



**“Evaluación de la genotoxicidad *in vitro* de arcillas modificadas con silanos mediante el ensayo de micronúcleos”**

**Julio Asencio Álvarez**







FACULTAD DE FARMACIA, UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN FARMACIA

**“Evaluación de la genotoxicidad *in vitro* de arcillas modificadas con silanos mediante el ensayo de micronúcleos”**

TFG de carácter experimental

Autor: Julio Asencio Álvarez

Sevilla, diciembre de 2016

Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal.

Área de Toxicología

Tutoras: Dra. Ángeles Mencía Jos Gallego y Dra. Sara Maisanaba Hernández



***A mis tutoras, Sara y Ángeles, quienes me han inculcado  
rigor y constancia a lo largo de estos años de estudio.***



## RESUMEN

El diseño de nuevos materiales de envasado con propiedades mecánicas, térmicas y de barrera mejoradas, destinados a incrementar la vida media de los productos alimenticios en el mercado, es una apuesta segura llevada a cabo por la industria alimentaria. Estos envases son conocidos como materiales nanocompuestos y difieren del polímero tradicional en que cuentan en su estructura con arcillas modificadas que presentan láminas de grosor nanométrico. Entre estas arcillas se encuentra Clay3, una arcilla modificada desarrollada por el Instituto Tecnológico de Embalaje, Transporte y Logística de Valencia. Dicha arcilla se basa en la modificación de la montmorillonita con un silano, el 3-aminopropiltriethoxisilano. Aunque las mejoras tecnológicas son bien conocidas, poco se sabe acerca de la toxicidad de estos nuevos materiales, siendo necesario su conocimiento para asegurar la salud de los consumidores y evitar futuros daños por exposición a estas arcillas debido a migraciones del envase al alimento. En el presente trabajo se investiga la genotoxicidad de Clay3 mediante el ensayo *in vitro* de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (CBMN) en la línea celular hepática humana HepG2. La inducción de micronúcleos (MN) y otras malformaciones nucleares se analizaron tras 24 h de exposición a concentraciones subcitotóxicas de Clay3 (0-250 µg/ml). Los resultados obtenidos no indicaron una alteración notable de las células tratadas con respecto a los grupos control bajo las condiciones de ensayo establecidas. El ensayo de MN forma parte de un conjunto de ensayos obligatorios solicitados por parte de las autoridades competentes en los procesos de autorización de materiales destinados al contacto con alimentos. Por tanto, es necesario ampliar los datos disponibles acerca de la toxicidad de este nuevo material antes de su potencial utilización comercial.

**Palabras claves:** arcilla modificada, micronúcleos, genotoxicidad, HepG2, silano, Clay3.





# ÍNDICE

<b>1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1.	<i>ORIGEN Y CLASIFICACIÓN DE LAS ARCILLAS Y MINERALES DE ARCILLA</i> .....	1
1.2.	<i>PRINCIPALES APLICACIONES INDUSTRIALES DE LAS ARCILLAS Y MINERALES DE ARCILLA</i> .....	2
1.2.1.	<i>Envasado alimentario y arcillas</i> .....	2
1.2.2.	<i>Materiales nanocompuestos ¿qué son?</i> .....	3
1.2.3.	<i>Modificación orgánica de arcillas: reacción de silación</i> .....	4
1.3.	<i>EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA DE NUEVOS MATERIALES DESTINADOS AL CONTACTO ALIMENTARIO: GENOTOXICIDAD</i> .....	6
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>11</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>13</b>
3.1.	<i>PRODUCTOS QUÍMICOS</i> .....	13
3.2.	<i>ARCILLA MODIFICADA Y CARACTERIZACIÓN</i> .....	13
3.3.	<i>SOLUCIONES DE ENSAYO DE LA ARCILLA</i> .....	13
3.4.	<i>LÍNEA CELULAR SELECCIONADA Y MANTENIMIENTO</i> .....	14
3.5.	<i>ENSAYO IN VITRO DE MICRONÚCLEOS CON BLOQUEO DE LA CITOCINESIS (CBMN)</i> .....	14
3.6.	<i>ESTUDIO ESTADÍSTICO Y TRATAMIENTO DE DATOS</i> .....	17
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>19</b>
4.1.	<i>GENOTOXICIDAD DE CLAY3 EN HEPG2: INDUCCIÓN DE MICRONÚCLEOS, PUENTES NUCLEOPLÁSMICOS Y BROTES NUCLEARES</i> .....	19
4.2.	<i>ÍNDICE DE DIVISIÓN NUCLEAR</i> .....	23
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>25</b>
<b>6.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>27</b>
<b>7.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>33</b>



# 1. INTRODUCCIÓN

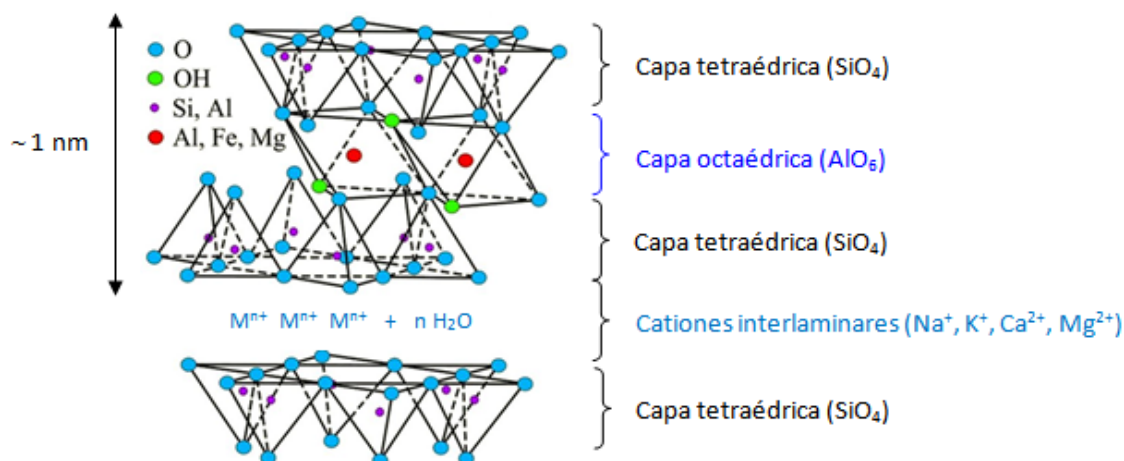
## 1.1. Origen y clasificación de las arcillas y minerales de arcilla

Las arcillas y minerales de arcilla (**Tabla 1**) son compuestos naturales que pertenecen al grupo de los filosilicatos. Las propiedades fisicoquímicas de este grupo dependen de su estructura y composición. De forma general, la estructura básica se compone de capas tetraédricas de silicio y oxígeno y una segunda capa octaédrica de magnesio o aluminio en cuyos vértices hay presencia de oxígeno (**Fig. 1**). A la unidad formada por la unión de capas tetraédricas y octaédrica se le denomina lámina, cuyo espesor es de aproximadamente 1 nm. Los principales minerales de arcilla de uso industrial difieren en la composición cuantitativa de estas capas dando lugar a diferentes tipos de filosilicatos como son las caolinitas (1:1), esmectitas (2:1) y sepiolita (2:1 de carácter fibroso) (Murray, 2007a; Maisanaba y cols., 2015b).

ARCILLA	MINERALES DE ARCILLA
Natural	Natural y sintético
De grano fino (<2 o <4 μm)	No hay criterio de tamaño
Filosilicatos como componente principal	Puede incluir a los no filosilicatos
Plástico (con algunas excepciones)	Plástico
Se endurece al secado o cocción	Se endurece al secado o cocción

**Tabla 1.** Diferencias entre arcillas y minerales de arcilla. Tomada de Bergaya y Lagaly (2013).

Más específicamente, dentro del grupo de las esmectitas, se encuentra la montmorillonita (Mt). Ésta es la arcilla natural más ampliamente utilizada en diversos campos industriales, destacando entre otros el envasado. La Mt está compuesta por numerosas plaquetas de estructura básica 2:1, dos capas tetraédricas de sílice y una octaédrica de alúmina. Entre las láminas existe un espacio interlaminar muy fino que contiene moléculas de agua y diferentes tipos de compuestos orgánicos o inorgánicos que proporcionarán estabilidad química y diferentes características a las láminas que la componen (FEEDAP 2010, 2011). Las plaquetas tienen un espesor de 1nm y un diámetro entre 100 - 500 nm, lo que resulta una relación muy elevada superficie/volumen.



**Figura 1.** Estructura de lámina 2:1 de la montmorillonita. Tomada de Sorrentino y cols. (2007).

## ***1.2. Principales aplicaciones industriales de las arcillas y minerales de arcilla***

En la última década, el uso de estos materiales ha aumentado exponencialmente en diversos campos como la construcción, biorremediación, ingeniería e industrias como la farmacéutica o alimentaria. Esto es debido a sus propiedades tan versátiles, su amplia distribución natural y su bajo costo (Murray, 2007b).

### **1.2.1. Envasado alimentario y arcillas**

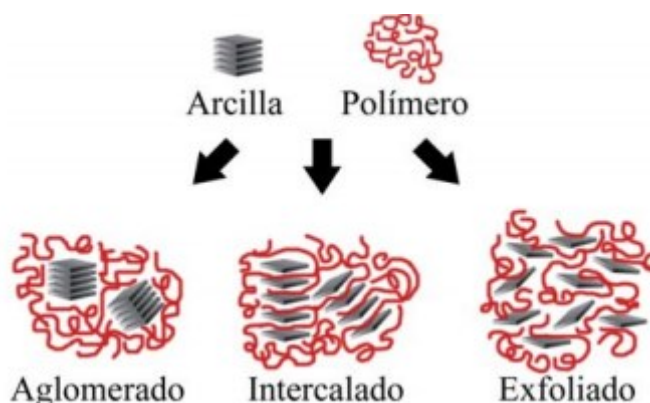
Los envases alimentarios tienen como función principal mantener la calidad y seguridad de los productos alimenticios durante el almacenamiento y transporte, además de ampliar su vida útil. Para ello, el envoltorio debería actuar como una barrera impermeable frente a gases como el vapor de agua (impidiendo su ganancia o pérdida de humedad), oxígeno, dióxido de carbono y otros compuestos volátiles que puedan alterar las propiedades organolépticas del alimento e impedir la contaminación microbiana (Rhim y cols., 2013).

