

DOI 10.17590/20211208-150136

Neubewertung von Titandioxid: BfR zieht ähnliche Schlüsse wie die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit

Stellungnahme Nr. 038/2021 des BfR vom 8. Dezember 2021

Die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) hat gesundheitliche Risiken von Titandioxid als Lebensmittelzusatzstoff E 171 neu begutachtet und das Ergebnis am 6. Mai 2021 veröffentlicht. Nach einer systematischen Literaturrecherche wurden insbesondere Studien zu möglichen erbgutschädigenden (genotoxischen) Effekten durch Titandioxid ausgewertet.

Die EFSA kommt zu dem Ergebnis, dass genotoxische Wirkungen von Titandioxid nicht mit hinreichender Sicherheit ausgeschlossen werden können. Als Lebensmittelzusatzstoff könne Titandioxid deshalb nicht mehr länger als sicher angesehen werden. Da für genotoxische Stoffe bislang keine gesundheitlich unbedenkliche Dosis ermittelt wird, konnte entsprechend keine akzeptable tägliche Aufnahmemenge (Acceptable Daily Intake, ADI) für die Substanz abgeleitet werden.

Das BfR hat sich mit den von der EFSA berücksichtigten Daten zur Genotoxizität befasst und zieht überwiegend die gleichen Schlüsse. Allerdings weist das BfR darauf hin, dass für eine abschließende Bewertung noch Wissenslücken bestehen. Bislang ist zum Beispiel unklar, in welchem Ausmaß und auf welche Weise Titandioxid das Erbgut schädigen kann. Welche Rolle spielen die Teilcheneigenschaften, ihre Größe, Form, kristalline Beschaffenheit? Besteht ein Krebsrisiko? Auf diese Fragen müssen noch Antworten gefunden werden.

Siehe auch:

<https://www.bfr.bund.de/cm/343/lebensmittelzusatzstoff-titandioxid-e%20-171-auf-dem-pruefstand.pdf>

1 Bewertungen zur Verwendung von Titandioxid als Lebensmittelzusatzstoff durch die EFSA

Im Jahr 2016 wurde die Verwendung von Titandioxid als Lebensmittelzusatzstoff (E 171) von der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) im Rahmen des Programms zur Neubewertung der zugelassenen Lebensmittelzusatzstoffe gemäß Artikel 32 der Verordnung (EG) Nr. 1333/2008 und der Verordnung (EU) Nr. 257/2010 bewertet. Dabei ging die EFSA davon aus, dass der Lebensmittelzusatzstoff E 171 weniger als 3,2 % Nanopartikel (bezogen auf die Masse) enthielt, und hat daher den Studien mit Titandioxid-Nanopartikeln nur eine begrenzte Relevanz beigemessen. In ihrer Bewertung kam die EFSA zu dem Ergebnis, dass auf der Basis der bis zum Jahr 2016 verfügbaren Informationen zur Genotoxizität und der Daten zur Absorption, Verteilung und Ausscheidung von Titandioxid-Nanopartikeln und -Mikropartikeln ein erbgutschädigendes Potenzial von oral aufgenommenem Titandioxid (in Nano- und Mikro-Form) *in vivo* unwahrscheinlich sei. Insgesamt kam die EFSA zu dem Schluss, dass im Hinblick auf die orale Aufnahme von Titandioxid (E 171) mit Lebensmitteln keine Hinweise auf gesundheitliche Risiken vorlagen (EFSA 2016). Die EFSA wies jedoch auf Datenlücken zur Reproduktionstoxizität und zur Charakterisierung des Lebensmittelzusatzstoffs E 171 hin.

Im Auftrag der Europäischen Kommission hatte die EFSA im Juni 2018 vier neue Studien (Heringa *et al.* 2016; Bettini *et al.* 2017; Guo *et al.* 2017; Proquin *et al.* 2017) zur potenziellen

Toxizität von Titandioxid als Lebensmittelzusatzstoff E 171 bewertet. Aus diesen Daten ergab sich für die EFSA kein Anlass, die Bewertung von 2016 zu revidieren (EFSA 2018).

Im Jahr 2019 hatte die EFSA zu einem Gutachten der Französischen Agentur für Lebensmittelsicherheit, Umwelt- und Arbeitsschutz (ANSES) Stellung genommen. Die EFSA kam zu dem Schluss, dass das im April 2019 veröffentlichte Gutachten der ANSES keine wesentlichen neuen Erkenntnisse enthält, die die Schlussfolgerungen der beiden vorangegangenen wissenschaftlichen Gutachten der EFSA zur Verwendung von Titandioxid als Lebensmittelzusatzstoff E 171 in Frage stellen würden (EFSA 2019a).

In ihrem Gutachten aus dem Jahr 2016 hatte die EFSA empfohlen, die Partikelgrößenverteilung als zusätzlichen Parameter in die Spezifikation für Titandioxid (E171) einzufügen. Im Juni 2019 hatte die EFSA hierzu einen Vorschlag ausgearbeitet. Konkret wurde empfohlen, einen mittels Elektronenmikroskopie bestimmten Median der minimalen äußeren Abmessung von mehr als 100 nm als zusätzlichen Parameter in die Spezifikation für Titandioxid (E171) in den Anhang der Verordnung (EU) Nr. 231/2012 aufzunehmen. Das entspricht einem Anteil von weniger als 50 % an Partikeln mit einer minimalen äußeren Abmessung von weniger als 100 nm (EFSA 2019b). Bislang wurde die Spezifikation im Anhang der Verordnung (EU) Nr. 231/2012 jedoch nicht geändert.

Im März 2020 hat die Europäische Kommission die EFSA gebeten, die von der EFSA 2016 empfohlenen und von der Europäischen Kommission im Januar 2017 geforderten Studien zur Reproduktionstoxizität und Untersuchungen zur Charakterisierung des Lebensmittelzusatzstoffs E 171 bis März 2021 zu bewerten. Die EFSA hat die entsprechende Bewertung im März 2021 abgeschlossen und ihr Gutachten am 6. Mai 2021 veröffentlicht (EFSA 2021). In diesem Gutachten hat die EFSA mögliche gesundheitliche Risiken im Zusammenhang mit der Verwendung von Titandioxid als Lebensmittelzusatzstoff (E 171) auf Basis aller derzeit verfügbaren relevanten wissenschaftlichen Erkenntnisse neu bewertet.

