

Milano 26 Settembre 2017

Convegno

**Contaminazioni, adulterazioni e contraffazioni di alimenti e integratori alimentari: come controllare, tecnologie analitiche disponibili e normative di riferimento**

Università degli Studi di Milano - Sala Napoleonica, Palazzo Greppi  
Via Sant'Antonio 10, Milano

# Questione Micotossine

Cinzia Ballabio (SISTE)



**ASSOERBE**

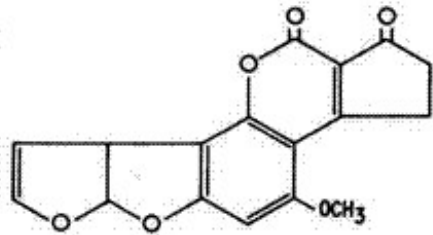
# MICOTOSSINE

- \* Le micotossine sono un gruppo di composti chimici ad elevata tossicità e a basso peso molecolare che si trovano in natura come metaboliti secondari di funghi filamentosi microscopici appartenenti prevalentemente ai generi *Penicillium*, *Fusarium* ed *Aspergillus*.
- \* Lo sviluppo di muffe e la produzione di micotossine possono avvenire in qualunque fase della filiera produttiva, ma sono più frequenti in campo e durante lo stoccaggio.
- \* La crescita fungina e la sintesi di micotossine è favorita da particolari condizioni climatiche (alte temperature e umidità).

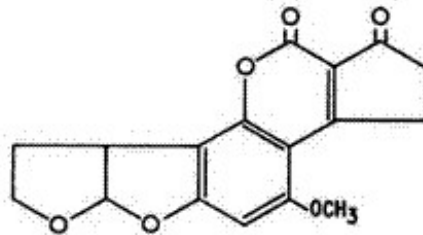
# MICOTOSSINE

- \* Gli alimenti più soggetti a contaminazione da muffe tossigene e da micotossine sono i prodotti di origine vegetale: cereali, frutta secca, semi oleosi, spezie, caffè, cacao, uva essiccata, vino, birra, integratori alimentari a base vegetale, etc.
- \* Le micotossine sono molecole molto stabili e persistono nei prodotti contaminati anche per molto tempo dopo la morte del fungo produttore. Resistono anche alle alte temperature (molitura, cottura), ai trattamenti chimici (aggiunta di additivi e conservanti) o biologici (fermentazione).
- \* Studi epidemiologici condotti su popolazioni di aree geografiche più a rischio di contaminazione evidenziano una correlazione positiva tra la presenza di micotossine nella dieta e l'incidenza di alcune patologie (cancro).

