



**Università degli Studi di Teramo**

# Valutazione del rischio tossicologico da xenobiotici presenti negli alimenti

**Analisi del rischio da sostanze chimiche**  
**Valutazione del rischio da residui**  
**Piani di controllo e metodologie analitiche**

# Definizioni di residuo

- Per residuo si intende ciò che rimane dei farmaci o delle sostanze attive dei presidi sanitari e le relative impurezze, in seguito alla loro somministrazione negli animali, nei prodotti destinati all'alimentazione umana e a quella degli".
- Quantità di xenobiotico o di suoi metaboliti che può accumularsi e/o depositarsi all'interno di cellule, tessuti od organi animali (destinati all'alimentazione umana) e risultare dannosa per la sua salute.
- Qualsiasi sostanza chimica la cui presenza nella derrata alimentare possa costituire un rischio per il consumatore della derrata".

## **Regolamento (CEE) 26-6-1990 n. 2377/90.**

Regolamento del Consiglio che definisce una procedura comunitaria per la determinazione dei limiti massimi di residui di **medicinali veterinari** negli alimenti di origine animale.

I limiti massimi di residui vennero stabiliti in base a principi generalmente riconosciuti di **valutazione dell'innocuità**, effettuate da organizzazioni internazionali quali il Codex Alimentarius o da altri comitati scientifici istituiti nella Comunità. Per limite massimo di residui (LMR) si intende "*...la concentrazione massima di residui risultante dall'uso di un medicinale veterinario (espressa in mg/kg o mg/kg sulla base del peso vivo) che la Comunità può ammettere che sia consentita legalmente o riconosciuta accettabile negli o sugli alimenti. Esso è stabilito sulla base del tipo e del quantitativo del residuo considerato **esente da rischi tossicologici** per la salute umana secondo il criterio della dose giornaliera accettabile (DGA), o sulla base di una DGA temporanea che utilizzi un fattore di sicurezza supplementare. Tiene anche conto di altri rischi pertinenti per la pubblica sanità e di aspetti di tecnologia alimentare. Nello stabilire un limite massimo di residui (LMR) si tiene conto anche dei residui presenti negli alimenti di origine vegetale e/o provenienti dall'ambiente. Inoltre **si può ridurre** il LMR per renderlo conforme alle buone prassi nell'impiego dei medicinali veterinari, **nella misura in cui sono disponibili metodi analitici pratici...**»*

**Per residuo intendiamo ‘qualsiasi sostanza chimica’ qualitativamente e/o quantitativamente estranea alla composizione ‘normale’ della derrata alimentare e potenzialmente in grado di causare degli effetti negativi (diretti e/o indiretti) sulla salute del consumatore”.**

# Come possono essere classificati i residui?

- **Residui pervenuti:** sostanze che raggiungono gli alimenti come conseguenza della contaminazione degli animali per cause dirette od indirette (**inquinamento ambientale, trattamenti terapeutici e/o profilattici, contaminazione dei mangimi** ecc.)
- **Residui aggiunti:** sostanze che volontariamente vengono aggiunte agli alimenti per migliorarne qualità, conservabilità e sanità (ADDITIVI)
- **Residui neoformati:** sostanze che si formano in alcuni prodotti alimentari a seguito di trattamenti di natura fisica (calore, radiazioni) oppure chimica (impiego di additivi). Esempi: nitrosamine, amine eterocicliche che si formano durante la pirolisi (cottura) delle proteine e di alcuni aminoacidi o **idrocarburi aromatici policiclici (IPA)** durante l'affumicamento.

# Residui pervenuti intenzionali, accidentali, e naturali

## • Intenzionali

- Sostanze medicamentose usate a scopo terapeutico
- Sostanze medicamentose usate a scopo fraudolento

## • Accidentali

Contaminanti ambientali: Metalli pesanti (Hg, Pb, Cd, As);  
Organoclorurati (PCB, Diossine, PBDEs, insetticidi, IPA,  
ecc.); Radionuclidi.

## • Naturali

- Contaminanti ambientali naturali: Micotossine,  
Biotossine Marine

# Procedure dell' analisi del rischio (FAO/WHO 2005)





# Procedure dell' analisi del rischio (FAO/WHO 2005)



# Analisi di Rischio

## Valutazione di rischio

- **Identificazione del pericolo:** Caratteristiche chimico-fisiche del farmaco
- **Caratterizzazione del pericolo:** valutazione dose-risposta
- **Determinazione della sicurezza:** definizione dei **LIMITI SOGLIA**

# VALUTAZIONE DEL RISCHIO TOSSICOLOGICO DA RESIDUI DI FARMACI Regolamento (CE) n°470/2009

## Caratterizzazione del pericolo

### STUDI TOSSICOLOGICI PRIMARI

#### TOSSICITA' ACUTA

Valuta l'intrinseca tossicità acuta delle sostanze.

