



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

IMPIEGO DI BIOSSIDO DI TITANIO (E171) NEGLI ALIMENTI

TIPO TESI: compilativa

Studente:
CARLO GRATTACAGIO

Relatore:
PROF./DOTT. MASSIMO MOZZON

ANNO ACCADEMICO 2019/2020

ELENCO DELLE TABELLE	4
ELENCO DELLE FIGURE.....	5
ACRONIMI E ABBREVIAZIONI	6
INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI	8
CAPITOLO 1 BIOSSIDO DI TITANIO	9
1.1 Campi di applicazione del biossido di titanio.....	11
1.2 Utilizzo del biossido di titanio negli alimenti.....	12
CAPITOLO 2 RIVALUTAZIONE DEL BIOSSIDO DI TITANIO DA PARTE DELL'EFSA, 2016	16
2.1 Dimensione delle particelle nel TiO ₂	16
2.2 Livelli di TiO ₂ nei prodotti alimentari	17
2.2.1 Livelli di esposizione.....	18
2.3 Analisi dati biologici e tossicologici	20
2.4 Raccomandazioni	21
CAPITOLO 3 VALUTAZIONE DA PARTE DELL' EFSA DI QUATTRO PUBBLICAZIONI (BETTINI ET AL., HERINGA ET AL., PROQUIN ET AL., GUO ET AL.), 2018.....	22
3.1 Bettini et al.	22
3.1.1 Risultati	22
3.1.2 Valutazione EFSA	23
3.2 Guo et al.	24
3.2.1 Risultati	24
3.2.2 Valutazioni EFSA	25
3.3 Heringa et al.	26
3.3.1 Risultati	26
3.3.2 Valutazioni EFSA	26
3.4 Proquin et al.....	27
3.4.1 Risultati	27
3.4.2 Valutazioni EFSA	28
3.5 Conclusioni.....	29
CAPITOLO 4 VALUTAZIONE DELL'ANSES SULL' E171, 2019	30
4.1 Nuovo parere ANSES.....	30
3.1.2 Conclusioni ANSES.....	31
4.2 Parere scientifico EFSA	32

CAPITOLO 5 CARATTERIZZAZIONE DELL' E171 E ATTIVITÀ ATTUALMENTE IN CORSO	33
5.1 Attività in corso	35
CONCLUSIONI	36
BIBLIOGRAFIA.....	37

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1: Categorie di alimenti in cui è consentita la presenza di TiO ₂	14
Tabella 2: Riassunto dell'esposizione al TiO ₂ usato come additivo alimentare con la dieta (i livelli minimi e massimi sono espressi in mg/kg di peso corporeo per giorno).....	19
Tabella 3: Riassunto dell'esposizione alle nanoparticelle di TiO ₂ , presenti ad un livello di 3.2% di peso nel TiO ₂ , dal suo utilizzo come additivo alimentare (i livelli minimi e massimi sono espressi in mg/kg di peso corporeo per giorno).....	19
Tabella 4: Margini di sicurezza calcolati sulla base del NOAEL 2.250 mg TiO ₂ / kg di peso corporeo e dei dati sull'esposizione ottenuti dallo scenario del consumatore non fedele al marchio.....	20
Tabella 5: Pubblicazioni analizzate dall'ANSES.....	31
Tabella 6: Caratterizzazione dell'E171 realizzata dall'EFSA.....	35

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1: Strutture cristalline delle tre principali fasi del TiO_2	9
Figura 2: Produzione nel corso degli anni del biossido di titanio a livello globale.....	12
Figura 3: Quantità di TiO_2 presente in alcuni alimenti.....	13
Figura 4: Esempio immagine SEM dell'E171 ottenuta dal laboratorio n.1.....	34
Figura 5: Esempio immagine SEM dell'E171 ottenuta dal laboratorio n.2.....	34
Figura 6: Esempio immagine SEM dell'E171 ottenuta dal laboratorio n.3.....	34

ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

USA	United State of America
JEFCA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
IARC	International Agency for Research on Cancer
EFSA	European Food Safety Authority
UE	Unione Europea
SCF	Scientific Committee on Food
CEFIC	European Chemical Industry Council
TDMA	Titanium Dioxide Manufacturers Association
SEM	scanning electron microscope
TEM	transmission electron microscope
DLS	dynamic light scattering
ANS	EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level
OCSE	Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico
DNA	acido desossiribonucleico
PP	placche di Peyer
TH	T helper
NM	nano materiale
BSA	bovine serum albumin
ACF	aberrant crypt foci
ROS	reactive oxygen species
NP	nanoparticelle

PBS	phosphate buffered saline
RIVM	Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu
REACH	registration, evaluation, authorization and restriction of chemicals
MP	microparticelle
ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire
STEM	scanning and transmission electron microscope
XDC	X-ray disk centrifuge
DC	disk centrifuge
EOGRT	extended one generation reproductive toxicity study

INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI

Questa tesi affronta la controversia circa l'additivo biossido di titanio (E171), messa in evidenza anche dalla decisione della Francia di sospendere temporaneamente la messa in vendita dei prodotti alimentari che lo contengono a partire dal 1° Gennaio 2020. Con questa tesi si mira a comprendere la controversia dal punto di vista scientifico e tecnologico, anche attraverso una migliore valutazione dell'impatto del biossido di titanio sulla salute dell'uomo. Vengono affrontate la sua natura e le sue caratteristiche così da contribuire ad una maggiore chiarezza. La controversia circa l'E171 è emersa e si è sviluppata quando è stata evidenziata la presenza di nanoparticelle, ovvero particelle con una o più dimensioni superficiali comprese tra 1-100 nm, in alcuni prodotti alimentari. Nella tesi sono in particolare riportati i vari studi effettuati nel corso degli anni volti a stabilire l'idoneità e la sicurezza per quanto riguarda l'utilizzo del TiO_2 come additivo alimentare. Le decisioni pubbliche prese dalla Francia sembrano essere un compromesso tra le posizioni delle parti interessate in cui i principi di interrogazione e precauzione svolgono un ruolo importante. Questa controversia è ancora in corso e su di essa ci sono incertezze sia scientifiche che legali.

Capitolo 1

BIOSSIDO DI TITANIO

Il biossido di titanio è l'unico ossido del titanio naturalmente presente a pressione atmosferica e possiamo trovarlo in diverse forme cristalline di cui le principali sono: il rutilo, l'anatasio e la brookite. Il rutilo in condizioni ambientali è la forma termodinamicamente più stabile. Ha una struttura tetragonale in cui ogni atomo di Ti è coordinato da sei atomi di O a formare un ottaedro leggermente distorto tramite quattro legami equatoriali ($1.946 \pm 0.003 \text{ \AA}$) e due apicali più lunghi ($1.983 \pm 0.003 \text{ \AA}$). Ogni ottaedro condivide otto angoli e due lati con altri ottaedri con cui forma una catena lineare parallela all'asse c della cella unitaria, che contiene due unità di TiO_2 (fig 1). L'anatasio ha struttura tetragonale e coordinazione degli atomi di Ti e O analoghe a quella del rutilo. La distorsione dell'ottaedro di TiO_6 , però, è maggiore con i quattro legami corti e i due lunghi rispettivamente di $1.966 \pm 0.001 \text{ \AA}$ e $1.937 \pm 0.001 \text{ \AA}$. Inoltre, si ha una contrazione dell'asse c che comporta una contrazione del volume di circa il 9%. Per questo motivo il rutilo risulta essere più denso dell'anatasio. Ogni ottaedro condivide quattro angoli e quattro lati con altrettanti ottaedri formando una struttura a zig-zag perpendicolare all'asse c. La cella unitaria contiene quattro unità di TiO_2 .

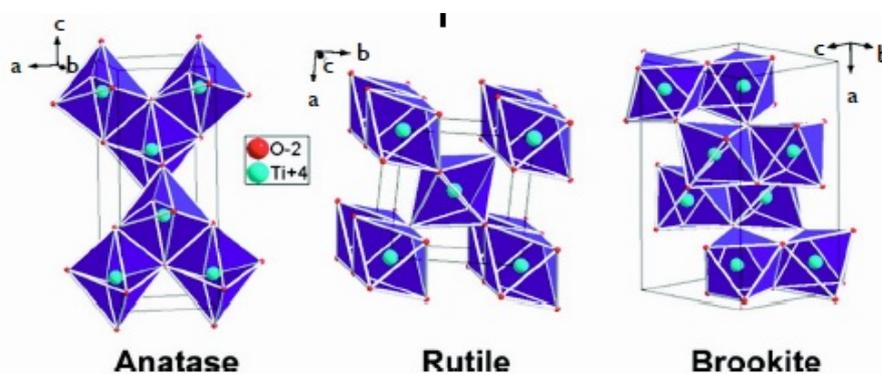


Figura 1: Strutture cristalline delle tre principali fasi del TiO_2 .

La brookite ha una struttura ortorombica formata da ottaedri che condividono tre lati con i vicini. La cella unitaria contiene otto unità di TiO_2 . La brookite pura è molto difficile da sintetizzare e meno utilizzata. Il biossido di titanio può trovarsi sia sotto forma di microparticelle che di nanoparticelle. Il TiO_2 (E171) utilizzato come pigmento alimentare è caratterizzato da particelle con un diametro di circa 150 nm, dunque meno del 50% di queste presenta un diametro minore di 100 nm, in questo caso non si parla quindi di nanomateriali. La Commissione Europea ha adottato la seguente definizione di nanomateriale: “Un materiale naturale, casuale o prodotto contenente particelle, in uno stato slegato o come aggregato o come agglomerato e dove, per il 50% o più delle particelle nella distribuzione delle grandezze numeriche, una o più dimensioni esterne sono nell'intervallo di grandezza 1 nm – 100 nm. In casi specifici e dove giustificato da preoccupazioni per l'ambiente, la salute, la sicurezza o la competitività la soglia di distribuzione delle grandezze numeriche del 50% può essere sostituita da una soglia tra l'1 e il 50%”.

