and dose-dependent toxicity of amorphous silica nanoparticles." Beilstein J Nanotechnol **5**: 1380-1392.
Monopoli, M. P., C. Aberg, et al. (2012). "Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials." Nat Nanotechnol **7**(12): 779-786.

Protein-Corona

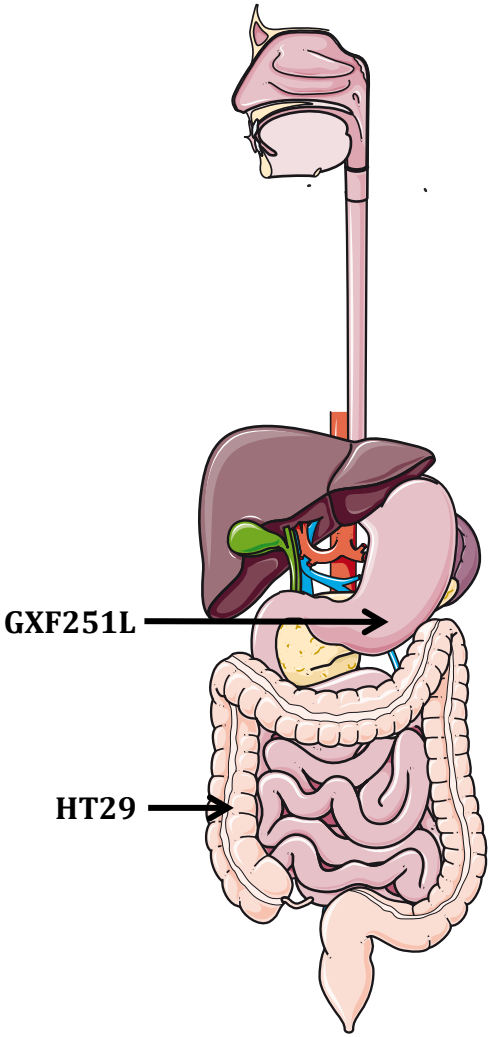
- Aerosil ® 200 F (12 nm SiO_2 NPs) und Aerosil ® Ox50 (40 nm SiO_2 NPs) in humanem Plasma:
  - zeitlich stabile Protein-Corona
  - unterschiedliches Protein-Bindungs-Muster
  - Apolipoprotein A1 und Fibrogen mit hohen Affinität zu SiO_2 NPs (wichtig wenn Partikel in den Blutkreislauf gelangen)
  - Oberflächen-Chemie beeinflusst deutlich die Protein-Bindungs-Menge und -Zusammensetzung (hydrophile Metalloxide binden deutlich weniger Proteine als hydrophobe NPs)

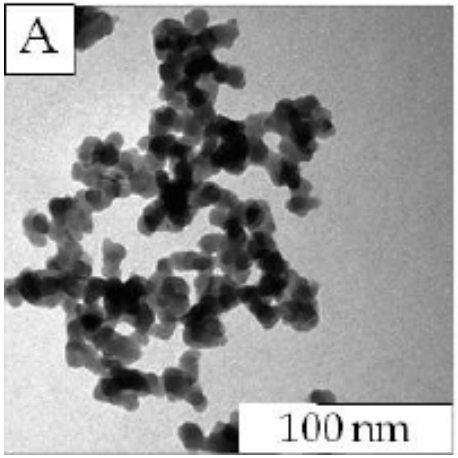
→ Variation der Corona in Abhängigkeit der NP Oberflächen-Chemie

→ muss individuell für jedes Nanomaterial erfasst werden

Ruh et al. (2012). "Identification of serum proteins bound to industrial nanomaterials." Toxicol Lett **208**(1): 41-50.

Zelluläre Aufnahme





Gehrke *et al.* 2013

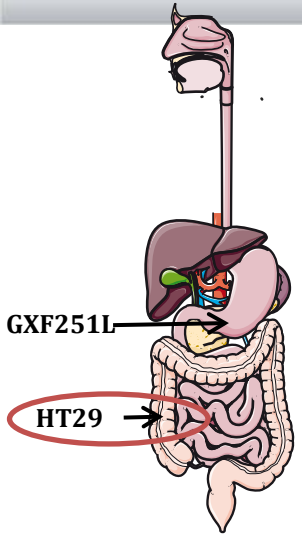
(A) TEM Aufnahmen der Aerosil® 200 F Silika-Nanopartikel