2 Datengrundlage der für die Beurteilung möglicher genotoxischer Effekte relevanten toxikologischen Endpunkte

Im Rahmen der aktuellen Stellungnahme der EFSA wurden eine neue Tierstudie zur Untersuchung möglicher reproduktionstoxischer Wirkungen berücksichtigt und eine systematische Literaturrecherche durchgeführt. Im Fokus standen bei der Neubewertung auch Bedenken hinsichtlich möglicher erbgutschädigender Wirkungen von Titandioxid. Auf der Basis neuer Erkenntnisse zur Partikelgrößenverteilung von Titandioxid (E 171) wurden dabei die zahlreichen Studien mit Titandioxid-Nanopartikeln erstmals als für die Bewertung relevant eingestuft. Für die Beurteilung möglicher genotoxischer Effekte wurden von der EFSA nach einer systematischen Methodik Publikationen als potentiell relevant identifiziert und bewertet. Die Studien wurden dabei von der EFSA in einem sehr detaillierten Verfahren im Hinblick auf ihre Relevanz, Zuverlässigkeit und Qualität überprüft (EFSA 2021).

Unter Berücksichtigung dieser Daten kommt die EFSA zu dem Schluss, dass Titandioxid-Partikel das Potenzial haben, DNA-Strangbrüche und Chromosomenschäden, nicht aber Genmutationen zu verursachen. Allerdings konnte keine eindeutige Korrelation zwischen den physikalisch-chemischen Eigenschaften von Titandioxid-Partikeln (z. B. kristalline Form, Partikelgröße, Form, Agglomerationszustand) und den Ergebnissen in den bewerteten *in vitro*- bzw. *in vivo*-Genotoxizitätsstudien abgeleitet werden. Die bewerteten Studien wurden jedoch nahezu ausschließlich mit annähernd sphärischen Partikeln durchgeführt, was die Beurteilung einer Korrelation im Hinblick auf die Partikelform einschränkt.

Insgesamt kommt die EFSA zu folgendem Fazit: „...Based on all the evidence available, a concern for genotoxicity could not be ruled out, and given the many uncertainties, the Panel concluded that E 171 can no longer be considered as safe when used as a food additive. ...”

2.1 Potential zur Induktion von Genmutationen

Übersicht über die von der EFSA berücksichtigten Studien

Die EFSA hat acht bakterielle *in-vitro*-Genmutationstests bewertet, die alle negativ waren. Die darin beschriebenen Daten wurden allerdings von der EFSA aufgrund der eingeschränkten Durchlässigkeit der bakteriellen Zellwand für (Nano-)Partikel als nicht aussagekräftig angesehen.

Ferner identifizierte die EFSA 14 *in vitro*-Genmutationstests an Säugetierzellen, wovon sieben Studien als „hoch relevant“ oder „eingeschränkt relevant“ eingeschätzt und für die weitere Bewertung herangezogen wurden. Positive Befunde (d. h. genmutationsinduzierende Effekte) wurden in zwei HPRT-Tests sowie in einem *Spī*-Genmutationstest beobachtet, während sich in zwei anderen HPRT-Tests sowie zwei Mouse Lymphoma-Assays keine signifikanten Effekte in Bezug auf die Induktion von Genmutationen nachweisen ließen. Die Ergebnisse eines weiteren Mouse Lymphoma-Assays in CHO-K1-Zellen wurde als nicht eindeutig („equivocal“) eingeschätzt.

Die Daten aus sechs *in vivo*-Genmutationstests in Nagern unter Verwendung von Titandioxid-Nanopartikeln < 30 nm wurden von der EFSA als „hoch relevant“ oder „eingeschränkt relevant“ eingestuft und berücksichtigt. Eine Studie mit oraler Applikation erbrachte einen positiven Befund im Hinblick auf die Induktion von größeren Deletionen, während fünf andere Studien nach intraperitonealer, intravenöser bzw. intratrachealer Applikation ein negatives Ergebnis in Bezug auf die Induktion von Genmutationen und kleineren Deletionen zeigten.

Die EFSA kommt insgesamt zu dem Ergebnis, dass die Hinweise auf ein Potential zur Induktion von Genmutationen aus *in vitro*-Genmutationstests an Säugetierzellen durch die Daten aus *in-vivo*-Studien (mit TiO₂ NPs < 30 nm) nicht bestätigt werden.

Bewertung der Datenlage durch das BfR

Diese Einschätzung der EFSA ist für das BfR nachvollziehbar.

2.2 Potential zur Induktion von Mikrokernen und Chromosomenaberrationen

Übersicht über die von der EFSA berücksichtigten Studien

Zur Beurteilung des Potenzials von Titandioxid, Mikrokernen bzw. Chromosomenaberrationen zu induzieren, hat die EFSA 82 potenziell relevante Studien identifiziert und ausgewertet. Die Datenbasis zu den *in vitro*-Studien umfasste insgesamt 56 Studien, von denen 43 Studien mit 67 Einzelexperimenten von der EFSA als relevant (hohe oder eingeschränkte Relevanz) für die Bewertung angesehen wurden. Von den 67 berücksichtigten Einzelexperimenten berichteten 26 ein positives Testergebnis. Zwölf der berücksichtigten Einzelexperimente mit einem positiven Ergebnis wurden durch die EFSA mit einer hohen Relevanz für die Bewertung eingestuft. Die Mehrzahl der berücksichtigten Studien befasste sich mit Nanopartikeln von einer Größe < 30 nm. Eine Studie befasste sich explizit mit E171 und berichtete ein positives Ergebnis.

Darüber hinaus wurden insgesamt 26 *in vivo*-Studien bewertet, von denen 15 Studien von der EFSA als für die Bewertung relevant (hohe oder eingeschränkte Relevanz) eingeschätzt wur-

den. Von den 15 berücksichtigten *in vivo*-Studien berichteten acht Studien ein positives Testergebnis. Jedoch wurde lediglich eine der berücksichtigten *in vivo*-Studien durch die EFSA mit einer hohen Relevanz für die Bewertung eingeschätzt. Diese Studie von Shukla *et al.* berichtete ein positives Ergebnis (Shukla *et al.* 2014). Im Hinblick auf den oralen Verabreichungsweg, der im Zusammenhang mit der Verwendung von Titandioxid als Lebensmittelzusatzstoff als besonders relevant betrachtet wird, berichteten vier von fünf berücksichtigten Studien ein positives Testergebnis. Insgesamt 12 Studien befassten sich mit Nanopartikeln von geringer (< 30 nm) und/oder mittlerer (30-60 nm) Größe und berichteten sowohl positive als auch negative Ergebnisse nach oraler, intraperitonealer und intravenöser Verabreichung. In einer Studie wurde nach oraler Verabreichung von nanoskaligen Partikeln mit einer Größe von ca. 75 nm ein negatives Ergebnis berichtet. Zwei Studien berichteten nach intraperitonealer Applikation von größeren Partikeln (> 100 nm) jeweils ein uneindeutiges und ein negatives Ergebnis.