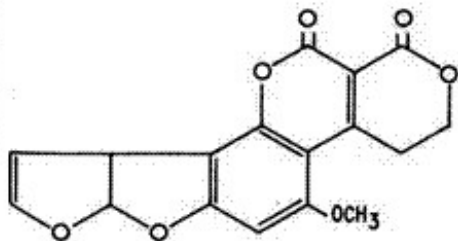
# MICOTOSSINE



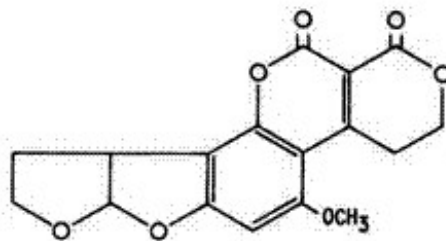
AFLATOSSINA B1



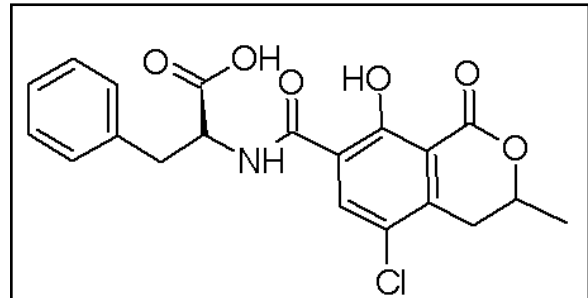
AFLATOSSINA B2



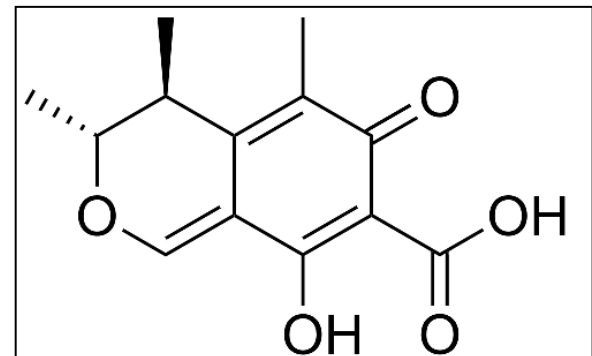
AFLATOSSINA G1



AFLATOSSINA G2



OCRATOSSINA A



CITRININA

**Altre:** Fumonisine, Zearalenoni, Tricoteceni, Ergoline, Patulina

# SCOPO

- \* Messa a punto e validazione di un metodo analitico appropriato per la determinazione della presenza di:
  - **citrinina** in integratori alimentari a base di riso rosso fermentato e relative materie prime;
  - **aflatossine** ed **ocratossina A** in prodotti a base di ginseng, ginkgo biloba, uva rossa e caffè verde e relative materie prime.
- \* Valutazione del potenziale rischio per i consumatori associato al consumo di integratori alimentari contaminati da micotossine.

# PROTOCOLLO

## FASE I – Scelta dei campioni

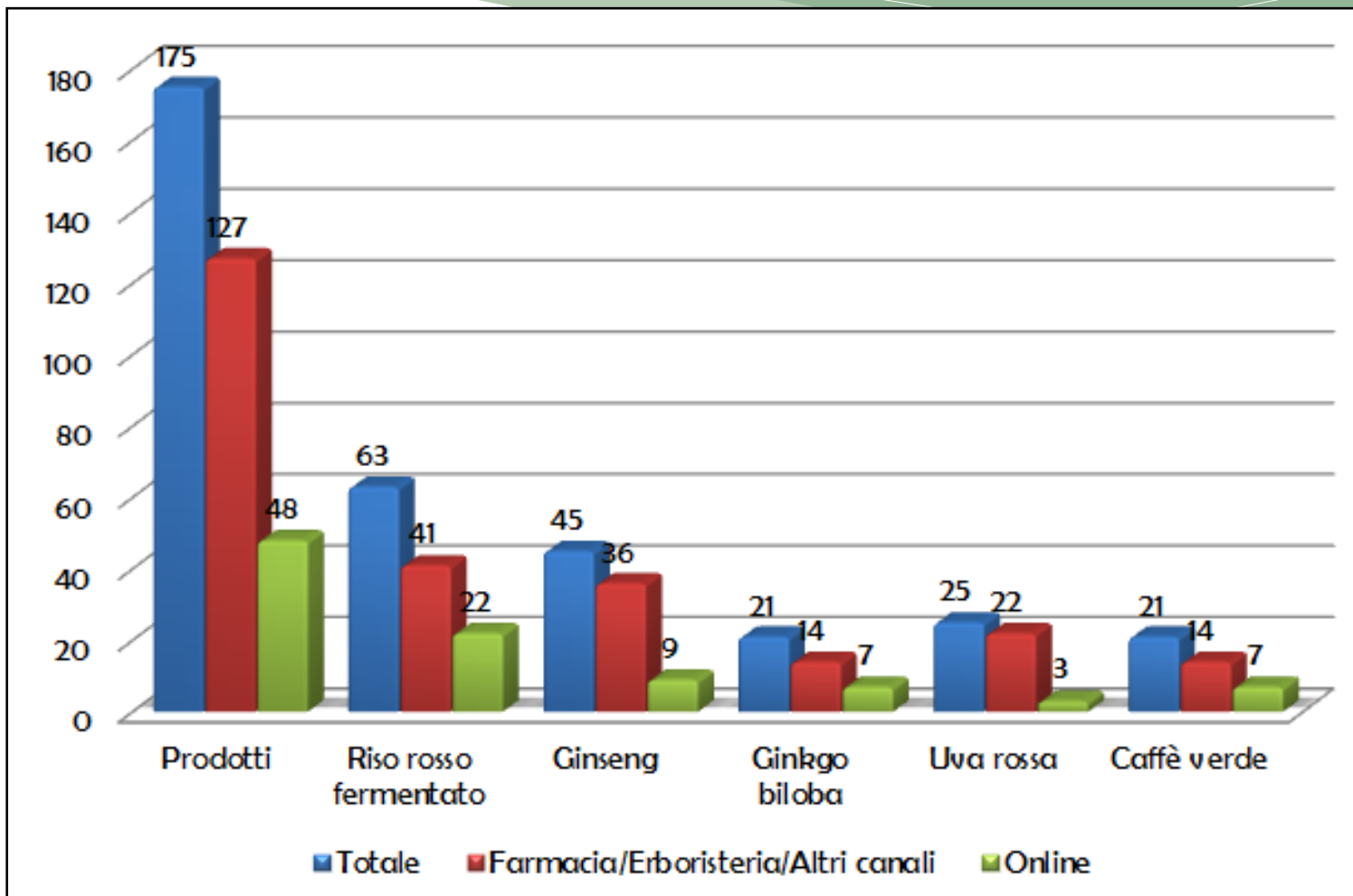
- \* Selezione degli integratori alimentari sul mercato italiano (dati di letteratura scientifica, distribuzione, brand, claim sulla salute, etc.) presso i più comuni punti vendita (farmacie, erboristerie, GDO) e on-line.
- \* Sono stati analizzati anche alcuni campioni di materie prime fornite da ASSOERBE.