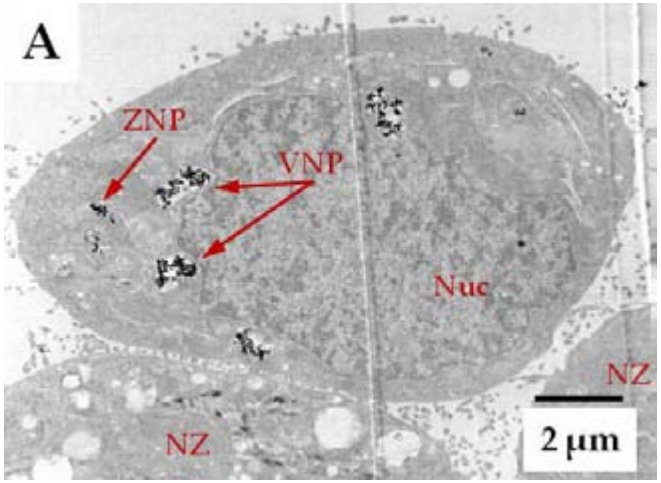
- zugelassen für Lebensmittel
- nominaler primärer Durchmesser: 12 nm
- Ausbildung von Agglomeraten/ Aggregaten

Gehrke et al. (2013). "In vitro toxicity of amorphous silica nanoparticles in human colon carcinoma cells." Nanotoxicology **7**(3): 274-293.

Forschung zu Silika in Lebensmitteln – Ergebnisse aus der Analytik und Forschungsbedarf

Zelluläre Aufnahme





Diss. H. Gehrke 2012 (Aufnahme: Laboratorium für Elektronenmikroskopie, KIT)

(A) STEM-BF Aufnahmen von 12nm SiO_2-NP in HT29

- 31,3 µg/cm² ≡100 µg/ml
- 10 % FKS-haltiges DMEM
- 24 h

ZNP: Nanopartikel im Zytosol

VNP: Nanopartikel in Vesikeln

Nuc: Zellnukleus

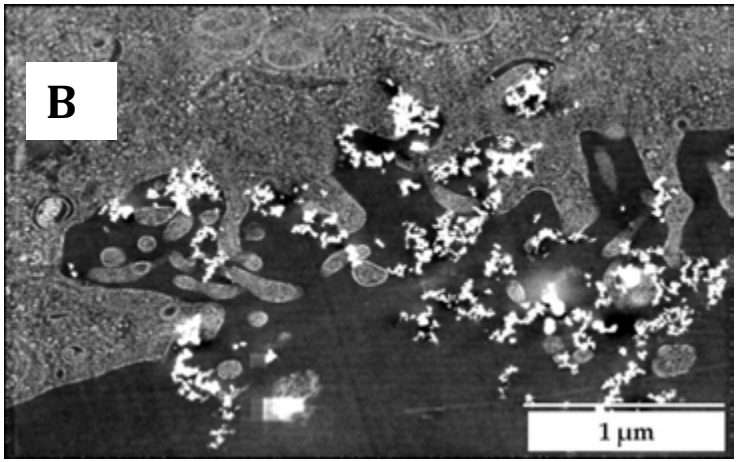
NZ: Nachbarzelle

(B) STEM-HADDF Aufnahmen von 12nm SiO_2-NP in HT29

- 31,3 µg/cm² ≡100 µg/ml
- 1 % FKS-haltiges DMEM
- 24 h

multiple Einstülpungen der Zellmembran

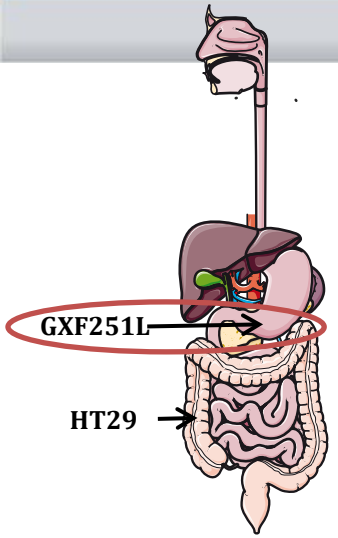
zelluläre Aufnahme agglomerierter/aggregierter SiO_2-NP



Diss. H. Gehrke 2012 (Aufnahme: Laboratorium für Elektronenmikroskopie, KIT)

Gehrke, H. (2012). Biologische Wirkungen metallischer und nicht-metalloxidischer Nanopartikel in Zellen des Gastrointestinaltrakts. Department of Food Chemistry and Toxicology, University of Vienna.

