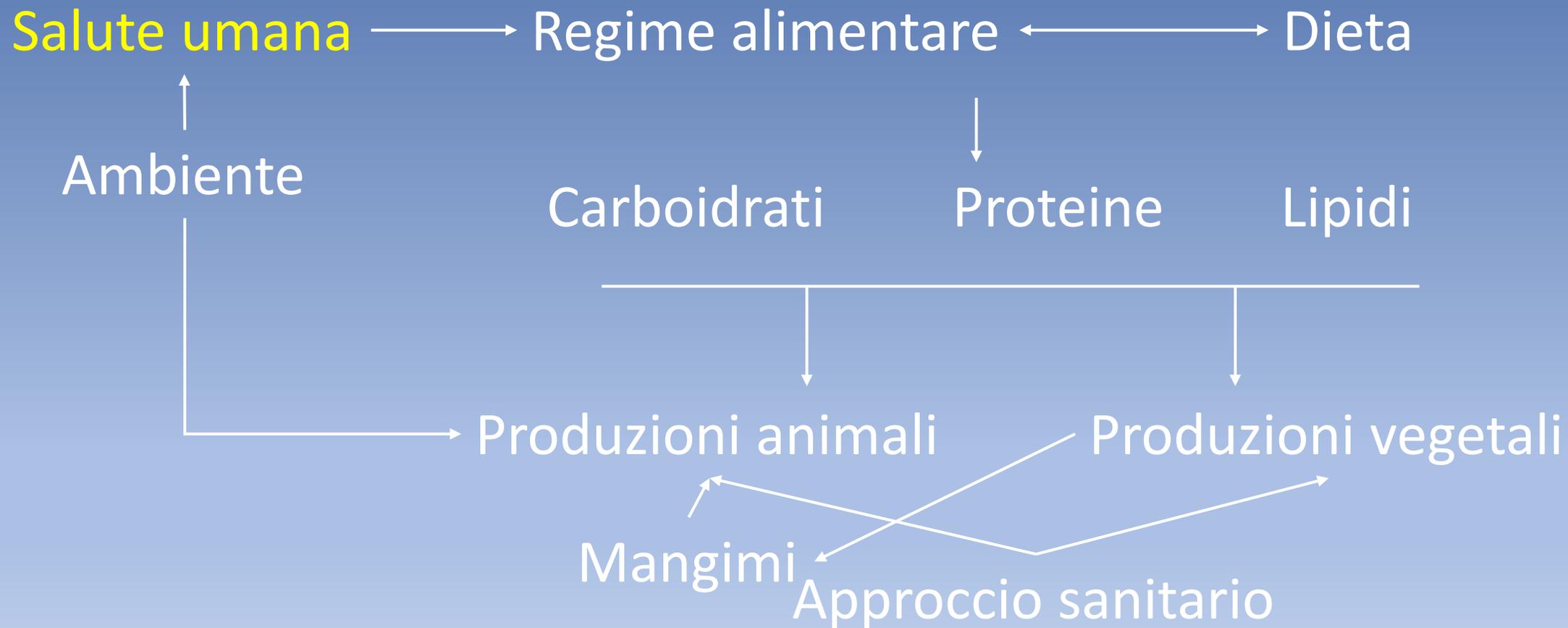
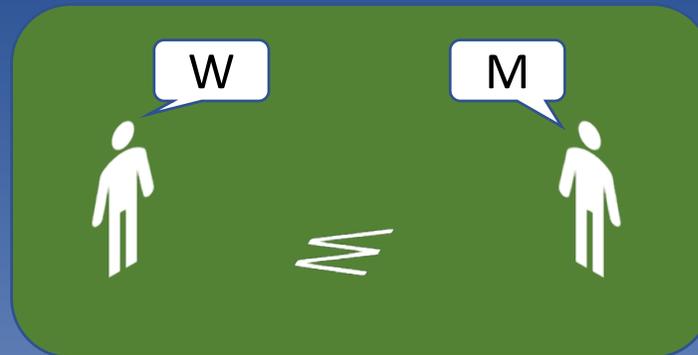