Il biossido di titanio può essere ottenuto tramite due processi: il **processo al solfato** e il **processo al cloruro** che utilizzano i due principali minerali, ilmenite e rutilo particolarmente abbondanti in Australia e Sud Africa.

Il processo al solfato prevede tre fasi:

- 1) **Dissoluzione del minerale**
- 2) **Formazione del biossido di titanio idrato**
- 3) **Formazione del biossido di titanio anidro**

Il minerale usato in tale processo è l'ilmenite FeTiO_3 ; dopo essere stato macinato finemente viene trattato con acido solforico con formazione di una miscela di solfati, il solfato di titanile, il solfato di ferro (II) e solfato di ferro (III):

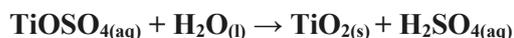


Prima dell'estrazione del biossido di titanio lo ione ferrico viene convertito a ione ferroso usando limatura di ferro:



Eventuali solidi presenti vengono eliminati per filtrazione dopo la sedimentazione. La soluzione viene poi raffreddata e si ha la precipitazione dei cristalli di solfato di Ferro (II) che, a loro volta, vengono allontanati per filtrazione.

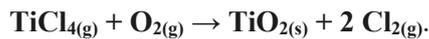
La soluzione rimanente contiene **solfato di titanile** quindi lo stadio successivo prevede la formazione di biossido di titanio idrato secondo la reazione:



Il biossido di titanio idrato viene portato alla temperatura di circa 800°C alla quale perde la sua acqua di idratazione.

Il **processo al cloruro** prevede la conversione di rutilo a cloruro di titanio (IV) e la successiva ossidazione di quest'ultimo.

Il rutilo viene scaldato a 900 °C in presenza di cloro e carbon coke con formazione di cloruro di titanio (IV) che è un composto volatile. Quest'ultimo viene riscaldato in presenza di ossigeno a 1200 °C:



1.1 Campi di applicazione del biossido di titanio

La produzione di biossido di titanio a livello globale è di circa 6 milioni di tonnellate all'anno; di queste circa il 99% è destinato ad essere utilizzato come pigmento, ma il TiO_2 trova anche altri importanti utilizzi come quello di fotocatalizzatore. Il biossido di titanio viene utilizzato in molti settori tra cui quello delle costruzioni (cementi, vernici e vernici antivegetative), nell'industria cartaria, nella cosmetica (creme solari e dentifrici), nella farmaceutica (comprese), negli alimenti (additivo colorante), ma anche in altri ambiti (sistemi di purificazione dell'aria, gomme, inchiostri e ceramiche). L'interesse per il biossido di titanio è dovuto principalmente alla sua capacità di disperdere la luce visibile grazie all'elevato indice di rifrazione (vicino a quello del diamante) e alla sua granulometria (dimensioni e forma). Questi requisiti sono molto importanti nel cibo dove TiO_2 viene utilizzato appunto per ottenere un effetto sbiancante. In particolare, il colore bianco deriva dal fatto che le particelle con dimensioni maggiori rispetto alla lunghezza d'onda della luce diffondono tutte le componenti della luce bianca in eguale misura. Poiché il processo si ripete moltissime volte all'interno del mezzo, la direzione di provenienza della luce non è più riconoscibile e il mezzo assume un colore bianco. Negli ultimi anni si è assistito, nel caso settore alimentare, ad una diminuzione dell'utilizzo di TiO_2 a causa delle preoccupazioni sui possibili rischi per la salute umana.

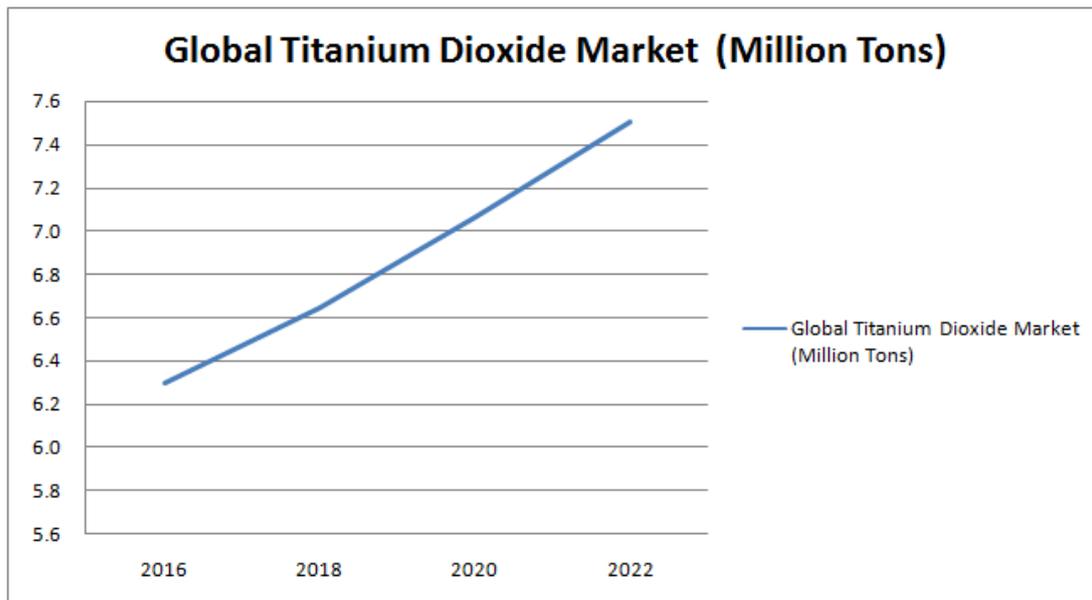


Figura 2: Produzione nel corso degli anni del biossido di titanio a livello globale.

1.2 Utilizzo del biossido di titanio negli alimenti

L'utilizzo del TiO_2 negli alimenti è stato approvato nel 1966 dalla Food and Drug Administration negli USA e nel 1969 dall'Unione Europea sulla base dell'analisi dei rischi condotta dalla commissione di esperti dell'Organizzazione per l'alimentazione e l'agricoltura/Organizzazione Mondiale della Sanità (JECFA) che arrivò alla seguente conclusione: "Il biossido di titanio è un composto altamente insolubile. Gli studi in diverse specie, uomo incluso, hanno dimostrato che nel caso del biossido di titanio non vi è né un assorbimento significativo né un accumulo nei tessuti e dunque non è necessario stabilire un limite giornaliero per quanto riguarda la sua assunzione". Quando viene utilizzato come additivo alimentare il biossido di titanio si indica nell'Unione Europea con la sigla E171; come gli altri additivi anche il TiO_2 sottostà al regolamento CE n° 1333/2008 dove, nell'allegato II, è stabilito che nelle 51 categorie di alimenti in cui è consentito, il TiO_2 (E171) può essere utilizzato quantum satis.

Negli alimenti l'E171 può essere formato esclusivamente da anatasio e/o rutilio. Viene utilizzato per il suo potere sbiancante e opacizzante soprattutto nel campo dolciario (caramelle e gomma da masticare), nelle salse bianche, nelle glassature, nelle creme non casearie e negli integratori alimentari. Il biossido di titanio è fortemente stabile al calore, alla luce, all'ossigeno e al pH e risulta quindi inalterato a seguito di molti dei processi a cui sono sottoposti gli alimenti.

L'uso di TiO_2 è aumentato costantemente fino al 2014, figurando nell'etichettatura di oltre 3500 cibi e bevande. Anche se il TiO_2 si trova solo nell'1,3% dei nuovi prodotti, è presente comunque nel 51% delle gomme da masticare, nel 10% delle pastiglie, gelatine e masticabili e nel 10% dei lecca-lecca.

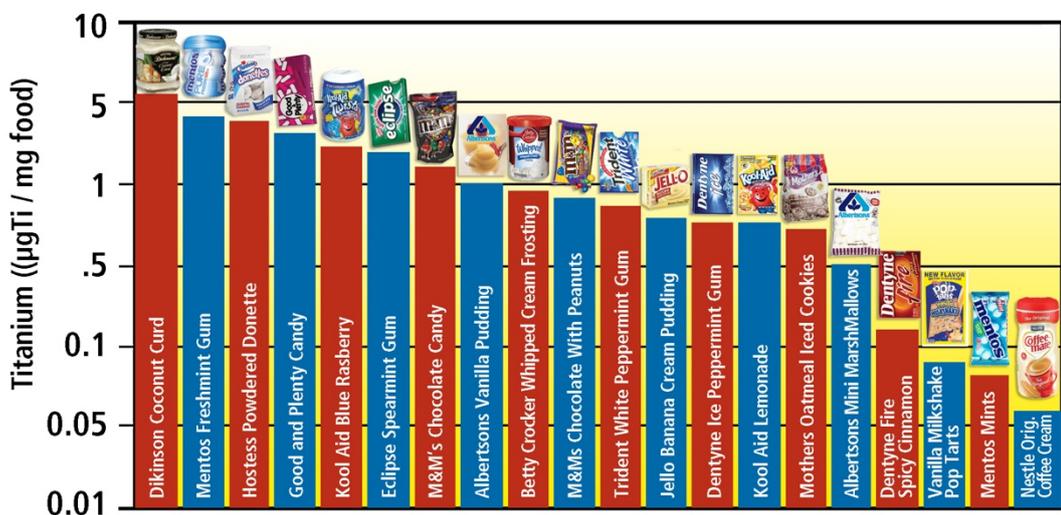


Figura 3: Quantità di TiO_2 presente in alcuni alimenti.

