



21° Congresso Nazionale

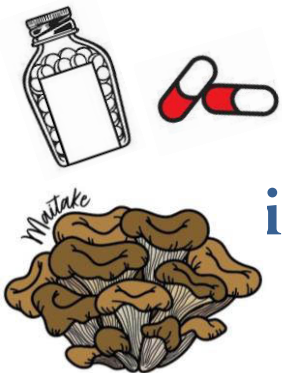
Società Italiana di Tossicologia

**Pericolo, rischio
e rapporto
rischio-beneficio**

BOLOGNA

20-22 Febbraio 2023

www.sitox.org



Metodiche molecolari applicate alla definizione di qualità e sicurezza di integratori alimentari formulati con funghi



¹Valeria Fochi, ²Cristiano Garino, ³Fabiano Sillo, ¹Marco Arlorio

¹ Dipartimento di Scienze del Farmaco, Food Chemistry and Biotechnology Unit, UPO “A. Avogadro”, Novara (Italy)

² Department Food Safety - German Federal Institute for Risk Assessment (BfR), Max-Dohrn-Str. 8-10, 10589 Berlin, Germania

³ Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante (IPSP-CNR), Strada delle cacce 73, 10135 Torino, Italia

I funghi: valori nutrizionali e composti bioattivi

ALTO VALORE
NUTRIZIONALE

Basso contenuto in grassi
Fibre non digeribili
Vitamine
Acqua



Ottimo alimento per
una dieta equilibrata



COMPOSTI BIOATTIVI

β -Glucani
Terpeni
Composti fenolici
Proteine



Rinforzo del sistema
immunitario

Funghi e integratori alimentari: i botanicals

«Integratori alimentari»

“prodotti alimentari destinati ad integrare la comune dieta, che costituiscono una fonte concentrata di sostanze nutritive o aventi un effetto fisiologico, in forme predosate”



BOTANICALS

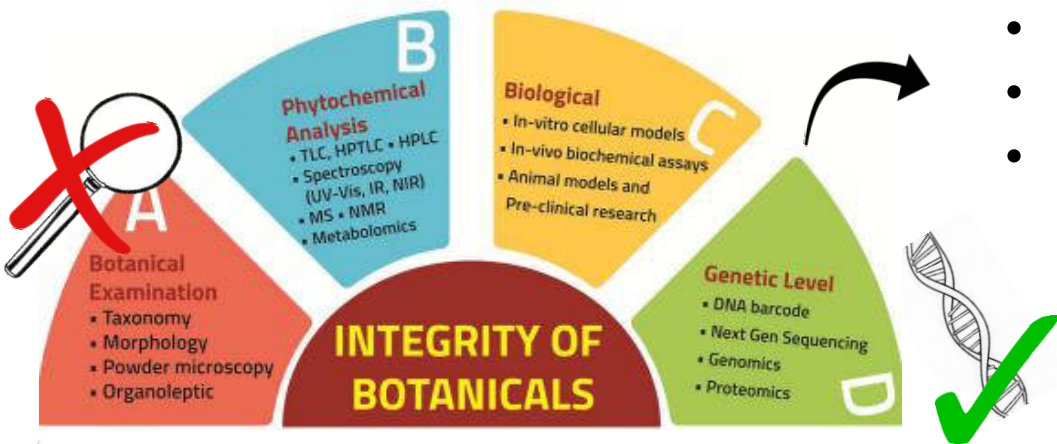
“sostanze e preparati a base di:

PIANTE, ALGHE, LICHENI e **FUNGHI**”



Allegato 1 al DM 10 agosto 2018
recepito dal Decreto 26 luglio 2019

Qualità e sicurezza degli integratori alimentari



No riconoscimento morfologico

Il DNA è una molecola:

- Stabile
- Non influenzata dall'ambiente esterno
- Unica per ogni individuo



Approcci molecolari strumento ottimale per il controllo degli ingredienti

Sequenziamento

Tecniche PCR



Ministero della Salute

SEZIONE SICUREZZA ALIMENTARE - CNSA (COMITATO NAZIONALE PER LA SICUREZZA ALIMENTARE)

PARERE N. 21 DEL 24 GENNAIO 2018

Parere sul rischio legato alla presenza di larve di ditteri non vitali e non visibili ad occhio nudo in funghi conservati



Il corpo fruttifero dei funghi è l'habitat ideale per alcuni insetti



Proteine di insetto: potere allergizzante e cross-reazioni



Tracce di insetto anche negli integratori a base di funghi???

