



# SANA BOLOGNA 2018

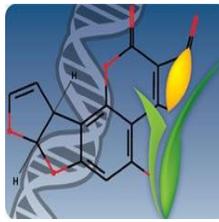
## Botanicals e contaminanti: questione emergente o nuova gestione di rischio esistente?

### **Aflatossine ed Ocratossina A**

**Carlo Brera**

Istituto Superiore di Sanità

# Regolamento EU/178/2002 (GFL) – Art. 23f e 34



## Definizione di rischi emergenti

‘an emerging risk to human, animal and/or plant health is understood as a risk resulting from a newly identified hazard to which significant **exposure** may occur or from an unexpected new or increased significant **exposure** and/or susceptibility to a known hazard’ (EFSA/SC/415 Final, 2007).

RASFF (ultimi 15 anni)

Spezie ed erbe

AFL N=691

OTA N= 154

Liquirizia

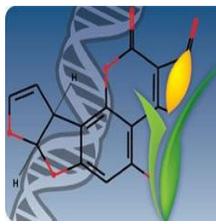
OTA N=1

Integratori alimentari

CIT N=2



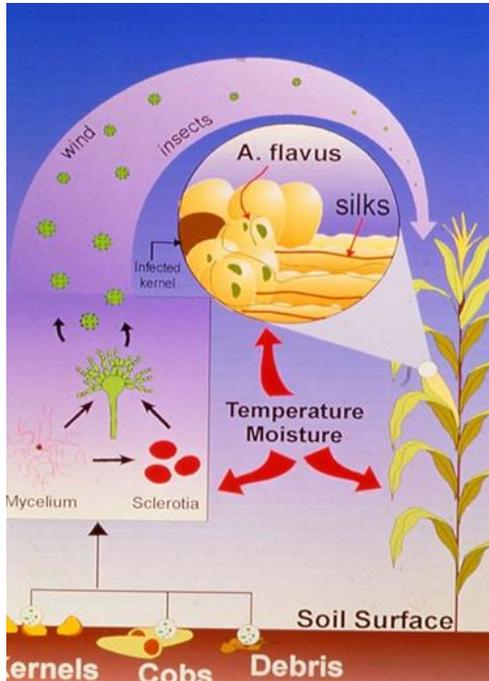
# LE MICOTOSSINE



**Le micotossine sono sostanze tossiche prodotte dal metabolismo secondario di funghi filamentosi o muffe (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Stachybotris*, *Cephalosporium*) che possono svilupparsi sulle piante e sugli alimenti**



# La produzione delle micotossine è influenzata da:



➤ **condizioni climatiche e ambientali**

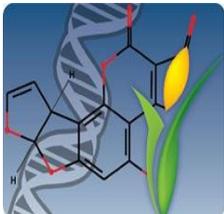
➤ **pratiche di coltivazione e conservazione**