Per poter ottenere un effetto sbiancante ottimale si debbono avere particelle con dimensioni di circa 250 nm; la presenza di nano particelle non è dunque favorevole al raggiungimento di questo scopo: nonostante ciò in campioni di E171 ne è stata riscontrata una quantità compresa tra 0% e 39% dal punto di vista numerico e fino al 3.2% per quanto riguarda la massa.

Questo fatto ha portato a preoccupazioni circa la sicurezza dell'additivo E171, specialmente dopo che il P25, una delle diverse specie chimiche in cui possiamo trovare il biossido di titanio costituito per il 100% da nanoparticelle, è stato identificato nel 2006 dall' Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) come possibilmente cancerogeno per gli umani se inalato.

Sebbene P25 e E171 siano due diversi tipi di TiO_2 con proprietà fisico-chimiche differenti (area della superficie, fase cristallina, dimensioni e punto isoelettrico) queste ed altre scoperte hanno portato alla necessità di ulteriori studi circa l'utilizzo dell'additivo alimentare.

Tabella 1: Categorie di alimenti in cui è consentita la presenza di TiO₂

Food category number	Food category name	E-number/group	Restrictions/exceptions	MPL (mg/L or mg/kg as appropriate)
01.4	Flavoured fermented milk products including heat-treated products	Group II		QS
01.5	Dehydrated milk as defined by Directive 2001/114/EC	Group II	Except unflavoured products	QS
01.6.3	Other creams	Group II	Only flavoured creams	QS
01.7.1	Unripened cheese, excluding products falling in category 16	Group II	Only flavoured unripened cheese	QS
01.7.3	Edible cheese rind	Group II		QS
01.7.4	Whey cheese	Group II		QS
01.7.5	Processed cheese	Group II	Only flavoured processed cheese	QS
01.7.6	Cheese products, excluding products falling in category 16	Group II	Only flavoured unripened products	QS
01.8	Dairy analogues, including beverage whiteners	Group II		QS
03	Edible ices	Group II		QS
04.2.4.1	Fruit and vegetable preparations, excluding compote	Group II	Only <i>mostarda di frutta</i>	QS
04.2.4.1	Fruit and vegetable preparations, excluding compote	E 171	Only seaweed-based fish roe analogues	QS
04.2.5.3	Other similar fruit or vegetable spreads	Group II	Except <i>crème de pruneaux</i>	QS
05.2	Other confectionery including breath-refreshening microsweets	Group II		QS
05.3	Chewing gum	Group II		QS
05.4	Decorations, coatings and fillings, except fruit-based fillings covered by category 4.2.4	Group II		QS
06.3	Breakfast cereals	Group II	Only breakfast cereals other than extruded, puffed and/or fruit-flavoured breakfast cereals	QS
06.5	Noodles	Group II		QS
06.6	Batters	Group II		QS
06.7	Precooked or processed cereals	Group II		QS
07.2	Fine bakery wares	Group II		QS
08.2.3	Casings and coatings and decorations for meat	Group II	Except edible external coating of pastourmas	QS
09.2	Processed fish and fishery products, including molluscs and crustaceans	Group II	Only surimi and similar products and salmon substitutes	QS
09.2	Processed fish and fishery products, including molluscs and crustaceans	E 171	Only fish paste and crustacean paste	QS
09.2	Processed fish and fishery products, including molluscs and crustaceans	E 171	Only precooked crustacean	QS
09.2	Processed fish and fishery products, including molluscs and crustaceans	E 171	Only smoked fish	QS
09.3	Fish roe	Group II	Except sturgeons' eggs (caviar)	QS
12.2.2	Seasonings and condiments	Group II	Only seasonings, for example curry powder, tandoori	QS
12.4	Mustard	Group II		QS
12.5	Soups and broths	Group II		QS
12.6	Sauces	Group II	Excluding tomato-based sauces	QS
12.7	Salads and savoury-based sandwich spreads	Group II		QS
12.9	Protein products, excluding products covered in category 1.8	Group II		QS

Food category number	Food category name	E-number/group	Restrictions/exceptions	MPL (mg/L or mg/kg as appropriate)
13.2	Dietary foods for special medical purposes defined in Directive 1999/21/EC, excluding products from food category 13.1.5	Group II		QS
13.3	Dietary foods for weight control diets intended to replace total daily food intake or an individual meal (the whole or part of the total daily diet)	Group II		QS
13.4	Foods suitable for people intolerant to gluten as defined by Regulation (EC) No 41/2009	Group II		QS
14.1.4	Flavoured drinks	Group II	Excluding chocolate milk and malt products	QS
14.2.3	Cider and perry	Group II	Excluding <i>cidre bouché</i>	QS
14.2.4	Fruit wine and made wine	Group II	Excluding <i>wino owocowe markowe</i>	QS
14.2.5	Mead	Group II		QS
14.2.6	Spirit drinks as defined in Regulation (EC) No 110/2008	Group II	Except spirit drinks as defined in Article 5(1) and sales denominations listed in Annex II, paragraphs 1–14 of Regulation (EC) No 110/2008 and spirits (preceded by the name of the fruit) obtained by maceration and distillation, Geist (with the name of the fruit or the raw material used), London Gin, Sambuca, Maraschino, Marrasquino or Maraskino and Mistrà	QS
14.2.7.1	Aromatised wine-based products as defined by Regulation (EEC) No 1601/91	Group II	Except Americano, bitter vino	QS
14.2.7.2	Aromatised wine-based drinks	Group II	Except bitter soda, sangria, claria, zurra	QS
14.2.7.3	Aromatised wine-product cocktails	Group II		QS
14.2.8	Other alcoholic drinks including mixtures of alcoholic drinks with non-alcoholic drinks and spirits with less than 15% of alcohol	Group II		QS
15.1	Potato-, cereal-, flour- or starch-based snacks	Group II		QS
15.2	Processed nuts	Group II		QS
16	Desserts, excluding products covered in categories 1, 3 and 4	Group II		QS
17.1	Food supplements supplied in a solid form, including capsules and tablets and similar forms, excluding chewable forms	Group II		QS
17.2	Food supplements supplied in a liquid form	Group II		QS
17.3	Food supplements supplied in a syrup-type or chewable form	Group II		QS

Capitolo 2

RIVALUTAZIONE DEL BLOSSIDO DI TITANIO DA PARTE DELL'EFSA, 2016

La Commissione Europea, in seguito alle preoccupazioni sollevatesi circa l'utilizzo del biossido di titanio come additivo, ha chiesto all'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) di rivalutarne i possibili effetti sulla salute e di fornire un'opinione scientifica.

Nel compiere la sua valutazione, l'EFSA è partita dalla considerazione che, seppur vi fosse già un esteso database circa i possibili danni dovuti ai nanomateriali del TiO₂, molti di questi dati non potevano essere considerati rilevanti per l'E171. La rivalutazione dei vari additivi alimentari da parte dell'EFSA è comunque prevista per quelli permessi già prima del 20 Gennaio 2009 in base al regolamento (EU) N° 257/2010 e l'ordine di rianalisi avviene su tre criteri:

- il tempo trascorso dall'ultima valutazione dell'additivo da parte del Comitato Scientifico dell'Alimentazione Umana (SCF) o dell'EFSA,
- la presenza di nuove prove scientifiche,
- la diffusione d'uso e l'esposizione dell'uomo a quel determinato additivo alimentare.

2.1 Dimensione delle particelle nel TiO₂

Per comprendere meglio le caratteristiche delle particelle del TiO₂ (E171) l'EFSA ha analizzato i dati provenienti da diverse fonti: industrie interessate (CEFIC, TDMA Colorcon ecc.), letteratura (Peters et al., Yang et al. ecc.) e principali studi tossicologici. Si è notato che la quantità di nanoparticelle individuate varia a seconda del metodo analitico utilizzato (SEM, TEM, laser diffraction, DLS ecc.) e del tipo di mezzo (acquoso o meno). In tutti i casi la percentuale di nanoparticelle non ha mai superato il limite del 50% necessario per poter parlare di nanomateriali. Il gruppo di esperti dell'EFSA ha affermato che, oltre ai limiti per la presenza di elementi tossici come arsenico, mercurio, cadmio e piombo, già previsti dal regolamento N°231/2012, si sarebbero dovuti stabilire limiti anche per la dimensione delle particelle di TiO₂.

2.2 Livelli di TiO₂ nei prodotti alimentari

Per poter avere un quadro più realistico circa l'esposizione all'additivo E171, è stato effettuato un pubblico invito per la fornitura di dati sulla concentrazione del TiO₂ (E171) negli alimenti, poi resi disponibili da industrie e stati membri; altri dati sono stati ottenuti dal Mintel's Global New Products Database, usato in particolare per controllare l'etichettatura dei prodotti contenenti biossido di titanio. L'EFSA è ricorsa inoltre al Comprehensive Food Consumption Database, in cui troviamo dati dettagliati circa il consumo di cibo grazie a studi condotti dalle varie nazioni sulla dieta dei cittadini. Alcune categorie di alimenti non sono presenti nell'EFSA Comprehensive Food Consumption Database e quindi non sono state prese in considerazione: questo può portare a una sottostima dell'esposizione al TiO₂. Le categorie di cibo escluse sono le seguenti:

- 01.7.3. edible cheese rind,
- 01.7.6. cheese products (excluding products falling in category 16), only flavoured unripened products,
- 04.2.4.1. fruit and vegetable preparations, excluding compote, only mostarda di frutta,
- 04.2.4.1. fruit and vegetable preparations, excluding compote, only seaweed-based fish analogue,
- 05.4. decorations, coatings and fillings, except fruit-based fillings covered by category 04.2.4, only decorations, coatings and sauces, except fillings and only fillings,
- 06.6. batters,
- 06.7. precooked or processed cereals,
- 08.2.3. casings and coatings and decorations for meat,
- 14.2.4. fruit wine and made wine,
- 14.2.5. mead.

