



# RAPPORTI ISTISAN 20|20<sub>Rev</sub>

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

**VI Congresso nazionale**

## **Micotossine e tossine vegetali nella filiera agro-alimentare**

**Nobile Collegio Chimico Farmaceutico,  
Roma, 10 giugno 2019**

**Istituto Superiore di Sanità  
Roma, 11-12 giugno 2019**

**ATTI**

A cura di C. Brera



EPIDEMIOLOGIA  
E SANITÀ PUBBLICA



**ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ**

**VI Congresso Nazionale  
Micotossine e tossine vegetali  
nella filiera agro-alimentare**

**Nobile Collegio Chimico Farmaceutico,  
Roma, 10 giugno 2019  
Istituto Superiore di Sanità  
Roma, 11-12 giugno 2019**

**ATTI**

A cura di Carlo Brera

*Dipartimento Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria*

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

**Rapporti ISTISAN  
20/20 Rev.**

Istituto Superiore di Sanità

**VI Congresso Nazionale. Micotossine e tossine vegetali nella filiera agro-alimentare. Nobile Collegio Chimico Farmaceutico, Roma, 10 giugno 2019; Istituto Superiore di Sanità, Roma, 11-12 giugno 2019. Atti.**

A cura di Carlo Brera

2020, iii, 144 p. Rapporti ISTISAN 20/20 Rev. (in italiano e in inglese)

Il rapporto contiene gli atti del VI congresso sulle micotossine nella filiera agroalimentare che ha ospitato esperti che hanno presentato le più recenti evidenze scientifiche derivanti da progetti di ricerca, dalla gestione di situazioni di emergenza lungo l'intera filiera agro-alimentare nonché dall'adeguamento delle attività di (auto) autocontrollo alla nuova normativa vigente. A differenza delle precedenti edizioni, si è ritenuto di estendere la tematica anche alle tossine vegetali, ciò a seguito della costituzione di un nuovo laboratorio comunitario di riferimento unificato per micotossine e tossine vegetali. Sin dal 2004, il Congresso si è tenuto presso l'Istituto Superiore di Sanità con frequenza media biennale, rappresentando un'opportunità per i ricercatori e in generale tutti gli operatori del Servizio Sanitario Nazionale e della filiera agroalimentare per confrontarsi in base alle proprie esperienze.

*Parole chiave:* Micotossine; Tossine vegetali; Valutazione del rischio; Valutazione dell'esposizione; Metodi di analisi; Campionamento

Istituto Superiore di Sanità

**6th National Congress. Mycotoxins and plant toxins in agri-food chain. Nobile Collegio Chimico Farmaceutico, Rome, June 10, 2019; Istituto Superiore di Sanità, Rome, June 11-12, 2019. Proceedings.**

Edited by Carlo Brera

2020, iii, 144 p. Rapporti ISTISAN 20/20 Rev. (in Italian and in English)

This volume contains the proceedings of the 6<sup>th</sup> Congress on mycotoxins in agri-food chain. It involved the major experts, who presented the most recent scientific evidences deriving from research projects outputs, the management of emergency situations and the alignment of the own-check and official control activities to the new current legislation. Differently from the previous editions, it was decided to extend the topics also to the plant toxins, this in consideration of the new European Union Reference Laboratory that gathered Mycotoxins and plant toxins in the same organization. Since 2004 the National Congress has been held at the Istituto Superiore di Sanità (ISS, the National Institute of Health in Italy) with a two-year frequency, on average. This scientific event is an opportunity for researchers and stakeholders for discussing the effect of mycotoxins and plant toxins occurrence on economics, agriculture, industry, safety and legislation.

*Key words:* Mycotoxins; Plant toxins; Risk analysis; Exposure assessment; Analysis; Sampling

Per informazioni su questo documento scrivere a: [carlo.brera@iss.it](mailto:carlo.brera@iss.it)

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: [www.iss.it](http://www.iss.it)

Citare questo documento come segue:

Brera C (Ed.). *VI Congresso Nazionale. Micotossine e tossine vegetali nella filiera agro-alimentare. Nobile Collegio Chimico Farmaceutico, Roma, 10 giugno 2019; Istituto Superiore di Sanità, Roma, 11-12 giugno 2019. Atti.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporti ISTISAN 20/20 Rev.).

---

Legale rappresentante dell'Istituto Superiore di Sanità: *Silvio Brusaferrò*

Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 114 (cartaceo) e n. 115 (online) del 16 maggio 2014

Direttore responsabile della serie: *Paola De Castro*

Redazione: *Sandra Salinetti e Manuela Zazzara*

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori, che dichiarano di non avere conflitti di interesse.

# INDICE

<b>Presentazione</b> .....	v
----------------------------	---

## SESSIONE. Metodi di analisi

---

<b>Valutazione e confronto delle caratteristiche analitiche di test rapidi per la determinazione dell'aflatossina M<sub>1</sub> nel latte</b> <i>Natascia Guarducci, Christoph von Holst, Ivan Pecorelli, Rita Bibi, Michelangelo Pascale, Biancamaria Ciasca, Antonio F. Logrieco, Veronica M.T. Lattanzio</i> .....	3
<b>Materiali di riferimento certificati per l'analisi delle micotossine</b> <i>Giovanna Zappa</i> .....	7
<b>Determinazione della moniliformina mediante cromatografia con ioni LA3+ in fase mobile</b> <i>Terenzio Bertuzzi, Silvia Rastelli, Annalisa Mulazzi, Amedeo Pietri</i> .....	18
<b>Analytical methodology to determine the fate of DEOXYNIVALENOL during the production of bakery products</b> <i>David Stadler, Francesca Lambertini, Christoph Bueschl, Rainer Schuhmacher, Elisa Cavandoli, Franz Berthiller, Michele Suman, Rudolf Krska</i> .....	25
<b>Immunosaggi basati sulla polarizzazione di fluorescenza per la determinazione di tossine di <i>Fusarium</i> e loro forme modificate in frumento</b> <i>Vincenzo Lippolis, Anna C.R. Porricelli, Erminia Mancini, Veronica M.T. Lattanzio, Biancamaria Ciasca, Annalisa De Girolamo, Sarah De Saeger, Chris M. Maragos, Susan McCormick, Peiwu Li, Antonio F. Logrieco, Michelangelo Pascale</i> .....	28
<b>Validazione di un metodo ELISA quantitativo per la ricerca di aflatossina M<sub>1</sub> nelle matrici latte, formaggio e burro</b> <i>Alberto Biancardi, Alessandro Moretti</i> .....	33
<b>Confronto tra il metodo ELISA e UPLC/FLD per la determinazione di T-2 ed HT-2 nei cereali</b> <i>Paola D'Agnello, Carlo Brera, Francesca Debegnach, Luigi Urbano, Antonello Curiale, Cinzia Franchino, Rita De Pace</i> .....	40
<b>Analisi di micotossine e tossine vegetali in alimenti e mangimi: cosa e come dovremmo monitorare?</b> <i>Emiliano De Dominicis, Michela Casarotto, Carmela Martire, Claudia Finotello, Simone Carron, Samim Saner, Fernando Formaggio</i> .....	51
<b>Spettroscopia infrarossa per l'analisi rapida di campioni di frumento e crusca contaminati da micotossine</b> <i>Annalisa De Girolamo, Marina Cortese, Christoph von Holst, Michelangelo Pascale, Francesco Longobardi, Lucia Catucci, Antonio F. Logrieco, Porricelli Anna C.R., Vincenzo Lippolis</i> .....	61
<b>Metodo veloce di analisi multiresiduale di micotossine in alimenti e mangimi</b> <i>Gian Piero Luciani, Laura De Cesare, Cristina Francion</i> .....	66

## SESSIONE. Gestione del rischio

---

<b>Funghi micotossigeni e micotossine nel riso italiano in campo e durante lo stoccaggio</b> <i>Terenzio Bertuzzi, Silvia Rastelli, Annalisa Mulazzi, Marco Romani, Paola Giorni</i> .....	73
<b>Rischio micotossine: analisi dei più moderni sistemi di gestione per la sicurezza alimentare</b> <i>Daniela Maurizi</i> .....	77
<b>Aflatossina M<sub>1</sub> nei prodotti lattiero-caseari: individuazione dei criteri per la definizione dei fattori di concentrazione</b> <i>Gilberto Giangolini, Andrea Valiani</i> .....	81
<b>Strategie operative per la mitigazione del rischio da micotossine: criticità e progressi</b> <i>Amedeo Reyneri, Massimo Blandino, Valentina Scarpino</i> .....	85
<b>Innovazioni per il controllo delle micotossine nei cereali</b> <i>Massimo Blandino, Valentina Scarpino, Michael Sulyok, Francesca Vanara, Amedeo Reyneri</i> .....	90
<b>Ripartizione delle micotossine normate ed emergenti durante la molitura del mais</b> <i>Valentina Scarpino, Francesca Vanara, Michael Sulyok, Amedeo Reyneri, Massimo Blandino</i> .....	97
<b>Rischio micotossine: una possibile soluzione per il mais</b> <i>Rolando Manfredini</i> .....	101
<b>Micotossine e tossine vegetali: criticità nel settore molitorio</b> <i>Lorenzo Cavalli</i> .....	104
<b>Rete Qualità Mais</b> <i>Sabrina Locatelli, Stefania Mascheroni, Chiara L Lanzanova, Nicola Pecchioni</i> .....	112
<b>Tossine dell'<i>Alternaria</i> spp. nel frumento: effetti della digestione anaerobica e BMP</b> <i>Gabriella Aureli, Angela Iori, Claudio Fabbri, Francesco Gallucci, Mariangela Soldano</i> .....	117
<b>Studio del comportamento del mais contaminato da aflatossine in digestione anaerobica</b> <i>Mariangela Soldano, Sergio Piccinini, Francesco Gallucci, Claudio Fabbri</i> .....	125
<b>Riduzione della contaminazione da micotossine nel mais mediante pulizia della granella su scala industriale</b> <i>Michelangelo Pascale, Katarina Slettengren, Anna N. Vega, Vincenzo Lippolis, Salvatore Cervellieri, Annalisa De Girolamo, Veronica M.T. Lattanzio, Biancamaria Ciasca, Antonio F. Logrieco</i> .....	129

## SESSIONE. Valutazione del rischio

---

<b>Percezione del rischio del consumatore alle micotossine e alle tossine naturali</b> <i>Agostino Macrì, Martina Bernardi</i> .....	135
<b>Valutazione dell'esposizione del consumatore alle micotossine: analisi dei dati NSIS 2016-2017</b> <i>Carlo Brera, Emanuela Gregori, Francesca Debegnach e Barbara De Santis</i> .....	138

## PRESENTAZIONE

La sesta edizione del Congresso Nazionale sulle Micotossine ha previsto l'estensione della tematica anche alle tossine vegetali che sono state accomunate alle micotossine in un unico laboratorio comunitario di riferimento.

Ci è sembrato quindi opportuno raccogliere i primi contributi scientifici anche su tale classe di contaminanti agricoli, anche in vista della designazione dell'omologo Laboratorio Nazionale di Riferimento.

Come consuetudine si sono selezionati quei contributi sia orali che come poster caratterizzati dalla trattazione delle varie tematiche da un punto di vista pragmatico in modo tale da fornire risposte adeguate e mirate ai differenti operatori sanitari sia pubblici che privati che operano sul territorio nelle varie filiere agro-alimentari, tra cui spicca quella cerealicola in quanto maggiormente interessata alla contaminazione da micotossine e tossine vegetali. Per quanto detto, è stato dato largo spazio a quei contributi contraddistinti da tecniche innovative di controllo delle tossine sul campo, da metodi innovativi di rilevazione rapida, da soluzioni tecnologiche finalizzate alla mitigazione delle contaminazioni, da strategie mirate di sicurezza alimentare, e non ultimo dall'aggiornamento sulla reale percezione del rischio da parte del consumatore.

Gli argomenti citati sono stati suddivisi in tre sessioni: Metodi di analisi, Gestione del Rischio e Valutazione del rischio.

Nella sessione "Metodi di analisi" sono state presentate le più moderne tecniche di rilevazione delle tossine con prevalenza delle tecniche ifenate. L'orientamento generale nell'adozione delle tecniche analitiche è ormai sempre più orientato verso la determinazione multi-residuale nei diversi prodotti della filiera agro-alimentare.

Nella sessione "Gestione del rischio", sono state illustrate le varie attività di prevenzione e autocontrollo che i diversi operatori del sistema alimentare utilizzano comunemente nelle varie fasi di produzione, dalle attività nel settore primario a quelle specificatamente utilizzate nei processi di prima e seconda trasformazione.

Infine, nella sessione "Valutazione del rischio" sono state presentate varie sfaccettature della tematica tra cui la Valutazione dell'esposizione del consumatore alle micotossine, relativamente agli anni 2016-2017 sia la percezione del rischio da parte del consumatore.

*Il curatore*





**SESSIONE**  
**Metodi di analisi**



# VALUTAZIONE E CONFRONTO DELLE CARATTERISTICHE ANALITICHE DI TEST RAPIDI PER LA DETERMINAZIONE DELL'AFLATOSSINA M<sub>1</sub> NEL LATTE

Nataschia Guarducci (a), Christoph von Holst (b), Ivan Pecorelli (c), Rita Bibi (c),  
Michelangelo Pascale (a), Biancamaria Ciasca (a), Antonio F. Logrieco (a), Veronica M.T. Lattanzio (a)  
(a) Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari, Italia  
(b) European Commission, DG Joint Research Centre, Geel, Belgio  
(c) Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche "Togo Rosati", Perugia, Italia

## Introduzione

L'aflatossina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>, IARC gruppo 1) è un contaminante dei mangimi che pertanto rappresentano una potenziale fonte di esposizione al rischio per gli animali da allevamento, e di conseguenza per l'uomo.

I dati della *European Food Safety Authority* (EFSA) indicano che il latte è l'unico alimento di origine animale in cui si osserva un *carry over* significativo della AFB<sub>1</sub>, dove si ritrova nella sua forma de-idrossilata, l'aflatossina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>).

La presenza di AFM<sub>1</sub> nel latte di vacca, ma anche di bufala, capra, pecora, può essere considerata un indice della vulnerabilità della filiera. La normativa vigente in ambito comunitario fissa un limite massimo consentito di 50 ng/kg per l'AFM<sub>1</sub> nel latte e di 25 ng/kg negli alimenti per lattanti (1).

In Italia inoltre, le linee guida del Ministero della Salute (2) indicano un livello di attenzione pari a 0,040 µg/kg. Quando questo valore viene superato l'operatore deve informare l'autorità competente entro 12 ore e proporre un'azione correttiva.

L'entrata in vigore del Regolamento comunitario e più generalmente i requisiti richiesti nel settore della contrattualistica, che vincolano i lotti a contenuti definiti di AFM<sub>1</sub>, rende necessario effettuare numerosi controlli per verificare la conformità del latte. Esiste pertanto la necessità da parte degli operatori del settore lattiero/caseario di dotarsi di strumenti di autocontrollo, per ottenere in tempi brevi indicazioni quantitative sulla eventuale contaminazione, consentendo un rapido processo decisionale.

Quando validati in accordo con linee guida ufficiali, come quelle definite nel Regolamento (UE) 519/2014 (3), i metodi di screening semiquantitativo possono essere utilizzati a supporto del già consolidato sistema europeo dei controlli per la sicurezza alimentare, che è basato principalmente su tecniche sofisticate che richiedono strumentazione costosa e personale esperto.

Obiettivo di questo studio è stato quello di valutare e confrontare le prestazioni analitiche degli immunosaggi commerciali attualmente più diffusi per la determinazione rapida dell'AFM<sub>1</sub> nel latte, ovvero test immunocromatografici a flusso laterale (*Lateral Flow Device*, LFD) e test enzimatici (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA).

## Materiali e metodi

### Saggio immunocromatografico

Il saggio immunocromatografico utilizzato in questo studio (AFLA M<sub>1</sub>-V, Vicam, a Waters Business) è basato sull'approccio competitivo indiretto. L'intensità del colore sviluppato in corrispondenza della linea test (T) e della linea di controllo (C) viene misurata da un lettore ottico. Il rapporto T/C viene convertito in concentrazione di AFM<sub>1</sub> (µg/kg) attraverso una curva di calibrazione fornita dal produttore. Per le analisi, 200 µL di latte vengono aggiunte alla fiala contenente i reagenti e posti sotto agitazione su un vortex per 15 secondi. Quindi viene inserito lo strip dopo aver posizionato la fiala in un incubatore. Il campione viene lasciato migrare per 10 min, a 40°C. Dopo la corsa, lo strip viene immediatamente posizionato all'interno del lettore per la lettura e l'interpretazione del risultato.

### Saggio ELISA

Per le analisi ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) è stato utilizzato il test *I'screen AFLA M<sub>1</sub> milk* (Tecna, Eurofins). Per le analisi, 100 µL di latte vengono aggiunti nel pozzetto e incubati per 45 min a temperatura ambiente. Dopo il lavaggio del pozzetto si procede con l'aggiunta di 100 µL di soluzione di coniugato AFM<sub>1</sub>-enzima, seguita da una incubazione per 15 min. Segue un secondo lavaggio del pozzetto e l'aggiunta della soluzione di substrato per lo sviluppo del colore. Dopo un tempo di incubazione di 15 min si procede con l'aggiunta della soluzione di stop. I risultati vengono letti mediante un lettore di micropiastre ELISA.

## Risultati e discussione

Le prestazioni analitiche quali precisione (ripetibilità e precisione intermedia), valore soglia (*cut-off*), percentuale di falsi sospetti e falsi negativi sono state valutate per ciascun immunosaggio attraverso uno studio di validazione effettuato a livelli di AFM<sub>1</sub> di 0, 25, 50, 75 ng/kg, fissando la concentrazione bersaglio (*Screening Target Concentration*, STC) a 50 ng/kg. Gli esperimenti di validazione sono stati organizzati secondo un disegno Nested, suddivisi in 2 giorni, utilizzando campioni di latte di vacca proveniente da 3 diversi produttori, analizzati in condizioni di ripetibilità. Il disegno sperimentale è stato ripetuto per i 4 livelli di concentrazione suddetti. I risultati sono riportati in Tabella 1.

I due immunosaggi hanno mostrato caratteristiche analitiche simili in termini di *cut-off* (37,7 ng/kg e 39,4 ng/kg per LFD e ELISA rispettivamente), percentuale di falsi sospetti per campioni non contaminati (< 0,1% in entrambi i test) e falsi negativi per campioni contenenti AFM<sub>1</sub> a valori al di sopra della STC (0,3 % per entrambi i test). La percentuale di falsi sospetti per campioni contaminati a 25 ng/kg (25% della STC) è risultata di 3% e 23% per LFD e ELISA rispettivamente. Valori confrontabili sono stati ottenuti anche per la precisione intermedia (espressa come deviazione standard relativa, RSD<sub>R</sub>), che per tutti i livelli di validazione è risultata essere ≤ 19% per LFD e ≤ 24 per ELISA.

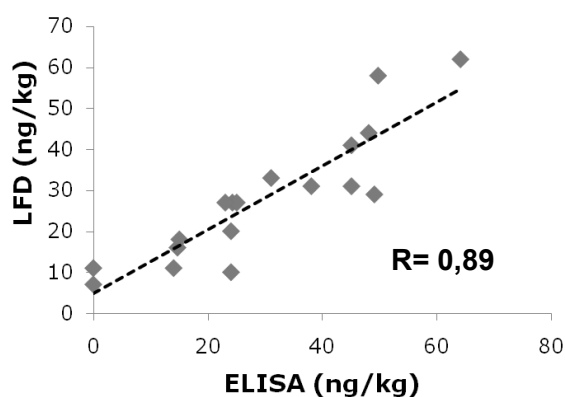
I due immunosaggi validati sono stati confrontati nell'analisi di campioni di latte di vacca contaminati da AFM<sub>1</sub> nell'intervallo compreso tra n.d. (< 0,5 ng/kg) e 60 ng/kg (Figura 1).

**Tabella 1. Caratteristiche analitiche degli immunosaggi, determinate in accordo con le linee guida descritte nel Regolamento (UE) 519/2014**

Campioni	Caratteristiche	LFD	ELISA
Bianchi	Risposta media (ng/kg)	4,2	3,9
	RSD <sub>r</sub> * (%)	93	31
	RSD <sub>R</sub> ** (%)	140	53
	Tasso di Falsi Sospetti (%)	0,0	0,0
50% STC (25 ng/kg)	Risposta media (ng/kg)	23,2	33,4
	RSD <sub>r</sub> (%)	26	12
	RSD <sub>R</sub> (%)	32	24
	Tasso di Falsi Sospetti (%)	3	25
STC (50 ng/kg)	Risposta media (ng/kg)	53,1	65,4
	RSD <sub>r</sub> (%)	12	24
	RSD <sub>R</sub> (%)	17	24
150% STC (75 ng/kg)	Risposta media (ng/kg)	85,6	128,7
	RSD <sub>r</sub> (%)	16	21
	RSD <sub>R</sub> (%)	19	22
	Tasso di Falsi Negativi (%)	0,4	0,2
CUT OFF (ng/kg)		37,7	39,7

\*RSD<sub>r</sub>: deviazione standard relativa delle misure effettuate in condizioni di ripetibilità

\*\*RSD<sub>R</sub>: deviazione standard relativa delle misure effettuate in condizioni di precisione intermedia



**Figura 1. Correlazione tra i risultati ottenuti, per un set di campioni di latte di vacca naturalmente contaminati da AFM<sub>1</sub>, mediante analisi LFD e ELISA**

È stato inoltre osservato un buon accordo tra i risultati ottenuti con i due immunosaggi validati e quelli ottenuti con la metodica di riferimento riportata nei metodi ufficiali dell'AOAC (4) relativamente all'analisi di campioni di latte di vacca contaminati da AFM<sub>1</sub> nell'intervallo compreso tra n.d. (< 0,5 ng/kg) e 60 ng/kg.

## Conclusioni

Nel corso di questo studio sono state valutate e confrontate le prestazioni analitiche degli immunosaggi commerciali attualmente più diffusi per la determinazione rapida dell'AFM<sub>1</sub> nel latte, ovvero test immunocromatografici a flusso laterale (LFD) e test enzimatici (ELISA). I due saggi, sottoposti a validazione in accordo con le linee guida definite nel Regolamento (UE) 519/2014, hanno mostrato caratteristiche analitiche soddisfacenti confermando la loro idoneità allo scopo di effettuare misure in autocontrollo per la determinazione rapida dell'AFM<sub>1</sub> nel latte a livelli di contaminazione prossimi ai limiti massimi ammissibili. Infine occorre considerare che negli ambiti di applicazione dei metodi di screening semiquantitativo, la valutazione della idoneità allo scopo include non solo le suddette prestazioni analitiche, ma anche parametri di natura pratica come rapidità, facilità di implementazione da parte di utenti inesperti. Per esempio per quanto riguarda i tempi di analisi, il test ELISA richiede circa 80 minuti ma consente di analizzare fino a 96 campioni contemporaneamente, risultando quindi più idoneo per laboratori che gestiscono un numero molto elevato di campioni al giorno. Al contrario il test LFD è particolarmente appropriato a laboratori che gestiscono un numero minore di campioni (i test si eseguono uno alla volta) ma necessitano di risposte in pochi minuti. Per quanto riguarda la portabilità, il test LFD è dotato di lettore portatile e curva di calibrazione sotto forma di QR code, pertanto può essere effettuato anche in stalla, mentre il test ELISA richiede un minimo di attrezzatura da laboratorio, inoltre la costruzione della curva di calibrazione è affidata all'operatore. A parità di prestazioni analitiche, la scelta del test più appropriato è da effettuarsi sulla base di esigenze specifiche dell'operatore.

## Bibliografia

1. Europa. Regolamento (CE) n. 1881/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006, che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L 364 del 20.12.2006.
2. Italia. Ministero della Salute. Contaminazione da aflatossine nel mais e nella catena alimentare. *Nota prot. 0000855-P-16/01/2003*.
3. Europa. Regolamento (UE) N. 519/2014 della Commissione del 16 maggio 2014 che modifica il regolamento (CE) n. 401/2006 per quanto riguarda i metodi di campionamento per le grandi partite, per le spezie e gli integratori alimentari, i criteri di rendimento per le tossine T-2 e HT-2 e per la citrinina, nonché i metodi di analisi di screening. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L147/29 del 17.05.2014.
4. Analysis of Official Analytical Chemists. AOAC Official Method 2000.08-2004. In: *Aflatoxin M1 in Liquid Milk. Immunoaffinity Column by Liquid Chromatography*. Rockville, MD: AOAC International; 2004. p. 1-3.

# MATERIALI DI RIFERIMENTO CERTIFICATI PER L'ANALISI DELLE MICOTOSSINE

Giovanna Zappa

*Divisione Biotecnologie e Agroindustria, Dipartimento Sostenibilità dei Sistemi Produttivi e Territoriali,  
ENEA Casaccia Roma, Italia*

## Introduzione

Da diversi anni la chimica e la biologia sono entrate con pieni diritti nel mondo della metrologia con grandi benefici, per questi settori in termini di affidabilità e comparabilità dei dati e per la scienza delle misure in termini di maggiore apertura e avvicinamento al vasto mondo delle misure, su cui oggi sempre più si fondano sicurezza, sostenibilità e innovazione.

I materiali di riferimento hanno rappresentato l'elemento chiave per applicare i criteri e i principi metrologici alle misure chimiche e biologiche.

Il concetto di materiale di riferimento certificato si è andato via via evolvendo per adeguarsi anche a questi nuovi settori, come si sta evolvendo lo stesso concetto di misurazione, che da prerogativa solo delle grandezze (da sempre definite come proprietà misurabili) sta per trovare applicazione anche alle proprietà classificatorie. I problemi che dovremo affrontare e risolvere in termini di riferibilità, incertezza di misura e realizzazione di materiali di riferimento certificati saranno molto grandi, ma quello che è richiesto oggi è soprattutto vivere in maniera attiva, dinamica e consapevole questo cambiamento.

Si è ritenuto utile – per meglio trattare il tema dei materiali di riferimento e della loro “certificazione” – includere nel presente lavoro una breve panoramica sulle recenti evoluzioni della metrologia e su quella che è stata l'esperienza e il contributo italiano al diffondersi della cultura metrologica nel settore delle analisi chimiche e biologiche e quindi all'impiego dei materiali di riferimento. Dopo aver presentato la disponibilità attuale di materiali di riferimento per l'analisi di micotossine, vengono discussi i risultati di un recente studio di fattibilità per la realizzazione di nuovi RM.

## Approccio metrologico alle analisi chimiche e biologiche ed evoluzione del concetto di misurazione

Negli ultimi anni abbiamo assistito a profondi cambiamenti nella Metrologia, tra cui i più significativi sono stati il passaggio da *Error Approach* a *Uncertainty Approach* (1-3) e la progressiva sostituzione dei campioni materiali delle unità di misura (come per esempio il campione del chilogrammo conservato a Sèvres) con definizioni basate su Costanti Universali. In particolare quest'ultimo cambiamento ha aperto una serie di riflessioni che riguardano anche la comunicabilità e comprensibilità sociale del nuovo Sistema Internazionale di unità basato su costanti (4).

Parallelamente, l'allargamento della metrologia ai settori della Chimica e della Biologia ha reso via via necessaria la revisione di alcuni concetti fondamentali, tra cui il concetto stesso di misurazione che si prevede verrà profondamente rivisto nella IV edizione del Vocabolario Internazionale di Metrologia (VIM) di prossima pubblicazione. Nelle prime 2 edizioni del VIM

il termine *measurement* era definito come “2.08 Processo di misurazione - Totalità delle informazioni, strumenti e operazioni relative ad una data misurazione”. Nella terza edizione del VIM (5) viene introdotto il concetto di “proprietà classificatoria (*nominal property*)”, che vengono dichiarate “non misurabili” e il termine *measurement* che viene così definito: “2.1 Misurazione - Processo volto a ottenere sperimentalmente uno o più valori che possono essere ragionevolmente attribuiti a una grandezza”; la nota 1 esplicitamente afferma che “la misurazione non si applica alle proprietà classificatorie”.

Nella prossima edizione del VIM (IV edizione in corso di ultimazione) la definizione di “measurement” si prevede invece che diventerà “measurement process of experimentally obtaining one or more values that can reasonably be attributed to a quantity, an ordinal property or a nominal property”, includendo quindi le proprietà classificatorie nelle proprietà misurabili e allargando l’approccio metrologico ad ogni processo di misurazione delle proprietà di corpi o fenomeni. A riguardo mi preme sottolineare l’importante lavoro portato avanti in ambito internazionale dalla Commissione Metrologia UNI-CEI e in particolare da Luca Mari nell’ambito del WG2 del *Joint Committee for Guides in Metrology* (JCGM) (6).

## Materiali di riferimento per le analisi chimiche e biologiche

Se si guarda alla definizione dei materiali di riferimento, ci si accorge che questa evoluzione del concetto di misurazione era già avvenuta da tempo, a dimostrazione del fatto che questo cambiamento è stato determinato principalmente dal processo di inclusione delle misure Chimiche e Biologiche nella Metrologia.

Le nuove definizioni (7) riportate poi nell’ultima edizione della Guida ISO-REMCO (8) evidenziano non solo il ruolo dei materiali di riferimento nell’esame delle proprietà classificatorie, ma anche come il concetto stesso di “valore” possa essere applicato alle proprietà classificatorie ossia ad attributi qualitativi come l’identità o la sequenza e che l’incertezza per questo tipo di attributi possa essere espressa come probabilità o livello di confidenza. I materiali di riferimento rappresentano quindi l’elemento chiave per applicare i criteri e i principi metrologici alle misure chimiche e biologiche.

L’Italia ha svolto negli anni 1980-1990 un’attività pionieristica in questo settore, grazie all’attività dell’Istituto Nazionale di Ricerca Metrologica (INRIM) e al grande impegno di ENEA (Agenzia nazionale per le nuove tecnologie, l’energia e lo sviluppo economico sostenibile) e del Centro Sviluppo Materiali (CSM) (9) che dettero vita al Centro Nazionale Materiali di Riferimento (CNMR), intorno al quale si aggregarono gli attori del Sistema Qualità Italia e i più importanti gruppi di ricerca tra cui quelli afferenti gli Istituti Metrologici Nazionali poi confluiti in INRIM, l’Istituto Superiore di Sanità (ISS) e l’Università Sapienza di Roma.

Il CNMR grazie all’impegno congiunto di ENEA e CSM divenne anche per 5 anni distributore autorizzato dei Materiali di Riferimento del *Bureau Communautaire de Reference* (BCR), rafforzando sempre più la rete internazionale e svolgendo nel contempo una grande e importante azione di sensibilizzazione, diffusione e formazione sul territorio nazionale. Fin dall’inizio uno dei focus principali fu l’agroalimentare (10), ed ENEA dopo aver per tanti anni partecipato ai circuiti internazionali per la certificazione di materiali di riferimento, rese operativi, a cavallo del nuovo millennio, impianti dedicati alla preparazione di materiali di riferimento per il settore agroalimentare, che, grazie alle tecnologie adottate, hanno consentito di ideare e sperimentare nuove vie progettuali e soluzioni pratiche per la riferibilità metrologica (11-14).



Il lavoro di cooperazione di questi ultimi anni ha permesso di dare il via al progetto internazionale METROFOOD per la realizzazione della prima infrastruttura europea di ricerca dedicata alla produzione di materiali di riferimento e al rafforzamento della metrologia per gli alimenti e la nutrizione (per approfondimenti: <https://cordis.europa.eu/project/id/739568/results>) (15), iniziativa che si spera consentirà di valorizzare ulteriormente l'importante ruolo della ricerca italiana e l'impegno di quanti hanno contribuito al successo di questa percorso.

## Certificazione dei materiali e accreditamento dei produttori

Nei primi anni abbiamo assistito ad una certa confusione terminologica, in particolare per quanto riguarda i materiali di riferimento certificati, sia perché si diffuse l'errata interpretazione dei due termini Materiali di Riferimento (*Reference Material*, RM) e Materiali di Riferimento Certificati (*Certified Reference Material*, CRM) come in "antitesi" (insiemi disgiunti) e sia perché erano gli anni in cui stavano esplodendo le norme per i Sistemi di Gestione per la Qualità dove il termine certificazione era di fatto (ed è tuttora) utilizzato per indicare la *certificazione di conformità* a requisiti prestabiliti, condotta da una terza parte (Organismo di Certificazione). Lo sforzo di chiarimento riguardo la terminologia, le procedure di realizzazione e l'impiego di RM e CRM (7, 8, 16) ha dato senz'altro i suoi frutti.

Rimane una certa disarmonia per quanto riguarda l'uso del termine "certificazione": si è deciso infatti di non impiegare il termine quando riferito al processo di misura, ma di mantenere l'aggettivo qualificativo e il sostantivo "certificato" ad indicare rispettivamente il tipo di RM (o il tipo di valori) e il documento di accompagnamento. La guida 35 ISO-REMCO è stata quindi modificata da "guida per la certificazione" a "guida per la caratterizzazione e valutazione dell'omogeneità e stabilità" (17) e a fine 2016 è stata pubblicata la norma internazionale ISO 17034:2016 (18) sulla quale si basa oggi in tutti i Paesi l'accreditamento dei produttori di Materiali di Riferimento.

In Tabella 1 sono riportati i requisiti previsti da tale norma per la produzione di RM e CRM, dai quali si evince che la differenza fondamentale tra CRM e RM risiede nella riferibilità metrologica dei valori certificati e nella disponibilità di un certificato che espliciti come questa sia stata ottenuta.

**Tabella 1. Requisiti per la produzione di RM e CRM (ISO 17034:2016)**

Requisiti	RM	CRM
Valutazione dell'omogeneità	x	x
Valutazione della stabilità	x	x
Caratterizzazione del materiale	<i>se appropriato</i>	x
Dichiarazione di Commutabilità	<i>se appropriato</i>	<i>se appropriato</i>
Assegnazione dei valori e delle loro incertezze	<i>se appropriato</i>	x
Riferibilità metrologica dei valori certificati		x
Certificato con informazioni sulla stabilità, riferibilità metrologica e grado di omogeneità		x

## Materiali di riferimento per le analisi delle micotossine: disponibilità attuale di CRM, caratteristiche e problematiche di produzione

La storia dei Materiali di Riferimento per le micotossine va di pari passo con l'evoluzione del quadro normativo per la sicurezza alimentare e fin dall'inizio si è capito che nella produzione di questi RM si dovevano avere attenzioni particolari (19). EU-Joint Research Centre (EU-JRC) ha tenuto egregiamente il passo nella produzione di RM per rispondere alle necessità che l'applicazione della normativa via via richiedeva ed ha a catalogo oggi sotto diversi marchi (BCR®, IRMM ed ERM®25) 25 CRM di cui 17 *matrix* CRM e 8 soluzioni di sostanze pure Il Bureau International des Poids et Mesures (BIPM) ha recentemente lanciato il progetto *Mycotoxin Metrology* all'interno del programma *Capacity Building & Knowledge Transfer* (CBKT). Si tratta di un progetto finalizzato a rafforzare l'infrastruttura di metrologia delle micotossine e consentire agli Istituti Metrologici Nazionali (NMI) di caratterizzare materiali, fornire sostanze di taratura e *matrix*-RM per supportare i laboratori che effettuano analisi delle micotossine nei diversi Paesi. Oltre a EU-JRC, producono CRM per le micotossine: il Laboratory of the Government Chemist inglese (www.lgc.uk), il tedesco MUVA Kempten GmbH (www.muva.de) e il tedesco Dr. Ehrenstorfer Reference Materials; recentemente anche il *National Institute of Standards and Technology* statunitense (NIST, www.nist.gov) ha inserito a catalogo un *matrix*-CRM di Mais certificato per il contenuto di Ocratossina A e con valori informativi per diverse altre micotossine. Complessivamente, risultano disponibili 32 *matrix*-CRM e 15 *calibrant* solution. In Tabella 2 è riportato un quadro sintetico della copertura in termini di *matrix*-CRM.