➤ **tipo di substrato**

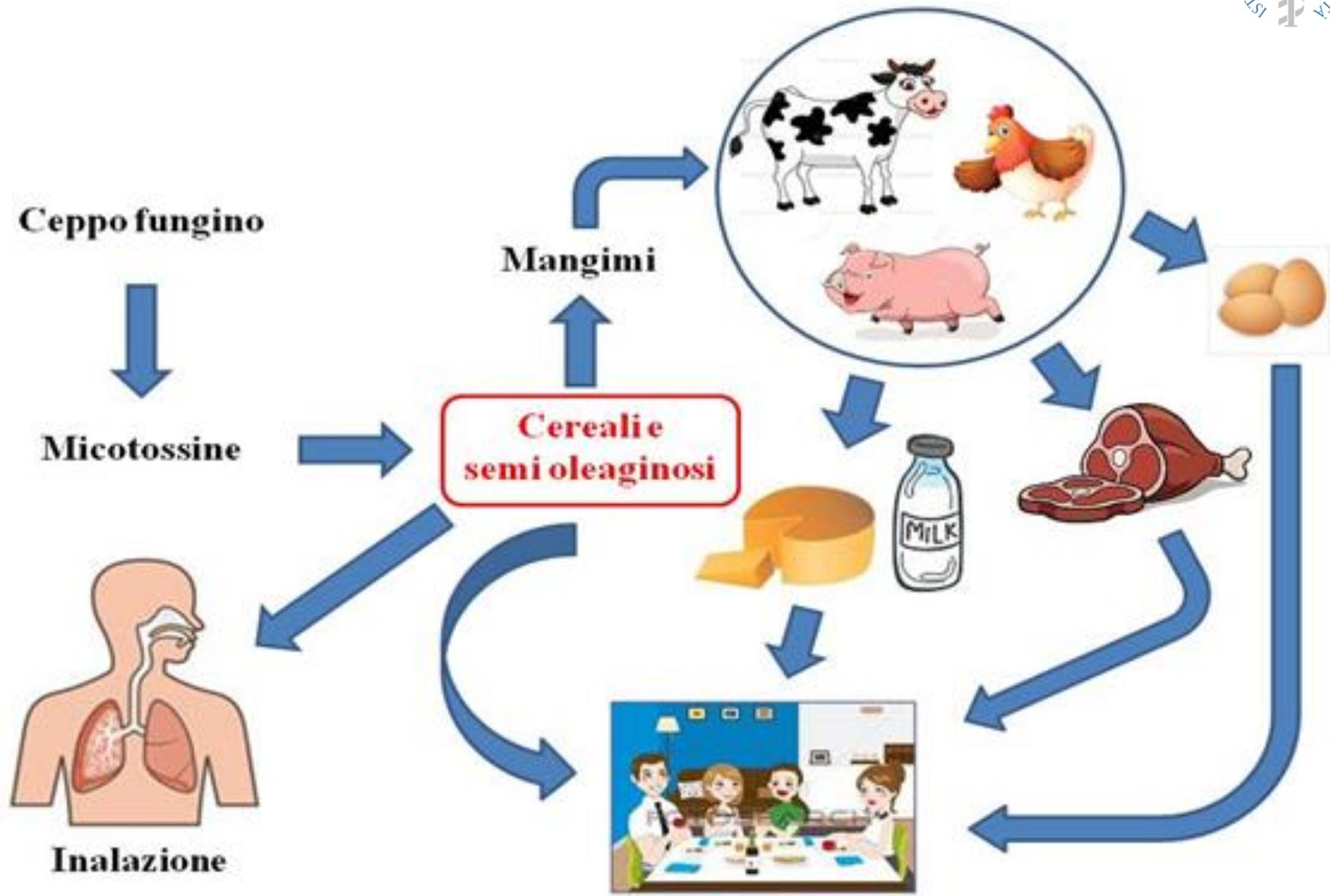
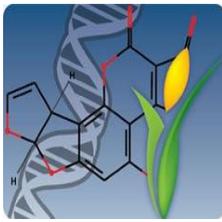