## FASE II – Analisi

- \* Riso rosso: Citrinina
- \* Ginseng: Aflatossine e Ocratossina A
- \* Ginkgo biloba: Aflatossine e Ocratossina A
- \* Uva rossa: Ocratossina A
- \* Caffè verde: Ocratossina A

## FASE III – Valutazione del rischio nei consumatori

# CAMPIONI





# INTEGRATORI ALIMENTARI

## RISO ROSSO FERMENTATO

- \* Il riso rosso fermentato si ottiene dalla fermentazione del comune riso da cucina (*Oryza sativa* L.) ad opera del fungo *Monascus purpureus*.
- \* La **Monacolina K**, una molecola statino-simile, si forma durante la fermentazione del riso.
- \* Claim autorizzato per il *Monascus purpureus* (riso rosso) - Reg. (UE) 432/2012: «**La monacolina K del riso rosso contribuisce al mantenimento di livelli normali di colesterolo nel sangue**». L'indicazione va accompagnata dall'informazione al consumatore che l'effetto benefico si ottiene con l'assunzione giornaliera di 10 mg di monacolina K da preparazioni di riso rosso fermentato.





# INTEGRATORI ALIMENTARI RISO ROSSO FERMENTATO

- \* Durante la fermentazione del riso rosso con *Monascus purpureus* si forma **Citrinina**, una micotossina nefrotossica. Sono in corso ulteriori studi per valutarne l'azione genotossica e cancerogena.
- \* Regolamento (CE) 1881/2006: è fissato un limite di 2.000 µg/kg per la citrinina negli integratori alimentari a base di riso rosso fermentato con lievito *Monascus purpureus*.
- \* Il gruppo CONTAM dell'EFSA ha identificato un NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) di 20 µg di citrinina/kg p.c./die per la nefrotossicità. Applicando un fattore di incertezza pari a 100, ha concluso che non esiste alcun rischio a livelli di esposizione dell'uomo alla citrinina pari a 0,2 µg/kg p.c./die (EFSA Journal 2012;10(3):2605).



