



Dióxido de Titanio: toxicidad e importancia en la industria alimentaria y farmacéutica

Universidad de Sevilla

Facultad de Farmacia

Alumna: Marta Jiménez Durán

Tutora: Remedios Guzmán Guillén



Universidad de Sevilla, Facultad de Farmacia

Dióxido de Titanio: toxicidad e importancia en la industria alimentaria y farmacéutica

Alumna: Marta Jiménez Durán

Trabajo de Fin de Grado

Área de Toxicología

Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal

Grado en Farmacia

Sevilla, 7 de junio de 2023

Tutora: Remedios Guzmán Guillén

Revisión bibliográfica

Resumen

El dióxido de titanio (TiO_2) es un pigmento blanco muy utilizado en la industria debido a que confiere un color blanco excepcional y una elevada opacidad y brillo gracias a que tiene la capacidad tanto de absorber como de dispersar la luz ultravioleta (UV). Se emplea en la industria alimentaria como aditivo (E171) y en la industria farmacéutica y cosmética como excipiente opacificante en la elaboración de medicamentos y como filtro UV en protectores solares. Debido a su gran prevalencia en productos de uso cotidiano, sobre todo en forma de nanopartícula (NP), crea preocupación por su seguridad. En este trabajo se aborda el TiO_2 desde el punto de vista de los efectos tóxicos para la salud humana estudiados en diferentes modelos *in vitro* e *in vivo* y para ello se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica de la literatura científica de las bases de datos PubMed y ScienceDirect. Además, esta revisión resume la normativa actual del TiO_2 en Europa. Los resultados obtenidos muestran la existencia de una gran controversia acerca de la toxicidad que las NPs de TiO_2 producen en los humanos. Aunque algunos trabajos afirman que las NPs de TiO_2 no son nocivas para el ser humano, existe una cantidad considerable de estudios que demuestran sus efectos tóxicos, tanto citotóxicos como genotóxicos, en modelos animales. Aún no existe un consenso entre la comunidad científica, pero de momento en Europa se ha prohibido el uso del TiO_2 en los alimentos y se está estudiando la posibilidad de hacer lo mismo con los productos farmacéuticos y cosméticos. Por todo ello, es de gran importancia que se llegue a un acuerdo definitivo sobre la toxicidad de este nanomaterial.

Palabras clave

Dióxido de titanio (TiO_2), toxicidad, exposición, salud humana, normativa UE

Índice de contenido

1. Introducción.....	1
1.1. Dióxido de titanio	1
1.2. Propiedades	2
1.3. Nanopartículas.....	4
1.4. Aplicaciones	5
1.4.1. Aplicaciones en la industria alimentaria	5
1.4.2. Aplicaciones en la industria farmacéutica y cosmética	5
1.5. Toxicidad.....	6
2. Objetivos.....	7
3. Metodología.....	7
4. Resultados y discusión	9
4.1. Vías de exposición.....	9
4.1.1. Exposición por vía pulmonar	10
4.1.2. Exposición por vía oral	10
4.1.3. Exposición por vía tópica.....	11
4.1.4. Exposición por vía parenteral	12
4.2. Potenciales mecanismos de toxicidad	13
4.2.1. Citotoxicidad.....	13
4.2.2. Genotoxicidad	15
4.3. Efectos sobre la salud	16
4.3.1. Sistema respiratorio	16
4.3.2. Sistema digestivo	17
4.3.3. Sistema dérmico.....	20
4.3.4. Otros sistemas	21
4.4. Controversia sobre la toxicidad.....	22
4.5. Normativa, legislación y seguridad	23
4.5.1. El futuro del TiO ₂ como excipiente farmacéutico.....	24
4.5.2. Cambios en la normativa referente a la exposición del TiO ₂ por inhalación	25
5. Conclusiones.....	26
6. Bibliografía.....	27

Índice de tablas

Tabla 1. Características de algunos de los pigmentos blancos más utilizados (Gázquez et al., 2021).....	2
--	---

Índice de figuras

Figura 1. Estructuras cristalinas de los polimorfos del TiO ₂ en (a) rutilo, (b) anatasa y (c) brookita (Samat et al., 2016)	1
Figura 2. Fenómenos fotoelectroquímicos en TiO ₂ expuesto a la luz UV (Racovita, 2022)	3
Figura 3. Fotoexcitación del TiO ₂ y generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) (Musial et al., 2020).....	4
Figura 4. Artículos encontrados sobre el dióxido de titanio en relación a la toxicidad, exposición y salud humana en las bases de datos de PubMed y ScienceDirect en los últimos 15 años.....	8
Figura 5. Toxicocinética y lugares de acumulación de las NPs de TiO ₂ . Las flechas discontinuas indican incertidumbres (Shakeel et al., 2016)	9
Figura 6. Mecanismos de toxicidad de la reacción de las NPs de TiO ₂ con las células (Rashid et al., 2021).....	14
Figura 7. Mecanismos de la posible genotoxicidad de las NPs de TiO ₂ en las células (Ling et al., 2021)	15
Figura 8. Vía postulada de resultados adversos del TiO ₂ tras la ingestión y relacionada con la inflamación y la carcinogenicidad. Abreviaturas: ROS: especies reactivas del oxígeno; PAMP: patrones moleculares asociados a patógenos; LPS: lipopolisacáridos; EII: enfermedad inflamatoria intestinal; NLRP3: proteína 3 que contiene dominios NOD, LRR y pirina; TLR: receptor tipo Toll (Bischoff et al., 2021).....	18

1. Introducción

1. 1 Dióxido de titanio

Actualmente el dióxido de titanio (TiO_2) es considerado el pigmento blanco más importante del mercado debido a que confiere un color blanco excepcional y una elevada opacidad y brillo gracias a su capacidad de dispersar la luz. Además, su inercia química, bajo coste y elevada disponibilidad hace que sea ampliamente utilizado, especialmente en pinturas y revestimientos (57%-58%), en plásticos y caucho (24%-25%), en papel (12%), en tintas (6%) y en la industria textil, farmacéutica y cosmética (3%) (Gázquez et al., 2021).

El TiO_2 es un compuesto inorgánico polimorfo y simple, que existe en tres formas cristalinas fundamentales: anatasa, rutilo y brookita (Figura 1). Estas estructuras cristalinas se ensamblan en octaedros de manera que seis aniones de oxígeno son compartidos por tres cationes de titanio (IV). Al expandirse en un espacio tridimensional, estas unidades octaédricas se organizan y distorsionan de forma diferente en cada polimorfo, lo que da lugar a distintos patrones de cristalinidad. Por tanto, los tres polimorfos difieren en forma, estructura, densidad e índice de refracción.

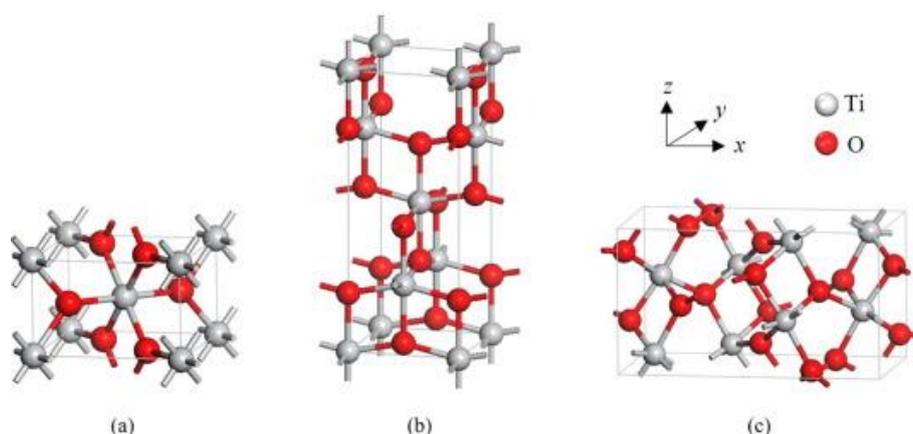


Figura 1. Estructuras cristalinas de los polimorfos del TiO_2 en (a) rutilo, (b) anatasa y (c) brookita. Tomado de Samat et al., 2016.

Actualmente, el TiO_2 se comercializa en forma de rutilo y anatasa debido a que la brookita es poco frecuente y, aunque se ha preparado en laboratorio, carece de interés comercial. El rutilo es la forma más estable y, por tanto, la más abundante. Tiene un punto de fusión de 1825°C , un índice de refracción más alto, un peso específico más elevado y una mayor estabilidad química que la anatasa (Banerjee, 2011; Gázquez et al., 2021; Racovita, 2022).

1.2 Propiedades

El TiO_2 es un polvo fino de color blanco que se utiliza principalmente como pigmento por su brillo y poder opacificante (poder cubriente). Es resistente a los ataques químicos y presenta una excelente estabilidad térmica, pero lo más importante es que tiene la capacidad tanto de absorber como de dispersar la luz ultravioleta (UV) (Musial et al., 2020).

El índice de refracción mide la capacidad que tiene una sustancia para dispersar la luz. El TiO_2 posee el índice de refracción más alto de todos los pigmentos blancos conocidos, lo que significa que es el que tiene mayor opacidad. Esto se traduce en que se necesitan cantidades relativamente bajas de TiO_2 para conseguir un recubrimiento blanco opaco. En la Tabla 1 se muestran las características de algunos de los pigmentos blancos más utilizados. El rutilo refleja la luz de forma más eficiente que la anatasa, lo que lo convierte en el pigmento de elección. Por el momento no existe en el mercado ningún pigmento alternativo en cantidades suficientes y con propiedades similares que pueda igualar la opacidad, el poder cubriente, la rentabilidad, la inercia o la resistencia a los factores ambientales del TiO_2 (Gázquez et al., 2021).

Tabla 1. Características de algunos de los pigmentos blancos más utilizados. Tomado de Gázquez et al., 2021.

Pigmentos	Índice de refracción	Peso específico	CI
Blanco de plomo (*)	1.94-2.09	6.70-6.86	CI Pigmento Blanco 1 n° 77597
Blanco de cinc (blanco chino u óxido de cinc)	2.08	5.5-5.6	CI Pigmento Blanco 4 n° 77947
Sulfuro de cinc	2.37	4.0	CI Pigmento blanco 7 n° 77975
Anatasa	2.53	3.70-3.85	CI Pigmento blanco 6 n° 77891
Rutilo	2.71	3.7-4.2	CI Pigmento blanco 6 n° 77891
Litopón (30% de sulfuro de cinc)	1.84	4.3	CI Pigmento blanco 5 n° 77115

Óxido de antimonio	2.08-2.35	5.6-5.7	CI Pigmento blanco 11 n° 77052
Arcilla china (conocida como bentonita o arcilla de caolín)	1.57	2.6	CI Pigmento blanco 19 n° 77004
Blanco fijo (sulfato de bario)	1.6	4.0-4.4	CI Pigmento blanco 21 n° 77120

(*) Blanco sulfato de plomo CI Pigmento Blanco 2 n° 77633, Blanco sulfato de plomo básico CI Pigmento Blanco 3 n° 77630. *CI, Índice de color.*

El TiO_2 presenta absorción óptica en la región de luz ultravioleta (UV), en una región de absorción de 300 a 400 nm. Esta propiedad contribuye a que absorba la luz en condiciones débiles o difusas (Samat et al., 2016).