Auf der Grundlage der zuvor beschriebenen Studienlage stellte die EFSA fest, dass Titandioxid-Nanopartikel das Potenzial haben, Mikrokerne bzw. Chromosomenaberrationen zu induzieren. Nach Einschätzung der EFSA konnte dabei kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Partikelgröße und dem Auftreten positiver Ergebnisse im Mikrokerntest bzw. Chromosomenaberrationstest beobachtet werden.

Bewertung der Datenlage durch das BfR

Basierend auf der Gesamtschau der zur Verfügung stehenden Informationen, die sich insbesondere auf die *in vivo*-Mikrokerntests mit oraler Verabreichung bezieht und zudem durch weitere positive Ergebnisse aus *in vivo*-Studien mit anderen Verabreichungswegen bzw. *in vitro*-Studien untermauert wird, erscheint aus Sicht des BfR die Einschätzung der EFSA im Hinblick auf das vorhandene Potenzial von nanopartikulärem Titandioxid zur Induktion von Chromosomenaberrationen plausibel. Es wird jedoch angemerkt, dass die aufgeführten *in vivo*-Studien aufgrund von bestehenden Dokumentationslücken bzw. Abweichungen zu OECD-Prüfrichtlinien in der zitierten Originalliteratur bei alleiniger Betrachtung nur als eingeschränkt belastbar angesehen werden.

Die der EFSA-Stellungnahme zu Grunde gelegten Daten erlauben keine Einschätzung bezüglich eines Zusammenhangs zwischen den physikochemischen Eigenschaften (Partikelgröße sowie weiteren Partikeleigenschaften wie Partikelform, Kristallstruktur oder Agglomerationszustand) und dem Auftreten positiver Ergebnisse im Mikrokerntest bzw. Chromosomenaberrationstest. Die verfügbaren *in vivo*-Studien nach oraler Verabreichung deuten in der Summe auf ein genotoxisches Potenzial insbesondere für Nanopartikel von geringer bzw. mittlerer Größe (5-58 nm) hin. Das Potenzial in Bezug auf die Induktion von Mikrokerne bzw. Chromosomenaberrationen für größere Partikel (insbesondere > 100 nm) nach oraler Verabreichung ist jedoch nicht ausreichend durch die der EFSA-Bewertung zu Grunde liegenden Studien charakterisiert.

2.3 Potential zur Induktion von DNA-Schäden

Übersicht über die von der EFSA berücksichtigten Studien

Die EFSA hat in ihrem Gutachten insgesamt 142 *in vitro*-Studien und 44 *in vivo*-Studien identifiziert, die das genotoxische Potenzial von Titandioxidpartikeln mit Hilfe des Comet-Assays untersucht haben.

Hinsichtlich der *in vitro*-Studien wurden 106 Studien mit 142 Einzelexperimenten von der EFSA als „hoch relevant“ oder „eingeschränkt relevant“ bewertet. Die Mehrzahl der betrachteten *in vitro*-Studien berichtete ein positives Testergebnis.

Von den 44 *in vivo*-Studien wurden 18 Studien für den oralen Aufnahmepfad als „hoch relevant“ oder „eingeschränkt relevant“ angesehen. Davon befassten sich neun Untersuchungen mit dem oralen Aufnahmepfad, der für die Bewertung von Titandioxid als Lebensmittelzusatzstoff im Vordergrund steht. Dem EFSA-Gutachten ist zu entnehmen, dass Strangbrüche in sechs der neun Studien mit oraler Applikation nachgewiesen wurden. Als Zielorgan wurde meist das retikulo-endotheliale System identifiziert. Die tierexperimentellen Daten stehen im Einklang mit den Befunden aus *in vitro*-Experimenten. In einzelnen Studien konnte zudem eine Korrelation mehrerer Endpunkte zur Genotoxizität beobachtet werden. So berichteten z. B. Grissa *et al.* positive Befunde im Comet-Assay in Leukozyten, Mikrokerne im Knochenmark und Mikrokerne in roten Blutkörperchen (Grissa *et al.* 2015).

Basierend auf den Studiendaten schlussfolgert die EFSA, dass Titandioxid-Partikel DNA-Schäden induzieren können. Allerdings wird dabei angemerkt, dass ein überwiegender Teil der positiven Studien mit Partikeln < 30 nm durchgeführt wurde, jedoch DNA-Strangbrüche auch mit Partikeln > 30 nm induziert wurden. Außerdem weist die EFSA darauf hin, dass sich auf Grundlage der betrachteten Studien keine klare Abhängigkeit zwischen der Induktion von DNA-Schäden im Comet-Assay und der Partikelgröße ableiten lässt.

Bewertung der Datenlage durch das BfR

Die Darstellung und Interpretation der in der Stellungnahme berücksichtigten wesentlichen Studienergebnisse durch die EFSA sind insgesamt nachvollziehbar.

Aussagen über eine eventuelle Abhängigkeit zwischen positiven Ergebnissen und den physikochemischen Eigenschaften des Testmaterials sind anhand der berücksichtigten Datenlage mit Unsicherheiten behaftet. Ein Grund ist, dass die EFSA-Stellungnahme in Bezug auf die *in vivo*-Studien keine hinreichend belastbare Datenlage für eine klare Trennung zwischen nano- und mikroskaligem Material aufweist.

2.4 Untersuchung von Interaktionen mit der DNA

Übersicht über die von der EFSA berücksichtigten Studien

In der Stellungnahme der EFSA werden fünf *in-vitro*-Studien und zwei *in vivo*-Studien beschrieben, in denen die Interaktion zwischen Titandioxid-Nanopartikeln und der DNA untersucht wurde. In zwei tierexperimentellen Untersuchungen wurde dabei nach intraperitonealer bzw. intranasaler Applikation von Titandioxid-Nanopartikeln eine Bindung der Partikel an die aus Leberzellen der Versuchstiere isolierte DNA nachgewiesen (Li *et al.* 2010; Jin *et al.* 2013). Die Bindung führte zu Veränderungen in der DNA-Konformation. Die Ergebnisse weiterer aufgeführter *in vitro*-Studien haben ebenfalls eine Interaktion zwischen den Nanopartikeln und der DNA gezeigt. Bei der Untersuchung von Mikropartikeln in der Rutil-Kristallform (Durchmesser < 5 µm) wurde hingegen keine Bindung an die DNA beobachtet.