# INTEGRATORI ALIMENTARI

## RISO ROSSO FERMENTATO - ANALISI

### FASE I

- \* Estrazione con metanolo 100%, rapporto matrice/solvente 1:25
- \* Estratto centrifugato a 6.000 rpm per 10 min e filtrato su membrana di acetato di cellulosa

### FASE II

- \* Analisi in HPLC-FDL (rivelatore a fluorescenza) usando come fase mobile secondo un gradiente lineare una miscela di acetonitrile/acqua allo 0,05% acido trifluoroacetico, pH 2-2,5.
- \* Condizioni cromatografiche:
  - Flusso: 1 ml/min
  - Rilevazione fluorimetrica ( $\lambda_{ecc} = 331 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{em} = 500 \text{ nm}$ );
  - Colonna cromatografica: Phenomenex, Kinetex EVO C18, Core-Shell technology (150 x 4,6 mm ID, 5  $\mu\text{m}$ )

# RISO ROSSO FERMENTATO – CAMPIONI

Monascus purpureus - titolo	Forma di presentazione	N° Campioni
5% Monacolina K	Compresse	4
	Capsule	4
	Perle gelatinose	2
	Bustine	2
3% Monacolina K	Estratto secco	8
	Compresse	14
	Capsule	11
	Perle gelatinose	4
	Bustine	1
	Tavolette	2
2,5% Monacolina K	Capsule	1
1,5% Monacolina K	Estratto secco	1
	Compresse	3
	Capsule	4
0,8% Monacolina K	Capsule	1
0,076% Monacolina K	Perle gelatinose	1
<b>TOTALE</b>		<b>63 (22 online)</b>





# INTEGRATORI ALIMENTARI

## RISO ROSSO FERMENTATO - ANALISI

	Citrinina
Campioni > LOQ*	5 (8%)
Media campioni > LOQ	717 µg/kg
Media su tutti i campioni	57** µg/kg

\* LOQ: 150 µg/kg

\*\* I campioni con livelli di citrinina < LOQ sono stati considerati uguali a zero (Lower bound)

**Reg. (CE) 1881/2006: 2.000 µg/kg**  
in integratori alimentari a base di  
riso rosso fermentato

Campioni > LOQ	Valore medio <sup>§</sup> (µg/kg)
Campione 1	1.330
Campione 2	1.019
Campione 3	148
Campione 10	207
Campione 11	881

§ Ogni campione è stato analizzato in doppio



# VALUTAZIONE DELL'ESPOSIZIONE ALLA CITRININA – Approccio deterministico

$$\text{ESPOSIZIONE} = \frac{\text{Concentrazione media micotossina } (\mu\text{g/kg}) \times \text{Consumo medio (g)}}{\text{Peso corporeo medio (70 kg)}}$$

Ricavata dall'analisi quantitativa dei campioni

Dose giornaliera di riso rosso fermentato necessaria per assumere 10 mg di Monacolina K



# VALUTAZIONE DELL'ESPOSIZIONE ALLA CITRININA – Approccio deterministico

Valori di esposizione alla citrinina nel consumatore calcolati sulla base del consumo medio giornaliero di integratori alimentari con riso rosso fermentato

Titolo in Monacolina K	Consumo medio (g/die)	Livello medio contaminazione LB ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Livello medio contaminazione UB ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Esposizione LB* ( $\mu\text{g}/\text{kg p.c./die}$ )	Esposizione UB** ( $\mu\text{g}/\text{kg p.c./die}$ )
0,4%	2,5	57	139	0,002	0,005
1,5%	0,67			$0,5 \cdot 10^{-3}$	$1,3 \cdot 10^{-3}$
3%	0,3			$0,3 \cdot 10^{-3}$	$0,6 \cdot 10^{-3}$
5%	0,2			$0,2 \cdot 10^{-3}$	$0,4 \cdot 10^{-3}$