El TiO_2 posee propiedades semiconductoras y es capaz de absorber la luz UV gracias a la estructura de bandas que presenta (Figura 2). La brecha energética (E_G) se encuentra entre la banda de valencia y la banda de conducción. Su valor es igual o menor que la energía de los fotones UV y puede actuar como una barrera para la transferencia de electrones. El TiO_2 muestra valores de E_G de 3,1 eV para el rutilo y de 3,3 eV para la anatasa. Al iluminar el TiO_2 con luz UV, se produce un proceso de excitación de electrones que da lugar a huecos positivos en la banda de valencia (h^+_{VB}) y fotoelectrones elevados en la banda de conducción (e^-_{CB}). Estos fotoelectrones pueden ayudar a reducir moléculas adsorbidas en la superficie del catalizador, mientras que los huecos positivos pueden oxidarlas (Racovita, 2022).

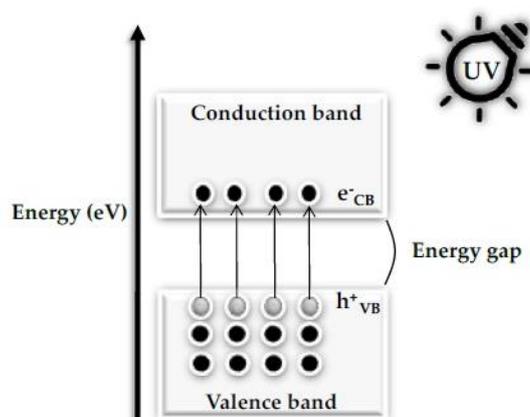


Figura 2. Fenómenos fotoelectroquímicos en TiO_2 expuesto a la luz UV. Tomado de Racovita, 2022.

Como consecuencia, se produce la formación de radicales hidroxilo, radicales superóxido y peróxido de hidrógeno (Figura 3), los cuales constituyen un grupo de especies reactivas de oxígeno (EROs). Un exceso en el organismo de EROs puede llevar a la aparición de estrés oxidativo. La anatasa es la forma cristalina más fotoactiva del TiO_2 debido a que su estructura electrónica es la que presenta un mayor hueco de banda (Musial et al., 2020).

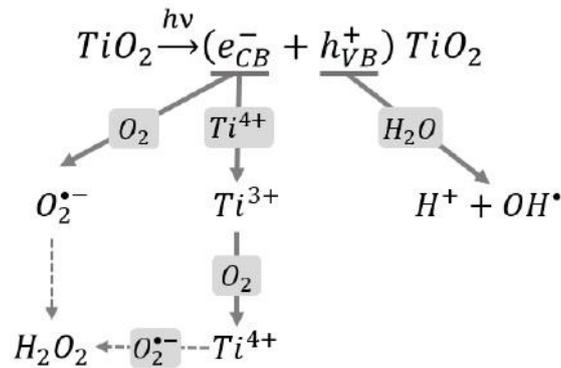


Figura 3. Fotoexcitación del TiO_2 y generación de especies reactivas de oxígeno (EROs). Tomado de Musial et al., 2020.

1.3 Nanopartículas de TiO_2

El tamaño del TiO_2 puede variar de algunas decenas a varios centenares de nanómetros, por lo que existe en forma de macropartículas, micropartículas o nanopartículas (NPs). Las nanopartículas de TiO_2 (NPs de TiO_2) son uno de los nanomateriales más fabricados del mundo, y tienen un diámetro inferior o igual a 100 nm. Esta disminución de tamaño conlleva un aumento de átomos superficiales y una mayor relación superficie/volumen en comparación con las macro o micropartículas, por ello las NPs son capaces de absorber mejor la luz. Existe un aumento considerable de la absorción de la luz en NPs pequeñas en las que la relación superficie/volumen es muy elevada y la fracción de átomos superficiales es suficientemente grande. El tamaño a partir del cual la mejora de la absorción de la luz es significativo es de unos 20 nm. Además, las NPs de TiO_2 también presentan la ventaja de dispersar los fotones UV con mayor eficacia que las macro o micropartículas (Banerjee, 2011; Musial et al., 2020; Racovita, 2022).

Sorprendentemente, la disminución del tamaño de partícula de las NPs de TiO_2 a materiales más pequeños de unos 10 nm o menos cambia las propiedades ópticas de estas NPs de opacas a transparentes en la región visible del espectro de luz y, posteriormente, a bloqueadores de la luz UV (Dar et al., 2020).

1.4 Aplicaciones

Las características del TiO₂ dependen de la fase cristalina, el tamaño y la forma de las partículas. El TiO₂ se utiliza sobre todo en forma de polvo y tiene dos aplicaciones principales, como pigmento (la dispersión de la luz es máxima en partículas de 200 a 300 nm de diámetro) o como fotocatalizador (con un tamaño medio de partícula primaria de 10 a 50 nm) en una gran variedad de productos acabados, como pinturas, cosméticos (protectores solares), medicamentos, dentífricos, productos alimenticios y productos de construcción (Boutillier et al., 2020).

1.4.1 Aplicaciones en la industria alimentaria

En el sector alimentario, el TiO₂ se utiliza como aditivo alimentario y se denomina E171 en la Unión Europea e INS171 en Estados Unidos. Se utiliza habitualmente para aumentar la opacidad, el brillo y la blancura de muchos alimentos. Su uso está autorizado en formulaciones de cremas para espesar su textura, y en pescado, bebidas instantáneas y productos de confitería para realzar su sabor. A pesar de su presencia en muchos alimentos, el E171 es un aditivo sin valor nutricional (Racovita, 2022).

Para actuar como pigmento blanqueador, se espera que la distribución de tamaños se centre en un tamaño medio de 250 nm para obtener un efecto óptimo. Por lo tanto, el E171 no debería contener NPs. Sin embargo, la proporción de NPs dentro de algunas muestras de E171 puede variar de 0 a 39 % en número y de 0 a 3,2 % en masa (EFSA, 2016). Esto crea incertidumbre con respecto a la consideración del E171 como nanomaterial. Según su contenido en NPs y la definición de nanomaterial de la Comisión Europea (2011/696/EU) ((EUR-Lex, 2011), el E171 no puede considerarse un nanomaterial. Pero según otras normativas, la existencia de NPs, sea cual sea su cantidad, debe indicarse en los productos. De hecho, el artículo 18 del Reglamento Europeo n° 1169/2011 (reglamento INCO) indica que “todos los ingredientes presentes en forma de nanomateriales artificiales deberán indicarse claramente en la lista de ingredientes” (Boutillier et al., 2020).

1.4.2 Aplicaciones en la industria farmacéutica y cosmética

En la industria farmacéutica el TiO₂ puede utilizarse de diferentes maneras: como colorante (para dar color blanco al medicamento), como opacificante (para proteger los compuestos que son fotosensibles y que pueden ser vulnerables a la degradación por la

luz UV) y en el envasado (para prolongar la vida útil de los medicamentos y evitar que se produzcan degradaciones prematuras debido a la humedad, el calor o la luz). Para este tipo de aplicaciones es necesario emplear el TiO₂ en forma de NPs (Gázquez et al., 2021; Palugan et al., 2022).

En cuanto a la industria cosmética, actualmente las NPs de TiO₂ son las nanoestructuras más utilizadas en los protectores solares disponibles en el mercado debido a su capacidad para reflejar y difundir la radiación ultravioleta A (UVA, 320-400 nm) y ultravioleta B (UVB, 290-320 nm). De esta forma las NPs de TiO₂ protegen la piel de las quemaduras solares y el fotoenvejecimiento (Sanches et al., 2020).

Cabe destacar que recientemente se han desarrollado nuevas aplicaciones de las NPs de TiO₂ en ingeniería de tejidos cutáneos y vendaje de heridas (Babitha y Korrapati, 2017) y como vehículo de fármacos mediante el uso de nanotubos de TiO₂ (Kunrath et al., 2019; Wang et al., 2016).

1.5 Toxicidad

Teniendo en cuenta que las NPs de TiO₂ se utilizan de forma generalizada y habitual en muchos ámbitos de la industria, el riesgo de exposición aumenta, por lo que debería estudiarse con detalle el efecto que estas NPs puedan causar en los seres humanos (Baranowska-Wójcik et al., 2020).

El uso extensivo de las NPs de TiO₂ crea preocupación debido a su potencial toxicidad inducida por el estrés oxidativo, en el que influye la formación de EROs en la superficie de las NPs de TiO₂ en presencia de la luz UV. Estas NPs pueden ingresar en el cuerpo humano por diferentes vías, como la pulmonar (inhalación), la oral (ingestión), la tópica (piel) y la parenteral (inyección). Una vez dentro del organismo, las NPs de TiO₂ podrían inducir inflamación, citotoxicidad, genotoxicidad, inmunotoxicidad y neurotoxicidad. El destino final de estas NPs en el organismo depende de su tamaño y carga superficial. Los principales órganos diana donde se produce la acumulación de las NPs de TiO₂ son el hígado, el riñón, los pulmones y la piel (Rashid et al., 2021; Zhang, 2015).

Aunque hoy en día se dispone de una cantidad considerable de bibliografía sobre la toxicidad de las NPs de TiO₂, sigue habiendo mucha incertidumbre, ya que muchos de los resultados obtenidos son tan contradictorios que no se pueden extraer conclusiones claras. Es probable que esto se deba a que la toxicidad de las NPs de TiO₂ se ve afectada

por muchos factores, como sus propiedades fisicoquímicas y las diferencias metodológicas experimentales (Chen et al., 2022).

2. Objetivos

Dada la importancia y la alta frecuencia a la que los seres humanos nos vemos expuestos al TiO₂, el presente trabajo tiene como objetivo principal estudiar y recopilar, mediante revisión bibliográfica, los aspectos más relevantes sobre el TiO₂, haciendo especial hincapié en sus efectos tóxicos y en la potencial repercusión que éstos puedan tener en la población humana.

Para ello se abordaron los siguientes objetivos específicos:

- Conocer las propiedades y la importancia que tiene el TiO₂ en la industria alimentaria y farmacéutica.
- Conocer las principales fuentes de exposición del ser humano al TiO₂.
- Estudiar los mecanismos de toxicidad del TiO₂.
- Estudiar las posibles repercusiones para la salud humana de la exposición al TiO₂.
- Conocer la normativa y legislación vigentes de las autoridades implicadas en la evaluación de la seguridad del TiO₂.

3. Metodología

Los datos utilizados para la realización del presente trabajo se obtuvieron tras una búsqueda bibliográfica en las bases de datos Pubmed, ScienceDirect y Google.

Para la búsqueda de artículos se utilizaron los términos “titanium dioxide”, “toxicity”, “exposure” y “human health” con el conector AND, y se filtró la búsqueda para que solo aparecieran los artículos publicados en los últimos 15 años.