*Residui sotto-soglia
negli alimenti:
valutazioni preliminari
sugli effetti
tossicologici in vitro*

Alberto Angioni

Università degli Studi di Cagliari
Food Toxicology Unit
Mediterranean Group of Pesticide Research (MGPR)





Contaminanti chimici negli alimenti

Micotossine

Metalli pesanti

Radionuclidi



Pesticidi

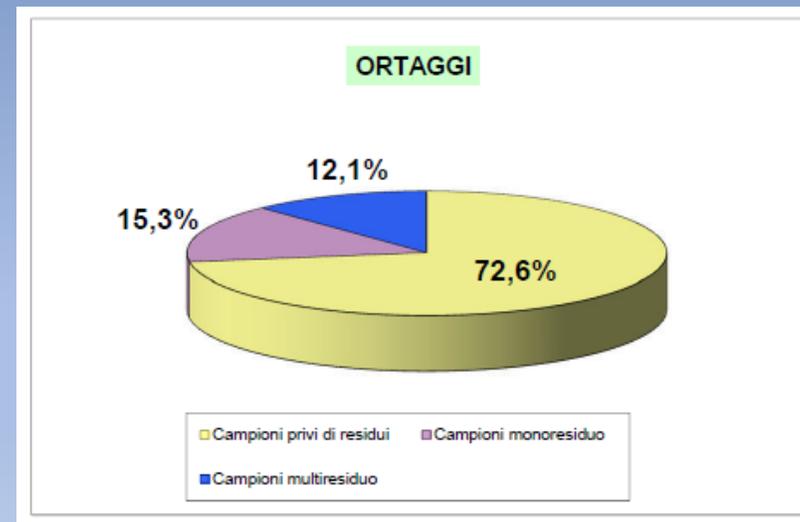
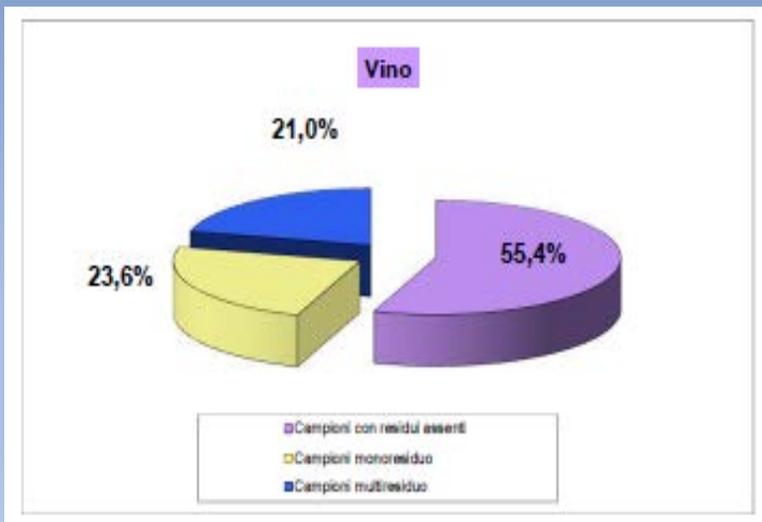
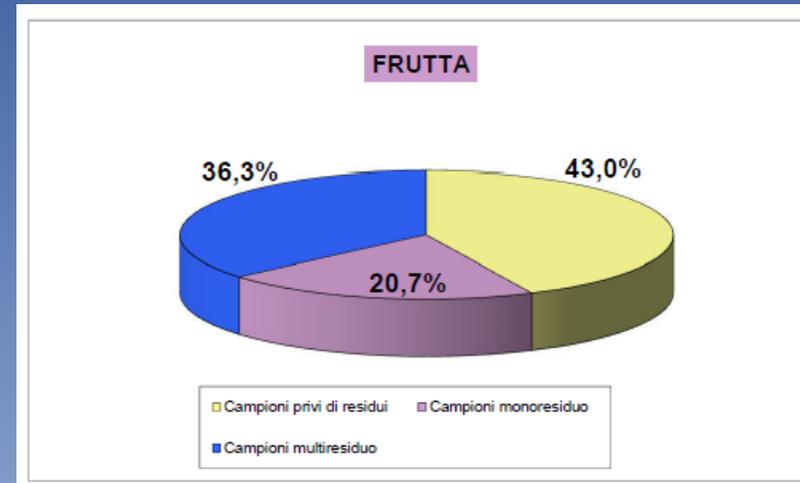
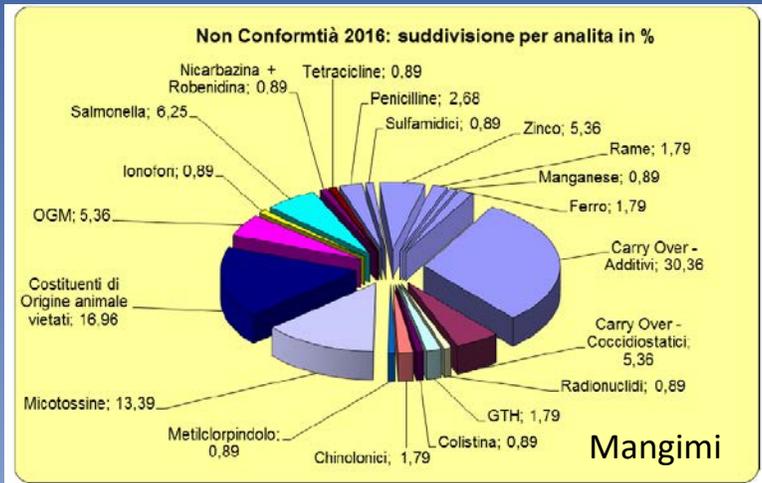
Additivi