Auf Grundlage der Ergebnisse wurden von den Studienautoren sowohl elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Titandioxid-Nanopartikeln und der DNA als auch eine Interkalation der Nanopartikel in die DNA als möglich angesehen. Zudem wurde in einigen Studien auch die Möglichkeit einer kovalenten Bindung zwischen den Nanopartikeln und der DNA postuliert. Die EFSA gelangte in ihrer Stellungnahme zu dem Schluss, dass auf Grundlage der angewandten Techniken keine abschließende Beurteilung möglich ist, ob die beschriebenen Interaktionen auch eine kovalente Bindung an die DNA umfassen.

Bewertung der Datenlage durch das BfR

Die Darstellung und Interpretation der wesentlichen Studienergebnisse durch die EFSA ist nachvollziehbar und wird von Seiten des BfR geteilt. Aus Sicht des BfR wird aber weiterer Forschungsbedarf gesehen (siehe Abschnitt 3.5).

Im Detail ist anzumerken, dass die Studien überwiegend mit Titandioxid-Nanopartikeln mit einer Größe von weniger als 30 nm durchgeführt wurden. In zwei von Patel *et al.* durchgeführten Studien war die Partikelgröße zwar mit < 100 nm angegeben; laut der Originalpublikation aus dem Jahr 2017 ergab eine Charakterisierung der Partikel allerdings eine durchschnittliche Größe von etwa 20 nm (Patel *et al.* 2017), so dass auch hier von einem relevanten Anteil kleiner Partikel mit einer Größe unterhalb von 30 nm ausgegangen werden muss.

2.5 Auftreten von aberranten Krypten (*Aberrant Crypts, AC*)

Übersicht über die von der EFSA berücksichtigten Studien

Die EFSA hat bezüglich des Auftretens von aberranten Krypten insgesamt drei Studien berücksichtigt. Als neue Studie wurde die im Jahr 2016 von der EFSA geforderte Studie zur Reproduktionstoxizität gemäß der OECD-Prüfrichtlinie 443 (*Extended One Generation Reproductive Toxicity Study*; EOGRTS) bewertet. Außerdem wurden zwei weitere Studien berücksichtigt, die diesen Endpunkt untersuchten (Bettini *et al.* 2017; Blevins *et al.* 2019).

Die Studie von Bettini *et al.* (2017) wurde zuvor vom ANS-Panel bewertet, und die Limitationen wurden ausführlich diskutiert (EFSA 2018). In der Studie wurde in adulten männlichen Wistar-Ratten ein gehäuftes Auftreten von *aberrant cryptic foci* (ACF) bei einer Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht pro Tag beobachtet. In der Studie von Blevins *et al.* (2019) und der von der EFSA bewerteten, neu vorgelegten Studie zur Reproduktionstoxizität konnten diese Befunde nicht bestätigt werden. Die EFSA bewertet die beiden letztgenannten Studien als weniger aussagekräftig, weil die Exposition der Versuchstiere gegenüber Titandioxid-Nanopartikeln hier unklar sei.

Bewertung der Datenlage durch das BfR

Aberrante Krypten und Herde mit einem gehäuften Auftreten dieser atypischen bis dysplastischen Morphologie gelten als Vorstufe colorektaler Polypen und damit als präneoplastische Läsion. Ein gehäuftes Auftreten kann in der Darmschleimhaut von Versuchstieren regelmäßig nach Behandlung mit entsprechenden genotoxischen Kanzerogenen beobachtet werden. Dabei findet eine Ausprägung der ACF innerhalb von zwei Wochen statt. Hinsichtlich Anzahl und Schwere der Veränderungen ist mit genotoxischen Kanzerogenen eine Dosis-Abhängigkeit zu beobachten.

In ihrem Gutachten stellt die EFSA fest, dass die von Bettini *et al.* (2017) beschriebenen Befunde zwar in zwei weiteren Studien (Extended One-Generation Reproductive Toxicity Study und Blevins *et al.* 2019) nicht bestätigt werden konnten, für diese zwei Studien jedoch die Exposition der Versuchstiere gegenüber Titandioxid-Nanopartikeln unklar sei. Weil in den beiden anderen Studien die Exposition gegenüber Titandioxid-Nanopartikeln unklar war, hat die EFSA diesen Studien weniger Gewicht beigemessen als der Studie von Bettini *et al.* (2017).

Das BfR kann die in der Stellungnahme vorgenommene Wichtung der Studien von Bettini *et al.* (2017) im Vergleich zu der Studie von Blevins *et al.* (2019) nicht vollständig nachvollziehen, deren Unterschied in erster Linie in der Aufbereitung und Verabreichung der Prüfsubstanz beruht. Das BfR merkt an, dass die in der Studie von Bettini *et al.* (2017) mit nur einer Dosierung (10 mg/kg bw/Tag) beobachteten Effekte hinsichtlich Häufigkeit und Schweregrad allenfalls als marginal betrachtet werden können. In der Studie von Blevins *et al.* (2019), in der

entsprechend den OECD-Empfehlungen mit vier Dosisgruppen ein Bereich bis zu ca. 300 mg/kg bw/Tag untersucht wurde, konnten trotz erhöhter Gruppengröße die Befunde zu colorektalen präneoplastischen Läsionen in Form von ACF nicht bestätigt werden. Über die gemäß OECD-Prüfrichtlinie 443 durchgeführte neue Studie liegen dem BfR derzeit keine ausreichenden Informationen zur Beurteilung der Studienergebnisse vor.

2.6 Befunde aus sonstigen Studien

Übersicht über die von der EFSA berücksichtigten Studien

Zur Beurteilung genotoxischer Eigenschaften von E 171 wurden zusätzlich Ergebnisse aus Untersuchungen zur Phosphorylierung des Histons H2AX (γ H2AX), Untersuchungen zur Bildung oxidiertes DNA-Basen (8-oxo-dG) und zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, zum Einfluss auf das DNA-Methylierungsmuster zur Abschätzung epigenetischer Effekte sowie zur möglichen Induktion der Zelltransformation im Rahmen berücksichtigt.

Zur Abschätzung des Potenzials von Titandioxid-Partikeln, die Phosphorylierung von H2AX zu induzieren, wurden seitens der EFSA vier *in vitro*-Studien und zwei *in vivo*-Studien beurteilt, wobei in zwei der vier *in vitro*- und in beiden *in vivo*-Studien ein Anstieg von γ H2AX detektiert wurde. Die EFSA misst diesen Studien nur eine limitierte Aussagekraft zu.

Zur Bewertung der Bildung oxidiertes DNA-Basen (8-oxo-dG) als Reaktion auf die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies wurden fünf *in vitro*-Studien und eine *in vivo*-Studie bewertet. In vier *in vitro*-Studien und in der *in vivo*-Studie wurde jeweils ein positives Ergebnis nach Behandlung mit Titandioxid-Nano- und Mikropartikeln beobachtet. Die EFSA kommt aufgrund der hier beschriebenen Daten zu dem Schluss, dass Titandioxid-Nanopartikel und -Mikropartikel das Potenzial haben, die DNA zu schädigen. Jedoch wird diesen Studien nur eine limitierte Aussagekraft zugesprochen.