**Tabella 2. Produzione di *matrix*-CRM per l'analisi delle micotossine**

Produttore	Matrice	Micotossine
EU-JRC	Mais	ZON, DON, NIV
	Mangimi	AFB <sub>1</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>2</sub>
	Latte	AFM <sub>1</sub>
	Grano e derivati	OTA, DON
	Arachidi e derivati	AFB <sub>1</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>2</sub>
	Pistacchi	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub>
	Paprika	AFB <sub>1</sub> , AFG <sub>1</sub> , OTA
	Orzo	OTA
LGC	Mais	ZON
	Mangimi	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub>
	Latte	AFM <sub>1</sub>
MUVA	Latte	AFM <sub>1</sub>
	Succo di mela	PAT
NIST	Mais	OTA

EU-JRC: European Union-Joint Research Center; LGC: Laboratory of the Government Chemist; MUVA: ; NIST: National Institute of Standards and Technology  
 ZON: Zearalenone; DON: Deossinivalenolo; NIV: Nivalenolo; AFB<sub>1</sub>: Aflatossina B<sub>1</sub>; AFB<sub>2</sub>: Aflatossina B<sub>2</sub>; AFG<sub>1</sub>: Aflatossina G<sub>1</sub>; AFG<sub>2</sub>: Aflatossina G<sub>2</sub>; AFM<sub>1</sub>: Aflatossina M<sub>1</sub>; PAT: Patulina; OTA: Ocratossina A.

Le principali problematiche nella produzione di *matrix*-CRM riguardano la stabilità e l'incertezza dei valori certificati. Per quanto riguarda la stabilità ci sono da considerare diversi aspetti. Per rendere stabile il contenuto di micotossina è necessario da un lato eliminare qualsiasi ulteriore potenziale fonte (microrganismi tossigeni) attraverso idonei processi di sterilizzazione e dall'altro lato conservare i materiali in condizioni tali (temperatura, illuminazione, atmosfera) da impedire la degradazione o comunque la trasformazione chimica delle molecole di interesse. Inoltre, come per la gran parte dei prodotti alimentari, va considerata la stabilità delle matrici, che richiede già di per sé, in molti casi, la deidratazione e la conservazione in idonee condizioni. La validità dei valori certificati prodotte da EU-JRC è di 1 anno dall'acquisto se il prodotto viene conservato a -20°C, sia per i *matrix*-CRM che per le soluzioni di taratura. L'incertezza è invece generalmente molto diversa a seconda che si tratti di soluzioni pure o *matrix*-CRM. Quando l'attribuzione di valori avviene attraverso uno studio interlaboratorio, l'incertezza finale è calcolata come segue:

$$U_{CRM} = k \cdot \sqrt{u_{char}^2 + u_{bb}^2 + u_{lts}^2 + u_{sts}^2}$$

dove  $k$  è il fattore di copertura (generalmente  $k=2$ ),  $u_{char}$  è l'incertezza dello studio interlaboratorio di caratterizzazione,  $u_{bb}$  è l'incertezza dovuta a disomogeneità tra unità,  $u_{lts}$  è l'incertezza di stabilità a lungo termine (storage) e  $u_{sts}$  è l'incertezza della stabilità a breve termine (trasporto e utilizzo). Le soluzioni, in linea generale, avranno una  $u_{bb}$  trascurabile e anche la  $u_{char}$  risulterà inferiore per via della minore complessità e maggiore riproducibilità del metodo analitico. Quando i valori di concentrazione sono attribuiti in base ai dati di preparazione (misura di volumi e masse, purezza dei reattivi), che è tipicamente quanto avviene per le sostanze pure, l'incertezza può risultare ulteriormente più bassa (Tabella 3) (20).

**Tabella 3. Calcolo incertezza CRM certificati per il contenuto di zearalenone (ZON) in acetonitrile e in matrice di mais (sigle: BCR 699 e BCR 717)**

Parametri	ZON in acetonitrile BCR 699	Maize (ZON livello basso) BCR 717
$u_{char}$ (%)	0,4	1,01
$u_{bb}$ (%)	0,92	0,81
$u_{lts}$ (%)	1,1	4,9
Incertezza combinata (%)	1,49	5,1
Valore certificato ( $\mu\text{g/mL}$ )	9,95	83,32
Incertezza combinata ( $\mu\text{g/mL}$ )	0,148	4,22
Incertezza estesa ( $k=2$ ) ( $\mu\text{g/mL}$ )	0,296	8,45
Incertezza estesa (%)	3,0	10,2

Fonte: Report EUR20782EN (20)

Le sostanze pure sono molto utili per l'identificazione dei picchi e per le verifiche iniziali e periodiche, ma la disponibilità di un *matrix*-CRM, possibilmente con lo stesso livello e combinazione di analiti, rappresenta l'unica possibilità per ottenere la reale riferibilità dei risultati, validare un metodo ed evidenziare come eventuali effetti matrice interferiscano sul risultato finale. La via intermedia – ossia l'aggiunta di quantità note di analita ad una matrice reale (*spiked-RM*) – non è consigliabile nel caso delle micotossine, per la scarsa rappresentatività rispetto ad un materiale naturalmente contaminato, mentre una buona soluzione, adottata per altro da EU-JRC nella preparazione dei 3 CRM di latte in polvere con diversi valori di Aflatossina  $M_1$  (AFM<sub>1</sub>),

è quella di partire da 2 materiali di partenza omogenei a diverso contenuto di micotossine (di cui una possibilmente a livello inferiore al limite rivelabilità) e preparare i materiali intermedi al livello voluto, per miscelazione. Nel caso dei CRM di latte in polvere certificati per AFM<sub>1</sub> preparati da EU-JRC, i due materiali di partenza contenevano rispettivamente <0,02 µg/kg e 87 µg/kg di AFM<sub>1</sub> e per opportuna miscelazione sono stati ottenuti i 2 CRM intermedi, contenenti rispettivamente 0,111 µg/kg AFM<sub>1</sub> (ERM-BD283) e 0,44 µg/kg AFM<sub>1</sub> (ERM-BD284). Le incertezze finali e i contributi delle diverse fonti per questi CRM sono riportati in Tabella 4 (21). Come si può vedere anche in questo caso il maggior contributo deriva dall'instabilità a breve termine.

**Tabella 4. Incertezza nei CRM certificati per il contenuto di Aflatossina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) nel latte in polvere a due diversi livelli (ERM-BD283 e ERM-BD284)**

Parametri	AFM <sub>1</sub> nel latte in polvere	
	ERM-BD283 (livello basso)	ERM-BD284 (livello alto)
U <sub>char</sub> (%)	2,2	1,7
U <sub>bb</sub> (%)	0,89	0,77
U <sub>lts</sub> (%)	7,4	6,3
Incertezza combinata (%)	7,8	6,6
Valore certificato (µg/kg)	0,111	0,442
Incertezza combinata (µg/kg)	0,0086	0,0291
Incertezza estesa (k=2) (µg/kg)	0,018	0,059
Incertezza estesa (%)	15,6	13,2

Fonte: Report EUR21202EN (21)

Per la produzione di sostanze pure sono state sviluppate diverse strategie, tra cui la biosintesi tramite inoculo e raffinate sintesi biotecnologiche che consentono la preparazione di metaboliti secondari, oltre che di CRM marcati (22).

L'inoculo (sia in campo che sul raccolto) può essere utilizzato anche per realizzare CRM mirati (*driven*), ossia una sorta di *matrix*-RM "personalizzati", particolarmente utili, quando non ci sia disponibilità di materiali naturalmente contaminati o per ottenere – attraverso opportuna miscelazione di un materiale fortemente contaminato con un materiale non contaminato – una serie di CRM della stessa matrice, ma a diversa concentrazione di analita (23).

Per quanto riguarda gli analiti le necessità più impellenti in termini di nuovi CRM sono legate alle micotossine emergenti e ai materiali certificati per più micotossine. Per quanto riguarda le matrici sarebbe altresì utile disporre di CRM per caratterizzare non solo il prodotto finito ma tutta la filiera produttiva. Disporre di questi CRM consentirebbe di effettuare studi pre-normativi più efficaci, rapidi e completi, fornendo nel contempo alle aziende virtuose gli strumenti di controllo più idonei per mettere in atto le opportune azioni di mitigazione (24).

## Studio di fattibilità per la realizzazione di un nuovo RM per l'analisi di DON e Ac-DON nella farina

Nell'ambito del progetto Safe&Smart (<https://www.clusteragrifood.it/it/attivita/progetti/safe-smart.html>) è stato recentemente condotto, in collaborazione tra ENEA, ISS, Barilla G. e R. Fratelli SpA (nel seguito Barilla) e UCSC Piacenza, uno studio di fattibilità per la realizzazione

di nuovi RM per l'analisi di DON e Ac-DON nella farina (23). Le novità di questo studio riguardano principalmente il processo di preparazione. Vista la non disponibilità di farine naturalmente contaminate da DON, i materiali sono stati preparati per diluizione di un materiale artificialmente contaminato, attraverso inoculo di fungo *Fusarium*. Lo studio ha preso in considerazione diverse possibilità partendo da farina o da granelle, sia per di grano duro che di grano tenero e sono stati testati diverse specie e ceppi di *Fusarium*. Tutte le prove sono state condotte su batch forniti da Barilla, preventivamente omogeneizzati e ripartiti in lotti mediante gli impianti ENEA del Centro Ricerche Trisaia (Figura 1).



**Figura 1. Impianti ENEA Centro Ricerche Trisaia per l'omogeneizzazione dei materiali in batch e la preparazione di lotti omogenei**

USCS ha condotto gli studi di inoculo sui lotti omogenei preparati da ENEA e le verifiche iniziali del livello di contaminazione raggiunto. Partendo da grano duro, inoculato con *Fusarium culmorum* è stato possibile preparare lotti di 100-200 g di granella contaminati da tricoteceni nel range 100-200 ppm. I lotti così contaminati, dopo sterilizzazione, sono stati impiegati insieme con i lotti del materiale di partenza per preparare 3 RM (L0=livello 0; L1=livello basso; L2=livello alto) seguendo un complesso schema di omogeneizzazione messo a punto da ENEA, basato su step successivi di miscelazione, ripartizione e macinazione (Figura 2). Per ciascun livello si sono ottenute 64 aliquote da 50g. Sono state preparate sia aliquote in vetro che in plastica, conservate a -80°C e utilizzate per la caratterizzazione e per gli studi di omogeneità e stabilità.

L'ISS ha effettuato gli studi di omogeneità e di caratterizzazione dei materiali mediante LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*). L'indagine è stata allargata anche agli acetilati del DON, in particolare il 3 e 15 acetildeossinivalenolo (3AcDON e 15AcDON) in conformità con la recente posizione EFSA di considerare la soglia tossicologica di riferimento (*grouped Tolerable Daily Intake*) riferendola alla somma del DON e dei suoi acetilati. ISS ha inoltre verificato la stabilità del materiale conservato a -80°C.

I risultati (Figura 3 e Tabella 5) mostrano che il Livello 0 ha effettivamente una concentrazione di DON e AcDON inferiore al limite di quantificazione; i livelli 1 e 2 risultano omogenei per il contenuto di DON e 3AcDON e si conferma la stabilità con una conservazione a -80°C (23).

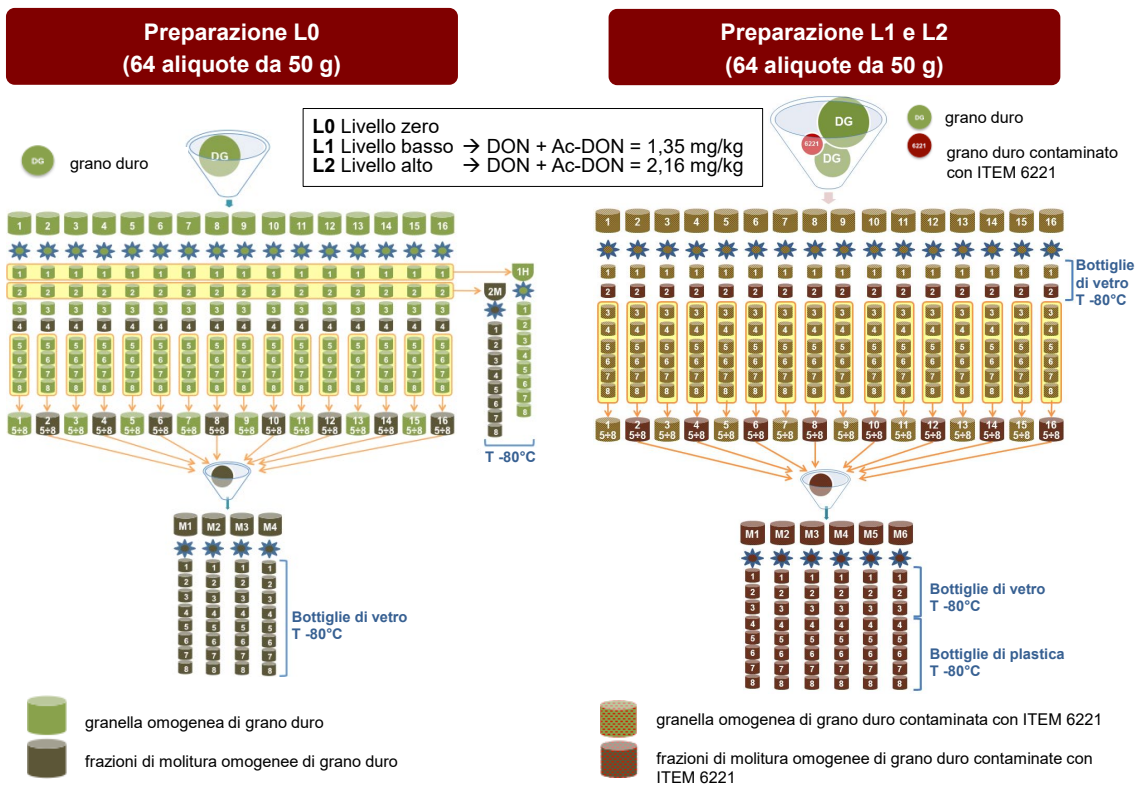


Figura 2. Schema di ripartizione, re-miscelazione e macinazione adottato per la preparazione dei RM di grano duro (Impianti ENEA Centro Ricerche Casaccia)

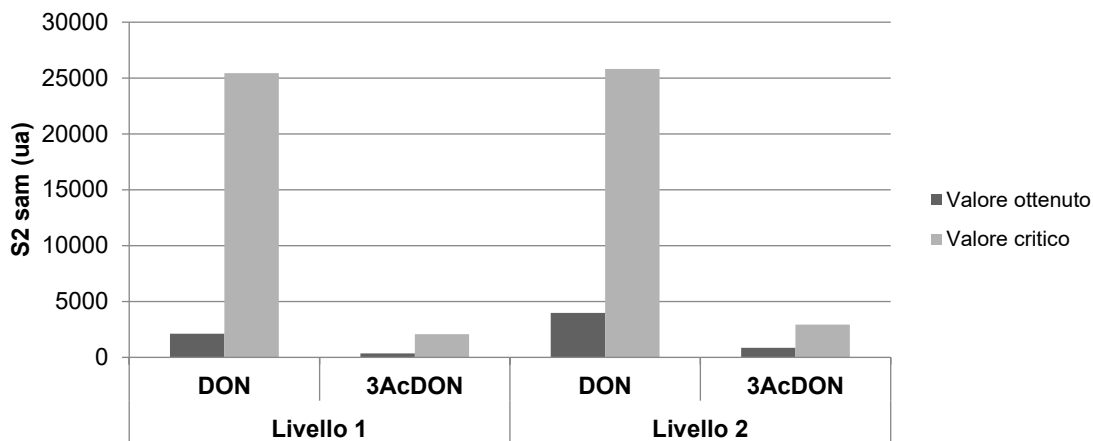


Figura 3. Risultati test ANOVA per valutazione omogeneità inter e intra aliquota ( $S_{sam}$  = estimated sampling standard deviation)

**Tabella 5. Quadro complessivo dei risultati ottenuti da ISS e confronto dei risultati a distanza di tempo**

Parametri di prestazione del metodo	Risultati 2015 (ISS)			Risultati 2019 (ISS)			
	DON	3AcDON	15AcDON	DON	3Ac DON	15Ac DON	DON 3G
R <sub>A</sub> (%)	108	69	64				
SSE (%)	118	71	70				
R <sub>E</sub> (%)	88	97	121				
LOQ (µg/kg)	50	25	25	40	40	100	76
LOD				10	10	25	19
Recupero (%)				106	96	104	71
Livello 0	media (µg/kg)	< LOQ	< LOQ	< LOQ			
Livello 1	media (µg/kg)	741	207	< LOQ	722	147	< LOQ
	SD (µg/kg)	146	37				
	RSD (%)	20	18				
	U (µg/kg)				159	40	
Livello 2	media (µg/kg)	918	233	< LOQ	1129	201	< LOQ
	SD (µg/kg)	131	41				
	RSD (%)	14	18				
	U (µg/kg)				248	40	

Nell'ambito degli studi di stabilità è stata inoltre messa a punto una procedura per la radiosterilizzazione ed effettuate alcune prove preliminari impiegando l'impianto per la sterilizzazione  $\gamma$  Calliope di ENEA equipaggiato con una sorgente di  $^{60}\text{Co}$ . Sono state eseguite prove irraggiando a 10 kGy e a 25 kGy, ossia impiegando rispettivamente, la massima dose di radiazione consentita per gli alimenti e la dose di radiazione comunemente necessaria per il raggiungimento della sterilità. Dai risultati ottenuti da Barilla (Tabella 6) si può affermare che l'irraggiamento (sia a 10 kGy che a 25 kGy) non sembra determinare alcun effetto di riduzione del contenuto della tossina DON nella matrice, mentre un certo effetto, in termini di riduzione dopo irraggiamento, si nota sull'AcetilDON, la cui entità non sembra però correlata alla dose. Ciò potrebbe far pensare ad una degradazione o comunque modifica della molecola dovuta all'irraggiamento, per cui questo aspetto dovrà essere ulteriormente indagato in uno studio specifico.

**Tabella 6. Confronto tra i contenuti di DON e 3AcDON in campioni di RM livello 2 non irraggiati e irraggiati a 10 kGy e 25 kGy (Risultati Barilla normalizzati)**

Prova	DON (µg/kg)	3AcDON (µg/kg)
L2 bottle A2.8	1149	212
L2_bottle B4.8	1109	190
L2_IRR-A 10kGray L2_IRR-B	1129	133
25kGray	1112	156

## Conclusioni

Sebbene la disponibilità di RM per l'analisi delle micotossine sia ampia e sufficiente per coprire le principali necessità connesse ai controlli normativi, è auspicabile un maggiore sviluppo di questo settore per consentire un più rapido progredire delle conoscenze sui meccanismi di formazione e interazione delle micotossine, per effettuare accurati studi pre-normativi, per monitorare in maniera più affidabile tutte le fasi di produzione e per valutare l'efficacia delle azioni di mitigazione. È indispensabile rafforzare l'azione formativa e informativa riguardo i benefici la scelta e l'utilizzo dei RM, tenendo il passo con l'evoluzione della Scienza delle Misure, considerando sia l'innovazione tecnologica che l'innovazione culturale.

## Bibliografia

1. Bureau International des Poids et Mesures. Evaluation of measurement data — *Guide to the expression of uncertainty in measurement JCGM 100:2008 (GUM 1995 with minor corrections)*. Sèvres: BIPM; 2008. Disponibile all'indirizzo: <https://www.bipm.org/en/publications/guides/>; ultima consultazione 15/05/2020.
2. Joint Committee for Guides in Metrology. *International Vocabulary of Metrology (IVM) – Basic and General Concepts and Associated Terms (VIM 3rd edition) JCGM 200:2012 (JCGM 200:2008 with minor corrections)*. Sèvres: BIPM; 2012. Disponibile all'indirizzo: <https://www.bipm.org/en/publications/guides/>; ultima consultazione 15/05/2020.
3. Mari L. Evolution of 30 years of the International Vocabulary of Metrology (VIM). *Metrologia* 2015;52:R1-R10.
4. Bureau International des Poids et Mesures. *The International System of Units – 9<sup>th</sup> edition*. Sèvres: BIPM; 2019. Disponibile all'indirizzo: <https://www.bipm.org/en/publications/si-brochure/>; ultima consultazione 15/05/2020.
5. UNI CEI 70099:2008. *Vocabolario Internazionale di Metrologia. Concetti fondamentali e generali e termini correlati (VIM)*. Milano: UNI-CEI; 2008. Disponibile all'indirizzo: <https://www.ceinorme.it/it/normazione-it/vim/vim-content-it.html?>; ultima consultazione 15/05/2020
6. Mari L, Narduzzi C. Verso un'incertezza di classificazione – La cultura metrologica nella valutazione delle proprietà classificatorie. *Tutto Misure* 2019;21;2
7. Emons H, Fajgel A, Van der Vee AMH, Watters R. New definitions on reference materials. *Accred Qual Assur* 2006;10: 576–78.
8. ISO GUIDE 30. *Reference materials — Selected terms and definitions*. Geneva: International Organization for Standardization; 2015.
9. Biancifiori MA, Del Monte MG, Zappa G. Standardization and Reference Materials: Some Words on the Italian Situation. IV Simposio Italo-Ungherese, Pisa, settembre 1991. *Micr. Journal* 1992; 45
10. Zappa G, Del Monte MG, Troisi L. *Materiali di riferimento per il settore agroalimentare: stato attuale e necessità*. Roma: ENEA; 2000. (ENEA RT/2000/7)
11. Zappa G, Carconi P, Gatti R, Palazzo S, Portaro N, Troisi L. Preparazione di materiali di riferimento per il settore agroalimentare presentato al Convegno Nazionale “Terzo Millennio: Il futuro della Chimica Analitica nel controllo alimentare e ambientale” Università “La Sapienza” Roma 22-24 febbraio 2001
12. Zappa G, Carconi P, Gatti R, Zoani C, Costantini S, Senofonte O. ENEA resources for Reference Materials production to support Food Quality and Safety. Co-operation with the Community Reference Laboratory for Chemical Elements in Food of Animal Origin (CRL-ISS) - Scientific Symposium EFSA



- University of Parma Food Safety and Quality, Nutrition and Nano-Technology - Parma 4 ottobre 2007.
13. Zappa G, Gatti R, Zoani C, Diletti G, Scortichini G. Double-Phase Reference Materials. “The Future of Reference Materials – Science and Innovation”. November 23-25 2010, Geel, Belgium.
  14. Zappa G, Gatti R, Zoani C. *Reference Materials for Food Flavour Analysis*. IMEKO TC-8, TC-23, TC-24 Three-day Conference “Metrological traceability in the globalization age” Paris, 6-8 April 2011
  15. Zappa G. METROFOOD-RI: a new reality to develop Reference Materials for the agri-food sector. *J Phys Conf Ser* 2018;1065 23.
  16. Zappa G, Gatti R, Sangiorgio P, Zoani C. Scelta e utilizzo dei materiali di riferimento per la qualità delle misure chimiche. In: VI° Congresso “Metrologia & Qualità”; Torino 7-9 aprile 2009.
  17. ISO GUIDE 35. *Reference materials - Guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability*. Geneva: International Organization for Standardization; 2017.
  18. ISO 17034:2016. *General requirements for the competence of reference material producers*. Geneva: International Organization for Standardization; 2016.
  19. Josephs RD, Koeber R, Bernreuther A, Linsinger TPJ, Schimmel H. *Development of certified reference materials for mycotoxins*. Wageningen: Academic Publishers; 2004. Disponibile all’indirizzo: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC24139>.
  20. Krska R, Josephs RD, MacDonald S, Petterson H. *The certification of the mass concentration of Zearalenone in Acetonitrile (BCR 699) and mass fraction of Zearalenone in Maize – very low level (BCR 716) Zearalenone in Maize – low level (BCR 717)*. Geel (BE): Institute for Reference Materials and Measurements; 2003. (Report EUR 20782 EN 2003).
  21. Josephs RD, Koeber R, Bernreuther A, Schimmel H, Ulbert F. *The certification of the mass fraction of aflatoxin M1 whole milk powder Certified Reference Material ERM®-BD282 (zero level), ERM®-BD283 (low level), ERM®-BD284 (high level)*. Geel (BE): Institute for Reference Materials and Measurements; 2005. (Report EUR 21202 EN 2005).
  22. Kuster L, Berthiller F, Michlmayr H, Malachova A, Fiby I, Adam G. Biotechnological Synthesis Of Deoxynivalenol-3-Glucoside and Its Fully Labeled 13c Analogue with Heterologously Expressed Enzymes and Their Analytical Application in a Stable Isotope Dilution Assay. In: De Saeger S, Logrieco A (Ed.). Report from the 1st MYCOKEY International Conference Global Mycotoxin Reduction in the Food and Feed Chain Held in Ghent, Belgium, 11–14 September 2017. *Toxins* 2017;9(9): 276.
  23. Zappa G, Gatti R, Zoani C, Sangiorgio P, Rebecchi A, Brera C, De Santis B, Debegnach F, Silvestri M, Suman M. Feasibility study for the development of new Reference Materials for mycotoxin analysis in cereals. In: 21<sup>st</sup> IMEKO World Congress on Measurement in Research and Industry, Prague, Czech 2015. p. 2134-6
  24. Pinton P, Suman M, Buck N, Dellafiora L, De Meester J, Stadler D, Rito E. *Practical guidance to mitigation of mycotoxins during food processing*. Brussels: ILSI Europe; 2019. Disponibile all’indirizzo: [http://ilsi.eu/wp-content/uploads/sites/3/2020/01/Mitigation-of-Mycotoxins\\_report\\_FIN\\_digital-3.pdf](http://ilsi.eu/wp-content/uploads/sites/3/2020/01/Mitigation-of-Mycotoxins_report_FIN_digital-3.pdf); ultima consultazione giugno 2020

## DETERMINAZIONE DELLA MONILIFORMINA MEDIANTE CROMATOGRAFIA CON IONI LA<sup>3+</sup> IN FASE MOBILE

Terenzio Bertuzzi, Silvia Rastelli, Annalisa Mulazzi, Amedeo Pietri

Dipartimento di Scienze Animali, della Nutrizione e degli Alimenti, Università Cattolica del Sacro Cuore di Piacenza, Italia

### Introduzione

La Moniliformina (MON) è una *Fusarium* tossina, spesso presente nei cereali; è principalmente prodotta da *F. avenaceum*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. tricinctum* e *F. verticilloides*.

MON è una molecola a basso peso molecolare e altamente polare; inoltre, a causa del suo basso pK<sub>a</sub> (< 1,7), è presente in acqua come sale di Na o di K. MON è risultata tossica su animali, causando degenerazione del miocardio, debolezza muscolare e patologie respiratorie; l'EFSA ha segnalato ematossicità e cardiotoxicità come principali effetti negativi sulla salute (1). La stessa Commissione ha raccomandato lo sviluppo di metodi analitici validati per la sua determinazione.

A causa della sua natura ionica, MON è debolmente trattenuta dalle più comuni fase stazionarie usate nella cromatografia in fase inversa; la sua determinazione può essere effettuata con la formazione di coppie ioniche o utilizzando fasi stazionarie specifiche per composti polari. Anche la cromatografia *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* (HILIC) è stata utilizzata, non ottenendo sempre risultati soddisfacenti.

In questo lavoro è stato valutato un nuovo approccio cromatografico, basato sull'interazione tra l'analita e un legante addizionato alla fase mobile. Oltre alla sua natura ionica, MON è un  $\alpha$ -di-chetone (1-idrossiciclobut-1-ene-3,4-dione; Figura 1a). I di-chetoni possono formare complessi con gli ioni dei lantanidi (Ln), come La<sup>3+</sup>, Tb<sup>3+</sup> o Eu<sup>3+</sup>; generalmente, tre di-chetoni si legano a uno ione metallico (Figura 1b). Si è quindi valutato se l'aggiunta di un sale di Lantanio nella fase mobile potesse migliorare la separazione cromatografica e la successiva determinazione mediante rivelazione UV e spettrometria di massa.

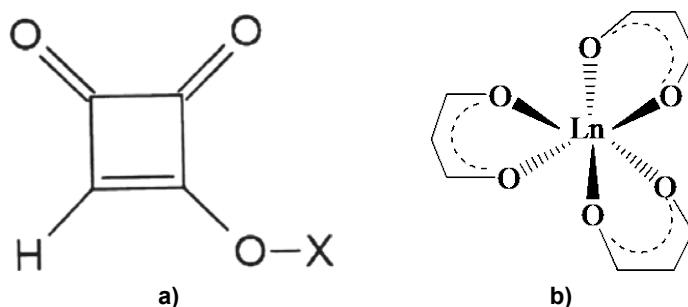


Figura 1: a) struttura della moniliformina; b) complesso [Ln-( $\beta$ -di-chetone)<sub>3</sub>] (Ln: ione lantanide)

## Materiali e metodi

### Analisi HPLC-UV per la determinazione della moniliformina

La MON è stata estratta da 10 g di cereali con 40 mL di una miscela acetonitrile:acqua 50+50 v/v usando un agitatore rotante per 60 min. Dopo diluizione su filtro di carta, 2 mL di estratto sono stati purificati su una colonna LC-NH<sub>2</sub> (500 mg, 3 mL, Supelco, Bellefonte, PA 16823, USA), precedentemente condizionata con 2 mL di una soluzione acetonitrile:acqua 50+50 v/v. La colonna è stata lavata con CH<sub>3</sub>CN (2 mL), acqua deionizzata (2 mL) e 1 mL di soluzione LaCl<sub>3</sub>·7H<sub>2</sub>O 12,5 mM; quindi, la MON è stata eluita in provetta graduata con altri 2 mL di soluzione LaCl<sub>3</sub>·7H<sub>2</sub>O 12,5 mM. L'estratto purificato è stato diluito (1+1) con acetonitrile e iniettato in HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) con rivelatore UV impostato a 219 e 260 nm. La MON è stata separata usando una colonna Supelcosil LC-NH<sub>2</sub> (250 x 3 mm, 5 µm, Supelco) e come fase mobile un gradiente di eluizione acetonitrile – soluzione acquosa LaCl<sub>3</sub>·7H<sub>2</sub>O 2,5 mM (o TbCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O). Il gradiente utilizzato partiva da un 15% di LaCl<sub>3</sub>·7H<sub>2</sub>O 2,5 mM, salendo al 35% in 3 minuti e rimanendovi per altri 5 minuti. Il flusso è stato impostato a 0,7 mL/min e la colonna termostata a 25°C.

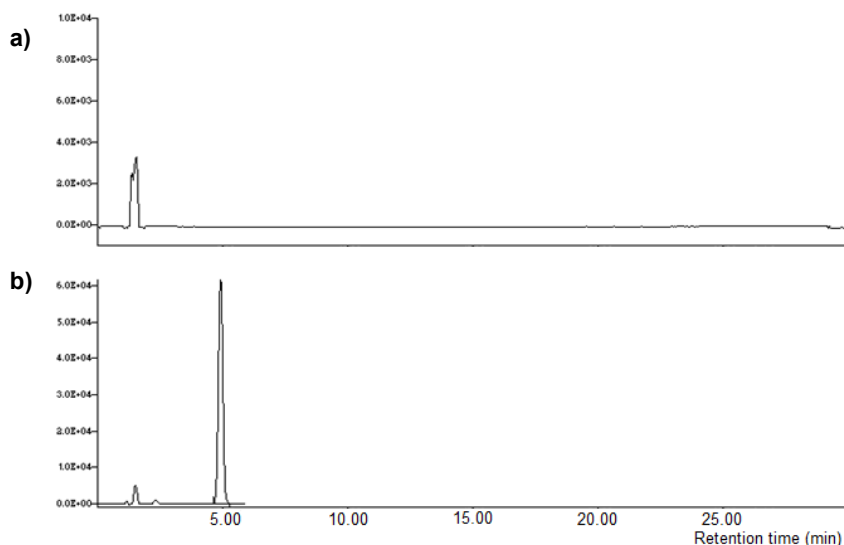
### Analisi LC-MS/MS per la determinazione della moniliformina

Dopo estrazione e filtrazione come riportato per l'analisi HPLC-UV, l'estratto è stato diluito (1+1) con metanolo-acqua 85+15 v/v e iniettato in LC-MS/MS (*Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry*). La MON è stata separata usando una colonna Supelcosil LC-NH<sub>2</sub> (75 x 3 mm, 3 µm, Supelco, Bellefonte, PA 16823, USA) e come fase mobile un gradiente di eluizione metanolo – soluzione acquosa 25 mM ammonio acetato contenente LaCl<sub>3</sub>·7H<sub>2</sub>O 1,25 mM. Il gradiente utilizzato partiva da un 15% di LaCl<sub>3</sub>·7H<sub>2</sub>O 2,5 mM, salendo al 35% in 3 minuti e rimanendovi per 1 minuto. Il flusso è stato impostato a 0,3 mL min<sup>-1</sup>. La ionizzazione è stata eseguita con interfaccia ESI in modalità negativa con i seguenti parametri: *spray capillary voltage* 3,5 kV, *sheath e auxiliary voltage* 40 e 15 psi; *skimmer* 9 V, temperatura del capillare 350°C. La determinazione è stata effettuata in modalità SRM (*Selected Reaction Monitoring*). Per la frammentazione dell'ione 97 m/z, la pressione di collisione dell'Argon è stata impostata a 1,2 mTorr e l'energia di collisione a 21 V. Lo ione di frammentazione rilevato e quantificato è stato il 41 m/z.

## Risultati

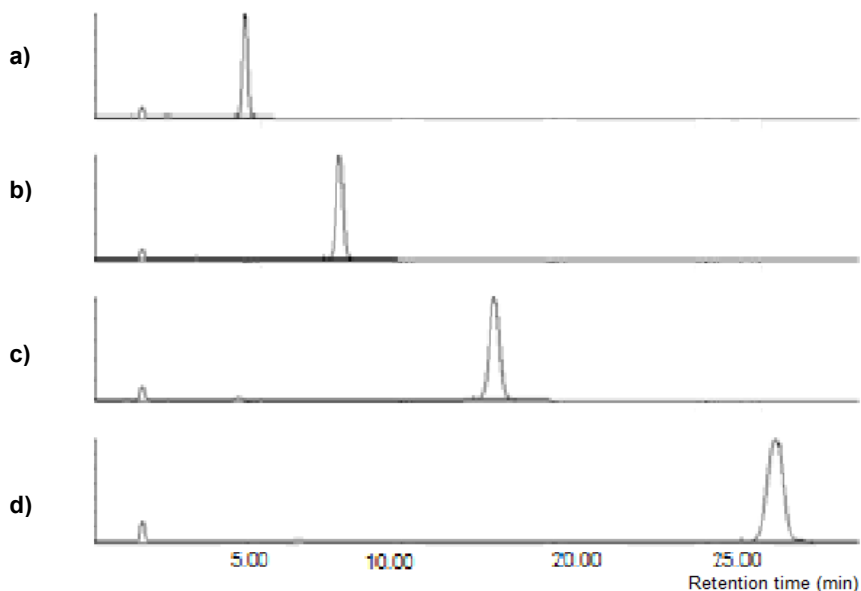
È noto che la MON, composto ad alta polarità, è poco trattenuta in cromatografia in fase inversa; recentemente sono state usate per la sua determinazione specifiche colonne per composti polari. In questo lavoro, sono state inizialmente testate le seguenti colonne, utilizzando un sistema HPLC con rivelazione UV: una colonna RP-8 (Lichrospher, 5 µm particle size, 125x4 mm i.d., Merck, Darmstadt, Germany), una X-Select HSS T3 (RP-18 a bassa densità di legante, 2,5 µm particle size, 100 x 2,1 mm i.d., Waters Corporation, Milford, MA, USA), una XBridge BEH Amide (2,5 µm particle size, 100 x 2,1 mm i.d., Waters Corporation, Milford, MA, USA) e una Supelcosil LC-NH<sub>2</sub> (250 x 3 mm, 5 µm, Supelco, Bellefonte, PA 16823, USA); come fase mobile è stata usata una miscela acetonitrile:acqua 20+80 v/v a flusso 1,0 mL/min<sup>-1</sup>. Iniettando una soluzione standard di MON (a 1000 µg L<sup>-1</sup>), la micotossina è stata debolmente trattenuta dalle colonne RP-8, X-Select HSS T3 e BEH Amide (tempo di ritenzione inferiore a 2,0 min); invece, MON è risultata fortemente trattenuta dalla colonna LC-NH<sub>2</sub> (nessun picco fino a 30 min).

Successivamente, la fase mobile è stata sostituita con acetonitrile:  $\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10 mM 20+80 v/v; se nessuna differenza rilevante del tempo di ritenzione è stata osservata per le colonne RP-8, X-Select HSS T3 e BEH Amide, MON è stata eluita dalla colonna LC-NH<sub>2</sub> a 4,9 min (Figura 2).