Farmaci veterinari

Inquinanti ambientali persistenti (POPs)

IPA, PCB, DDT, Diossine

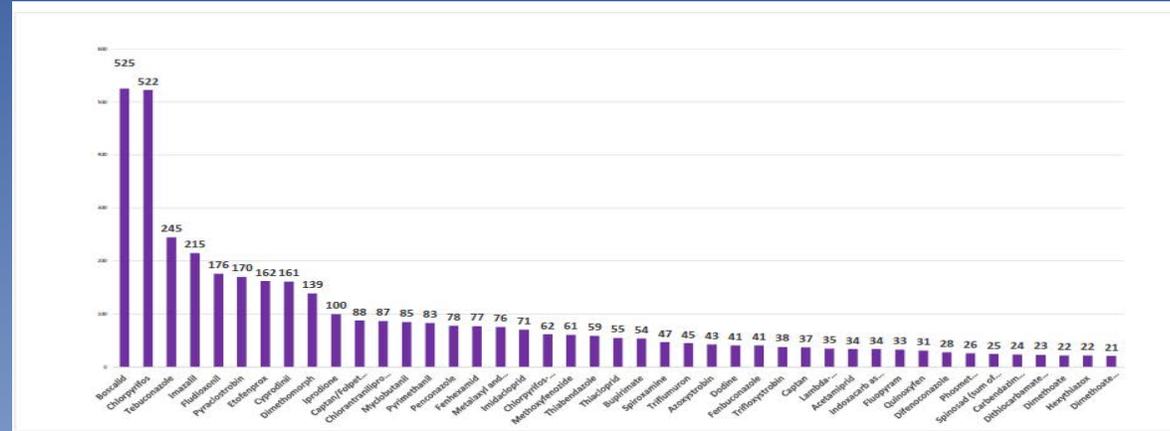
Contaminanti



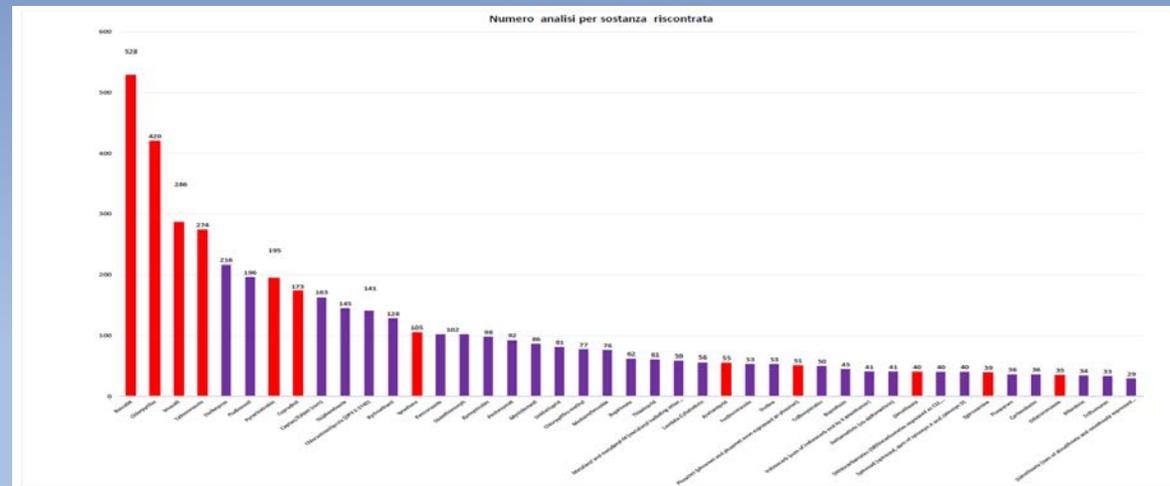


Sostanze attive maggiormente riscontrate su frutta

Ministero della salute, Direzione generale per l'igiene e la sicurezza degli alimenti e la nutrizione



– Controllo Ufficiale sui residui dei prodotti fitosanitari negli alimenti 2014



– Controllo Ufficiale sui residui dei prodotti fitosanitari negli alimenti 2015



Legislativo

Interpretazione dei dati

Conformità \longrightarrow Residuo \leq MRL

Non Conformità \longrightarrow Residuo $>$ MRL

MRL non è un dato tossicologico

Tossicologico

No-Observable-Adverse-Effect-Level, (NOAEL)

Acceptable daily intake (ADI)

Acute reference dose (ARfD)

Theoretical Maximum Daily Intake (TMDI)

Come si giunge all'autorizzazione all'uso di un pesticida	
Caratterizzazione del pericolo	Caratterizzazione dell'esposizione
1. Identificazione del pericolo: quali effetti tossici	1. definizione delle condizioni in cui l'uso del pesticida è efficace (buone pratiche agricole)