Informazioni circa la **minima dose tossica** e **la massima dose senza effetto**.

Deve essere realizzata su quattro specie (due non roditori).

#### TOSSICITA' SUBCRONICA

Durata 90 giorni. Valuta i possibili effetti tossici del farmaco in seguito a somministrazioni ripetute.

# STUDI TOSSICOLOGICI PRIMARI

Informazioni circa:

**la dose minima** che per somministrazione ripetuta produce un effetto tossico Misurabile;

**l'organo o il tessuto interessato;**

**reversibilità** degli effetti dopo sospensione del trattamento;

**livello di dose che non produce effetti dannosi.**

Ratto e cane sono le specie maggiormente impiegate.

## **Studi di MUTAGENICITA' in vitro e in vivo**

Correlazione tra mutagenicità e cancerogenesi; Test di Ames (screening); Altri test.

## **Studi di FARMACOCINETICA (nella specie target)**

Assorbimento; Distribuzione; Biotrasformazione; Eliminazione

## STUDI TOSSICOLOGICI SECONDARI

Essi prevedono:

- **somministrazione a lungo termine** ai roditori mediante l'alimento;
- uno studio di **tossicità cronica in un non roditore**;
- valutazione di possibili **effetti sulla riproduzione**.
- Valutazioni di possibili **effetti postgenazionali**
- Valutazione possibili **effetti neurotossici**

*La specie selezionata deve quanto più possibile rassomigliare alla specie cui l'impiego del farmaco è destinato.*

Questi studi hanno lo scopo di stabilire il **NOEL (No Observed Effect Level)** **NOAEL (No Observed Adverse Effect Level)** o **LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect Level)**

Ossia avvicinarsi o stabilire il dosaggio del farmaco (nella specie più sensibile) che non sortirà alcun effetto negativo (determinabile e misurabile) se l'esposizione è cronica

Dal NOAEL , NOEL o LOAEL verrà stabilita la **DGA (ADI)**

## VALUTAZIONE DEL RISCHIO TOSSICOLOGICO DA RESIDUI DI FARMACI

- La **Dose Giornaliera Accettabile DGA (ADI)** è quel valore espresso in mg che indica la quantità massima di sostanza in esame (Farmaco, Fitofarmaco) che può essere ingerita quotidianamente con l'alimento, per tutta la vita, senza rischi apprezzabili per la salute del consumatore.

### ***DOSE RIFERITA AL RISCHIO***

$$\text{DGA (ADI)} = \frac{\text{DSE o NOAEL} \times 70 \text{ (peso medio uomo)}}{\text{Fattore di sicurezza}}$$

## VALUTAZIONE DEL RISCHIO TOSSICOLOGICO DA RESIDUI DI FARMACI

- **Fattore di sicurezza = varia da 100 a 10.000**

**Varia in funzione del diverso contributo, nelle diverse condizioni sperimentali, dei singoli fattori di sicurezza**

**10 = fattore massimo della variabilità interspecifica;**

**10 = fattore massimo della variabilità intraspecifica;**

**10 = fattore dell'estrapolazione dall'esposizione subcronica a quella cronica;**

**1 - 10 = fattore di estrapolazione dal NOAEL al LOAEL**

# VALUTAZIONE DEL RISCHIO TOSSICOLOGICO DA RESIDUI DI FARMACI

Stabilita la DGA si calcola il limite massimo di residuo accettabile nella derrata - **MRL**

QUANTITATIVI TEORICI DI ALIMENTI DI O.A. ASSUNTI QUOTIDIANAMENTE DA UN INDIVIDUO

	MAMMIFERI	POLLAME	ALTRI
• muscolo	300 g	300 g	<b>pesce 300 g</b>
• fegato	100 g	100 g	
• reni	50 g	10 g	
• grasso	50 g	90 g	
• latte e deriv.	1500 g	uova 100 g	miele 20 g



## VALUTAZIONE DEL RISCHIO TOSSICOLOGICO DA RESIDUI DI FARMACI

- Conoscendo gli MRL e i dati di cinetica di eliminazione dei residui nella specie di interesse è possibile stabilire il **tempo di sospensione** cioè il periodo di tempo che deve intercorrere tra la sospensione della somministrazione del farmaco ed il consumo della derrata alimentare. Nei pesci è espresso come **gradi/giorno**
- Con il decreto n° 675/92 e successive modifiche sono stati indicati gli **MRL** da applicare ai medicinali ad uso veterinario autorizzati nelle specie produttrici di derrate

# Allegato I

Elenco delle sostanze farmacologicamente attive per le quali sono stati fissati dei limiti massimi di residui.

<b>Sostanza</b>	<b>res.marcatore</b>	<b>LMR muscolo e pelle in proporzioni naturali</b>
<b>Ossitetaricina</b>	<b>ossitetraciclina</b>	<b>100 µg/kg</b>
<b>Sulfamidici</b>	<b>sulfamidici</b>	<b>100 µg/kg</b>

## Allegato II

Elenco delle sostanze **non** soggette ad un **LMR**.