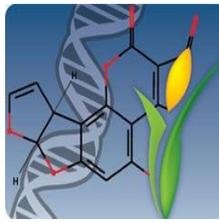
## Stress

- ✓ **termico**
- ✓ **nutrizionale**
- ✓ **idrico**



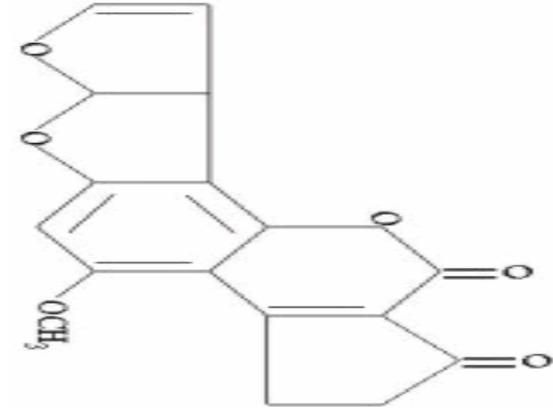
# Vie di esposizione





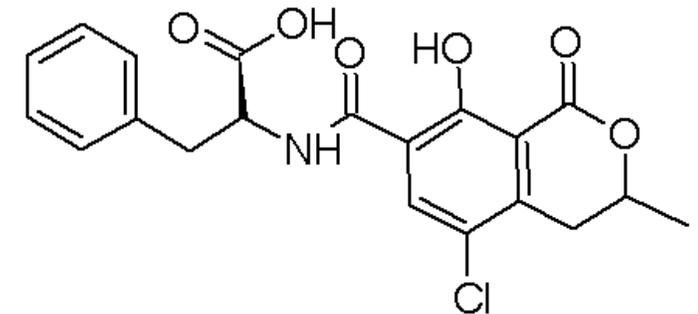
Gruppo di metaboliti prodotti da funghi da stoccaggio del genere *Aspergillus*; sono state riconosciute 18 differenti aflatossine, ma solo la B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> sono state riconosciute come agenti naturali di contaminazione di mangimi o alimenti. Fra questi composti, la AFB<sub>1</sub> presenta una tossicità acuta e cronica ed un potere cancerogeno e mutageno che ne fanno uno delle sostanze più pericolose per la salute.

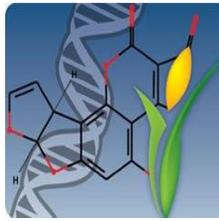
## Aflatossine



## Ocratossina

Prodotta da muffe del genere *Penicillium* e *Aspergillus* è una micotossina dotata di elevata tossicità, soprattutto a carico del rene, ed è molto diffusa nei climi freschi e temperati.

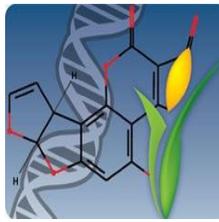




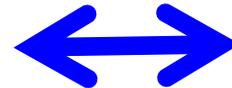
## Elementi nella considerazione della esposizione dell'uomo

- Tossicità della sostanza
- Quantità assunta con gli alimenti
  - Frequenza di assunzione
- Presenza di altre micotossine
  - Regime dietetico

# Approcci per valutare l'esposizione

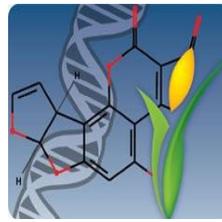


## Analisi dei Prodotti Alimentari



## Analisi dei Fluidi biologici





# Valutazione dell'esposizione

A prescindere dal tipo di tossicità (acuta o cronica) di una sostanza e dal tipo di approccio utilizzato per la sua stima, la valutazione della esposizione risponde al semplice algoritmo:

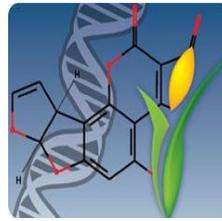
$$\text{Esposizione} = \frac{\text{CONCENTRAZIONE } (\mu\text{g/kg}) \times \text{CONSUMO (kg)}}{\text{PESO CORPOREO (kg)}}$$

- Numerosità campionaria
- Metodi di analisi sensibili

Dati ufficiali di riferimento

- ✓ Dati disaggregati
- ✓ Fasce di popolazione
- ✓ Area geografica
- ✓ Tipologia di consumo (M, 95ile)

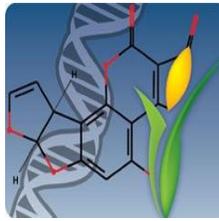
SPEZIE



## Calcolo dell'esposizione (ng/kg pc/giorno)

Per le aflatossine, si utilizza il Margine di esposizione, calcolando il rapporto tra il valore  $BMDL_{10}$  pari a 170 ng/kg pc/giorno, riportato dall'EFSA nel 2007 (basato su studi di cancerogenicità condotti su ratti esposti alla AFB1), e l'esposizione rilevata attraverso studi di ricerca.