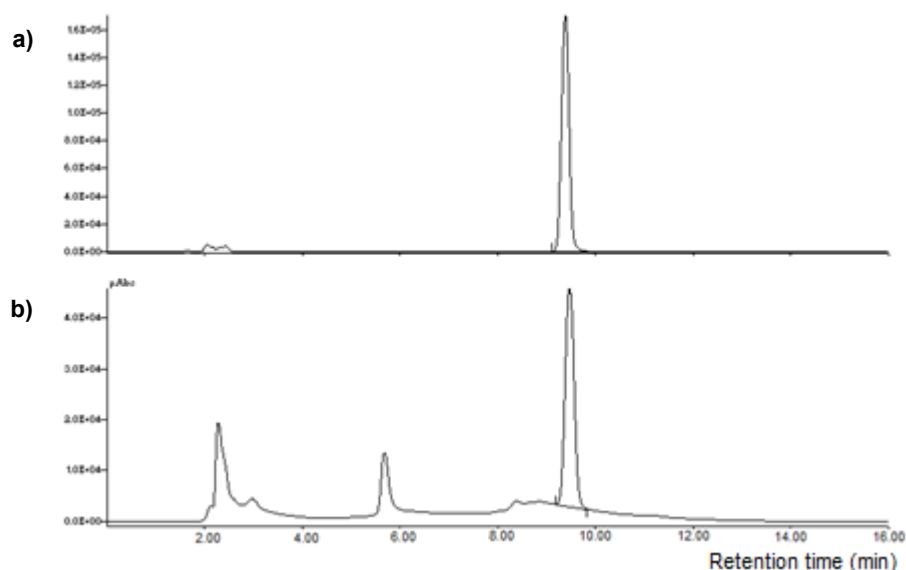
**Figura 2. Separazione cromatografica di una soluzione standard di MON ( $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ ) con colonna LC-NH<sub>2</sub> usando acqua (a) o una soluzione acquosa di  $\text{La}^{3+}$  10 mM (b) nella fase mobile.**

Iniettando cinque soluzioni standard a diversa concentrazione (20, 100, 250, 500 e  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ ) è stata ottenuta una soddisfacente curva di calibrazione ( $R^2=0,998$ ). Successivamente, aumentando la concentrazione di  $\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  nella fase mobile da 1 a 50 mM, è stato osservato una diminuzione del tempo di ritenzione (Figura 3).



**Figura 3. Cromatogrammi di soluzioni standard di MON usando concentrazioni 10, 5, 2,5 e 1 mM di  $\text{La}^{3+}$  - acetonitrile 8+2 v/v come fase mobile (a, b, c, d)**

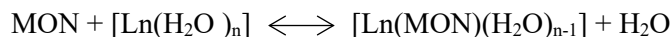
Infine, è stata ottenuta una soddisfacente separazione cromatografica applicando un gradiente lineare acetonitrile:  $\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2,5 mM come fase mobile (Figura 4).



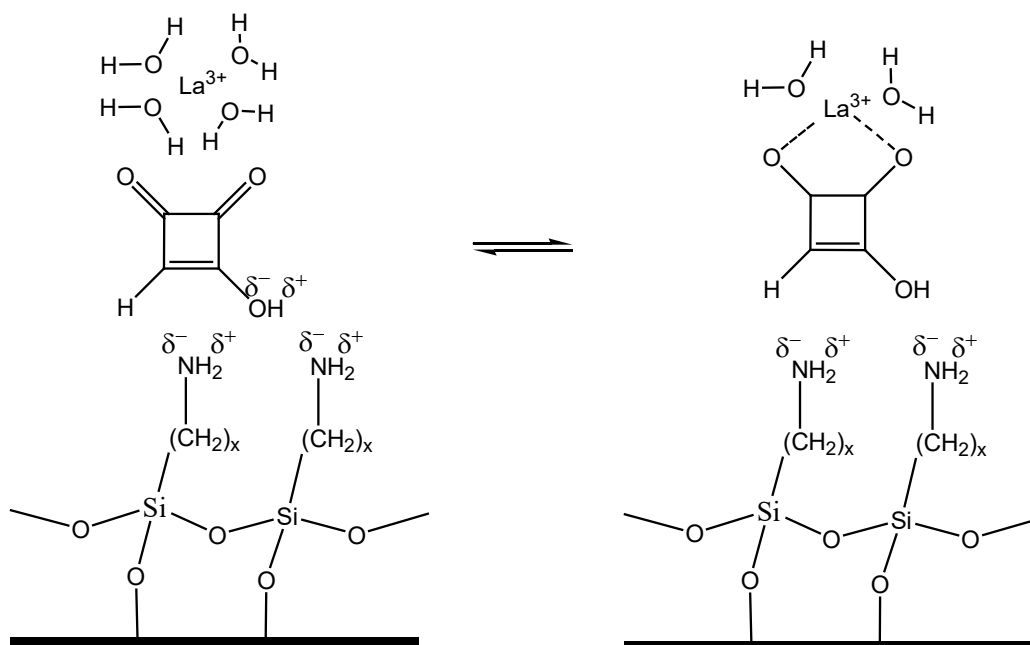
**Figura 4. Cromatogramma di: a) soluzione standard di MON ( $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ ); b) estratto di mais fortificato con MON ( $250 \mu\text{g L}^{-1}$ ). La separazione cromatografica è stata effettuata usando un gradiente lineare acetonitrile: soluzione acquosa di  $\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2,5 mM; rilevazione a 260 nm (UV)**

Risultati simili sono stati ottenuti aggiungendo alla miscela eluente  $\text{TbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  o  $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . I cromatogrammi hanno indicato una coordinazione della MON con gli ioni dei lantanidi durante la separazione, risultando in una maggiore affinità della micotossina per la fase mobile e una conseguente più veloce eluizione dalla colonna. Inoltre, aumentando la concentrazione degli ioni dei lantanidi, è favorita una maggiore affinità per la fase mobile e conseguentemente tempi di ritenzione più corti.

Questo processo di separazione può essere spiegato considerando la teoria della cromatografia a scambio di legante (*Ligand Exchange Chromatography*, LEC), un processo cromatografico nel quale i composti di coordinazione formati sono separati attraverso la formazione e la rottura continua di deboli legami di coordinazione con lo ione metallico, attraverso una partizione tra fase mobile e fase stazionaria (2). Basandosi su questa teoria, la coordinazione dello ione lantanide con le molecole di acqua nella fase mobile può essere parzialmente sostituita con la coordinazione alla MON, portando alla formazione di complessi misti di coordinazione (Figura 5). Tali composti sono cineticamente deboli, la loro continua formazione e dissociazione è veloce e può essere descritta dalla seguente reazione di equilibrio:

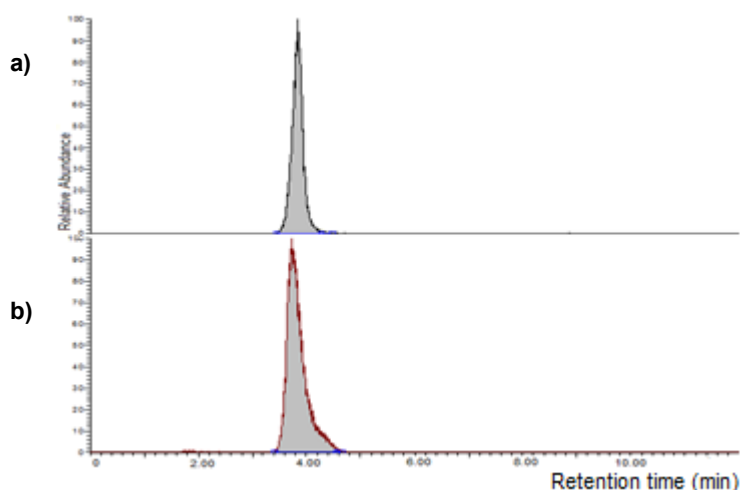


Questo processo potrebbe spiegare la maggiore affinità della MON per la fase mobile e la più veloce eluizione, quando viene aumentata la concentrazione dello ione lantanide. In assenza di tali ioni, la MON è fortemente trattenuta dalla fase stazionaria della colonna LC- $\text{NH}_2$ .



**Figura 5. Possibile struttura del complesso di coordinazione durante la separazione cromatografica della MON in presenza di  $\text{La}^{3+}$  nella fase mobile**

Infine, l'analisi cromatografica è stata effettuata mediante LC-MS/MS (triplo quadrupolo) per ottenere una migliore accuratezza della presenza di MON e valori di rilevabilità più bassi; in questo caso è stata usata una concentrazione di  $\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  molto bassa (1,25 mM) per evitare problematiche durante la ionizzazione. La MON è stata separata usando una colonna LC- $\text{NH}_2$  75 x 3 mm, 3  $\mu\text{m}$  (Supelco, Bellefonte, PA 16823, USA) e rilevata a circa 4,4 min, portando il limite di rilevabilità (LOD) a 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$  riferito al campione iniziale (Figura 6).



**Figura 6. Cromatogramma di: a) soluzione standard di MON (100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ); b) campione di mais naturalmente contaminato (1637  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). La separazione cromatografica è stata effettuata usando un gradiente lineare metanolo-  $\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,25 mM in ammonio acetato 25 mM; rilevazione mediante MS/MS (MRM transizione  $m/z$  97  $\rightarrow$  41)**

## Sviluppo di un metodo di estrazione e purificazione per la determinazione di MON in cereali

Normalmente, MON è estratta usando una miscela acetonitrile-acqua 84:16 (come per i tricoteceni); considerando l'alta polarità della MON, Barthel *et al.* (3) e Herrera *et al.* (4) hanno aumentato la percentuale di acqua nella miscela estraente, usando una miscela acetonitrile-acqua 50+50 v/v o acqua deionizzata al 100%, ottenendo maggiori rese di estrazione. Avendo ottenuto degli estratti non limpidi con acqua al 100%, probabilmente per la presenza di composti polari ad alto peso molecolare, è stata preferita la miscela acetonitrile-acqua 50+50 v/v.

Per quanto riguarda il passaggio di purificazione, diversi autori hanno usato o colonne SAX o MycoSep® MON 240 (5-6); tuttavia, Herrera *et al.* non hanno ottenuto percentuali di recupero soddisfacenti usando queste colonne e conseguentemente ha sviluppato un metodo senza passaggio di purificazione. In questo lavoro, abbiamo precedentemente testato colonne MycoSep® MON 240 (Romer Labs, Getzersdorf, Austria), MAX, WAX e HLB OASIS (Waters Corporation, Milford, MA, USA) e la tecnica QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*); in tutti i test, sono state ottenute purificazioni insoddisfacenti o bassi recuperi. Inoltre abbiamo confermato che l'evaporazione sotto azoto diminuisce il recupero, come riportato da Herrera *et al.*

Infine, è stata utilizzata una colonna di purificazione LC-NH<sub>2</sub> (Supelco, Bellefonte, PA 16823, USA), allo scopo di trattenere la MON e eluirla usando una soluzione di ioni lantanio, come sviluppato per la separazione HPLC.

Questa fase di purificazione è stata introdotta solo per l'analisi mediante HPLC-UV; per quella LC-MS/MS, la presenza di un'alta concentrazione di La<sup>3+</sup> nell'estratto purificato ha creato problematiche nella rivelazione strumentale.

## Conclusioni

È stato sviluppato un semplice e efficiente metodo cromatografico per la determinazione della MON; la semplice aggiunta di ioni lantanidi alla fase mobile ha permesso una facile determinazione della MON usando sia la rivelazione UV che quella spettrometrica di massa. Con questo metodo si possono facilmente ottenere dati sulla contaminazione da MON in mangimi e alimenti con soddisfacente accuratezza. Infine, questa tecnica cromatografica può essere applicata anche per la rivelazione di altre micotossine e anche per lo sviluppo di separazioni chirali.

## Bibliografia

1. EFSA Panel Contam. Risks to human and animal health related to the presence of moniliformin in food and feed. *EFSA Journal* 2018;16(3):1-95.
2. Davankov VA, Navratil JD, Walton HF. *Ligand Exchange Chromatography*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1988.
3. Barthel J, Rapp M, Holtmannspötter H, Gottschalk C. 2018. A rapid LC-MS/MS method for the determination of moniliformin and occurrence of this mycotoxin in maize products from the Bavarian market. *Mycotoxin Research*, 2018; 349(13):9-12.
4. Herrera M, van Dam R, Spanjer M, de Stoppelaar J, Mol H, de Nijs M, López P. 2017. Survey of moniliformin in wheat- and corn-based products using a straightforward analytical method. *Mycotoxin Research* 2017;33:333-41.

5. Lim CW, Lai KY, Yeo JF, Tai SH, Chan SH. Quantitative assessment of moniliformin in cereals via alternative precipitation pathways, aided by LC-LIT-MS and LC-Q-TOF-MS. *Food Chem* 2015;174:372-9.
6. Scarpino V, Blandino M, Negre M, Reyneri A, Vanara F. Moniliformin analysis in maize samples from North-West Italy using multifunctional clean-up columns and the LC-MS/MS detection method. *Food Addit Contam.* 2013;30(5):876-84.



# ANALYTICAL METHODOLOGY TO DETERMINE THE FATE OF DEOXYNIVALENOL DURING THE PRODUCTION OF BAKERY PRODUCTS

David Stadler (a), Francesca Lambertini (c), Christoph Bueschl (a), Rainer Schuhmacher (a), Elisa Cavandoli (c), Franz Berthiller (a), Michele Suman (c), Rudolf Krska (a,b)  
(a) *Institute of Bioanalytics and Agro-Metabolomics, Department of Agrobiotechnology (IFA-Tulln), University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna (BOKU), Tulln, Austria*  
(b) *Institute for Global Food Security, School of Biological Sciences, Queens University Belfast, Northern Ireland, United Kingdom.*  
(c) *Barilla G. R. F.lli SpA, Advanced Research Labs, Parma, Italy*

## Introduction

Deoxynivalenol (DON) is the most prevalent mycotoxin in cereal commodities. Although the population of industrial nations is exposed to DON mainly due to the consumption of bread and other bakery wares, the impact of the baking process on DON is unclear. After 30 years of research, the knowledge of degradation products that are formed from DON during baking and their toxicity is still incomplete. Furthermore, the extent of possible DON reduction is highly controversial (1).

The aim of the present work was to elucidate the fate of DON during industrial baking.

In particular the objectives were the following: (i) elucidate the full spectrum of DON degradation products without prior assumptions using a <sup>13</sup>C stable isotope assisted Liquid Chromatography (LC) High Resolution (HR) MS (Mass Spectrometry) method; (ii) determine the mass balance of DON and its formed degradation products by subsequently employing targeted LC tandem MS (MS/MS) analysis.

## Materials and methods

Acetonitrile (ACN, gradient grade) was purchased from VWR International GmbH (Vienna, Austria). Acetic acid (LC-MS gradient grade) was obtained from Sigma Aldrich (Vienna, Austria). In all experiments, ultra-pure water (purified by a Purelab Ultra system ELGA LabWater, Celle, Germany) was used. Liquid calibrant solutions of DOM-1, DON-3-Glc, DON, and U-(<sup>13</sup>C<sub>15</sub>)-DON were supplied by Romer Labs GmbH (Tulln, Austria). Reference standards of the DON degradation products isoDON and norDONs A, B and C were synthesized according to published procedures (2,3,4).

The food commodities used in the present study were produced from naturally contaminated flour (Figure 1) according to the procedure previously described by our group by applying a suitable scaling up factor of the starting ingredients that fits with the production under pilot plant facilities:

- *Biscuits*. The final dough (3000 g, 14% moisture content (MC)) was used to form the individual biscuits (approximately 11 g each) which consisted of 56 wt% flour, 40 wt% fat and sugar, and 4 wt% water.

- *Bread*. The final dough (8000 g, 14% MC) was used to form the individual loafs of 450 g each (40% MC), that reached a final weight of 400 g and consisted of 65 wt% flour, yeast, oil, and salt and 35 wt% water after baking.
- *Crackers*. They were shaped (approximately 10 g each) from the final dough (4127 g, 26% MC) and they consisted of 97 wt% flour, yeast, and malt extract and 3 wt% water.

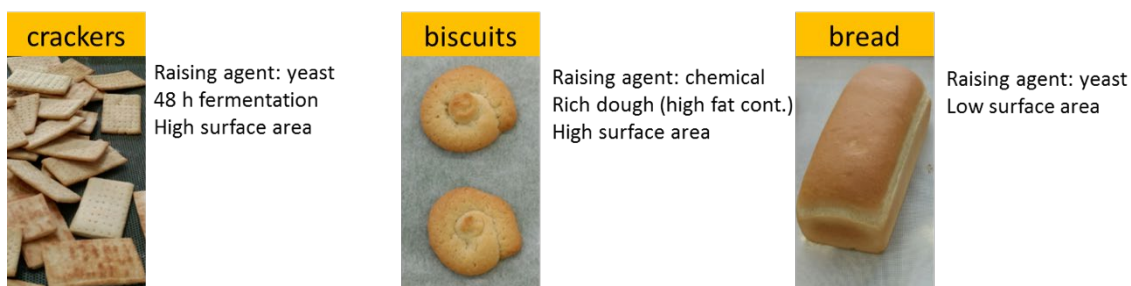


Figure 1. Production of bakery product

## Results and discussion

An untargeted metabolomics workflow, which was first used to detect metabolites of DON in wheat (5), was utilized to study the fate of DON during baking (Figure 2).

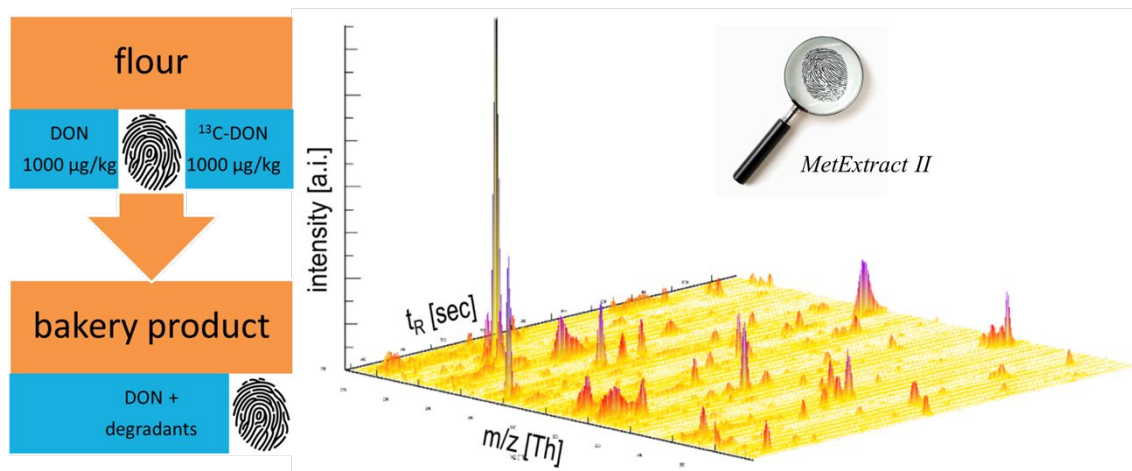


Figure 2. Untargeted search for DON degradants in bakery products by LC-HR-MS

In short, the dough was treated with a mixture of non-labelled DON and the labelled U-(<sup>13</sup>C<sup>15</sup>)-DON tracer. The finished food commodities were analyzed by LC-HR-MS. Signals originating from the tracer were extracted from the raw data by the software MetExtract II. The degradation of DON and the increase of its degradation products due to baking were verified for the three food commodities. UHPLC MS/MS (Ultra High Performance Liquid Chromatography coupled with tandem Mass Spectrometry) was used in combination with a) Stable Isotope Dilution

Analysis (SIDA) or b) matrix-matched calibration and correction for the Extraction Recovery (ER) to ensure accurate results. All details are reported in a complete overview in the correspondent recently published paper (3).

We have elucidated the fate of DON during baking of crackers, biscuits and bread, which were produced from fortified dough and processed under pilot plant conditions. Untargeted stable isotope assisted Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS) was used to determine all extractable degradation products. Targeted LC-MS/MS-based quantification revealed that DON was partially degraded to isoDON (1.3-3.9 %), norDON B (0.2-0.9%) and norDON C (0.3-1.2%). A DON degradation of 6 % (crackers), 5 % (biscuits) and 2 % (bread), respectively, was observed (*see* Figure 2).

## Acknowledgements

This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 678012 (MyToolBox).

## References

1. Pitt JI, Wild CP, Baan RA, Gelderblom WCA, Miller JD, Riley RT, Wu F. *Improving public health through mycotoxin control*. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2012. (IARC Scientific Publications Series, No. 158)
2. Bretz M, Beyer M, Cramer B, Knecht A, Humpf HU. Thermal degradation of the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol. *J. Agric. Food Chem* 2006;54:6445-51.
3. Stadler D, Lambertini F, Bueschl C, Wiesenberger G, Hametner C, Schwartz-Zimmermann H, Hellinger R, Sulyok M, Lemmens M, Schuhmacher R, *et al.* Untargeted LC-MS based <sup>13</sup>C labelling provides a full mass balance of deoxynivalenol and its degradation products formed during baking of crackers, biscuits and bread. *Food Chem* 2019;279:303-11.
4. Scudamore KA, Hazel CM, Patel S, Scriven F. Deoxynivalenol and other Fusarium mycotoxins in bread, cake, and biscuits produced from UK-grown wheat under commercial and pilot scale conditions. *Food Addit. Contam* 2009;26:1191-8.
5. Kluger B, Bueschl C, Lemmens M, Berthiller F, Häubl G, Jaunecker G, Adam G, Krska R, Schuhmacher R. Stable isotopic labelling-assisted untargeted metabolic profiling reveals novel conjugates of the mycotoxin deoxynivalenol in wheat. *Anal Bioanal Chem*. 2013;405(15): 5031-6.

# IMMUNOSAGGI BASATI SULLA POLARIZZAZIONE DI FLUORESCENZA PER LA DETERMINAZIONE DI TOSSINE DI *FUSARIUM* E LORO FORME MODIFICATE IN FRUMENTO

Vincenzo Lippolis (a), Anna C.R. Porricelli (a), Erminia Mancini (a), Veronica M.T. Lattanzio (a), Biancamaria Ciasca (a), Annalisa De Girolamo (a), Sarah De Saeger (a), Chris M. Maragos (c), Susan McCormick (a), Peiwu Li (d), Antonio F. Logrieco (a), Michelangelo Pascale (a)  
(a) *Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari, Italia*  
(b) *Centre of Excellence in Mycotoxicology and Public Health, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ghent University, Ghent, Belgio*  
(c) *Mycotoxin Prevention and Applied Microbiology Research Unit, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Peoria, IL, USA*  
(d) *Key Lab for Mycotoxins Detection, Oil Crops Research Institute of the Chinese Academy of Agricultural Sciences, Wuhan, Cina*

## Introduzione

Le tossine di *Fusarium*, tra cui ritroviamo i tricoteceni, sono le principali micotossine prodotte in campo. I tricoteceni sono una grande famiglia di tossine, chimicamente correlate con struttura ad anello sesquiterpenoide, contenente un gruppo epossidico in posizione C12-C13 che è responsabile della loro attività tossica. Nonostante abbia una tossicità più bassa di altri tricoteceni, il deossinivalenolo (DON), che appartiene ai tricoteceni di tipo B, ha ricevuto particolare attenzione in quanto è la micotossina che viene più frequentemente ritrovata nel frumento e in altri cereali come mais, orzo, avena e segale (1, 2). La tossina T-2 (T-2) e la tossina HT-2 (HT-2) sono invece tricoteceni di tipo A noti per la loro elevata tossicità e che possono essere ritrovate in un'ampia varietà di cereali (3). Tali tossine per la loro tossicità rappresentano un rischio per la salute dell'uomo e degli animali. Pertanto, al fine di proteggere la salute dei consumatori, la Commissione Europea ha fissato i livelli massimi consentiti di DON nei cereali e negli alimenti trasformati a base di cereali compresi tra 200 e 1750 µg/kg (4) e livelli indicativi per la somma di T-2 e HT-2 nei cereali e nei prodotti derivati che vanno da 15 a 2000 µg/kg (5). I tricoteceni vengono, inoltre, ritrovati nelle forme chimicamente modificate che sono biosintetizzate dal metabolismo di piante, funghi e animali (6) e che hanno tossicità e incidenza già ampiamente studiate. Tra le forme modificate del DON, il 3-acetil-deossinivalenolo (3Ac-DON), il 15-acetil-deossinivalenolo (15Ac-DON) e il deossinivalenolo-3-glucoside (DON3G) rappresentano le forme maggiormente ritrovate in natura (2). Analogamente, T-2 glucoside (T-2G) e HT-2 glucoside (HT-2G) sono i derivati di T-2 ed HT-2 di maggiore rilevanza per i cereali (3).

Lo sviluppo di metodi analitici in grado di rilevare simultaneamente le micotossine e le loro forme modificate, anche espresse come somma, è altamente richiesto perché potrebbe soddisfare le richieste di future normative europee. L'approccio più utilizzato per la determinazione simultanea di tricoteceni e relative forme modificate prevede l'analisi LC-MS/MS (*Liquid Chromatography - tandem Mass Spectrometry*) (7). Tuttavia, poiché tali metodi analitici hanno costi elevati, richiedono personale specializzato e tempi lunghi di analisi, non sono adatti per scopi di screening. Per tale motivo, sono richiesti metodi analitici di facile realizzazione, rapidi, economici, robusti e affidabili per il monitoraggio simultaneo di tricoteceni e forme modificate al

fine di raccogliere un maggior numero di dati. Tra i metodi di screening, gli immunosaggi basati sulla polarizzazione di fluorescenza (*Fluorescence Polarization Immunoassay*, FPIA) hanno ampiamente dimostrato le loro elevate potenzialità nella determinazione di micotossine (8).

Per questo motivo, lo scopo del presente studio è stato quello di sviluppare e validare due FPIA per la determinazione simultanea, espressa come somma, di (i) DON, 3Ac-DON, 15Ac-DON e DON3G nel frumento e (ii) T-2, HT-2, T-2G e HT-2G nel frumento. I metodi sviluppati sono stati validati sia come metodi quantitativi, che come metodi di screening in accordo con le linee guida stabilite dalla Commissione Europea nel Regolamento (UE) 519/2014 (9).

## Materiali e metodi

Lo sviluppo e la validazione dei sono state condotte attraverso le seguenti quattro diverse fasi: i) preparazione e test dei reagenti, ii) sviluppo dei test immunochimici, iii) ottimizzazione dei protocolli di estrazione e iv) valutazione degli effetti della matrice, v) ottimizzazione e validazione sia come metodi quantitativi, sia come metodi di screening.

## Risultati e discussione

### Sviluppo dei metodi

Per quanto riguarda il metodo per la determinazione simultanea di DON, 3Ac-DON, 15Ac-DON e DON3G è stato sviluppato un saggio FPIA competitivo con una curva di calibrazione nell'intervallo di concentrazione 0,8-206 ng/mL di tali tossine (espresso come somma), con  $IC_{50} = 18$  ng/mL e che prevede un tempo di incubazione di 2 minuti. Per tale immunosaggio è stato messo a punto un protocollo di estrazione da campioni di frumento che prevede l'estrazione di un'aliquota campione (25 g) con soluzione salina tampone fosfato (100 mL) miscelando ad alta velocità per 2 minuti e filtrando attraverso filtro di carta e filtro in microfibra di vetro. Un'aliquota di estratto filtrato (equivalente a 30 mg di matrice) viene sottoposta ad analisi FPIA (Figura 1).

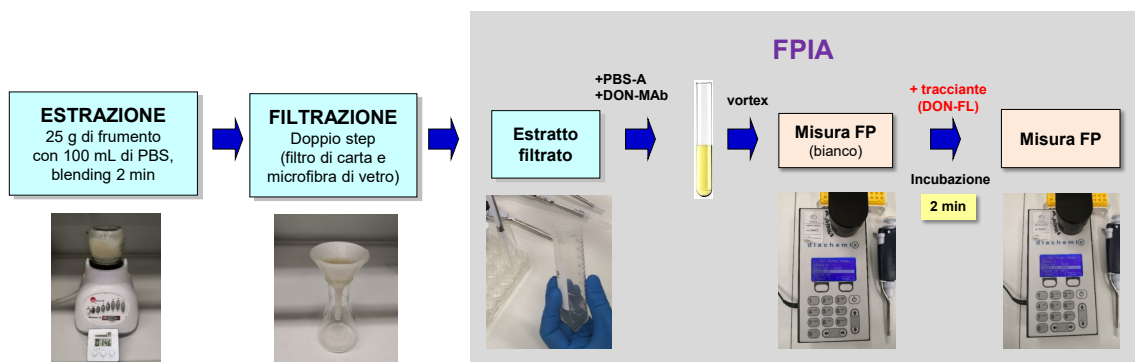


Figura 1. Schema del metodo FPIA per la determinazione di DON, 3Ac-DON, 15Ac-DON e DON3G

Per quanto riguarda, invece, il metodo la determinazione simultanea di T-2, HT-2, T-2G e HT-2G è stato sviluppato un saggio FPIA competitivo con una curva di calibrazione nell'intervallo di concentrazione 0,1-73,2 ng/mL di tali tossine (espresso come somma), con  $IC_{50} = 2$  ng/mL e che prevede un tempo di incubazione di 5 minuti (10). Sono stati messi a punto due protocolli di estrazione alternativi basati sull'uso di solvente organico (protocollo A) e acquoso (protocollo B) da campioni di frumento. In particolare, per il protocollo A l'analisi prevede l'estrazione di un'aliquota di campione di frumento (50 g) con una miscela organica (100 mL di metanolo/acqua, 90/10 v/v) miscelando ad alta velocità per 3 minuti. L'estratto previa filtrazione su carta viene diluito con una soluzione di NaCl al 4% (rapporto 1:5, v/v) e lasciato riposare per 5 minuti. L'estratto diluito viene quindi filtrato con filtro in microfibra di vetro.

Nel caso del protocollo B, l'analisi prevede che un'aliquota di campione di frumento (10 g) viene estratta con 100 mL di acqua miscelando ad alta velocità per 3 minuti e filtrando attraverso filtro di carta e filtro in microfibra di vetro. Per entrambi i protocolli A e B, un'aliquota di estratto filtrato (equivalente a 20 mg di matrice) viene sottoposta ad analisi FPIA (10) (Figura 2).

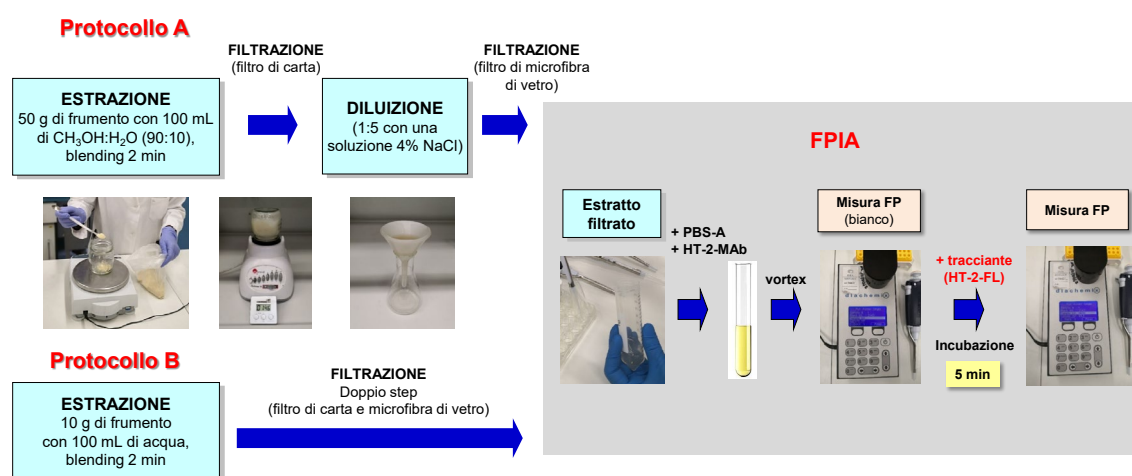


Figura 2. Schema dei metodi FPIA per la determinazione di T-2, HT-2, T-2G e HT-2G

## Validazione dei metodi

I metodi sviluppati sono stati validati *in-house* come metodi quantitativi, al fine di valutare le loro prestazioni in termini di sensibilità, recupero e ripetibilità. Nel caso dell'FPIA per la determinazione di DON, 3Ac-DON, 15Ac-DON e DON3G nel frumento, il limite di determinazione (LOD) e il limite di quantificazione (LOQ) erano rispettivamente di 80 e 120  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (espressi come somma). Mentre, per gli FPIA per la determinazione di T-2, HT-2, T-2G e HT-2G nel frumento utilizzando entrambi i protocolli di estrazione (Protocollo A e B) sono stati ottenuti LOD e LOQ rispettivamente di 10 e 15  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (espressi come somma). I valori medi di recupero per campioni di frumento non contaminati e addizionati con DON e forme modificate a livelli compresi nell'intervallo 500-2000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (prove in triplicato) variavano dal 92 al 112% con RSD inferiori al 7%. Nel caso dell'FPIA per la determinazione di T-2, HT-2, T-2G e HT-2G, i campioni di frumento sono stati addizionati con tali tossine a livelli compresi nell'intervallo 50-200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . I recuperi medi per FPIA utilizzando il protocollo A variavano dal 92 al 102% con

RSD inferiori al 13%, mentre i recuperi medi per FPIA utilizzando il protocollo B erano compresi nell'intervallo 89-98% con RSD inferiori al 7% (10). I valori dei recuperi e della precisione ottenuti per tutti i metodi FPIA sviluppati soddisfano i criteri di accettabilità per un metodo analitico per la determinazione quantitativa delle forme native stabilite dalla Commissione Europea.

I metodi sviluppati sono stati inoltre validati in accordo con le linee guida per i metodi di screening stabiliti dalla Commissione Europea nel Regolamento (UE) 519/2014 (9). L' idoneità allo scopo dei metodi FPIA sviluppati è stata valutata calcolando i profili di precisione, il tasso di falsi positivi e il livello di *cut-off* ai livelli regolamentati/indicativi dell'UE delle forme native nel frumento duro. In particolare, le prove sono state condotte in 5 differenti giorni, in condizioni di ripetibilità, per un totale di 20 misurazioni, per campioni di frumento non contaminato e contaminato artificialmente alla concentrazione target di screening (STC) di 1750 µg/kg per la somma di DON, 3Ac-DON, 15Ac-DON e DON3G e di 100 µg/kg per la somma di T-2, HT-2, T-2G e HT-2G. Per quanto riguarda l'FPIA per la determinazione di DON e forme modificate i valori medi della risposta del metodo per campioni contaminati artificialmente alla STC e dei campioni non contaminati erano rispettivamente di 1815 e 116 µg/kg, con RSD del 6 e 47% e con precisione intermedia (RSD<sub>PI</sub>) del 7 e 51%, rispettivamente. Il livello di *cut-off* calcolato era 1585 µg/kg e la percentuale di risultati falsi sospetti per campioni non contaminati era inferiore allo 0,1%. Nel caso di FPIA per la determinazione di T-2, HT-2 e forme modificate i valori medi delle risposte al metodo con protocollo A e protocollo B erano rispettivamente di 115 e 104 µg/kg per campioni alla STC e 12 e 21 µg/kg per i campioni non contaminati. Nel caso di FPIA con protocollo A, i valori di RSD e RSD<sub>PI</sub> erano 5 e 10% per campioni alla STC e 16 e 25% per i campioni non contaminati. Nel caso di FPIA con protocollo B, i valori di RSD e RSD<sub>PI</sub> erano 9 e 13% per i campioni alla STC e 14 e 16% per i campioni non contaminati. I livelli di *cut-off* calcolati erano 96 e 80 µg/kg, rispettivamente per FPIA con protocollo A e protocollo B, e la percentuale di risultati falsi positivi per campioni non contaminati era in entrambi i casi inferiore allo 0,1% (10). In definitiva, tutti i metodi sviluppati hanno mostrato soddisfacenti prestazioni analitiche, in termini di precisione in condizione di ripetibilità, di precisione intermedia, livello di *cut-off* e percentuale di falsi positivi.

## Conclusioni

I risultati di questo studio dimostrano l'applicabilità dei metodi sviluppati, basati sulla tecnica FPIA, sia come metodi quantitativi, sia come metodi di screening per valutare il contenuto delle tossine target nel frumento ai livelli indicati dall'UE per le forme native. Inoltre i metodi FPIA proposti utilizzano procedure a basso impatto ambientale e, essendo rapidi, facili da realizzare, a basso costo e portatili possono considerarsi utili e robusti strumenti per lo screening di un elevato numero di campioni.

## Ringraziamenti

Lavoro svolto nell'ambito del progetto MYCOKEY (H2020-Grant Agreement No 678781).