Zur Beurteilung der Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) wurden von der EFSA *in vitro*- und *in vivo*-Studien berücksichtigt, in denen die Induktion von ROS zum Teil parallel zur Induktion von Mikrokernen und DNA-Schäden untersucht wurde. Im überwiegenden Teil der *in vitro*-Studien konnte eine Induktion von ROS nach Exposition gegenüber Titandioxid-Partikeln nachgewiesen werden. In den betrachteten *in vivo*-Studien wurden neben der Induktion von ROS durch Titandioxid-Partikel auch die Induktion der Expression von Markergenen für Apoptose nachgewiesen. Die ROS-Induktion wurde unabhängig von der Applikationsart beobachtet.

Zur Bewertung möglicher epigenetischer Effekte wurden von der EFSA fünf *in vitro*-Studien bewertet. Diese zeigten eine Veränderung der Promotormethylierung spezifischer Gene bzw. des globalen zellulären DNA-Methylierungsmusters nach Exposition gegenüber Titandioxid-Nanopartikeln. Die EFSA kommt zu dem Schluss, dass die Studien zur Erfassung von epigenetischen Veränderungen nach Titandioxid-Partikelapplikation geeignet sein könnten. Sie werden von der EFSA als unterstützende Information angesehen.

Außerdem wurde von der EFSA unter dem Punkt „Weitere Studien“ der Einfluss von Titandioxid-Partikeln auf die Zelltransformation bewertet, wobei hier vier *in vitro*-Studien betrachtet wurden. Diese zeigen eine vermehrte Koloniebildung und „*anchorage independent growth*“ nach Titandioxid-Nanopartikelapplikation. Eine Studie zeigt neben einem Anstieg der Kolonienanzahl auch eine Kolonievergrößerung. Nach Einschätzung der EFSA liefern die *in vitro*-Studien Hinweise auf ein Potenzial von Titandioxid-Nanopartikeln, Zelltransmutationsprozesse als einen initialen Schritt bei der Kanzerogenese zu induzieren. Insgesamt kommt die EFSA zu dem Schluss, dass diesen Ergebnissen eine limitierte Relevanz für Bewertung von Genotoxizität und Kanzerogenität zugesprochen werden kann.

Bewertung der Datenlage durch das BfR

Zusammenfassend sind die Ergebnisse der von der EFSA bewerteten sonstigen Studien nachvollziehbar dargestellt. Die daraus gezogenen Schlussfolgerungen werden vom BfR mit Einschränkungen geteilt.

Die Untersuchungen zur Phosphorylierung von H2AX besitzen nur eine limitierte Aussagekraft. γ H2AX ist kein spezifischer Marker für DNA-Doppelstrangbrüche, sondern zeigt einen generellen DNA-Schaden an, der auch in Folge einer zellulären Stressantwort bzw. apoptotischen Prozessen entstehen kann. Insoweit lässt sich die biologische Relevanz dieser Daten nur schwer einschätzen.

Die Daten zu epigenetischen Veränderungen nach Titandioxid-Partikelapplikation werden von der EFSA als eingeschränkt unterstützende Information angesehen. In der EFSA-Stellungnahme werden u. a. Veränderungen im DNA-Methylierungsmuster in den epigenetischen Kontrollregionen („CpG islands“) von Genen, die für DNA-Reparaturproteine kodieren, als ein möglicher Wirkmechanismus der Titandioxid-vermittelten genotoxischen Effekte angesehen. Das BfR ist der Auffassung, dass sich die biologische Relevanz der Daten zu Effekten auf das Epigenom aktuell noch nicht abschätzen lässt.

Auch die unter „Sonstige Studien“ berücksichtigten Daten haben nur eine eingeschränkte Relevanz für Bewertung von Genotoxizität und Kanzerogenität.

3 Fazit aus Sicht des BfR

3.1 Evaluierung des methodischen Vorgehens

Insgesamt wurden von der EFSA fast 12.000 Publikationen recherchiert. Nach Anwendung einer systematischen Methodik wurden darunter mehr als 200 Publikationen identifiziert und bewertet, in denen mögliche genotoxische Effekte durch Titandioxid untersucht wurden.

Die Strategie zur Recherche der für die Beurteilung möglicher genotoxischer Effekte berücksichtigten Literatur sowie die den international etablierten wissenschaftlichen Kriterien folgende Evaluierung der Studien im Hinblick auf Belastbarkeit und Relevanz ist in den Anhängen transparent dargestellt. In der Zusammenstellung der verwendeten Literatur (Kapitel „References“) findet sich eine Reihe von Referenzen mit unvollständigen bibliographischen Angaben. Einige der in *Appendix F* genannten Studien sind nicht in der Referenzliste enthalten.

3.2 Überlegungen zum Wirkmechanismus der Titandioxid-vermittelten genotoxischen Effekte

Mehrere *in vitro*- und *in vivo*-Studien weisen darauf hin, dass Titandioxidpartikel DNA-Strangbrüche, oxidativ erzeugte DNA-Schäden und Chromosomenschäden verursachen. Für die beobachteten genotoxischen Effekte werden mehrere, u. U. auch parallel wirkende Mechanismen in Betracht gezogen. Neben der Titandioxid-vermittelten Bildung reaktiver Intermediate (reaktiver Sauerstoff- oder Stickstoff-Spezies (ROS/RNS)) wird in dem Gutachten der EFSA eine unmittelbare Wechselwirkung von Titandioxid-Nanopartikeln mit der DNA diskutiert.

Hinsichtlich der Bildung reaktiver Intermediate wird diskutiert, dass diese auf eine intrinsische Eigenschaft von Titandioxid-Nanopartikeln zurückgehen könnte, über eine durch Titandioxid-Partikel-vermittelte Entzündungsreaktion verläuft oder durch Wirkungen von Titandioxid-Nanopartikeln auf die Mitochondrien vermittelt wird (Ghosh *et al.* 2013; Louro *et al.* 2014; Barkhade *et al.* 2019).

Laut der EFSA-Stellungnahme gibt es Hinweise darauf, dass Titandioxid-Nanopartikel in den Zellkern und in die Mitochondrien gelangen könnten (Louro *et al.* 2014). Die meisten Studien, die anhand von elektronenmikroskopischen Bildern eine Aufnahme in den Zellkern zeigen, wurden mit Titandioxid-Nanopartikeln kleiner 30 nm durchgeführt. Diesen stehen Publikationen gegenüber, die ebenfalls teilweise mit Titandioxid-Nanopartikeln kleiner als 30 nm durchgeführt wurden, die jedoch keine Aufnahme in den Zellkern belegen.