## Allegato III

Elenco delle sostanze per le quali, in mancanza di dati scientifici, non è possibile stabilire un LMR definitivo, bensì, pur senza mettere a repentaglio la salute dei consumatori, **solo un limite provvisorio** e limitato al tempo necessario per completare gli studi scientifici; tale periodo di tempo può essere prorogato solo una volta e in casi eccezionali.

## Allegato IV

Elenco delle sostanze per le quali **non può essere stabilito alcun LMR** perché presentano rischi per la salute umana, a prescindere dalla loro quantità

# RESIDUO ZERO

**(Non determinabile analiticamente–  
Residuo analitico zero)**

- Per tutti i principi attivi non menzionati nel Regolamento CEE continua ad essere in vigore il «residuo zero», rappresentato dal limite di sensibilità della metodica analitica

**La presenza di residui di farmaci e fitofarmaci negli alimenti può essere ricondotta sostanzialmente a queste cause:**

- 1) mancato rispetto dei tempi di sospensione (non valutazione corretta delle condizioni di temperatura dell'acqua)
- 2) uso improprio dei farmaci (dosaggi diversi da quelli prescritti);
- 3) uso di mangimi contaminati
- 4) impiego fraudolento di farmaci e fitofarmaci non autorizzati.

**Valenza economica dei farmaci e fitofarmaci  
(conseguenza: limitata disponibilità di farmaci e fitofarmaci)**

**La scarsa disponibilità di farmaci per l'acquacoltura, soprattutto per le specie ittiche non appartenenti alla classe dei salmonidi, porta all'ampio ricorso **dell'uso in deroga** (possibilità prevista dalla 193/2006)**

**Farmaci registrati per l'acquacoltura in Italia**

**Ossitetraciclina, clortetraciclina, flumechina, amoxicillina, sulfadiazina in ass, trimetoprim, bronopol (disinfettante)**

**Aspetto limitante nella registrazione dei farmaci in acquacoltura è la valutazione dell'impatto ambientale**



# Procedure dell' analisi del rischio (FAO/WHO 2005)





# Procedure dell'analisi del rischio (FAO/WHO 2005)



# Analisi di Rischio

## Valutazione di rischio

- **Identificazione del pericolo:** indagine preliminare
- **Caratterizzazione del pericolo:** valutazione dose-risposta
- **Determinazione della sicurezza:** definizione della TDI
- **Gestione del rischio:** concentrazioni massime tollerabili
- **Caratterizzazione del rischio:** valutazione dell'esposizione  
confronto con i limiti soglia
- **Comunicazione del rischio**

# CARATTERIZZAZIONE DEL PERICOLO

## SICUREZZA PER ESPOSIZIONI DI LUNGA DURATA

- Sperimentazione croniche (70% della vita fisiologica) su animali sensibili
- Dati epidemiologici (UOMO)

### DEFINIZIONE DELLE DOSI SOGLIA

**NOAEL - LOAEL** : No (Lowest)-observed-adverse-effect-level)

**BMD= Benchmark dose** - **BMDL= BMDLower limit**

Valutazione quantitativa che utilizza una curva dose-probabilità per determinare il livello di dosaggio equivalente al NOAEL (sotto del rischio di background).

**EHDI= (Equivalent - Human - Daily - Intake)** per sostanze bioaccumulabili:

Dose che l'uomo deve assumere giornalmente per lunghi periodi per arrivare (all'equilibrio) ad avere un carico corporeo come quello che negli animali ha prodotto un NOAEL o un LOAEL

**per diossine e PCB sono necessari 20 - 30 anni per raggiungere un carico corporeo stabile**

**DETERMINAZIONE DELLA SICUREZZA**  
ESTRAPOLAZIONE DELLA DOSE SOGLIA ALL'UOMO -

**NOAEL o LOAEL o BMDL o EHDI**

**LIMITE SOGLIA** = -----  
**Fattore di incertezza/sicurezza (UF/SF)**

<b>NOAEL o LOAEL</b>	10 - variabilità interspecifica 10 - variabilità individuale
<b>BMDL</b>	< 10 - variabilità individuale
<b>EHDI</b>	< 10 - variabilità individuale

**Contaminazioni volontarie** (additivi, pesticidi, residui di farmaci)

**ADI:** (Acceptable Daily Intake)

**Contaminazioni involontarie** (contaminanti ambientali)

**TDI** :Tolerable Daily Intake (Dose Giornaliera Tollerabile) -

## LIMITI SOGLIA PER LUNGHE ESPOSIZIONI

*Esposizioni giornaliere sicure per lunghe esposizioni (lifetime)  
n volte inferiori a quelle che non ha prodotto effetti indesiderati*