2. Definizione della dose-risposta e del livello di non effetto (NOAEL)	2.a. misura dei livelli di residui risultanti dalle buone pratiche agricole 2.b. misura dei livelli di residui nei prodotti in commercio
3. Definizione del limite di esposizione mediante l'applicazione al NOAEL di fattori di sicurezza (NOAEL /100)	3. stima della dieta della popolazione
	4. stima dell'assunzione di residui dei pesticidi sulla base di 2.a. e 2.b.
Valutazione del rischio: confronto fra il limite stabilito (NOAEL/fattore di sicurezza) e stima dell'assunzione	
Autorizzazione del pesticida: quando l'assunzione stimata è minore del limite stabilito	



1538 - Responsio ad quasdam accusationes & calumnias suorum aemulorum et obtrectatorum. Defensio III. Descriptionis & designationis nouorum Receptorum.

Omnia venenum sunt: nec sine veneno quicquam existit. Dosis sola facit, ut venenum non fit.«

"Tutto è veleno, e nulla esiste senza veleno.

Solo la dose fa in modo che il veleno non faccia effetto.



Interpretazione dei dati

Effetto acuto

Effetto cronico

Come valutare la tossicità indefinibile di un contaminante presente in concentrazioni sotto soglia legale, in relazione agli altri possibili contaminanti presenti nell'alimento o nell'ambiente?