En relación al uso de los filosilicatos en la industria alimentaria destaca la aplicación de minerales de arcilla como la Mt para obtener envases alimentarios nanocompuestos con mejores propiedades mecánicas, térmicas y barrera frente a los gases que el polímero de partida (Arora y Padua, 2010; Jordá-Beneyto y cols., 2014; Maisanaba y cols., 2015b).

### 1.2.2. Materiales nanocompuestos ¿qué son?

Las mejoras implementadas en los materiales tras la adición de arcillas se deben a varios factores tales como la concentración y dispersión de la arcilla en el polímero así como el tipo de arcilla utilizada, natural o modificada (Maisanaba y cols., 2015b).

El término de material nanocompuesto deriva del tamaño que se obtiene tras dispersar la arcilla y separar las diversas plaquetas que las componen en sus unidades básicas que tienen una dimensión de orden nanométrico ( $1 \times 10^{-9}$  m). Se pueden obtener tres tipos de compuestos atendiendo a la dispersión de la arcilla sobre el polímero: (A) Microcompuestos con dispersión aglomerada: los compuestos que se obtienen no se consideran nanocompuestos *per se*, debido a que el polímero no consigue intercalarse entre las láminas de la arcilla, por lo que no se llegan a dispersar. (B) Nanocompuestos con dispersión intercalada, en el cual el polímero sí consigue abrirse paso a través las láminas de la arcilla, pero no se obtienen nanocompuestos con mejoras demasiado notables dado que no se consigue la dispersión de las láminas por todo el polímero. (C) Nanocompuestos con dispersión exfoliada, obteniéndose la distribución óptima de la arcilla en el polímero. Es una dispersión de tipo exfoliada, en la cual se consigue desordenar y separar completamente las diferentes láminas de las que está compuesta la arcilla adoptando una estructura en monocapa con el máximo número de interacciones arcilla – polímero (**Fig. 2**). Como resultado, se obtiene una estructura polimérica modificada, en la cual, la arcilla obliga a los gases a seguir un camino tortuoso a través del material que reduce en gran medida su transmisión y llegada al alimento (Abacha y cols., 2009; Choudalakis y Gotsis, 2009; Herrera–Alonso y cols., 2010). De esta forma, también se consiguen mejoras en las propiedades fisicoquímicas del envase (Arora y Padua, 2010; Maisanaba y cols., 2015b).



**Figura 2.** Tipos de dispersión de las arcillas en el polímero nanocompuesto. Tomada de Franco-Urquiza y Maspoch (2009).

Sin embargo, una dispersión simple de arcillas en una matriz polimérica, no va a producir un material nanocompuesto con mejoras destacadas, debido a las pobres interacciones interfaciales entre los sitios de reacción hidrófilos de la arcilla y la alta hidrofobicidad del material polimérico (Pisticelli y cols., 2010). La solución para esta notable desventaja se puede solventar mediante la introducción de grupos orgánicos para mejorar la interacción entre las arcillas y los polímeros (Silva y cols., 2011).

### **1.2.3. Modificación orgánica de arcillas: reacción de silación**

Como se ha descrito anteriormente, las arcillas presentan en su estructura grupos químicos y cargas electrostáticas que le confieren un carácter polar e hidrofílico. Para poder dispersar con mayor facilidad estas arcillas en los polímeros hidrófobos, la industria ha llevado a cabo diversas modificaciones químicas de la superficie de las arcillas con el fin de mejorar la compatibilidad arcilla - polímero y generar nanocompuestos exfoliados (Pisticelli y cols., 2010; Houtman y cols., 2014; Maisanaba y cols., 2015b).

En la bibliografía podemos encontrar diversos tipos de modificadores orgánicos utilizados con el fin de obtener arcillas organomodificadas. Entre los más comunes se pueden encontrar las sales de amonio cuaternario, incluidas en las arcillas por reacciones de intercambio iónico con cationes inorgánicos y orgánicos. Como resultado se obtienen arcillas modificadas más hidrofóbicas y compatibles con el polímero. Esta modificación da lugar a un espacio interlaminaar más amplio y con menos interacciones electrostáticas facilitando la penetración del polímero a través de las láminas de arcilla (Jordá-Beneyto y cols., 2014).

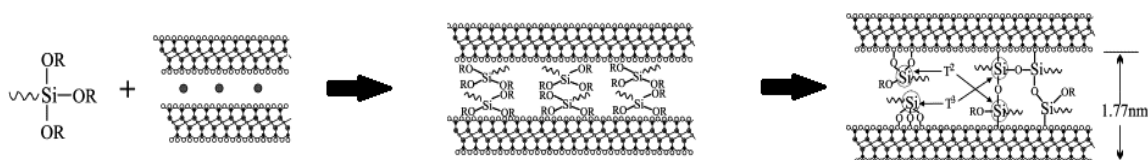
Sin embargo estos modificadores se degradan en determinados procesos de elaboración de los envases debido a las altas temperaturas que en ellos se alcanzan. Estas sales de amonio cuaternario comienzan a descomponerse a temperaturas superiores a los 200°C (Xie y cols., 2001). Debido a lo anteriormente mencionado, estos modificadores presentan una notable limitación en el procesamiento de nanocompuestos poliméricos de arcilla modificadas (Xie y cols., 2001, 2002; Wang y cols., 2013).

En este sentido, la reacción de inserción de grupos hidrofóbicos en las superficies de las plaquetas ha supuesto una alternativa viable y da lugar a una estabilidad térmica de la arcilla modificada en el procesamiento de los envases. Esta reacción de inserción (**Fig. 3**), se lleva a cabo generalmente entre silanos, como agentes de acoplamiento, y los grupos silanoles de las arcillas que se localizan en los bordes, la superficie externa y el espacio interlaminaar de las

plaquetas de arcilla (Di Gianni y cols., 2008; Herrera-Alonso y cols., 2010; Pisticelli y cols., 2010).

La síntesis de arcillas modificadas con silanos ocurre en un proceso en 2 etapas:

- 1) Intercalación de moléculas de silano.
- 2) Reacción de condensación entre las moléculas de silano y los grupos silanoles.



**Figura 3.** Diagrama hipotético de inserción de un silano en la capa intermedia de la Mt. Tomada de He y cols. (2005).

Cabe mencionar en este punto al Instituto Tecnológico del Embalaje, Transporte y Logística (ITENE) de Valencia, empresa que lleva a cabo el diseño y síntesis mediante la reacción anteriormente descrita de nuevas arcillas organomodificadas basadas en la Mt, con el fin de crear nuevos materiales de envasado. Entre estas nuevas arcillas está Clay3, arcilla en la cual nos vamos a centrar en el presente trabajo, sintetizada a partir de la Mt también conocida comercialmente como Cloisite® Na<sup>+</sup> (CNa<sup>+</sup>) y el modificador 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES).

La selección de modificadores es también un punto crucial en la síntesis de estos nuevos materiales destinados a entrar en contacto con los envases alimentarios, prestando especial atención a su potencial migración y posible toxicidad en los consumidores.

Estos materiales nanocompuestos deben cumplir las normativas sanitarias que establecen unos límites de migración de sustancias con estructura nanométrica. La migración tiene lugar del envase al alimento y debe mantenerse por debajo de un límite de detección establecido. Tomando en consideración los alimentos para lactantes y otras personas especialmente sensibles, así como la amplia tolerancia analítica de los análisis de migración, conviene establecer un nivel máximo de 0,01 mg/kg de alimento para la migración de una sustancia no autorizada. Las sustancias mutagénicas, carcinógenas o tóxicas para la reproducción no deben utilizarse en los materiales u objetos en contacto con alimentos sin una autorización previa. Las nuevas técnicas de elaboración de materiales de envasado permiten obtener nuevos materiales nanocompuestos. La adición de sustancias con características nanométricas da lugar a propiedades químicas y físicas diferentes de las observadas a tamaño macromolecular. Las propiedades resultantes debido a la reducción del tamaño pueden implicar perfiles

toxicológicos diferentes, por lo tanto, las Autoridades deben evaluar caso por caso el riesgo que estas sustancias representan, a la espera de que se conozca más información sobre su perfil toxicológico (Reglamento (UE) 2016/1416, 2016, EFSA 2016).

Es muy importante destacar que los materiales nanocompuestos necesitan poca cantidad de aditivo para mostrar una mejora de las propiedades mecánicas, térmicas, etc. Suelen contener alrededor de un 4% p/p de arcillas orgánicas para obtener propiedades mejoradas. Hasta el momento, los estudios disponibles en bibliografía acerca de la migración de arcillas organomodificadas del envase al alimento no han mostrado niveles significativos con respecto a la migración de residuos de polímeros tradicionales (Maisanaba y cols., 2014c).

### ***1.3. Evaluación toxicológica de nuevos materiales destinados al contacto alimentario: Genotoxicidad***

Aunque las consecuencias y mejoras tecnológicas son conocidas y están generalmente bien descritas desde hace años, los potenciales efectos tóxicos y el impacto sobre la salud humana y el medio ambiente de las arcillas sin modificar o modificadas, así como de los nanocompuestos poliméricos, están actualmente siendo investigados con mucho interés.

Respecto a la incorporación de las arcillas a los polímeros empleados en la industria alimentaria, ésta puede resultar en una exposición no intencionada para el consumidor, por lo que es necesario no sólo evaluar la arcilla microestructurada modificada o no, sino también el nanocompuesto resultante una vez imbuida ésta, debido a la posible migración al producto alimenticio (Guillard y cols., 2010; Song y cols., 2011; EFSA, 2011a, 2015).

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) es la piedra angular de la Unión Europea (UE) en materia de evaluación de riesgos en relación con la alimentación y la seguridad de los piensos. En estrecha colaboración con las autoridades nacionales y en consulta abierta con grupos de interés, la EFSA proporciona asesoramiento científico independiente y comunicación clara sobre los riesgos existentes y emergentes.