*Servono a scopi regolamentatori in procedure di tipo amministrativo e  
in nessun modo hanno valore predittivo degli effetti sulla salute  
dell'uomo, se questo limite viene superato (SCF).*

## LIMITI SOGLIA PER BREVI ESPOSIZIONI

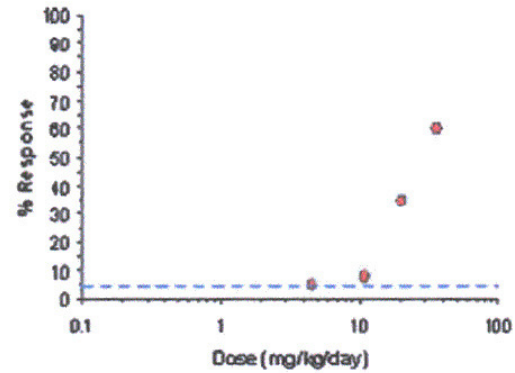
### ARfD: ACUTE REFERENCE DOSE

*quantità di sostanza che può essere ingerita un giorno o con un pasto  
senza apprezzabili rischi*

- È un errore frequente confrontare le brevi esposizioni con i valori di ADI o TDI

# Sostanze con Soglia

## Dose-response in animals



Divide no-effect level (NOAEL) by safety or uncertainty factors

## "Safe" intake for humans

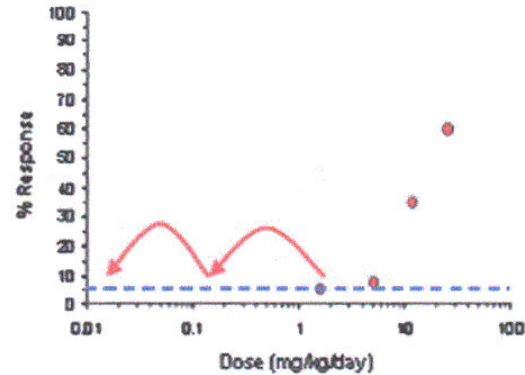


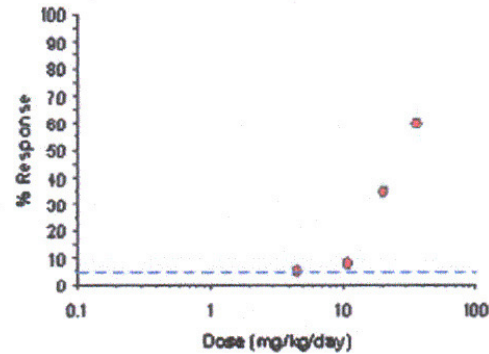
Fig. 2. The default approach to hazard characterization for threshold effects.