## Bibliografia

1. WHO/FAO. *Safety evaluation of certain mycotoxins in food. Prepared by the fifty-sixth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)*. Geneva: World Health Organization; 2001. (WHO food additives series 47. FAO food and nutrition paper 74).
2. EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM)). Scientific opinion on risks to human and animal health related to the presence of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms in food and feed. *EFSA Journal* 2017;15(9):4718, 345 pp.
3. European Food Safety Authority. Scientific report on human and animal dietary exposure to T-2 and HT-2 toxin. *EFSA Journal* 2017;15(8):4972, 57 pp. DOI: 10.2903/j.efsa.2017.4972.
4. Europa. Regolamento (CE) n. 1881/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006, che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L 364 del 20.12.2006.
5. Europa. Raccomandazione della Commissione del 27 marzo 2013 relativa alla presenza di tossine T-2 e HT-2 nei cereali e nei prodotti a base di cereali. (2013/165/UE). *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 91/12 del 3.4.2013.
6. Bryla M, Waskiewicz A, Ksieniewicz-Wozniak E, Szymczyk K, Jedrzejczak R. Modified Fusarium Mycotoxins in Cereals and Their Products-Metabolism, Occurrence, and Toxicity: An Updated Review. *Molecules* 2018;23:963.
7. Freire L, Sant'Ana AS. Modified mycotoxins: An uptake review on their formation, detection, occurrence and toxic effects. *Food and Chemical Toxicology* 2018;111:189-205.
8. Lippolis V, Maragos C. Fluorescence polarization immunoassays for rapid, accurate and sensitive determination of mycotoxins. *World Mycotoxin Journal* 2014;7(4):479–89.
9. Europa. Regolamento (UE) n. 519/2014 che modifica il Regolamento (CE) 401/2006 per quanto riguarda i metodi di campionamento per le grandi partite, per le spezie e gli integratori alimentari, i criteri di rendimento per le tossine T-2 e HT-2 e per la citrinina, nonché i metodi di analisi di screening. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L 147 del 17 maggio 2014.
10. Lippolis V, Porricelli ACR, Mancini E, Ciasca B, Lattanzio VMT, De Girolamo A, Maragos CM, McCormick S, Li P, Logrieco AF, Pascale M. Fluorescence Polarization immunoassay for the determination of T-2 and HT-2 toxins and their glucosides in wheat. *Toxins* 2019;11:380.



# VALIDAZIONE DI UN METODO ELISA QUANTITATIVO PER LA RICERCA DI AFLATOSSINA M<sub>1</sub> NELLE MATRICI LATTE, FORMAGGIO E BURRO

Alberto Biancardi, Alessandro Moretti

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia, Italia

## Introduzione

Classificata dalla *International Agency for Research on Cancer* (IARC) come cancerogeno di classe 2B, l'aflatossina M<sub>1</sub> è un metabolita ossidrilato dell'aflatossina B<sub>1</sub> e come tale è presente nel latte e nei prodotti derivati. Dista particolare attenzione e preoccupazione la sua presenza nel latte e l'effetto di concentrazione nel trasferimento da latte a formaggio per interazione con la componente proteica. Nell'attività routinaria del laboratorio di controllo risulta di notevole importanza la produttività analitica ossia la possibilità di testare un numero elevato di campioni in tempi utili e ragionevoli. Da questo punto di vista la tecnica ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) costituisce un valido strumento per l'analisi quantitativa sia in termini di sensibilità e specificità ma anche di accuratezza e precisione (1).

Facendo seguito a risultati precedentemente pubblicati sul confronto ELISA vs. HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) (2), lo scopo del presente lavoro è la validazione e l'applicazione routinaria del metodo ELISA per la ricerca e la determinazione quantitativa di aflatossina M<sub>1</sub> sulle matrici latte, formaggio e burro in un ampio intervallo di concentrazioni, anche di molto superiori ai limiti di tolleranza normati e/o consigliati per le matrici prese in esame. Per quanto riguarda la matrice latte il Regolamento (CE) 1881/2006 stabilisce un limite di tolleranza di 0,050 µg/kg per il latte di produttori e 0,025 µg/kg per il latte destinato alla prima infanzia (3). Quanto ai derivati del latte, in particolare i formaggi, attualmente sono in vigore limiti suggeriti di 150 ng/kg e 275 ng/kg in relazione ai coefficienti di concentrazione 3,0 e 5,5 per i formaggi a pasta tenera e per i formaggi a pasta dura rispettivamente (Nota del Ministero della Salute pr. DGISAN 28454 del 3/7/2013).

## Materiali e metodi

### Reagenti

Il kit ELISA utilizzato per la determinazione quantitativa dell'aflatossina M<sub>1</sub> è stato fornito da TECNA (I'screen AFLA M<sub>1</sub>) e contiene: micropiastra a 96 pozzetti adsorbiti con anticorpi anti-aflatossina M<sub>1</sub>, soluzioni standard di aflatossina M<sub>1</sub> pronte per l'uso (1,5 mL) a 0, 5, 10, 25, 50, 100, 250 ng/L di aflatossina M<sub>1</sub>, coniugato enzimatico (14 mL), tampone di lavaggio concentrato 20X (50 mL), tampone di estrazione (60 mL), diluente del campione ovvero tampone latte (12 mL), soluzione di sviluppo (14 mL), soluzione d'arresto (8 mL) contenente acido solforico 2 M.

L'acqua bidistillata, deionizzata e filtrata su 0,2 µm è stata prodotta mediante apparecchiatura Milli-Q (Millipore).

Le Matrici di Riferimento Certificate (MRC) sono state fornite da FAPAS (*Food Analysis Performance Assessment Scheme*) e da AIA (Associazione Italiana Allevatori).

## Preparazione del campione per analisi ELISA

La preparazione del campione per analisi ELISA per ogni matrice è stata la seguente:

– *matrice LATTE*

Trasferire 10 mL in provetta da centrifuga; centrifugare per 10 min a 3000 rpm; filtrare su carta e usare la parte sgrassata direttamente nel saggio. Il fattore di diluizione è pari a 1.

– *matrice FORMAGGIO*

Pesare mediante bilancia 2,00 g di campione in provettone PP da 50 mL munito di tappo a vite. Aggiungere 20 mL di diclorometano e mantenere su agitatore per 30 min. Filtrare su carta e trasferire 5 mL del filtrato in provetta conica PP da 15 mL. Evaporare a secco in corrente di azoto a  $40^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  e riprendere il residuo con 750  $\mu\text{L}$  di tampone di estrazione. Aggiungere quindi 2 mL di n-esano e procedere allo sgrassaggio agitando vigorosamente su vortex per 2 min. Centrifugare per 10 min a 3000 rpm; eliminare quindi la fase organica sovrastante mediante aspirazione con l'ausilio della pompa meccanica per il vuoto. Trasferire 50  $\mu\text{L}$  della fase acquosa in provetta conica PP e aggiungere 450  $\mu\text{L}$  di diluente del campione. Miscelare vigorosamente su vortex e quindi centrifugare a 2000 rpm per 5 min. Il fattore di diluizione è pari a 15.

– *matrice BURRO*

Pesare mediante bilancia 2,00 g di campione in provettone PP da 50 mL munito di tappo a vite. Aggiungere 20 mL di diclorometano e mantenere su agitatore per 30 min. Filtrare su carta e trasferire 5 mL del filtrato in provetta conica PP da 15 mL. Evaporare a secco in corrente di azoto a  $40^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  e riprendere il residuo con 750  $\mu\text{L}$  di tampone di estrazione. Precedere quindi con lo sgrassaggio: aggiungere 2 mL di n-esano e agitare vigorosamente su vortex per 2 min. Centrifugare per 10 min a 3000 rpm; eliminare quindi la fase organica sovrastante mediante aspirazione con l'ausilio della pompa meccanica per il vuoto. Ripetere l'intera operazione di sgrassaggio una seconda volta. Trasferire 100  $\mu\text{L}$  della fase acquosa in provetta conica PP e aggiungere 170  $\mu\text{L}$  di diluente del campione. Miscelare vigorosamente su vortex e quindi centrifugare a 2000 rpm per 5 min. Il fattore di diluizione è pari a 4.

## Analisi ELISA

Deporre nei rispettivi pozzetti 100  $\mu\text{L}$  di ogni standard e di ogni campione. Mescolare manualmente con cauto movimento rotatorio su superficie piana. Coprire e incubare per 45 min a temperatura ambiente ( $18 \div 25^{\circ}\text{C}$ ). Svuotare il contenuto dei pozzetti e aggiungere in ciascuno 260  $\mu\text{L}$  della soluzione di lavaggio; svuotare e rimuovere ogni residuo della soluzione di lavaggio capovolgendo la micropiastra più volte su un foglio di carta assorbente. Ripetere l'operazione di lavaggio altre tre volte. Aggiungere 100  $\mu\text{L}$  del coniugato enzimatico per pozzetto. Mescolare manualmente con cauto movimento rotatorio su superficie piana. Coprire e incubare per 15 min a temperatura ambiente ( $18 \div 25^{\circ}\text{C}$ ). Procedere con i quattro lavaggi come indicato sopra. Aggiungere poi 100  $\mu\text{L}$  della soluzione di sviluppo per pozzetto. Mescolare manualmente con cauto movimento rotatorio su superficie piana. Coprire e incubare per 15 min a temperatura ambiente ( $18 \div 25^{\circ}\text{C}$ ). Bloccare la reazione enzimatica aggiungendo 50  $\mu\text{L}$  di soluzione d'arresto per pozzetto. Misurare l'assorbanza a 450 nm.

La *modalità di calcolo* è stata la seguente: riportando l'assorbanza in funzione delle concentrazioni 0, 5, 10, 25, 50, 100, 250 ng/L delle soluzioni standard, generare la curva di

calibrazione su 7 livelli mediante apposito programma informatico (Foglio di calcolo I'screen M<sub>1</sub> TECNA). Per interpolazione, si risale alla concentrazione incognita espressa in ng/L. Moltiplicare il valore ottenuto per il fattore di diluizione (1 per il latte, 15 per il formaggio e 4 per il burro).

## Risultati e discussione

Il metodo è stato validato sulle matrici latte, formaggio e burro. Il campo di validazione è 5÷100 ng/kg per la matrice latte, 75÷475 ng/kg per la matrice formaggio e 20÷80 ng/kg per il burro. I parametri di validazione sono: specificità, limite di quantificazione (*Limit of Quantification*, LOQ), accuratezza e precisione e stima dell'incertezza di misura.

La specificità è stata valutata mediante l'applicazione dell'intero metodo di prova a 8 campioni/matrici non contenenti l'analita (bianchi). Attraverso la curva di calibrazione è stata verificata l'assenza di aflatossina M<sub>1</sub>. Il metodo si è quindi dimostrato essere specifico.

Il LOQ è stato fissato a 5 ng/kg, 75 ng/kg e 20 ng/kg per le matrici latte, formaggio e burro rispettivamente. Ogni singolo LOQ è stato verificato sperimentalmente sulle tre diverse matrici: uno stesso campione "bianco", in sei repliche indipendenti, è stato drogato al LOQ prescelto. Per la valutazione dell'accuratezza e della precisione sono state fatte prove replicate nel campo di applicazione del metodo a diversi livelli di concentrazione utilizzando sia matrici opportunamente drogate che matrici di riferimento certificate, laddove disponibili. I risultati sono riportati nelle Tabelle 1, 2, 3.

**Tabella 1. Risultati validazione matrice LATTE**

Parametri	Media (ng/kg)	DS*	CV%**	REC (%)***	z-score medio
LOQ (spiked 5 ng/kg)	5,1	0,72	14,2	102 (n=6)	-
MRC Test Veritas (58,45 ng/kg; $\sigma_p$ 12,86)	66,7	2,58	3,87	114 (n=6)	0,64
MRC FAPAS (31,9 ng/kg; $\sigma_p$ 7)	36,3	2,2	6,2	114 (n=10)	0,63
MRC FAPAS (34,1 ng/kg; $\sigma_p$ 7,7)	37,1	1,9	5,0	109 (n=10)	0,39
Spiked (95 ng/kg)	90,5	2,95	3,26	95 (n=6)	-
COMPLESSIVO	-	9,87	9,20	108 (n=38)	-

\*DS= Deviazione Standard;

\*\* CV=Coefficiente di Variazione;

\*\*\*REC= recupero

**Tabella 2. Risultati validazione matrice FORMAGGIO**

Parametri	Media (ng/kg)	DS*	CV%**	REC (%)***	z-score medio
LOQ (spiked 76 ng/kg)	79,8	5,74	7,19	105 (n=6)	-
Spiked (152 ng/kg)	153,2	6,49	5,24	101 (n=6)	-
Spiked (304 ng/kg)	295,8	19,50	6,59	97 (n=6)	-
Spiked (475 ng/kg)	486,2	23,91	4,92	102 (n=6)	-
MRC AIA (331,13 ng/kg; $\sigma_p$ 61,58)	349,3	9,13	2,62	105 (n=6)	0,30
COMPLESSIVO	-	5,88	5,75	102 (n=30)	-

\*DS= Deviazione Standard;

\*\* CV=Coefficiente di Variazione;

\*\*\*REC= recupero

**Tabella 3. Risultati validazione matrice BURRO**

Parametri	Media (ng/kg)	DS*	CV%**	REC (%)***
LOQ (spiked 20,9 ng/kg)	20,5	2,07	10,12	98 (n=6)
Spiked (39,9 ng/kg)	43	2,61	6,06	108 (n=6)
Spiked (60,8 ng/kg)	60,8	5,84	9,61	100 (n=6)
Spiked (80,75 ng/kg)	83,8	3,31	3,95	104 (n=6)
COMPLESSIVO	-	8,29	8,10	102 (n=24)

\*DS= Deviazione Standard;

\*\* CV=Coefficiente di Variazione;

\*\*\*REC= recupero

Al livello di drogaggio pari 95 ng/kg, prima dell'esecuzione del test ELISA, i campioni sono stati diluiti 1:3 con il tampone latte in modo da rientrare nel range di massima linearità di risposta del kit, centrato sul valore IC50, ovvero B/B0 50% (mediamente sui 30 ng/kg). I recuperi al livello di drogaggio più alto (95 ng/kg) e al livello più basso (LOQ) sono risultati praticamente quantitativi. Dal confronto mediante ANOVA degli *z-score* ottenuti per le tre diverse MRC non è stata evidenziata una differenza significativa ( $P=0,094$ ).

I recuperi ottenuti ai cinque livelli considerati sono stati confrontati mediante ANOVA; non esiste una differenza statisticamente significativa ( $P=0,09$ ). Il recupero complessivo calcolato su 30 dati è risultato quantitativo (102%). La precisione dei dati, espressa come CV%, è del tutto accettabile (<10%). I risultati migliori sono stati ottenuti proprio sulla MRC con uno *z-score* medio (n=6) pari a 0,30 e un CV=2,62%.

Dal confronto mediante ANOVA dei recuperi ottenuti ai quattro livelli considerati non è emersa una differenza statisticamente significativa ( $P=0,19$ ). Complessivamente il recupero è quantitativo e pari a 102% (n=24) con una ottima dispersione dei dati (CV=8,10%).

Il metodo si è dunque dimostrato anzitutto quantitativo, ma anche preciso e accurato per le tre matrici trattate; la manipolazione del campione è minima e ciò riduce notevolmente la probabilità di introdurre errori casuali e/o sistematici. È inoltre un metodo veloce, con tempi e costi di analisi ridotti. In tal senso presenta una notevole produttività.

Sebbene non strettamente richiesta per un metodo di screening, l'incertezza estesa relativa è stata stimata (approccio bottom-up) ed è riportata nella Tabella 4.

**Tabella 4. Incertezza di misura relativa**

Matrice	Campo di validazione (ng/kg)	Incetezza estesa relativa	Gradi di libertà (v)	Fattore di copertura (K)
LATTE	5÷100	20,6%	75	1,99
FORMAGGIO	75÷475	22,3%	45	2,01
BURRO	20÷80	33,1%	36	2,03

I risultati ottenuti sono in linea con i criteri di rendimento fissati dal vigente Regolamento (UE) 519/2014 (4).

Nell'applicazione routinaria il metodo si è dimostrato essere accurato, come si evidenzia dalle carte di controllo degli *z-score* riportate di seguito sulle matrici latte e formaggio, e relative ad un periodo di attività di 20 mesi.

Per avere un dato oggettivo di affidabilità, sono stati considerati i dati di controllo di qualità (N= 158 per la matrice latte; N= 31 per la matrice formaggio) prodotti dal laboratorio nell'arco di

20 mesi di attività routinaria (da gennaio 2018 ad agosto 2019). Nella carta di controllo (Figura 1) relativa alla matrice latte è riportato l'andamento degli *z-score* su sei diverse MRC in un intervallo di concentrazione da 9 a 60 ng/kg. Per quanto riguarda la matrice formaggio è stata utilizzata la sola MRC disponibile alla concentrazione di 331,13 ng/kg (Figura 2). È bene sottolineare che siamo in condizioni di massima riproducibilità: 20 mesi, operatori diversi, lotti diversi a parità di tipologia di kit. Ogni punto rappresenta il controllo interno di un batch di analisi di screening. La distribuzione degli *z-score* è mediamente centrata nella fascia  $\pm 1$  per entrambe le matrici. Non è stato possibile fare altrettanto con la matrice burro, in quanto non sono disponibili MRC.

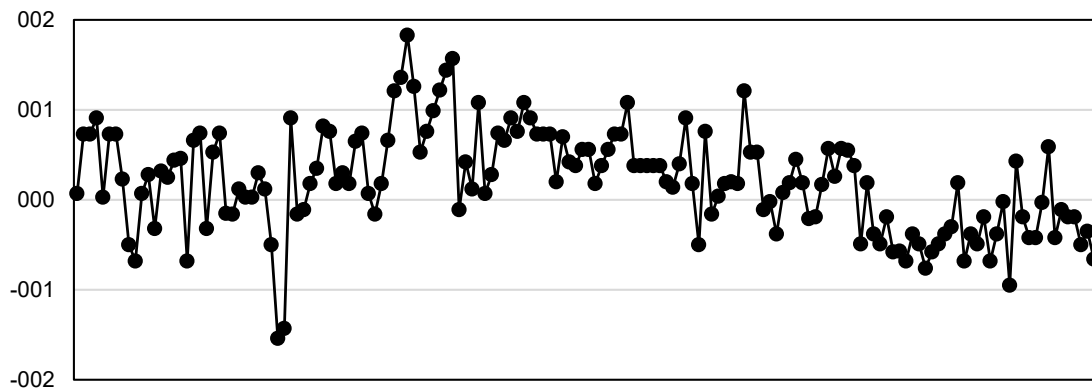


Figura 1. Carta di controllo degli *z-score* su matrice LATTE (n. 158)

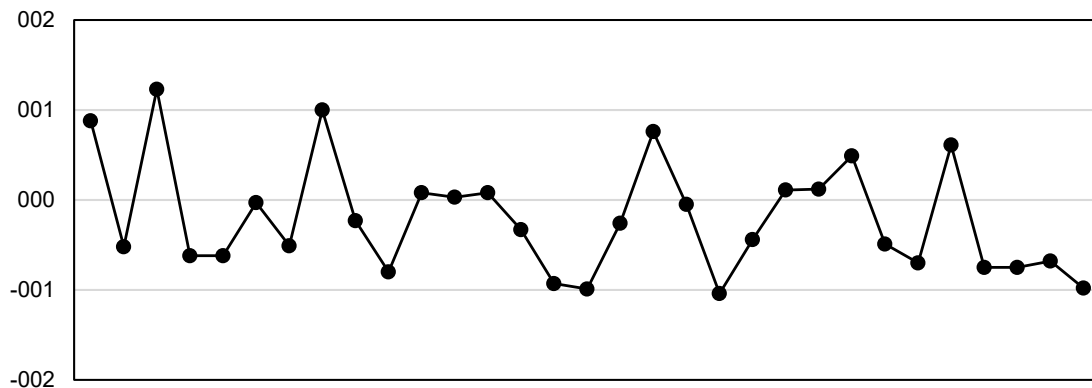


Figura 2. Carta di controllo degli *z-score* su matrice FORMAGGIO (n. 3)

Ad ulteriore riprova dell'attendibilità del dato quantitativo ELISA, su 11 campioni di latte di routine, è stata eseguita la determinazione sia con metodo ELISA che con cromatografia liquida accoppiata con spettroscopia di massa tandem (*Liquid Chromatography - tandem Mass Spectrometry*, LC-MS/MS) come metodo di conferma (5) in condizioni di ripetibilità intermedia, ossia stesso operatore e stessa strumentazione in un arco temporale di 2 mesi. I risultati sono riportati in Tabella 5. Si può constatare che il dato di conferma LC-MS/MS cade nell'intervallo

di incertezza di misura calcolato per il dato ELISA. Infatti, dal confronto mediante ANOVA dei 2 gruppi non si evidenzia una differenza statisticamente significativa ( $P=0,62$ ).

**Tabella 5. Confronto ELISA vs. LC-MS/MS su matrice LATTE**

Risultato ELISA (ng/kg)	Incertezza estesa (ELISA)	Risultato LC-MS/MS (ng/kg)
141	29	126
18	4	17
66	14	63
78	16	67
72	15	62
67	14	56
92	19	83
48	10	42
70	14	63
68	14	75
53	11	52

## Conclusioni

Data l'elevata potenzialità delle determinazioni ELISA in termini di produttività analitica, si è voluto validare un metodo ELISA per la ricerca e la determinazione *quantitativa* di aflatoxina  $M_1$  sulle matrici latte, formaggio e burro. Utilizzando sia campioni drogati che matrici di riferimento, il metodo è stato validato su un ampio intervallo di concentrazioni, anche superiori ai limiti normati e/o consigliati per le matrici prese in esame. Infatti il campo di validazione è per la matrice latte  $5 \div 100$  ng/kg, per la matrice formaggio  $75 \div 475$  ng/kg e per la matrice burro  $20 \div 80$  ng/kg. Il recupero complessivo è stato 108% ( $CV=9,2\%$ ) per il latte, 102% ( $CV=5,8\%$ ) per il formaggio e 102% ( $CV=8,1\%$ ) per il burro. È stata inoltre calcolata l'incertezza di misura pari a 20,6% per la matrice latte, 22,3% per la matrice formaggio e 33,1% per la matrice burro.

Il metodo si è dimostrato idoneo in termini di sensibilità, precisione e accuratezza anche a concentrazioni di aflatoxina  $M_1$  relativamente alte; è attualmente applicato nell'attività di analisi routinaria. Oltre alla produttività analitica, tale metodo presenta interessanti potenzialità e ben si presta a possibili applicazioni, quali ad esempio studi di trasferimento dell'aflatoxina  $M_1$  dal latte ai prodotti derivati seguendo le varie fasi di lavorazione e maturazione del prodotto caseario.

## Bibliografia

1. ISO 14675. *Milk and milk products- Guidelines for a standardized description of competitive enzyme immunoassays- Determination of aflatoxin  $M_1$  content*. Geneva: International Organization for Standardization; 2003.
2. Biancardi A, Aimo C, Piazza P, Piro R. Tecniche di screening e conferma: il caso aflatoxina  $M_1$ . In: Brera C, De Santis B, Debegnach F, Gregori E, Pannunzi E, Barea Toscan MC (Ed.). *IV Congresso Nazionale. Le micotossine nella filiera agro-alimentare. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 11-13 giugno 2012. Atti*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2013. (Rapporti ISTISAN 13/18). p. 8-15.

3. Europa. Regolamento (CE) n. 1881/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006, che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione europea* L 364 del 20.12.2006.
4. Europa. Regolamento (UE) n. 519/2014 che modifica il Regolamento (CE) 401/2006 per quanto riguarda i metodi di campionamento per le grandi partite, per le spezie e gli integratori alimentari, i criteri di rendimento per le tossine T-2 e HT-2 e per la citrinina, nonché i metodi di analisi di screening. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione europea* L 147 del 17 maggio 2014.
5. Biancardi A, Dall'Asta C. A simple and reliable liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of aflatoxin M1 in milk. *Food Add. & Contam* 2013; 30(2); 318-88.

## CONFRONTO TRA IL METODO ELISA E UPLC/FLD PER LA DETERMINAZIONE DI T-2 ED HT-2 NEI CEREALI

Paola D'Agnello (a), Carlo Brera (b), Francesca Debegnach (b), Luigi Urbano (c), Antonello Curiale (c), Cinzia Franchino (a), Rita De Pace (a)

(a) *Struttura Semplice Micotossine e Tecniche immunoenzimatiche-Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilica, Foggia, Italia*

(b) *Dipartimento Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia*

(c) *Dipartimento di Prevenzione, ASL Foggia, Italia*

### Introduzione

Le tossine T-2 ed HT-2 appartengono alla classe dei tricoteceni, che comprendono più di 150 micotossine prodotte principalmente da specie di funghi del genere *Fusarium*. La struttura di base, degli stessi, è un sesquiterpene tetraciclico con un gruppo spiro-epossido a livello del C-12 e C-13 e un doppio legame olefinico tra C-9 e C-10. In base ai sostituenti del sistema ad anello tetraciclico, i tricoteceni sono raggruppati in diversi tipi A e D. Le micotossine T-2 e HT-2 appartengono ai tricoteceni di tipo A, caratterizzati da un gruppo idrossilico esterificato o libero al C-8 o un C-8 non sostituito. Le strutture della tossina T-2 e HT-2 differiscono solo in un gruppo funzionale, la tossina T-2 è acetilata a livello del C-4 mentre la tossina HT-2 non è acetilata. La T-2 è facilmente convertita in HT-2 senza perdere la sua tossicità. Gli esperti EFSA hanno concluso che la T-2 è cancerogena, mutagena e immunosoppressore (EFSA, 2011). Attualmente, non sono in vigore limiti massimi tollerabili per queste micotossine, tuttavia, recentemente l'Unione Europea ha espresso, nella Raccomandazione 2013/165/UE, livelli indicativi circa la presenza di T2/ HT2 in cereali e derivati, espressi come somma di T-2 e HT-2, sia negli alimenti sia nei mangimi. I metodi attualmente utilizzati per la determinazione di queste tossine sono generalmente basati sulla gas cromatografia accoppiati a rivelatori a ionizzazione di fiamma (*Flame Ionization Detector*, FID) o rivelatori a cattura di elettroni (*Electron Capture Detector*, ECD), o anche a spettrometria di massa (MS) (Langseth *et al.*, 1998; Schollenberger *et al.*, 1998; Krška *et al.*, 2001). In letteratura sono riportati anche metodi in cromatografia liquida accoppiati a rivelazione spettrofluometrica (Kraska *et al.*, 2001; Visconti *et al.*, 2005; Meister *et al.*, 2008) o a spettrometria di massa (Di Mavung *et al.*, 2009, Zachariosova *et al.*, 2010). Tali metodi sono caratterizzati da una buona accuratezza nella determinazione quantitativa delle tossine considerate, tuttavia, poiché richiedono personale altamente specializzato e strumentazioni costose, molti laboratori si sono orientati verso test rapidi, affidabili e semplici da utilizzare per l'analisi di screening come i metodi immunoenzimatici ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Requisito principale per l'accuratezza di un kit ELISA è la specificità dell'anticorpo che deve essere elevata per entrambe le micotossine T-2 ed HT-2, poiché quantificate come somma. Considerando la praticità di utilizzare per l'analisi delle tossine T2-HT2 nei cereali i metodi immunoenzimatici ELISA per una prima scrematura e cromatografici UPLC/FLD (*Ultra Performance Liquid Chromatography- Fluorescence Detector*) per l'analisi di conferma, abbiamo validato-accreditato tali metodi ai sensi della Raccomandazione 2013/165/UE, della norma UNI CEI EN ISO /IEC/17025, del Regolamento (CE) 882/2004, della Decisione 2002/657/CE e del Regolamento (CE) 401/2006, e, successivamente, ricercato tali tossine in cento campioni di alimenti a base di cereali e di mangimi, provenienti dalla regione Puglia (Italia).



Il metodo cromatografico utilizzato è stato quello di Pascale *et al.* (2003). Questo metodo include una purificazione con colonnina di immunoaffinità (IAC) dopo estrazione e una fase di derivatizzazione con 1-anthroilnitrile e 4-dimetilamminopiridina per rilevare la fluorescenza. Per l'analisi immunoenzimatica ELISA abbiamo utilizzato un kit della ditta R-Biopharm, Ridascreen T-2/HT-2.

## Materiali e metodi

### Campionamento

Il campionamento eseguito secondo il Regolamento (CE) 882/2004 e conformemente al Regolamento (CE) 401/2006 e al Regolamento (UE) 519/2014, su 100 campioni di cereali (frumento tenero, grano duro, orzo, mais e avena) provenienti dalla regione Puglia (Italia), è stato eseguito dalla Azienda Sanitaria Locale (ASL) Foggia (Puglia). Tutti i campioni sono stati macinati finemente, utilizzando un mulino della ditta Romer (Manuale di Romer Series II Mil), e omogenizzati per garantire la distribuzione omogenea delle micotossine. I campioni, infine, sono stati conservati in sacchetti di carta a doppio strato o in cotone in ambienti freschi e asciutti al riparo dalla luce fino allo svolgimento delle analisi.

### Analisi Immunoenzimatica

#### Preparazione del campione

5 g del campione, sono stati estratti con un tampone di estrazione. Dopo centrifugazione, il surnatante, diluito con metanolo, è stato utilizzato per il kit ELISA e la lettura spettrofluorimetrica è stata eseguita a 450 nm.

#### Esecuzione del kit

Le analisi sono state effettuate in doppio per ogni singolo campione utilizzando un kit della ditta R-Biopharm, Ridascreen T-2/HT-2.

Le specifiche del kit sono:

- LOQ = 75 µg/kg
- Cross-reattività: HT-2 = 100%  
T-2 = 85%
- Soluzioni standard: 0-3-6-12-36 µg/kg.
- Recupero medio ottenuto in validazione del 102%.

Il kit validato accreditato è controllato periodicamente utilizzando carte di controllo e *Proficiency Test*.

### Analisi strumentale UPLC/FLD

10 g del campione sono stati addizionati con NaCl ed estratti con metanolo-acqua, centrifugati e filtrati. Il filtrato diluito con acqua deionizzata è stato ulteriormente filtrato, ed eluito con metanolo su colonnine di immunoaffinità specifiche per le tossine, portato a secco, e infine derivatizzato con soluzione di 4-Dimetilamminopiridina (DMAP) e 1-anthroilnitrile (1-AN). La miscela di reazione è stata lasciata reagire a 50°C, e raffreddata in ghiaccio, e, dopo evaporazione,

risospesa con 700  $\mu\text{L}$  di acetonitrile e 300  $\mu\text{l}$  di acqua HPLC. L'analisi cromatografica è stata eseguita con un sistema Acquity UPLC H-Class Bio, comprendente una pompa quaternaria, un autocampionatore termostato, una colonna di Acquisizione UPLC BEH-C18 termostata (50x2,1 mm, 1,7  $\mu\text{m}$ ) e un rivelatore di fluorescenza. Le lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione adottate per il rilevamento della fluorescenza sono state rispettivamente 370 e 481 nm. La separazione cromatografica è stata effettuata con una portata di 0,4 mL/min utilizzando un gradiente binario basato su acqua (solvente A) e acetonitrile (solvente B). La temperatura della colonna e dell'autocampionatore sono state impostate rispettivamente a 40°C e 10°C. Il tempo di analisi totale è stato di 10 minuti. Il volume di iniezione è stato di 5 $\mu\text{L}$  con un tempo di ritenzione pari a di 1,9 e 4,2 minuti rispettivamente per T-2, HT-2.

## Risultati e discussione

### Performance di validazione studiate in ELISA

#### Specificità e verifica errore $\beta$

Le prove per la verifica della specificità e dell'errore  $\beta$  (<5%) sono state condotte parallelamente; infatti, a ciascun bianco-campione è stato associato il suo fortificato al livello di interesse della stessa seduta analitica. Pertanto, sono stati testati 20 bianchi-campione rappresentativi dei cereali (grano, mais, avena, orzo e mangimi semplici) e i relativi fortificati additivati a 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$  con lo standard HT-2. Dato l'elevato numero di prove, sono state eseguite due sedute analitiche, come mostrato in Tabella 1.

**Tabella 1. Risultati della selettività (20 campioni bianchi, 20 campioni fortificati a 250  $\mu\text{g kg}^{-1}$  per HT-2) ottenuti nella validazione in ELISA**

N. campione	Prima sessione analitica			N. campione	Seconda sessione analitica		
	Matrice	B/B <sub>0</sub> (%) campione bianco	B/B <sub>0</sub> (%) campione fortificato		Matrice	B/B <sub>0</sub> (%) campione bianco	B/B <sub>0</sub> (%) campione fortificato
1	Grano	0,75	0,3	11	Grano	0,75	0,3
2	Grano	0,75	0,34	12	Grano	0,81	0,35
3	Mais	0,78	0,31	13	Mais	0,79	0,314
4	Mais	0,62	0,3	14	Mais	0,62	0,3
5	Mangime semplice	0,63	0,28	15	Mangime semplice	0,63	0,26
6	Mangime semplice	0,65	0,31	16	Mangime semplice	0,65	0,32
7	Orzo	0,77	0,3	17	Orzo	0,77	0,3
8	Orzo	0,67	0,33	18	Orzo	0,67	0,34
9	Avena	0,65	0,29	19	Avena	0,65	0,26
10	Avena	0,62	0,29	20	Avena	0,63	0,26
<b>Media</b>		0,689	0,305	<b>Media</b>		0,697	0,3004
<b>DS*</b>		0,0655	0,0184	<b>DS*</b>		0,0742	0,0324

\*DS=Deviazione Standard

Per i campioni bianchi, il valore B/B<sub>0</sub> medio ottenuto nella prima seduta analitica è risultato dello 0,689% e dello 0,697 % nella seconda seduta analitica. Lo scarto tipo invece 0,065% nella prima seduta analitica e 0,074% nella seconda seduta analitica. Il valore medio B/B<sub>0</sub> dei campioni fortificati invece è risultato 0,305% prima seduta analitica, 0,3% seconda seduta analitica con uno scarto tipo di 0,018% e 0,032% rispettivamente. La valutazione statistica è stata valutata mediante analisi della varianza (test ANOVA), test Fischer e test di Student tra i segnali dei campioni bianchi e i suoi campioni fortificati al valore di interesse scelto tra le due sessioni. Per entrambe le sessioni, il valore t critico (Stat t) è superiore a quello sperimentale (*One-tail t critical*), quindi è stato verificato che la differenza tra il campione bianco e il corrispondente fortificato è significativamente (P = 0,05) diversa da zero. Viene calcolato, inoltre, il semi-intervallo fiduciario utilizzando la formula:

$$S_0 - \frac{t^* S_0}{\sqrt{n}}$$

Sia per la prima che per la seconda sessione, i campioni fortificati avevano un B/B<sub>0</sub> (%) al di sotto del semi-intervallo fiduciario (65,10 per la prima sessione e 65,40 per la seconda sessione), quindi tutti i 20 fortificati risultano essere “contaminati”. L’errore β è soddisfatto.

### Robustezza

La robustezza è la capacità posseduta da un metodo di non essere influenzato significativamente, in termini di risultati finali, da variazioni deliberatamente introdotte nelle sue fasi di esecuzione. Il test è stato eseguito utilizzando l’approccio di Youden allo stesso livello di concentrazione dell’analita a cui è stata effettuata la verifica dell’errore beta e cioè a 250µg/kg con lo standard HT-2. Il metodo è risultato robusto per i parametri: preparazione campione, apertura kit, centrifugazione campioni, temperatura kit, tempo agitazione manuale, lettura colorimetrica, ditta produttrice del metanolo.

### Precisione

La precisione è stata eseguita su due livelli di fortificazione. Fortificati a 100 µg/kg: valore medio 102,12 µg/kg; scarto tipo = 5,964; recupero = 102%; CV= 6%. Fortificati a 250 µg/kg: valore medio 253,93 µg/kg; scarto tipo = 18,367; recupero =102%; CV= 7% (Tabella 2).

**Tabella 2. Risultati di precisione e recupero in ELISA**

Prove	Fortificati 100 µgkg <sup>-1</sup>	Fortificati 250 µgkg <sup>-1</sup>
#1	97,13	245,83
#2	101,96	255,95
#3	93,84	263,75
#4	110,26	283,63
#5	103,36	230,89
#6	106,19	243,55
Media	102,12	253,93
DS	5,96	18,37
CV%	6	7
Recupero%	102%	102%

## Analisi statistica

Le analisi statistiche sono state condotte con un programma computerizzato calcolando la varianza (ANOVA test), il test di Fisher, il test di Student.