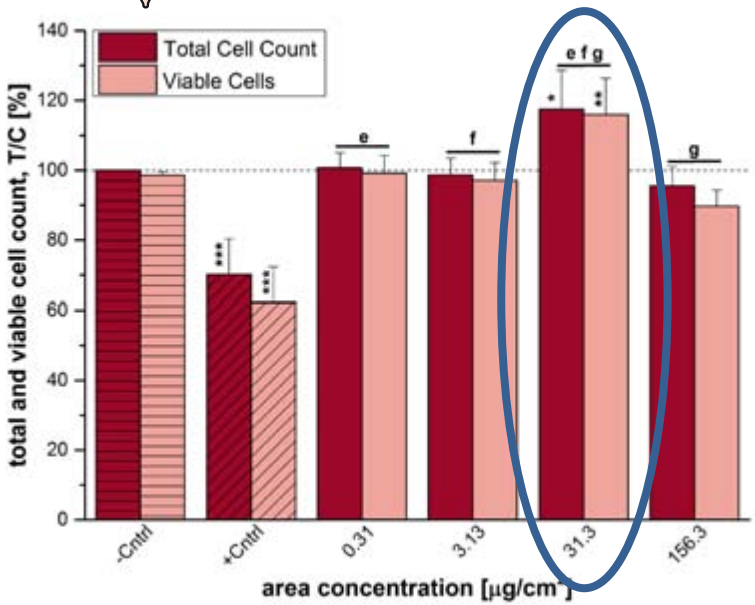
Forschung zu Silika in Lebensmitteln – Ergebnisse aus der Analytik und Forschungsbedarf

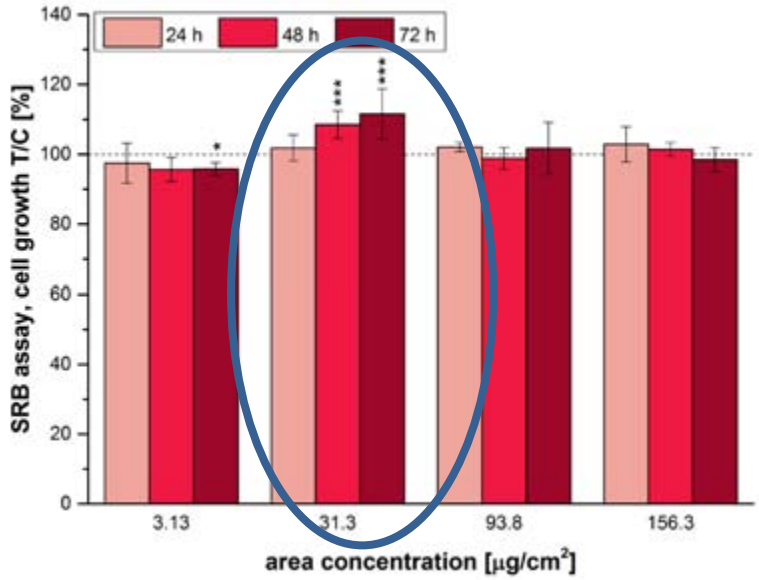


Zytotoxizität und Zellviabilität

(Gehrke *et al.* 2013;
Wittig *et al.* 2015 in prep.)

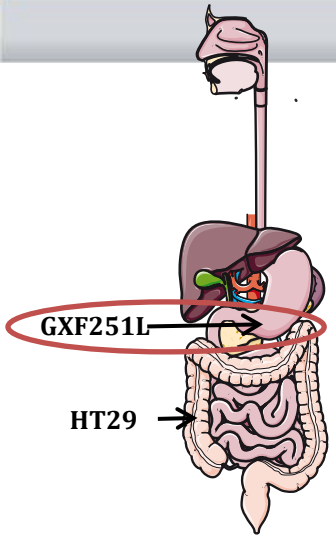
- **zelluläre Aufnahme** der Partikel
- keine Zytotoxizität
- keine ROS-Bildung
- **Zellwachstum** aufgrund von **Zellproliferation**
- **Beeinflussung** von **zellproliferations-stimulierenden Signalkaskaden**