# Sostanze senza soglia cancerogeni genotossici

166

A.G. Renwick / Toxicology Letters 149 (2004) 163–176

## Dose-response in animals



Low dose  
extrapolation to a  
negligible risk

## "Safe" intake for humans

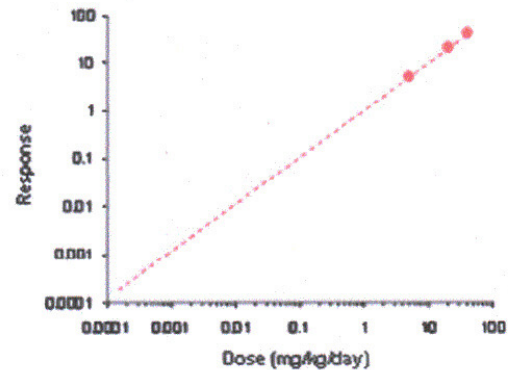
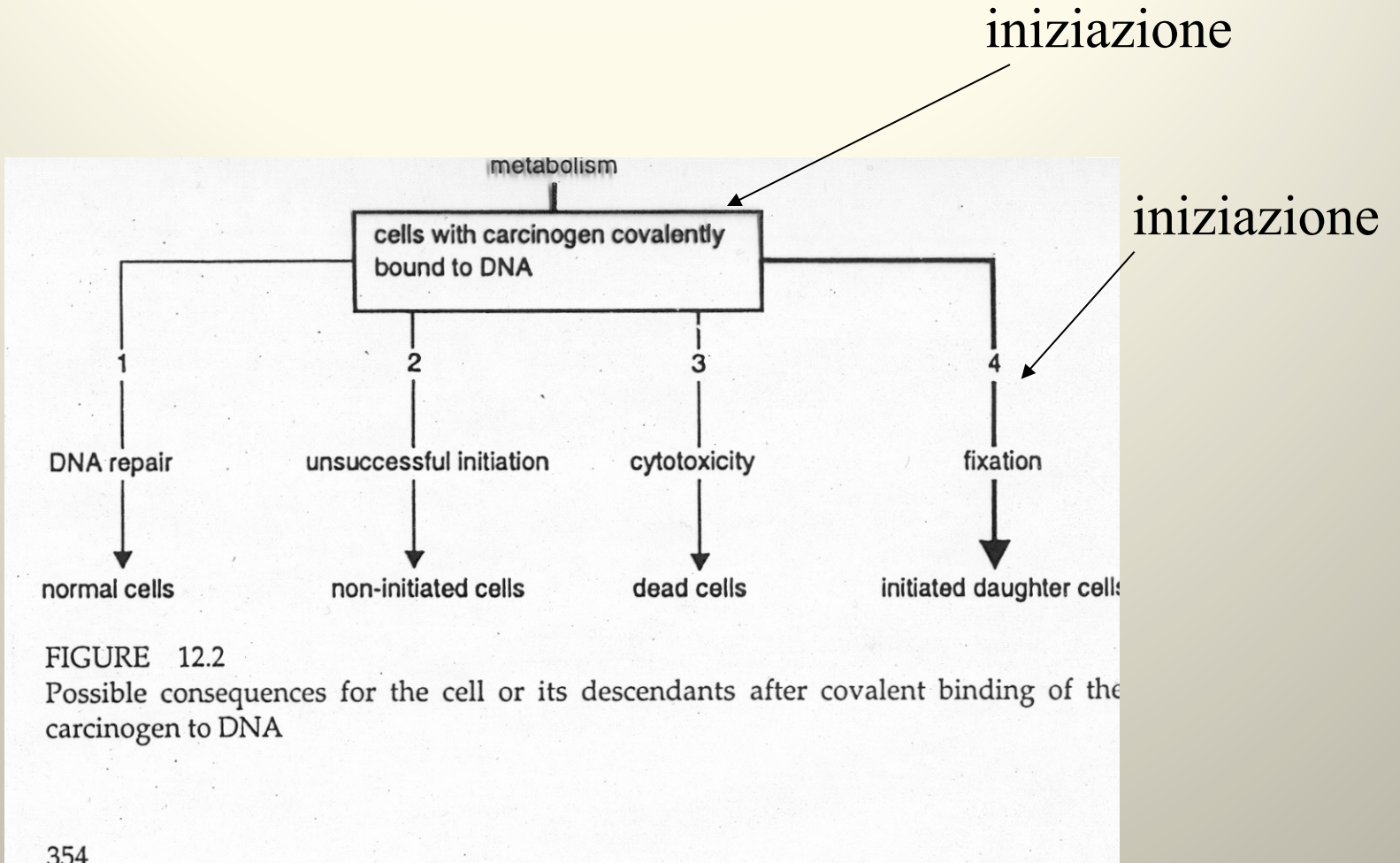


Fig. 3. The default approach to hazard characterisation for non-threshold effects.