ARTÍCULOS ENCONTRADOS SOBRE EL DIÓXIDO DE TITANIO

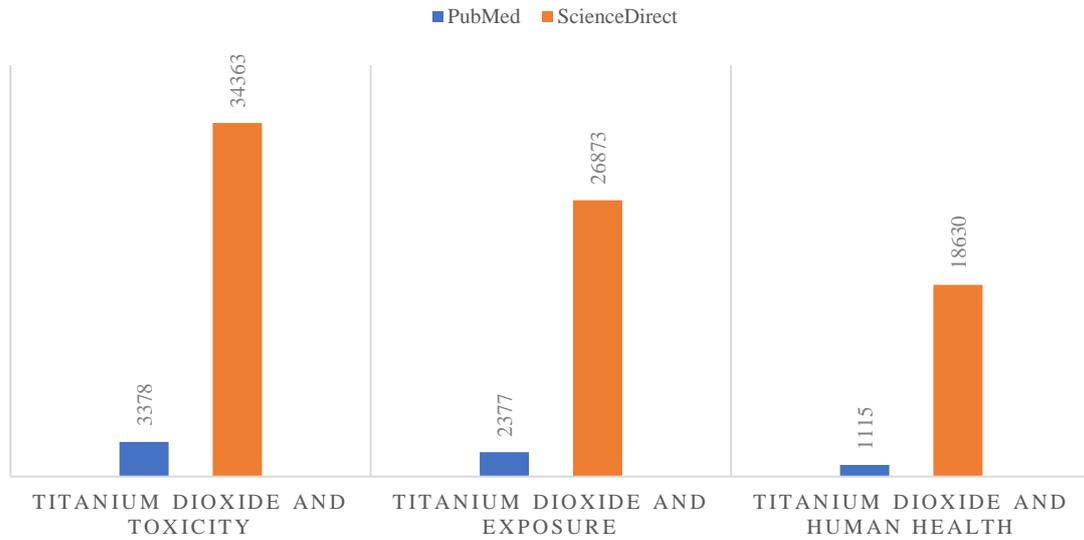


Figura 4. Artículos encontrados sobre el dióxido de titanio en relación a la toxicidad, exposición y salud humana en las bases de datos de PubMed y ScienceDirect en los últimos 15 años

Así mismo, como búsqueda secundaria, también se examinaron las referencias bibliográficas de los artículos que fueron seleccionados en la búsqueda original con el objetivo de identificar documentos no detectados.

4. Resultados y discusión

4.1 Vías de exposición

Los seres humanos pueden estar expuestos a NPs de TiO_2 tanto durante el proceso de fabricación y manipulación como durante el uso de productos que contienen estas NPs (alimentos, medicamentos, cosméticos, etc.). La exposición a NPs de TiO_2 puede producirse en forma de aerosoles, suspensiones o emulsiones (Shakeel et al., 2016).

Existen cuatro vías principales de exposición a las NPs de TiO_2 en los seres humanos: la pulmonar (inhalación), la oral (ingestión), la tóptica (piel) y la parenteral (inyección). La absorción, distribución, metabolismo y excreción de las NPs de TiO_2 pueden verse afectadas por diversos factores, como las vías de exposición y el tamaño de las partículas, su aglomeración y el recubrimiento de su superficie. Sea cual sea la vía de exposición a las NPs de TiO_2 , una vez que entran en el sistema circulatorio, las NPs son transportadas a diversas partes del cuerpo (Figura 5) (Shi et al., 2013).

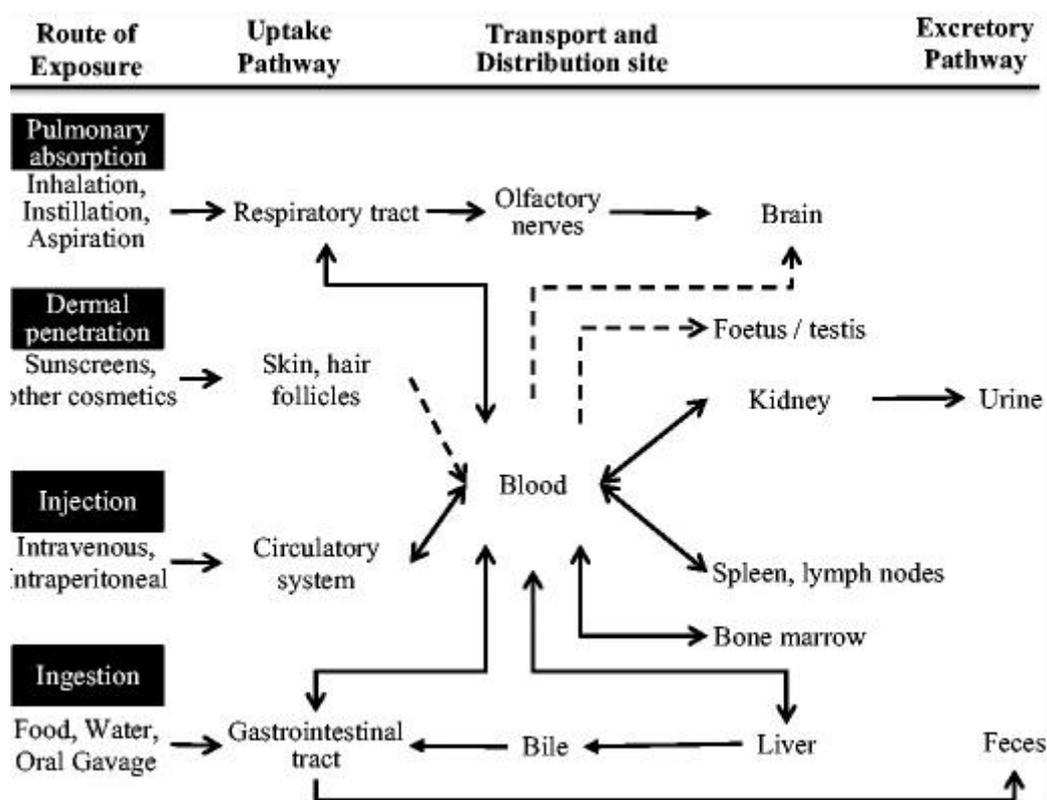


Figura 5. Toxicocinética y lugares de acumulación de las NPs de TiO_2 . Las flechas discontinuas indican incertidumbres. Tomado de Shakeel et al., 2016.

4.1.1 Exposición por vía pulmonar

Las NPs pueden liberarse fácilmente en el aire en forma de aerosol y, en general, se considera que la inhalación es la vía principal de exposición laboral a las NPs. Las exposiciones a éstas generalmente ocurren como agregados y aglomerados de partículas cuando se inhalan en el tracto respiratorio (Pujalté et al., 2017).

Cuando se inhalan las NPs de TiO₂, se transportan a diversos tejidos pulmonares, capilares, vías respiratorias y alvéolos y se distribuyen al corazón, el hígado, el sistema nervioso, etc. Según la duración y la concentración de la inhalación, las NPs de TiO₂ se eliminan a corto y/o largo plazo de los compartimentos corporales. Por inhalación, las partículas más finas, como las de la forma anatasa, tienen un efecto más tóxico que las de la forma de rutilo, que comparativamente son de mayor tamaño. Para un umbral de inhalación a corto plazo, de un solo ciclo, se asume un valor de 3,5 mg/m³ para aplicaciones de pulverización. Para la inhalación repetida, se asume un umbral de 17 mg/m³ para una jornada laboral de 8 horas. No obstante, se ha demostrado que una concentración por inhalación de hasta 35 mg/m³ no provoca una sobrecarga pulmonar crónica (Christensen et al., 2011; Shakeel et al., 2016; Warheit y Donner, 2015).

Actualmente, la inhalación de NPs de TiO₂ también puede producirse a través del uso de protectores solares en forma de aerosol. Se trata de emulsiones, espumas y nieblas. Estas formas pulverizadas son cada vez más comunes entre los consumidores por su facilidad de uso. Cabe destacar que los niños son especialmente susceptibles de sufrir inhalaciones involuntarias de NPs de TiO₂, ya que este tipo de formulaciones hacen que los protectores solares sean más fáciles de dispensar y extender (Musial et al., 2020).

4.1.2 Exposición por vía oral

El TiO₂ se utiliza como aditivo alimentario y puede encontrarse en dulces, cremas de café, chicles, salsas, suplementos nutricionales, pasta de dientes y productos farmacéuticos. La anatasa es la estructura cristalina de TiO₂ predominante utilizada como E171 y, por lo tanto, la principal fuente de exposición para la población general. La ingesta de E171 varía entre diferentes grupos de edad y países, mientras que los niños, en general, son el grupo más expuesto, debido a su menor masa corporal y al consumo desproporcionadamente mayor de productos que contienen E171. Las concentraciones más altas de E171 se encuentran en los chicles, los caramelos y las coberturas de azúcar en polvo, como los glaseados. La ingestión accidental de pasta de dientes durante el

cepillado es otra fuente importante de ingesta de E171. La liberación adicional de partículas de TiO_2 procedentes de materiales de envasado de alimentos o productos relacionados con la alimentación, como sartenes, también puede contribuir a la ingestión de TiO_2 . La ingesta alimentaria diaria de E171 puede alcanzar varios cientos de miligramos, de los cuales al menos el 10-40 % se encuentran en forma de NPs de TiO_2 . La exposición a largo plazo a tales cantidades de TiO_2 de tamaño nanométrico y micrométrico genera una gran preocupación por el riesgo de acumulación en los órganos y los efectos potencialmente nocivos que esto podría tener para la salud humana (Bischoff et al., 2020).

La exposición oral a las NPs de TiO_2 está asociada no sólo a la ingestión de E171, sino también al consumo de productos farmacéuticos. El TiO_2 es un excipiente farmacéutico muy común utilizado sobre todo como pigmento blanco. Asimismo, en forma de NPs puede ser un eficaz portador de antibióticos, que además potencia o prolonga la acción del fármaco (Kotrange et al., 2021; Mottola et al., 2019).

La cavidad bucal está muy expuesta a las NPs de TiO_2 . La penetración de estas NPs en los tejidos de la cavidad bucal depende de las características físicas de las partículas y especialmente de su tamaño, pero no de su forma cristalina. En el tracto gastrointestinal las NPs de TiO_2 son absorbidas tras su ingestión. Son capaces de atravesar barreras intestinales sanas y no sanas, aunque la absorción de NPs de TiO_2 ingeridas a través de una barrera intestinal sana parece ser muy baja. En el paso de las NPs de TiO_2 a través del epitelio intestinal pueden intervenir tres vías diferentes: la vía linfática, que es la más probable, en la que las NPs son absorbidas por las células M y pasan a los tejidos linfoides, la vía paracelular y la vía transcelular a través de los enterocitos. Tras su absorción por el tracto gastrointestinal, las NPs de TiO_2 pueden ser transportadas y acumularse en distintos órganos. Se distribuyen principalmente en el hígado, los riñones, el bazo y los pulmones, y en pequeñas cantidades en el corazón, el cerebro y los testículos. Estas NPs quedan retenidas en los órganos durante bastante tiempo y finalmente acaban siendo excretadas a través de la orina y las heces (Baranowska-Wójcik et al., 2020; Cornu et al., 2022).

4.1.3 Exposición por vía tópica

Las NPs de TiO_2 se emplean como filtro UV en protectores solares y cosméticos (cremas, bálsamos labiales, maquillaje, etc.). La mayoría de los estudios realizados en humanos o animales demostraron que las NPs de TiO_2 no atraviesan el estrato córneo, la capa

epidérmica más externa, y que el número de partículas que consiguen atravesarla es insignificante. El estrato córneo es la capa más superficial de la piel y constituye una barrera frente a la absorción de las sustancias químicas a través de la piel, y está formada por células muertas incapaces de transportar sustancias de forma activa. Por tanto, las NPs de TiO₂ no penetran más allá de la capa externa del estrato córneo a las células viables de la epidermis o la dermis y no llegan a la circulación sistémica (Dréno et al., 2019; Shakeel et al., 2016).