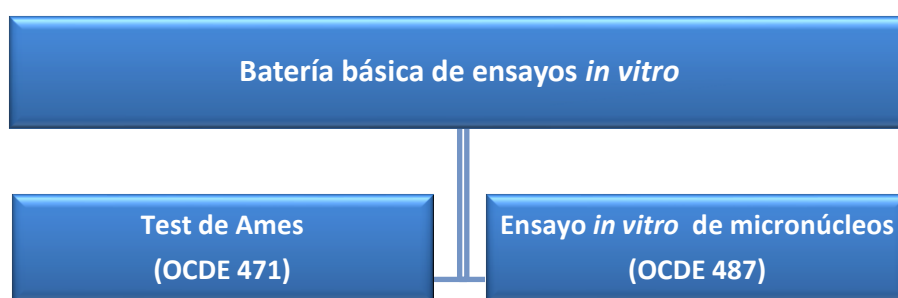
En sus informes, la EFSA proporciona orientación sobre diferentes aspectos como: (I) los requisitos de caracterización físico-química de nanomateriales utilizados como aditivos alimentarios, materiales en contacto con alimentos, aditivos para piensos y plaguicidas entre otros; (II) el conjunto de pruebas básicas para identificar y caracterizar los peligros potenciales de los materiales en evaluación. Entre estos ensayos se incluyen los estudios de genotoxicidad



*in vitro*, punto que nos concierne para el presente estudio. En estas guías se indican todos los aspectos que deben ser considerados para llevar a cabo una correcta y completa evaluación del riesgo (EFSA 2011, 2016).

En este sentido, el Comité Científico de la EFSA (2011) y Kirkland y cols. (2014) recomendaron un enfoque secuencial para evaluar la genotoxicidad de los xenobióticos, comenzando con una evaluación *in vitro* en los diferentes modelos que propone. En función de los resultados, se establecen pruebas *in vivo* que corroboren los datos *in vitro* obtenidos a veces contradictorios o no correlacionados (Glej, 2016).

De los ensayos *in vitro* propuestos por las Autoridades competentes se establecen (**Fig. 4**):



**Figura 4.** Batería de ensayos *in vitro* básicos para la autorización de compuestos.

Test de Ames: el ensayo de mutación inversa en bacterias es el ensayo más utilizado para detectar mutaciones genéticas. La prueba se lleva a cabo en cepas de *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* auxótrofas para la histidina. El principio de esta prueba es que detecta mutaciones que revierten mutaciones presentes originalmente en las cepas de prueba y que restauran la capacidad funcional de las bacterias de sintetizar un aminoácido esencial. El ensayo de mutación inversa en bacterias es rápido, barato y relativamente fácil de realizar (OCDE 471, 1997).

El ensayo *in vitro* de micronúcleos: el ensayo *in vitro* de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (CBMN), un ensayo práctico, universalmente validado y accesible tecnológicamente, es útil para evaluar la inestabilidad genética, efectos citostáticos y la citotoxicidad. Los efectos genotóxicos se manifiestan en células binucleadas (BN) con la formación de micronúcleos (MN) y malformaciones nucleares como los puentes nucleoplásmicos (NPBs) y brotes nucleares (NBUDs) que puede dar información adicional sobre el grado de inestabilidad cromosómica tras la exposición de un tóxico. La exposición a sustancias genotóxicas pueden incrementar los niveles celulares de MN, NPBs, NBUDs, con respecto a las células no tratadas (Fenech, 2007; OCDE 487, 2016).

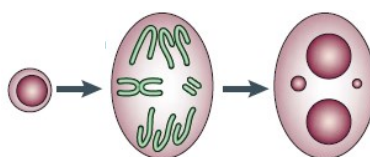
Los efectos citostáticos se miden a través del índice de división nuclear (IDN) contabilizando la proporción de células mono-, bi- y multinucleadas y la citotoxicidad a través de relaciones de células necróticas y / o apoptóticas.

Las malformaciones nucleares se han contabilizado en células BN como describe el protocolo de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) 487 con el fin de evitar errores derivados por la cinética de división celular irregular de las diferentes líneas celulares de estudio *in vitro*. Este dato es una variable importante en protocolos de ensayos de MN que no distingue entre las células que están en división y aquellas que no lo están, y por tanto la posibilidad de expresar alteraciones nucleares (Fenech, 2007).

El bloqueo de la citocinesis se consigue utilizando citocalasina-B (Cyt-B), un inhibidor de la polimerización de actina necesaria para la división del citoplasma en dos células hijas extraído del hongo *Helminthosporium dematoideum* (Zalacain y cols., 2005). Se debe añadir al menos 6 horas antes de que las células entren en la fase M del ciclo celular para que haya el mayor número de células con una división, células BN (Carter, 1967; Fenech, 2007). Transcurrido el tiempo de exposición al tóxico y a Cyt-B, con el fin de evaluar el potencial genotóxico de los compuestos, debemos contabilizar estas anomalías genéticas con respecto a la frecuencia basal:

### 1. Micronúcleos (MN):

Los MN se originan a partir de fragmentos de cromosomas o cromosomas enteros durante la anafase del ciclo de división nuclear (**Fig. 5**)



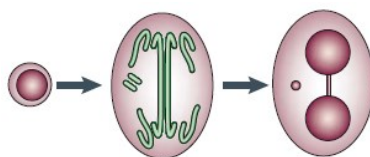
**Figura 5.** Célula binucleada tras una división mitótica con dos micronúcleos incluidos en un mismo citoplasma por acción de la Cyt-B. Tomada de Fenech (2007).

El tamaño suele ser en torno a  $1/3 \sim 1/16$ , pero en las células humanas u otro tipo de células con cromosomas de tamaño heterogéneo no se recomienda discriminar por el tamaño del MN ya que éste puede contener un fragmento de un gran cromosoma o un pequeño cromosoma entero.

## 2. Puentes nucleares (NPBs):

Este método también es útil para medir los NPBs, un biomarcador de errores en la reparación del ADN y/o presencia de cromosomas dicéntricos resultantes de la fusión de los telómeros. Los NPBs indican una medida de reordenamiento cromosómico inconclusa, en el que material cromosómico conecta los núcleos de una célula BN (Thomas y cols., 2003; Fenech, 2007).

Los NPBs suelen tener un ancho variable, por lo general no exceden 1/4 del diámetro de los núcleos de la célula, deben tener las mismas características de tinción como los principales núcleos (**Fig. 6**). Es posible apreciar varios fenómenos de daño genético en una célula, un NPB asociado a uno o varios MN, incluso varios puentes, aunque son casos raros (Fenech, 2007).

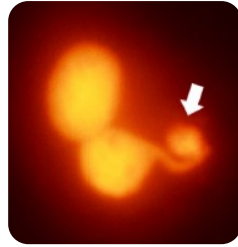


**Figura 6.** Célula binucleada tras una división mitótica con un micronúcleo y un puente nucleoplásmico incluidos en un mismo citoplasma por acción de la Cyt-B. Tomada de Fenech (2007).

## 3. Brotes nucleares (NBUDs):

Otra malformación que se puede visualizar con esta técnica es la formación de NBUDs. Se consideran un biomarcador de amplificación génica (Yankiwski y cols., 2000). Algunos autores como Shimizu y cols. (1998) han mostrado en ensayos *in vitro* con células de mamíferos, que la amplificación del ADN genera estas inestabilidades genómicas localizadas selectivamente en la periferia del núcleo, sin llegar a escindirse completamente dando la apariencia de la gemación de una espora. Otra posible formación está ligada a un déficit de algunas vitaminas como el ácido fólico (en líneas celulares como los linfocitos) ampliamente estudiada (OCDE 487, 2016).

Los NBUDs se caracterizan por tener la misma morfología que un MN con la excepción de que están vinculados al núcleo por un tallo estrecho o amplio de material nucleoplásmico dependiendo de la etapa del proceso (**Fig. 7**). Se ha demostrado que los NBUDs y MN se forman simultáneamente después de la exposición a genotoxinas (Serrano-García y Montero-Montoya, 2001).



**Figura 7.** Célula HepG2 con un NBUD. Tomada de Maisanaba y cols. (2016b).

En la actualidad, se requiere una evaluación caso por caso de la genotoxicidad de estas arcillas modificadas como paso previo a su autorización por las autoridades competentes para estar incluidas en matrices poliméricas destinadas a estar en contacto con los alimentos por medio de un conjunto básico de pruebas (EFSA 2011, 2015). En este sentido, el ensayo *in vitro* de micronúcleos es una de las principales pruebas de genotoxicidad propuestas por el comité científico de la EFSA (2011).

## **2. OBJETIVOS**

Debido a la escasa información sobre el potencial genotóxico de las arcillas organomodificadas, el objetivo del estudio ha sido determinar si Clay3 (montmorillonita modificada con 3-aminopropiltriétoxilano), puede influir en la estabilidad genómica de la línea celular hepática humana HepG2 mediante la determinación de la formación de micronúcleos y otras anomalías nucleares, tales como brotes o puentes nucleares con el ensayo *in vitro* de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis.



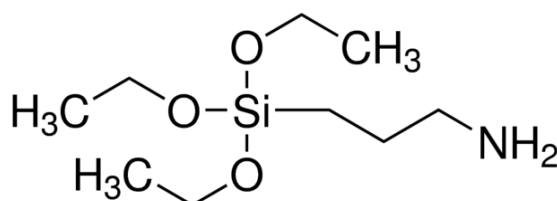
### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Productos químicos

El medio esencial mínimo (MEM), el suero bovino fetal (SBF), los aminoácidos no esenciales (AANE), la penicilina/ estreptomycin, la L –glutamina y la tripsina fueron adquiridos en Gibco (Biomol, España); la solución salina tamponada con fosfato (PBS) , la citocalasina B (Cyt-B), el naranja de acridina (AO), dimetilsulfóxido (DMSO) [CAS 67-68-5], el epóxido (EtO) [CAS 33419-42-0] y el benzo  $\alpha$  pireno (BaP) [CAS 50-32-8], se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, EE.UU).

#### 3.2. Arcilla modificada y caracterización

La arcilla organomodificada Clay3, se ha desarrollado y caracterizado por el Instituto Tecnológico del Embalaje, Transporte y Logística (ITENE). Para el desarrollo de dicha arcilla se ha utilizado el silano 3-aminopropiltriétoxisisilano; CAS [919-30-2], de fórmula molecular ( $H_2N(CH_2)_3Si(OC_2H_5)_3$ ), y peso molecular (221,37 g/mol), el cual ha sido incorporado a la Mt mediante una reacción de silación (**Fig. 8**). La arcilla ha sido caracterizada mediante diversos métodos y seleccionada para ser incorporada al polipropileno con el fin de obtener el material nanocompuesto, de acuerdo a lo descrito en Maisanaba y cols. (2016d).