# Estrapolazioni lineare per bassi dosaggi

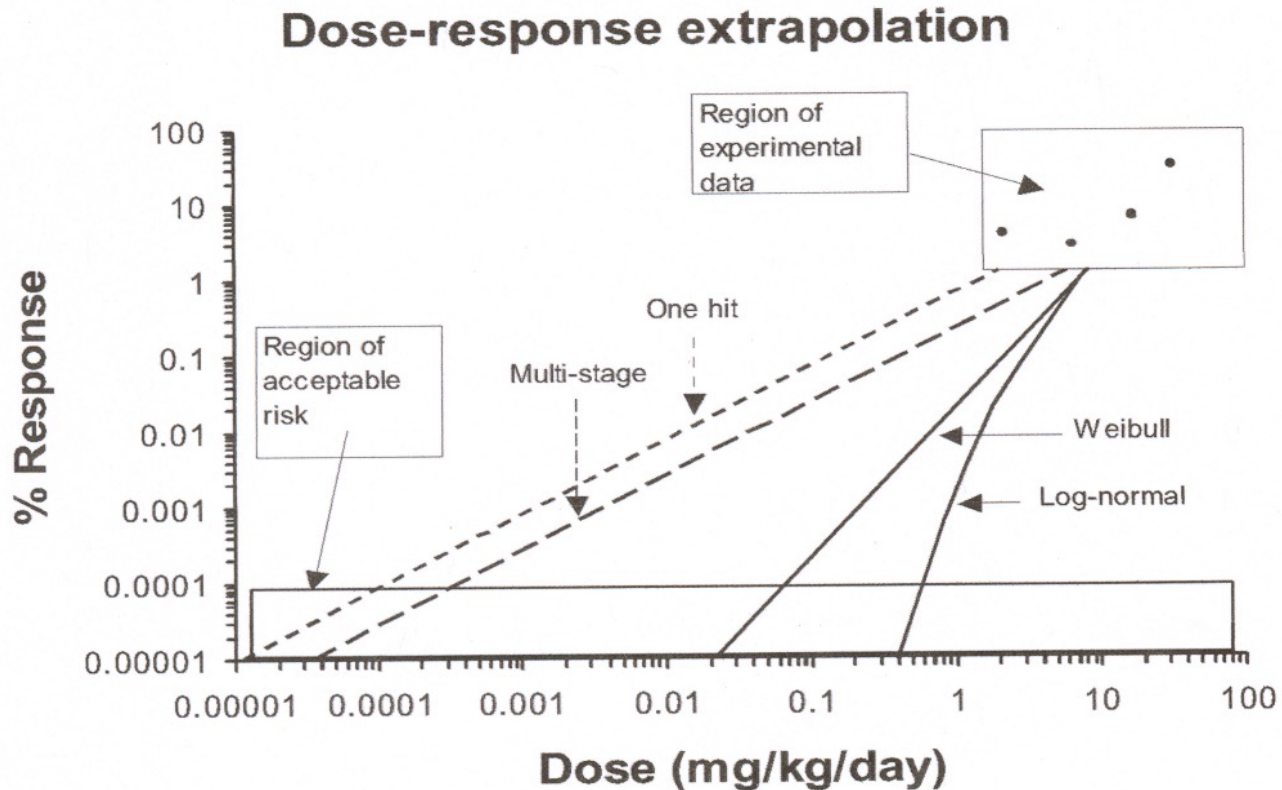
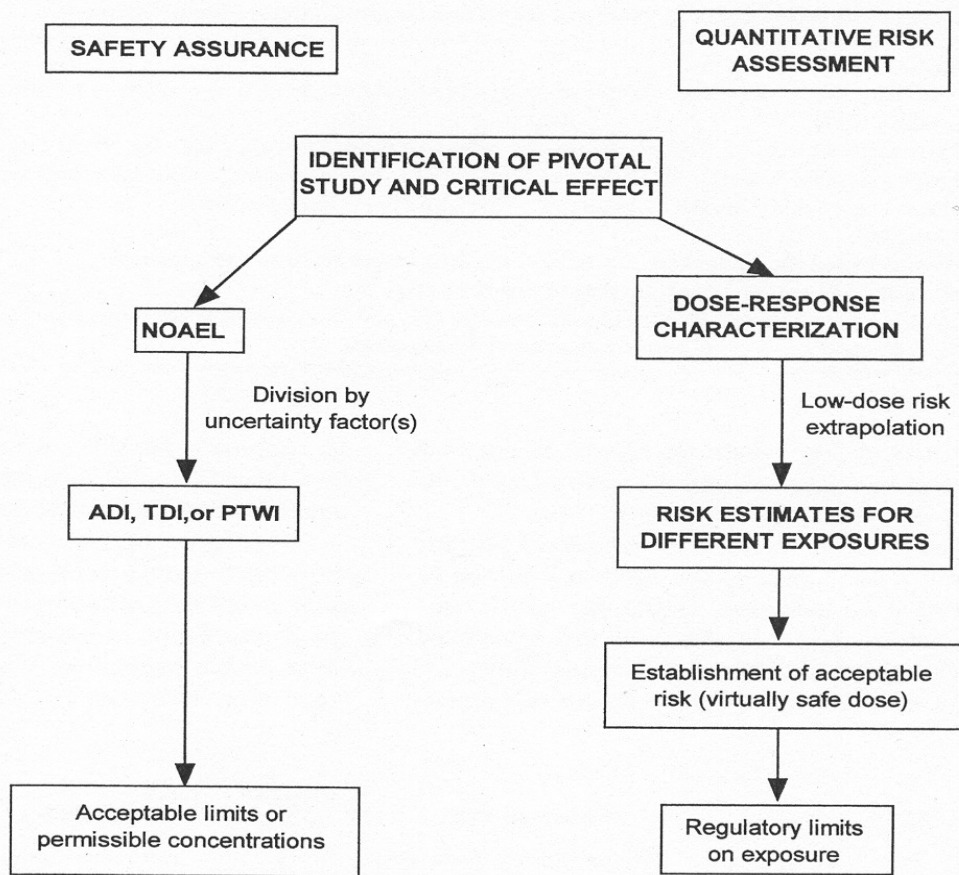


Figure 8.1 Mathematical models for low-dose risk estimation for non-threshold chemicals (based on ECETOC, 1996)



**Figure 6.13** Two approaches to risk assessment for establishing safety (nongenotoxic) or virtually safe (genotoxic) exposures to chemical hazards in the human food chain.

# CONTROLLO DEL RISCHIO

Sostanze con soglia (compresi cancerogeni epigenetici)

## Concentrazione Massima Ammessa (Tollerata - Accettabile)

Concentrazione massima di una sostanza in un mezzo  
(aria, acqua, alimenti) calcolata in modo che  
l'esposizione dell'uomo non superi l'ADI o il TDI

E' sempre vero?