Miscele di contaminanti

Pesticide mixture – cocktail di fitofarmaci

Regolamento (EC) 396/2005

effetti cumulativi e sinergici conosciuti

Art. 14 fissazione, modifica o soppressione di un MRL

Art. 36 misure di sostegno agli MRL armonizzati –
studi/metodologie



EFSA (European Food Safety Authority)

2013 - review della letteratura tossicologica internazionale

2015 – workshop top expert

2016 - MixTox – elaborazione di metodi di risk-assessment relativi a chemical mixtures/cocktail effects.

2017-2019 messa a punto di metodologie analitiche di risk assessment armonizzate sull'esposizione a miscele di contaminanti



Impostazione dello studio tossicologico

Meccanismo d'azione, valutazione della tossicità in campo tumorale (US EPA, 2005) e non.
Interazione recettoriale (ogni struttura molecolare capace di legare il tossico e che, da questo suo legame, subisca un'alterazione della sua normale funzione) e non-recettoriale.

Adverse outcome pathway (AOP), “Questa metodologia permette di valutare la plausibilità di un'associazione tra un evento a livello molecolare generato da una sostanza chimica ed un effetto negativo a livello biologico. Non dimostra che una sostanza chimica provochi una malattia, ma è rilevante per la valutazione di risk assessment” (Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD 2012a)

Lo sviluppo di un approccio AOP include 3 steps consecutive:

Raccolta delle informazioni – evento molecolare iniziale (MIE), eventi intermedi, effetto avverso finale

Elaborazione dei dati – solitamente per via grafica

Valutazione dei risultati ottenuti e valutazione sull'efficacia e affidabilità del percorso tossicologico su 2 livelli Bradford Hill criteria e OECD criteria.



Impostazione dello studio tossicologico sui chemical mixture

Pesticidi con lo stesso meccanismo d'azione

Pesticidi con lo stesso organo target

Pesticidi con lo stesso effetto avverso finale

Pesticidi che non presentano nessuna delle caratteristiche riportate sopra



Pesticidi con lo stesso meccanismo d'azione

Principio di additività (dose/concentrazione)

Gli effetti della miscela sono ipotizzabili anche quando ciascuna sostanza chimica è presente sotto i livelli di effetto nullo, poiché si presume che tutte le sostanze tossiche nella miscela si comportino come ognuna fosse solo la diluizione di un'altra.

Tutti i composti hanno una partecipazione all'effetto direttamente proporzionale alla concentrazione

Pesticidi con diverso meccanismo d'azione

Si applica il principio della independent action, assumendo che quando si trovano al livello di concentrazione a effetto zero, sebbene in miscela sono sicuri per l'uomo e l'ambiente.



Gli studi tossicologici vengono storicamente sviluppati su diversi target batteri, daphnia, alghe e pesci.

Diverse specie animali – cavie, topi, ratti etc.

Organismi unicellulari

receptor-binding, and receptor-activation assays,
endocrine disruption



ECHA: Regolamento REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals)

Reach invita la Commissione, gli Stati Membri, le industrie, I ricercatori e tutti coloro che si cimentano in prove tossicologiche di sostanze chimiche ad utilizzare metodi alternative alla sperimentazione animale.

Modellistica computazionale QSAR

Utilizzo di dati effettuati da sperimentazioni precedenti

Approccio read-across

Metodologie in-vitro (cellule, tessuti, organi)



Test di maturazione in vitro (IVM): riproduce in vitro il processo di maturazione dell'ovocita, che corrisponde alla fase pre-ovulattoria in vivo, consente di evidenziare effetti tossici specifici sull'ovocita.

Test di fecondazione in vitro (IVF): esposizione di ovociti e spermatozoi alle sostanze da testare e permette di valutare effetti tossici sia sull'ovocita sia sull'interazione ovocita-spermatozoo durante la fase di fecondazione.

Test di coltura embrionale in vitro (IVC): utilizzo di embrioni bovini di circa una settimana dopo la fecondazione per valutare effetti tossici sullo sviluppo embrionale fino allo stadio di blastocisti sgusciata, mimando l'inizio dello sviluppo embrionale in vivo fino all'impianto.