## Performance di validazione dei metodi di conferma (UPLC/FLD)

### Selettività (UPLC/FLD)

Per la valutazione della selettività sono stati testati 20 bianchi campione (grano tenero, frumento duro, avena, mais e orzo) in cui non sono stati trovati composti interferenti al tempo di ritenzione previsto per T-2 e HT-2. Sono stati considerati campioni bianchi quelli con una concentrazione al di sotto di 3 µg/L, limite di rilevabilità del metodo ELISA. I cromatogrammi di Figura 1 mostrano campioni bianchi e campioni additivati con tossine T-2 e HT-2 a 250 µg/kg. La selettività del metodo è stata dimostrata poiché non sono stati rilevati interferenti significativi nell'intorno di tolleranza massima accettata per i tempi di ritenzione dell'analita rispetto ad un campione fortificato (nel caso della LC pari a 2,5%).

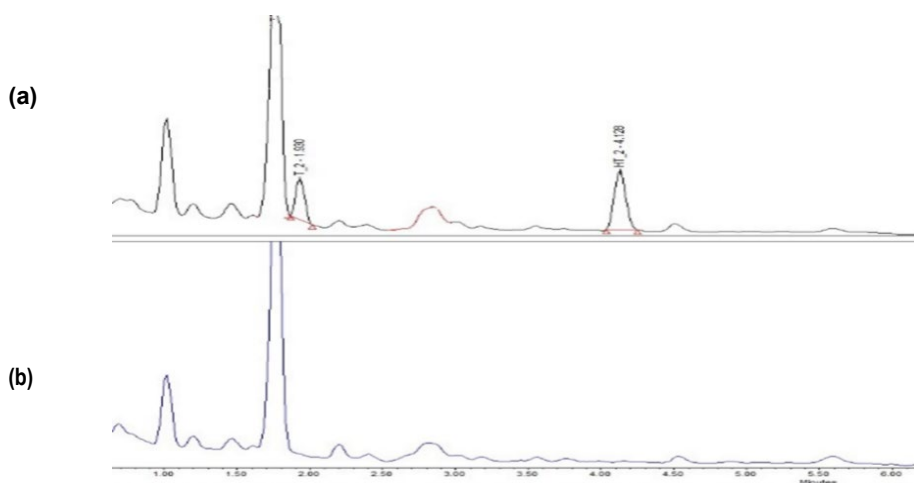


Figura 1. Cromatogramma di un campione di mais additivato (a) e bianco (b)

### Linearità

Tale verifica serve per fissare il range di linearità strumentale e consente di testare le performances del cromatografo utilizzato. Per tale motivo la verifica non prevede la costruzione della retta in matrice, ma solo in solvente in modo da determinare l'intervallo di concentrazione dell'analita in cui sussiste una risposta lineare dello strumento.

Il test di linearità è stato eseguito preparando una curva media in solvente ottenuta iniettando 6 soluzioni standard di tossine T-2 e HT-2 ad una concentrazione di 15, 50, 100, 250, 500 e 1000 µg/L. Mediante il metodo dei minimi quadrati, le coppie di valori concentrazione dello standard, area del picco cromatografico, sono state interpolate ottenendo un ( $R^2 > 0,99$ ). Nello specifico il coefficiente di correlazione calcolato è risultato 0,995 per T-2 e 0,998 per HT-2. I limiti di determinazione e quantificazione sono stati calcolati in base alle seguenti equazioni:  $LOD = 3,9 * S_b / b$  e  $LOQ = 3,3 * X_{lod}$ , dove  $S_b$  è la deviazione standard dei segnali pseudo-bianchi e  $b$  è la pendenza della retta di regressione, ottenuta dalla curva di calibrazione. Si è ottenuto un limite

di quantificazione pari a 29 µg/kg per la T-2 e 19 µg/kg per la HT-2, dati che soddisfano quanto riportato è nella raccomandazione della Commissione del 27 marzo 2013.

### Precisione

Nel presente lavoro è stata valutata la precisione in condizioni di riproducibilità inter e intra-laboratorio, secondo le modalità riportate di seguito. Campioni di cereali sono stati fortificati con una soluzione di micotossina T-2 e HT-2. In particolare sono stati realizzati 6 additivi a 100 µg/kg, 6 additivi a 250 µg/kg e 6 additivi a 500 µg/kg. Si è valutata, quindi, la concentrazione di sei duplicati per ciascun livello di fortificazione ripetendo l'estrazione, purificazione e lettura strumentale in un'altra seduta analitica in cui sono stati variati l'operatore e la taratura del cromatografo liquido. Ai fini della valutazione della precisione del metodo, ciascuna seduta analitica è stata quantificata mediante le curve di taratura costruite con soluzioni standard preparate come descritto nella sezione Linearità. Sui dati ottenuti è stata effettuata, per ciascun livello, l'analisi della varianza (ANOVA) tra le 2 sedute di validazione. Si è calcolato, quindi, lo scarto tipo di ripetibilità (sr) e di riproducibilità (SR) intra-laboratorio e successivamente l'RDS% di ripetibilità e di riproducibilità intra-laboratorio e si è quindi verificato che soddisfacessero i criteri di rendimento del Regolamento (UE) 519/2014 della Commissione europea (Tabella 3).

**Tabella 3. Criteri di rendimento della Commissione per le micotossine T-2/HT-2 secondo il Regolamento (UE) 519/2014**

Concentrazione (µg/kg)	Tossine singole T-2 e HT-2		
	% RDS r	% RSD R	%Recupero
15-250	<30	<50	60-130
>250	<25	<40	60-130

Si riporta nella Tabella 4 il riassunto dei risultati ottenuti.

**Tabella 4. Scarto tipo di ripetibilità e di riproducibilità, deviazione standard di ripetibilità e di riproducibilità ottenuti per le micotossine T-2 e HT-2**

Tossina	Sr	SR	% RDS r	% RSD R
<b>T-2</b>				
Livello 100 µg/kg	12,3	17	13	18
Livello 250 µg/kg	28,6	38,4	10	13
Livello 500 µg/kg	43,9	46	8	8
<b>HT-2</b>				
Livello 100 µg/kg	5,8	6,5	6	7
Livello 250 µg/kg	24,1	51	9	19
Livello 500 µg/kg	39,5	40,6	7	7

In Tabella 5 sono riportati i recuperi medi di T-2 e HT-2 valutati ad ogni livello di fortificazione. Come si può notare, i valori di recupero ottenuti sono sempre superiori a 100 eccetto al livello di fortificazione 100 µg/kg in cui per entrambe le tossine si è riscontrato un recupero leggermente inferiore.

**Tabella 5. Percentuale di recupero ottenuta per le micotossine T-2 e HT-2 durante al validazione in UPLC/FLD**

Tossina	Livello di contaminazione ( $\mu\text{gkg}^{-1}$ )	Recupero (%)
T-2	100	95
	250	118
	500	107
HT-2	100	88
	250	106
	500	108

### Robustezza

Anche per la validazione in cromatografia è stata valutata la robustezza adoperando l'approccio di Youden. Il test di Youden è stato eseguito su campioni di cereali fortificati con 500  $\mu\text{g kg}^{-1}$  di T-2 e HT-2 (Tabella 6). L'analisi dei campioni ha fornito una deviazione standard calcolata della differenza SDi 43  $\mu\text{g kg}^{-1}$  per T-2 e 45  $\mu\text{g kg}^{-1}$  per HT-2, dal momento che SDi, a un livello di confidenza  $P=0,05$ , non è significativamente diverso da SR che è la deviazione standard di riproducibilità allo stesso livello di fortificazione (46 per T-2 e 41 per HT-2), si può concludere che il metodo è robusto.

**Tabella 6. Schema del test di robustezza con l'approccio di Youden**

N. Campioni	Prove							
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8
1	A	A	A	A	a	A	a	a
2	B	B	b	b	B	B	b	b
3	C	c	C	c	C	c	C	c
4	D	D	d	d	d	d	D	D
5	E	e	E	e	e	E	e	E
6	F	f	f	F	F	f	f	F
7	G	g	g	G	g	G	G	g
T-2 ( $\mu\text{g/kg}$ )	576	580	469	497	554	464	596	581
HT-2 ( $\mu\text{g/kg}$ )	615	590	578	477	581	585	636	681

Le lettere maiuscole rappresentano i livelli nominali, ovvero le condizioni esatte stabilite per l'analisi, le lettere minuscole rappresentano le variazioni deliberatamente apportate al metodo:

**A:** filtri in fibra di vetro, **B:** temperatura di bagnomaria (50°C), **C:** tempo di congelamento (10 min), **D:** temperatura della colonna (40°C), **E:** temperatura dell'autocampionatore (10°C), **F:** procedura di derivatizzazione (nello stesso giorno), **G:** analisi cromatografica (nello stesso giorno); **a:** filtro di carta, **b:** temperatura di bagnomaria (45°C), **c:** tempo di congelamento (11 min), **d:** temperatura della colonna (39°C), **e:** temperatura dell'autocampionatore (11°C), **f:** procedura di derivatizzazione (il giorno successivo); **g:** analisi cromatografica (il giorno successivo).

### Incertezza di misura

La valutazione dell'incertezza dei risultati analitici è obbligatoria per i laboratori accreditati secondo la norma ISO 17025 e sono stati proposti diversi metodi per la determinazione di questo parametro (Guida Eurachem, 2000). In questo lavoro abbiamo utilizzato il metodo bottom-up sui dati di convalida ottenuti da ciascuna fase della procedura analitica (NMLK, 2003). Sulla base della legge di propagazione delle incertezze, per ogni tossina l'incertezza relativa della concentrazione è stata calcolata con la seguente equazione:

$$v = \sqrt{[(v(C))^2 + (v(V_f))^2 + (v(w))^2]}$$

dove  $v$  indica l'incertezza relativa,  $C$  è la concentrazione dell'analita nel campione,  $V_f$  è il volume dell'estratto finale e  $w$  è il peso del campione. La determinazione di  $v$  è stata eseguita considerando quattro fonti di incertezza: (a) preparazione dello standard; (b) riproducibilità del metodo; (c) recupero del metodo; (d) curva di calibrazione. Un'incertezza di misura estesa relativa è stata calcolata utilizzando un fattore di copertura  $k=2$ , corrispondente ad un livello di confidenza del 95% (Hund *et al.*, 2001) ottenendo valori di 16,5%, 11%, 6% and 11%, 16%, 6% rispettivamente per T-2 e per HT-2 ai tre livelli di fortificazione (100, 250 e 500  $\mu\text{gkg}^{-1}$ ). Questi risultati sono stati confrontati con la funzione di incertezza ( $U_f$ ), riportata nel Regolamento (CE) 401/2006, per valutare se il metodo di analisi è "adatto allo scopo". Questa funzione, che fornisce il livello di incertezza massima accettabile del metodo, è calcolata dalla seguente equazione:

$$U_f = \sqrt{\left[\left(\frac{LOD}{2}\right)^2 + (\alpha C)^2\right]}$$

dove  $C$  è la concentrazione di interesse e dipende da un fattore costante  $\alpha$ . Le incertezze di misurazione valutate sono considerevolmente inferiori ai valori corrispondenti, ovvero il 18% per ciascun livello di concentrazione (100, 250, 500  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). I risultati sopra riportati confermano che il metodo è "adatto allo scopo".

### Analisi statistica

I risultati della validazione sono stati verificati mediante i seguenti test statistici: analisi della varianza (ANOVA), Shapiro-Wilk, test di Dixon, test di Fisher, test di Student, ad un livello del 95%. L'affidabilità del metodo viene verificata eseguendo le carte di controllo e i Proficiency test.

### Confronto tra il metodo ELISA e UPLC/FLD

La legislazione europea, riguardante l'esecuzione di metodi analitici per la ricerca di residui di droghe e contaminanti ambientali (decisione 2002/657/CE), prevede anche l'uso di metodi di screening. Tecnicamente, i metodi di conferma, generalmente più sofisticati e costosi, possono essere utilizzati anche come primo approccio analitico. Tuttavia, quando è possibile, sia per il laboratorio che per il cliente, è estremamente più conveniente disporre di metodi di screening più rapidi ed economici, che consentono una maggiore produttività esaminando più campioni. La determinazione delle tossine (estrazione e analisi) con il metodo ELISA richiede un tempo di circa 60 minuti mentre, l'UPLC, un tempo più lungo circa tre ore e mezza per la fase di preparazione e dieci minuti per l'analisi cromatografica. È quindi opportuno che il campione sia esaminato prima con un metodo di screening e, solo in caso di positività con metodo di conferma strumentale. La validazione dello screening, infatti, ha lo scopo di eliminare i campioni falsi negativi determinando il  $CC\beta$ , il più piccolo contenuto di sostanza che può essere rilevato, identificato e/o quantificato in un campione con la probabilità di un errore  $\beta$ . L'errore  $\beta$  rappresenta la probabilità che il campione in analisi sia effettivamente non conforme, sebbene sia stata ottenuta una misura conforme (decisione di conformità falsa o decisione di falsa negazione). La percentuale massima di errore  $\beta$  ammessa dalla Decisione 2002/657/CE è del 5%, per cui il nostro metodo rispetta quanto riportato (risultati dello screening ELISA). Dopo la validazione, sono stati testati i due metodi, analizzando 100 campioni di cereali (20 campioni di grano duro, 11 campioni di grano tenero, 15 mais, 31 orzo

e 23 avena) in ELISA e in UPLC/FLD. Tutti i campioni provenivano dalla Capitanata, un'area specifica situata a nord-est della regione Puglia (Italia) sono stati raccolti in campo, quando avevano raggiunto la maturazione ottimale, nel periodo tra maggio e luglio 2018. Il metodo ELISA consente di determinare la somma del contenuto di tossina T-2 e HT-2 in matrice con un limite di rilevabilità di  $75 \mu\text{g kg}^{-1}$ , mentre il metodo UPLC, più sensibile, consente la determinazione delle tossine T-2 e HT-2 con un limite di quantificazione (*Limit of Quantification*, LOQ) di  $29 \mu\text{g kg}^{-1}$  per T-2 e  $19 \mu\text{g kg}^{-1}$  per HT-2. Le specifiche tecniche dei due metodi confrontati sono riportate nella Tabella 9.

**Tabella 9. Caratteristiche tecniche dei due metodi comparati (ELISA e UPLC) applicati ai cereali**

Caratteristica tecnica	ELISA <sup>a</sup>		UPLC/FLD <sup>b</sup>	
	T-2	HT-2	T-2	HT-2
Specificità	No <sup>c</sup>	No <sup>c</sup>	Sì	Sì
Cross reactivity (%)	85	100	100	100
Recupero medio (%)	102	102	106	100
Precisione (%)	6,5 <sup>d</sup>	6,5 <sup>d</sup>	13 <sup>e</sup>	11 <sup>e</sup>
LOQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	75	75	9	5,7
Intervallo di linearità ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	75	75	29-100	19-100
Tempo di analisi	1 ora circa		4 ore circa	

<sup>a</sup> ReadsreenT-2 + HT-2, R-Biopharm

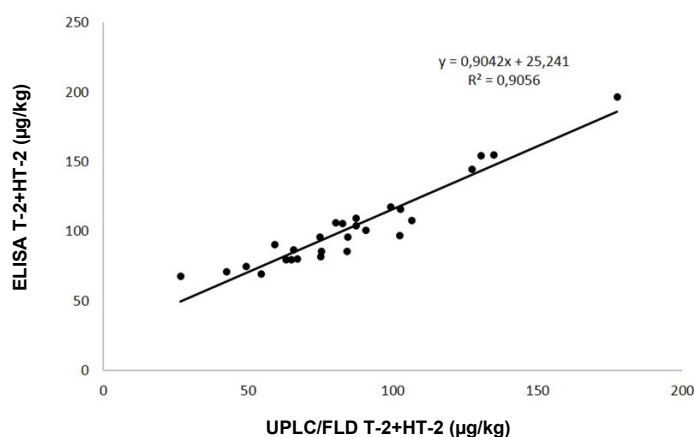
<sup>b</sup> pulizia dell'estratto con le colonne di immunoaffinità Vicam® T-2 e HT-2

<sup>c</sup> somma di T-2 e HT-2

<sup>d</sup> CV% Coefficiente di Variazione

<sup>e</sup> RSD<sub>R</sub> deviazione standard di riproducibilità

Dei 100 campioni analizzati nessun campione è risultato maggiore del limite legale (Raccomandazione n. 165/2012) sia per ELISA che per UPLC/FLD. Confrontando i risultati ottenuti 66 sono risultati non rilevabili sia per ELISA sia per UPLC, 5 campioni invece non erano rilevabili per l'ELISA ma quantificabili per il metodo cromatografico, solo perché, essendo quest'ultimo più sensibile, ha permesso di determinare concentrazioni più basse, 2 campioni erano rilevabili per ELISA ma non per UPLC. Ciò potrebbe essere causato da molecole interferenti che con l'estrazione strumentale sono state invece eliminate grazie ad un maggiore purificazione del campione. I risultati dei restanti 27 campioni sono stati confrontati usando la regressione lineare che ha mostrato una buona correlazione  $R^2=0,9056$ ;  $n=27$  (Figura 2). In generale, l'ELISA ha sovrastimato la concentrazione somma di T-2 e HT-2 di un valore medio del 17% rispetto al metodo UPLC.



**Figura 2. Regressione lineare ELISA vs. UPLC**



## Conclusioni

I risultati della validazione dei metodi, eseguita secondo il Regolamento (CE) 657/2002, dimostrano che le procedure possono essere applicate con successo per analisi accurate di screening e conferma. L'ELISA (Ridascreen T-2/HT-2, R-Biopharm) potrebbe essere il metodo di screening per determinare concentrazioni somma di T-2 e HT-2 nei cereali, mentre il metodo cromatografico verrebbe usato solo per confermare gli eventuali positivi dell'ELISA, in modo da ridurre tempi e costi dell'analisi. Il confronto tra i due metodi, infatti, ha mostrato un buon coefficiente di correlazione, evidenziando l'efficacia dell'utilizzo di entrambi i metodi secondo il protocollo analitico suggerito.

## Bibliografia

- Di Mavung, D, Monbaliu, S, Scippo, ML, Maghuin-Rogister YJ, Schneider Y, Larondelle Y, Callebaut, A, Robbens, J, Van Peteghem, C, De Saeger S. LC-MS/MS multi-analyte method for mycotoxin determination in food supplements *Food Addit. Contam A*, 2009;26:885-95.
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM) Scientific Opinion on the risks for animal and public health related to the presence of T-2 and HT-2 toxin in food and feed. *EFSA Journal* 2011;9(12):2481.
- Ellison SLR, Rosslein M, Williams A (Ed.). *EURACHEM/CITAC Guide* CG 4 2000. Quantifying uncertainty in analytical measurement. 2nd ed. QUAM.2000P1
- Europa. Decisione della Commissione N. 657/2002 del 12 agosto 2002 che attua la direttiva 96/23/CE del Consiglio relativa al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati. *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee* L 221/8 del 17.8.2002
- Europa. Raccomandazione della Commissione N. 165/2013 del 27 marzo 2013 relativa alla presenza di tossine T-2 e HT-2 nei cereali e nei prodotti a base di cereali *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 91/12 del 3.4.2013
- Europa. Regolamento della Commissione (UE) N. 519/2014 del 16 maggio 2014 che modifica il regolamento (CE) n. 401/2006 per quanto riguarda i metodi di campionamento per le grandi partite, per le spezie e gli integratori alimentari, i criteri di rendimento per le tossine T-2 e HT-2 e per la citrinina, nonché i metodi di analisi di screening. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L147/29 del 17/5/2014.
- Europa. Regolamento della Commissione Europea N. 401/2006 del 23 febbraio 2006 relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L70/12 del 9.3.2006
- Europa. Regolamento della Commissione Europea N. 882/2004 del 29 aprile 2004 relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 165 del 30.4.2004
- Hund E, Massart DL, Smeyers-Verbeke J. Operational definitions of uncertainty. *TrAC* 2001;20(8):394-406.
- Krska R, Baumgartner S, Josephs R. The state-of-the-art in the analysis of type-A and -B trichothecene mycotoxins in cereals *Journal of Analytical Chemistry* 2001;371:285-99.
- Langseth W, Rundberget T. Instrumental methods for the determination of nonmacrocytic thricothecenes in cereals, foodstuffs and cultures. *Journal of Chromatography A*. 1998;815:103-21.
- Meister U. Analysis of T-2 and HT-2 toxins in oats and other cereals by means of HPLC with fluorescence detection, *Mycotoxin Research* 2008;24(1):31-9.

- Muscarella M, Lo Magro S, Palermo C, Centonze D. Validation of a confirmatory analytical method for the determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in foods and feed materials by HPLC with on-line photochemical derivatization and fluorescence detection. *Anal Chim Acta* 2007;594:257-64.
- Nordic Committee on Food Analysis. *Estimation and expression of measurement uncertainty in chemical analysis*. 2nd ed. Lyngby: NMKL-NordVal International; 2003. (NMKL-prosedyre nr. 5, 2003)
- Pascale M, Haidukowski M, Visconti J. Determination of T-2 toxin in cereal grains by liquid chromatography with fluorescence detection after immunoaffinity column clean-up and derivatization with 1-anthroylnitrile. *J Chromatogr A* 2003;989:257.
- Schollenberger M, Lauber U, Terry Jara H, Suchy S, Drochner W, Müller H-M. Determination of eight trichothecenes by gas chromatography-mass spectrometry after sample clean-up by a two-stage solid-phase extraction. *J Chromatogr A* 1998;815(1):123-32.
- Sibanda L, De Saeger S, van Peteghem C, Grabarkiewicz-Szczesna J, Tomczak M. Detection of T-2 toxin in different cereals by flow-through enzyme immunoassay with a simultaneous internal reference. *J Agric Food Chem* 2000;48(12):5864-7.
- UNI CEI EN ISO/IEC 17025. *Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2000.
- Visconti A, Lattanzio VMT, Pascale M, Haidukowski M. Analysis of T-2 and HT-2 toxins in cereal grains by immunoaffinity clean-up and liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatography A* 2005;1075:151-8.
- Zachariasova M, Lacina O, Malachova A, Kostelanska M, Poustaka J, Godula M, Hajslova J. Novel approaches in analysis of Fusarium mycotoxins in cereals employing ultra performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 2010; 662:51-61.

# ANALISI DI MICOTOSSINE E TOSSINE VEGETALI IN ALIMENTI E MANGIMI: COSA E COME DOVREMMO MONITORARE?

Emiliano De Dominicis (a), Michela Casarotto (b), Carmela Martire (b), Claudia Finotello (b),  
Simone Carron (b), Samim Saner (a), Fernando Formaggio (c)  
(a) *Mérieux NutriSciences R&D Dept., Resana, Treviso, Italia*  
(b) *Mérieux NutriSciences Contaminant Dept., Resana, Treviso, Italia*  
(c) *Università di Padova, Dipartimento di Chimica, Padova, Italia*

## Introduzione

Le micotossine sono metaboliti secondari tossici prodotti da funghi, che entrano nella filiera alimentare attraverso colture contaminate con cui sono prodotti alimenti e mangimi: la contaminazione può avvenire in campo e/o durante lo stoccaggio. In alcuni casi le micotossine possono essere trasferite agli animali attraverso i mangimi e da qui ai prodotti di origine animale. Le micotossine possono causare malattie e morte sia nell'uomo che negli animali.

Anche le piante possono produrre sostanze, le tossine vegetali, che hanno effetti avversi sulla salute dell'uomo e degli animali. Le tossine vegetali sono molecole bioattive prodotte principalmente dalle piante come difesa naturale contro insetti, animali ecc. Le tossine vegetali entrano nella filiera alimentare, perché sono presenti in colture alimentari oppure a causa della contaminazione con infestanti; alcune possono essere trasferite agli animali attraverso i mangimi e da qui ai prodotti di origine animale.

L'Autorità Europea di Sicurezza Alimentare (*European Food Safety Authority*, EFSA), altre agenzie e organizzazioni internazionali e la comunità scientifica in generale si occupano da tempo dell'analisi del rischio connesso con l'assunzione di micotossine e tossine vegetali attraverso la dieta per l'uomo e gli animali: dalle risultanze di questa analisi sono derivati alcuni limiti massimi tollerabili negli alimenti e nei mangimi, che, per quanto riguarda l'Unione Europea, sono indicati nel Regolamento (CE) 1881/2006 (1) e nella Direttiva 2002/32/CE (2), rispettivamente per alimenti e alimenti per animali e sono stati più volte aggiornati nel corso del tempo. In molti casi l'analisi del rischio è ancora in corso o sono in corso i processi decisionali di gestione del rischio, che porteranno a stabilire nuovi limiti massimi tollerabili per tossine ancora non inserite nella legislazione oppure per nuove combinazioni tossina-alimento (3).

Da queste considerazioni si deduce l'importanza di precorrere i tempi dell'implementazione normativa, sviluppando e applicando metodi analitici idonei alla rilevazione e quantificazione di tossine, quali ad esempio alcaloidi dell'ergot, tossine dell'alternaria, alcaloidi pirrolizidinici, ecc.

Sono stati sviluppati metodi multiresiduali per la determinazione di micotossine e tossine vegetali in conformità ai regolamenti e alle raccomandazioni di riferimento (4-15). In particolare è stato studiato l'uso di standard marcati isotopicamente per massimizzare le prestazioni in termini di accuratezza e precisione a livello di quantificazione.

In Tabella 1 sono elencate le micotossine e tossine vegetali che sono analizzate in alimenti ad uso umano e zootecnico.

Tabella 1. Tossine analizzate e validati in alimenti ad uso umano e zootecnico

Gruppo	Tossina	Gruppo	Tossina
Micotossine e metaboliti	Aflatossina B <sub>1</sub>	Alcaloidi pirrolizidinici	Echimidina
	Aflatossina B <sub>2</sub>		Echimidina-N-ossido
	Aflatossina G <sub>1</sub>		Erucifolina
	Aflatossina G <sub>2</sub>		Erucifolina-N-ossido
	Ocratossina A		Europina
	Fumonisinina B <sub>1</sub>		Europina-N-ossido
	Fumonisinina B <sub>2</sub>		Eliotrina
	Tossina T-2		Eliotrina-N-ossido
	Tossina HT-2		Indicina
	Deossivalenolo		Indicina-N-ossido
	3-Acetildeossivalenolo		Intermedina
	Deossivalenolo-3-glucoside		Intermedina-N-ossido
	Nivalenolo		Jacobina
	Zearalenone		Jacobina-N-ossido
	Alfa-zearalenolo		Lasiocarpina
	Beta-zearalenolo		Lasiocarpina-N-ossido
	Fusarenone X		Licopsamina
	Neosolaniolo		Licopsamina-N-ossido
Diacetossiscirpenolo	Monocrotalina		
Acido Tenuzoico	Monocrotalina-N-ossido		
Tossine Alternaria	Tentossina	Retrorsina	
	Alternariolo	Retrorsina-N-ossido	
	Alternariolo-9-metil etere	Senecionina	
	Altenuene	Senecionina-N-ossido	
Alcaloidi dell'ergot	Ergocornina	Senefillina	
	Ergocorninina	Senefillina-N-ossido	
	Ergocristina	Senecivernina	
	Ergocristinina	Senecivernina-N-ossido	
	Ergocriptina	Senkirkina	
	Ergocriptinina	Tricodesmina	
	Ergometrina	Scopolamina	
	Ergometrinina	Atropina	
	Ergosina	Anisodamina	
	Ergosinina	Atropina N-ossido	
Alcaloidi	Ergotamina	Alfa-solanina	
	Ergotaminina	Alfa-Caconina	
Alcaloidi Tropanici			
Glicoalcaloidi			

## Materiali e metodi

### Preparazione del campione

Considerando quanto riportato nella recente letteratura scientifica a livello di sviluppo di metodi per la determinazione di tossine e alcaloidi (10, 16-39), la preparazione del campione sviluppata prevede una fase di estrazione con solvente e/o miscela di solventi appropriati. Ad esempio, mentre la maggior parte delle micotossine sono estraibili da ambienti acquosi con solventi organici basso pH, gli alcaloidi dell'ergot necessitano di soluzioni a pH basico per poter essere efficacemente estratti in solventi organici (10).

In funzione della categoria di tossine e della matrice in esame, l'estratto del campione viene quindi sottoposto a diversi tipi di purificazione: liquido/liquido, *Dispersive Solid Phase Extraction*, *Solid Phase Extraction*, filtrazioni o colonnine di immunoaffinità. Il campione estratto

e purificato viene infine solubilizzato e sottoposto ad analisi strumentale in cromatografia liquida abbinata alla spettrometria di massa (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, LC-MS/MS) e/o cromatografia liquida abbinata alla spettrometria di massa ad alta risoluzione (*Liquid Chromatography- High Resolution Mass Spectrometry*, LC-HRMS).

## Spettrometria di massa tandem a bassa risoluzione

La spettrometria di massa è la tecnica analitica di elezione per contaminanti come micotossine e alcaloidi (molecole a bassi livelli di concentrazione) in matrici alimentari, in quanto permette di ottenere elevate performances in termini di selettività e di sensibilità in matrici complesse, sia a livello qualitativo, che a livello quantitativo. Il recente approccio multi-residuale consente, rispetto al passato, maggiore sostenibilità generale a livello di tempi di esecuzione e di costi correlati, oltre che maggiore affidabilità dei risultati. Questo significa, in termini industriali, possibilità di azione/reazione sul mercato efficace, tempestiva e rapida.

Un aspetto tecnico-scientifico importante legato all'utilizzo della spettrometria di massa è quello relativo all'utilizzo di standard interni marcati, che possono essere di prima generazione, quindi con deuterio al posto di idrogeno, oppure di seconda generazione, quindi con C<sub>13</sub> e/o N<sub>15</sub> al posto di C<sub>12</sub> e/o N<sub>14</sub>.

Tali standard consentono di affrontare in maniera opportuna due punti importanti correlati alle analisi residuali: l'effetto matrice e l'efficacia estrattiva in termini di recupero (40-47). Complessivamente questo significa analisi residuali sempre più precise e più accurate, quindi in generale più affidabili, soprattutto in matrici complesse e difficili, sia in termini di prodotti destinati ad uso umano (per adulti, ma soprattutto per l'infanzia), che ad alimentazione animale.

## Spettrometria di massa ad alta risoluzione

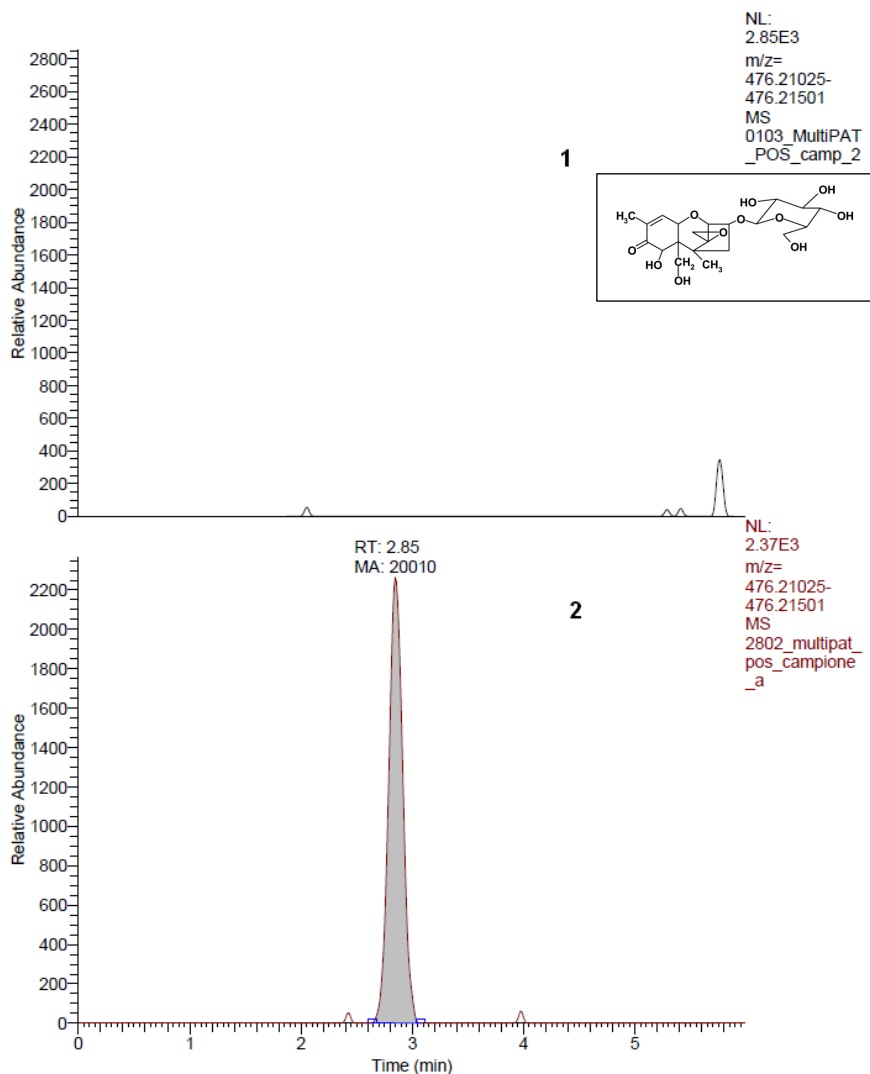
Nei casi di matrici complesse, dove è sorta la necessità di migliorare ulteriormente la selettività, ci si è approcciati all'analisi in spettrometria di massa ad alta risoluzione (HMRS): con tale tecnica è stato possibile studiare gli spettri di massa esatta, utilizzandoli sia per l'analisi quantitativa, che qualitativa, a livello di screening mirato e a livello di screening non mirato (*Non Targeted Screening*), che ha consentito l'identificazione a posteriori di tossine e/o metaboliti/prodotti correlati non attesi e/o non noti (48-50).

In Figura 1 si riporta un esempio relativo a due estratti di prodotti da forno la cui analisi mirata aveva subito evidenziato la presenza di deossinivalenolo (DON) in uno dei due campioni.

Successivamente l'approccio HRMS aveva consentito di rilevare nel campione in cui era stata rilevata la presenza di DON, anche la presenza del metabolita deossinivalenolo-3-glucoside (DON-3-glucoside) successivamente confermato e quantificato.

## Risultati e discussione

Metodi di estrazione e di purificazione del campione efficaci combinati con opportuni utilizzi della spettrometria di massa e con l'impiego di materiali di riferimento isotopicamente marcati di prima e seconda generazione, portano a buoni risultati in termini di selettività e sensibilità in matrici complesse, oltre che a livello di accuratezza e precisione.



**Figura 1. Cromatogrammi HRMS di deossinivalenolo-3-glucoside (DON-3-glucoside) in prodotti da forno: la parte alta (1) mostra assenza di DON-3-glucoside mentre il tracciato in basso (2) consente di ipotizzare la presenza di DON-3-glucoside**

In Figura 2 sono riportati due campioni: un peperoncino con un'alta concentrazione di fumonisin B<sub>1</sub> (> 300 µg/kg) e una paprika avente una concentrazione < LOQ (*Limit of Quantification*) (con LOQ = 10 µg/kg).

Il protocollo di validazione utilizzato ha previsto l'esecuzione di test a livello di: linearità, recupero (a diversi livelli di concentrazione), effetto matrice, precisione, accuratezza, limiti di quantificazione e rilevabilità. I risultati della validazione e dei controlli di qualità confermano l'efficacia complessiva dei metodi sviluppati e applicati.

Nelle Tabelle da 2 a 7 si riportano esempi/estratti dell'analisi dei dati di validazione per 2 micotossine e 4 alcaloidi in diverse matrici (principalmente cereali, farine, prodotti da forno e di gastronomia ed estratti secchi) a diversi livelli di concentrazione, vale a dire il LOQ e 10xLOQ.

