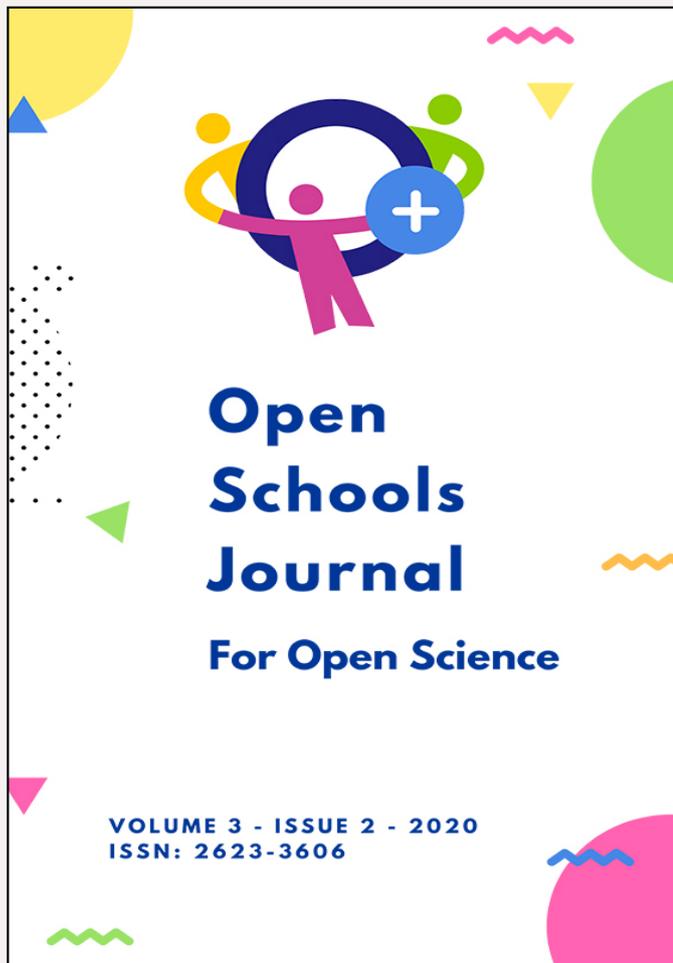


## Open Schools Journal for Open Science

Vol. 3, 2020



### Toxicity of azo-dyes combined with TiO<sub>2</sub> nanoparticles

Kroath M. BG/BRG Schloss Wagrain  
Punz E. BG/BRG Schloss Wagrain  
Joubert I.A. Dept. Biosciences, University  
of Salzburg  
Himly M. Dept. Biosciences, University  
of Salzburg  
Geppert M. Dept. Biosciences, University  
of Salzburg

<https://doi.org/10.12681/osj.22590>

Copyright © 2020 M. Kroath, E. Punz, I.A. Joubert,  
M. Himly, M. Geppert



#### To cite this article:

Kroath, M., Punz, E., Joubert, I.A., Himly, M., & Geppert, M. (2020). Toxicity of azo-dyes combined with TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Open Schools Journal for Open Science*, 3(2). doi:<https://doi.org/10.12681/osj.22590>

# Toxicity of azo-dyes combined with TiO<sub>2</sub> nanoparticles

M. Kroath<sup>1</sup>, E. Punz<sup>1</sup>, I.A. Joubert<sup>2</sup>, M. Himly<sup>2</sup>, and M. Geppert<sup>2</sup>

<sup>1</sup> BG/BRG Schloss Wagrain, Vöcklabruck, Austria

<sup>2</sup> Dept Biosciences, University of Salzburg, Austria

Abstract of poster presented orally in the moderated poster session at the International Open NanoScience Congress, 26.2.2019, Salzburg ([www.uni-salzburg.at/ONSC](http://www.uni-salzburg.at/ONSC))

Azo-dyes are organic compounds frequently used for food coloring for example in sweets. A characteristic feature of azo-dyes is the azo-group ( $-N=N-$ ) as part of the chromophore. In parallel, nanoparticles (NPs) are more and more used as food additives and thus, the encounter of NPs with azo-dyes is highly likely. In particular, TiO<sub>2</sub> NPs are incorporated into foods under the term E171.

The aim of this work was the investigation of potential combinatorial toxic effects of the azo-dye Azorubin in combination with TiO<sub>2</sub> NPs. Initially, the dye was diluted with pure water and characterized using spectrophotometry. Then, a concentration series of Azorubin ranging from 0 to 200 µg/mL was prepared and their cytotoxicity was investigated on human intestinal cells (Caco-2 cells) in absence or presence of 100 µg/mL TiO<sub>2</sub> NPs. None of the tested Azorubin concentrations resulted in a significant loss of the cellular metabolic activity in both – absence or presence of the TiO<sub>2</sub> NPs as shown by the CellTiter-Blue<sup>®</sup> assay. Comparable results were obtained by the Neutral Red uptake assay, which addresses the cells lysosomal integrity. Again, the presence of TiO<sub>2</sub> NPs did not alter the cytotoxicity profile of Azorubin; however, the highest Azorubin concentration (200 µg/mL) caused a 40% reduction in the cells lysosomal integrity – in both, absence or presence of TiO<sub>2</sub> NPs.