Oltre a quelle sopraelencate, non sono state incluse nella valutazione altre 25 categorie di alimenti a causa della mancanza o della inadeguatezza dei livelli d'uso/analitici riportati, escludendo in totale 35 delle 51 categorie in cui il TiO₂ è consentito.

2.2.1 Livelli di esposizione

La valutazione dell'esposizione a TiO₂ (E171) è stata effettuata sulla base dei livelli massimi indicati nei dati forniti all'EFSA (definiti come lo scenario di esposizione a livello

massimo) e dei livelli d'uso riportati (definiti come lo scenario di esposizione raffinato) forniti dall'industria e dagli Stati membri; quella massima è stata stimata in base all'uso maggiore riportato dalle industrie o dai dati più alti forniti dagli stati membri. Il gruppo di esperti ritiene che le stime derivate da questo scenario sono le più conservative in quanto presumono che il consumatore sarà continuamente esposto al TiO_2 presente nel cibo al massimo livello d'uso riportato nei dati analitici. La valutazione più raffinata è basata sui livelli d'uso riportati dall'industria e sui dati analitici inviati all'EFSA dagli stati membri. Sono state effettuate due diverse stime basate su due diversi modelli di popolazione:

- 1) Lo scenario del consumatore fedele al marchio: si è ipotizzato che un consumatore sia esposto a lungo termine all'additivo alimentare presente ai livelli massimi di utilizzo/analitici riportati per una categoria alimentare. Questa stima dell'esposizione viene calcolata come segue:
 - combinando il consumo di cibo con il massimo dei livelli d'uso massimi riportati o il massimo dei risultati analitici, a seconda di quale dei due fosse il più alto o disponibile, per la principale categoria di alimenti a livello individuale;
 - utilizzando la media dei livelli d'uso tipici riportati o la media dei risultati analitici, a seconda di quale fosse il più alto o disponibile, per le restanti categorie di alimenti.
- 2) Lo scenario del consumatore non fedele al marchio: si è ipotizzato che la popolazione sia esposta a lungo termine all'additivo alimentare presente ai livelli medi di utilizzo/analitici riportati negli alimenti. Questa stima dell'esposizione è calcolata utilizzando la media dei livelli d'uso tipici riportati o la media dei risultati analitici per tutte le categorie di alimenti.

Tabella 2: Riassunto dell'esposizione al TiO_2 usato come additivo alimentare con la dieta (i livelli minimi e massimi sono espressi in mg/Kg di peso corporeo per giorno)

	Infants (12 weeks – 11 months)	Toddlers (12–35 months)	Children (3–9 years)	Adolescents (10–17 years)	Adults (18–64 years)	The elderly (> 65 years)
Maximum level exposure assessment scenario						
Mean	0.4–1.9	1.2–9.2	1.8–10.4	0.8–6.7	0.6–6.8	0.4–4.5
95th percentile	1.4–9.6	4.0–19.3	4.9–32.4	3.1–23.5	2.2–15.0	1.2–10.7
Refined estimated exposure scenario						
<i>Brand-loyal scenario</i>						
Mean	0.4–1.8	1.1–7.6	1.5–8.8	0.7–5.9	0.5–5.7	0.4–3.9
95th percentile	1.2–9.2	3.6–14.7	4.1–30.2	2.5–21.2	1.9–13.6	1.1–9.2
<i>Non-brand-loyal scenario</i>						
Mean	0.2–0.8	0.6–4.6	0.9–5.5	0.4–4.1	0.3–4.0	0.2–2.8
95th percentile	0.7–3.9	2.0–6.8	2.4–14.8	1.3–10.8	1.1–9.7	0.5–7.0

Tabella 3: Riassunto dell'esposizione alle nanoparticelle di TiO₂ (presenti ad un livello di 3.2% di peso nel TiO₂) dal suo utilizzo come additivo alimentare (i livelli minimi e massimi sono espressi in mg/Kg di peso corporeo per giorno)

	Infants (12 weeks – 11 months)	Toddlers (12–35 months)	Children (3–9 years)	Adolescents (10–17 years)	Adults (18–64 years)	The elderly (> 65 years)
Maximum level exposure assessment scenario						
Mean	0.01–0.06	0.04–0.30	0.06–0.33	0.03–0.21	0.02–0.22	0.01–0.14
95th percentile	0.04–0.31	0.13–0.62	0.16–1.04	0.10–0.75	0.07–0.48	0.04–0.34
Refined estimated exposure scenario						
<i>Brand-loyal scenario</i>						
Mean	0.01–0.06	0.03–0.24	0.05–0.28	0.02–0.19	0.02–0.18	0.01–0.12
95th percentile	0.04–0.29	0.11–0.47	0.13–0.97	0.08–0.68	0.06–0.44	0.03–0.29
<i>Non-brand-loyal scenario</i>						
Mean	0.01–0.03	0.02–0.15	0.03–0.18	0.01–0.13	0.01–0.13	0.01–0.09
95th percentile	0.02–0.13	0.06–0.22	0.08–0.47	0.04–0.35	0.04–0.31	0.02–0.23

2.3 Analisi dati biologici e tossicologici

Dall'analisi di studi su assorbimento, distribuzione e escrezione del TiO₂ nei ratti e topi, sono emerse differenze per quanto riguarda i risultati a seconda del tipo di studio e la sua durata. Il gruppo di esperti dell'EFSA è giunto alla conclusione che:

- l'assorbimento del TiO₂ somministrato per via orale è estremamente basso,
- la biodisponibilità di TiO₂ (misurata come particelle o come titanio) è bassa,

- la biodisponibilità misurata come titanio sembra essere indipendente dalla dimensione delle particelle,
- la grande maggioranza di una dose orale di TiO₂ è eliminata immutata con le feci,
- una piccola quantità (massimo dello 0,1%) di TiO₂ ingerito per via orale è stata assorbita dal tessuto linfoide associato all'intestino e successivamente distribuito a vari organi e le velocità di eliminazione da questi organi erano variabili,
- c'erano livelli di fondo (basali) di titanio altamente variabili negli animali e nell'uomo, che presentavano sfide nell'analisi ai bassi livelli di assorbimento di titanio riportati e che possono complicare l'interpretazione dei risultati riportati in alcuni studi.

È quindi improbabile che le particelle di TiO₂ ingerite per via orale (micro e nanometriche) rappresentino un rischio genotossico *in vivo*; possibili effetti negativi nel sistema riproduttivo sono stati identificati in alcuni studi condotti con nanomateriale non di grado alimentare o non adeguatamente caratterizzato (cioè non E171). Il gruppo di esperti scientifici non è stato in grado di raggiungere una conclusione definitiva sugli endpoint riproduttivi per l'additivo alimentare (E171) a causa della mancanza di uno studio esteso di 90 giorni, come richiesto nella Guida degli additivi alimentari (gruppo di esperti scientifici EFSA, 2012), o di uno studio multigenerazionale o uno studio esteso di tossicità sulla riproduzione di una generazione con l'additivo alimentare (E171). Non è stato quindi possibile stabilire una dose giornaliera accettabile. Da uno studio sulla cancerogenicità del TiO₂ nei topi e nei ratti, è stato scelto il NOAEL più basso riportato che era di 2.250 mg TiO₂/kg di peso corporeo al giorno per i maschi, la dose più alta testata in questa specie e sesso. Sulla base di questo NOAEL e dei dati sull'esposizione ottenuti dallo scenario del consumatore non fedele al marchio, il gruppo di esperti scientifici ha calcolato i valori che rappresentano il margine di sicurezza per i diversi gruppi di popolazione (Tabella 4).

Tabella 4: Margini di sicurezza calcolati sulla base del NOAEL 2.250 mg TiO₂/kg di peso corporeo e dei dati sull'esposizione ottenuti dallo scenario del consumatore non fedele al marchio.

Population groups	MoS calculation based on exposure to the non-brand loyal scenario	
	Mean	p95
Infants	2,800–11,000	600–3,200
Toddlers	500–3,800	350–1,200
Children	400–2,500	150–950
Adolescents	550–5,700	200–1,800
Adults	550–7,500	250–2,100
The elderly	800–11,000	300–4,500

Si è ritenuto che, in base al database attualmente disponibile e alle considerazioni sull'assorbimento di TiO₂, i margini di sicurezza calcolati non sarebbero preoccupanti. Solamente una volta disponibili dati definitivi e affidabili sulla tossicità riproduttiva di E171, il set di dati completo consentirà di stabilire una dose giornaliera accettabile.

2.4 Raccomandazioni

Il parere EFSA si è concluso con le seguenti raccomandazioni:

- Per poter stabilire una dose giornaliera accettabile per l'additivo alimentare TiO₂ (E171), dovrebbero essere eseguiti ulteriori test. Si potrebbero eseguire uno studio esteso di 90 giorni o uno multigenerazionale o uno studio di tossicità riproduttiva esteso a una generazione secondo le attuali linee guida dell'OCSE. Tali studi dovrebbero essere eseguiti con TiO₂ (E171) conforme alle specifiche dell'UE e includendo inoltre una caratterizzazione della distribuzione granulometrica del materiale di prova.
- Le specifiche dell'UE per TiO₂ (E171) dovrebbero includere una caratterizzazione della distribuzione delle dimensioni delle particelle utilizzando descrittori statistici appropriati (ad es. Intervallo, mediana, quartili) nonché la percentuale (in numero e in massa) di particelle in nanoscala (con almeno una dimensione <100 nm) presente nel TiO₂ (E171) utilizzato come additivo alimentare. La metodologia di misurazione applicata deve essere conforme al documento di orientamento dell'EFSA (Comitato scientifico dell'EFSA, 2011).
- I limiti massimi per le impurità degli elementi tossici (arsenico, piombo, mercurio e cadmio) nella specifica UE per TiO₂ (E171) dovrebbero essere rivisti al fine di garantire che TiO₂ (E171) come additivo alimentare non sia una fonte significativa di esposizione a quegli elementi tossici negli alimenti.