**Figura 8.** Estructura química del modificador APTES.

#### 3.3. Soluciones de ensayo de la arcilla

Las concentraciones ensayadas de la arcilla fueron seleccionadas de acuerdo con los resultados obtenidos previamente en ensayos de citotoxicidad limitando de tal forma la máxima concentración ensayada a la concentración más alta no citotóxica (Maisanaba y cols., 2015). De tal forma se seleccionó 250  $\mu\text{g/ml}$ , su  $\frac{1}{2}$  y su  $\frac{1}{4}$ . Las soluciones de ensayo (62,5, 125, 250  $\mu\text{g/ml}$ ) se prepararon en medio sin suero a partir de una solución madre de 1000 $\mu\text{g/ml}$ .

Previamente, se realizaron tres pasos de sonicación de 10 s cada uno a una amplitud de 40% utilizando una punta ultrasónica (Dr. Hielscher, Alemania) para dispersar la concentración madre y a partir de ahí preparar las concentraciones de exposición.

### ***3.4. Línea celular seleccionada y mantenimiento***

La línea celular epitelial de carcinoma hepatocelular humano (HepG2) se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EE.UU). Se seleccionó la línea celular HepG2 como modelo experimental *in vitro* ya que se utiliza frecuentemente en los estudios toxicológicos y de expresión génica (Knowles y cols., 1980). Además, el hígado puede ser uno de los órganos diana en el caso que se produzcan efectos tóxicos debido a la llegada de la arcilla al organismo por migración de la misma del envase al alimento. Las células fueron cultivadas en monocapa en medio MEM suplementado con 10% de SBF, 2 mM L -glutamina, 1% AANE y penicilina / estreptomycin (100 U/ml). Las células se cultivaron a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> en atmósfera humidificada. Se utilizaron pases celulares entre 9 y 15.

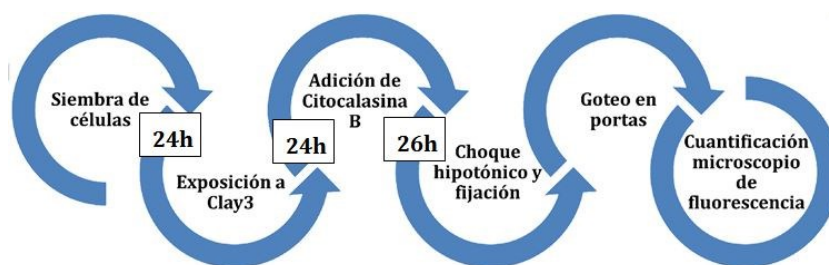
### ***3.5. Ensayo in vitro de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (CBMN)***

El ensayo de CBMN se llevó a cabo siguiendo los pasos descritos por Straser y cols. (2011) y adaptado de la guía OCDE 487 (2016). Esta guía y recomendación de la OCDE reconoce un conjunto de líneas celulares humanas y animales para realizar el ensayo *in vitro* de MN. Entre la líneas celulares humanas se encuentran los linfocitos de sangre periférica o TK6, y líneas celulares de roedores como CHO, V79, CHL / IU y L5178Y. La guía también reconoce la posibilidad de utilizar otras líneas celulares humanas siempre que se cumplan los criterios de aceptabilidad y cuando esté justificada su uso pero en este momento no han sido ampliamente validados. Entre estas líneas se encuentran las células Caco-2 (cáncer de colon) o HepG2 (cáncer de hígado) (Knasmüller y cols., 2004).

Para comenzar el ensayo las células se sembraron a una densidad de  $1,5 \times 10^5$  células. Tras 24h y con una confluencia del 85-90% se retiró el medio, se hicieron dos lavados con PBS y las células fueron expuestas por duplicado a las concentraciones seleccionadas de Clay3 (62,5, 125, 250 µg/ml), a los controles positivos BaP (2,5 µM) y EtO (1 µg/ml) y a medio blanco como grupo control negativo. A las 24h de exposición, se llevó a cabo el tratamiento con Cyt-B durante 26h a una concentración de 3µg/ml diluida en medio MEM fresco. A continuación, se



recogió el medio de cultivo-CytB en un falcon de 15 ml y se hicieron dos lavados con PBS. Seguidamente, se añadió 0,5 ml de tripsina con el fin de hidrolizar las uniones intercelulares y poder recuperar las células tratadas adheridas a los frascos. Se procedió a una centrifugación de 800 rpm durante 5 min y se aspiró el sobrenadante. A continuación, las células se incubaron en una solución hipotónica fría (75mM KCl) durante 5 min, se volvió a centrifugar y se fijaron con una mezcla de metanol / ácido acético (3:1; v/v) y formaldehído al 37%. Las células se extendieron por goteo en portaobjetos, se fijaron, y se secaron al aire. Antes de ser visualizadas, se tiñeron con unas gotas del fluoróforo naranja de acridina a una concentración de 10 µg/ml y se examinaron bajo un microscopio de fluorescencia (Olympus BX61, Japón). Se utilizó una lámpara de vapor de Mercurio de 120W (X-Cite 120PC) a una potencia de 50V, un filtro CY3 (banda estrecha) a 40x / aire y el software CellSens para la adquisición y procesamiento de imágenes (**Fig. 9**).



**Figura 9.** Diagrama del ensayo CBMN

Las muestras obtenidas se codificaron por una persona ajena a la etapa de cuantificación con el fin de no condicionar los resultados obtenidos.

De acuerdo con lo exigido por la guía de la OCDE 487 (2016), durante el análisis se anotó para cada una de las muestras la distribución de 250 células entre células mononucleadas, BN y multinucleadas, contabilizando un total de 1000 células por concentración. Del mismo modo se analizó la frecuencia de MN, NPB y NBUD en 500 células binucleadas/muestra (contabilizando 4 réplicas), analizando un total de 2000 células binucleadas/concentración (Fenech, 2007; OCDE 487, 2016).

Las células contabilizadas debían tener las siguientes características de acuerdo con los criterios de selección expuestos por Fenech (2007) y OCDE 487 (2016):

- Las células binucleadas mantenían su membrana citoplasmática intacta y estaban aisladas unas de otras.

- Las células eran binucleadas (con el fin de disminuir las diferentes cinéticas de división celular) con núcleos de tamaño e intensidad de tinción iguales.
- Los dos núcleos de una célula BN podían tocarse, pero no superponerse entre sí.
- Podían o no contener uno o más MN, NBUDs y NPBs.
- Las células sin citoplasma, necróticas o apoptóticas no fueron incluidas entre las células viables anotadas.

Las alteraciones génicas detectadas y contabilizadas para este ensayo fueron MN, NBUDs y NPBs. Los criterios de inclusión para cada una de ellas se basaron en las premisas indicadas por Fenech (2007) y OCDE 487 (2016):

– **Criterios de contabilización de MN:**

Los MN deben ser considerados un componente independiente del núcleo, de apariencia y características de tinción similares a los núcleos, pero de tamaño menor, entre 1/3 y 1/16 del diámetro del núcleo. Los MN no deben superponerse con otros elementos ni tener contacto con los núcleos.

– **Criterios de contabilización de NPBs:**

Los NPBs conectan los núcleos de una célula binucleada, suelen tener un ancho variable, por lo general no exceden 1/4 del diámetro de los núcleos de la célula, deben tener las mismas características de tinción como los principales núcleos.

– **Criterios de contabilización de NBUDs:**

Los NBUDs se caracterizan por tener la misma morfología de un MN con la excepción de que están vinculados al núcleo. Tienen un patrón de tinción similar a los núcleos de la célula.

Es posible apreciar varios fenómenos de daño genético en una célula binucleada, un NBUD o NPB asociado a uno o varios MN, varios NBUDs o NPBs.

Para el análisis de las muestras es esencial que sea siempre el mismo investigador el que analice todas las muestras durante todo el estudio y el mismo equipo de medida para evitar discrepancias en las medidas y elevados coeficientes de variación (CV).

En los ensayos citogenéticos se permite un aumento del CV (hasta un 40%) frente a los ensayos analíticos (hasta un 10%), debido a que el equipo de medida de las malformaciones genómicas es el ojo humano y puede haber más disparidad en sus anotaciones.

### ***3.6. Estudio estadístico y tratamiento de datos***

Todas las concentraciones seleccionadas fueron ensayadas por duplicado. El programa que se ha empleado para registrar los valores recopilados de frecuencia de las malformaciones genéticas y su representación ha sido Microsoft Excell® 2010.

El análisis estadístico fue llevado a cabo con el programa GraphPad Instat. En el ensayo *in vitro* de CBMN se utilizó la prueba de Chi-cuadrado para comparar el número de células BN con MN, MN totales, NBUDs y NPBs entre el grupo control y las células expuestas a Clay3. Se consideraron diferencias significativas, muy significativas o extremadamente significativas con respecto al grupo control los respectivos valores de p: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .



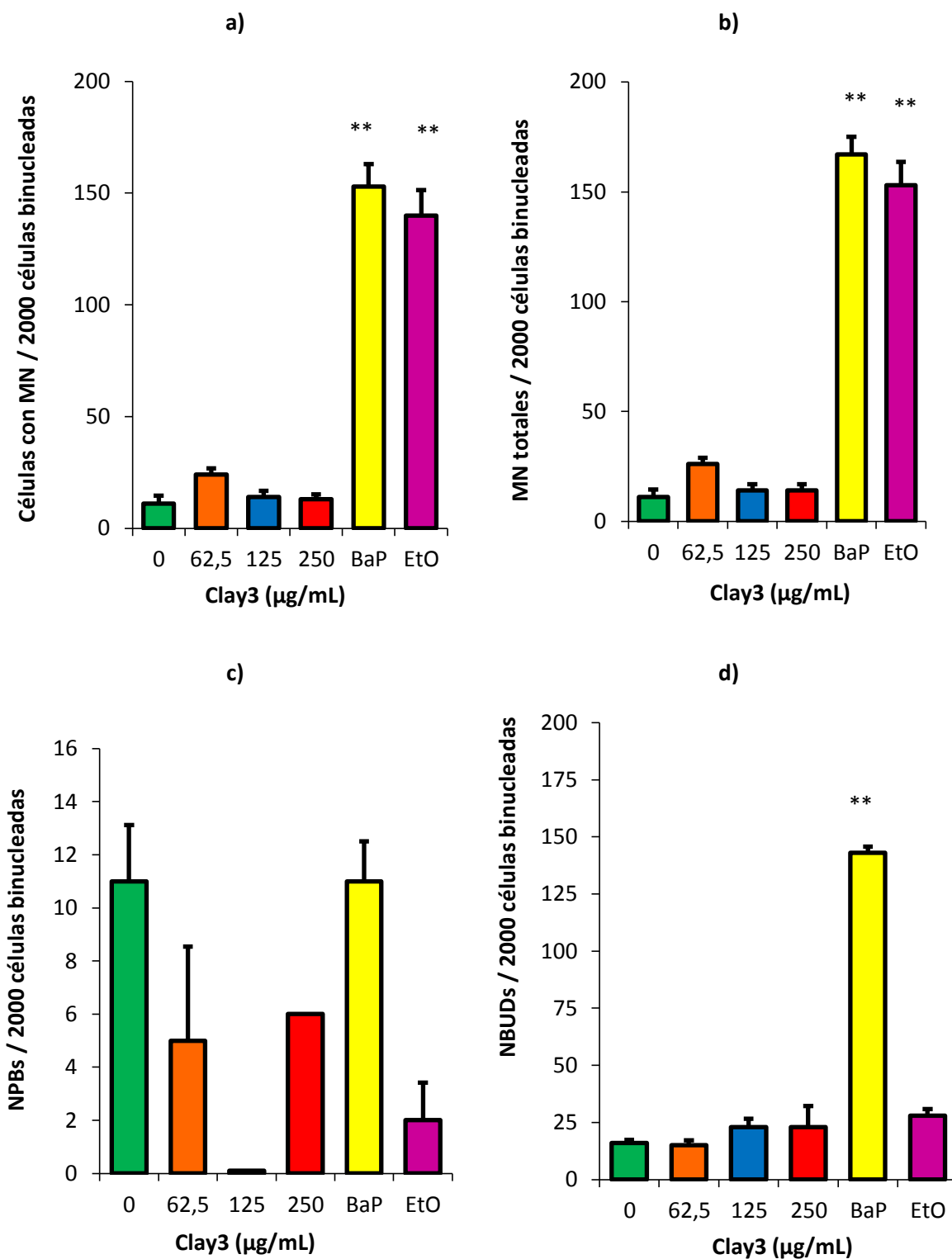
## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las continuas investigaciones de la industria con el fin de obtener nuevos compuestos de uso comercial, deben mostrar previamente su seguridad y estabilidad en los estudios toxicológicos para ser aprobados por las autoridades competentes. A pesar de la gran cantidad de aplicaciones que tienen las arcillas, su toxicidad apenas se ha investigado hasta ahora. En el presente trabajo se ha llevado a cabo uno de los estudios toxicológicos que la EFSA exige realizar con el fin de autorizar los nuevos materiales destinados al contacto con alimentos. El ensayo *in vitro* de CBMN ha demostrado ser una herramienta eficaz para el estudio de la disfunción celular y nuclear, causada por la exposición a sustancias tóxicas (EFSA 2011, 2016).

Clay3, objeto de estudio de este trabajo, es de una arcilla nueva diseñada y sintetizada con el fin de mejorar el perfil tecnológico de polímeros tradicionales. Los datos toxicológicos sobre esta arcilla son escasos, siendo necesaria una exhaustiva evaluación toxicológica con el fin de confirmar la ausencia de toxicidad y poder cumplir con los procesos de autorización y su posible puesta en el mercado.

### ***4.1. Genotoxicidad de Clay3 en HepG2: inducción de micronúcleos, puentes nucleoplásmicos y brotes nucleares***

El potencial genotóxico de Clay3 se evaluó en las células HepG2 utilizando el ensayo *in vitro* de CBMN. Después de 24 h de exposición, Clay3 no indujo un aumento significativo en el rango de concentraciones ensayadas en las frecuencias de células binucleadas con MN, NBUDs, NBPs y de MN totales en las células de hepatoma humano. En el caso de los controles positivos se produjo un aumento de los marcadores estudiados, corroborándose así la sensibilidad del ensayo. Fue destacada la inducción de MN en células binucleadas tras la exposición a BaP y EtO, además del aumento significativo de NBUDs en el caso de la exposición a BaP (**Fig. 10**).



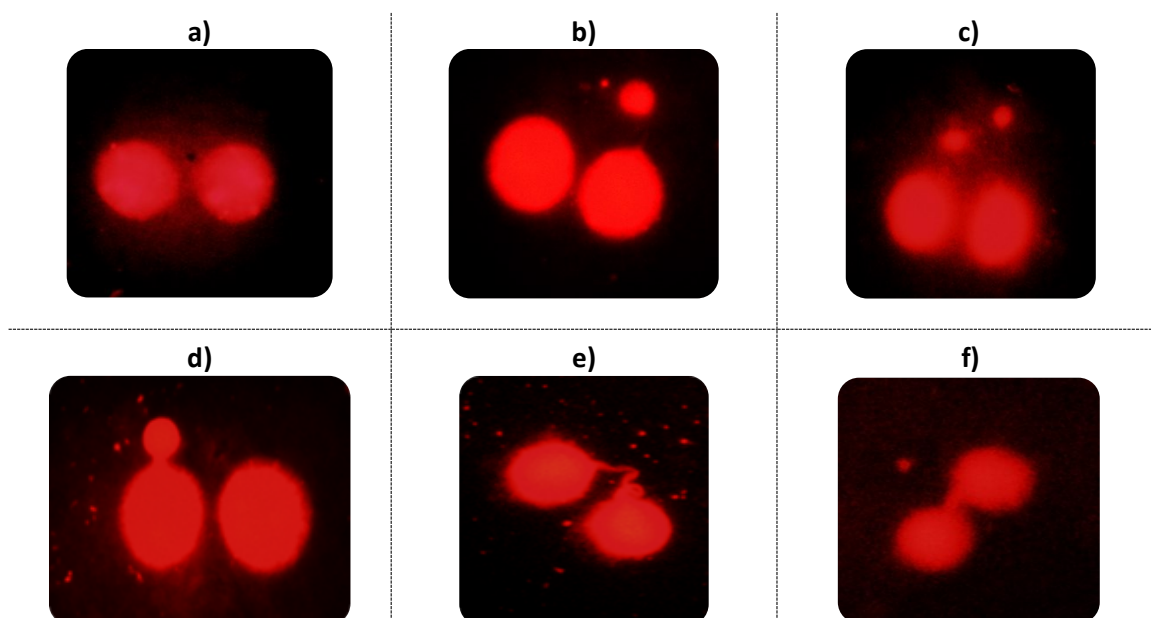
**Figura 10.** Número de **a)** células con micronúcleos (MN), **b)** MN totales, **c)** puentes nucleares (NPBs) y **d)** brotes nucleares (NBUDs) por 2000 células HepG2 binucleadas tras 24h de exposición a Clay3 (0-250 µg/ml). Benzo  $\alpha$  pireno (BAP 2,5 µM) y Etopósido (EtO 1 µg/ml) fueron utilizados como controles positivos. Las diferencias significativas son indicadas mediante \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

Hasta la fecha no existe en la bibliografía información sobre el potencial genotóxico de Clay3 evaluado mediante el ensayo *in vitro* de CBMN. Además, es la primera vez, que se estudia la capacidad genotóxica mediante este ensayo en arcillas organomodificadas con silanos. Otros autores han descrito la ausencia de potencial mutagénico de Clay3, y Clay4, otra arcilla modificada con viniltrimetoxisilano, mediante el test de Ames a concentraciones similares a las estudiadas en el presente trabajo (Maisanaba y cols., 2016e). Estos resultados podrían indicar que la arcilla no supondría un riesgo para el consumidor, sin embargo se debería llevar a cabo una evaluación más completa, no sólo de la arcilla si no de los extractos de migración tras la incorporación de la misma al envase alimentario.

Resultados similares a los obtenidos con Clay3 han sido descritos por Maisanaba y cols. (2016a) en relación a dos arcillas modificadas con sales de amonio cuaternario, Cloisite®30B (C30B), una arcilla ya comercializada, y Clay1, una arcilla desarrollada también por ITENE y aún no comercializada. De forma general, tras la exposición de ambas arcillas en células HepG2 no se obtuvieron diferencias con respecto al grupo control en el caso de los MN totales y células binucleadas con MN bajo las condiciones ensayadas. Únicamente se observó un incremento de NBUDs tras la exposición a Clay1 a la concentración más alta ensayada (8µg/ml). En este caso la correlación con nuestros resultados es muy estrecha, sin embargo cabe mencionar que las concentraciones ensayadas de ambas arcillas difieren mucho de las seleccionadas para nuestro trabajo, por lo que para una comparación directa se debería tener en cuenta el efecto que tendrían Clay1 y C30B a concentraciones similares.

En la literatura también podemos encontrar evidencias de que tanto arcillas no modificadas como arcillas modificadas con sales de amonio cuaternario pueden dar lugar a una inestabilidad génica y por tanto a una inducción significativa de MN y otras malformaciones nucleares.

En la siguiente figura se muestran fotografías de las distintas anomalías genéticas analizadas en el presente ensayo de CBMN (**Fig. 11**):



**Figura 11.** Fotografías de las células HepG2 tras 24h de exposición a Clay3 (0-250  $\mu\text{g/ml}$ ) obtenidas del microscopio de fluorescencia. **a)** célula binucleada sin malformaciones, **b)** célula binucleada con MN, **c)** célula binucleada con dos MN, **d)** célula binucleada con NBUD, **e)** célula binucleada con NBP, **f)** célula binucleada con NBUD y MN.

De tal modo, células HepG2 expuestas a  $\text{CNa}^+$ , nombre comercial de la Mt, han mostrado diferencias significativas con respecto al grupo control en la presencia de MN así como de células binucleadas con MN a la concentración más alta ensayada (62,5  $\mu\text{g/ml}$ ), sin embargo no observaron diferencias notables en la presencia de otras anomalías nucleares estudiadas (Maisanaba y cols., 2016b). Resultados similares fueron encontrados por los mismos autores tras la exposición a una arcilla modificada no comercial, Clay2, en la línea hepatocelular. En este caso, los resultados positivos de presencia de MN también aparecieron a la concentración más alta ensayada (15,6  $\mu\text{g/ml}$ ). Además, se obtuvieron también diferencias significativas en la presencia de NBUDs en el rango de concentraciones ensayadas (3,9 – 15,6  $\mu\text{g/ml}$ ) (Maisanaba y cols., 2016c). Sí cabe mencionar que las concentraciones seleccionadas para Clay2 son mucho más bajas que las estudiadas en el presente trabajo, por lo que la arcilla modificada con sales de amonio cuaternario cuenta con un potencial genotóxico muy acusado en comparación con Clay3.