Sin embargo, recientemente han aparecido estudios que confirman que las NPs de TiO₂ pueden penetrar en el organismo a través de la piel (Pelclova et al., 2019).

También existen discrepancias sobre la posible absorción de NPs de TiO₂ a través de la piel dañada. Los protectores solares suelen aplicarse sobre piel ya quemada por el sol, reseca por la irradiación UV, afectada por procedimientos de belleza (como la depilación) o irritada por factores ambientales (como el viento, la sal y la arena). En general, debe tenerse en cuenta que cualquier cambio en la composición de los lípidos causado por daños en la piel puede perjudicar la función de barrera de la piel y, por tanto, facilitar la penetración de las NPs. Hasta ahora, los resultados de la mayoría de los estudios comparativos, tanto de formulaciones comerciales de protección solar como de suspensiones de NPs de TiO₂, indican que los daños leves en la piel no aumentan su permeabilidad. Cabe destacar que los protectores solares no deben aplicarse sobre la piel lesionada o sobre una herida abierta (Musial et al., 2020).

4.1.4 Exposición por vía parenteral

Las NPs de TiO₂ se utilizan en medicina como transportadores de fármacos para el tratamiento del cáncer debido a que consiguen superar las restricciones de los quimioterápicos tradicionales: se administran en el torrente sanguíneo, se acumulan en el tumor, se liberan de forma controlada y permiten una terapia sinérgica fototérmica y/o fotodinámica (Ren et al., 2017). En general, se supone que el tamaño de partícula ideal para las aplicaciones de tratamiento de destrucción celular que garantiza la permeabilidad vascular y maximiza la acumulación en las células cancerosas es de 100 a 150 nm. Las NPs de más de 200 nm se aíslan en el hígado, el bazo y los riñones, mientras que las de menos de 100 nm pueden salir de los vasos sanguíneos a través de las fenestraciones (Jukapli y Bagheri, 2016).

Los estudios realizados indican que tras la inyección intravenosa de NPs de TiO₂, éstas son rápidamente eliminadas de la sangre y se distribuyen mayoritariamente en hígado, bazo, riñón y pulmones. El hígado fue identificado como el principal órgano diana de estas NPs. Las NPs de TiO₂ se pueden eliminar del cuerpo con una vida media de 12,7 días (Disdier et al., 2015; Elgrabli et al., 2015).

4.2 Potenciales mecanismos de toxicidad

El mecanismo de toxicidad de las NPs de TiO₂ en los organismos vivos puede resumirse en tres aspectos (Hou et al., 2019):

- Las EROs producidas por las NPs de TiO₂.
- El daño de la pared celular y la peroxidación lipídica de la membrana celular causados por la adhesión de las NPs a las células por fuerzas electrostáticas debido a la gran superficie de las NPs de TiO₂.
- La adhesión de las NPs de TiO₂ a orgánulos intracelulares y macromoléculas biológicas.

4.2.1 Citotoxicidad

El estrés oxidativo causado por las NPs de TiO₂ es considerado el mecanismo de toxicidad más importante. Normalmente, las EROs generadas por las mitocondrias en las células son neutralizadas rápidamente por sustancias antioxidantes. Sin embargo, una generación excesiva de EROs provoca un desequilibrio entre los agentes oxidantes y los procesos antioxidantes, lo que se denomina estrés oxidativo. Las EROs, como los radicales hidroxilo, los radicales superóxido y el peróxido de hidrógeno, son productos naturales del metabolismo habitual del oxígeno. Sin embargo, estos radicales libres pueden interactuar dentro de los sistemas biológicos produciendo un daño oxidativo al organismo (Musial et al., 2020; Song et al., 2016).

Las altas concentraciones de NPs de TiO₂ provocan un mayor estrés oxidativo, que se correlaciona con el aumento de la peroxidación lipídica en la membrana celular tras la adsorción de las NPs de TiO₂ en la membrana celular. Las EROs y la peroxidación lipídica inducidas por las NPs de TiO₂ dañan la integridad de la pared y la membrana celular, lo que provoca un aumento de la permeabilidad, que permite la entrada de las NPs de TiO₂ en la célula. Además, las NPs de TiO₂ también pueden entrar en la célula a través del proceso de endocitosis. Mientras que las partículas de más de 500 nm pueden ser

eliminadas por los fagocitos, las partículas más pequeñas pueden ser engullidas por una vesícula de la membrana celular e introducirse en la célula (Rashid et al., 2021).

Tras la entrada de las NPs de TiO_2 en la célula, son transportadas a los lisosomas, donde generan estrés lisosómico y liberan citosol que reacciona con los componentes celulares, lo que provoca daños en el ADN, reordenación del ADN, alteración de la expresión génica, estrés oxidativo e inflamación (Figura 6). Las NPs de TiO_2 alteran las funciones micromoleculares mediante la adsorción de proteínas, el bloqueo de las vías de señalización y la unión a la estructura del ADN. Sin duda, estos daños afectan a la viabilidad celular y dependen de la dosis y del tiempo (Rashid et al., 2021).

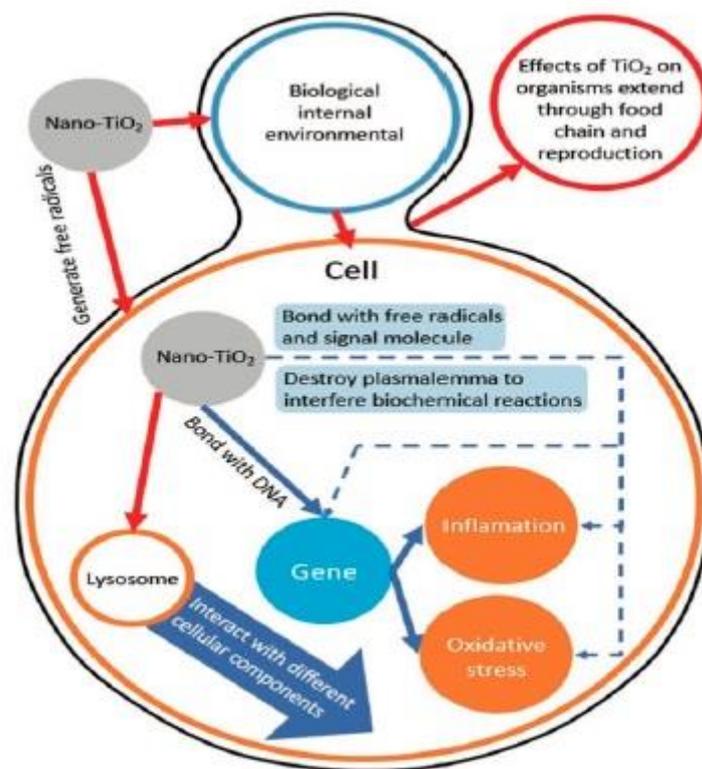


Figura 6. Mecanismos de toxicidad de las NPs de TiO_2 . Tomado de Rashid et al., 2021.

También hay que señalar que la respuesta de las células en presencia de NPs de TiO_2 es compleja. Así, la presencia de NPs de TiO_2 puede modular diferentes destinos celulares, entre ellos la necrosis y la apoptosis, que son las vías habituales de muerte celular, o la autofagia, que conduce a mecanismos citoprotectores o a la muerte celular (Rashid et al., 2021).

4.2.2 Genotoxicidad

La genotoxicidad se refiere a la destrucción o alteración de la información genética dentro de las células por factores físicos y químicos, incluyendo daños en el ADN, daños cromosómicos y mutaciones genéticas. Por lo tanto, la genotoxicidad está estrechamente relacionada con la aparición y el desarrollo del cáncer (Shi et al., 2022).

La genotoxicidad de las NPs de TiO₂ depende de sus propiedades fisicoquímicas (forma cristalina, tamaño y forma), el tipo de células/animales experimentales, la concentración, el modo y tiempo de exposición. Más de la mitad de los estudios indican que podrían causar genotoxicidad, lo que sugiere que probablemente sean genotóxicas para los seres humanos, a pesar de las contradicciones que existen entre experimentos *in vitro* e *in vivo*. La evaluación actual de la genotoxicidad de las NPs de TiO₂ depende principalmente del ensayo del cometa, el ensayo de micronúcleos y el experimento de mutación, pero la concentración y el método de detección inadecuados pueden generar falsos positivos y dificultar la extrapolación de conclusiones (Chen et al., 2022; Ling et al., 2021; Shi et al., 2022).

En la actualidad, los mecanismos de genotoxicidad de las NPs de TiO₂ (figura 7) se dividen generalmente en tres tipos: el primero es el resultado de la interacción directa con el ADN, el segundo son mecanismos indirectos con moléculas que interactúan con el material genético (al aumentar la liberación lisosomal de ADNasas o formar nanoagregados para extruir el núcleo), y el tercero puede ser causado por EROs generados por el potencial catalítico de las partículas, activación por UV o durante la inflamación provocada por partículas. Además, las NPs de TiO₂ también pueden inhibir la reparación por escisión de bases y las vías de reparación por escisión de nucleótidos, lo que influye en el proceso de reparación del ADN. Sin embargo, la genotoxicidad resultante de las NPs de TiO₂ es de bajo nivel y puede ser reparada por el organismo. Las pruebas de que las NPs de TiO₂ pueden actuar directamente sobre el ADN no son suficientes, por lo que el principal mecanismo que conduce a la genotoxicidad de las NPs de TiO₂ puede ser el daño indirecto al ADN a través de la generación de EROs (Chen et al., 2022; Ling et al., 2021; Shi et al., 2022).

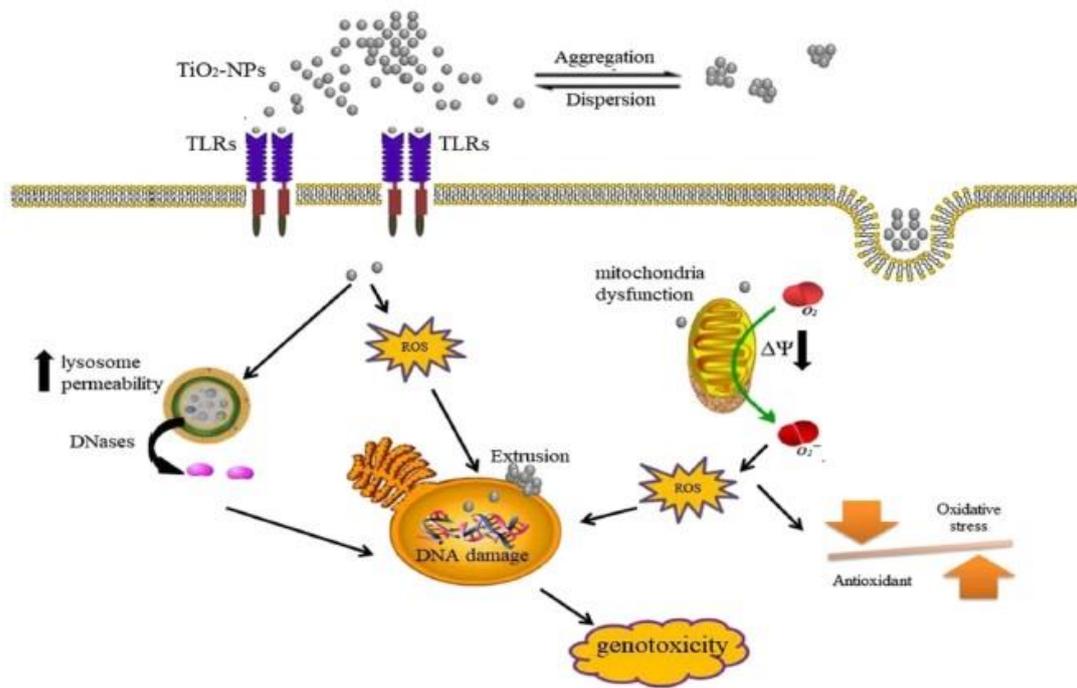


Figura 7. Mecanismos de la posible genotoxicidad de las NPs de TiO₂ en las células. Tomado de Ling et al., 2021.