Test di citotossicità su linea cellulari: effetto tossico aspecifico, non riproduttivo, sulla vitalità e proliferazione delle cellule di mammifero in vitro di diversi distretti. E' un test da usare in associazione con i test IVM, IVF e IVC per discriminare una tossicità generica da effetti specifici sui processi riproduttivi.

Il caso del pomodoro da industria

I prodotti fitosanitari autorizzati sul pomodoro al 1° luglio 2017 sono 178 (150 composti chimici organici)



Target	N°	I.S.
Fungicidi	71	1-21
Insetticidi	54	3-30
Diserbanti	17	15-75
Nematocidi	13	3-60
Acaricidi	12	3-7
Fitoregolatori	4	7-20
Attivatori di resistenza	3	2-3
Lumachicidi	2	20
Feromoni	2	-



Metodi analitici per la determinazione dei residui

Metodi analitici multiresiduo hanno lo scopo di determinare in un'unica procedura il maggior numero di analiti.

Vantaggi:

Diminuzione dei tempi di risposta

Diminuzione del consumo di reagenti e reattivi

Svantaggi:

Personale altamente qualificato

Strumentazione con elevate performance analitiche

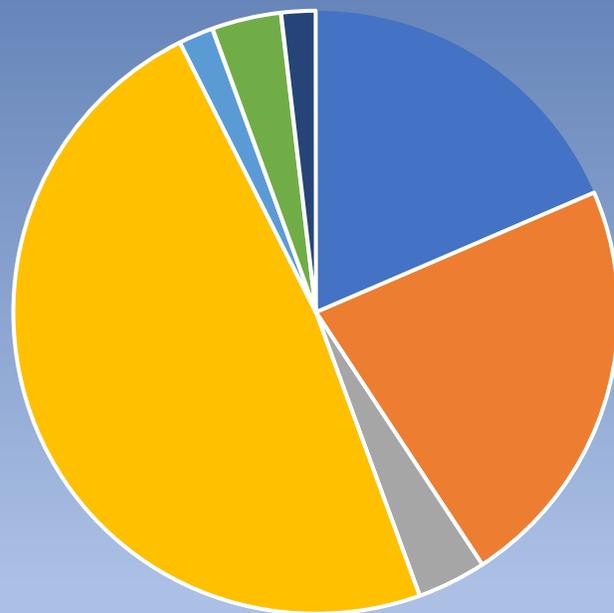
LC_MS/MS e GC_MS/MS

Limiti di determinazione solitamente più alti dei metodi monoresiduo



126 campioni, 123 analiti analizzati, 55 pesticidi trovati, 733 residui determinati