Como se ha mencionado anteriormente, el ensayo de MN es uno de los incluidos por las Autoridades competentes dentro de la batería de ensayos que se exige en los procesos de autorización. Si bien es un eslabón fundamental en la evaluación del perfil toxicológico de los nuevos materiales destinados a entrar en contacto con alimentos, hay otros muchos ensayos



que lo completan y dan información acerca de la toxicidad presentada por el material objeto de estudio.

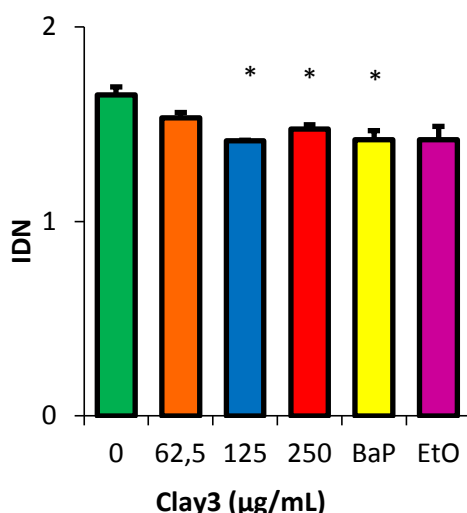
El Test de Ames evalúa la capacidad mutagénica de un compuesto. Diversos autores han descrito tanto la ausencia como la presencia de potencial mutagénico de diversas arcillas (Maisanaba y cols., 2015a; Sharma y cols., 2010). También, se pueden encontrar en la bibliografía estudios enfocados en la evaluación de la capacidad genotóxica de las arcillas mediante el ensayo cometa, evaluando la rotura simple o doble de la hebra de ADN (Houtman y cols., 2014; Maisanaba y cols., 2013; Sharma y cols., 2010).

#### 4.2. Índice de División Nuclear

La frecuencia de células viables mono, bi y multinucleadas se midió para determinar los efectos citostáticos y la tasa de división mitótica a través del índice de división nuclear (IDN). El IDN se calcula de acuerdo con el método de Eastmond y Tucker (1989). Tras contabilizar la frecuencia de núcleos en 500 células HepG2 viables, se aplicó la siguiente fórmula:

$$NDI = \frac{M_1 + 2M_2 + 3M_3 + 4M_4}{N}$$

Donde  $M_1 - M_4$  representan el número de células con 1 - 4 núcleos y N es el número total de células viables anotados (excluyendo células necróticas y apoptóticas).



**Figura 12.** El IDN se calculó en 500 células HepG2 con uno a cuatro núcleos tras exposición a Clay3 (0-250 µg/ml), benzo  $\alpha$  pireno (BaP 2,5 µM) y etopósido (EtO 1 µg/ml).

Los resultados obtenidos muestran que no se obtuvieron cambios significativos en el índice de división nuclear tras exposición a la concentración más baja (62,5 µg/ml) ni en la exposición a EtO. Sin embargo, sí se observaron diferencias significativas en las células HepG2 expuestas a las concentraciones superiores ensayadas de Clay3 y al control positivo BaP (**Fig. 12**). Las distribuciones de células mono, bi y multinucleadas fueron relativamente homogéneas. Los valores del IDN obtenidos nos indican que Clay3 tiene efectos citostáticos e interviene en una correcta división celular tras exposición a las concentraciones más altas.

Distribuciones similares en las tasas de división nuclear se observaron tras exposición a la arcilla organomodificada Clay2, presentando disminuciones ligeramente significativas a la concentración de 7,8 µg/ml al igual que el control positivo BaP, sin embargo EtO no presenta tales disminuciones en el IDN (Maisanaba y cols., 2016c).

Sin embargo, CNa<sup>+</sup> (Maisanaba y cols., 2016b), Clay1 y C30B (Maisanaba y cols., 2016a), no mostraron disminuciones significativas en el IDN mientras que los controles positivos, a las mismas concentraciones que en este ensayo, BaP y EtO sí las produjeron.

Los últimos trabajos están haciendo hincapié en los análisis toxicogenómicos para identificar los cambios de expresión de genes y conocer los mecanismos de toxicidad de las arcillas. Sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuales se afecta la estabilidad genómica y genética de las células permanecen en gran parte desconocidos y por lo tanto hay una necesidad de confirmar aún más los resultados obtenidos en las actividades a nivel de proteínas y enzimas, que sin duda, ayudará a aclarar los mecanismos implicados en la actividad genotóxica (Maisanaba 2016a, 2016b, 2016c).

## 5. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se muestra la ausencia de potencial genotóxico de la arcilla organomodificada Clay3 tras 24h de exposición en las células HepG2 mediante el ensayo *in vitro* CBMN a las concentraciones ensayadas.

No obstante, no se puede garantizar la completa seguridad de Clay3 en su aplicación como material destinado a estar en contacto con los alimentos ya que sería necesario completar la batería de ensayos establecidos por la EFSA para autorizar este tipo de sustancias.

De la comparación de los resultados obtenidos con los datos disponibles en la literatura científica se deduce que es necesaria una evaluación toxicológica (y de la genotoxicidad en particular) caso por caso.

Las futuras investigaciones en relación con Clay3 deberían orientarse a la realización de nuevos ensayos de genotoxicidad basados en fundamentos toxicológicos diferentes, que permitan tener una visión global de la genotoxicidad de esta arcilla. Además, se propone explorar su toxicidad en otras líneas celulares representativas de otros órganos diana de absorción o almacenamiento.



## 6. BIBLIOGRAFÍA

Abacha, N., Kubouchi, M., Sakai, T. Diffusion behavior of water in polyamide 6 organoclay nanocomposites. *Express Polym. Lett.* 2009; 3: 245–255.

Arora, A., Padua, G., W. Review: nanocomposites in food packaging. *J. Food Sci.* 2010; 75: 43–49.

Baker, S.E., Sawvel, A.M., Zheng, N., Stucky, G.D. Controlling bioprocesses with inorganic surfaces: layered clay hemostatic agents. *Chem. Mater.* 2007; 19: 4390–4392.

Carter, S.B. Effects of cytochalasins on mammalian cells. *Natur.* 1967; 213: 261–264.

Choudalakis, G., Gotsis, A.D. Permeability of polymer/clay nanocomposite: a review. *Eur. Polym. J.* 2009; 45: 967–984.

Di Gianni, A., Amerio, E., Monticelli, O., Bongiovanni, R. Preparation of polymer/clay mineral nanocomposites via dispersion of silylated montmorillonite in a UV curable epoxy matrix. *Appl. Clay Sci.* 2008; 42: 116–124.

Eastmond DA, Tucker JD. Kinetochore localization in micronucleated cytokinesis-blocked Chinese hamster ovary cells: a new and rapid assay for identifying aneuploidy-inducing agents. *Mutat Res.* 1989; 224(4): 517–25.

European Food Safety Authority (EFSA) CEF Panel (EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids), 2016. Scientific opinion on recent developments in the risk assessment of chemicals in food and their potential impact on the safety assessment of substances used in food contact materials. *EFSA Journal* 2016; 14(1): 4357–4385.

European Food Safety Authority (EFSA) Scientific Committee. Scientific opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment. *EFSA J.* 2011; 9:2379–2447. Disponible en: <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2379>

European Food Safety Authority (EFSA) Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP); Scientific Opinion on the efficacy of Bentonite (dioctahedral montmorillonite) for all species. *EFSA Journal* 2011; 9(6): 2276–2285.

European Food Safety Authority (EFSA) Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP); Scientific Opinion on the safety and efficacy of bentonite as a technological feed additive for all species. *EFSA Journal* 2010; 10(7): 2787–2801.

European Food Safety Authority (EFSA) Scientific Committee. Scientific opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment. EFSA J. 2011; 9:2379–2447. Disponible en: <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2379>

Fenech, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. Nat Protoc. 2007; 2 (5): 1084-104.

Glei M, Schneider T, Schlörmann W. Comet assay: an essential tool in toxicological research. Arch Toxicol. 2016; 90(10): 2315-36.

Guillard, V., Mauricio-Iglesias, M., Gontard, N. Effect of novel food processing methods on packaging: structure, composition and migration properties. Crit. Rev. Food Sci. 2010; 50: 969–988.

Herrera-Alonso, J.M., Sedláková, Z., Marand, E. Gas transport properties of polyacrylate/clay nanocomposites prepared via emulsion polymerization. J. Membr.Sci. 2010; 363: 48–56.

Houtman, J., Maisanaba, S., Puerto, M., Gutierrez-Praena, D., Jorda, M., Aucejo, S., Jos, A. Toxicity assessment of organomodified clays used in food contact materials on human target cell lines. Appl. Clay Sci. 2014; 90: 150-158.

Jordá-Beneyto, M., Ortuño, N., Devis, A., Aucejo, S., Puerto, M., Gutiérrez-Praena et al. Use of nanoclay platelets in food packaging materials: technical and cytotoxicity approach. FoodAddit. Contam.A. 2014; 3: 354–363.

Kirkland D, Edwards J, Woehrl T, Beilstein P. Investigations into the genotoxic potential of olive extracts. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen. 2014; 1(777): 17-28

Knasmüller, S. Mersch-Sundermann V, Kevekordes S, Darroudi F, Huber WW, Hoelzl et al. Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge, Toxicology. 2004; 1(198): 315-328.

Knowles, B.B., Howe C.C., Aden, D.P. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. Science, 1980; 209 (4455): 497–499.

Maisanaba, S., Puerto, M., Pichardo, S., Jordá, M., Moreno, F. J., Aucejo, S., and Jos, A. *In vitro* toxicological assessment of clays for their use in food packaging applications. Food Chem. Toxicol. 2013; 57: 266–275.

Maisanaba, S., Gutiérrez-Praena, D., Pichardo, S., Moreno, F.J., Jordá, M., Cameán, A.M. et al. Toxic effects of a modified montmorillonite clay on the human intestinal cell line Caco-2. *Appl. Toxicol.* 2014a; 34: 714–725.