In vitro-Studien mit isolierter DNA zeigten eine Interaktion mit Titandioxid. In der Proteomik wird Titandioxid zur Aufreinigung von phosphorylierten Proteinen verwendet (Larsen *et al.* 2005). Daher ist es nachvollziehbar, dass Titandioxid mit dem Phosphatrückgrat isolierter DNA interagieren kann. Ob die Befunde auf *in vivo*-Bedingungen übertragbar sind, lässt sich anhand der dargestellten Daten nicht beurteilen. Unter *in vivo*-Bedingungen sind Partikel mit einer Protein-Corona umgeben, weshalb unklar ist, ob die Partikel mit der DNA interagieren könnten. In dem Gutachten der EFSA werden zwei *in vivo*-Studien aus derselben Arbeitsgruppe zitiert, die eine Interaktion von Titandioxid-Nanopartikeln mit der DNA mittels UV VIS-Spektroskopie belegen sollen. Insgesamt erbringen die bislang bekannten Daten keinen belastbaren Nachweis für die Fähigkeit von Titandioxid-Nanopartikeln, *in-vivo* eine kovalente Bindung mit der DNA einzugehen.

Die von der EFSA zusammengefassten Befunde ergeben keine belastbaren Belege für einen direkten genotoxischen Wirkmechanismus durch Titandioxidpartikel. Der indirekte genotoxische Wirkmechanismus, über die Bildung von reaktiven Intermediaten durch Titandioxid, ist indes plausibel. Die im Abschnitt „*Sonstige Endpunkte*“ berücksichtigten Studien haben für die Bewertung des genotoxischen Potentials nur eine begrenzte Aussagekraft.

3.3 Korrelation zwischen beobachteten Effekten und den physikochemischen Eigenschaften des getesteten Titandioxidmaterials

Die der Stellungnahme der EFSA zugrunde gelegten Daten zur Genotoxizität von Titandioxid ergeben ein inkonsistentes Bild, das u. a. auf der Verwendung von Testmaterialien mit unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften und auf dem unterschiedlichen Studiendesign beruhen könnte.

Für einen großen Anteil der Studien wurden Nanomaterialien verwendet. Für Nanomaterialien gibt es bisher keine international harmonisierten Testmethoden. Die fehlende Standardisierung der Testmethoden für Nanomaterialien erschwert den Vergleich der Studien. Zudem wird darauf hingewiesen, dass Erfahrungen aus EU-Projekten (NANOGENOTOX, NANoREG) zeigen, dass in Ringversuchen zu *in vitro*-Genotoxizitätstests mit Titandioxid die Ergebnisse in den verschiedenen Laboren trotz Verwendung des gleichen Materials, der gleichen Zelllinie und des gleichen SOP-Protokolls nicht in allen Laboren reproduzierbar waren (unveröffentlichte Daten). Aktuell erfolgt auf OECD-Ebene die Erstellung eines Leitfadens, um die speziellen Testanforderungen von Nanomaterialien zu adressieren.

Nanomaterialien können in ihren physikochemischen Eigenschaften (z. B. der kristallinen Form, Partikelgröße, Form und dem Agglomerationszustand) variieren. Möglicherweise beeinflussen diese die toxischen Eigenschaften von Nanomaterialien. Titandioxid kommt beispielsweise in verschiedenen Kristallformen vor: Rutil, Anatas und Brookit. Grundsätzlich ist die wissenschaftliche Literatur zu Studien, in denen ein Zusammenhang zwischen der Toxizität von Titandioxidpartikeln und der Kristallform untersucht wurde, inkonsistent.

Die EFSA geht in ihrer Bewertung davon aus, dass ein nanoskaliger Anteil in E 171 nicht auszuschließen ist. Die Partikelgrößenverteilung des Lebensmittelzusatzstoffes E 171 ist polydispers und sehr divers zwischen den Herstellern – mit nanoskaligen Anteilen (≤ 100 nm), die in Einzelfällen sogar mehr als 50 % der Partikelanzahl betragen können (Verleysen *et al.*

2020; Verleysen *et al.* 2021). Die meisten *in vivo*-Studien zur Genotoxizität von Titandioxid, die in der EFSA-Stellungnahme zitiert werden, sind mit Nanopartikeln durchgeführt worden. Die mittlere Partikelgröße lag in den meisten Studien bei < 30 nm. Der Anteil an Studien mit Partikeln größer als 100 nm ist im Vergleich dazu deutlich geringer.

Bei Nanopartikeln wird aufgrund der größeren spezifischen Oberfläche (Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis) im Allgemeinen eine höhere Reaktivität angenommen als bei größeren Partikeln. Nanopartikel können zudem auf Grund ihrer geringen Größe einige Körperbarrieren leichter überwinden als nicht-nanoskalige Materialien und daher eine andere Toxikokinetik (Aufnahme, Verteilung und Ausscheidung) aufweisen.

Studien zur Toxikokinetik zeigen allerdings für den Dünndarm keine generell bevorzugte Aufnahme von Partikeln mit bestimmter Partikelgröße. Demzufolge lässt sich unter Berücksichtigung der gegenwärtigen technischen Möglichkeiten für die Partikelgröße kein Schwellenwert für die intestinale Aufnahme von Titandioxidpartikeln, weder für kleine noch für große Partikel (Nano- bis Mikrometerbereich), ableiten.

Da die meisten Studien zur Genotoxizität mit Nanopartikeln von Titandioxid durchgeführt wurden und nur wenige belastbare Daten zu ausschließlich größeren Partikeln vorliegen, lässt sich derzeit keine eindeutige Aussage zur Abhängigkeit der Toxizität von der Partikelgröße treffen.

Die EFSA schreibt in ihrer Schlussfolgerung, dass keine eindeutige Korrelation zwischen den gezeigten Effekten in den *in vitro*- bzw. den *in vivo*-Genotoxizitätstests und den physikochemischen Eigenschaften der Titandioxidpartikel beobachtet wurde. Für die Nachvollziehbarkeit dieser Schlussfolgerung wäre eine Aufbereitung der Daten nach den verschiedenen physikochemischen Parametern der verwendeten Untersuchungsmaterialien (z. B. Partikelgröße sowie weiteren Partikeleigenschaften wie Partikelform, Kristallstruktur oder Agglomerationszustand) in den von der EFSA als relevant angesehenen Studien hilfreich gewesen, sofern diese Parameter in den Originalveröffentlichungen zu den begutachteten Studien berichtet wurden.