Grifola frondosa (Dicks.) Gray : 'Maitake' il fungo danzante



Utilizzato tradizionalmente come tonico per stimolare il sistema immunitario



Proprietà immunostimolanti e ipoglicemizzanti



'FRAZIONE D' / 'GRIFOLAN'
Stimolazione cellule del sistema immunitario e riduzione crescita cellule tumorali

'FRAZIONE SX'
Riduzione livelli di zucchero nel sangue e attivazione recettori per l'insulina



(He et al. 2017 - Polysaccharides in *Grifola frondosa* mushroom and their health promoting properties: a review. Int J Biol Macromol 101:910-921)



Corpo fruttifero di *G. frondosa*

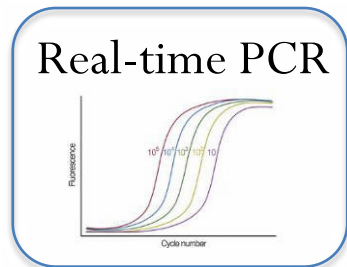
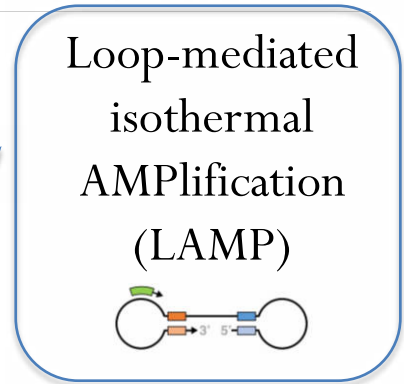


10 Integratori alimentari a base di *G. frondosa*

Food Analytical Methods (2022) 15:1803–1815
<https://doi.org/10.1007/s12161-022-02235-0>

A Rapid and Efficient Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for the Authentication of Food Supplements Based on Maitake (*Grifola Frondosa*)

Valeria Fochi¹ · Fabiano Sillo² · Fabiano Travaglia¹ · Jean Daniel Coisson¹ · Raffaella Balestrini² · Marco Arlorio¹