4.3 Efectos sobre la salud

4.3.1 Sistema respiratorio

Estudios recientes demuestran que, tras la exposición por inhalación, las NPs de TiO₂ pueden depositarse en la región alveolar y acceder al intersticio pulmonar provocando una respuesta inflamatoria y lesión pulmonar. Estos fenómenos conducen a una disfunción pulmonar y a cambios irreversibles en las células que dan lugar a fibrosis y el desarrollo de tumores. La interacción de las NPs de TiO₂ con un sistema biológico está estrechamente relacionada con sus características estructurales, como el tamaño, la forma, la forma cristalina y el revestimiento de la superficie. Entre las NPs de TiO₂ la citotoxicidad aumenta en el siguiente orden: amorfo > anatasa > anatasa/rutilo. Con respecto a esto, la anatasa induce una mayor producción de EROs y respuestas celulares y es más tóxica que el rutilo. (Hsiao y Huang, 2011; Wang et al., 2014).

Otros estudios también confirman la influencia de las características fisicoquímicas, sobre todo de la forma cristalina, en la respuesta celular a las NPs de TiO₂, centrándose en lo que respecta a los efectos citotóxicos, genotóxicos/oxidativos y la inflamación. La anatasa presenta una mayor citotoxicidad en comparación con el rutilo en las células bronquiales,

y el rutilo es más genotóxico que la anatasa en las células alveolares y bronquiales (Kose et al., 2021).

Por otra parte, antes de ingresar al pulmón, prácticamente todas las NPs de TiO₂ están expuestas a algo de luz UV, y la toxicidad pulmonar de las NPs podría verse influenciada por la fotoexcitación, que se sabe que altera las propiedades de la superficie del TiO₂. En las NPs de TiO₂ preirradiadas se observó un mayor efecto citotóxico en comparación con las NPs no irradiadas (Freseigna et al., 2021).

En los últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios en roedores para confirmar la relación entre la inhalación de TiO₂ y el desarrollo de toxicidad pulmonar. Sin embargo, muchos de estos estudios aplican protocolos cuestionables. En los ensayos de toxicidad las metodologías empleadas deben ser capaces de simular condiciones realistas, en lugar de introducir parámetros extremos que difieren significativamente de las condiciones de exposición humana. Hasta la fecha, no se disponen de datos suficientes sobre la duración de la exposición pulmonar a las NPs de TiO₂ y los efectos consiguientes para establecer una correlación científica relevante. Por lo tanto, la extrapolación de los resultados de estudios con roedores, con escaso control sobre el rigor de los parámetros, no presenta una evaluación precisa de la toxicidad de las NPs de TiO₂ en el sistema respiratorio humano (Racovita, 2022).

4.3.2 Sistema digestivo

Hasta la fecha, los mecanismos de toxicidad de las NPs de TiO₂ después de la exposición oral y la ingestión no se conocen con exactitud, aunque sabemos que pueden ocurrir cambios en las propiedades de las NPs debido a su comportamiento dinámico en condiciones fisiológicas, y es probable que se vea afectada una red global de vías celulares y moleculares ante tal exposición. Cuando se ingieren, la interacción entre el TiO₂ y las biomoléculas orgánicas en los alimentos y en los fluidos gastrointestinales es inevitable. En estas circunstancias, las propiedades fisicoquímicas de las NPs pueden cambiar, es decir, pueden aglomerarse/agregarse, reaccionar o unirse a otros componentes del alimento/pienso, solubilizarse al reaccionar con los fluidos de digestión o incluso pueden excretarse del cuerpo. Debido a esto, es probable que las NPs de TiO₂ no estén disponibles en forma de partículas libres, por lo que su distribución y sus efectos citotóxicos y genotóxicos pueden verse afectados (Vieira et al., 2022).

Muchos estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la exposición al TiO₂ puede dar lugar a la formación de EROs y a la inducción de daños genéticos, y que el E171 tiene el potencial de iniciar y estimular la inflamación, promover tumores y perjudicar la salud intestinal en general a través de un modo similar. Los estudios sugieren que la absorción de TiO₂/E171 puede inducir la formación de EROs y podría conducir a un desequilibrio del sistema oxidativo-antioxidante. Se han identificado dos eventos iniciadores postulados y varios eventos clave relacionados con efectos adversos tras de la ingestión de TiO₂ (Figura 8). Entre los KE se incluyen la generación de EROs, el estrés oxidativo, la inflamación persistente, la lesión epitelial persistente, el aumento de la proliferación celular y el daño del ADN, que dan lugar a lesiones preneoplásicas y, en última instancia, a adenomas/carcinomas intestinales (Bischoff et al., 2020).

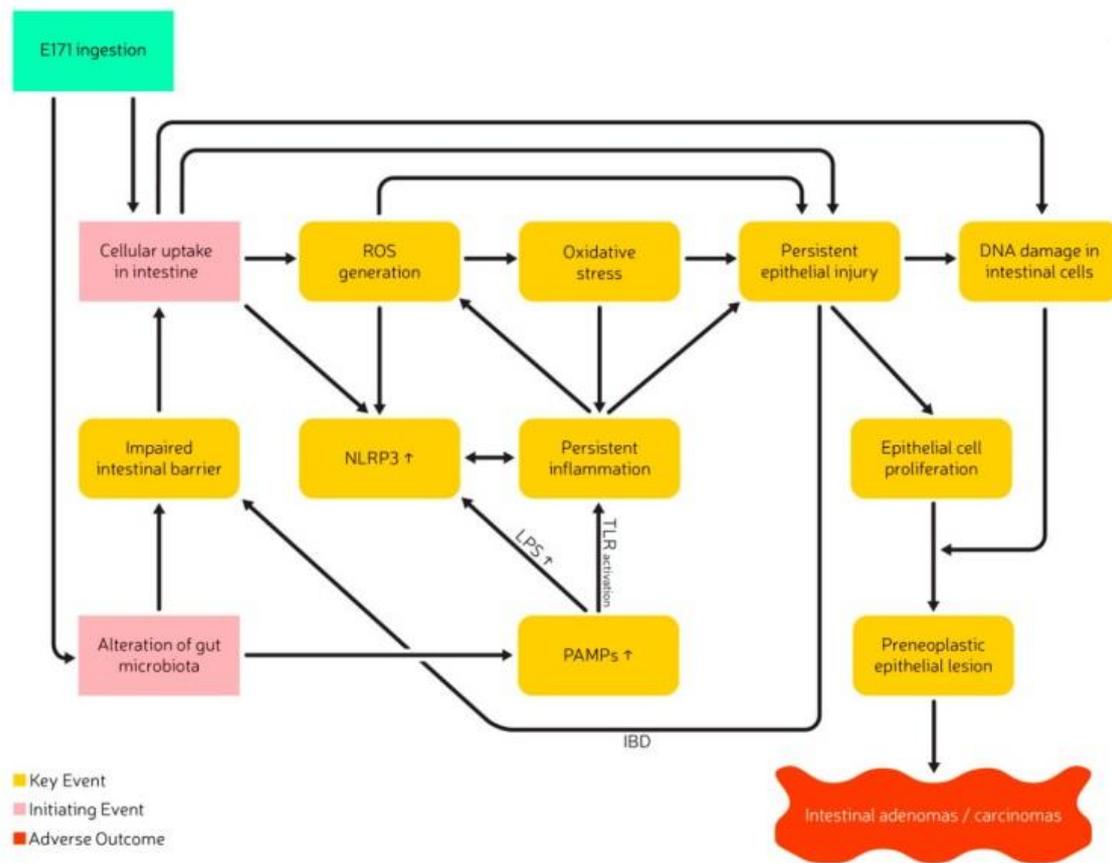


Figura 8. Vía postulada de resultados adversos del TiO₂ tras la ingestión y relacionada con la inflamación y la carcinogenicidad. Abreviaturas: ROS: especies reactivas del oxígeno; PAMP: patrones moleculares asociados a patógenos; LPS: lipopolisacáridos; EII: enfermedad inflamatoria intestinal; NLRP3: proteína 3 que contiene dominios NOD, LRR y pirina; TLR: receptor tipo Toll. Tomado de Bischoff et al., 2021.

La ingestión de E171 y su absorción en los enterocitos intestinales podría dar lugar a la formación de EROs, conducir a la inducción directa de inflamación a través de la

permeabilización de la membrana lisosomal y, finalmente, inducir daños directos en el ADN de las células epiteliales intestinales (Bischoff et al., 2020).

La presencia de E171 en el intestino posiblemente altera la composición de la microbiota intestinal comensal (uno de los eventos iniciadores), lo que puede dar lugar a cambios en la función metabólica y resultar en un aumento de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), como el LPS. La presencia de LPS, la internalización de las propias partículas de TiO₂ y las alteraciones del flujo de adenosina trifosfato (ATP) relacionadas con el TiO₂ son posibles desencadenantes de la activación del inflammasoma NLRP-3, lo que provoca inflamación. Las vías moleculares relevantes para el desarrollo de tumores, incluido el estrés oxidativo, la respuesta inmunitaria, la inflamación y la señalización del cáncer, mostraron cambios después de la exposición a E171. Los procesos inflamatorios persistentes pueden debilitar las membranas celulares y disminuir la integridad de la barrera, lo que da como resultado una función de barrera deteriorada. Además, se especula que la alteración general de la microbiota intestinal puede afectar la salud intestinal y aumentar la permeabilidad intestinal. Estos procesos aumentan potencialmente la absorción de E171 con el tiempo y empeoran las condiciones o aceleran los efectos adversos para la salud. Una disminución en la integridad de la barrera intestinal y el consiguiente aumento en la absorción de E171 eleva los niveles sistémicos de TiO₂ y aumenta el riesgo de toxicidad específica de órganos, por ejemplo, neurotoxicidad, cardiotoxicidad, hepatotoxicidad y reprotoxicidad (Bischoff et al., 2020; Cornu et al., 2022; Rolo et al., 2022; Vieira et al., 2022).