In conclusion, the data showed that Azorubin can be considered as safe in the used concentrations and setting and that TiO<sub>2</sub> NPs in the used concentration did not induce potentially harmful effects of the dye on human intestinal cells.

## Keywords

Azorubin; Titanium dioxide nanoparticles; Food coloring; Interactions; Spectrophotometry

## Acknowledgment

This work was supported by the Sparkling Science project Nan-O-Style (SPA 06/270) of the Austrian Ministry of Education, Science and Research (BMBWF).

# Toxizität von Azofarbstoffen in Kombination mit Titandioxidnanopartikeln

Maximilian Kroath, BRG Schloss Wagrain, Vöcklabruck

## Einleitung

Nanopartikel kommen immer öfter in unserem Alltag vor, zum Beispiel auch in Nahrungsmitteln. Deshalb ist es von Interesse zu verstehen, wie diese Partikel mit Azofarbstoffen (aus Lebensmittelfarbe) interagieren und welche biologischen Auswirkungen diese Kombinationen haben. Zur Zeit gibt es hierzu noch keine vergleichbaren Studien.

Zur experimentellen Klärung wurden zunächst die Interaktionen von Titandioxidnanopartikeln mit Azofarbstoffen untersucht. Des Weiteren wurde die Toxizität von Azofarbstoffen in Kombination mit Titandioxidnanopartikeln bestimmt. Hierfür wurde die humane Darmzelllinie Caco-2 verwendet.

## Methode

Zu Beginn wurde eine Farbspektrums Messung der Azofarbstoffe in unterschiedlichen Milieus mittels Spektralphotometer durchgeführt. Die Farbstoffe wurden dafür zuerst in destilliertem Wasser, verdünnter Salzsäure und Natronlauge im Verhältnis von 1:100 verdünnt.

Bei den Toxizitätstests wurde ein CTB Test und Neutralrot Test durchgeführt. Für beide Methoden wurden die Caco-2 Zellen in eine 96-well Platte ausgesät (Abb. 1). Die Zellen wurden dann mit den Azofarbstoffen in An- und Abwesenheit von Titandioxidnanopartikeln inkubiert und im Anschluss die Toxizitätsbestimmung durchgeführt (Abb. 2).



Abb. 1: Aussäen der Caco-2 Zellen.

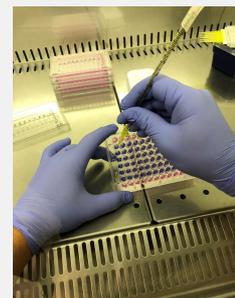


Abb. 2: Toxizitätsbestimmung mittels CTB Test

Der Neutralrot Test wirkt in den Lysosomen: dort reichert sich der Rote Farbstoff aufgrund des sauren pH-Wertes an, und die lebende Zelle färbt sich rot. Der CTB Test untersucht den Stoffwechsel: bei aktivem Stoffwechsel der Zellen färbt er sich von blau zu lila. In der rechten Abbildung (Abb. 2) ist die blaue Farbe des CTB-Reagenzes zu sehen.

## Ergebnisse

Die Resultate behandeln nur Azorubin. Allgemein kann man sagen, dass die Zellen ohne TiO<sub>2</sub> Nanopartikel eine höhere Vitalität aufweisen. Wie in Abbildung 3 zu erkennen ist reicht diese bei dem CTB Test, bei einer Konzentration von 12,5 µg/ml bis zu 118% im Vergleich zur Kontrolllösung. Mit Ausnahme der 200 µg/ml Lösung ist bei keiner anderen ein Sterben der Zellen zu beobachten. Der Neutralrot Test lieferte vergleichbare Ergebnisse. Jedoch wurden mit diesem Test bei der Konzentration von 200 µg/ml 40% weniger lebende Zellen gemessen. Der Neutralrot Test ist also etwas empfindlicher.

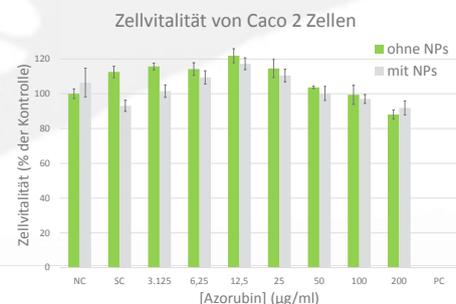


Abb. 3 CTB-Test Azorubin

## Schlussfolgerungen

Mit Azorubin gefärbte Lebensmittel, welche im Darm auf TiO<sub>2</sub> Nanopartikel treffen, haben keine toxische Wirkung auf die Darmzellen. Der niedrige Wert bei 200 µg/ml lässt sich auf die Agglomerationen von Azorubin mit Nanopartikeln zurückführen.