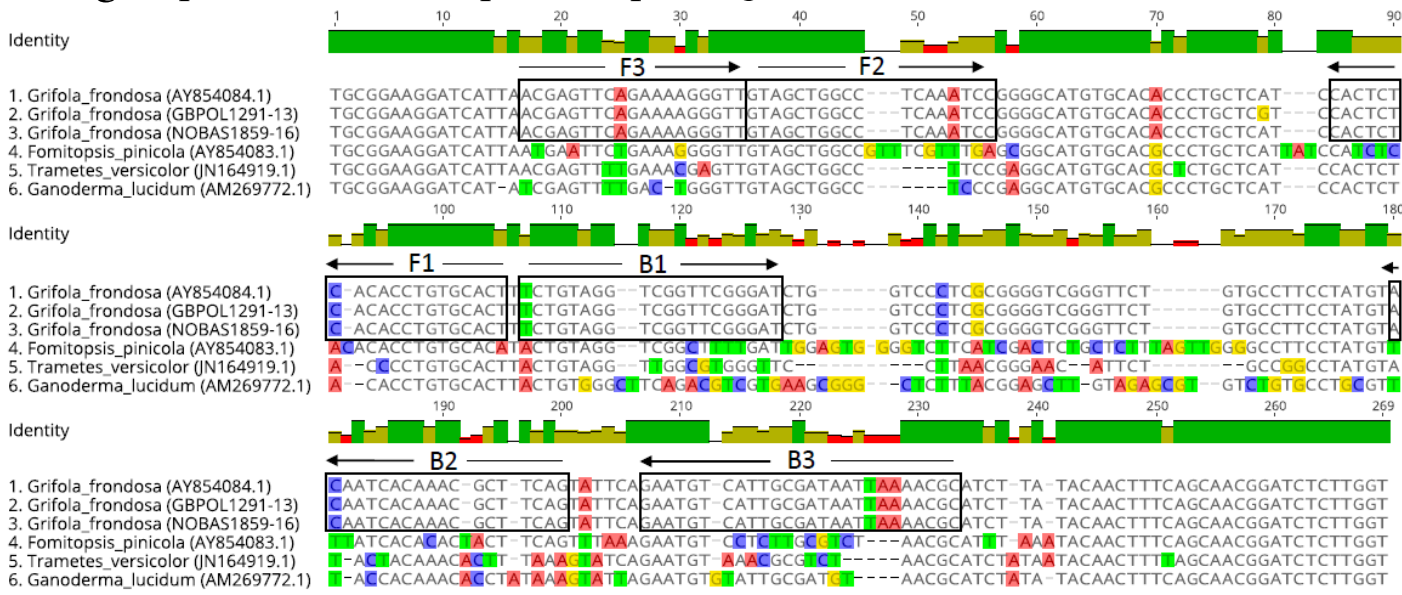
Autenticazione

Ricerca ingredienti nascosti


Autenticazione integratori alimentari a base di *G. frondosa*



Disegno primer LAMP specifici per *G. frondosa*



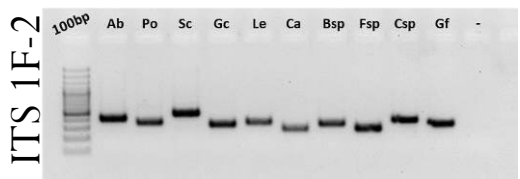
Allineamento
 sequenze ITS di
 specie fungine
 tassonomicamente
 vicine



Selezione zone
 variabili tra specie
 ma conservate in
Grifola

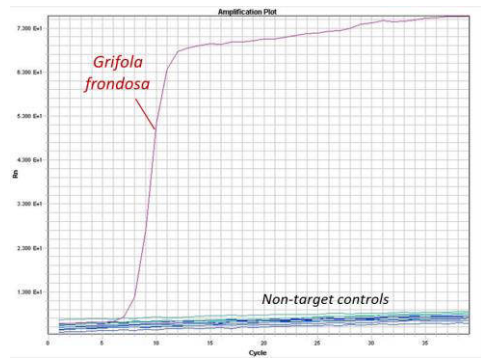
Test in Real-time PCR dei primer LAMP:

Specificità



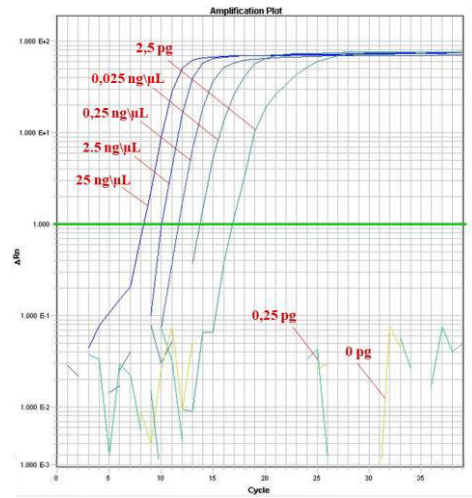
Controlli negativi

- Ab: *Agaricus bisporus*
- Po: *Pleurotus ostreatus*
- Sc: *Saccharomyces cerevisiae*
- Gc: *Ganoderma carnosum*
- Le: *Lentinula edodes*
- Ca: *Cyclocybe aegerita*
- Bsp: *Boletus spp.*
- Fsp: *Fusarium sp.*
- Csp: *Cladosporium sp.*
- : acqua



- Amplificazione positiva con DNA di *G. frondosa*
- Nessun segnale con DNA estratti da altri funghi

Sensibilità

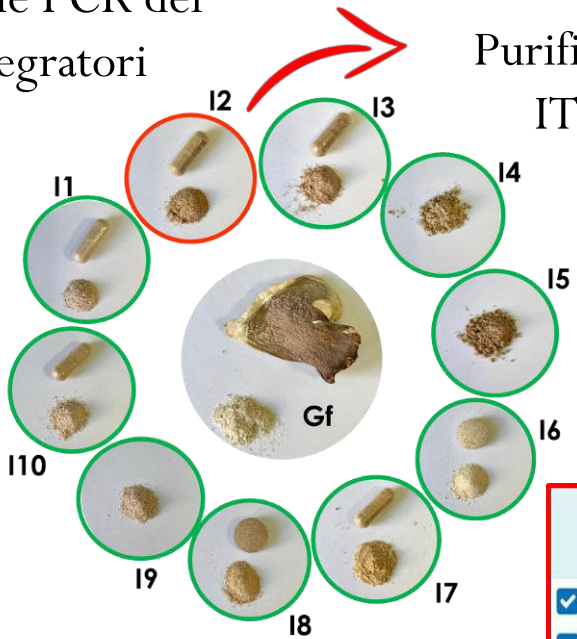
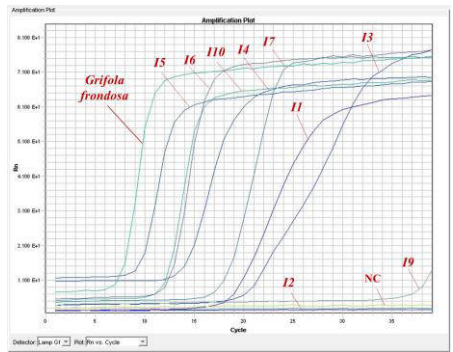