Las interacciones de las EROs con el ADN y la lesión epitelial persistente pueden provocar daños en el ADN. La formación de lesiones epiteliales preneoplásicas, adenomas/carcinomas intestinales o alteraciones en el tamaño de los tumores ha demostrado ir acompañada de una regulación negativa del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y AKT, así como una regulación negativa de los genes supresores de tumores, por ejemplo, p53 y p21. Se ha observado una regulación positiva y negativa de p53 probablemente provocadas por la exposición al E171. El E171 también parece aumentar la expresión de los genes Apaf-1 y BAX. Apaf-1 es una proteína citoplasmática que inicia la apoptosis. BAX es un regulador apoptótico, que se une al gen BCL-2 para iniciar la apoptosis y está estrechamente relacionado con la vía p53 y la formación de cáncer de colon. La regulación positiva del regulador maestro para la biogénesis lisosomal y el factor transcripcional de autofagia EB (TfEB), así como el aumento de la

expresión de LC-3 y Beclin-1 (marcadores predictivos de cáncer colorrectal) contribuyen a suponer que la exposición a E171 y la inducción resultante de inflamación persistente podría estar asociada con un mayor riesgo de cáncer colorrectal. En conjunto, los estudios revisados sugieren que la exposición oral al E171 puede agravar y, si no iniciar, al menos promover el desarrollo y la progresión de lesiones preneoplásicas en el colón (Bischoff et al., 2020; Cornu et al., 2022; Rolo et al., 2022; Vieira et al., 2022).

Como se sospecha que E171 altera las funciones de la barrera intestinal a través de la desregulación de las citocinas inflamatorias, la inmunosupresión y la alteración de la microbiota intestinal comensal, se puede esperar que los pacientes que ya padecen enfermedad inflamatoria intestinal sean un grupo de personas más susceptibles a los resultados adversos para la salud relacionados con el E171 (Bischoff et al., 2020; Cornu et al., 2022; Rolo et al., 2022; Vieira et al., 2022).

Actualmente no está claro si el E171 es químicamente activo y un mutágeno, o si su modo de acción se limita a la formación de EROs, que promueven el crecimiento de tumores. Se dispone de muy poca información sobre la interacción directa del TiO_2 con el ADN. La investigación de las respuestas humanas a la exposición al E171 y la comparación de los procesos biológicos moleculares observados *in vitro* e *in vivo* pueden ayudar a comprender mejor los efectos potencialmente dañinos tras la ingestión de TiO_2 como aditivo (Bischoff et al., 2020; Vieira et al., 2022).

4.3.3 Sistema dérmico

Los estudios *in vitro* e *in vivo* realizados cuestionan la nocividad de las NPs de TiO_2 presentes en cosméticos y productos farmacéuticos que se administran por vía tópica. Existen controversias sobre la capacidad de las NPs de TiO_2 para penetrar tanto en la epidermis como en la dermis vascularizada cuando se aplican por vía tópica. Si son capaces de penetrar y llegar al sistema circulatorio, las NPs pueden acumularse en los órganos y provocar efectos secundarios nocivos. También existe el debate de que si se aplican sobre la piel, el TiO_2 iluminado por luz UV puede entrar fácilmente en contacto con la humedad de la atmósfera y generar EROs, los cuales actúan como mutágenos para las células dérmicas al provocar estrés oxidativo y roturas de la cadena de ADN (Racovita, 2022).

Por ello, es esencial controlar minuciosamente las formulaciones de los protectores solares para verificar el tamaño de las NPs, su distribución por tamaños, la tasa de

agregación y la concentración de las NPs. Según el dictamen del Comité Científico de Seguridad de los Consumidores de la Comisión Europea (CCSC) (EUR-Lex, 2021), se puede considerar que las de NPs de TiO₂ utilizadas en protectores solares hasta una concentración del 25% no plantean ningún riesgo de efectos adversos en humanos tras su aplicación sobre la piel sana, intacta o quemada por el sol (Musial et al., 2020).

4.3.4 Otros sistemas

Cuando las NPs de TiO₂ alcanzan la circulación sistémica también pueden acumularse y causar lesiones en otros sistemas del organismo (Cornu et al., 2022).

Se han realizado muy pocos estudios sobre el efecto de las NPs de TiO₂ en el sistema cardiovascular. Los investigadores sospechan que las NPs depositadas en el corazón pueden provocar respuestas inflamatorias, un mal funcionamiento del sistema y daños cardíacos. Según el tipo y la duración de la exposición, las NPs ultrafinas de TiO₂ podrían provocar un aumento de la frecuencia cardíaca y de la presión arterial, y daños en el músculo cardíaco (Baranowska-Wójcik et al., 2020).

Las NPs de TiO₂ puede cruzar la barrera hematoencefálica (BHE) y acumularse en el cerebro. Este hecho puede afectar a las funciones cerebrales aumentando la peroxidación lipídica y provocando estrés oxidativo, lo que desencadena una cascada de reacciones que incluyen: la disminución de las actividades de las enzimas antioxidantes y la capacidad antioxidante total, la liberación excesiva de NO y el aumento de la producción de TNF- α , lo que conduce a un daño neurotóxico acompañado del aumento de las neuronas cerebrales degeneradas y en apoptosis (Grissa et al., 2020).

Los efectos de las NPs de TiO₂ sobre el sistema inmunitario están poco documentados. El mecanismo molecular por el que las NPs de TiO₂ influyen en la célula inmunitaria se ha estudiado en relación con los TLR, que son una subfamilia de receptores de reconocimiento de patrones situados estratégicamente en la superficie celular y en él endosoma de los macrófagos. Se comprobó que la inmunotoxicidad inducida por las NPs de TiO₂ se producía a través de la activación de varios receptores, que a su vez activaban vías de señalización específicas para reducir los antioxidantes mediante la formación de EROs. Al aumentar la exposición a las EROs se redujo el potencial de membrana mitocondrial, lo que en última instancia condujo a la muerte celular por apoptosis e indujo inmunotoxicidad a través del desequilibrio redox inmunitario. Es esencial realizar

experimentos *in vivo* para validar mejor la influencia de las NPs en el sistema inmunitario (Dhupal et al., 2018).

La toxicidad para la reproducción se ha demostrado en varias publicaciones recientes. Se ha descrito un deterioro de la eficiencia espermática en ratones después de una exposición a corto plazo a las NPs de TiO₂. Estas NPs también causaron cambios patológicos en los testículos del ratón. Además, se ha comprobado que la exposición durante el embarazo a NPs de TiO₂ originó alteraciones neuroconductuales y lesiones en el tejido cerebral en las crías cuando alcanzaron la edad adulta. Es importante destacar que, tras la exposición a las NPs de TiO₂ durante el embarazo, se notificaron retrasos en el crecimiento y teratogenicidad, lo que conduce a defectos del desarrollo del tubo neural, como la espina bífida, la reducción del grosor cortical y la dilatación de los ventrículos laterales (Rolo et al., 2022).

4.4 Controversia sobre la toxicidad

Aunque este nanomaterial se ha estudiado ampliamente en los últimos años, existen resultados totalmente diferentes sobre la toxicidad que ejerce en los distintos órganos y sistemas en función de las condiciones experimentales (Zhang et al., 2015).

Debido a la gran variedad de aplicaciones del TiO₂, sobre todo en forma de NP, es necesario estudiar su potencial genotóxico y citotóxico. Actualmente, es difícil obtener resultados coherentes entre ensayos de toxicidad, ya que las incoherencias obtenidas con el TiO₂ son más frecuentes que con otros óxidos metálicos inorgánicos. La exposición del TiO₂ a la luz UV en el laboratorio parece ser el responsable de las incongruencias experimentales, ya que la irradiación puede desencadenar su actividad fotocatalítica. Además, el aumento de tamaño de la superficie de la microescala a la nanoescala permite que el TiO₂ interactúe con reactivos o equipos utilizados en los ensayos, interfiriendo así con resultados experimentales (Musial et al., 2020; Racovita, 2022).

Se han realizado multitud de estudios, tanto *in vitro* como *in vivo* para investigar la genotoxicidad de las NPs de TiO₂. Algunos indican que son genotóxicas, mientras que otros demuestran lo contrario. Estas incoherencias en los resultados podrían deberse al uso de diferentes tipos de células, niveles de concentración de NPs y tiempos de exposición variables, e incluso debido a diferencias en el tamaño de NPs y el tipo de forma cristalina. Se han realizado más estudios *in vitro* que *in vivo* para evaluar la genotoxicidad de las NPs de TiO₂ y, en general, hay más estudios que implican a estas

NPs como genotóxicas que aquellos que afirman lo contrario. También cabe destacar que existen pocas similitudes entre los estudios de genotoxicidad de las NPs de TiO₂. Idealmente, todos los estudios de investigación deberían realizarse utilizando protocolos idénticos para permitir la comparación de los resultados. Debido a estos problemas, los resultados de los ensayos de genotoxicidad son difíciles de comparar e interpretar con claridad (Wani y Shadab, 2020).

4.5 Normativa, legislación y seguridad

En los últimos años, la normativa en materia de nanomateriales, y en especial el de las NPs de TiO₂, ha ido evolucionando. Las primeras regulaciones eran referentes a la exposición por vía pulmonar. Basándose en pruebas experimentales procedentes de estudios de inhalación en animales, en 2006 la Agencia Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC) clasificó al TiO₂ como sustancia posiblemente cancerígena para el ser humanos (categoría 2B) por vía pulmonar. Unos años más tarde, la Agencia Europea de Sustancias y mezclas Químicas (ECHA) clasificó al TiO₂ en la categoría 2 como sospechoso de causar cáncer (categoría 2A) por vía pulmonar (ECHA, 2017). Más recientemente, la regulación también ha considerado la exposición por vía oral (Boutillier et al., 2020; Cornu et al., 2022; Vieira et al., 2022).

El E171 figura como aditivo alimentario en la norma internacional del Codex Alimentarius, una lista de directrices establecidas por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación y la Organización Mundial de la Salud (OMS). Por tanto, el uso de E171 como aditivo alimentario está autorizado de acuerdo con el *quantum satis*. En 2013, la OMS sugirió tomar precauciones con respecto al uso de este aditivo, especialmente para los niños, pero no suspendió ni modificó las normas relacionadas con el uso de E171. En 2016, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) solicitó una reevaluación de la toxicidad de este aditivo. Los expertos concluyeron que las exposiciones actuales al E171 no suponen un riesgo para la salud de los consumidores, pero mostraron la importancia de establecer una ingesta diaria aceptable (EFSA, 2016). Un año después se publicó un estudio que muestra que la exposición crónica a E171 conduce al desarrollo de lesiones colorrectales preneoplásicas en ratas (Bettini et al., 2017). Ese mismo año, la Agencia Francesa de Seguridad Alimentaria, Medio Ambiente y Trabajo (ANSES) concluyó que ese estudio, aunque mostraba efectos no identificados previamente, no cuestionaba la evaluación del E171 que había realizado anteriormente la EFSA. A la espera de nuevos datos, la ANSES

recomendó limitar la exposición de los trabajadores, los consumidores y el medio ambiente al aditivo E171 (ANSES, 2019). Como medida cautelar, el decreto del 17 de abril de 2019 suspendió la venta de productos alimenticios que llevaran en su composición E171 en el mercado francés durante un año a partir del 1 de enero de 2020 (Légifrance, 2019). En 2021, la EFSA publicó una nueva evaluación de seguridad y concluyó que "el E171 ya no puede considerarse seguro cuando se usa como aditivo alimentario" (EFSA, 2021). Sin embargo, la Unión Europea (UE) no identificó riesgos inmediatos para la salud asociados con su uso. Así en enero de 2022 la Comisión Europea (CE) publicó la legislación (EC 2022/63) (EUR-Lex, 2022) que, a partir de febrero de 2022, prohíbe el uso de E171 en alimentos. Para ello estableció un periodo de transición de 6 meses. Durante ese período, los alimentos que contenían E171 y que fueron producidos antes de la fecha de entrada en vigor de este reglamento pudieron comercializarse. Paralelamente, en el nuevo reglamento de la UE se incluye el compromiso de revisar la necesidad de mantener o eliminar el E171 de la lista de aditivos alimentarios permitidos para 2025 (Boutillier et al., 2020; Cornu et al., 2022; Vieira et al., 2022).