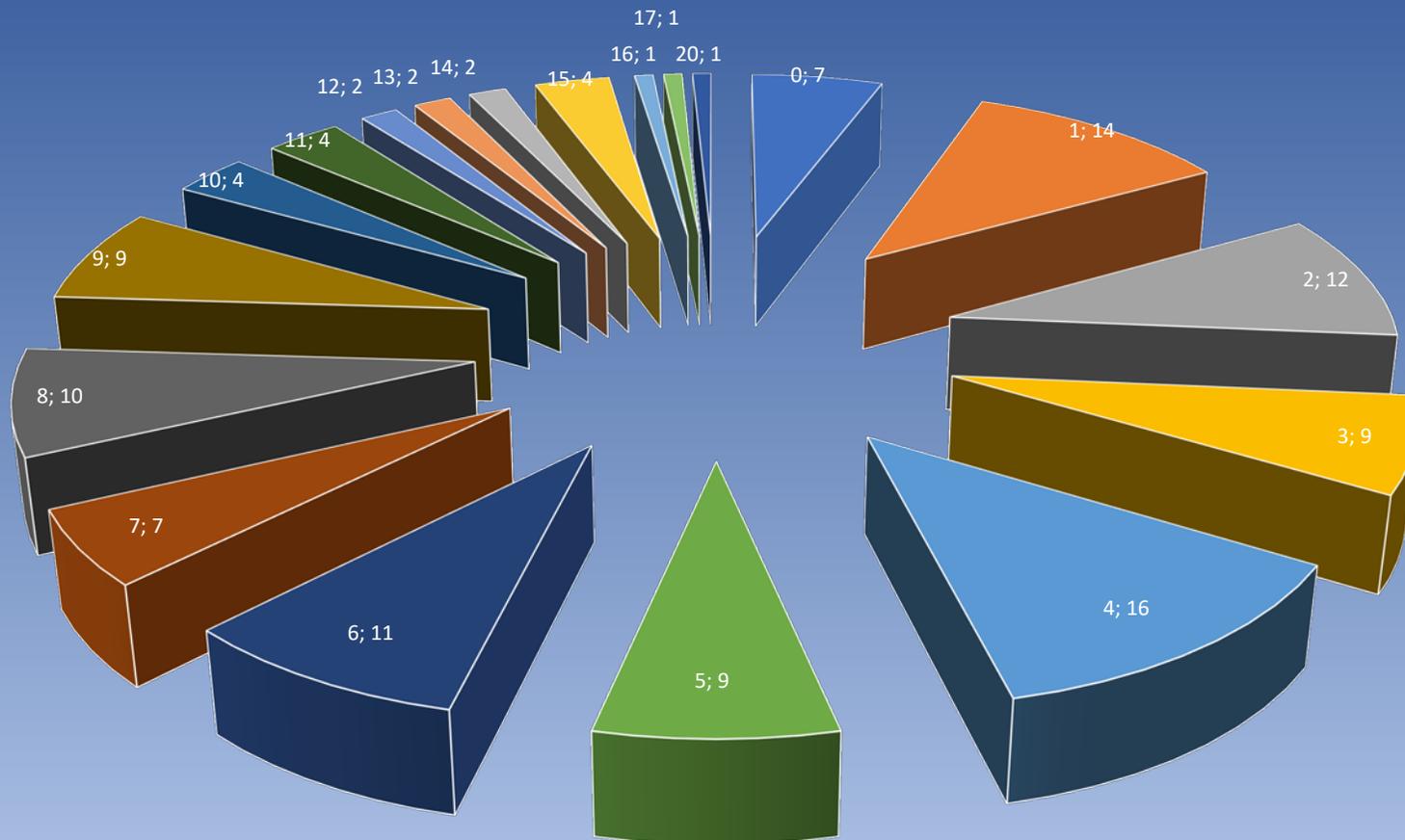
pesticidi riscontrati sul pomodoro



INSETTICIDA 10
Acaricide, Insetticida 12
Nematicide, Insetticida 2
Fungicida 26
REGOL. DI CRESCITA 1
ERBICIDA 2
Molluschicida, insetticida,acaricide, repellente per uccelli 1