Capitolo 3

VALUTAZIONE DA PARTE DELL'EFSA DI QUATTRO PUBBLICAZIONI (BETTINI ET AL., HERINGA ET AL., PROQUIN ET AL., GUO ET AL.), 2018

In seguito alla nascita di nuove perplessità sulla sicurezza dell'additivo E171, suscitate in particolare da quattro studi (Bettini et al., Guo et al., Heringa et al., Proquin et al.), pubblicati successivamente al parere del gruppo ANS nel 2016, la Commissione europea ha richiesto un intervento dell'EFSA in conformità con l'articolo 29 del regolamento (CE) n. 178/2002.

Il gruppo di esperti scientifici ha quindi valutato le quattro pubblicazioni come richiesto nel mandato della CE e ha formulato commenti specifici per ognuno degli studi nel contesto delle conclusioni tratte nel parere EFSA del 2016.

Per analizzare i nuovi studi si è tenuto conto in particolare dell'eventuale presenza di dati rilevanti per la sicurezza del TiO₂ alimentare e di eventuali prove scientifiche in grado di colmare le incertezze precedentemente individuate e di giustificare una riapertura del parere EFSA del 2016.

3.1 Bettini et al.

Lo studio parte dalla considerazione che attraverso l'alimentazione umana, ogni giorno, si assumono livelli significativi di nanoparticelle di TiO₂ usato come additivo alimentare: nei lotti di E171 è stato infatti ritrovato fino ad un 36% di particelle che scendono sotto i 100 nm in una dimensione (nanoparticelle). Crescenti sono le preoccupazioni che una assunzione di nanoparticelle di TiO₂ per via orale possa portare ad un maggiore rischio di infiammazione intestinale cronica e cancerogenesi, tuttavia, gli effetti dell'assunzione di TiO₂ sono ancora poco studiati.

3.1.1 Risultati

Al termine dello studio condotto sui ratti è emerso che le particelle di TiO₂ di tipo alimentare sono in grado di attraversare la barriera intestinale e raggiungere il fegato senza alterare però la permeabilità intestinale o causare danni al DNA nelle placche di Peyer.

Inoltre, le particelle influenzano la quantità di cellule dendritiche e le popolazioni di cellule T nelle placche di Peyer e causano squilibri nelle risposte immunitarie intestinali e sistemiche. Nei ratti esposti per via orale per una settimana a E171 a livelli umani rilevanti, il titanio è stato individuato nelle cellule immunitarie delle placche di Peyer (PP) come osservato con il modello TiO₂-NP NM-105. La quantità delle cellule dendritiche è aumentata nelle PP indipendentemente dal trattamento con TiO₂, mentre le cellule T regolatorie, coinvolte nello smorzamento delle risposte infiammatorie, sono diminuite solo con E171, un effetto ancora osservato dopo 100 giorni di trattamento. In tutti i ratti trattati con TiO₂, la stimolazione delle cellule immunitarie isolate dalle PP ha mostrato una diminuzione della secrezione di T helper (Th) -1 IFN- γ , mentre le risposte infiammatorie della milza Th1/Th17 sono nettamente aumentate.

Si è infine notato che le particelle di TiO₂ di tipo alimentare avviano e promuovono la formazione di lesioni preneoplastiche nel colon e inducono un'inflammation delle mucose di basso livello. E171 o NM-105 per una settimana non hanno avviato l'inflammation intestinale, mentre un trattamento con E171 per 100 giorni ha promosso la microinflammation del colon e ha avviato lesioni preneoplastiche, favorendo anche la crescita di focolai aberranti di cripta in un modello di carcinogenesi indotta chimicamente.

3.1.2 *Valutazione EFSA*

Per lo studio di Bettini et al. (2017) il gruppo di esperti dell'EFSA ha riportato le seguenti osservazioni:

- i materiali per il test TiO₂ sono stati preparati seguendo il protocollo generico di dispersione Nanogenotox, che prevede il rivestimento delle particelle con sieralbumina bovina (BSA) e l'ultrasonicazione. Questo protocollo è stato concepito per prevenire l'agglomerazione delle nanoparticelle ed è stato sviluppato in particolare per l'identificazione dei pericoli legati alle nanoparticelle in sospensione;
- la somministrazione di TiO₂ (E171) tramite sonda o acqua potabile non è pienamente rappresentativa dell'uso dell'additivo alimentare E171 negli alimenti. Ciò potrebbe introdurre alcune incertezze nell'estrapolazione dei risultati di questo studio per la valutazione dell'additivo alimentare poiché potrebbero non verificarsi interazioni con la matrice alimentare;
- gli effetti osservati sull'immunomodulazione/inflammation erano in linea con quelli che si verificano nei primissimi passi dello sviluppo di una reazione infiammatoria/immunologica. Le variazioni dei diversi biomarcatori sono state basse

(entro il 10-20%), mettendo così in discussione la rilevanza biologica dei risultati, anche tenendo conto della mancanza di dati storici per quel tipo di studio;

- la sieralbumina bovina (BSA) come rivestimento delle particelle di TiO₂ (E171) potrebbe a sua volta innescare una reazione immunologica e/o allergica;
- sebbene il modello utilizzato per indagare gli effetti del TiO₂ (E171) nello sviluppo di lesioni preneoplastiche presunte nel colon sia stato ben descritto, sono state evidenziate alcune limitazioni, come l'uso di un singolo marcatore;
- la presenza di focolai aberranti di cripta (ACF) in assenza di un promotore è insolita, ma in questo studio gli ACF sono stati osservati nel colon di alcuni animali trattati con il solo TiO₂ (E171);
- una pubblicazione di Wijnands et al. (2004), ha mostrato che il numero e la dimensione di ACF indotta da diversi composti alimentari come la crusca di grano, curcumina, rutina o isotiocianato di benzile, non erano predittivi del numero finale di tumori colon-rettali. Wijnands et al. (2004) hanno concluso che il numero e le dimensioni dell'ACF non sono considerati adatti come biomarcatori per il cancro colon-rettale, mentre l'espressione di alcuni geni associati al tumore (ad esempio la metalloproteinasi 1) è ben correlata con gli effetti dei composti alimentari sulla resa finale del tumore.

Il gruppo di esperti scientifici ha pertanto ritenuto che i nuovi risultati non fossero sufficienti a sollevare una preoccupazione sulle potenziali proprietà di inizio o promozione del TiO₂ (E171) sulla cancerogenesi del colon.

3.2 Guo et al.

L'obiettivo di questo studio è quello di esaminare gli effetti dovuti all'ingestione di particelle di TiO₂ della dimensione di 30 nm attraverso un modello di coltura cellulare *in vitro* dell'epitelio del piccolo intestino. Si vuole inoltre determinare come l'esposizione acuta o cronica alle nanoparticelle di TiO₂ influenzi la funzionalità della barriera intestinale, la generazione di specie reattive all'ossigeno, l'attivazione proinfiammatoria, l'assorbimento dei nutrienti (ferro, zinco, acidi grassi) e la funzione enzimatica del bordo dell'orletto a spazzola (fosfatasi alcalina intestinale).

3.2.1 Risultati

Un campione di coltura cellulare Caco-2/HT29-MTX è stato esposto a dosi fisiologicamente rilevanti di nanoparticelle di TiO₂ per periodi di tempo acuti (quattro ore) o

cronici (cinque giorni). L'esposizione cronica alle nanoparticelle di TiO₂ ha diminuito significativamente la funzione della barriera intestinale. La generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), la segnalazione proinfiammatoria, e l'attività della fosfatasi alcalina intestinale, hanno mostrato un incremento in risposta alle nanoparticelle di TiO₂. Ferro, zinco e trasporto degli acidi grassi sono significativamente diminuiti a seguito di esposizione a nanoparticelle di TiO₂ che ha indotto una diminuzione dei microvilli assorbenti nelle cellule epiteliali intestinali. È stata alterata inoltre l'espressione dei geni delle proteine trasportatrici di nutrienti, evidenziando come le cellule stiano lavorando per regolare i meccanismi di trasporto disturbati dall'ingestione di nanoparticelle. Nel complesso, questi risultati hanno dimostrato che la funzionalità delle cellule epiteliali intestinali è influenzata da un'esposizione fisiologicamente rilevante alle nanoparticelle comunemente ingerite attraverso il cibo.