4.5.1 El futuro del TiO₂ como excipiente farmacéutico

Como la lista de aditivos alimentarios permitidos es común tanto para los alimentos como para los productos farmacéuticos en la UE, es de esperar que las decisiones que se tomen sobre esta lista puedan repercutir directamente en la industria farmacéutica. Por el momento, la prohibición del uso de E171 solo afecta a los alimentos. En la industria alimentaria es bastante sencillo eliminarlo de los alimentos, pero éste no es el caso de los productos farmacéuticos, dadas las propiedades únicas del TiO₂ y la falta de materiales alternativos con las mismas características. El único otro pigmento blanco de la lista de aditivos aprobados es el carbonato cálcico, y no es tan eficaz como pigmento u opacificante. La Agencia Europea del Medicamento (EMA) informó en 2021 (EMA, 2021) que la sustitución del TiO₂ en los medicamentos no podría lograrse actualmente sin un impacto negativo en la calidad y cantidad de los medicamentos de la UE. Sin embargo, la legislación actual obliga a las empresas farmacéuticas a investigar sustitutos para el E171 y a realizar las modificaciones necesarias en las licencias existentes. Además, las nuevas solicitudes de autorización de comercialización (MAA) tendrán que utilizar alternativas al E171 o aportar razones objetivas y verificables por las que no es factible sustituirlo (Teasdale y Hughes, 2023).

La legislación establece que la CE tomará una decisión final sobre el uso del E171 en medicamentos en febrero de 2025, y ésta se basará en un informe de la EMA que debe presentarse antes del 1 de abril de 2024. En él se tendrán en cuenta los progresos realizados en la búsqueda de sustitutos del TiO_2 ; las repercusiones en la calidad, seguridad y eficacia; y la disponibilidad de medicamentos en la Unión Europea (Teasdale y Hughes, 2023).

Actualmente existen 91.000 medicamentos de uso humano y 800 de uso veterinario que contienen E171 en el mercado de la UE. Si se toma una media, el coste de sustituir el TiO_2 en todos estos productos asciende a unos 32.000 millones de euros. Además, al no existir otro excipiente similar al E171, se requieren distintas combinaciones de excipientes para lograr la opacidad, lo que hace más compleja la sustitución. Desafortunadamente, es poco probable que sea económico cambiar todas las formulaciones, por lo que estos medicamentos podrían ser retirados de la venta, lo que repercutiría directamente en la capacidad de los pacientes para acceder a los medicamentos en la UE (Teasdale y Hughes, 2023).

4.5.2 Cambios en la normativa referente a la exposición del TiO_2 por inhalación

En 2016, la autoridad francesa competente presentó a la ECHA una propuesta para clasificar el TiO_2 como sustancia cancerígena (EUR-Lex, 2008). Al año siguiente, el Comité de Evaluación de Riesgos de la ECHA (CCR) adoptó un dictamen por el que se clasificaba el TiO_2 como carcinógeno de categoría 2, incluida la indicación de peligro “H351 (inhalación)”. Una sentencia del Tribunal de Justicia Europeo de finales de noviembre de 2022 (Court of Justice of the European Union, 2023) ha anulado esta normativa por considerar que la CE cometió un error en su apreciación de la fiabilidad y aceptabilidad del estudio en el que se basó la clasificación e infringió el criterio según el cual dicha clasificación solo puede referirse a una sustancia que tenga la propiedad intrínseca de causar cáncer. Concluyó que se cometieron errores significativos en la evaluación de riesgos de este material y que el reglamento nunca debió ponerse en marcha. Hay un proceso de apelación que debe seguir su curso, pero si se aprueba, permitirá a las empresas retirar las etiquetas de advertencia de los envases de sus productos (Teasdale y Hughes, 2023).

5. Conclusiones

- El TiO_2 es un material con un alto interés para la industria debido a que tiene la capacidad tanto de absorber como de dispersar la luz UV. Se utiliza, sobre todo en forma de nanopartícula, y tiene dos aplicaciones principales, como pigmento y como fotocatalizador. Se emplea en la industria alimentaria como aditivo (E171) y en la industria farmacéutica y cosmética como excipiente opacificante en la elaboración de medicamentos y como filtro UV en protectores solares.
- Las principales vías de exposición al TiO_2 en los seres humanos son: la pulmonar, mediante la inhalación de aerosoles; la oral, mediante la ingestión de alimentos y medicamentos; la tópica, mediante la aplicación en la piel de protectores solares; y la parenteral, mediante la inyección de medicamentos quimioterápicos.
- Los mecanismos por los cuales el TiO_2 desarrolla su citotoxicidad y genotoxicidad son: la producción de EROs, el daño de la pared celular y la peroxidación lipídica de la membrana celular, y la adhesión a orgánulos intracelulares y a macromoléculas biológicas.
- En los seres humanos el TiO_2 podría inducir inflamación, citotoxicidad, genotoxicidad, inmunotoxicidad y neurotoxicidad. Los principales órganos diana son el hígado, el riñón, los pulmones y la piel. Aunque se han realizado gran cantidad de estudios *in vitro* e *in vivo* sobre la toxicidad del TiO_2 , sigue habiendo mucha controversia, ya que muchos de los resultados obtenidos son tan contradictorios que no permiten extraer conclusiones claras. Es probable que esto se deba a que la toxicidad del TiO_2 se ve afectada por muchos factores, como sus propiedades fisicoquímicas y las diferencias metodológicas experimentales.
- En enero de 2022 la CE publicó la legislación (EC 2022/63), en la que prohíbe el uso de E171 en alimentos y establece que tomará una decisión final sobre el uso del E171 en medicamentos en febrero de 2025. Sin embargo, la legislación actual obliga a las empresas farmacéuticas a investigar sustitutos para el E171 y a realizar las modificaciones necesarias en las licencias existentes, por lo que parece que la tendencia en la UE es sustituir el TiO_2 en los medicamentos nuevos y existentes.

6. Bibliografía

1. ANSES (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail). AVIS de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif aux risques liés à l'ingestion de l'additif alimentaire E171. 2019 [en línea]. [Consultado en Mayo 2023]. Disponible en:

<https://www.anses.fr/fr/content/avis-de-lanses-relatif-aux-risques-li%C3%A9s-%C3%A0-l%E2%80%99ingestion-de-l%E2%80%99additif-alimentaire-e171>

2. Babitha S, Korrapati PS. Biodegradable zein-polydopamine polymeric scaffold impregnated with TiO₂ nanoparticles for skin tissue engineering. *Biomed Mater*. 2017; 12(5):055008.

3. Banerjee AN. The design, fabrication, and photocatalytic utility of nanostructured semiconductors: focus on TiO₂-based nanostructures. *Nanotechnol Sci Appl*. 2011; 4:35-65.

4. Baranowska-Wójcik E, Szwajgier D, Oleszczuk P, Winiarska-Mieczan A. Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles Exposure on Human Health-a Review. *Biol Trace Elem Res*. 2020; 193(1):118-129.

5. Bettini S, Boutet-Robinet E, Cartier C, Coméra C, Gaultier E, Dupuy J, Naud N, Taché S, Grysan P, Reguer S, Thieriet N, Réfrégiers M, Thiaudière D, Cravedi JP, Carrière M, Audinot JN, Pierre FH, Guzylack-Piriou L, Houdeau E. Food-grade TiO₂ impairs intestinal and systemic immune homeostasis, initiates preneoplastic lesions and promotes aberrant crypt development in the rat colon. *Sci Rep*. 2017; 7:40373.

6. Bischoff NS, de Kok TM, Sijm DTHM, van Breda SG, Briedé JJ, Castenmiller JJM, Opperhuizen A, Chirino YI, Dirven H, Gott D, Houdeau E, Oomen AG, Poulsen M, Rogler G, van Loveren H. Possible Adverse Effects of Food Additive E171 (Titanium Dioxide) Related to Particle Specific Human Toxicity, Including the Immune System. *Int J Mol Sci*. 2020; 22(1):207.

7. Boutillier S, Fourmentin S, Laperche B. Food additives and the future of health: An analysis of the ongoing controversy on titanium dioxide. *Futures*. 2020; 122:102598.

- 8.Chen Z, Shi J, Zhang Y, Han S, Zhang J, Jia G. DNA Oxidative Damage as a Sensitive Genetic Endpoint to Detect the Genotoxicity Induced by Titanium Dioxide Nanoparticles. *Nanomaterials* (Basel). 2022; 12(15):2616.
- 9.Christensen FM, Johnston HJ, Stone V, Aitken RJ, Hankin S, Peters S, Aschberger K. Nano-TiO₂--feasibility and challenges for human health risk assessment based on open literature. *Nanotoxicology*. 2011; 5(2):110-24.
- 10.Cornu R, Béduneau A, Martin H. Ingestion of titanium dioxide nanoparticles: a definite health risk for consumers and their progeny. *Arch Toxicol*. 2022; 96(10):2655-2686.
- 11.Court of Justice of the European Union. The General Court annuls the Commission Delegated Regulation of 2019 in so far as it concerns the harmonised classification and labelling of titanium dioxide as a carcinogenic substance by inhalation in certain powder forms. 2023 [en línea]. [Consultado en Mayo 2023]. Disponible en:
<https://curia.europa.eu/jcms/upload/docs/application/pdf/2022-11/cp220190en.pdf>
- 12.Dar GI, Saeed M., Wu A. Properties of TiO₂ Nanoparticles. En: Wu A y Ren W, editores. *TiO₂ Nanoparticles: Applications in Nanobiotechnology and Nanomedicine*. Wiley-VCH; 2020. p.2–6.
- 13.Disdier C, Devoy J, Cosnefroy A, Chalansonnet M, Herlin-Boime N, Brun E, Lund A, Mabondzo A. Tissue biodistribution of intravenously administrated titanium dioxide nanoparticles revealed blood-brain barrier clearance and brain inflammation in rat. *Part Fibre Toxicol*. 2015;12:27.
- 14.Dréno B, Alexis A, Chuberre B, Marinovich M. Safety of titanium dioxide nanoparticles in cosmetics. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2019; 33 Suppl 7:34-46.
- 15.Dhupal M, Oh JM, Tripathy DR, Kim SK, Koh SB, Park KS. Immunotoxicity of titanium dioxide nanoparticles via simultaneous induction of apoptosis and multiple toll-like receptors signaling through ROS-dependent SAPK/JNK and p38 MAPK activation. *Int J Nanomedicine*. 2018; 13:6735-6750.
- 16.ECHA (European Chemicals Agency). Titanium dioxide proposed to be classified as suspected of causing cancer when inhaled. 2017 [en línea]. [Consultado en Mayo 2023]. Disponible en:

<https://echa.europa.eu/es/-/titanium-dioxide-proposed-to-be-classified-as-suspected-of-causing-cancer-when-inhaled>

17.EFSA ANS Panel (EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food). Scientific Opinion on the re-evaluation of titanium dioxide (E 171) as a food additive. EFSA Journal. 2016; 14(9):4545, 83 pp.