Insgesamt erlauben die der EFSA-Stellungnahme zugrundeliegenden Daten keine Aussage bezüglich eines Zusammenhangs zwischen den physikochemischen Eigenschaften und dem Auftreten positiver Ergebnisse in Genotoxizitätstests. Aus Sicht des BfR bedarf es gezielter Studien unter standardisierten Testbedingungen, um eine eindeutige Schlussfolgerung zu einer möglichen Korrelation mit den physikochemischen Eigenschaften von Titandioxidpartikeln treffen zu können.

3.4 Konsequenzen für die Ableitung eines gesundheitsbasierten Richtwerts

Zwar werden für die beobachteten genotoxischen Effekte mehrere, unter Umständen auch parallel wirkende Mechanismen in Betracht gezogen, jedoch wird vor allem der Titandioxid-vermittelten Bildung reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS) Bedeutung beigemessen. Diskutiert wird, ob die ROS-Bildung auf eine intrinsische Eigenschaft von Titandioxid-Nanopartikeln zurückgeht, über Titandioxid-Partikel-vermittelte Entzündungsreaktionen verläuft oder durch Wirkungen von Titandioxid-Nanopartikeln auf die Mitochondrien vermittelt wird. Der relative Beitrag der insgesamt diskutierten Wirkmechanismen zur Titandioxid-vermittelten Genotoxizität lässt sich anhand der verfügbaren Daten nicht abschließend beurteilen.

Die von der EFSA berücksichtigten *in vivo*-Studien zur Genotoxizität lassen keinen eindeutigen Schluss im Hinblick auf einen möglichen Zusammenhang zwischen physikochemischen Eigenschaften von Titandioxid-Partikeln und einem genotoxischen Effekt zu.

Insgesamt besteht Unsicherheit darüber, ob ein Schwellenwert für die möglichen genotoxischen Effekte durch Exposition gegenüber dem Lebensmittelzusatzstoff E 171 angenommen werden kann.

Es ist für das BfR daher nachvollziehbar, dass die EFSA internationalen Leitlinien folgend keinen gesundheitsbasierten Richtwert (HBGV) abgeleitet hat.

3.5 Datenlücken und Forschungsbedarf aus Sicht des BfR

Die Einschätzung der EFSA, dass die Bedenken hinsichtlich möglicher genotoxischer Wirkungen von E 171 nicht ausgeräumt werden können und damit der Verdacht bezüglich einer erbgutschädigenden Wirkung nicht entkräftet werden kann, ist auf Grundlage der verfügbaren Daten nachvollziehbar.

Aus Sicht des BfR könnten gezielte Untersuchungen zu den folgenden Aspekten wesentlich zur Verbesserung der wissenschaftlichen Bewertungsgrundlage beitragen:

(1) *Zusammenhang zwischen physikochemischen Eigenschaften von Titandioxid-Partikeln und den genotoxischen Eigenschaften*

Die meisten *in vivo*-Studien zur Genotoxizität, die in der Stellungnahme zitiert werden, sind mit Nanopartikeln durchgeführt worden. Nach Darstellung der EFSA lässt sich anhand der verfügbaren Daten derzeit keine eindeutige Aussage treffen, inwieweit die physikochemischen Eigenschaften von Titandioxid in E 171 einen Einfluss auf die Genotoxizität haben.

Studien unter standardisierten Bedingungen mit Titandioxidmaterialien definierter Größe (insbesondere mit Materialien, die keine nanoskaligen Anteile enthalten), könnten daher geeignet sein, belastbare Schlussfolgerungen im Hinblick auf einen möglichen Zusammenhang zwischen physikochemischen Eigenschaften von Titandioxid-Partikeln und den genotoxischen Eigenschaften treffen zu können.

(2) *Untersuchungen zu möglichen Wirkmechanismen*

Der Titandioxid-vermittelten Bildung reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS) wird für die Genotoxizität besondere Bedeutung beigemessen. Nimmt man ferner an, dass das größere Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis (spezifische Oberfläche) von Nanopartikeln und die daraus resultierende höhere Reaktivität bei Nanopartikeln eine Rolle spielt, könnte geprüft werden, ob der nanoskalige Anteil für die genotoxischen Befunde verantwortlich ist.

Grundsätzlich können Schäden an der DNA durch unmittelbare Interaktion der Substanz mit der DNA entstehen oder durch indirekte Mechanismen, die keine unmittelbare Interaktion mit der DNA erfordern, ausgelöst werden. Die Risikobewertung für eine DNA-reaktive, genotoxisch-karzinogene Wirkung basiert auf der Annahme, dass es nicht möglich ist, ein Expositionsniveau zu bestimmen, das gänzlich ohne zusätzliches Risiko ist. Aus diesem Grund wird üblicherweise auch kein gesundheitsbasierter Richtwert (health based guidance value, HBGV) abgeleitet.

Aus Sicht des BfR könnten gezielte Untersuchungen zu möglichen Interaktionen von Titandioxid mit der DNA die Datenbasis für Schlussfolgerungen im Hinblick auf einen möglichen Wirkmechanismus verbessern. Insgesamt wird aus Sicht des BfR Forschungsbedarf gesehen, welcher Zusammenhang zwischen der Partikelgröße und dem Transfer in den Zellkern besteht, ob die entsprechende Interaktion zwischen Ti-

tandioxid und der DNA von der Größe abhängig ist, und ob es neben den elektrostatischen Interaktionen und der Interkalation auch zu kovalenten Bindungen kommen kann.

(3) *Untersuchungen zum kanzerogenen Potential*

Um das kanzerogene Potential insbesondere von nanoskaligen Titandioxidpartikeln abschließend bewerten zu können, fehlen entsprechende belastbare Studien insbesondere unter Verabreichung von Untersuchungsmaterial mit kleineren Partikelgrößen bis in den Bereich deutlich unter 100 nm.

Derzeit liegt nur eine einzige Karzinogenitätsstudie nach oraler Verabreichung an Mäusen und Ratten vor (NCI 1979), bei der auch in der höchsten Dosisgruppe (50 g/kg Futter) keine statistisch signifikanten neoplastischen Effekte beobachtet werden konnten. Allerdings wurde die Partikelgrößenverteilung in dieser Studie nicht bestimmt, weshalb dieser Studie nur eingeschränkte Relevanz beigemessen wurde.