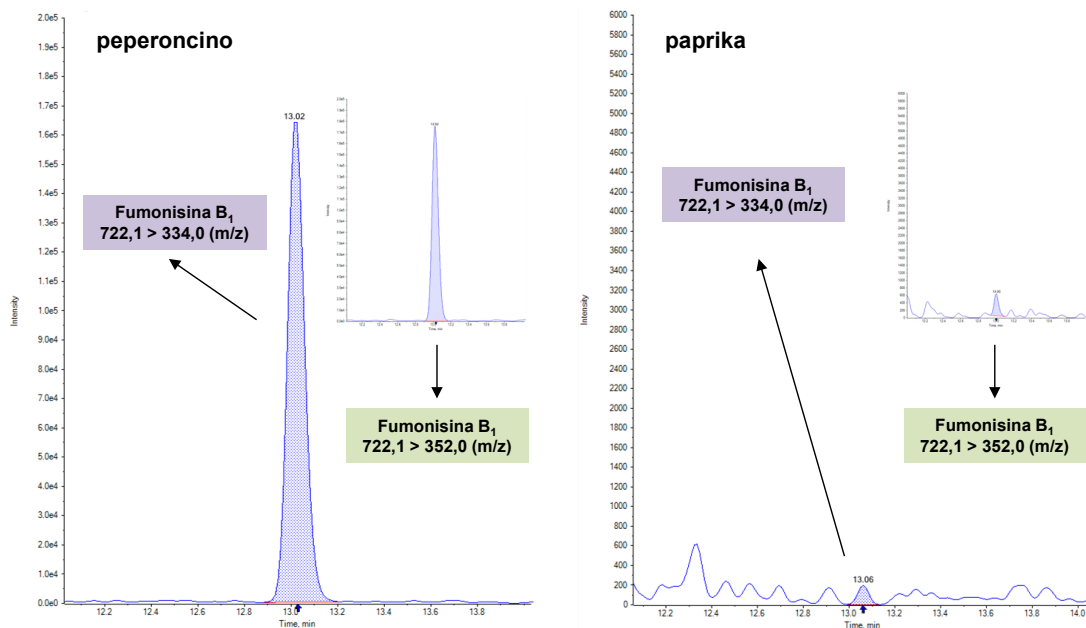


Figura 2. Fumonisin B<sub>1</sub>: cromatogramma LC-MS/MS in peperoncino e paprika

Tabella 2. Analisi di dati di validazione del deossinivalenolo

Dati statistici			
CV	9,8%	Recupero <sub>m</sub>	69,7%
r	27,1%	s(Recupero)	6,8%
N	28	N	28
Gradi di libertà	14	s(Recupero <sub>m</sub> )	1,3%
N medio	14	Recupero <> 100%	TRUE

Tabella 3. Analisi di dati di validazione della tossina T2

Dati statistici			
CV	10,7%	Recupero <sub>m</sub>	79,5%
r	29,6%	s(Recupero)	10,6%
N	28	N	28
Gradi di libertà	14	s(Recupero <sub>m</sub> )	2,0%
N medio	14	Recupero <> 100%	TRUE

Tabella 4. Analisi di dati di validazione dell'atropina

Dati statistici			
CV	10,4%	Recupero <sub>m</sub>	65,1%
r	28,7%	s(Recupero)	13,5%
N	103	N	103
Gradi di libertà	78	s(Recupero <sub>m</sub> )	1,3%
N medio	25	Recupero <> 100%	TRUE

**Tabella 5. Analisi di dati di validazione della scopolamina**

Dati statistici			
CV	11,4%	Recupero <sub>m</sub>	78,0%
r	31,7%	s(Recupero)	13,2%
N	103	N	103
Gradi di libertà	78	s(Recupero <sub>m</sub> )	1,3%
N medio	25	Recupero <> 100%	TRUE

**Tabella 6. Analisi di dati di validazione echimidina**

Dati statistici			
CV	14,6%	Recupero <sub>m</sub>	88,5%
r	40,4%	s(Recupero)	19,0%
N	64	N	64
Gradi di libertà	45	s(Recupero <sub>m</sub> )	2,4%
N medio	19	Recupero <> 100%	TRUE

**Tabella 7. Analisi di dati di validazione senecionina**

Dati statistici			
CV	17,1%	Recupero <sub>m</sub>	86,5%
r	47,3%	s(Recupero)	21,2%
N	64	N	64
Gradi di libertà	45	s(Recupero <sub>m</sub> )	2,7%
N medio	19	Recupero <> 100%	TRUE

Particolare importanza riveste il ruolo della robustezza del metodo in relazione alle diverse matrici che vengono sottoposte ad analisi: tale parametro viene costantemente monitorato, anche grazie alla partecipazione a circuiti interlaboratorio (*Proficiency Test*, PT) e utilizzo di Matrici di Riferimento Certificate (CRM).

L'applicazione in routine del metodo validato viene monitorata e verificata con regolarità mediante Campioni di Controllo di Processo (*Process Control Sample*, PCS) e analisi di campioni bianchi di processo opportunamente inseriti in ogni lotto di campioni.

Oltre alle tossine validate ed elencate in Tabella 1, è previsto, per il prossimo futuro, un continuo lavoro di sviluppo/validazione/accreditamento di metodi per la determinazione di tossine non ancora monitorate: un esempio è l'attività di ricerca e sviluppo per l'analisi di enniatine e beauvericina. Parallelamente è in atto un processo costante di ricerca e messa a punto di metodi sempre più performanti, sia in termini tecnico-scientifici (a livello di selettività e sensibilità), che in termini di sostenibilità economica (costo/prezzo e tempo di esecuzione). Infine attraverso la diffusione e l'utilizzo di approcci di screening non mirati basati su HRMS e MS/HRMS si migliorerà sempre di più la capacità di rilevare e identificare metaboliti e relativi prodotti di degradazione.

## Bibliografia

1. Europa. Regolamento (CE) n. 1881/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006, che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione europea* L 364 del 20.12.2006.



2. Europa. Direttiva 2002/32/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 7 maggio 2002 relativa alle sostanze indesiderabili nell'alimentazione degli animali. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione europea* L 140 del 30 maggio 2002.
3. Food Standard Agency. *June 2019 Stakeholder Update on Rapidly Developing Policy on Food Contaminants*. London: FSA; 2019. Disponibile all'indirizzo <https://www.food.gov.uk/news-alerts/consultations/june-2019-stakeholder-update-on-rapidly-developing-policy-on-food-contaminants?navref=breadcrumb>; ultima consultazione 19/09/2019.
4. Europa. Regolamento (CE) n. 401/2006 della Commissione del 23 febbraio 2006 relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione europea* L 70 del 9 marzo 2006.
5. Europa. Regolamento (UE) n. 519/2014 che modifica il Regolamento (CE) 401/2006 per quanto riguarda i metodi di campionamento per le grandi partite, per le spezie e gli integratori alimentari, i criteri di rendimento per le tossine T-2 e HT-2 e per la citrinina, nonché i metodi di analisi di screening. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione europea* L 147 del 17 maggio 2014.
6. Muldera PPJ, López Sánchez P, Theseb A, Preiss-Weigertb A, Castellaric M. Occurrence of Pyrrolizidine Alkaloids in food. *EFSA Supporting Publications* 2015:EN-859.
7. Agenzia Italiana del Farmaco, Ufficio Autorizzazioni Officine. Richiesta di verifica del contenuto di Alcaloidi Pirrolizidinici nei medicinali contenenti sostanze attive di origine vegetale. AIFA/UAO/P/53321 del 19 maggio 2016.
8. Europa. Raccomandazione della Commissione del 15 marzo 2012 sul controllo della presenza di alcaloidi della *Claviceps* spp. in alimenti e mangimi. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione europea* L 77 del 16 marzo 2012.
9. Europa. Regolamento (UE) 2015/1940 della Commissione, del 28 ottobre 2015, che modifica il regolamento (CE) n. 1881/2006 per quanto riguarda i tenori massimi di sclerozidi di *Claviceps* spp. in taluni cereali non trasformati e le disposizioni in materia di monitoraggio e relazioni. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione europea* L 283 del 29 ottobre 2015.
10. European Food Safety Authority. Scientific Opinion on Ergot alkaloids in food and feed. *EFSA Journal* 2012;10(7):2798.
11. Europa. Regolamento (UE) 2016/239 della Commissione, del 19 febbraio 2016, recante modifica del regolamento (CE) n. 1881/2006 per quanto riguarda i tenori massimi di alcaloidi tropanici in determinati alimenti a base di cereali destinati ai lattanti e ai bambini. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione europea* L 45 del 20 febbraio 2016.
12. European Food Safety Authority. Scientific Opinion on Tropane alkaloids in food and feed. *EFSA Journal* 2013;11(10):3386.
13. European Food Safety Authority-Unit on Biological Hazards and Contaminants. *Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain. Minutes of the 85th Plenary meeting*. Parma: EFSA; 2017. Disponibile all'indirizzo: <https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/event/170704-m.pdf>; ultima consultazione: 15/05/2019.
14. European Commission, Health and Food Safety Directorate-General. *Summary report of the Standing Committee on Plants, Animals, Food and Feed held in Brussels on 23 June 2015*. Disponibile all'indirizzo: [https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/reg-com\\_toxic\\_20150623\\_sum.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/reg-com_toxic_20150623_sum.pdf); ultima consultazione: 09/05/2019.
15. European Medicines Agency. *Public statement on contamination of herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products with pyrrolizidine alkaloids*. London: EMA; 2016. (EMA/HMPC/328782/2016). Disponibile all'indirizzo: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/public-statement/public-statement-contamination-herbal-medicinal-products/traditional-herbal-medicinal-products-pyrrolizidine-alkaloids\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/public-statement/public-statement-contamination-herbal-medicinal-products/traditional-herbal-medicinal-products-pyrrolizidine-alkaloids_en.pdf); ultima consultazione: 09/05/2019.

16. Turner NW, Bramhmbhatt H, Szabo-Vezse M, Poma A, Coker R, Piletsky SA. Analytical methods for determination of mycotoxins: An update (2009–2014). *Anal Chim Acta* 2015;901:12-33.
17. Winkler J, Kersten S, Valenta H, Meyer U, Engelhardt UH, Dänicke S. Development of a multi-toxin method for investigating the carryover of zearalenone, deoxynivalenol and their metabolites into milk of dairy cows. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 2015;32(3):371-80.
18. De Baere S, Osselaere A, Devreese M, Vanhaecke L. Development of a liquid–chromatography tandem mass spectrometry and ultra-high-performance liquid chromatography high-resolution mass spectrometry method for the quantitative determination of zearalenone and its major metabolites in chicken and pig plasma. *Anal Chim Acta* 2012;756:37-48.
19. Walravens J, Mikula H, Rychlik M, Asam S, Ediage EN, Di Mavungu JD, Van Landschoot A, Vanhaecke L, De Saeger S. Development and validation of an ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometric method for the simultaneous determination of free and conjugated *Alternaria* toxins in cereal-based foodstuffs. *J Chromatogr A* 2014;1372C:91-101.
20. De Santis B, Debegnach F, Gregori E, Russo S, Marchegiani F, Moracci G, Brera C. Development of a LC-MS/MS Method for the multi-mycotoxin determination in composite cereal-based samples. *Toxins (Basel)* 2017;9(5):E169.
21. Capriotti AL, Caruso G, Cavaliere C, Foglia P, Samperi R, Laganà A. Multiclass mycotoxin analysis in food, environmental and biological matrices with chromatography/mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 2012;31(4):466-503.
22. Breidbach A, Bouten K, Kroeger-Negiota K, Stroka J, Ulberth F (Ed.). *LC-MS based method of analysis for the simultaneous determination of four mycotoxins in cereals and feed*. Luxembourg: Publications Office of the European Union; 2013.
23. Wang S, Kong WJ, Yang MH. Simultaneous determination of 11 mycotoxins in malt by isotope internal standard-UPLC-MS/MS. *Acta Pharm Sin.* 2016;51(01):110-5.
24. Vukovic G, Kos J, Bursic V, Colovic R. Determination of multiple mycotoxins in maize using QuEChERS sample preparation and LC-MS/MS detection. *Matica Srpska J Nat Sci* 2017;133:123-30.
25. Qian M, Yang H, Li Z, Liu Y, Wang J, Wu H, Ji X, Xu J. Detection of 13 mycotoxins in feed using modified QuEChERS with dispersive magnetic materials and UHPLC–MS/MS. *J Sep Sci* 2018;41(3):756-64.
26. Kim DH, Hong SY, Kang JW, Cho SM, Lee KR, An TK, Lee C, Chung SH. Simultaneous determination of multi-mycotoxins in cereal grains collected from South Korea by LC/MS/MS. *Toxins (Basel)* 2017;9(3): E106.
27. Berthiller F, Brera C, Iha MH, Krska R, Lattanzio VMT, MacDonald S, Malone RJ, Maragos C, Solfrizzo M, Stranska-Zachariasova M, Stroka J, Tittlemier SA. Developments in mycotoxin analysis: an update for 2015-2016. *World Mycotoxin J* 2017;10(1): 5-29.
28. Zhou J, Xu JJ, Cai ZX, Huang BF, Jin MC, Ren YP. Simultaneous determination of five *Alternaria* toxins in cereals using QuEChERS-based methodology. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2017;1068-9:15-23.
29. Saldan NC, Almeida RTR, Avíncola A, Porto C, Galuch MB, Magon TFS, Pilau EJ, Svidzinski TIE, Oliveira CC Development of an analytical method for identification of *Aspergillus flavus* based on chemical markers using HPLC-MS. *Food Chem* 2018;241:113-21.
30. Varga E, Glauner T, Berthiller F, Krska R, Schuhmacher R, Sulyok M. Development and validation of a semi-quantitative UHPLC-MS/MS method for the determination of 191 mycotoxins and other fungal metabolites in almonds, hazelnuts, peanuts and pistachios. *Anal Bioanal Chem* 2013;405(15):5087-104.
31. Rodríguez-Carrasco Y, Mañes J, Berrada H, Juan C. Development and validation of a LC-ESI-MS/MS method for the determination of *Alternaria* toxins alternariol, alternariol methyl-ether and tentoxin in tomato and tomato-based products. *Toxins (Basel)* 2016;8(11):E328.

32. Malachová A, Stránská M, Václavíková M, Elliott CT, Black C, Meneely J, Hajšlová J, Ezekiel CN, Schuhmacher R, Krska R. Advanced LC–MS-based methods to study the co-occurrence and metabolization of multiple mycotoxins in cereals and cereal-based food. *Anal Bioanal Chem* 2018;410(3):801-25.
33. Schenzel J, Forrer HR, Vogelgsang S, Bucheli TD. Development, validation and application of a multi-mycotoxin method for the analysis of whole wheat plants. *Mycotoxin Res* 2012;28(2):135-47.
34. Malachová A, Sulyok M, Beltrán E, Berthiller F, Krska R. Optimization and validation of a quantitative liquid chromatography–tandem mass spectrometric method covering 295 bacterial and fungal metabolites including all regulated mycotoxins in four model food matrices. *J Chromatogr A* 2014;1362:145-56.
35. Trufelli H, Palma P, Famigliani G, Cappiello A. An overview of matrix effects in liquid chromatography–mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 2011;30(3):491-509.
36. Marschik S, Hepperle J, Lauber U, Schnauffer R, Maier S, Kühn C, Schwab-Bohnert G. Extracting fumonisins from maize: efficiency of different extraction solvents in multi-mycotoxin analytics. *Mycotoxin Res* 2013;29(2):119-29.
37. Lacina O, Zachariasova M, Urbanova J, Vaclavikova M, Cajka T, Hajslova J. Critical assessment of extraction methods for the simultaneous determination of pesticide residues and mycotoxins in fruits, cereals, spices and oil seeds employing ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2012;1262:8-18.
38. Sun J, Li W, Zhang Y, Hu X, Wu L, Wang B. QuEChERS purification combined with ultrahigh-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for simultaneous quantification of 25 mycotoxins in cereals. *Toxins (Basel)* 2016;8(12):E375
39. De Saeger S, Audenaert K, Croubels S. Report from the 5th International symposium on mycotoxins and toxigenic Moulds: challenges and perspectives (MYTOX) held in Ghent, Belgium, May 2016. *Toxins (Basel)* 2016;8(5):E146
40. Rychlik M, Asam S. Stable isotope dilution assays in mycotoxin analysis. *Anal Bioanal Chem* 2008;390(2):617-28
41. Varga E, Glauner T, Köppen R, Mayer K, Sulyok M, Schuhmacher R, Krska R, Berthiller F. Stable isotope dilution assay for the accurate determination of mycotoxins in maize by UHPLC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem* 2012;402(9):2675-86.
42. Zhang K, Wong JW, Krynitsky AJ, Trucksess MW. Determining mycotoxins in baby foods and animal feeds using stable isotope dilution and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 2014;62(36):8935-43.
43. Gao B, Jiang D, Yang Y. Simultaneous determination of five mycotoxins in various grains and their products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with isotope internal standard. *Se Pu* 2017;35(6):601-7.
44. Zhang K, Liao CD, Prakash S, Conway M, Cheng HF. Interlaboratory Validation of a Stable Isotope Dilution and Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Method for the Determination of Aflatoxins in Milk, Milk-Based Infant Formula, and Feed. *J AOAC Int* 2018;101(3):677-85.
45. Zhang K, Schaab MR, Southwood G, Tor ER, Aston LS, Song W, Eitzer B, Majumdar S, Lapainis T, Mai H, Tran K, El-Demerdash A, Vega V, Cai Y, Wong JW, Krynitsky AJ, Begley TH. A Collaborative Study: determination of mycotoxins in corn, peanut butter, and wheat flour using Stable Isotope Dilution Assay (SIDA) and Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). *J Agric Food Chem* 2017;65(33):7138-52.
46. Asam S, Rychlik M. Recent developments in stable isotope dilution assays in mycotoxin analysis with special regard to *Alternaria* toxins. *Anal Bioanal Chem* 2015;407(25):7563-77.
47. Habler K, Gotthardt M, Schüller J, Rychlik M. Multi-mycotoxin stable isotope dilution LC–MS/MS method for *Fusarium* toxins in beer. *Food Chem* 2017;218:447-54.

48. De Dominicis E, Commissati I, Suman M. Targeted screening of pesticides, veterinary drugs and mycotoxins in bakery ingredients and food commodities by liquid chromatography-high-resolution single-stage Orbitrap mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2012;47(9):1232-41.
49. De Dominicis E, Commissati I, Gritti E, Catellani D, Suman M. Quantitative targeted and retrospective data analysis of relevant pesticides, antibiotics and mycotoxins in bakery products by liquid chromatography-single-stage Orbitrap mass spectrometry. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 2015;32(10):1617-27.
50. Righetti L, Paglia G, Galaverna G, Dall'Asta C. Recent advances and future challenges in modified mycotoxin analysis: why HRMS has become a key instrument in food contaminant research. *Toxins (Basel)* 2016;8(12):E361.

# SPETTROSCOPIA INFRAROSSA PER L'ANALISI RAPIDA DI CAMPIONI DI FRUMENTO E CRUSCA CONTAMINATI DA MICOTOSSINE

Annalisa De Girolamo (a), Marina Cortese (a), Christoph von Holst (b), Michelangelo Pascale (a), Francesco Longobardi (c), Lucia Catucci (c), Antonio F. Logrieco (a), Porricelli Anna C.R. (a), Vincenzo Lippolis (a)

(a) *Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari, Italia*

(b) *Joint Research Centre, European Commission, Geel, Belgio*

(c) *Dipartimento di Chimica, Università degli Studi di Bari "A. Moro", Bari, Italia*

## Introduzione

Il frumento rappresenta il principale cereale consumato in tutto il mondo tipicamente sotto forma di pane, pasta, cereali per colazione, biscotti, torte e pasticcini.

Anche la crusca viene considerata un alimento importante per l'alimentazione umana in quanto ricco di fibre e numerosi oligoelementi.

Tuttavia i cereali sono soggetti a contaminazione da micotossine e tra queste vanno menzionate, per tossicità e frequenza di contaminazione, l'ocratossina A (OTA) e il deossinivalenolo (DON) (1, 2).

Al fine di preservare l'esposizione del consumatore alle micotossine, la Commissione Europea ne ha definito i tenori massimi ammissibili nei cereali e prodotti derivati (3).

Per tale ragione si rende necessaria la disponibilità di metodi rapidi di screening per valutare la conformità dell'alimento alla legislazione vigente e ridurre il numero di campioni da sottoporre ad analisi di conferma, con notevoli risparmi sia in termini di tempo che di costi.

La spettroscopia infrarossa (IR) è una tecnica non distruttiva, rapida, facile da utilizzare, poco costosa e che non richiede particolari preparazioni del campione.

Negli ultimi anni, la spettroscopia IR è stata utilizzata per la rilevazione di micotossine, principalmente del DON in campioni di frumento duro affetti da fusariosi, e in minor misura per la rilevazione di altre micotossine quali OTA, fumonisine e aflatossine, e dei relativi funghi produttori in cereali e prodotti derivati (4-5).

Scopo del presente studio è stato quello di valutare la possibilità di usare la spettroscopia IR trasformata di Fourier nel vicino (FT-NIR, *Fourier Transform Near-Infrared*) e medio (FT-MIR, *Fourier Transform Mid-Infrared*) infrarosso per la classificazione di campioni di frumento e crusca di frumento sulla base dei livelli di contaminazione rispettivamente di OTA e DON.

A tale scopo sono stati applicati i modelli statistici multivariati di *linear discriminant analysis* (LDA) e *partial least squares discriminant analysis* (PLS-DA).

Si è proceduto quindi con la valutazione delle prestazioni analitiche dei modelli sviluppati al fine di valutare l'intervallo spettrale e il modello statistico più appropriato per l'analisi di OTA nel frumento e di DON nella crusca di grano duro.

## Materiali e metodi

### Analisi di DON nel frumento duro e OTA nella crusca mediante spettroscopia a trasformata di Fourier nel vicino e medio infrarosso

Lo studio è stato condotto su 229 campioni di frumento duro e su 94 campioni di crusca di frumento duro di differenti varietà e provenienti da diverse regioni italiane e annate agrarie (2011-2015) e contaminati naturalmente rispettivamente con OTA e DON. Ciascun campione è stato macinato (granulometria  $\leq 500 \mu\text{m}$ ) e analizzato mediante spettroscopia FT-NIR e FT-MIR. Parallelamente ciascun campione è stato analizzato con un metodo di riferimento comunemente utilizzato per la determinazione quantitativa di DON e OTA nei cereali e basato sull'utilizzo di colonnine ad immunoaffinità e analisi HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) (6-7).

L'analisi mediante FT-NIR e FT-MIR è stata condotta utilizzando uno spettrofotometro IR modello iS50TM (Thermo Scientific, Madison, WI, USA) in grado di lavorare in riflessione diffusa e in riflessione totale riflessa. Gli spettri di assorbanza sono stati registrati nell'intervallo  $10000\text{-}4000 \text{ cm}^{-1}$  nel caso del NIR e  $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$  nel caso del MIR (Figura 1). Il tempo di analisi per ciascun campione è risultato inferiore a 2 min per l'analisi FT-NIR e 30 sec per l'analisi FT-MIR.

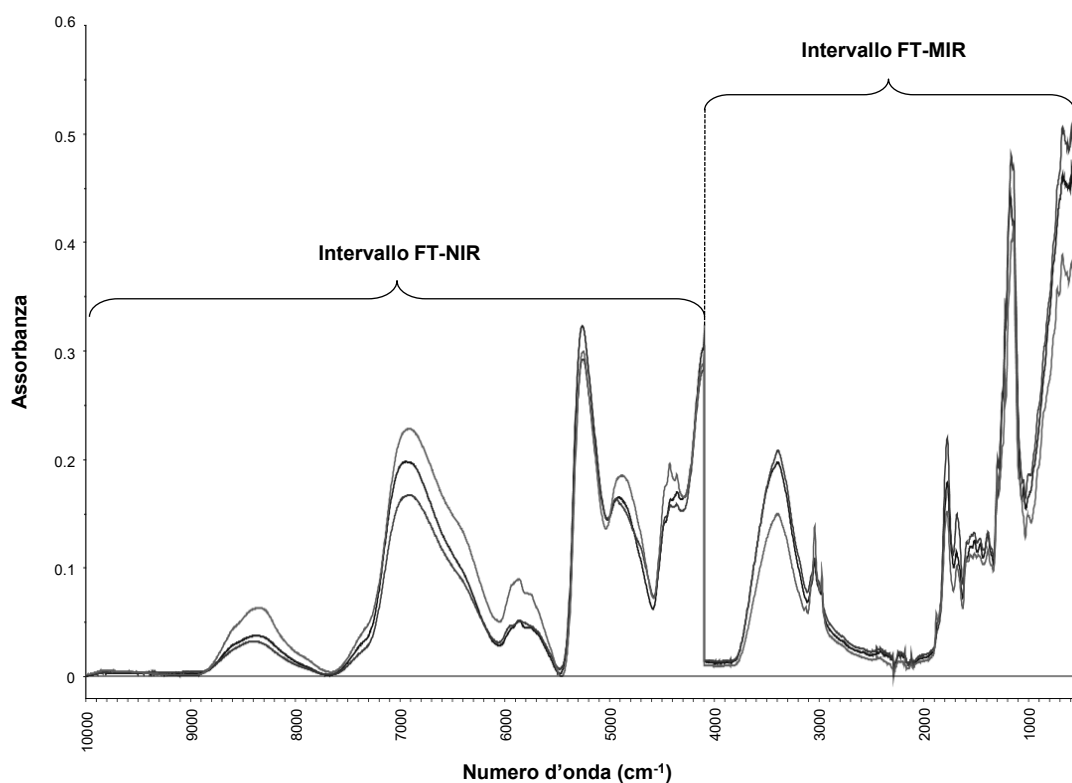


Figura 1. Esempio di spettri FT-NIR e FT-MIR di tre differenti campioni di crusca contaminati naturalmente da deossinivalenolo

I dati spettrali FT-NIR e FT-MIR sono stati correlati con i valori di riferimento HPLC ed elaborati statisticamente applicando i modelli statistici multivariati di *Linear Discriminant Analysis* (LDA) e *Partial Least Squares-Discriminant Analysis* (PLS-DA). Prima di procedere con lo sviluppo dei modelli qualitativi è stato necessario pretrattare opportunamente i dati spettrali per rimuovere le differenze spettrali di tipo moltiplicativo o minimizzare eventuali altre sorgenti indesiderate di varianza (6-8). Ciascun modello è stato sviluppato utilizzando il 70% circa dei campioni del set e validato sul restante 30%.

## Analisi statistica multivariata

Per la discriminazione dei campioni in due classi si è scelto un valore soglia pari a 2 µg/kg di OTA per il frumento e a 400 µg/kg di DON per la crusca di frumento, entrambi ben al di sotto dei tenori massimi ammissibili per il DON in crusca di grano (750 µg/kg) e OTA nei cereali (5 µg/kg) (3). I campioni sono stati classificati come conformi se [micotossina] ≤ valore soglia (classe A) e come non conformi se [micotossina] > valore soglia (classe B).

Le prestazioni dei modelli sviluppati per i dati relativi ai range spettrali FT-NIR e FT-MIR sono stati valutati confrontando le performance di predizione in termini di discriminazione totale (DT, % di campioni classificati correttamente), falsi conformi (FC, % di campioni erroneamente classificati come classe A) e falsi sospetti (FNC, % di campioni erroneamente classificati come classe B).

## Risultati e discussione

La Tabella 1 riassume i valori delle prestazioni dei modelli sviluppati ottenuti in predizione per i campioni di frumento contaminati da OTA applicando i due approcci statistici di classificazione (PLS-DA e LDA) nei range spettrali FT-NIR e FT-MIR. Indipendentemente dall'intervallo spettrale considerato, entrambi gli approcci statistici impiegati hanno mostrato una discriminazione totale (DT) intorno al 95%, con un tasso di “falsi conformi” (FC) e di “falsi sospetti” (FNC) entrambi minore del 6% (6). L'alto tasso di discriminazione generale, la bassa percentuale di campioni FC e FNC (addirittura assenti nel caso dei dati FT-MIR) indicano che la spettroscopia FT-IR (sia impiegando il vicino sia il medio infrarosso) è una promettente tecnica di screening economica, non-distruttiva e di facile utilizzo per l'analisi di OTA nel frumento.

**Tabella 1. Risultati di validazione dei modelli di classificazione PLS-DA e LDA di campioni di frumento contaminati da OTA e analizzati mediante spettroscopia FT-NIR e FT-MIR. Per la divisione dei campioni in due classi è stato fissato un *cut-off* di 2 µg/kg di OTA**

Prestazioni dei modelli di classificazione	FT-NIR		FT-MIR	
	PLS-DA*	LDA**	PLS-DA	LDA
Discriminazione totale, DT (%)	94	94	96	96
Falsi conformi, FC (%)	6	3	6	6
Falsi sospetti, FNC (%)	3	6	0	0

\*PLS-DA, partial least squares discriminant analysis; \*\*LDA, linear discriminant analysis.

Per i campioni di crusca contaminati da DON si è ottenuta una DT fino al 91% con FC fino all'8% e FNC fino al 27%. In generale, le prestazioni migliori sono state ottenute applicando il

modello LDA nell'intervallo spettrale FT-NIR, infatti la percentuale di DT è stata del 91% con il 18% dei campioni FNC e nessun FC (Tabella 2). Tuttavia va menzionato che l'alto tasso di campioni classificati come FNC è dovuto principalmente alla presenza nella classe A di campioni di crusca che contenevano livelli di DON prossimi al *cut-off* di 400 µg/kg fissato (7).

**Tabella 2. Risultati di validazione dei modelli di classificazione PLS-DA e LDA di campioni di crusca di grano contaminati da DON analizzati mediante spettroscopia FT-NIR e FT-MIR. Per la divisione dei campioni in due classi è stato fissato un *cut-off* pari a 400 µg/kg di DON**

Prestazioni dei modelli di classificazione	FT-NIR		FT-MIR	
	PLS-DA*	LDA**	PLS-DA	LDA
Discriminazione totale, DT (%)	87	91	86	87
Falsi conformi, FC (%)	0	0	0	8
Falsi sospetti, FNC (%)	27	18	27	18

\*PLS-DA, partial least squares discriminant analysis; \*\*LDA, linear discriminant analysis.

## Conclusioni

Dai risultati ottenuti si evince che la spettroscopia FT-IR è una promettente tecnica da impiegare per la discriminazione di campioni di frumento e di crusca contaminati da OTA e DON a determinati livelli (valori soglia) e poter così valutare la loro conformità con la regolamentazione vigente consentendo, inoltre, di ridurre sensibilmente la necessità di ricorrere ai metodi tradizionali per l'analisi quantitativa e di conferma della micotossina. Inoltre, la rapidità di analisi, la quasi totale assenza di una fase di preparazione del campione e i costi relativamente contenuti fanno della spettroscopia FT-IR un potenziale strumento di analisi in grado di implementare la fase di controllo delle materie prime.

## Ringraziamenti

Il lavoro è stato svolto nell'ambito del progetto No. CTN01 00230CL.A.N. Cluster Tecnologici Nazionali – SAFE&SMART “Nuove tecnologie abilitanti per la food safety e l'integrità delle filiere agro-alimentari in uno scenario globale”.

## Bibliografia

1. Canady RA, Coker RD, Egan SK, Krska R, Kuiper-Goodman T, Olsen M. Deoxynivalenol. In: WHO/FAO. *Safety evaluation of certain of certain mycotoxins in food, fifty-sixth Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)*. Geneva: WHO/FAO; 2001. p. 419-556. (FAO Food and Nutrition paper 74, WHO Food Additives series 47).
2. EFSA. Opinion of the scientific panel on contaminants in food chain on a request from the commission related to ochratoxin A (OTA) as undesirable substance in animal feed. *EFSA Journal* 2004;101:1-36.
3. Europa. Regolamento (CE) n. 1881/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006, che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L 364 del 20.12.2006.



4. McMullin D, Mizaikoff B, Krska R. Advancements in IR spectroscopic approaches for the determination of fungal derived contaminations in food crops. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2015;407:653-60.
5. Levasseur-Garcia C. Updated overview of infrared spectroscopy methods for detecting mycotoxins on cereals (corn, wheat and barley). *Toxins* 2018;10:38.
6. De Girolamo A, von Holst C, Cortese M, Cervellieri S, Pascale M, Longobardi F, Catucci L, Porricelli ACR, Lippolis V. Rapid screening of ochratoxin A in wheat by Infrared Spectroscopy. *Food Chemistry* 2019;282:95-100.
7. De Girolamo A, Cervellieri S, Cortese M, Porricelli ACR, Pascale M, Longobardi F, von Holst C, Ciaccheri L, Lippolis V. Fourier transform near-infrared and mid-infrared spectroscopy as efficient tools for rapid screening of deoxynivalenol contamination in wheat bran. *Journal of Sciences and Food Agriculture* 2019;99:1946-53.
8. Stuart B. Spectral analysis. In: *Infrared spectroscopy: fundamentals and applications*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd; 2004. p. 45–70.

# METODO VELOCE DI ANALISI MULTIRESIDUALE DI MICOTOSSINE IN ALIMENTI E MANGIMI

Gian Piero Luciani, Laura De Cesare, Cristina Francion  
*Tentamus Agriparadigma s.r.l, Ravenna, Italia*

## Introduzione

Lo sviluppo della spettrometria di massa accoppiata alla cromatografia liquida ha consentito lo sviluppo di metodi multiresiduali per molte famiglie di contaminanti (1).

Tuttavia, l'analisi delle micotossine tramite cromatografia liquida associata a spettroscopia di massa tandem (*Liquid Chromatography - tandem Mass Spectrometry*, LC-MS/MS) si è spesso scontrata con le difficoltà derivate dal dover rispettare limiti di legge particolarmente bassi in presenza di campioni complessi e molto differenti tra di loro. Questa complessità e varietà di matrice ha portato considerevoli problemi in termini di robustezza del metodo e impedito quantificazioni accurate e riproducibili.

Ci sono diversi modi che consentono di migliorare questi aspetti, anche in presenza di importanti effetti matrice. Due approcci complementari, di facile applicazione ed elevata efficacia sono la diluizione del campione, permessa dalla migliore sensibilità strumentale, e l'utilizzo di omologhi marcati isotopicamente.

Il laboratorio ha implementato entrambi gli approcci per ottenere analisi affidabili e compensare efficacemente gli effetti derivati dalla matrice. Ma per essere in grado di processare un numero elevato di campioni e ridurre i tempi di analisi si è dovuto far ricorso alla cromatografia liquida ad ultra prestazioni (*Ultra High Performance Liquid Chromatography*, UHPLC) che consente di diminuire i tempi di analisi senza sacrificare risoluzione cromatografica ed efficacia separativa.

Tutte le migliori opzioni sono state messe in campo per ottenere risultati ottimali e minimizzare i tempi di analisi e consentire ai clienti risposte veloci e affidabili.

## Parte sperimentale

L'analisi utilizza un protocollo QuEChERS (acronimo di *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged e Safe*) e consiste in quattro fasi principali.

La macinazione/omogeneizzazione costituisce la prima fase e riveste una grande importanza perché da essa dipende la precisione del metodo. Abbiamo testato diverse metodologie a secco e a umido (*slurry*); l'omogeneizzazione a umido è stata preferita per campioni di grandi dimensioni dove risulta più difficile ottenere campioni omogenei rappresentativi dell'intera massa del campione, mentre la macinazione a secco è stata scelta quando è disponibile meno campione ed è possibile macinarlo/omogeneizzarlo interamente.

La seconda fase dell'analisi è costituita dall'estrazione del campione. In questa fase si opera in provette di polipropilene. Si pesano 2 g di campione secco o l'equivalente di campione estratto a umido e si aggiunge acqua sino ad un peso complessivo di 10 g.

Si aggiunge quindi lo standard interno costituito da una miscela delle micotossine marcate isotopicamente con carbonio 13.

A questo punto il campione si agita meccanicamente per 60 minuti, si aggiungono 10ml di acetonitrile, una miscela di sali (cloruro di sodio, magnesio solfato, citrato monobasico e citrato dibasico di sodio) e si agita meccanicamente per altri 10 minuti.

I sali aggiunti oltre a stabilizzare il pH promuovono lo spostamento dei composti apolari nella fase organica e la separazione della fase acquosa dall'acetonitrile.

Per centrifugazione si ottiene la separazione delle fasi con l'acetonitrile in alto che viene raccolto per la successiva fase di purificazione.

La terza fase della preparazione consiste nella purificazione dell'estratto. Questa fase è condotta mediante SPE dispersiva utilizzando una miscela di *Primary Secondary Amine* (PSA) e magnesio solfato anidro.

Nella quarta fase il campione è raccolto in *vial*, analizzato in LC-MS/MS e quantificato mediante l'utilizzo degli standard interni isotopicamente marcati con carbonio 13.

La cromatografia utilizza una colonna in fase C18 con particelle da 1,8  $\mu$  e un gradiente lineare 20-90% metanolo in acqua con 20 mmoli di ammonio formiato.

Lo spettrometro lavora con interfaccia ESI in polarità positiva, in Tabella 1 si riportano le condizioni strumentali.