18.EFSA FAF Panel (EFSA Panel on Food Additives and Flavourings), Younes, M, Aquilina, G, Castle, L, Engel, K-H, Fowler, P, Frutos Fernandez, MJ, Fürst, P, Gundert-Remy, U, Gürtler, R, Husøy, T, Manco, M, Mennes, W, Moldeus, P, Passamonti, S, Shah, R, Waalkens-Berendsen, I, Wölfle, D, Corsini, E, Cubadda, F, De Groot, D, FitzGerald, R, Gunnare, S, Gutleb, AC, Mast, J, Mortensen, A, Oomen, A, Piersma, A, Plichta, V, Ulbrich, B, Van Loveren, H, Benford, D, Bignami, M, Bolognesi, C, Crebelli, R, Dusinska, M, Marcon, F, Nielsen, E, Schlatter, J, Vleminckx, C, Barmaz, S, Carfi, M, Civitella, C, Giarola, A, Rincon, AM, Serafimova, R, Smeraldi, C, Tarazona, J, Tard, A and Wright, M. Scientific Opinion on the safety assessment of titanium dioxide (E171) as a food additive. EFSA Journal. 2021; 19(5):6585, 130 pp.

19.Elgrabli D, Beaudouin R, Jbilou N, Floriani M, Pery A, Rogerieux F, Lacroix G. Biodistribution and Clearance of TiO₂ Nanoparticles in Rats after Intravenous Injection. PLoS One. 2015; 10(4):e0124490.

20. EMA (European Medicines Agency). Final feedback from European Medicine Agency (EMA) to the EU Commission request to evaluate the impact of the removal of titanium dioxide from the list of authorised food additives on medicinal products. 2021 [en línea]. [Consultado en Mayo 2023]. Disponible en:

https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/final-feedback-european-medicine-agency-ema-eu-commission-request-evaluate-impact-removal-titanium_en.pdf

21.EUR-Lex. Recomendación de la comisión de 18 de octubre de 2011 relativa a la definición de nanomaterial. 2011 [en línea]. [Consultado en Abril 2023]. Disponible en:

<https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:275:0038:0040:ES:PDF>

22.EUR-Lex. Reglamento (CE) N° 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de diciembre de 2008 sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y

mezclas, y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE y se modifica el Reglamento (CE) no 1907/2006. 2008 [en línea]. [Consultado en Mayo 2023]. Disponible en:

<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32008R1272>

23.EUR-Lex. Reglamento (UE) 2021/850 de la Comisión de 26 de mayo de 2021 por el que se modifica y corrige el anexo II y se modifican los anexos III, IV y VI del Reglamento (CE) n.o 1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre los productos cosméticos. 2021 [en línea]. [Consultado en Mayo 2023]. Disponible en:

<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32021R0850>

24.EUR-Lex. Reglamento (UE) 2022/63 de la Comisión de 14 de enero de 2022 por el que se modifican los anexos II y III del Reglamento (CE) n.o 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que respecta al aditivo alimentario dióxido de titanio (E 171). 2022 [en línea]. [Consultado en Mayo 2023]. Disponible en:

<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32022R0063>

25.Fresegna AM, Ursini CL, Ciervo A, Maiello R, Casciardi S, Iavicoli S, Cavallo D. Assessment of the Influence of Crystalline Form on Cyto-Genotoxic and Inflammatory Effects Induced by TiO₂ Nanoparticles on Human Bronchial and Alveolar Cells. *Nanomaterials* (Basel). 2021; 11(1):253.

26.Gázquez MJ, Pérez SM, Bolívar JP. TiO₂ as white pigment and valorization of the waste coming from its production. En: Parrino F y Palmisano L, editores. *Titanium Dioxide (TiO₂) and Its Applications*. Elsevier; 2021. p.311-335.

27.Grissa I, ElGhoul J, Mrimi R, Mir LE, Cheikh HB, Horcajada P. In deep evaluation of the neurotoxicity of orally administered TiO₂ nanoparticles. *Brain Res Bull*. 2020; 155:119-128.

28.Hou J, Wang L, Wang C, Zhang S, Liu H, Li S, Wang X. Toxicity and mechanisms of action of titanium dioxide nanoparticles in living organisms. *J Environ Sci (China)*. 2019; 75:40-53.

29.Hsiao IL, Huang YJ. Effects of various physicochemical characteristics on the toxicities of ZnO and TiO nanoparticles toward human lung epithelial cells. *Sci Total Environ*. 2011; 409(7):1219-28.

30. Jukapli NM, Bagheri S. Recent developments on titania nanoparticle as photocatalytic cancer cells treatment. *J Photochem Photobiol B*. 2016; 163:421-30.
31. Kose O, Tomatis M, Turci F, Belblidia NB, Hocheplid JF, Pourchez J, Forest V. Short Preirradiation of TiO₂ Nanoparticles Increases Cytotoxicity on Human Lung Coculture System. *Chem Res Toxicol*. 2021; 34(3):733-742.
32. Kotrange H, Najda A, Bains A, Gruszecki R, Chawla P, Tosif MM. Metal and Metal Oxide Nanoparticle as a Novel Antibiotic Carrier for the Direct Delivery of Antibiotics. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(17):9596.
33. Kunrath MF, Leal BF, Hubler R, de Oliveira SD, Teixeira ER. Antibacterial potential associated with drug-delivery built TiO₂ nanotubes in biomedical implants. *AMB Express*. 2019; 9(1):51.
34. Légifrance. JORF: Journal Officiel de la République Française Arrêté du 17 avril 2019 portant suspension de la mise sur le marché des denrées contenant l'additif E 171 (dioxyde de titane - TiO₂). 2019 [en línea]. [Consultado en Mayo 2023]. Disponible en: <https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/JORFTEXT000038410047/>
35. Ling C, An H, Li L, Wang J, Lu T, Wang H, Hu Y, Song G, Liu S. Genotoxicity Evaluation of Titanium Dioxide Nanoparticles In Vitro: a Systematic Review of the Literature and Meta-analysis. *Biol Trace Elem Res*. 2021; 199(5):2057-2076.
36. Mottola F, Iovine C, Santonastaso M, Romeo ML, Pacifico S, Cobellis L, Rocco L. NPs-TiO₂ and Lincomycin Coexposure Induces DNA Damage in Cultured Human Amniotic Cells. *Nanomaterials (Basel)*. 2019; 9(11):1511.
37. Musial J, Krakowiak R, Mlynarczyk DT, Goslinski T, Stanisiz BJ. Titanium Dioxide Nanoparticles in Food and Personal Care Products-What Do We Know about Their Safety?. *Nanomaterials (Basel)*. 2020; 10(6):1110
38. Palugan L, Spoldi M, Rizzuto F, Guerra N, Uboldi M, Cerea M, Moutaharrik S, Melocchi A, Gazzaniga A, Zema L. What's next in the use of opacifiers for cosmetic coatings of solid dosage forms? Insights on current titanium dioxide alternatives. *Int J Pharm*. 2022; 616:121550.
39. Pelclova D, Navratil T, Kacerova T, Zamostna B, Fenclova Z, Vlckova S, Kacer P. NanoTiO₂ Sunscreen Does Not Prevent Systemic Oxidative Stress Caused by UV

Radiation and a Minor Amount of NanoTiO₂ is Absorbed in Humans. *Nanomaterials (Basel)*. 2019; 9(6):888.

40.Pujalté I, Serventi A, Noël A, Dieme D, Haddad S, Bouchard M. Characterization of Aerosols of Titanium Dioxide Nanoparticles Following Three Generation Methods Using an Optimized Aerosolization System Designed for Experimental Inhalation Studies. *Toxics*. 2017; 5(3):14.

41.Racovita AD. Titanium Dioxide: Structure, Impact, and Toxicity. *Int J Environ Res Public Health*. 2022; 19(9):5681.

42.Rashid MM, Forte Tavčer P, Tomšič B. Influence of Titanium Dioxide Nanoparticles on Human Health and the Environment. *Nanomaterials (Basel)*. 2021; 11(9):2354.

43.Ren W, Iqbal MZ, Zeng L, Chen T, Pan Y, Zhao J, Yin H, Zhang L, Zhang J, Li A, Wu A. Black TiO₂ based core-shell nanocomposites as doxorubicin carriers for thermal imaging guided synergistic therapy of breast cancer. *Nanoscale*. 2017; 9(31):11195-11204.

44.Rolo D, Assunção R, Ventura C, Alvito P, Gonçalves L, Martins C, Bettencourt A, Jordan P, Vital N, Pereira J, Pinto F, Matos P, Silva MJ, Louro H. Adverse Outcome Pathways Associated with the Ingestion of Titanium Dioxide Nanoparticles-A Systematic Review. *Nanomaterials (Basel)*. 2022; 12(19):3275.

45.Samat MH, Ali AMM, Taib MFM, Hassan OH, Yahya MZA. Hubbard U calculations on optical properties of 3d transition metal oxide TiO₂. *Results Phys*. 2016; 6:891-896.

46.Sanches PL, Geaquinto LRO, Cruz R, Schuck DC, Lorencini M, Granjeiro JM, Ribeiro ARL. Toxicity Evaluation of TiO₂ Nanoparticles on the 3D Skin Model: A Systematic Review. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020; 8:575.

47.Shakeel M, Jabeen F, Shabbir S, Asghar MS, Khan MS, Chaudhry AS. Toxicity of Nano-Titanium Dioxide (TiO₂-NP) Through Various Routes of Exposure: a Review. *Biol Trace Elem Res*. 2016; 172(1):1-36.

48.Shi J, Han S, Zhang J, Liu Y, Chen Z, Jia G. Advances in genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in vivo and in vitro. *NanoImpact*. 2022; 25:100377.

49.Shi H, Magaye R, Castranova V, Zhao J. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Part Fibre Toxicol*. 2013; 10:15.

50. Song B, Zhang Y, Liu J, Feng X, Zhou T, Shao L. Unraveling the neurotoxicity of titanium dioxide nanoparticles: focusing on molecular mechanisms. *Beilstein J Nanotechnol.* 2016; 7:645-54.
51. Teasdale A, Hughes K. Regulatory Highlights. *Org Process Res Dev.* 2023; 27(3):394-398.
52. Vieira A, Gramacho A, Rolo D, Vital N, Silva MJ, Louro H. Cellular and Molecular Mechanisms of Toxicity of Ingested Titanium Dioxide Nanomaterials. *Adv Exp Med Biol.* 2022; 1357:225-257.
53. Wang J, Fan Y. Lung injury induced by TiO₂ nanoparticles depends on their structural features: size, shape, crystal phases, and surface coating. *Int J Mol Sci.* 2014; 15(12):22258-78.
54. Wang Q, Huang JY, Li HQ, Chen Z, Zhao AZ, Wang Y, Zhang KQ, Sun HT, Al-Deyab SS, Lai YK. TiO₂ nanotube platforms for smart drug delivery: a review. *Int J Nanomedicine.* 2016; 11:4819-4834.
55. Wani MR, Shadab G. Titanium dioxide nanoparticle genotoxicity: A review of recent *in vivo* and *in vitro* studies. *Toxicol Ind Health.* 2020; 36(7):514-530.
56. Warheit DB, Donner EM. Risk assessment strategies for nanoscale and fine-sized titanium dioxide particles: Recognizing hazard and exposure issues. *Food Chem Toxicol.* 2015; 85:138-47.
57. Zhang X, Li W, Yang Z. Toxicology of nanosized titanium dioxide: an update. *Arch Toxicol.* 2015; 89(12):2207-17.