3.2.2 Valutazioni EFSA

Per quanto riguarda lo studio di Guo et al. (2017), il gruppo di esperti ha riportato le seguenti osservazioni:

- lo studio è stato condotto con nanoparticelle di TiO₂ e non con TiO₂ come additivo alimentare;
- la sospensione di nanoparticelle di TiO₂ è stata sonicata per ridurre al minimo l'agglomerazione e/o l'aggregazione che potrebbe non verificarsi in ambienti più realistici;
- oltre all'analisi al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) delle particelle primarie, i risultati del dynamic light scattering (DLS) suggerivano che le dimensioni idrodinamiche erano considerevolmente più grandi, il che suggeriva che le nanoparticelle di TiO₂ potevano essere aggregate e agglomerate;
- gli autori hanno ipotizzato che tutte le particelle ingerite siano state a contatto con la superficie della parete, senza considerare la potenziale interazione delle nanoparticelle con il contenuto luminale;
- il glicocalice sulle cellule Caco-2 coltivate è diverso da quello sulle normali cellule intestinali umane;
- le cellule sono state risciacquate utilizzando un tampone fosfato salino (PBS) prima di esporle alle nanoparticelle di TiO₂ fattore che potrebbe alterare il glicocalice e le interazioni delle cellule di Caco-2 con le NP di TiO₂;

- i cambiamenti nell'espressione dei geni proinfiammatori visti dopo 5 giorni di trattamento con nanoparticelle di TiO₂ erano di piccola entità, non legati al dosaggio e non uniformi;
- informazioni su possibili marcatori dell'infiammazione come la produzione/secrezione di citochine, cambiamenti nell'espressione degli antigeni di membrana non erano disponibili;
- non è stato riportato alcun trasporto di nanoparticelle di TiO₂ attraverso i monostrati Caco-2/Ht29 MTX;
- con l'avvicinarsi di condizioni più fisiologiche gli effetti sono stati attenuati ed è stato quindi difficile utilizzare questi risultati *in vivo*.

3.3 Heringa et al.

L'obiettivo del presente studio è quello di valutare se l'ingestione orale di nanoparticelle di TiO₂ può rappresentare un rischio per la salute umana.

3.3.1 Risultati

Per l'analisi dei rischi sono stati utilizzati due diversi approcci: uno basato sull'assunzione di TiO₂, ovvero su dosi introdotte dall'esterno, l'altro basato sulle concentrazioni interne degli organi usando un modello di tipo cinetico per tenere conto dell'accumulo nel tempo. Nel primo caso non è stato rilevato alcun rischio per quanto riguarda gli effetti sul fegato e sulla milza, ma non si sono potute escludere possibili conseguenze sulle ovaie. Gli studi effettuati nel secondo approccio hanno evidenziato invece un potenziale rischio per fegato, ovaie e testicoli. Questa differenza dimostra l'importanza di includere informazioni tossico-cinetiche. Per rendere più precise queste valutazioni, si ritiene opportuno effettuare ulteriori analisi sulle concentrazioni effettive delle particelle negli organi umani e gli effetti su fegato e sistema riproduttivo a seguito di esposizione cronica alle nanoparticelle di TiO₂.

3.3.2 Valutazioni EFSA

Per quanto riguarda lo studio Heringa et al. (2016) il gruppo di esperti ha riportato le seguenti osservazioni:

- l'Istituto nazionale per la salute pubblica e l'ambiente (RIVM) oltre al presente studio ne ha forniti anche altri due non pubblicati al momento della valutazione del TiO₂ come additivo alimentare nel 2016;

- gli studi non pubblicati non hanno comunque influito sulle conclusioni del gruppo di esperti scientifici tratte dalla banca dati disponibile all'epoca;
- Heringa et al. hanno ipotizzato che, sebbene non vi fossero informazioni sull'assorbimento delle particelle di TiO₂, qualsiasi eventuale tossicità fosse causata dalle stesse;
- Si ritengono necessari nuovi studi sull'effettiva concentrazione di nano-TiO₂ negli organi umani e sugli effetti nel fegato e nel sistema riproduttivo dopo l'esposizione cronica a NP di TiO₂ ben caratterizzato, a causa di lacune ed incertezze, come sostenuto anche dagli autori dell'articolo;
- i dati sulla tossicità riproduttiva erano scarsi;
- i risultati circa gli effetti sui livelli di testosterone nei due studi (Jia et al., 2014; Tassinari et al., 2014) utilizzati da Heringa et al. (2016) erano contraddittori;
- incertezze significative sono attribuite all'utilizzo di dati riguardanti esposizioni a breve termine per lunghi periodi;
- Heringa et al. hanno utilizzato i fattori di incertezza del REACH piuttosto che quelli raccomandati dal comitato scientifico dell'EFSA (EFSA Scientific Committee, 2012);
- nel ricavare un margine accettabile di esposizione interna l'elemento cinetico nei fattori di incertezza inter e intra specie è stato rimosso solo da quelli interspecie;
- gli effetti osservati negli studi a breve termine che non hanno effetto utile per gli studi a lungo termine non sono di solito considerati una base solida per la valutazione del rischio.

3.4 Proquin et al.

Questo studio è stato realizzato con lo scopo di determinare se l'esposizione all'E171 possa indurre la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e danni al DNA, utilizzando un modello *in vitro* con l'impiego di cellule umane Caco-2 e HCT116. Lo studio vuole inoltre indagare come le micro e nanoparticelle di TiO₂ contribuiscano a questi effetti.

3.4.1 Risultati

I risultati hanno mostrato che sia l'E171, sia le micro e le nanoparticelle sono stabili in un terreno di coltura con lo 0,05% di sieralbumina bovina (BSA). La capacità di generazione di ROS in un ambiente privo di cellule risulta essere più alta per l'E171, seguito dalle NP e MP di TiO₂. Solo le MP sono in grado di indurre la formazione di ROS nelle cellule Caco-2 ad esse esposte. È stata riscontrata l'induzione di rotture di DNA a filamento singolo da parte

delle micro e nanoparticelle e dell'E171; è stato dimostrato inoltre che quest'ultimo induce danno cromosomico, come risultato dal test del micronucleo nelle cellule HCT116. In conclusione, l'E171 ha la capacità di indurre la formazione di ROS in un ambiente privo di cellule e, come le micro e nanoparticelle, ha potenziale genotossico. La capacità dell'E171 di indurre la formazione di ROS e danni al DNA solleva preoccupazioni sui potenziali effetti avversi associati alla sua presenza negli alimenti.

3.4.2 Valutazioni EFSA

Per quanto riguarda lo studio Proquin et al. (2017) il gruppo di esperti dell'EFSA ha osservato che:

- lo studio *in vitro* si aggiunge ad altri che hanno fornito alcune prove circa la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e circa la genotossicità *in vitro* delle micro e nanoparticelle di TiO₂ in diverse linee cellulari di origine umana e animale (roditori); genotossicità che, secondo il gruppo di esperti poteva già essere prevista sulla base della composizione dell'E171 e delle prove esistenti. È stato inoltre evidenziato che, da studi *in vivo* si sono ottenuti risultati complessivamente negativi per quanto riguarda la genotossicità di micro e nanoparticelle di TiO₂ e dell'E171 che non hanno quindi suscitato preoccupazioni;
- due linee cellulari, ottenute da adenocarcinomi del colon umano, sono state utilizzate come modello per studiare la possibile implicazione della generazione di ROS e la genotossicità del TiO₂ nell' induzione del cancro del colon. Sulla base della discussione svoltasi nel corso dell'audizione tecnica, gli esperti hanno osservato che questo modello appare adatto alla caratterizzazione dei pericoli, ma non ai fini della valutazione del rischio;
- cellule indifferenziate di Caco-2, raccolte dopo soli 3 giorni di coltura, sono state utilizzate per la valutazione dei danni al DNA indotti dal TiO₂. Per quanto riguarda il sistema cellulare utilizzato per la caratterizzazione del rischio, gli esperti hanno osservato come un altro recente studio *in vitro* abbia evidenziato una minore incorporazione di TiO₂ in cellule Caco-2 differenziate rispetto alle cellule indifferenziate di Caco-2, e come non sia stata osservata alcuna induzione di danno al DNA in monostrati di cellule Caco-2 differenziate esposte a nanoparticelle di TiO₂ (Vila et al., 2018). Il gruppo di esperti ha anche osservato che in condizioni in vivo, l'assorbimento di particelle di TiO₂ (tra cui E 171) può essere sostanzialmente diminuito dallo strato di muco dell'epitelio intestinale (Garcia-Rodriguez et al., 2018);

- per quanto riguarda la presunta colocalizzazione di TiO₂ (E 171) con "cinetocori, genoma mitotico e alfa-tubulina", il gruppo di esperti ha osservato che non è possibile trarre conclusioni chiare dalle cifre presentate, che possono essere indicative di una vera colocalizzazione e interazione funzionale, oppure derivare da una sovrapposizione non specifica di particelle di TiO₂ su strutture cellulari avvenuta nella preparazione microscopica.

Nel complesso, il gruppo di esperti scientifici ha ritenuto che i risultati riportati da Proquin et al. (2017) possano essere utili per una valutazione della pericolosità delle NP di TiO₂, se si fa riferimento alle condizioni utilizzate nello studio. Tuttavia, non è stata individuata una adeguata rilevanza dei risultati per la valutazione dei rischi riguardo l'additivo alimentare E171.

3.5 Conclusioni

Gli esperti dell'EFSA hanno individuato nei quattro studi analizzati alcune preoccupazioni, ma la presenza di incertezze e l'utilizzo di protocolli poco adeguati per valutare le reali condizioni d'uso dell'E171, limitano la loro rilevanza; ulteriori ricerche sono state quindi ritenute necessarie. In conclusione, il precedente parere dell'EFSA è stato ritenuto ancora valido.

Capitolo 4

VALUTAZIONE DELL'ANSES SULL'E171,2019

In virtù di nuovi studi sull'E171, il 15 aprile 2019 l'ANSES ha pubblicato una rassegna dei rischi legati all'ingestione dell'additivo alimentare biossido di titanio tenendo conto anche del proprio parere espresso nell'aprile 2017, in cui è stato preso in esame, in particolare, lo studio di Bettini et al. (2017). Nel precedente parere l'ANSES era giunta alla conclusione che i dati analizzati non erano sufficienti a mettere in discussione la valutazione del rischio eseguita precedentemente dall'EFSA e che dunque questi non potevano essere utilizzati prima di essere stati confermati da ulteriori studi.