**Tabella 1. Condizioni sperimentali dello spettrometro di massa per la determinazione multiresiduale**

Tossina	lone massa M1	lone massa M2	Tempo di ritenzione	Differenza di potenziale	Energia di collisione
Aflatossina B <sub>1</sub>	313	285	4,9	100	31
Aflatossina B <sub>1</sub>	313	241	4,9	100	49
Aflatossina B <sub>1</sub> /IS	330	255	4,9	100	53
Aflatossina B <sub>2</sub>	315,1	287,1	4,72	100	35
Aflatossina B <sub>2</sub>	315,1	259,1	4,72	100	40
Aflatossina G <sub>1</sub>	329	243,1	4,46	80	37
Aflatossina G <sub>1</sub>	329	200	4,46	80	53
Aflatossina G <sub>2</sub>	331	33,1	4,28	100	33
Aflatossina G <sub>2</sub>	331	245,1	4,28	100	41
HT2	442,1	263	5,59	50	18
HT2	442,1	215	5,59	50	18
HT2/IS	464,1	278,1	5,58	50	19
T2	484,1	305	6,06	50	18
T2	484,1	214,9	6,06	60	17
T2/IS	508,1	322,1	6,05	60	18
Zearalenone	319	283	6,38	36	17
Zearalenone	319	187	6,38	36	29
Zearalenone/IS	337	301	6,39	36	17
Ocratossina A	404,1	358	5,44	56	21
Ocratossina A	404,1	239	5,44	100	32
Ocratossina A/IS	424,1	250,1	5,43	100	31
Deossinivalenolo	297,1	249	2,6	66	17
Deossinivalenolo	297,1	203	2,6	66	21
Deossinivalenolo/IS	312	263	2,6	66	17

## Risultati e discussione

Il metodo è stato validato in accordo all'Allegato II del Regolamento (CE) 401/2006 (2) e accreditato secondo ISO 17025:2018 (3).

Sono state eseguite diverse prove con materiali certificati di diversa natura per coprire il più ampio spettro delle matrici di interesse.

Nelle condizioni descritte si è ottenuto un recupero compreso tra 80-120% con deviazione standard del 2-5%.

I dati di validazione sono riassunti in Figura 1 e Figura 2.

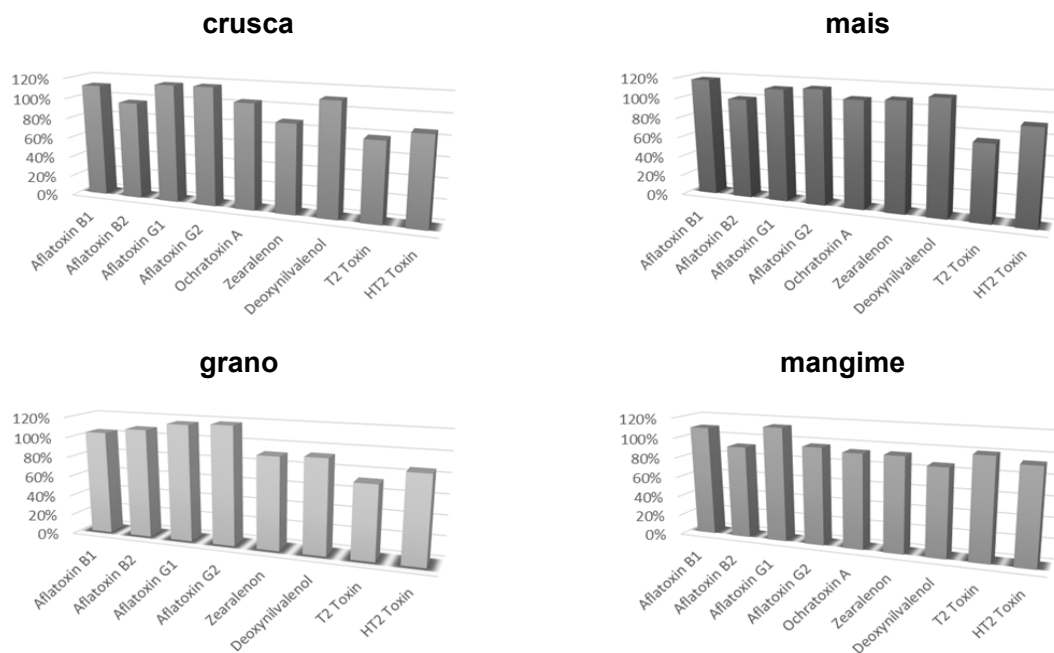


Figura 1. Recuperi delle varie micotossine su differenti matrici

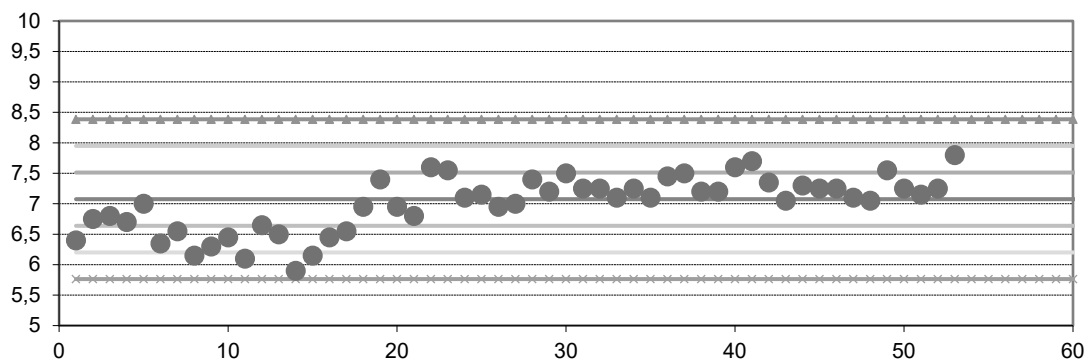


Figura 2. Carta di controllo della riproducibilità

Lavorando con una sequenza analitica che comprende standard, bianchi, campioni di controllo e possibile analizzare una *batch* di 10 campioni in circa 2 h consentendo una elevata produttività e ridotti tempi di analisi.

Il metodo descritto presenta numerosi vantaggi pratici e si è dimostrato rapido e affidabile.

## Conclusioni

Il metodo è stato validato e accreditato in conformità alla norma ISO 17025: 2018 (2). Non tutti i problemi e le criticità sono stati superati, ad esempio, l'analisi delle fumonisine non è stata ancora completamente testata e i dati di letteratura mostrano criticità nella procedura di estrazione.

Tuttavia, i vantaggi in termini di precisione e robustezza incoraggiano lo sviluppo di questi metodi che, grazie alla diffusione di UPLC-MS/MS sono destinati a diffondersi sempre più ampiamente.

## Bibliografia

1. UNI EN 16877:2017. *Mangimi per animali - Metodi di campionamento e di analisi - Determinazione delle tossine T-2 e HT-2, Deossivalenolo e Zearalenone nelle materie prime per mangimi e mangimi composti per mezzo di LC-MS*. Milano: Ente Italiano di Normazione; 2017.
2. Europa. Regolamento (CE) 401/2006 della Commissione, del 23 febbraio 2006, relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 70/12 del 9 marzo 2006.
3. UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2018. *Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e taratura*. Milano: Ente Italiano di Normazione; 2018.



**SESSIONE**  
**Gestione del rischio**





# FUNGHI MICOTOSSIGENI E MICOTOSSINE NEL RISO ITALIANO IN CAMPO E DURANTE LO STOCCAGGIO

Terenzio Bertuzzi (a), Silvia Rastelli (a), Annalisa Mulazzi (a), Marco Romani (b), Paola Giorni (c)

(a) Dipartimento di Scienze animali, della nutrizione e degli alimenti, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza, Italia

(b) Ente Nazionale Risi, Centro di Ricerca, Castello d'Agogna (PV), Italia

(c) Dipartimento di Scienze delle produzioni vegetali sostenibili, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza, Italia

## Introduzione

Il riso rappresenta una delle più importanti coltivazioni per l'agricoltura italiana, capace di coprire circa il 50% dell'intera produzione europea. La maggiore intensità di questa coltivazione si osserva in 3 regioni del Nord Italia, in particolare Piemonte, Lombardia e Veneto; questo è dovuto principalmente alla grande disponibilità di acqua in queste regioni che rende possibile la coltivazione in sommersione di questo cereale.

Nel riso italiano, le micotossine hanno causato fino ad ora problemi limitati, ma sono considerabili come contaminanti emergenti a causa dei cambiamenti climatici; inoltre, da diversi lavori risulta come il riso, prodotto in altre zone, possa risultarne contaminato (1-3). Obiettivi specifici sono stati quelli di valutare la presenza dei principali funghi micotossigeni e relative micotossine durante la produzione in campo e nel periodo di stoccaggio; la loro presenza, in alcuni casi anche solo in tracce, può essere molto rilevante per l'utilizzo del riso come *baby food*.

## Materiali e metodi

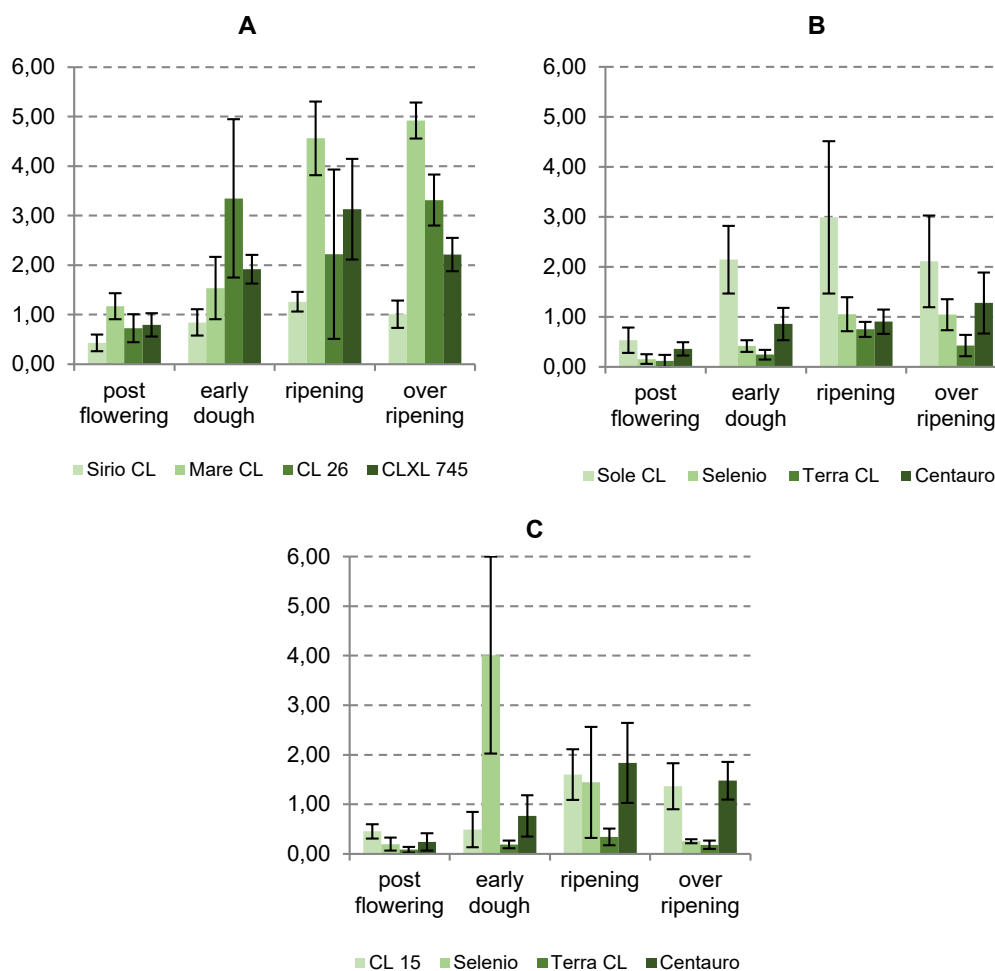
La contaminazione da funghi micotossigeni e relative micotossine è stata monitorata nel risone durante la crescita in campo a 4 diverse fasi fenologiche: maturazione latte, maturazione cerosa, maturazione di raccolta e sovra-maturazione (+15 gg) e, successivamente, per un periodo di stoccaggio di 5 mesi (1 prelievo ogni mese). Lo studio in campo ha coinvolto 3 campi sperimentali, 9 varietà di riso e 3 densità di semina differenti mentre, per lo stoccaggio, sono state considerate diverse condizioni di temperatura: temperatura ambiente, media refrigerata (11-15°C) e alta refrigerata (1-2°C). Sono state valutate l'incidenza fungina totale e dei principali generi micotossigeni (*Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp.) e le micotossine sterigmatocistina (STC), aflatoossina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), deossinivalenolo (DON), ocratossina A (OTA) usando le opportune tecniche cromatografiche ifenate.

## Risultati

In campo, i generi fungini micotossigeni più abbondanti sono risultati *Fusarium* spp. e *Aspergillus* spp.; in particolare, *A. flavus* and *A. niger* sono stati rilevati raramente, mentre *A. versicolor* è risultato sempre presente anche se a basse concentrazioni. Il genere *Penicillium* spp. è stato isolato sporadicamente ed è risultato non rilevante nella contaminazione fungina dei risoni. La percentuale di infezione fungina totale nelle varie varietà esaminate va da un minimo del 3%

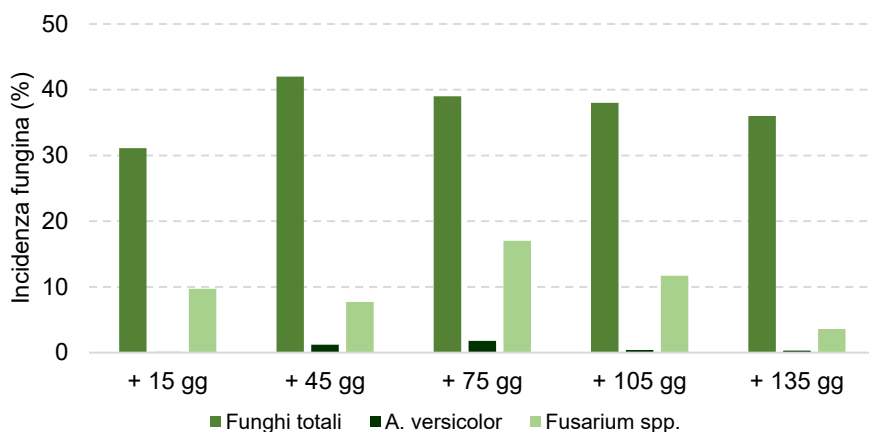
ad un massimo del 48%. Tuttavia, tale infezione si abbassa notevolmente se si prendono in considerazione le sole specie possibilmente in grado di produrre micotossine che invece variano da un minimo dello 0,3% ad un massimo del 22%.

I campioni di risone raccolti in campo non hanno mai presentato presenza di OTA; l'AFB<sub>1</sub> è stata rilevata in alcuni campioni con un valore massimo di 0,88 µg/kg, inferiore al limite di 5 µg/kg stabilito dalla Commissione Europea per riso da sottoporre a cernita o altri trattamenti fisici. DON e STC (una micotossina emergente ma non ancora normata) sono stati rilevati nella quasi totalità delle varietà esaminate così come i relativi funghi produttori (*Fusarium spp* e *A. versicolor*). La concentrazione di DON è sempre stata inferiore al limite di legge stabilito per i prodotti *baby-food* (200 µg/kg). Valori talvolta non trascurabili sono stati riscontrati per la STC, con un valore massimo di 6,27 µg/kg, confermando la contaminazione in riso riportata da Mol *et al.* (4). La contaminazione sia fungina che di micotossine è generalmente aumentata dal periodo di post-fioritura fino alla raccolta. In alcuni campioni che sono stati lasciati in campo per ulteriori 15 giorni dopo la completa maturazione, la contaminazione è rimasta costante o, talvolta, diminuita. Differenze statisticamente significative sono state riscontrate tra le varietà ( $P \leq 0,01$ ) per la contaminazione fungina e quella da STC (Figura 1), mentre la densità di semina non è risultata essere rilevante.

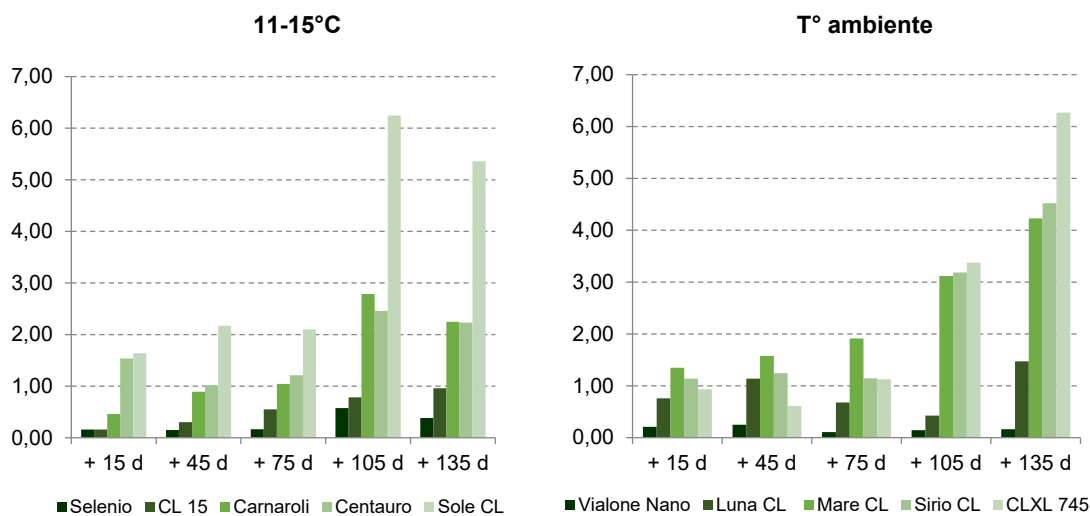


**Figura 1. Contaminazione da STC in diverse varietà di riso durante la produzione in 3 differenti campi (A, B, C)**

Durante lo stoccaggio, la presenza di funghi micotossigeni è risultata costante nel tempo e simile alla composizione riscontrata alla raccolta in campo (Figura 2). Per quanto riguarda le micotossine, invece, un aumento della contaminazione da STC è stato riscontrato nello stoccaggio a temperatura ambiente e mediamente refrigerato, mentre per le altre micotossine non sono state rilevate variazioni significative (Figura 3).



**Figura 2. Andamento della contaminazione da funghi micotossigeni durante lo stoccaggio in condizioni a temperatura ambiente**



**Figura 3. Andamento della contaminazione da STC durante lo stoccaggio in condizioni di media refrigerazione e a temperatura ambiente**

Nella conservazione a freddo a 1,5-2,0°C, la presenza sia di funghi che di micotossine si è ridotta molto rispetto ai lotti conservati in silos refrigerati tra 10-15°C. In tutti i campioni di risone stoccati a 1,5-2,0°C, l'OTA non è mai stata rilevata e il DON a bassi livelli, tra 10 e 20 µg/kg. L'AFB<sub>1</sub> è stata quantificata ad un livello pari al limite di rilevabilità del metodo (0,02 µg/kg) solo

in 2 campioni; anche la STC ha mostrato livelli di contaminazione contenuti (valore massimo 0,65 µg/kg).

## Conclusioni

Dal monitoraggio della presenza fungina in campo durante le diverse fasi di sviluppo della pianta è risultato che il periodo più critico per la presenza fungina è la fase di maturazione fisiologica dove è stata isolato il maggior numero di funghi indipendentemente dalla varietà di riso considerata. Lasciando le piante in campo per ulteriori 15 giorni dopo la maturazione di raccolta si è notato un abbassamento significativo della presenza fungina dovuto, probabilmente, ad una riduzione di umidità della granella (intesa come *water activity*, Aw) capace di limitarne la sopravvivenza. Le diverse specie fungine micotossigene, però, hanno mostrato una diversa adattabilità alle condizioni ambientali (temperatura) e della pianta (composizione chimica e Aw) e sono risultate diversamente distribuite nelle diverse fasi di sviluppo del riso. In particolare *A. flavus* ha mostrato una maggiore incidenza in fioritura, *A. sezione Nigri* e *Fusarium* spp. hanno mostrato una maggiore incidenza alla maturazione di raccolta mentre *A. versicolor* è risultato essere costantemente presente dalla maturazione cerosa fino a 15 giorni dopo la maturazione di raccolta.

Alcune varietà di riso si sono rivelate più predisponenti alla contaminazione fungina rispetto ad altre. In particolare, CL26, CL XL e MARE sono risultate quelle più contaminate da funghi mentre la varietà TERRA ha mostrato la maggiore resistenza all'attacco fungino. La tipologia di riso sembra essere una caratteristica importante per l'infezione fungina in quanto le varietà tonde sono risultate significativamente più contaminate da funghi rispetto alle lunghe di tipo B, tuttavia non vi sono differenze significative per quanto riguarda l'incidenza di funghi micotossigeni. I risultati relativi alle micotossine hanno evidenziato una diffusa contaminazione da STC anche prima della raccolta, presenza disomogenea di AFB<sub>1</sub>, limitata e in tracce per il DON e assenza di OTA in tutti i campioni.

Risulta quindi dimostrato come la contaminazione da STC, una micotossina emergente non ancora regolamentata dalla Comunità Europea, possa essere rilevante nel riso.

## Ringraziamenti

Lavoro finanziato dalla Regione Lombardia PSR 2014-20, Progetto BabyRice

## Bibliografia

1. Bansal J, Pantazopoulos P, Tam J, Cavlovic P, Kwong K, Turcotte AM, Lau BPY, Scott PM. Surveys of rice sold in Canada for aflatoxins, ochratoxin A and fumonisins. *Food Addit Contam* 2011;28:767-74
2. Iqbal SZ, Asi MR, Hanif U, Zuber M, Jinap S. The presence of aflatoxins and ochratoxin A in rice and rice products and evaluation of dietary intake. *Food Chem* 2016;210:135-40.
3. Lai X, Liu R, Ruan C, Zhang H, Liu C. Occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in rice samples from six provinces in China. *Food Control* 2015;50:401-4.
4. Mol HG, Mac Donald S, Anagnostopoulos C, Spanjer M, Bertuzzi T, Pietri A. European survey on sterigmatocystin in cereals, cereals-based products, beer and nuts. *World Mycotoxin J* 2016; 9:633-42.

# RISCHIO MICOTOSSINE: ANALISI DEI PIÙ MODERNI SISTEMI DI GESTIONE PER LA SICUREZZA ALIMENTARE

Daniela Maurizi

Federazione Nazionale degli Ordini dei Chimici e dei Fisici, Roma

## Introduzione

Il problema delle micotossine negli alimenti pone importanti criticità in tema di sicurezza degli alimenti (1, 2). La normativa in materia definisce orientamenti precisi per gli operatori del settore alimentare, ma le prescrizioni stabilite dal legislatore e le *Good Manufacture Practices* (GMP) poste in essere dall'industria non possono eliminare del tutto il rischio micotossine. Per quanto auspicabile, tale scenario non è realizzabile a causa dell'incidenza, sempre maggiore, di fattori ambientali significativi. Pertanto, nella gestione del rischio micotossine è fondamentale un approccio preventivo, aspetto propedeutico per il successo di qualsiasi sistema di gestione della sicurezza alimentare, dalle normative specifiche agli standard volontari internazionali.

## Tutela dal rischio micotossine della *Global Food Safety Initiative*

L'evoluzione degli standard di riferimento in materia di qualifica dei fornitori rappresenta un elemento fondamentale per il miglioramento continuo dei sistemi di gestione.

I principali standard di riferimento riconosciuti dalla *Global Food Safety Initiative* (GFSI) (3) sono:

- BRC, British Retail Consortium;
- IFS, International Food Standard;
- FSSC 22000, Food Safety System Certification.

Tali sistemi si caratterizzano per una spiccata attenzione per la scelta delle materie prime e dei relativi fornitori. In particolare: l'origine della materia prima, la sua sensibilità al pericolo considerato, la quantità di prodotto e il relativo utilizzo, le garanzie in termini analitici e le certificazioni del fornitore. L'attenzione della GFSI, per i suddetti aspetti si è concretizzata nella definizione della versione 8 del BRC.

La versione dello standard stabilisce, al requisito 3.5.11, che la valutazione del rischio delle materie prime deve essere rivista:

- ogni qualvolta si rilevi una modifica attinente alla materia prima, alla trasformazione di una materia prima o al fornitore di una materia prima;
- ogniqualvolta emerga un nuovo rischio in seguito al richiamo o al ritiro del prodotto che utilizzi una specifica materia prima;
- ogni tre anni obbligatoriamente.

La revisione triennale si caratterizza per un maggior livello di approfondimento rispetto a quella annuale richiesta dal precedente standard.

Nel caso in cui l'operatore del settore alimentare affidi ad un ente esterno, in audit di seconda o terza parte, la verifica del proprio fornitore, dovrà dimostrare:

- le competenze dell'auditor;
- l'inclusione, nella verifica, di una analisi approfondita che comprenda la valutazione della sicurezza alimentare del prodotto, la tracciabilità, il rispetto del protocollo HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points) e delle buone pratiche nei processi produttivi (GMP);
- la revisione del rapporto di audit completo.

Tale attenzione alle evidenze oggettive, alle GMP e alle competenze dell'auditor rappresentano un punto di contatto e allineamento con il *Food Safety Modernization Act* americano (FSMA).

La versione 8 del BRC contiene anche due nuovi requisiti rispetto a quella precedente per la qualificazione dei fornitori:

- il requisito 3.5.1.3 richiede l'implementazione di un processo e la predisposizione di un sistema di verifica continua della performance dei fornitori basato su criteri di valutazione del rischio che dovrà essere documentato ogni tre anni;
- il requisito 3.5.1.4, invece, richiede che l'azienda possieda un elenco aggiornato dei fornitori approvati in formato cartaceo ed elettronico, disponibile per il personale interessato.

## Rischio micotossine nel *Food and Feed Safety Alerts*

I dati del *Rapid Alert System for Food and Feed* (RASFF) (4) costituiscono un elemento imprescindibile del *risk assessment*, che deve essere realizzato con l'ausilio di tutte le informazioni utili per l'operatore del settore alimentare.

Alla scrupolosa messa in pratica del sistema di gestione per la sicurezza alimentare deve affiancarsi lo studio critico dei dati focalizzato sulle dinamiche globali del rischio che il sistema di gestione vuole minimizzare.

Il problema delle micotossine negli alimenti è un fenomeno preoccupante e in crescita: i contaminanti chimici più frequentemente notificati attraverso RASFF sono le micotossine (655), e i valori 2018 sono superiori a quelli registrati nel 2017.

Il rischio micotossine rappresenta il 36% dei rischi notificati attraverso il RASFF nel corso del 2018. In particolare, il valore della somma dei dati relativi a aflatossine e ocratossina A (651) è molto prossimo a quello registrato per la salmonella, che incide per il 37,2% (676).

Gli alimenti più critici in termini di rischio micotossine sono cereali, frutta e vegetali, frutta secca e semi e spezie.

Per la frutta e i vegetali, a fronte di 474 segnalazioni, le notifiche relative alla presenza di micotossine incidono per il 19%. Tale percentuale si suddivide tra ocratossina A (10%) e aflatossine (9%). Nel settore frutta secca e semi si registrano 667 segnalazioni, di cui il 65,7% è relativo alle micotossine, soprattutto aflatossine, che incidono per il 64,5%. Il restante 1,2% è relativo alle ocratossine. Nel settore cereali, in cui si rileva un totale di 156 notifiche, quelle riguardanti il rischio micotossine incidono per il 16,7%. In alcuni cereali è stata riscontrata la presenza di più micotossine, in particolare: ocratossina A, DON, fumonisine, zearalenone e aflatossine. Per erbe e spezie le irregolarità per micotossine costituiscono il 29,2% su un totale di 120 segnalazioni.

Anche sul totale delle notifiche effettuate dall'Italia, il rischio micotossine ha un'incidenza significativa (47 su un totale di 420, pari all'11,2%) (Tabella 1).

**Tabella 1. Rischi sanitari oggetto delle notifiche effettuate dall'Italia nel RASFF nel 2018**

Pericolo	Non conformità
Microrganismi patogeni	74
Metalli pesanti	56
Contaminanti microbici	56
Micotossine	47
Infestazione da parassiti	35
Additivi e aromi	25
Allergeni	19
Corpi estranei	18
Migrazione	15
Contaminanti biologici	10
Etichettatura assente/Incompleta/Non corretta	10
Adulterazione/Frodi	9
Residui di pesticidi	8
Aspetti organolettici	6
Controlli insufficienti	6
Residui di farmaci veterinari	5
Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili	5
Tossine Naturali	3
Varie	3
Difetti di confezionamento	3
Alimenti geneticamente modificati	2
Contaminanti industriali	2
Composizione	1
Contaminanti Ambientali	1
Nuovi alimenti	1

I dati RASFF mostrano una correlazione tra notifiche per non conformità dovute alla presenza di micotossine negli alimenti e origine della materia prima. Per esempio, nel settore frutta secca e semi, si rileva che le non conformità riguardano principalmente prodotti provenienti dagli Stati Uniti (19,8%) e Turchia (17,9%). Valori minori ma comunque significativi sono relativi ai prodotti provenienti da Argentina (14%) e Cina (9%).

## Conclusioni

L'attività di *risk assessment* sopra descritta rappresenta una valida tutela per l'operatore del settore alimentare perché tiene in considerazione il carattere globale del mercato odierno.

La globalizzazione delle dinamiche commerciali impone un'evoluzione nella gestione della sicurezza alimentare. La qualifica dei fornitori e la scelta delle materie prime non possono prescindere dallo studio approfondito delle dinamiche attuali del rischio oggetto di attenzione.

Alla scrupolosa messa in pratica del sistema di gestione per la sicurezza alimentare deve affiancarsi una valutazione dei dati che consideri, nel momento preciso in cui si sta operando, la frequenza con cui il rischio si verifica e la sua caratterizzazione geografica. Osservare che, in un dato momento le allerte per un determinato rischio sono in aumento e che sono collocate geograficamente in luoghi ben definiti è fondamentale per la qualifica dei fornitori e la scelta delle materie prime e, quindi, per la riduzione del rischio micotossine.

## Bibliografia

1. Nanni P. *Micotossine nei cereali: risultati del progetto interregionale Micocer*. Firenze: Polistampa; 2009.
2. Delledonne M. *Micotossine, riconoscimento e prevenzione delle micotossicosi di interesse medico*. Bologna: Edagricole; 2010
3. *Global Standard for Food Safety Issue 8*. Book. London: BRCGS; 2018
4. Ministero della Salute. *Sistema di Allerta Rapido per Alimenti e Mangimi. Relazione annuale 2018*. Roma: Ministero della Salute; 2019.



# AFLATOSSINA M<sub>1</sub> NEI PRODOTTI LATTIERO-CASEARI: INDIVIDUAZIONE DEI CRITERI PER LA DEFINIZIONE DEI FATTORI DI CONCENTRAZIONE

Gilberto Giangolini (a), Andrea Valiani (b)

(a) Centro di Referenza Nazionale per la Qualità del Latte e dei Prodotti Derivati degli Ovini e dei Caprini, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana "M. Aleandri", Roma, Italia

(b) Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche "Togo Rosati", Perugia, Italia

## Introduzione

L'aflatossina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) può essere presente nel latte in seguito all'ingestione di mangimi contaminati con aflatossina B<sub>1</sub>. Il Regolamento (CE) 1881/2006 (1) definisce il limite di legge dell'AFM<sub>1</sub> nel latte in 0,050 µg/kg e all'art. 2 introduce il concetto di fattori specifici di concentrazione/diluizione per gli alimenti sottoposti a trattamento tecnologico.

Per Fattore di Concentrazione (FC) si intende il rapporto tra la concentrazione di AFM<sub>1</sub> nel formaggio e la concentrazione nel latte di partenza. In Italia non è stato ancora definito un limite legislativo per l'AFM<sub>1</sub> nei prodotti lattiero-caseari.

Gli Operatori del Settore Alimentare (OSA), conformemente all'art. 2 del Regolamento (CE) 1881/2006, devono fornire all'autorità competente, in fase di controllo ufficiale, i fattori specifici di concentrazione o diluizione, e per fare questo devono necessariamente definire i coefficienti di concentrazione dei propri prodotti attraverso specifiche analisi quantitative per la determinazione di AFM<sub>1</sub>. In assenza di dati degli OSA, o se tali dati sono ritenuti non idonei, sarà la stessa autorità competente a definire il fattore di concentrazione in base alle informazioni disponibili.

Il Ministero della Salute, in base al parere del Comitato Nazionale per la Sicurezza Alimentare n. 13 del 10/6/2013 (2), ha raccomandato l'adozione, in via provvisoria, dei seguenti fattori di concentrazione per l'AFM<sub>1</sub>: 3,0 per i formaggi a pasta tenera e prodotti dal siero, 5,5 per i formaggi a pasta dura. Lo stesso Ministero ha successivamente indicato i criteri da seguire per la classificazione dei formaggi ai fini dell'applicazione dei due fattori di concentrazione sopra riportati, richiamando la Decisione della Commissione 97/80/CE (3).

Applicando questi fattori di concentrazione per un contenuto massimo di AFM<sub>1</sub> nel latte, si ottiene un limite di AFM<sub>1</sub> nel formaggio di 0,150 µg/kg per i formaggi a pasta tenera e prodotti del siero e 0,275 µg/kg per i formaggi a pasta dura.

La classificazione dei formaggi descritta nella Decisione della Commissione 97/80/CE si basa sul tasso di umidità della materia sgrassata (*Moisture Free Fat Basis*, MFFB):

$$MFFB\% = \frac{\text{Peso dell'acqua nel formaggio}}{\text{Peso totale} - \text{materia grassa nel formaggio}} \times 100$$

Ne risulta una classificazione in 5 categorie:

1. *Formaggio a pasta molle*: formaggio avente, una volta affinato, un MFFB di norma superiore o uguale al 68%.
2. *Formaggio a pasta semi-molle*: formaggio avente, una volta affinato, un MFFB di norma superiore o uguale al 62% e inferiore al 68%.

3. *Formaggio a pasta semi-dura*: formaggio avente, una volta affinato, un MFFB di norma superiore o uguale al 55% e inferiore al 62%.
4. *Formaggio a pasta dura*: formaggio avente, una volta affinato, un MFFB di norma superiore o uguale al 47% e inferiore al 55%.
5. *Formaggio a pasta extra-dura*: formaggio avente, una volta affinato, un MFFB di norma inferiore al 47%.

A queste categorie si somma la classificazione del formaggio fresco, identificato come un prodotto ottenuto partendo dal latte cagliato dal quale è stata eliminata la maggior parte del siero. Non specifica la percentuale di MFFB.

## Attività di lavoro

Per meglio definire i criteri normativi a cui riferirsi nel controllo dell'AFM<sub>1</sub> nella filiera lattiero casearia, il Ministero della Salute ha invitato gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS) e l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) a procedere alla definizione di uno specifico fattore di concentrazione per ciascuna delle categorie di cui alla Decisione della Commissione 97/80/CE, ad individuare se possibile un criterio alternativo per la classificazione dei formaggi rispetto a quello di cui alla decisione sopra riportata e a collaborare per la condivisione di studi sperimentali al fine di ottenere validi fattori di concentrazione.

Per dare seguito a quanto richiesto dal Ministero, 7 IZS (IZS Lazio e Toscana, IZS Umbria e Marche, IZS Lombardia ed Emilia Romagna, IZS Piemonte, Liguria e Valle D'Aosta, IZS delle Venezie, IZS Puglia e Basilicata, IZS Sardegna) e l'ISS hanno costituito un gruppo di lavoro (GdL).

Il GdL ha iniziato la sua attività esaminando la bibliografia disponibile, ha poi eseguito una valutazione dei prodotti lattiero caseari di maggior rilevanza dal punto di vista della diffusione, dell'importanza commerciale e della rappresentatività del settore merceologico, al fine di costituire una lista di prodotti. Su questi prodotti gli IZS, attraverso determinazioni analitiche e dati bibliografici, hanno calcolato il valore di MFFB, come previsto dalla Decisione 97/80/CE, per poterli ricondurre ad una delle cinque categorie previste dalla stessa Decisione.

Sono stati quindi selezionati alcuni prodotti che potessero rappresentare le diverse categorie di formaggi, al fine di definire, per ogni categoria, i relativi fattori di concentrazione per AFM<sub>1</sub>.

Dalla verifica dei valori di MFFB delle diverse tipologie commerciali di formaggi, ottenuta integrando i dati forniti dagli IZS, emerge che la stessa tipologia commerciale di prodotto lattiero caseario può presentare un intervallo di valori di MFFB che la pongono a cavallo tra due differenti categorie così come individuate dalla Decisione 97/80/CE. Pertanto, l'appartenenza ad una delle suddette categorie della Decisione 97/80/CE non potrebbe essere individuata in funzione della tipologia commerciale del prodotto (caciotta, mozzarella, crescenza, ecc.) ma determinata in ragione del valore MFFB di volta in volta riscontrato.