Maisanaba, S., Puerto, M., Gutiérrez-Praena, D., Llana-Ruíz-Cabello, M., Pichardo, S., Mate, A. et al. *In vivo* evaluation of activities and expression of antioxidant enzymes in Wistar rats exposed for 90 days to a modified clay. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 2014b; 77: 456–466.

Maisanaba, S., D., Puerto, M., Moyano, R., Blanco, A., Jordá, M.,. Cytotoxicity and mutagenicity studies on migration extracts from nanocomposites with potential use in food packaging. *Food Chem Toxicol.* 2014c; 66: 366-72.

Maisanaba S, Prieto AI, Pichardo S, Jordá-Beneyto M, Aucejo S, Jos Á. Cytotoxicity and mutagenicity assessment of organomodified clays potentially used in food packaging. *Toxicol In vitro.* 2015a;(6): 1222-30.

Maisanaba S., Pichardo S., Puerto M, Gutiérrez-Praena D., Cameán AM., Jos A. Toxicological evaluation of clay minerals and derived nanocomposites: a review. *Environ Res.* 2015b; 138: 233-54.

Maisanaba Hernández, S. Desarrollo y evaluación toxicológica de nuevos materiales para su aplicación en la conservación de alimentos [tesis doctoral]. Sevilla: Universidad de Sevilla, Facultad de Farmacia. 2015c.

Maisanaba S, Jordá-Beneyto M, Cameán AM, Jos Á. Effects of two organomodified clays intended to food contact materials on the genomic instability and gene expression of hepatoma cells. *Food Chem Toxicol.* 2016a; 88: 57-64.

Maisanaba S, Hercog K, Filipic M, Jos Á, Zegura B. Genotoxic potential of montmorillonite clay mineral and alteration in the expression of genes involved in toxicity mechanisms in the human hepatoma cell line HepG2. *J Hazard Mater.* 2016b; 304: 425-33.

Maisanaba S, Hercog K, Ortuño N, Jos Á, Žegura B. Induction of micronuclei and alteration of gene expression by an organomodified clay in HepG2 cells. *Chemosphere.* 2016c; 154: 240-8.

Maisanaba, S., Ortuño N., Jordá-Beneyto M., Aucejo S., Jos A. Development, characterization and cytotoxicity of novel silanes modified clays and nanocomposites intended to food packaging. *Applied Clay Science.* 2016d; 67: 386-92.

Maisanaba S, Llana-Ruíz-Cabello M, Pichardo S, Prieto AI, Cameán AM, Jordá-Beneyto M, et al. Toxicological assessment of two silane-modified clays with potential use as food contact materials in human hepatoma cells and *Salmonella typhimurium* strains. *Toxicology in vitro*. 2016e; en revisión.

Murray, H.H. Structure and compositions of the clay minerals and their physical and chemical properties. In: Murray, H.H. (Ed.), *Developments in Clay Science*, Elsevier. 2007a; (2): 7–31.

Murray, H.H. Introduction. In: Murray, H.H. (Ed.), *Developments in Clay Science*, Elsevier. 2007b; (2): 1–6.

OECD (1997), Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test, OECD Publishing, Paris. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264071247-en>

OECD (2016), Test No. 487: *In vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test, OECD Publishing, Paris. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264264861-en>

Pisticelli, F., Posocco, P., Toth, R., Fermeglia, M., Pricl, S., Mensitieri, G., et al. Sodium montmorillonite silylation: unexpected effect of the aminosilane chain length. *J. Colloid. Interf. Sci.* 2010; 351: 108-115.

Reglamento de la Comisión (UE) 2016/1416 de 24 de agosto de 2016 que modifica y corrige el Reglamento (UE) No. 10/2011 sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos. *Official Journal of the European Union*. Disponible en: <http://data.europa.eu/eli/reg/2016/1416/oj>.

Rhim, J-W., Park, H-M., Ha, C-S. Bio-nanocomposites for food packaging applications. *Progress in Polymer Science*. 2013; 38: 1629-1652.

Serrano-García L, Montero-Montoya R. Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events. *Environ Mol Mutagen*. 2001; 38(1): 38–45.

Sharma, A.K., Schmidt, B., Frandsen, H., Jacobsen, N.R., Larsen, E.H., Binderup, M.L.,. Genotoxicity of unmodified and organo-modified montmorillonite. *Mutat. Res*. 2010; 700: 18–25.

Shimizu N, Itoh N, Utiyama H, Wahl GM. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. *J Cell Biol*. 1998; 140(6): 1307–1320.



Silva, A.A., Dahmouche, K., Soares, B.G. Nanostructure and dynamic mechanical properties of silane-functionalized montmorillonite/epoxy nanocomposites. *Applied Clay Science*. 2011; 54: 151-158.

Sorrentino, A., Gorrasi G., Vittoria V. Potential perspectives of bio-nanocomposites for food packaging applications. *Trends in Food Science & Technology*. 2007; 18, (2): 84–95.

Song, H., Li, B., Lin, Q.B., Wu, H.J., Chen, Y., Migration of silver form nanosilver polyethylene composite packaging into food stimulants. *Food Addit. Contam.* 2011; 28: 1758-1762.

Straser, A., Filipic, M., Zegura, B. Genotoxic effects of the cyanobacterial hepatotoxin cylindrospermopsin in the HepG2 cell line. *Arch. Toxicol.* 2011; 85: 1617-1626.

Thomas P, Umegaki K, Fenech M. Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutagenesis*. 2003; 18(2): 187–194.

Wang, W., Li, Y., Liu, X., Jin, M., Du, H., Liu, Y., et al. Multinucleation and cell dysfunction induced by amorphous silica nanoparticles in an L-02 human hepatic cell line. *Int. J. Nanomed.* 2013; 8: 3533–3541.

Xie, S.Q., Li, Q., Zhang, Y.H., Wang, J.H., Mei, A.H., Zhao, J., Wang, C.J. NPC-16, a novel naphthalimide–polyamine conjugate, induced apoptosis and autophagy in human hepatoma HepG2 cells and Bel-7402 cells. *Apoptosis*. 2011; 16: 27-34.

Xie G, J Sun, Zhong G, L Shi, Zhang D. Biodistribution and toxicity of silica nanoparticles administered intravenously in mice *Arco Toxicology*. 2002; 84: 183-190.

Yankiwski V, Marciniak RA, Guarente L, Neff NF. Nuclear structure in normal and Bloom syndrome cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97 (10): 5214–5219.

Zalacain, M., Sierrasesúmaga, L., Patiño, A. The cytogenetic assay as a measure of genetic instability induced by genotoxic agents. *An. Sist. Sanit. Navar.* 2005; 28 (2): 227-236.



## 7. ANEXOS

Los resultados del presente trabajo han sido publicados como comunicación póster en los siguientes congresos internacionales y nacionales:



### XXXII Congreso Internacional SFML



SEVILLA 2016

14-17 de septiembre de 2016

La Secretaría Científica del XXXII Congreso Internacional de la *Sociedad Farmacéutica del Mediterráneo Latino*

Certifica que D. / D<sup>a</sup>

**Julio Asencio Álvarez**

Ha presentado la Comunicación póster "*Evaluación de la genotoxicidad in vitro de arcillas modificadas con silano*"

**Autores: Asencio J, Maisanaba S, Ortuño N, Cameán AM, Jos A**

Sevilla, 17 de septiembre de 2016

**La Secretaria  
del Congreso**

XXXII CONGRESO INTERNACIONAL  
Sevilla, 14-17 Septiembre 2016

**La Presidente  
del Congreso**

showed that illite [(K, H<sub>3</sub>O) Al<sub>2</sub> (Si<sub>7</sub>Al)O<sub>10</sub> (H<sub>2</sub>O,OH<sub>2</sub>)] (0.1 mg/ml) plus mycotoxin co-treatment produced a significant reduction in LDH release compared to mycotoxin treatment. LDH leakage reduction was 50–52% for AFB1, and 69–54% for FB1. After treatment of Caco-2 cells with the mycotoxins (100 μM), TEER values were decreased, and the co-treatment of illite (0.1 mg/ml) plus mycotoxins produced a significant elevation in the reduction of TEER values. The percentages of increase in the TEER reduction were 66% for AFB1 and 76% for FB1. Studies using animal models are also currently under way to further evaluate and expand on these findings.

**Acknowledgements:** Work supported by Project S2013/ABI-2728 (Programa ALIBIRD-Comunidad de Madrid).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.06.1633>

**P09-032**  
**Health and safety in the consumption of *B. rapa*: A nutraceutical vegetable**



T. Merinas-Amo<sup>1,\*</sup>, Á. Alonso-Moraga<sup>1</sup>, M. Mateo-Fernández<sup>1</sup>, Z. Fernández-Bedmar<sup>1</sup>, A. de Haro-Bailón<sup>2</sup>, M. Lozano-Baena<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Genetics, Gregor Mendel Building, Faculty of Science, University of Córdoba, Córdoba, Spain

<sup>2</sup> Department of Plant Breeding, Institute of Sustainable Agriculture, CSIC, Córdoba, Spain

Current diet is composed by a variety of food adapted to modern living habits. However, recent studies classify some of these meals as undesirable for human health and have produced a growing concern about what we eat and its safety. This is the case of *Brassica rapa*, a vegetable consumed since antiquity for its wholesome properties but now branded as not recommended due to the toxic effects of some of their constituents. Surprisingly, glucosinolate molecules seem to be the responsables of both effects. In order to elucidate the toxicity of this species, we have selected the *in vivo* *Drosophila melanogaster* system as a well proved method to reproduce the human food ingests and the effect of nourishment in the genome. With this purpose, three *B. rapa* accessions selected for their different glucosinolate content were assessed in the Somatic Mutation and Recombination Test (S.M.A.R.T.), as well as gluconapin, the most abundant *B. rapa* glucosinolate. Our results showed difference in *B. rapa* toxicity related to its glucosinolate profile and a dose effect in *Drosophila* survival after gluconapin oral administration. Also, *B. rapa* accession with less gluconapin content resulted genotoxic in the S.M.A.R.T. test, contrarily the other accessions which were evaluated as antigenotoxic together with gluconapin.