# Calcolo dell'esposizione del consumatore alle aflatossine nelle spezie



**CONCENTRAZIONE ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) x CONSUMO (kg)**

**PESO CORPOREO (kg)**

**Consumi Tutta la Popolazione**

**Consumi Soli Consumatori**

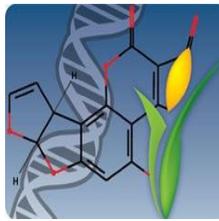
**1,9 grammi (Media)**

**2,3 grammi (Media)**

**6,1 grammi (95%ile)**

**6,5 grammi (95%ile)**

# Esposizione alla AFB1 nelle Spezie



Aflatossina B1	Esposizione media (ng/kg pc/d)	Esposizione 95%ile (ng/kg pc/d)	MoE*
Tutta la Popolazione (TP)	0,02	0,06	8500/2833
Solo Consumatori (C)	0,02	0,06	8500/2833
Bambini 3-9.9 anni (M/F)	0,04 (TP)	0,13 (TP)	4250/1307
	0,04 (C)	0,14 (C)	4250/1214
Adolescenti <18 anni (M)	0,02 (TP)	0,07 (TP)	8500/2428
	0,03 (C)	0,08 (C)	5667/2125
Adolescenti <18 anni (F)	0,03 (TP)	0,09 (TP)	5667/1888
	0,03 (C)	0,09 (C)	5667/1888
Adulti M	0,02 (TP)	0,05 (TP)	8500/3400
	0,02 (C)	0,06 (C)	8500/2833
Adulti F	0,02 (TP)	0,06 (TP)	8500/2833
	0,02 (C)	0,07 (C)	8500/2428
Anziani M	0,02 (TP)	0,06 (TP)	8500/2833
	0,02 (C)	0,06 (C)	8500/2833
Anziani F	0,02 (TP)	0,06 (TP)	8500/2833
	0,02 (C)	0,07 (C)	8500/2428

**\*Margine di esposizione >10000 No risk <<10000 Risk**

# Regolamento CE/1881/2006 (testo consolidato)

## Aflatossine

2.1.14.	Le seguenti specie di spezie: <i>Capsicum</i> spp. (frutti secchi dello stesso, interi o macinati, compresi peperoncini rossi, peperoncino rosso in polvere, pepe di Caienna e paprica) <i>Piper</i> spp. (frutti dello stesso, compreso il pepe bianco e nero) <i>Myristica fragrans</i> (noce moscata) <i>Zingiber officinale</i> (zenzero) <i>Curcuma longa</i> (curcuma) Miscele di spezie contenenti una o più delle suddette spezie	5,0	10,0
---------	---	-----	------

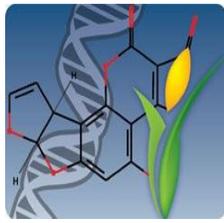
# Regolamento CE/1881/2006 (testo consolidato)

## Ocratossina A

		Dried herbs, Tea Herbal infusions	10 µg/kg
2.2.11.	Spezie, comprese le spezie essiccate		
	<i>Piper</i> spp (suoi frutti, compreso pepe bianco e nero)		15 µg/kg
	<i>Myristica fragrans</i> (noce moscata)		
	<i>Zingiber officinale</i> (zenzero)		
	<i>Curcuma longa</i> (curcuma)		
	<i>Capsicum</i> spp (suoi frutti secchi, interi o macinati, tra cui peperoncini, peperoncini in polvere, pepe di Caienna e paprica)		20 µg/kg
	Miscele di spezie contenenti una delle suddette spezie		15 µg/kg

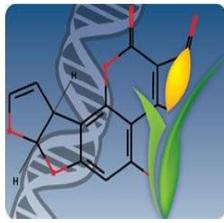
# Liquirizia e derivati

# Fasi da sviluppare



1. Individuazione di una procedura di campionamento per una corretta valutazione dell'OTA nei vari prodotti e valutazione della distribuzione della tossina (eterogeneità della contaminazione).
2. Analisi di un numero rappresentativo di prodotti a base di liquirizia da campionare sul territorio.
3. Interpretazione del risultato (come valutare la conformità del prodotto).
4. Disponibilità di dati di consumo ufficiale.
5. Dati sull'effetto dei trattamenti fisici sulla contaminazione originale della materia prima.
6. Disponibilità di informazioni sul fattore di conversione da materia prima a prodotto finito in modo tale da applicare l'art. 2 del Reg. (CE) 1881/2006.
7. Indicazione obbligatoria della percentuale di liquirizia sui prodotti finiti che la contengono.
8. Valutazione dell'esposizione del consumatore (in base ai dati di monitoraggio e consumo).
9. Disponibilità di metodi di analisi rapidi per la determinazione della OTA nella materia prima (liquirizia ed erbe essiccate). Affidabilità? Limite di quantificazione?