4. Referenzen

- Barkhade T., Mahapatra S. K., Banerjee I. (2019). Study of mitochondrial swelling, membrane fluidity and ROS production induced by nano-TiO₂ and prevented by Fe incorporation. *Toxicology Research* **8**: 711-722.
- Bettini S, Boutet-Robinet E., Cartier C., Coméra C., Gaultier E., Dupuy J., Naud N., Taché S., Gysan P., Reguer S., Thieriet N., Réfrégiers M., Thiaudière D., Cravedi J. P., Carrière M., Audinot J. N., Pierre F. H., Guzylack-Piriou L., Houdeau E. (2017). Food-grade TiO₂ impairs intestinal and systemic immune homeostasis, initiates preneoplastic lesions and promotes aberrant crypt development in the rat colon. *Scientific reports* **7**: 40373.
- Blevins L. K., Crawford R. B., Bach A., Rizzo M. D., Zhou J., Henriquez J. E., Olive Khan D. M. I., Sermet S., Arnold L. L., Pennington K. L., Souza N. P., Cohen S. M., Kaminski N. E. (2019). Evaluation of immunologic and intestinal effects in rats administered an E 171-containing diet, a food grade titanium dioxide (TiO₂). *Food Chem Toxicol* **133**: 110793.
- EFSA (European Food Safety Authority) (2019a). EFSA statement on the review of the risks related to the exposure to the food additive titanium dioxide (E 171) performed by the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety (ANSES). *EFSA Journal* **17(6)**: 5714.
- EFSA (European Food Safety Authority: Panel on Food Additives and Flavourings (FAF)) (2021). Safety assessment of titanium dioxide (E171) as a food additive. *EFSA Journal* **19(5)**: 6585.
- EFSA (European Food Safety Authority: Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS)) (2016). Re-evaluation of titanium dioxide (E 171) as a food additive. *EFSA Journal* **14(9)**: 4545.
- EFSA (European Food Safety Authority: Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS)) (2018). Evaluation of four new studies on the potential toxicity of titanium dioxide used as a food additive (E 171). *EFSA Journal* **16(7)**: 5366.
- EFSA (European Food Safety Authority: Panel on Food Additives and Flavourings (FAF)) (2019b). Scientific opinion on the proposed amendment of the EU specifications for

- titanium dioxide (E 171) with respect to the inclusion of additional parameters related to its particle size distribution. *EFSA Journal* **17(7)**: 5760.
- Ghosh M., Chakraborty A., Mukherjee A. (2013). Cytotoxic, genotoxic and the hemolytic effect of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles on human erythrocyte and lymphocyte cells in vitro. *J Appl Toxicol* **33**: 1097-1110.
- Grissa I., Elghoul J., Ezzi L., Chakroun S., Kerkeni E., Hassine M., El Mir L., Mehdi M., Ben Cheikh H., Haouas Z. (2015). Anemia and genotoxicity induced by sub-chronic intragastric treatment of rats with titanium dioxide nanoparticles. *Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **794**: 25–31.
- Guo Z., Martucci N. J., Moreno-Olivas F., Tako E., Mahler G. J. (2017). Titanium dioxide nanoparticle ingestion alters nutrient absorption in an in vitro model of the small intestine. *NanoImpact* **5**: 70-82.
- Heringa M. B., Geraets L., van Eijkeren J. C., Vandebriel R. J., de Jong W. H., Oomen A. G. (2016). Risk assessment of titanium dioxide nanoparticles via oral exposure, including toxicokinetic considerations. *Nanotoxicology* **10**: 1515-1525.
- Jin C., Tang Y., Fan X. Y., Ye X. T., Li X. L., Tang K., Zhang Y. F., Li A. G., Yang Y. J. (2013). *In vivo* evaluation of the interaction between titanium dioxide nanoparticle and rat liver DNA. *Toxicol Ind Health* **29**: 235-244.
- Larsen M. R., Thingholm T. E., Jensen O. N., Roepstorff P., Jorgensen T. J. D. (2005). Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns. *Molecular & Cellular Proteomics* **4**: 873-886.
- Li N., Ma L. L., Wang J., Zheng L., Liu J., Duan Y. M., Liu H. T., Zhao X. Y., Wang S. S., Wang H., Hong F. S., Xie Y. N. (2010). Interaction between nano-anatase TiO₂ and liver DNA from mice *in vivo*. *Nanoscale Research Letters* **5**: 108-115.
- Louro H., Tavares A., Vital N., Costa P. M., Alverca E., Zwart E., de Jong W. H., Fessard V., Lavinha J., Silva M. J. (2014). Integrated approach to the in vivo genotoxic effects of a titanium dioxide nanomaterial using lacZ plasmid-based transgenic mice. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **55**: 500-509.
- NCI (U.S. National Cancer Institute) (1979). Bioassay of titanium dioxide for possible carcinogenicity. *Technical Report Series* **97**: 1-130.
- Patel S., Patel P., Bakshi S.R. (2017). Titanium dioxide nanoparticles: an in vitro study of DNA binding, chromosome aberration assay, and comet assay *Cytotechnology* **69**: 245–263.
- Proquin H., Rodríguez-Ibarra C., Moonen C. G., Urrutia Ortega I. M., Briede J. J., de Kok T. M., van Loveren H., Chirino Y. I. (2017). Titanium dioxide food additive (E171) induces ROS formation and genotoxicity: contribution of micro and nano-sized fractions. *Mutagenesis* **32**: 139-149.
- Shukla R. K., Kumar A., Vallabani N. V., Pandey A. K., Dhawan A. (2014). Titanium dioxide nanoparticle-induced oxidative stress triggers DNA damage and hepatic injury in mice. *Nanomedicine (London)* **9**: 1423-1434.
- Verleysen E., Waegeneers N., Brassinne F., De Vos S., Jimenez I. O., Mathioudaki S., Mast J. (2020). Physicochemical characterization of the pristine E171 food additive by standardized and validated methods. *Nanomaterials (Basel)* **10**: 592.
- Verleysen E., Waegeneers N., De Vos S., Brassinne F., Ledecq M., Van Steen F., Andjelkovic M., Janssens R., Mathioudaki S., Delfosse L., Machiels R., Cheyns K.,

Mast J. (2021). Physicochemical characterization of nanoparticles in food additives in the context of risk identification. *EFSA Supporting publication* **2021:EN-9992**

Weitere Informationen auf der BfR-Website zum Thema Zusatzstoffe:

https://www.bfr.bund.de/de/bewertung_von_lebensmittelzusatzstoffen-2274.html

Über das BfR

Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) ist eine wissenschaftlich unabhängige Einrichtung im Geschäftsbereich des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL). Es berät die Bundesregierung und die Bundesländer zu Fragen der Lebensmittel-, Chemikalien- und Produktsicherheit. Das BfR betreibt eigene Forschung zu Themen, die in engem Zusammenhang mit seinen Bewertungsaufgaben stehen.