4.1 Nuovo parere ANSES

Per esprimere un nuovo parere circa l'utilizzo dell'additivo E171, l'ANSES, nel 2019, ha istituito un gruppo di esperti che, tra quelle prese in esame, ha ritenuto significative 25 pubblicazioni.

Per quanto riguarda la possibile cancerogenicità del TiO₂, l'ANSES ha tenuto conto di studi come quello di Proquin et al. del 2018, secondo cui sarebbero stati osservati in un modello di iniziazione/inflammation nei topi cambiamenti dell'espressione genica, così come effetti epigenetici dovuti principalmente a variazioni di espressione dell'istone che possono facilitare l'induzione e la promozione di tumore. Tuttavia, per arrivare a conclusioni certe, l'ANSES ritiene che lo studio di Proquin et al., così come gli altri presi in considerazione meriterebbero ulteriori indagini attraverso studi specificamente progettati e condotti.

Per la genotossicità, invece, il parere dell'ANSES si basa, in particolare, su una precedente revisione sistematica di 36 studi condotta da Charles et al. (2018), riguardante appunto la genotossicità *in vitro* del biossido di titanio sotto forma di nanoparticelle. Dalle loro analisi Charles et al. sarebbero giunti alla conclusione che l'effetto genotossico delle nanoparticelle di titanio rilevato *in vitro* è legato ad un meccanismo secondario conseguente allo stress ossidativo, sebbene non si possano escludere effetti genotossici primari.

Per l'ANSES, l'esclusione di una interazione diretta del biossido di titanio con il DNA e l'apparato mitotico meriterebbe di essere approfondita con ulteriori studi. L'ANSES ha poi riportato altri possibili effetti negativi del TiO₂ (possibili effetti sul microbiota intestinale, effetti cardiovascolari, o di infiammazione nei macrofagi) riscontrati in diverse pubblicazioni, senza però considerarli rilevanti per la valutazione della sicurezza dell'additivo alimentare.

Tabella 5: Pubblicazioni analizzate dall'ANSES

Tipo di studio	Autori
Articolo di letteratura	Winkler et al. (2018) Sohal et al. (2018a)
Digestione in vitro	Yusoff et al. (2018a) Yusoff et al. (2018b) Zhang et al. (2019) Sohal et al. (2018b)
Microbiota e barriera intestinale	Radziwill-Bienkowska et al. (2018) Dudefoi et al. (2017) Talbot et al. (2018)
Infiammazione	Riedle et al. (2017)
Genotossicità	Jensen et al. (2019) Gea et al. (2019) Dorier et al. (2018) Dorier et al. (2017) Proquin et al. (2017)
Cancerogenicità	Proquin et al. (2018a) Proquin et al. (2018b) Proquin et al. (2018c)
Tossicità per lo sviluppo	Jovanovic et al. (2018) Savic-Zdravkovic et al. (2018) Ma et al. (2019)
Tossicità cardiovascolare	Jensen et al. (2018a) Jensen et al. (2018b) Freyre-Fonseca et al. (2018)

4.1.2 Conclusioni ANSES

Al termine del suo nuovo studio l'ANSES ha individuato risultati di interesse, nessuno dei quali è però risultato essere sufficiente a fornire una conferma o ad escludere quanto già affermato da Bettini et al. (2017).

L'ANSES ha poi colto l'occasione per ribadire la necessità di nuovi studi, ad esempio per quanto riguarda la genotossicità *in vivo*, e l'esigenza di una precisa caratterizzazione fisico-

chimica del biossido di titanio, dato che questa rappresenterebbe un primo passo per poter effettuare idonee valutazioni sui pericoli dovuti all'E171.

4.2 Parere scientifico EFSA

Sulla base della legislazione secondo cui gli additivi alimentari devono essere costantemente controllati e, se necessario a seguito di nuovi dati scientifici, rivalutati, la Commissione Europea ha chiesto all'EFSA un'analisi del parere dell'ANSES.

Al termine del loro lavoro, gli esperti dell'EFSA hanno potuto stabilire che quanto affermato dall'ANSES nell'aprile 2019 non smentisce le precedenti conclusioni pubblicate nel 2016 e nel 2018 dall'EFSA stessa; vengono invece ribaditi i dubbi e le lacune già messi in evidenza e per i quali sono in atto attività di follow-up. Sulle nuove indagini circa la genotossicità *in vivo* consigliate dall'ANSES, l'EFSA suggerisce di attendere il completamento della caratterizzazione fisico-chimica dell'additivo alimentare.

Capitolo 5

CARATTERIZZAZIONE DELL'E171 E ATTIVITÀ ATTUALMENTE IN CORSO

La necessità di aggiungere limiti per quanto riguarda la dimensione delle particelle di biossido di titanio (E171) nelle specifiche dell'Unione europea (regolamento UE n. 231/2012) era già stata espressa dall'EFSA nel 2016 e successivamente ribadita dall'ANSES nel 2017. In particolare, era stata raccomandata una caratterizzazione completa comprensiva della distribuzione delle dimensioni delle particelle, insieme alla determinazione e quantificazione del materiale nanoparticellare.

Per poter stabilire dei limiti validi la Commissione europea ha dovuto effettuare una richiesta di dati aggiuntivi alle parti interessate, grazie ai quali si è potuto procedere in tal senso.

I dati forniti sono riferiti a sei diversi tipi di E171 che, da quanto detto dagli operatori di settore, sono stati fabbricati dagli unici tre produttori dell'UE. Tra questi, cinque marche commerciali sono di anatasio E171 e una di rutilo E171. La microscopia elettronica e in particolare quella a scansione rappresentano il metodo che ha consentito minori divergenze tra i dati ottenuti da tre diversi laboratori su campioni analoghi. Questi hanno riscontrato, tramite SEM, per i campioni di anatasio E171 un minimo diametro medio di Feret tra 104 e 166 nm e una percentuale numerica di particelle < 100 nm compresa tra 11,4 e 45,6%; per il campione di rutilo, un minimo diametro medio di Feret di 151 nm e una percentuale numerica di particelle <100 nm del 5,4%.

Ulteriori analisi sono poi state condotte attraverso microscopia elettronica a trasmissione (TEM), microscopia elettronica a scansione e trasmissione (STEM), centrifuga a disco a raggi X (XDC) o centrifuga a disco (DC). Per quanto riguarda le tecniche basate sulla misura della massa o del volume, come XDC e DC, è stata riscontrata una loro elevata dipendenza dal metodo utilizzato e dall'energia di dispersione; pertanto nel determinare le specifiche dell'E171 si è deciso di non basarsi su tali metodi.