# Cosa considerare all'atto della valutazione del consumo/esposizione



# Regolamento CE/1881/2006 (testo consolidato)

## Ocratossina A

$$\text{EXP} = 10 \mu\text{g/kg} * 10 \text{ g}/26,1 \text{ kg}$$

$$\text{EXP} = 3,83 \text{ ng/kg giorno}$$

$$\text{EXP} = 3,83 * 7 = 26,81/120 = 22\% \text{ TWI}$$

Foods containing liquorice or liquorice extract placed on the market for the final consumer: 10 µg/kg

2.2.12. Liquirizia (*Glycyrrhiza glabra*, *Glycyrrhiza gonfia* e altre specie)

2.2.12.1. Radice di liquirizia, ingrediente per infusioni a base di erbe

20 µg/kg

2.2.12.2. Estratto di liquirizia<sup>(42)</sup>, usato nei prodotti alimentari, soprattutto nelle bevande e nella confetteria

80 µg/kg

# Metodo di analisi – CEN (prEN 17250)

Foodstuffs - Determination of ochratoxin A in paprika, chilli, black & white pepper, nutmeg, spice mix, liquorice, cocoa and cocoa products by immunoaffinity column clean-up and high performance liquid chromatography with fluorescence detection

Method by HPLC-IAC-FLD. This method has been validated according to the IUPAC harmonised protocol in interlaboratory studies via the analysis of both naturally contaminated and spiked samples ranging from 1,0 µg/kg to 84,9 µg/kg for spices (paprika and chili, black and white pepper, nutmeg and spice mix), ranging from 7,7 µg/kg to 96,8 µg/kg for liquorice and ranging from 2,1 µg/kg to 26,3 µg/kg for cocoa and cocoa products.

The method is based on the extraction of the samples with an aqueous methanol solution, followed by immunoaffinity clean up. The determination is carried out by reversed phase high performance liquid chromatography coupled to a fluorescence detector.

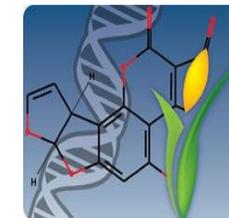
# Integratori alimentari



# Indagine ISS sugli integratori alimentari

## *Esposizione alla citrinina*

### *negli integratori a base di riso rosso fermentato*



	CITRININA
<b>N° campioni = 63</b>	
% campioni positivi	8
Media campioni positivi (µg/kg)	717
Media considerando tutti i campioni (µg/kg)	57

Campioni positivi	Livello (µg/kg)
Campione 1	1330
Campione 2	1019
Campione 3	148
Campione 10	207
Campione 11	881

**Integratori a base di  
riso rosso fermentato**

**Livello di legge  
(µg/kg)**

2000

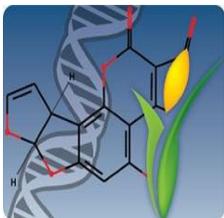
Based on the data available in EFSA scientific report in 2017, regarding the presence of citrinin in food supplements based on rice fermented with red yeast *Monascus purpureus* a review of the current maximum level of 2000 µg/kg in food supplements based on rice fermented with red yeast *Monascus purpureus* is necessary and appropriate.

# Valori di esposizione alla citrinina relativi ai consumatori adulti di integratori a base di riso rosso fermentato

% di monacolina K	Consumo medio	Contaminazione LB	Contaminazione UB	Esposizione LB	Esposizione UB
	(g/die)	( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	( $\mu\text{g}/\text{kg}$ pc/die)	( $\mu\text{g}/\text{kg}$ pc/die)
0,4	2,5	57	139	0,002	0,005
1,5	0,67			$0,5 * 10^{-3}$	$1,3 * 10^{-3}$
3	0,3			$0,3 * 10^{-3}$	$0,6 * 10^{-3}$
5	0,2			$0,2 * 10^{-3}$	$0,4 * 10^{-3}$

Consumo calcolato come la dose giornaliera di lievito di riso rosso necessaria per assumere 10 mg di monacolina K, quantità stabilita per ottenere l'effetto salutistico ipocolesterolemizzante.