- DNA Maitake da 25 a 0,025 pg/μL
- 2,5 pg di DNA in 16 min
- LOD : 0.7 pg/μL

Amplificazione Real-time PCR del DNA estratto dai 10 integratori

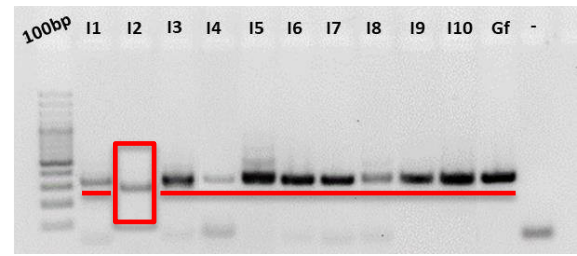


9 integratori su 10 danno segnale positivo



— Segnale negativo
— Segnale positivo

Purificazione e sequenziamento del frammento ITS amplificato da DNA del campione I2



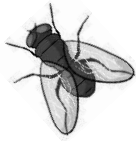
NCBI-Blast

DNA di <i>Boletus</i>		Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident
<input checked="" type="checkbox"/>	Boletus reticulatus genes for 18S rRNA, ITS1...	Boletus r...	346	346	95%	4e-91	100.00%
<input checked="" type="checkbox"/>	Boletus reticulatus genes for 18S rRNA, ITS1...	Boletus r...	346	346	95%	4e-91	100.00%
<input checked="" type="checkbox"/>	Boletus reticulatus genes for 18S rRNA, ITS1...	Boletus r...	344	344	95%	1e-90	100.00%
<input checked="" type="checkbox"/>	Boletus edulis partial 18S rRNA gene and inter...	Boletus e...	344	344	95%	1e-90	100.00%

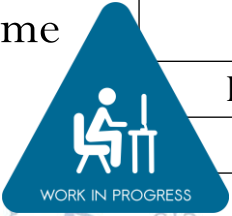
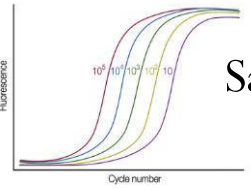
Ricerca di ingredienti nascosti in integratori a base di *G. frondosa*



Primer sviluppati per amplificare il sottordine di insetti Brachycera (Diptera)



Saggio Real-time PCR



Campione	Composizione	DNA (ng/μL)	Real-time PCR
I3	Maitake, Shitake, Reishi e.s.	18,5	✗
I4	Maitake sporoforo polvere	233	✓
I5	Maitake, Shitake, Reishi sporoforo polvere	526	✓
I6	Maitake sporoforo polvere	11	✓
I8	Agaricus blazei, Reishi, Maitake, Shitake e.s.	36	✗
I9	Cordyceps sinensis, Agaricus blazei, Reishi, Maitake, Shitake sporoforo	5	✗
I10	Maitake sporoforo liofilizzato	13,5	✗
Gf	Carpoforo essiccato	1800	✓



- ✓ Potenzialità degli approcci molecolari nel controllo della qualità e della sicurezza degli integratori alimentari contenenti funghi.
- ✓ Il protocollo LAMP sviluppato sul gene ITS è in grado di identificare la presenza di DNA di Maitake negli integratori alimentari, in modo rapido e sensibile → utile per l'autenticazione di ingredienti fungini e per prevenire frodi.
- ✓ Confermata tramite Real-time PCR la presenza di DNA di insetto in prodotti a base di funghi → necessaria identificazione delle proteine potenzialmente allergeniche per scongiurare un rischio per il consumatore.





Grazie per l'attenzione!