# CONTROLLO DEL RISCHIO

## CANCEROGENI GENOTOSSICI

### Livello di Rischio Accettabile" (Virtually Safe Dose) (VSD) EPA

- 1 individuo colpito da tumore ogni milione di individui  $1 \times 10^{-6}$
- 1 su 100.000 per esposizioni professionali  $-1 \times 10^{-5}$
- 1 su 10.000 contaminazione diffusa (diossine -DDT-IPA)  $1 \times 10^{-4}$

NESSUN DATO EPIDEMIOLOGICO HA MAI CONFERMATO LA  
CORRETTEZZA DELL'ESTRAPOLAZIONE LINEARE

"Nessuna dose sicura" - priva di significato scientifico e giuridico

Determinazione della CMA per non superare la VSA

## CARATTERIZZAZIONE DEL RISCHIO

Confronto tra  
ESPOSIZIONI DI LUNGO PERIODO  
(CONCENTRAZIONI X CONSUMI)

e  
LIMITI SOGLIA

### Valutazioni coerenti per il lungo periodo

•È un errore frequente confrontare le brevi esposizioni con i valori di TDI

Concentrazioni: medie di lungo periodo

Consumi :           medi di lungo periodo

*Consumatori medi- media o mediana dei consumi*

*Forti consumatori - 95° percentile della distribuzione delle classi di frequenza dei consumi - (fino a 5 volte maggiori della media)*

# L'assunzione massima teorica giornaliera . MTDI

**Table 6.15** Exaggerated Average Daily Consumption of Animal Products Used for Calculating the Maximal Theoretical Intake and Maximal Residue Limits for Residues of Veterinary Drugs in Products of Animal Origin

Animal product	Average daily consumption, g
<b>Cattle/swine</b>	
Muscle	300
Liver	100
Kidney	50
Fat	50
Milk	1.5 L
<b>Poultry</b>	
Muscle	300
Liver	100
Kidney	40
Skin	60
Eggs	100
<b>Fish</b>	
Muscle	300
Liver	100

Valori di consumo esagerati non utilizzati per la Caratterizzazione del Rischio da contaminanti ambientali

# Xenobioti negli alimenti

- **Tossicità acuta:** insieme di manifestazioni indesiderate che si verificano immediatamente, o al più entro pochi giorni, dopo una singola somministrazione della sostanza in esame.
- Test in vivo: su animali di laboratorio aumentando progressivamente la dose fino a provocare la morte del 50% degli animali stessi (DL50 in mg/Kg di peso corporeo).
- Test in vitro: es. test della *Drosophila*, test di Ames, *po*/test

Importanti:

- Struttura chimica (la relazione struttura-attività è un buon elemento di previsione – es. nitrosamine, aromatici policiclici)
- Metabolismo:

La metabolizzazione può trasformare una molecola in un costituente dell'organismo, in energia, oppure detossificarla o attivarla trasformandola in un prodotto intermedio reattivo (enzimi intracellulari, extracellulari o enzimi della microflora del tratto intestinale)

# Xenobioti negli alimenti

## •Tossicità cronica

Esperimenti con somministrazione orale giornaliera su animali di laboratorio, roditori e non, finalizzata a verificare gli effetti a lungo termine, ed in particolare, l'eventuale potere

- cancerogeno
- teratogeno
- mutageno



Difficoltà a trasferire i dati dall'animale all'uomo e ad individuare gli effetti sommatori conseguenti all'esposizione contemporanea a più fattori presenti contemporaneamente nella dieta.



# Valutazione dell' accettabilità

Per DGA (**Dose Giornaliera Ammissibile**) (**TDI – Dose Giornaliera tollerata**) si intende la dose di sostanza tossica espressa in mg / Kg di peso corporeo che può essere ingerita tutti i giorni e per tutta la vita senza che si manifestino danni per la salute umana.