\* Lower Bound (LB): campioni  $\leq$  LOQ  $\rightarrow$  valore zero

\*\* Upper Bound (UB): campioni  $\leq$  LOQ  $\rightarrow$  valore LOQ ( $150 \mu\text{g}/\text{kg}$ )

**Livello soglia (EFSA):  $0,2 \mu\text{g}/\text{kg p.c./die}$**



# INTEGRATORI ALIMENTARI

## RISO ROSSO FERMENTATO - CONCLUSIONI

- \* La citrinina è stata rilevata ed è risultata superiore al LOQ (150  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) in 5 campioni (estratti di riso rosso fermentato) sui 63 totali (8%) analizzati.
- \* Nessun campione è risultato contaminato a livelli superiori al tenore massimo di citrinina (2.000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) stabilito per gli integratori alimentari a base di riso rosso fermentato con *Monascus purpureus* dal Reg. (CE) 1881/2006.
- \* Nei diversi scenari di esposizione, il rischio di nefrotossicità dovuta all'assunzione degli integratori a base di riso rosso fermentato è risultato di scarsa significatività.
- \* Gli estratti secchi titolati al 3% in Monacolina K, nei quali è stata rilevata la presenza maggiore di citrinina, non rappresentano un rischio. I valori di esposizione calcolati sono ben al di sotto del valore soglia tossicologico ricavato dall'EFSA (0,2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  p.c./die).

# INTEGRATORI ALIMENTARI A BASE DI:



## **Ginseng**

*Panax ginseng* C.A. Meyer

Fam. *Araliaceae*

**Parti di piante ammesse:** foglie, radici

**Radice:** Tónico-adattogeno; Antiossidante; Tónico (stanchezza fisica, mentale); Metabolismo dei carboidrati



## ***Ginkgo biloba* L.**

Fam. *Ginkgoaceae*

**Parti di piante ammesse:** foglie, gemme

**Foglie:** Antiossidante; Memoria e funzioni cognitive; Normale circolazione del sangue; Funzionalità del microcircolo



# INTEGRATORI ALIMENTARI A BASE DI:

## Uva rossa

*Vitis vinifera* L.

Fam. *Vitaceae*

**Parti di piante ammesse:** foglie, frutti, gemme, semi e olio

- **Foglie, seme:** Funzionalità del microcircolo (pesantezza delle gambe); Antiossidante; Regolare funzionalità dell'apparato cardiovascolare;
- **Olio:** Integrità e funzionalità delle membrane cellulari; Trofismo e funzionalità della pelle; Contrasto dei disturbi del ciclo mestruale; Funzionalità articolare

## Caffè verde

*Coffea arabica* L.

Fam. *Rubiaceae*

**Parte di pianta ammessa:** semi

**Seme:** Azione tonica e di sostegno metabolico. Antiossidante.



# INTEGRATORI ALIMENTARI

## Analisi per la determinazione di Ocratossina A

### Caffè verde e Uva rossa

- \* Estrazione metanolo/soluzione acquosa di bicarbonato
- \* Filtrazione su filtro di carta a pieghe e centrifugazione a 6.000 rpm per 10 min
- \* Purificazione attraverso passaggio in colonnina di immunoaffinità, lavaggio con PBS e acqua ed eluizione con metanolo
- \* Analisi in HPLC-FDL (**Criticità**)

### Ginseng e Ginkgo biloba

- \* Estrazione metanolo/acqua 80:20
- \* Filtrazione su filtro di carta a pieghe e centrifugazione a 6.000 rpm per 10 min
- \* Purificazione attraverso passaggio in colonnina di immunoaffinità, lavaggio con PBS e acqua ed eluizione con metanolo
- \* Analisi in HPLC-FDL (**Criticità**)