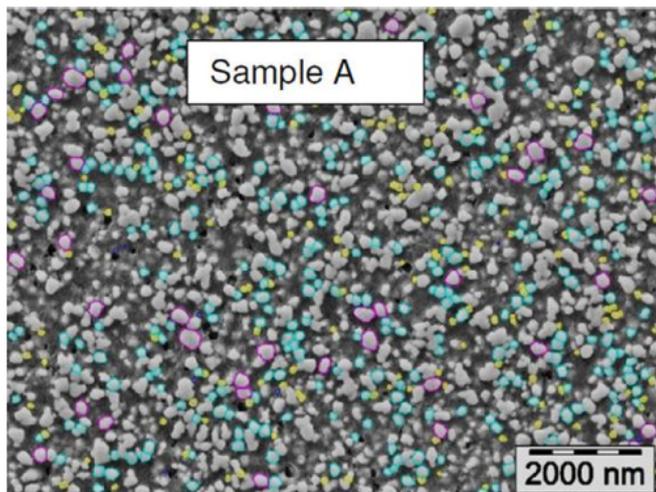


Figura 4: Esempio immagine SEM dell'E171 ottenuta dal laboratorio n.1

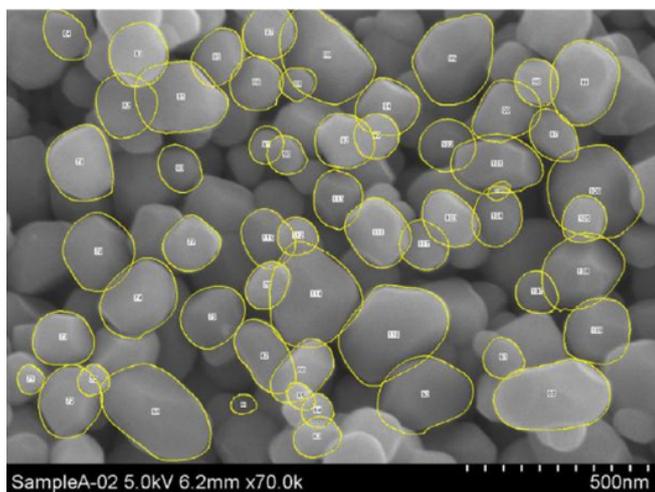


Figura 5: Esempio immagine SEM dell'E171 ottenuta dal laboratorio n.2

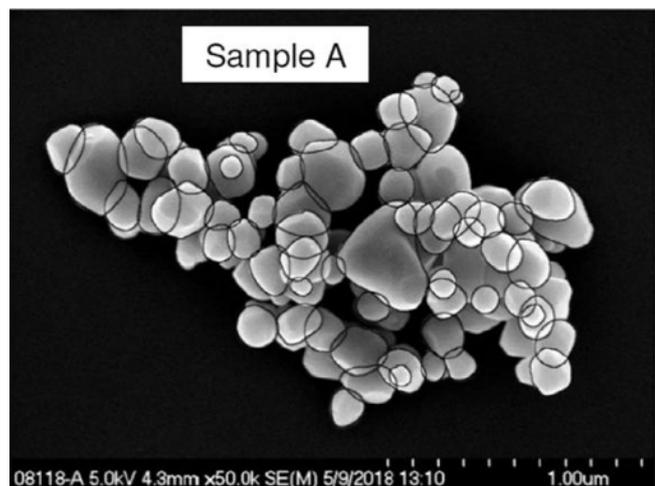


Figura 6: Esempio immagine SEM dell'E171 ottenuta dal laboratorio n.3

Gli operatori di settore interessati hanno proposto di introdurre, nelle specifiche dell'UE per l'E171, un minimo diametro medio di Feret superiore a 100 nm e un valore inferiore al 50% per quanto riguarda la percentuale di particelle costituenti con dimensione inferiore a 100 nm; in entrambi i casi il metodo utilizzato per la misurazione è rappresentato dalla microscopia elettronica. Nonostante la rilevazione di problematiche legate alle metodiche di preparazione dei campioni per la microscopia elettronica utilizzate dai tre laboratori sopraccitati e all'inclusione delle incertezze determinate dalle variabili di produzione e misurazione, l'EFSA è giunta alla conclusione che le specifiche proposte dalle parti interessate risultano idonee. Analizzando con attenzione le due specifiche si può notare come queste siano in realtà equivalenti in quanto un valore medio della dimensione esterna minima che sia maggiore di 100 nm implica che la percentuale di particelle con una dimensione esterna minima maggiore di 100 nm è superiore al 50%.

Tabella 6: Caratterizzazione dell'E171 realizzata dall'EFSA

Dimensione delle particelle che costituiscono il biossido di titanio (E 171) come additivo alimentare	Misurazione con microscopia elettronica
Dimensione esterna minima media (nm)	Più di 100 nm

Attualmente il regolamento UE n. 231/2012 che definisce le specifiche degli additivi alimentari non è ancora stato modificato conformemente alle raccomandazioni EFSA.

5.1 Attività in corso

La caratterizzazione dell'E171 non elimina le perplessità individuate nelle precedenti valutazioni relative all'additivo alimentare.

A questo proposito sono attualmente in corso nuovi test di tossicità che sembrerebbero in grado di ridurre il livello di incertezza per quanto riguarda i possibili effetti del biossido di titanio (E171) sulla salute dell'uomo. Troviamo ad esempio uno studio dietetico subcronico (100 giorni) condotto con E171 per valutare il suo potenziale di iniziazione/promozione di tumore, problema sollevato da Bettini et al. e uno studio tossicocinetico con E171 per indagare la cinetica, la distribuzione nei tessuti e l'escrezione.

In particolare, uno studio EOGRT che utilizza biossido di titanio (E171) ben caratterizzato, ovvero con una percentuale massima di nanoparticelle che rispetta le specifiche proposte è attualmente in corso.

CONCLUSIONI

Data la mancanza di studi condotti utilizzando E171 adeguatamente caratterizzato e/o eseguiti in condizioni rappresentative di quelle in cui l'E171 si trova nell'organismo non è stato possibile sino ad oggi effettuare affermazioni concrete per quanto riguarda gli effetti dell'additivo sulla salute umana. In attesa di tali studi il governo francese, viste le incertezze ancora irrisolte, ha sospeso con un'ordinanza del 17/04/2019 la possibilità di commercializzare sul proprio territorio prodotti alimentari contenenti E171 per il periodo di un anno a partire dal 1° gennaio 2020 e ha rinnovato le raccomandazioni generali sui nanomateriali, suggerendo di limitare l'esposizione dei lavoratori, dei consumatori e dell'ambiente a queste sostanze e di promuovere alternative sicure ed equivalenti in termini di efficienza. In Italia, sempre sulla base del principio di precauzione, l'associazione Altroconsumo ha inviato al Ministero della Salute, la richiesta di sostenere l'esempio francese e spingere affinché la Commissione europea presenti una proposta legislativa che rimuova l'E171 dall'elenco UE degli additivi alimentari autorizzati. La crescente pressione dell'opinione pubblica e politica ha convinto molti produttori e distributori operanti in Francia ad eliminare l'E171 dalle loro produzioni e altri stanno seguendo la stessa strada. Diversi alimenti, solitamente contenenti l'E171, sono stati rapidamente riformulati per eliminarlo. Il fenomeno si sta espandendo oltre i confini europei, e molte grandi multinazionali hanno promesso di rimuovere l'E171 dai loro prodotti.

BIBLIOGRAFIA

- 1: Ahmed Esmail Shalan, Ahmed Mourtada Elseman and Mohamed Mohamed Rashad, 2018. Controlling the Microstructure and Properties of Titanium Dioxide for Efficient Solar Cells. <https://cdn.intechopen.com/pdfs/59085.pdf>
- 2: Official Journal of the European Union, 2011. Recommendation on the definition of a nanomaterial. https://ec.europa.eu/research/industrial_technologies/pdf/policy/commission-recommendation-on-the-definition-of-nanomater-18102011_en.pdf
- 3: Biossido di titanio. <https://www.chimicamo.org/chimica-generale/biossido-di-titanio.html>
- 4: Marie-Hélène Ropers, Hélène Terrisse, Muriel Mercier-Bonin and Bernard Humbert, 2016. Titanium Dioxide as Food Additive. <https://www.intechopen.com/books/application-of-titanium-dioxide/titanium-dioxide-as-food-additive>
- 5: Serena Randazzo, Anna Caronia, Michele A. Floriano. Diossido di titanio e alcune sue applicazioni. <https://iris.unipa.it/retrieve/handle/10447/223910/406393/Diossido%20di%20titanio%20e%20alcune%20sue%20applicazioni.pdf>
- 6: Boris Jovanovic, 2014. Critical Review of Public Health Regulations of Titanium Dioxide, a Human Food Additive. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4309481/>
- 7: Sophie Boutillier, Sophie Fourmentin, Blandine Laperche, 2020. Food additives and the future of health: An analysis of the ongoing controversy on titanium dioxide.
- 8: EFSA Journal, 2016. Re-evaluation of titanium dioxide (E 171) as a food additive.
- 9: EFSA, 2018. Evaluation of four new studies on the potential toxicity of titanium dioxide used as a food additive (E 171).
- 10: Bettini, S., Boutet-Robinet, E., Cartier, C. *et al.*, 2017. Food-grade TiO₂ impairs intestinal and systemic immune homeostasis, initiates preneoplastic lesions and promotes aberrant crypt development in the rat colon.

- 11: Héloïse Proquin, Carolina Rodríguez-Ibarra, Carolyn G. J. Moonen, Ismael M. Urrutia Ortega, Jacob J. Briedé, Theo M. de Kok, Henk van Loveren and Yolanda I. Chirino, 2016. Titanium dioxide food additive (E171) induces ROS formation and genotoxicity: contribution of micro and nano-sized fractions.
- 12: Zhongyuan Guo, Nicole J Martucci, Fabiola Moreno-Olivas, Elad Tako, Gretchen J Mahler, 2017. Titanium dioxide nanoparticle ingestion alters nutrient absorption in an in vitro model of the small intestine.
- 13: Heringa, Minne & Geraets, Liesbeth & van Eijkeren, Jan & Vandebriel, Rob & Jong, Wim H & Oomen, Agnes, 2016. Risk assessment of titanium dioxide nanoparticles via oral exposure, including toxicokinetic considerations.
- 14: EFSA, 2019. Statement on the review of the risks related to the exposure to the food additive titanium dioxide (E 171) performed by the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety (ANSES)
- 15: ANSES, 2017. Avis de l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à une demande d'avis relatif à l'exposition alimentaire aux nanoparticules de dioxyde de titane.
- 16: Proquin H, Jetten MJ, Jonkhout MCM, Garduno-Balderas LG, Briede JJ, de Kok TM, Chirino YI and van Loveren H, 2018. Gene expression profiling in colon of mice exposed to food additive titanium dioxide (E171).
- 17: Charles S, Jomini S, Fessard V, Bigorgne-Vizade E, Rousselle C and Michel C, 2018. Assessment of the in vitro genotoxicity of TiO₂ nanoparticles in a regulatory context.
- 18: EFSA, 2019. Scientific opinion on the proposed amendment of the EU specifications for titanium dioxide (E 171) with respect to the inclusion of additional parameters related to its particle size distribution.
- 19: Additivi e nanomateriali: Biossido di titanio (E171) e Biossido di silicio (E551).
<http://www.food-advisory.it/additivi-e-nanomateriali-biossido-di-titanio-e171-e-biossido-di-silicio-e551/>

20: Biossido di titanio (E171): la Francia annuncia il divieto di commercializzazione dei prodotti che lo contengono. <https://www.altroconsumo.it/alimentazione/sicurezza-alimentare/news/biossido-titanio-additivo-e171>

21: Altroconsumo, 2019. Bando del biossido di titanio. <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwja6KWA3PXrAhXCsKQKHXIADAKQFjACegQIBxAB&url=https%3A%2F%2Fwww.altroconsumo.it%2Forganizzazione%2F-%2Fmedia%2Flobbyandpressaltroconsumo%2Fimages%2Fin-azione%2Frichieste-alle-istituzioni%2Fbando%2520del%2520biossido%2520di%2520titanio%2520e171%2520da%2520elenco%2520ue%2520degli%2520additivi%2520alimentari%2520autorizzati%2Frichiesta%2520bando%2520del%2520biossido%2520di%2520titanio.pdf%3Frev%3Ded318677-7067-4e58-a401-3a75af7e25ee&usg=AOvVaw25sTNI8AAAnZ4Nvx8j3S-VZ>