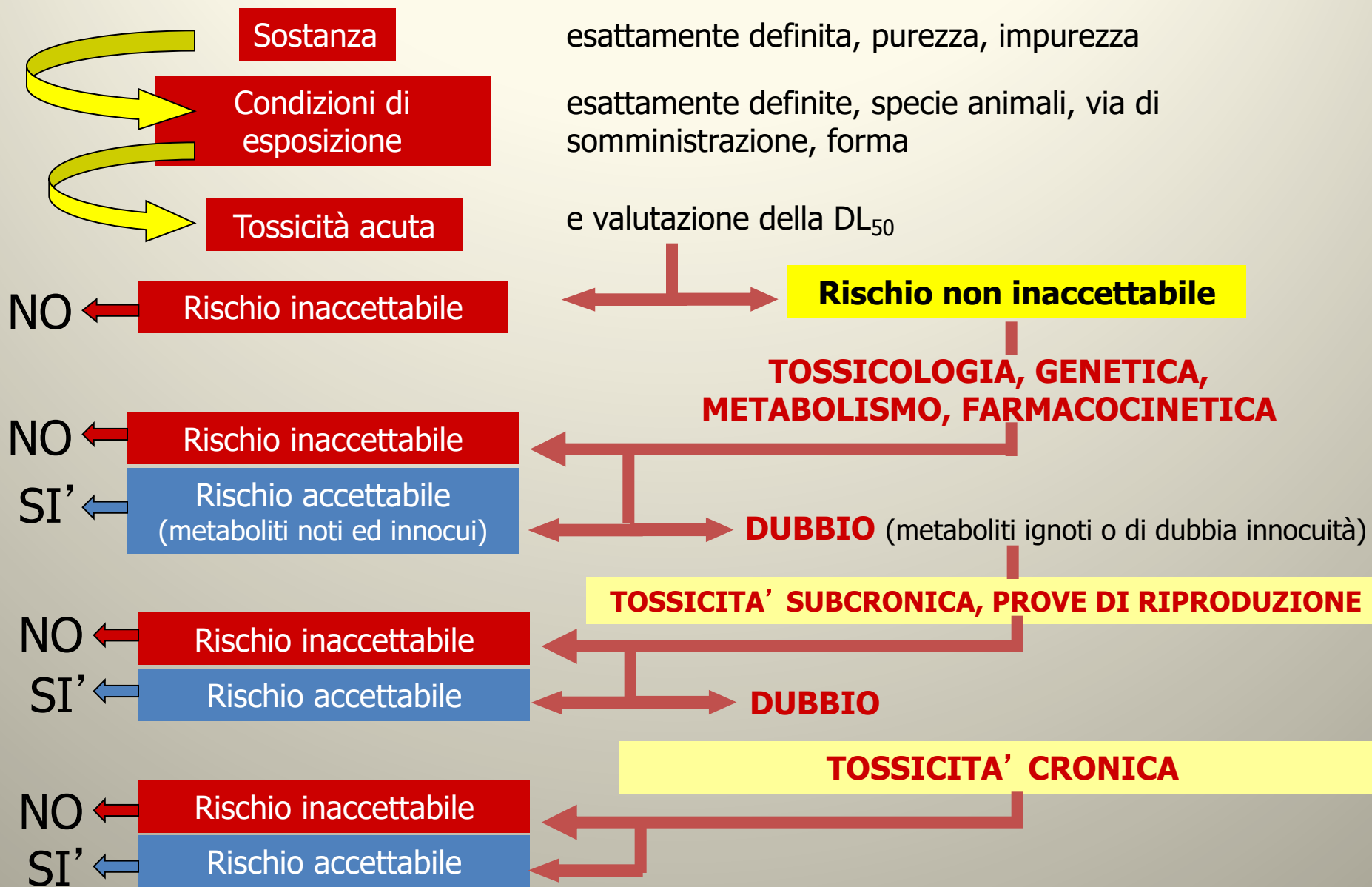
Per la sua definizione occorre conoscere il NOEL o NEL (No Effect Level) e la dose che causa risposta anomala nell' animale da esperimento [**BMD (Benchmark dose) EHD (Equivalent - Human - Daily - Intake)**].

Nell' ambito delle prove di laboratorio vengono valutati:

- cinetica di eliminazione
- disturbi della crescita
- manifestazioni cliniche
- effetti biochimici e fisiopatologici
- alterazioni istologiche di organi e tessuti
- effetti sulla riproduzione



# Studio dell' accettabilità di una molecola



# Valutazione dell' accettabilità

La **Dose senza Effetto osservata** (NOEL) corrisponde alla dose massima che non provoca nella specie animale più sensibile alcun effetto in termini di danno biologico. Essa richiede per la valutazione una sperimentazione a medio (90 gg) o a lungo termine (tutta la vita dell' animale) e si esprime in mg / Kg di peso corporeo.

Dal NOEL si passa alla DGA utilizzando un fattore di sicurezza:

$$DGA = \frac{NOEL}{\text{fattore di sicurezza}}$$

Se le prove sono state condotte a lungo termine il fattore è **100** e la DGA viene detta definitiva: x 10 data le differenze tra metabolismo umano ed animale e x 10 data la variabilità di risposta interumana. Se le prove sono state fatte a medio termine, si usa il fattore **1000** e la DGA è definita temporanea. Il fattore 1000 si applica se la sostanza ha solo effetti tossici; se presenta anche potere teratogeno o genotossico si moltiplica ancora per 10.

In presenza di potere cancerogeno documentato, la DGA non viene stabilita e si indica come massimo valore ammesso quello corrispondente alla soglia analitica di sensibilità delle metodiche più moderne in uso.

# Valutazione dell' accettabilità

Con il **Livello di Tollerabilità (TL, Tolerance Level)** si esprime la concentrazione di sostanza tossica teoricamente accettabile in un alimento:

$$TL = \frac{DGA \times P.C.}{FDI}$$

P.C. = peso corporeo

FDI = food daily intake

Il **Margine di Sicurezza (SM, Safety Margin)** è dato dal rapporto tra TL e concentrazione residua nell' alimento **FR (Food Residues)**:

$$SM = \frac{TL}{FR}$$