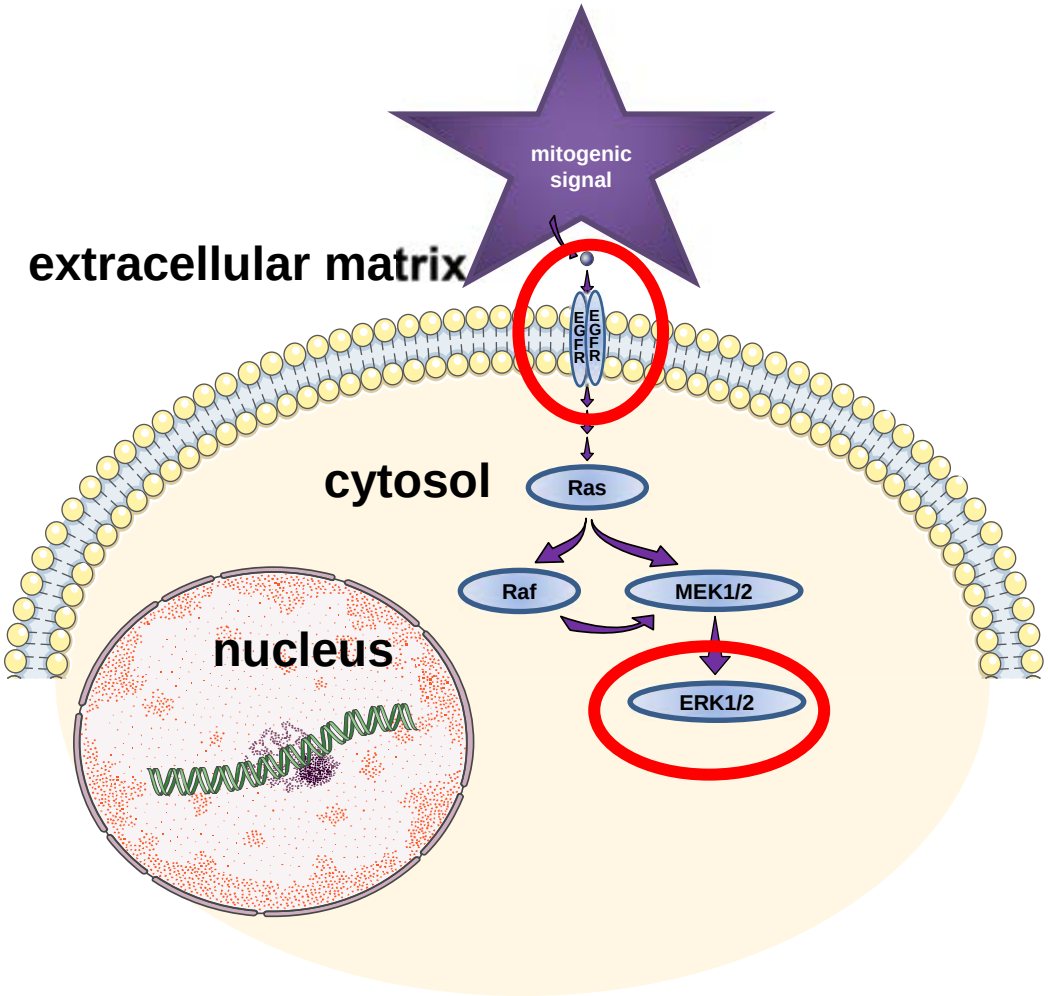


Gehrke et al. (2013). "In vitro toxicity of amorphous silica nanoparticles in human colon carcinoma cells." Nanotoxicology **7**(3): 274-293.
Wittig et al (2015). "Amorphous silica nanoparticles relevant in food industry influence cellular growth and associated signaling pathways in human gastric carcinoma cells." in preparation.