### \* **Analisi in UPLC-MS/MS**

Condizioni operative: Sorgente ESI

- Modalità positiva (ESI +)
- Temperatura sorgente: 120 °C
- Temperatura gas desolvatazione (azoto): 350 °C

- Flusso gas desolvatazione: 600 L/h
- Voltaggio capillare: 3,00 kV



# INTEGRATORI ALIMENTARI

## Ocratossina A in Ginseng



### CAMPIONI ANALIZZATI

\* 45 campioni totali (9 online)

- Bustine: 1
- Capsule: 16
- Compresse: 6
- Flaconcini: 13
- Liquido: 1
- Polvere: 5
- Caffè solubile: 3

Reg. (CE) 1881/2006: 80 µg/kg in estratto di liquirizia, usato nei prodotti alimentari, soprattutto nelle bevande e nella confetteria

### RISULTATI - 7 campioni (15,6%) > LOQ\*

Campioni > LOQ*	Valore medio <sup>§</sup> (µg/kg)
Campione 7	0,42
Campione 24	1,82
Campione 27	0,47
Campione 29	13,6
Campione 39 (online)	3,01
Campione 42 (online)	1,42
Campione 43 (online)	2,87

\* LOQ: 0,2 µg/kg

§ Ogni campione è stato analizzato in doppio



# INTEGRATORI ALIMENTARI

## Ocratossina A in Ginkgo biloba



### CAMPIONI ANALIZZATI

\* 21 campioni totali (7 online)

- Capsule: 13
- Compresse: 5
- Flaconcini: 1
- Liquido: 1
- Polvere: 1

Reg. (CE) 1881/2006: 15  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in spezie, comprese quelle essiccate (pepe bianco e nero, noce moscata, zenzero, curcuma)

### RISULTATI - 6 campioni (28,6%) > LOQ\*

Campioni > LOQ*	Valore medio <sup>§</sup> ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
Campione 1	2,21
Campione 2	0,51
Campione 16 (online)	0,74
Campione 17 (online)	1,22
Campione 18 (online)	7,79
Campione 19 (online)	3,72

\* LOQ: 0,2  $\mu\text{g}/\text{kg}$

§ Ogni campione è stato analizzato in doppio



# INTEGRATORI ALIMENTARI

## Ocratossina A in CAFFÈ VERDE



### CAMPIONI ANALIZZATI

\* 21 campioni totali (7 online)

- Bustine: 1
- Capsule: 8
- Compresse: 6
- Liquido: 4
- Ovalette: 1
- Pastiglie: 1

### RISULTATI - 15 campioni (71%) > LOQ\*

Campioni > LOQ*	Valore medio <sup>§</sup> (µg/kg)
Campione 2	0,96
Campione 3	2,51
Campione 4	3,46
Campione 5	0,21
Campione 6	0,21
Campione 7	2,3
Campione 9	19,3
Campione 11	1,15

Campioni > LOQ*	Valore medio <sup>§</sup> (µg/kg)
Campione 13	8,38
Campione 15 (online)	2,61
Campione 16 (online)	23,7
Campione 17 (online)	2,18
Campione 18 (online)	11,6
Campione 19 (online)	10,9
Campione 20 (online)	0,40

\* LOQ: 0,2 µg/kg

§ Ogni campione è stato analizzato in doppio



# INTEGRATORI ALIMENTARI

## Ocratossina A in UVA ROSSA



### CAMPIONI ANALIZZATI

\* 25 campioni totali (3 online)

- Bustine: 3
- Capsule: 11
- Compresse: 9
- Flaconcini: 1
- Liquido: 1

Reg. (CE) 1881/2006: 10 µg/kg  
in Uve secche (uve di Corinto,  
uva passa, uva sultanina)

### RISULTATI - 7 campioni (28%) > LOQ\*

Campioni > LOQ*	Valore medio <sup>§</sup> (µg/kg)
Campione 1	1,01
Campione 3	2,14
Campione 4	2,14
Campione 5	1,64
Campione 7	0,40
<b>Campione 12</b>	<b>38,50</b>
Campione 14	0,79