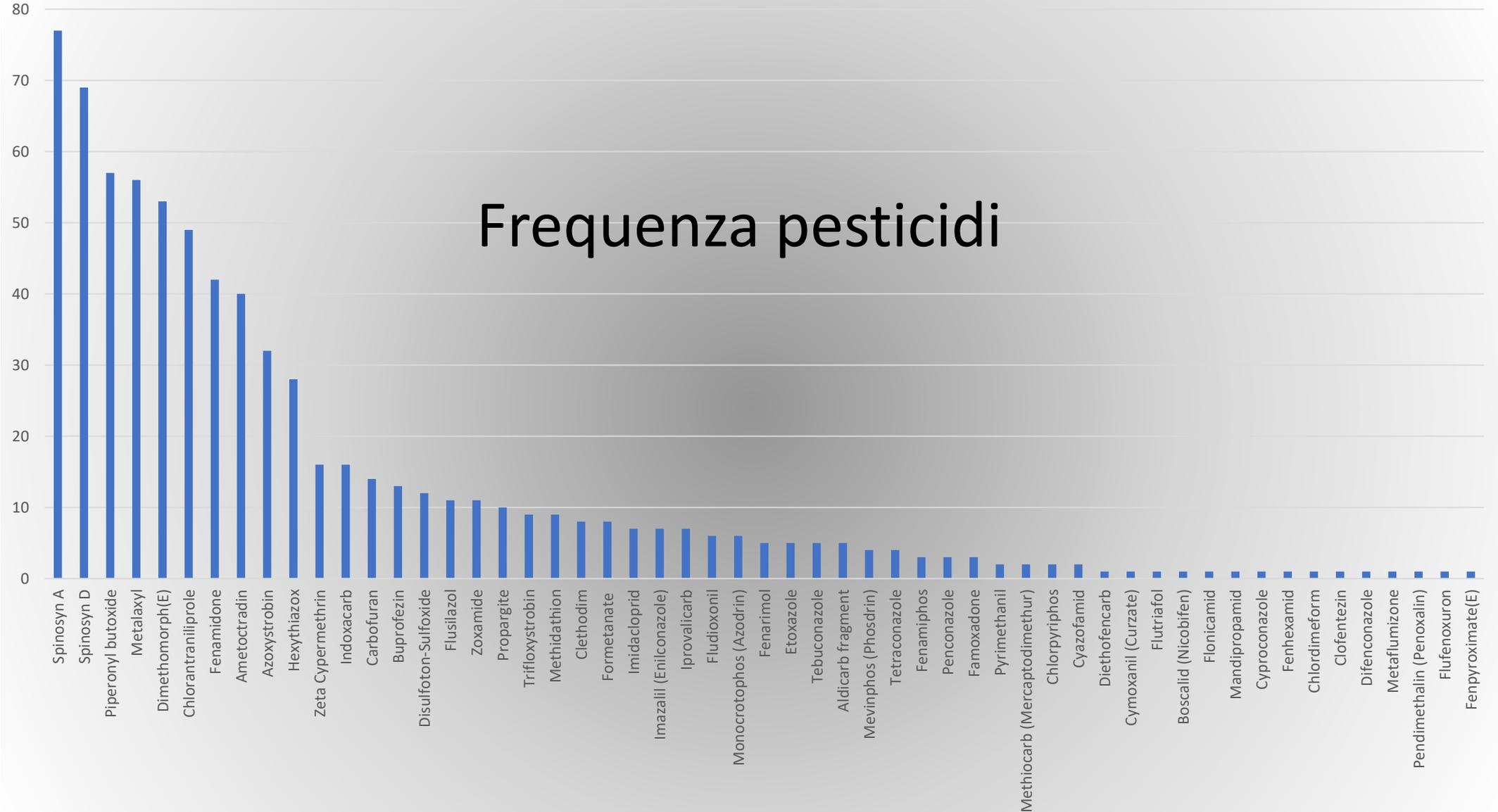


(n° pesticidi; n° campioni)



N° pesticidi	%
0-1	17
2-9	67
10-15	14
16-20	2

Frequenza pesticidi





Composizione delle miscele

90% Pesticidi con meccanismi d'azione differente

80% concentrazioni non confrontabili

100% residui inferiori al MRL di un fattore medio di 65



Approccio tossicologico

Sulla base delle informazioni presenti attualmente e sui dati dei regolamenti – devo considerare il prodotto esente da pericolosità per l'uomo e per l'ambiente

Whole mixture activity

Analisi su linee cellulari in vitro



GRAZIE PER L'ATTENZIONE

September 12-14 2018 · Bologna (Italy)

10th European Conference on Pesticides
and Related Organic Micropollutants in the Environment
&
16th Symposium on Chemistry and Fate
of Modern Pesticides
joined to
10th MGPR International Symposium of Pesticides in Food
and the Environment in Mediterranean Countries:
CONCERNS, CHALLENGE & POSSIBLE SOLUTIONS

<https://events.unibo.it/10thPesticides-16thChemistry-FateModernPesticides-10thMGPR-Symposium2018>