Zytotoxizität und Zellviabilität

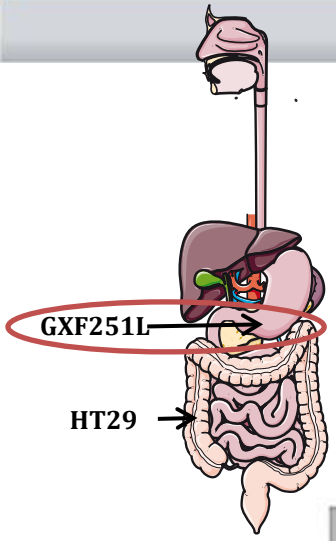


EGFR – ERK1/2 – Signalkaskade



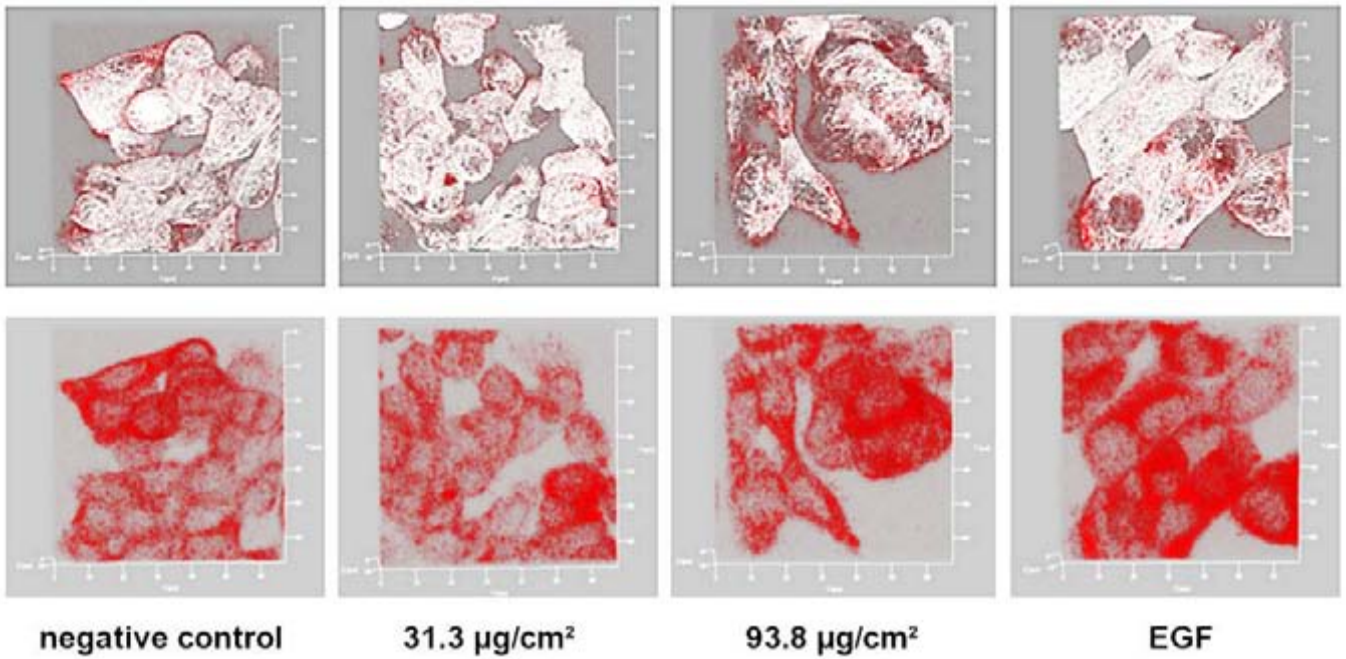
Forschung zu Silika in Lebensmitteln – Ergebnisse aus der Analytik und Forschungsbedarf

Zytotoxizität und Zellviabilität



- Einfluss auf zelluläre Signalkaskaden
- Hypothese: Effekte auf Rezeptor-Trafficking und -Recycling

(Wittig *et al.* 2015 in prep.)



Wittig et al (2015). "Amorphous silica nanoparticles relevant in food industry influence cellular growth and associated signaling pathways in human gastric carcinoma cells." in preparation.

Take home

- Wenn Zellen des Verdauungstraktes in direkten Kontakt mit Nanosilica kommen wird dieses effizient in die Zellen aufgenommen
- Nanosilica hat durchaus zelluläre Wirkungen wenn auch nicht direkte cytotoxische oder genotoxische Wirkungen zu beobachten sind
- Aktuellen Studien weisen auf ein leichte Steigerung des Zellwachstums durch Nanosilica hin
- Verdauungsmodelle lassen vermuten, dass Darmzellen in Kontakt mit Nanosilica kommen können.
- Weitere Forschung zur toxikologischen Relevanz von Nanosilica im Menschen dringend erforderlich

This research received support from the QNano Project http://www.qnano-ri.eu which is financed by the European Community Research Infrastructures under the FP7 Capacities Programme (Grant No. INFRA-2010-262163), and its partner Karlsruhe Institute of Technology KIT."

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!

Dr. Gudrun Pahlke

Dr. Giorgia Del Favero

Dr. Benedikt Warth

Dr. Isabel Groh

Katharina Jarolim

Katharina Vejdovsky

Georg Aichinger

Anja Wittig

Ebru Cenk

Svenja Termeer

Hannes Puntscher

Anika Schroeter

Christine Tiessen

Julia Beisl

Cordula Kohout

Konstantin Wolters

Kathrin Hahn

Lydia Wölflingseder

Eva Attakpah

Heidelinde Schweighofer

Johannes Ernst Seybert