\* LOQ: 0,2 µg/kg

§ Ogni campione è stato analizzato in doppio

# VALUTAZIONE DELL'ESPOSIZIONE ALLA OCRATOSSINA A – Approccio deterministico



## PREMESSA

- \* Assenza di tenori massimi di riferimento per Ocratossina A negli integratori alimentari in UE
- \* Non sono disponibili dati ufficiali sul consumo nell'UE di integratori alimentari a base di ginseng, G. biloba, caffè verde e uva rossa
- \* La composizione dei prodotti in commercio e la dose giornaliera raccomandata di prodotto da assumere è molto variabile



- \* La valutazione dell'esposizione è stata effettuata considerando, tra tutte le positività riscontrate nelle quattro tipologie di prodotti, il caso peggiore (Integratore alimentare a base di vite rossa: 38,5 µg/kg Ocratossina A), seguendo l'approccio deterministico.

$$\text{ESPOSIZIONE} = \frac{\text{Concentrazione media micotossina } (\mu\text{g/kg}) \times \text{Consumo medio (g)}}{\text{Peso corporeo medio (70 kg)}}$$



# VALUTAZIONE DELL'ESPOSIZIONE ALLA OCRATOSSINA – Approccio deterministico



\* **CASO PEGGIORE:** Integratore alimentare a base di vite rossa

- Dose massima giornaliera: 2 capsule da 650 mg
- Ocratossina A: 38,5 µg/kg

**Esposizione: 0,72 ng/kg p.c./die**

**Esposizione: 0,72 ng/kg p.c./die**



**TWI: 120 ng/kg p.c.**

(The EFSA Journal (2006) 365, 1 - 56)

**TDI: 17,1 ng/kg p.c.**





# INTEGRATORI ALIMENTARI

## RICERCA OCRATOSSINA A - CONCLUSIONI

- \* Il valore di esposizione (0,72 ng/kg p.c./die) calcolato secondo l'approccio deterministico è molto al di sotto della dose giornaliera tollerabile (TDI: 17,1 ng/kg p.c.).
- \* Considerando che i livelli di Ocratossina A rilevati negli altri prodotti sono inferiori rispetto alla quantità della stessa trovata nell'integratore alimentare a base di uva rossa, ed essendo le dosi raccomandate per l'assunzione giornaliera analoghe, il consumo da parte dell'uomo di integratori alimentari a base di ginseng, G. biloba, caffè verde e uva rossa contaminati da Ocratossina A, non desta preoccupazione per la salute.



# INTEGRATORI ALIMENTARI

## CONCLUSIONI GENERALI

### Ginseng, G. biloba, Caffè verde e Uva rossa

- \* Il consumo di integratori alimentari a base di ginseng, G. biloba, caffè verde e uva rossa, può considerarsi sicuro per l'uomo in relazione alla presenza di micotossine.
- \* I prodotti maggiormente contaminati sono quelli acquistati on-line. E' richiesto quindi un maggior controllo.

### Riso rosso fermentato

- \* Integratori alimentari a base di riso rosso fermentato con lievito *Monascus purpureus*: in alcuni campioni si è rilevata la presenza di citrinina a livelli superiori a 1.000 µg/kg. Tali valori, sebbene molto inferiori al tenore massimo di 2.000 µg/kg di citrinina stabilito dal Reg. (CE) 1881/2006 in tali prodotti, suggeriscono un monitoraggio più puntuale della materia prima.

# RINGRAZIAMENTI

## **ISS – Dip. Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare**

- \* **Dr Carlo BRERA** – Direttore ([carlo.brera@iss.it](mailto:carlo.brera@iss.it))
- \* Dr Emanuela GREGORI
- \* Dr Elisabetta SCARAMASTRA
- \* Dr Barbara DE SANTIS

## **ASSOERBE**



**GRAZIE PER  
L'ATTENZIONE**