In conclusion, the toxic properties of *B. rapa* as edible vegetable have been related to the glucosinolate content present in the plant. In this sense, *B. rapa* accessions with higher gluconapin content exert DNA protection properties and could be recommended for human consumption as safe and healthy.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.06.1634>

**P09-033**  
**Evaluation of the genotoxic potential of modified clays destined to food packaging through the micronucleus assay**



A. Jos<sup>1,\*</sup>, S. Maisanaba<sup>1</sup>, M. Jordá Beneyto<sup>2</sup>, A.M. Cameán<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Area of Toxicology, University of Sevilla, Sevilla, Spain

<sup>2</sup> Area of Packaging Materials and Systems, ITENE, Paterna, Valencia, Spain

The use in food packaging of quaternary ammonium salts modified clays in order to enhance the perdurability of food products is a new trend in the food industry area. In this sense, Clay1 and Cloisite®30B (C30B), two clays based on montmorillonite (Mt) modified with hexadecyltrimethylammonium bromide and methylhydroxylammonium, respectively, have been designed to develop novel packaging materials known as nanocomposites. However, the toxicity information about these new materials intended to be used as food contact material is still scarce. In the present study, the genotoxic potential of the two modified clays has been assessed, being this information an essential requirement to authorize these novel materials. The cytokinesis block micronucleus (CBMN) assay was performed in HepG2 cells, evaluating the genotoxic damage, the micronucleus (MN) presence and other nuclear alterations (buds and bridges), after 24 h of exposure to non-cytotoxic concentrations of Clay1 (0–8 μg/mL) and C30B (0–31.25 μg/mL). The results obtained did not show significant differences compared to the control group at the conditions tested, indicating an absence of genotoxic potential after clays exposure. The CBMN assay is a part from an exhaustive study about the toxicological profile of each clay, being necessary for their future use in the food industry.

**Acknowledgements:** Authors wish to thank to Junta de Andalucía (AGR5969) for the financial support and for the Sara Maisanaba's predoctoral grant. Also, to the Biology Service of CITIUS (University of Sevilla) for providing technical assistance.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.06.1635>

**P09-034**  
**Study of the genomic stability of hepatoma cells exposed to a silane-modified clay**



S. Maisanaba<sup>1,\*</sup>, J. Asencio<sup>1</sup>, N. Ortuño<sup>2</sup>, A. Cameán<sup>1</sup>, Á. Jos<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Area of Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Sevilla, Spain

<sup>2</sup> Area of Packaging Materials and Systems, ITENE, Paterna, Valencia, Spain

The design of novel food packaging materials with improved technical properties in order to enhance the shelf-life of food products is a great option for the food industry. This kind of packaging is known as nanocomposite material, and it is characterized by the presence of modified clays in its structure. Clay3, a silane-modified clay with aminopropyltriethoxysilane has been developed for this aim. However, the information about the toxicity of these novel materials imbued in polymeric matrices is still scarce, being necessary this assessment to avoid future negative effects in the consumers exposed by potential migration from the package to the food. In the present work the genotoxicity of Clay3 has been investigated through the micronucleus (MN) test in the human hepatoma cell line HepG2. The induction of MN and other nuclear abnormalities such as buds and bridges, were analyzed after 24 h of exposure to non cytotoxic concentrations of Clay3 (0–250 μg/mL). The preliminary results obtained did not show a remarkable damage of



## ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGÍA

Secretaría: Área de Toxicología. Facultad de Veterinaria. Campus de Espinardo  
Universidad de Murcia. 30100. Murcia. Teléfono: 868 887022  
FAX: 868 884147. Email: emmaml@um.es. Web: <http://www.aetox.es>  
Inscrita en el Registro Nacional de Asociaciones con el n.º. 33867

Dra. Dña. EMMA MARTÍNEZ LÓPEZ, Secretaria General de la Asociación Española de Toxicología,

CERTIFICA que:



*Asencio J, Maisanaba S, Ortuño N, Cameán AM, Jos A*

Han participado con la **comunicación tipo póster**

**“ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD GENÓMICA DE CÉLULAS DE HEPATOMA  
EXPUESTAS A UNA ARCILLA MODIFICADA CON SILANOS”**

en las Jornadas de Toxicología Españolas e Iberoamericanas 2016, que tuvieron lugar el 30 de Junio de 2016 en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla.

Y para que conste donde proceda, expido el presente a petición del interesado, en Sevilla a 29 de Junio de 2016.



Fdo.: Dra. Dña. Emma Martínez López  
Secretaria General de la AETOX



# EVALUACIÓN DE LA GENOTOXICIDAD IN VITRO DE ARCILLAS MODIFICADAS CON SILANO



*Asencio J<sup>1</sup>, Maisanaba S<sup>1</sup>, Ortuño N<sup>2</sup>, Cameán AM<sup>1</sup>, Jos A<sup>1</sup>*

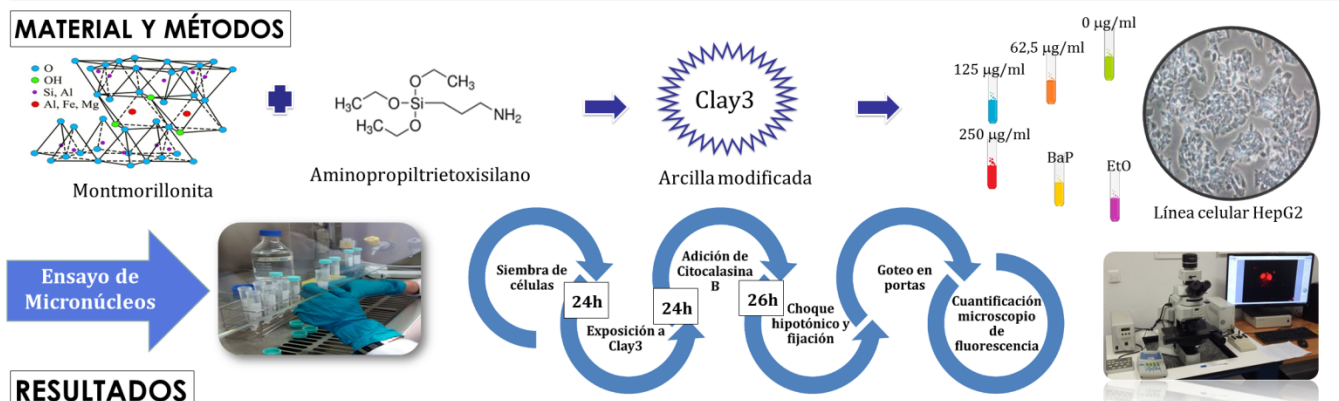
<sup>1</sup>Área de Toxicología, Dpto. de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. Sevilla.

<sup>2</sup>Área de Materiales y Sistemas de Envasado. Instituto de Embalaje, Transporte y Logística (ITENE). Valencia.

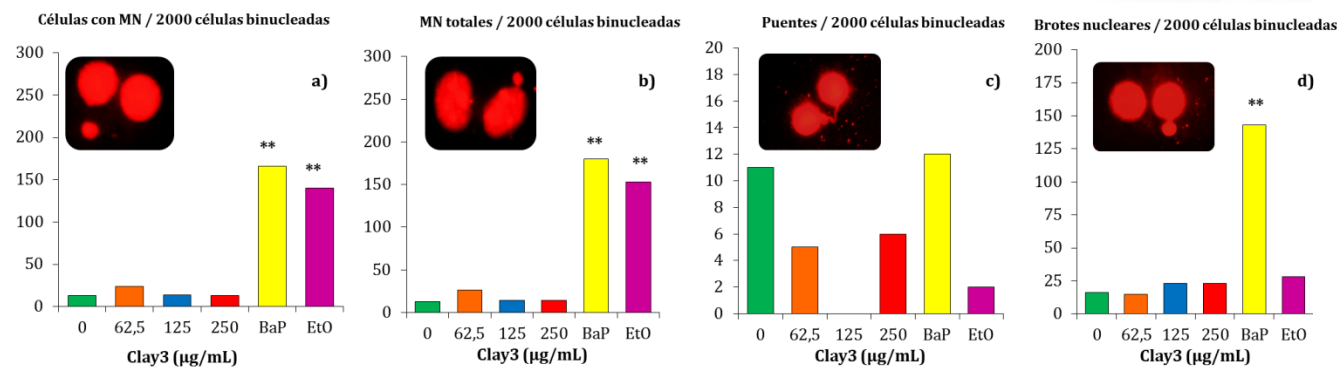
## INTRODUCCIÓN

El desarrollo de nuevos materiales de envasado de alimentos incorporando arcillas modificadas en la matriz polimérica con objeto de aumentar el tiempo de conservación de los alimentos ha supuesto un filón industrial y económico en los últimos años. Estos nuevos materiales nanocompuestos presentan una mejora en sus propiedades de barrera, mecánicas y térmicas debido a la incorporación de dichas arcillas. Sin embargo, poco se sabe acerca del perfil toxicológico de las mismas, siendo indispensable dicha información con el fin de salvaguardar la salud de los consumidores. En este sentido, el objetivo de este trabajo fue evaluar la genotoxicidad de Clay3, una arcilla modificada con silanos. Para ello se llevó a cabo el ensayo de micronúcleos (MN) en la línea celular hepática HepG2.

## MATERIAL Y MÉTODOS



## RESULTADOS



**Figura 1.** Número de **a)** células con micronúcleos (MN), **b)** MN totales, **c)** puentes y **d)** brotes nucleares por 2000 células HepG2 binucleadas tras la exposición durante 24h a Clay3 (0-250 µg/mL). Benzo(a) pireno (BaP 2,5 µM) y Etopósido (EtO 1 µg/mL) fueron utilizados como controles positivos. Las diferencias significativas con respecto al grupo control son indicadas mediante \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

La inducción de MN y otras malformaciones nucleares (puentes y brotes nucleares) se analizaron tras 24h de exposición de las células a concentraciones subcitotóxicas de Clay3 (62,5, 125, 250 µg/mL). No se observaron diferencias significativas con respecto al grupo control en ninguno de los parámetros ensayados. Sí se obtuvieron diferencias notables tras la exposición a los controles positivos (**Figura 1**).

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos con Clay3 a las concentraciones ensayadas, no muestran efectos genotóxicos representativos en el ensayo de micronúcleos con respecto al grupo control. Si bien, es necesario ampliar los datos de este nuevo material para garantizar la seguridad de los consumidores.

## AGRADECIMIENTOS



PROYECTO COFINANCIADO POR LOS FONDOS FEDER  
Referencia del Proy: AGR5969