**Dose tossicologica di riferimento: 0.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  b.w. per day (EFSA, 2012)**

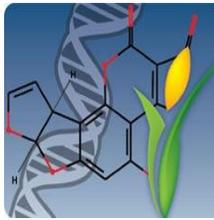




## Indagine ISS sugli integratori alimentari a base di ginseng, ginkgo biloba, uva rossa e caffè verde

La qualità sanitaria, relativamente alla presenza di aflatossine ed ocratossina, degli integratori a base di riso rosso, ginseng, ginkgo biloba, uva rossa e caffè verde, è da considerare del tutto rassicurante anche se dovrebbe essere monitorata costantemente la qualità della materia prima impiegata nella preparazione di alcuni di questi prodotti, data la presenza, in alcuni casi, di alti livelli di contaminazione.

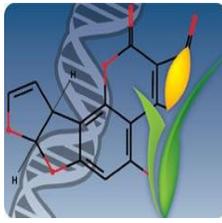
Inoltre, si rileva che la qualità sanitaria dei prodotti disponibili **ON-LINE** sembra essere inferiore, in quanto si è diffusamente riscontrata una maggiore frequenza di alti livelli di contaminazione.



**Table 1.** Homogenization of different types of capsule based food supplements. + indicates homogenization or solubilisation and – indicates no homogenization or solubilisation.

	<b>Description</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>Food supplement</b>	Capsule material	HPMC	HPMC	Gelatine	Gelatine	Carrageenan
	Matrix in capsule	Powder	Powder	Powder	Fish oil	Oil
<b>Mechanical mixing</b>	Coffee grinder <sup>1</sup>	+	+	+	-	-
	Freezing in liquid nitrogen followed by mechanical homogenization <sup>2</sup>	+	+	+	+	+
<b>Solubilisation</b>	Water (22°C)	-	-	-	-	30 min
	Hot water (37°C)	-	-	3 days	-	22 min
	0.1M HCl (pH=1)	1 day	-	30 min	1 day	12 min
	10% KOH in water:methanol (1:9)	-	-	-	3 days	-

<sup>1</sup> Bosch KM13 coffee grinder <sup>2</sup> Warning Pro Blender or Bosch KM13 coffee grinder



# Esposizione OTA

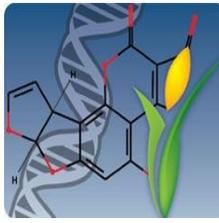
## Integratori a base di uva rossa

**Exp = 38,50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  x 1,3 g (due capsule da 650 mg come dose giornaliera raccomandata)/70 kg (peso corporeo)**

**Exp = 0,7 ng/kg peso corporeo/giorno**

**Exp = 4,9 ng/kg peso corporeo/settimana  $\xrightarrow{4\%}$  TWI = 120 ng/kg pc/sett**

# CONCLUSIONI



## Botanicals e contaminanti: questione emergente o nuova gestione di rischio esistente?

- Dai dati a disposizione non sussistono le condizioni per considerare i *botanicals* una questione emergente (relativamente alle micotossine).
- La combinazione spezie-micotossine rappresenta il binomio più degno di attenzione, anche se l'esposizione non è risultata critica.
- Per i prodotti a base di liquirizia, è necessario definire prioritariamente i piani di campionamento, metodi validati di analisi di screening, dati di consumo disaggregati e criteri armonizzati per la valutazione del rischio.
- Per gli integratori alimentari, è necessario intensificare gli studi di monitoraggio per verificare soprattutto la qualità delle materie prime impiegate nella preparazione di alcuni di questi prodotti, data la presenza, in alcuni casi, di alti livelli di contaminazione.
- Da dati preliminari, i prodotti on-line non presentano una situazione peggiorativa rispetto ai corrispondenti prodotti venduti al dettaglio, ma si consiglia un costante controllo data anche la vasta gamma di scelta di cui il consumatore può disporre.

# Grazie per l'attenzione



*Carlo Brera*

**ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ**

*Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e  
Sanità Pubblica Veterinaria*

**Tel. 06-49902377**

**Fax 06-49902363**

**carlo.brera@iss.it**