Nello studio sulla determinazione del fattore di concentrazione a livello sperimentale intervengono numerosi fattori di variabilità quali:

- livello di contaminazione del latte;
- tecnologia di produzione;
- composizione in grasso e proteine del latte;
- resa casearia;
- umidità del formaggio;
- metodo di determinazione dell'AFM<sub>1</sub>.

Alcuni autori (4-6) hanno dimostrato che l'AFM<sub>1</sub> si lega alle proteine del latte e in particolare alle caseine, ciò determina una concentrazione della tossina nel formaggio.

L'AFM<sub>1</sub> si distribuisce tra la cagliata e il siero in percentuali molto variabili, in relazione alla tipologia di caseificazione, al tipo di formaggio prodotto e alla contaminazione del latte di partenza.

Studi nazionali su diverse tipologie di formaggi hanno evidenziato i seguenti fattori di concentrazione:

- su grana padano Manetta *et al.* (7) hanno rilevato FC di 3 nella cagliata e di 4,5 in forme di 12 mesi.
- in formaggio parmigiano reggiano, Pietri *et al.* (8) hanno riscontrato un FC medio di 4,7 nella cagliata e di 5,5 nelle forme stagionate.

In prove sperimentali condotte dall'IZS Lombardia ed Emilia Romagna si è evidenziato nella cagliata del formaggio grana un fattore di concentrazione di 3,11 e di 6,2 nel prodotto finito.

Bovo *et al.* (9) hanno rilevato un FC di 2,4 nella mozzarella, di 4,0 nella caciotta, di 4,7 nel taleggio e di 4,9 nell'asiago d'allevato.

Cavallarin *et al.* (10) hanno rilevato FC di 1,4 su primo sale e 2,2 su robiola mentre hanno evidenziato un FC di 6,71 su maccagno, un formaggio a pasta dura stagionato.

Pecorelli *et al.* (11) su pecorino semi-stagionato hanno riscontrato un FC di 4,13.

Battacone *et al.* (12) hanno rilevato fattori di concentrazione da 1,8 a 2,9 su cagliate di pecora.

Dall'esame della bibliografia nazionale e internazionale si evidenzia però una mancanza di dati consistenti determinando una difficoltà nell'attribuzione, in via definitiva, di fattori di concentrazione nelle diverse categorie di formaggi:

- numerosi studi non fanno riferimento a valori di MFFB del prodotto e pertanto il coefficiente di concentrazione trovato non può essere ricondotto ad una delle cinque categorie della Decisione 97/80/CE;
- gli studi internazionali sono stati eseguiti su prodotti lattiero-caseari non facilmente riconducibili ad equivalenti nazionali;
- molte sperimentazioni sono state fatte impiegando latte artificialmente contaminato e questo introduce la possibilità di un diverso trasferimento del contaminante nel processo di trasformazione rispetto alla contaminazione naturale;
- in alcuni lavori il FC individuato è molto differente, in funzione della tipologia di formaggio considerato, rispetto a quanto ci si attenderebbe date le sue caratteristiche tecnologiche e compositive.

Ad oggi il GdL ha potuto considerare utili, al fine di una prima valutazione, poche sperimentazioni di cui la maggior parte eseguite in Italia.

Dai dati al momento disponibili sembra che il fattore di concentrazione dell'AFM<sub>1</sub> abbia una correlazione inversa con il valore di MFFB. Per i prodotti a pasta molle (MFFB  $\geq$  68%) il fattore di concentrazione sembra essere prossimo a 3; necessario sarà uno studio su prodotti come stracchini e crescenze dove i dati disponibili sono esigui.

Per i prodotti a pasta semi-molle (68% > MFFB  $\geq$  62%) i dati si riferiscono a caciotte prodotte con latte vaccino: il fattore di concentrazione è risultato pari a 4, differenziandosi da quello indicato dal Ministero della Salute dove tale categoria viene accumulata alla categoria precedente sotto un unico FC pari a 3.

Per i prodotti a pasta semi-dura (62% > MFFB  $\geq$  55%) il coefficiente di concentrazione più rappresentativo risulta essere 5.

Per i prodotti a pasta dura (55% > MFFB  $\geq$  47%) i dati si riferiscono ad un solo prodotto (asiago d'allevato) il cui fattore di concentrazione è anche in questo caso pari a 5. Pertanto, si potrebbe ipotizzare di far confluire le due categorie sotto un unico fattore di concentrazione.

Per i prodotti a pasta extra-dura (MFFB < 47%) il fattore di concentrazione è tendente a 6, non discostandosi molto dal fattore di concentrazione al momento indicato per tale categoria (5,5).

Le ipotesi su esposte, basate sulle informazioni al momento disponibili, necessitano sicuramente di essere integrate al fine di accrescerne la robustezza.

Quanto detto può essere prospettato esclusivamente per i prodotti lattiero caseari intesi come formaggi, in quanto il destino della componente caseinica, ovvero del principale “carrier” dell’AFM<sub>1</sub> nel processo tecnologico è sostanzialmente costante. Per gli altri derivati del latte, quali i latticini propriamente detti (ricotta, panna, mascarpone, ecc.), considerando il diverso destino della componente caseinica, sarà necessario fare valutazioni specifiche.

Un’ulteriore considerazione riguarda la specie animale da cui deriva il latte. Dai dati al momento disponibili, sembra che il fattore di concentrazione risenta anche delle caratteristiche del latte di partenza, inteso come contenuti delle componenti solide e quindi indirettamente dalla resa casearia.

Si ribadisce pertanto la necessità di incrementare i dati disponibili attraverso studi ad hoc, che dovranno essere effettuati sulla base di disegni sperimentali che prevedano anche il possibile coinvolgimento e la collaborazione di strutture produttive.

## Bibliografia

1. Europa. Regolamento (CE) n. 1881/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006, che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. *Gazzetta Ufficiale dell’Unione Europea* L 364 del 20.12.2006.
2. Ministero della Salute, Comitato Nazionale per la Sicurezza Alimentare. *Parere n.13 del 10.06.2013. Applicabilità dei coefficienti di trasformazione in equivalente latte (All. 2, D.M. 31 luglio 2003 del Ministero delle Politiche Agricole e Forestali)*. Roma: Ministero della Salute; 2013.
3. Europa. Decisione della Commissione 97/80/CE del 18 dicembre 1996 recante norme d’applicazione della direttiva 96/16/CE del Consiglio, relativa alle indagini statistiche da effettuare nel settore del latte e dei prodotti lattiero-caseari. *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee* L 24 del 25.1.1997.
4. Kamkar A, Karim G, Aliabadi FS, Khaksar R. Fate of aflatoxin M1 in Iranian white cheese processing. *Food and Chemical Toxicology* 2008;46:2236-8.
5. Mendonca C, Venancio A. Fate of aflatoxin M1 in cheese whey processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2005;85:2067-70.
6. Barbiroli A, Bonomi F, Benedetti S, Mannino S, Monti L, Cattaneo T, Iametti S. Binding of aflatoxin M1 to different protein fractions in ovine and caprine milk. *Journal of Dairy Science* 2007;90:532-40.
7. Manetta AC, Giammarco M, Di Giuseppe L, Fusaro I, Gramezzi A, Formigoni A, Vignola G, Lambertini L. Distribution of aflatoxin M1 during Grana Padano cheese production from naturally contaminated milk. *Food Chemistry* 2009;113:595-9.
8. Pietri A, Mulazzi A, Piva G, Bertuzzi T. Fate of aflatoxin M1 during production and storage of parmesan cheese. *Food Control* 2016;60:478-83.
9. Bovo D, Dall’Ava B, Contiero L, Barberio A, Angeletti R and Biancotto G. Fate of aflatoxin M1 from milk to different kinds of Italian cheese. In: *8<sup>th</sup> International Symposium on Recent Advances in Food Analysis*, Prague, November 2017.
10. Cavallarin L, Antoniazzi S, Giaccone D, Tabacco E, Borreani G. Transfer of aflatoxin M1 from milk to ripened cheese in three Italian traditional production methods. *Food Control* 2014; 38:174-7.
11. Pecorelli I, Braciari R, Ortenzi R, Ciriacci M, Checcarelli S, Roila R, Capotorti A, Spaccini G, Valiani A. Evaluation of the concentration factor of aflatoxin in semi-hard Pecorino cheese obtained from naturally contaminated milk. *Food Control* 2018;85:194-8.
12. Battacone G, Nudda A, Palomba M, Pascale M, Nicolussi P. and Pulina G. Transfer of Aflatoxin B1 from Feed to Milk and from Milk to Curd and Whey in Dairy Sheep Fed Artificially Contaminated Concentrates. *Journal of Dairy Science* 2005;88:3063-9.

# STRATEGIE OPERATIVE PER LA MITIGAZIONE DEL RISCHIO DA MICOTOSSINE: CRITICITÀ E PROGRESSI

Amedeo Reyneri, Massimo Blandino, Valentina Scarpino

Dipartimento di Scienze agrarie, forestali e alimentari, Università di Torino, Italia

## Emergenza del problema micotossine

La presenza delle micotossine nelle derrate alimentari è stata individuata in tempi recenti. Non è certo l'obiettivo di questo contributo tracciare la storia della ricerca su tali contaminanti, se non ricordare che l'individuazione dei diversi metaboliti secondari ad azione tossica è iniziata a partire dagli anni '60 arricchendosi di nuove conoscenze fino ai nostri giorni, per procedere certamente nel prossimo futuro. Tuttavia, la ricerca applicata alle derrate alimentari e ai sistemi produttivi agricoli è avvenuta successivamente, quando si è consolidata la conoscenza sull'effetto delle contaminazioni sulla salute dell'uomo e degli animali allevati e le potenziali conseguenze sui mercati. L'impatto sulle filiere produttive, ovvero l'emergenza del problema micotossine, è stato però riscontrato in tempi ancora successivi a seguito della progressiva introduzione di vincoli sanitari commerciali e, in modo più evidente, con l'introduzione di regolamenti riportanti i limiti delle concentrazioni per le diverse fasi del processo di produzione e trasformazione delle principali matrici alimentari. Uno schema riassuntivo sull'emergenza del problema micotossine, considerando le principali tra quelle che interessano il settore cerealicolo, è tracciato in Figura 1; in tale schema si evidenziano orientativamente gli anni che hanno interessato la loro individuazione con la ricerca di base, la ricerca applicata e l'impatto sulle filiere.

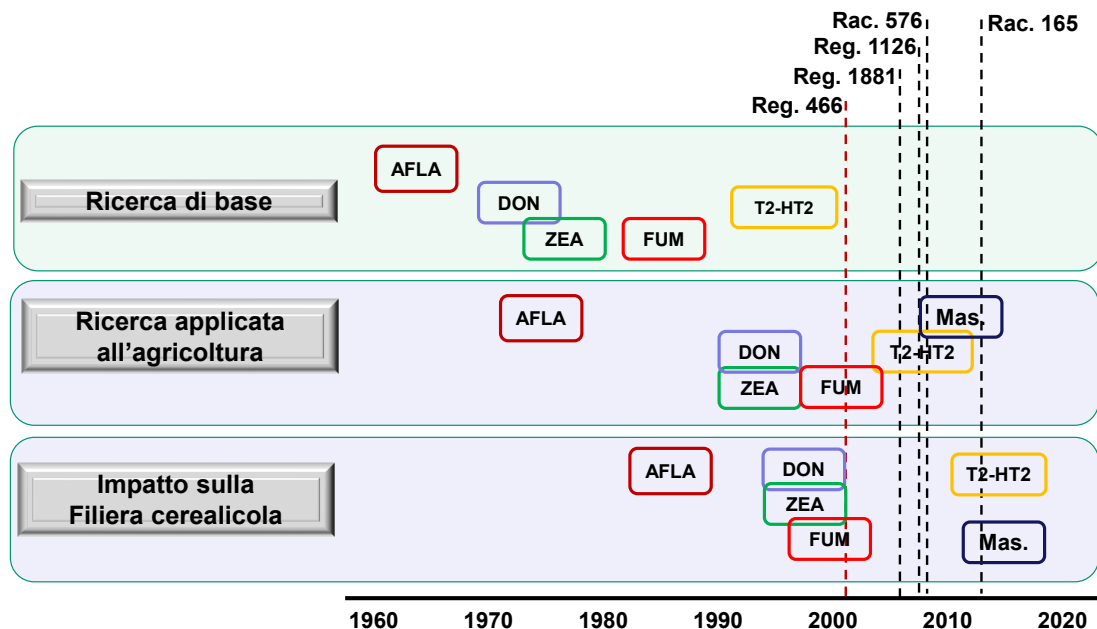


Figura 1. Successione temporale indicativa dell'emergenza del problema micotossine nella ricerca di base, nella ricerca applicata ai sistemi produttivi agricoli e l'impatto sulle filiere

Considerando il contesto italiano e le 2 principali colture cerealicole, il frumento e il mais, l'impatto delle contaminazioni sul sistema produttivo e le filiere è risultato molto evidente. Nella figura 2 si riporta l'andamento delle superfici coltivate ponendolo in relazione ad alcune annate critiche dovute a condizioni meteorologiche che hanno favorito la proliferazione dei funghi tossigeni e l'accumulo di micotossine. In particolare, le produzioni di mais raccolte nel 2003, 2012 e 2015 sono state caratterizzate da elevate e diffuse contaminazioni da aflatossine e secondariamente da fumonisine; inoltre, negli areali centro-settentrionali le produzioni di frumento tenero e duro del 2008 sono state affette da rilevanti contaminazioni da DON. Come la figura evidenzia, a seguito di queste condizioni e del conseguente deprezzamento di molti lotti commerciali, la superficie investita nelle annate successive si è sempre ridotta, accentuando con ciò le altre criticità che da diversi anni concorrono a contenere la superficie dei cereali italiani.

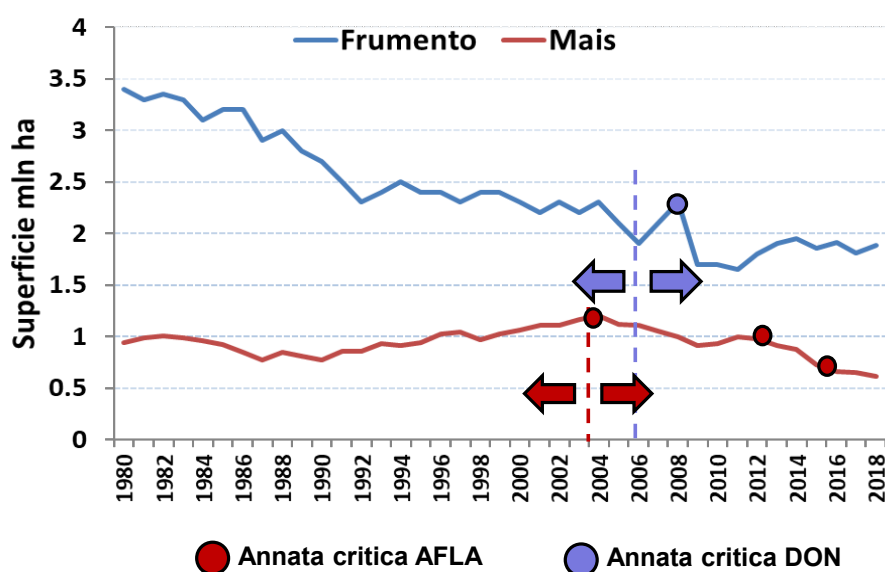


Figura 2. Andamento della superficie investita a frumento e mais filiere in relazione alle annate più critiche per la contaminazione rispettivamente da DON e aflatossine (ISTAT, 2019)

## Dalla gestione dell'emergenza alla coesistenza

A partire dall'entrata in vigore del Regolamento 466/2001 (1) e successivamente dei Regolamenti comunitari 1881/2006 (2), 1126/2007 (3) e 165/2010 (4) e delle Raccomandazioni 2006/583/CE (5) e 2013/165/UE (6), il problema della contaminazione da micotossine è diventata per le filiere una criticità prioritaria che richiedeva un approccio nuovo per la gestione delle produzioni e dei lotti commerciali.

In sintesi, il percorso affrontato dalle filiere può essere suddiviso in 4 fasi principali che individuano sia l'approccio tenuto, sia i mezzi adottati e disponibili al momento per prevenire e contenere la contaminazione da micotossine, che gli strumenti atti a valutare e riconoscere sul mercato i lotti con diversi livelli di contaminazione.

Le quattro fasi dell'evoluzione del problema micotossine affrontato dalle filiere cerealicole sono:

- *Prima fase precedente al 2004: "Emergenza" del problema*  
Selezione areali e fornitori, inizio controlli al conferimento.
  - Obiettivo: lotti commerciali nei limiti
- *Seconda fase 2005-2012: Gestione dell'emergenza*  
Selezione areali e fornitori, controlli sistematici al conferimento, introduzione elementi agro-tecnici straordinari di mitigazione.
  - Obiettivo: i conferimenti dal campo nei limiti
- *Terza fase 2013 al 2020: Coesistenza con le micotossine*  
Selezione areali e fornitori, controlli avanzati al conferimento, eliminazione progressiva degli elementi agro-tecnici di rischio.
  - Obiettivo: contaminazioni quanto più ridotte
- *Quarta fase dal 2020: Controllo delle micotossine*
  - Obiettivo: contaminazioni standard babyfood

La prima fase, già segnalata in precedenza, segna l'emergere del problema e la presa d'atto nei diversi soggetti coinvolti, dall'agricoltore all'industria di seconda trasformazione, della possibilità del reale rischio di incorrere in elevate contaminazioni. Questa fase non ha previsto l'introduzione di misure di mitigazione, in quanto avrebbe richiesto una diretta esperienza non ancora sopravvenuta sul rischio; pertanto, la sola soluzione perseguita è stata la verifica ex post di areali e fornitori seguendo un campionamento a tappeto con strumenti di campionamento e analitici spesso non adeguati.

La seconda fase ha avuto luogo a partire dalle campagne agrarie e di commercializzazione immediatamente successive a seguito della diffusione di sistematiche informazioni e dell'accelerata formazione tecnica degli operatori. In questa fase si è focalizzata l'attenzione su due aspetti principali: l'introduzione di elementi di mitigazione in campo e nel post-raccolta e il più attento controllo preventivo dei conferimenti al centro di raccolta e stoccaggio e successivamente dei lotti commerciali. Entrambi gli aspetti hanno incontrato non indifferenti difficoltà di applicazione soprattutto per l'impegno conseguente l'introduzione di agrotecniche mirate e diverse da quelle fino ad allora seguite, quali la scelta varietale condotta con priorità diverse dall'usuale, l'adozione di attente tecniche di difesa dalle malattie fungine o da insetti responsabili di promuovere le vie di infezione e più in generale, il controllo più attento degli stress. L'altra difficoltà di natura strutturale ha riguardato i centri di raccolta e stoccaggio: questi si sono infatti dovuti dotare di servizi interni con strumenti atti a campionare i conferimenti ed eseguire sistematicamente analisi speditive semi-quantitative, di rinnovare gli impianti di pulitura per decontaminare le granelle e di disporre di un sistema interno di stoccaggio per canalizzare le partite conferite in lotti con contaminazione omogenea. In questa seconda fase rimane però radicata in molti operatori l'idea che il problema delle micotossine sia sporadico e legato ad andamenti meteorologici eccezionali. L'esperienza nel corso degli anni evidenzierà che in molti areali questa non è la realtà.

## Dalla coesistenza al controllo

La terza fase è maturata successivamente con la presa d'atto che le contaminazioni da micotossine sono un problema strutturale e non sporadico e che conseguentemente sia necessario impostare una coesistenza con tali contaminanti che non comporti una passiva accettazione di queste nuove condizioni, quanto piuttosto una sistematica introduzione di misure appropriate di mitigazione in una situazione di rischio elevato. In questo contesto, i diversi attori delle filiere hanno offerto e messo in atto soluzioni e strumenti perfezionati e validati per ridurre il rischio delle contaminazioni: si ricordano a titolo di esempio l'introduzione di nuove varietà più resistenti alla fusariosi della spiga, di programmi di difesa più attenti, di selezionatrici ottiche in grado di individuare e allontanare le granelle ammuffite movimentando sistematicamente i lotti stoccati prima della commercializzazione. Tuttavia, l'introduzione di maggior significato operativo è stata l'adozione progressiva di percorsi integrati e di disciplinari di produzione e di conservazione che hanno introdotto vincoli per escludere l'adozione delle pratiche più rischiose; tale adozione ha spesso richiesto un cambio di approccio che ha contribuito a stringere più stretti rapporti tra i diversi anelli delle filiere, da quello della produzione in campo a quello della seconda trasformazione. Infine, durante questa fase i mercati si sono dotati di strumenti adeguati per riconoscere e quotare nelle borse merci i lotti individuando categorie commerciali distinte in funzione del livello di contaminazione delle principali micotossine.

L'ultima e quarta fase, che rappresenta la naturale evoluzione della precedente, è raggiunta con l'ulteriore affinamento dell'approccio integrato anche attraverso più rigorosi percorsi integrati e disciplinari e l'adozione di ulteriori elementi utili a ridurre il potenziale rischio di contaminazioni fino a ridurlo in misura tale da introdurre nuovi obiettivi sanitari quali quello di rispondere ai livelli più bassi di contaminazione, ad esempio il "livello baby-food", con gli andamenti meteorologici più frequenti. In tal senso il controllo operato in misura diversificata a seconda degli obiettivi spinge il sistema produttivo ad accelerare il percorso che orienta le produzioni di *commodities* verso le *specialties*, non solo nei riguardi del contenuto atteso di micotossine, ma anche di altri aspetti qualitativi e tecnologici.

## Prospettive

Alcune strategie operative attuali o prossime possono contribuire ad uno sguardo più ottimistico sul prossimo futuro. Alcuni esempi, non esaustivi possono essere offerti: da l'adozione della bio-competizione con la diffusione di ceppi atossigeni di *Aspergillus flavus*, che riducono in modo significativo il rischio di contaminazioni da aflatossine; in prospettiva, da l'introduzione di geni della resistenza all'attacco di funghi micotossigeni con la selezione genetica secondo le più avanzate tecniche di New Breeding Techniques (NBT); dai nuovi fungicidi più sistemici ed efficaci anche per le più semplici e meno impattanti applicazioni in concia al seme; da l'applicazione del *remote sensing* operato dai satelliti in grado di guidare l'agrotecnica e individuare gli stress colturali in anticipo e gestire così *ex ante* i conferimenti dei singoli campi contribuendo a superare i vincoli del campionamento e della sua rappresentatività.

Infine, un'osservazione appare opportuna. Il processo descritto ha interessato soprattutto i cereali, i prodotti di base di uno dei principali comparti agro-industriali nazionali e che vedono un ampio e diffuso consumo; tuttavia, il problema delle contaminazioni da micotossine e la loro presenza negli alimenti è rimasta confinata nel mondo tecnico e strettamente commerciale. Altri aspetti hanno influenzato molto più da vicino il dibattito sul mondo agro-alimentare; si pensi agli OGM, oppure all'applicazione e ai residui dei fitosanitari sia nell'ambiente, sia nei cibi, o alla



emissione di gas serra e all'impronta ecologica. Questa sensibile differenza di livello di percezione se, da un lato, ha indotto la politica agro-alimentare, molto soggetta all'opinione pubblica, a sottovalutare e a negare alcuni strumenti programmatici utili a velocizzare il percorso tracciato nelle quattro fasi descritte, dall'altro lato ha permesso la nascita di un percorso complesso e difficile rigorosamente gestito secondo criteri scientifici e tecnici.

Nel complesso pur nella grande eterogeneità dei casi, le strategie attuali di mitigazione si sono dimostrate efficaci. Ne è riprova la capacità dimostrata dalle filiere di gestire situazioni critiche quali quelle incontrate nel 2014 e 2015 per il mais e nel 2018 per i cereali vernini, che solo alcuni anni addietro avrebbero dato origine a criticità commerciali e impatti economici molto superiori.

Una sfida si presenterà ancora nel prossimo futuro: quella di introdurre in modo organico nel Piano strategico nazionale, strumento che guida l'applicazione della PAC nei nuovi PSR, gli elementi e le acquisizioni utili per non ostacolare e disperdere quanto è stato raggiunto in questi anni dalla ricerca, dagli operatori e dalle filiere.

## Bibliografia

1. Europa. Regolamento (CE) n. 466/2001 della Commissione dell'8 marzo 2001 che definisce i tenori massimi di taluni contaminanti presenti nelle derrate alimentari. *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee* L 77/1 del 16.3.2001.
2. Europa. Regolamento (CE) n. 1881/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006, che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione europea* L 364 del 20.12.2006.
3. Europa. Regolamento (CE) n. 1126/2007 della commissione del 28 settembre 2007 che modifica il regolamento (CE) n. 1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari per quanto riguarda le *Fusarium*-tossine nel granoturco e nei prodotti a base di granoturco. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 255/14 del 29.9.2007.
4. Europa. Regolamento (UE) n. 165/2010 della Commissione del 26 febbraio 2010 recante modifica, per quanto riguarda le aflatossine, del regolamento (CE) n. 1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 50/8 del 27.2.2010.
5. Europa. Raccomandazione della Commissione del 17 agosto 2006 sulla presenza di deossinivalenolo, zearalenone, ocratossina A, tossine T-2 e HT-2 e fumonisine in prodotti destinati all'alimentazione degli animali. (2006/583/CE). *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 229/7 del 23.8.2006.
6. Europa. Raccomandazione della Commissione del 27 marzo 2013 relativa alla presenza di tossine T-2 e HT-2 nei cereali e nei prodotti a base di cereali. (2013/165/UE). *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 91/12 del 3.4.2013.

# INNOVAZIONI PER IL CONTROLLO DELLE MICOTOSSINE NEI CEREALI

Massimo Blandino (a), Valentina Scarpino (a), Michael Sulyok (b), Francesca Vanara (a), Amedeo Reyneri (b)

(a) *Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Università degli Studi di Torino, Grugliasco, Italia*

(b) *Center for Analytical Chemistry, Department of Agrobiotechnology (IFA), Tulln, Austria*

## Introduzione

Al fine di minimizzare i rischi sanitari, i sistemi colturali del frumento sono disegnati per controllare principalmente la contaminazione della micotossina normata (1, 2) più frequentemente ritrovata, il deossinivalenolo (DON). La combinazione tra i fattori agronomici, quali la rotazione colturale, la gestione dei residui della coltura precedente, la suscettibilità varietale e l'applicazione di fungicidi in fioritura per il controllo della fusariosi della spiga, in percorsi agronomici integrati impatta fortemente sulla contaminazione da DON con gli andamenti meteorologici più frequenti (3, 4, 5). Lo scenario agronomico più favorevole nel ridurre il rischio di contaminazione (aratura, varietà mediamente tollerante, trattamento fungicida in fioritura) riduce fino al 97% il contenuto in DON rispetto a quello più rischioso (minima lavorazione, varietà suscettibile, nessun trattamento di difesa della spiga) (6). Tuttavia, molte altre micotossine e metaboliti secondari prodotti da *Fusarium* e altre specie sono ritrovati nei cereali vernini (7, 8). Vengono definite micotossine emergenti questi composti con probabile azione tossica nei confronti dell'uomo e/o degli animali superiori per le quali mancano ancora dettagliate informazioni scientifiche. L'autorità per la sicurezza alimentare europea (*European Food Safety Authority*, EFSA) sta lavorando per ottenere un'opinione scientifica sul rischio per la salute pubblica relativamente alla presenza di micotossine emergenti negli alimenti e nei mangimi (9, 10). Tuttavia oltre a raccogliere informazioni necessarie a verificare la presenza e il livello di contaminazione di questi metaboliti negli areali cerealicoli e nei prodotti alimentari e verificarne il potenziale tossico, risulta fondamentale verificare l'impatto che le soluzioni agronomiche possano esercitare sulla prevenzione della contaminazione di questi composti sintetizzati sia nella maggior parte dei casi da diverse specie fungine. L'obiettivo di questo contributo è quello di verificare se l'applicazione dei programmi agronomici per controllare il DON possa minimizzare il rischio anche delle micotossine emergenti. Inoltre vengono esposti i risultati di recenti sperimentazioni al fine di individuare l'impatto di nuove soluzioni e alternative agli strumenti attualmente disponibili per il controllo della problematica micotossine nei cereali vernini.

## Materiali e metodi

### Confronti agronomici

Nell'ambito di diverse sperimentazioni in campo (2012-2018) condotte in Nord Italia in condizioni di inoculo naturale sono stati confrontati percorsi agronomici per la coltivazione del frumento tenero con differente suscettibilità al DON, per verificarne l'impatto sulle micotossine emergenti:

– *Gestione dei residui colturali*

Nella località di Poirino (TO) sono stati messi a confronto negli anni 2012 – 2015 tre differenti lavorazioni del terreno, in appezzamenti la cui precessione colturale era mais da granella:

- Aratura, con interrimento a circa 30 cm dei residui coltura, seguito da un affinamento del terreno con un passaggio dell'erpice a dischi e di un erpice rotante, e successiva semina con una seminatrice meccanica per cereali vernini;
- Minima lavorazione, con un interrimento parziale dei residui colturali mediante un doppio passaggio con erpice a dischi e semina del frumento con le modalità descritte per la tesi arata;
- Semina su sodo, ovvero nessun interrimento dei residui coltura e semina diretta in un solco inciso da una specifica seminatrice.

– *Scelta varietale e fungicida*

Nella località di Cigliano (VC) e Carmagnola (TO) nelle campagne agrarie 2011-12 e 2012-13 sono stati confrontati 4 percorsi agronomici ottenuti dalla combinazione di 2 varietà con differente suscettibilità al DON e l'esecuzione del trattamento fusaricida in fioritura (s.a. protioconazolo):

- una varietà di frumento tenero (cv. Generale) moderatamente tollerante la fusariosi della spiga (FHB) trattata con fungicida;
- la varietà di frumento tenero (cv. Generale) non trattata;
- una varietà di frumento duro (cv. Saragolla) sensibile alla FHB trattata con fungicida;
- la varietà di frumento duro (cv. Saragolla) non trattata.

– *Nuove varietà resistenti alla fusariosi della spiga*

Nella località di Cigliano negli anni 2016-2018 sono stati confrontate 4 nuove varietà di frumento duro di recente costituzione con bassa suscettibilità alla FHB (cv. Sy Cysco, Fuego, Odisseo e Secolo) a confronto con un testimone suscettibile (cv. Saragolla).

– *Applicazione di composti naturali con azione antifungina*

Nella località di Buriasco (TO) negli anni 2014-2016 sono stati applicati degli estratti da alghe del genere *Spirulina* e *Nannochloropsis* ad alto contenuto di acidi fenolici sia in piastra sia in pieno campo per verificarne l'azione di contenimento della contaminazione da micotossine a confronto con quella di fungicidi azolici (s.a. tebuconazolo e protioconazolo). Le parcelle sperimentali sono state raccolte meccanicamente e un campione rappresentativo di granella è stato prelevato per l'analisi delle micotossine.

## Analisi HPLC-ESI-MS/MS

Un campione rappresentativo di 3 kg di granella di ciascuna parcella è stato macinato utilizzando un molino ZM 200 Ultra Centrifugal Mill (Retsch GmbH, Haan, Germania) e il macinato integrale ottenuto è stato utilizzato direttamente per l'estrazione. Un sottocampione rappresentativo di 5 g è stato estratto utilizzando 20 mL di una miscela di acetonitrile/acqua/acido acetico 79:20:1 (v/v/v). Dopo l'estrazione i campioni sono stati centrifugati, diluiti 1:1 e iniettati come descritto da Sulyok *et al.* nel 2006 (11).

L'identificazione e la quantificazione sono stati eseguiti utilizzando un sistema LC-MS/MS QTrap 5500 (Applied Biosystems, Foster City, CA). I parametri cromatografici e spettrometrici di massa degli analiti investigate sono descritti da Malachova *et al.* nel 2014 (12). I risultati della concentrazione da micotossine sono stati corretti sulla base del tasso di recupero.

## Risultati e discussione

Oltre al DON, i composti più abbondanti sono stati aurofusarina, culmorina, deossinivalenolo-3-glucoside (DON-3-G), moniliformina ed enniatine. Altri tricoteceni, forme derivate dello zerealenone, tossine da *Alternaria* e alcaloidi dell'ergot sono stati ritrovati a minori concentrazioni e in specifiche condizioni meteorologiche e agronomiche.

### Gestione dei residui colturali

Come noto l'applicazione di tecniche di non lavorazione (No till) o di minima lavorazione che non permettono l'interramento profondo dei residui colturali determina un aumento del rischio di contaminazione da DON in diverse condizioni pedo-climatiche. Queste tecniche di agricoltura conservativa determinano inoltre anche un aumento del rischio di contaminazione da altre micotossine emergenti quali le enniatine (Figura 1). La contaminazione della granella di frumento degli alcaloidi dell'ergot risulta chiaramente associata ad alcune campagne agrarie e in particolare all'adozione di tecniche di semina su sodo.

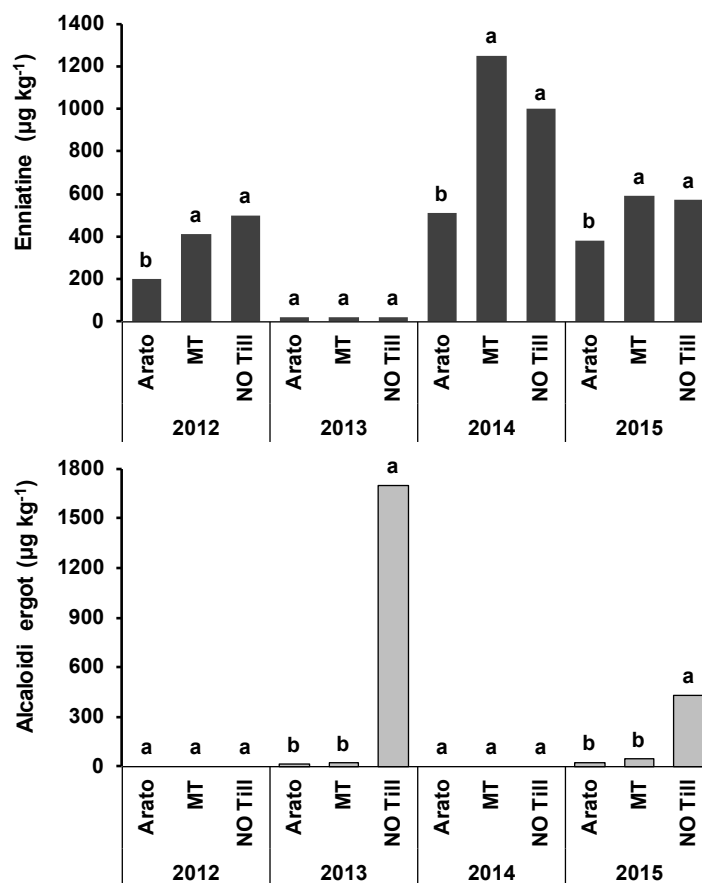


Figura 1. Effetto delle minime lavorazioni (MT) e semina su sodo (No Till) sulla contaminazione da enniatine e alcaloidi ergot rispetto all'interramento dei residui colturali con l'aratura. Sperimentazioni condotte a Poirino (TO) nel 2012-2015. Lettere differenti indicano differenze statisticamente significative ( $P < 0,05$ )

## Scelta varietale e fungicida

L'applicazione dei percorsi agronomici che derivano dalla combinazione di varietà con differente suscettibilità varietale per minimizzare il rischio di contaminazione da DON riduce significativamente (>84%) la contaminazione di altri metaboliti prodotti dalle specie fungine produttrici del DON, mentre riducono, in misura minore i metaboliti prodotti da altre specie fungine.

Tuttavia l'adozione di percorsi agronomici meno predisponenti l'accumulo di DON nella granello (varietà mediamente tollerante di frumento tenero con l'applicazione di un fungicida in fioritura) permette anche una riduzione significativa e chiara del contenuto in altri metaboliti associati al DON (DON-3-G, culmorina), tossine prodotte da *F. avenaceum* (enniatine e moniliformina) e anche le tossine da *Alternaria* (tentoxina, alternariolo e alternariolo-metil-etere).

**Tabella 1. Impatto di percorsi agronomici ottenuti dalla combinazione di cultivar di frumento tenero e duro e l'applicazione di fungicidi in fioritura per il controllo della fusariosi della spiga sul contenuto in deossinivalenolo 3-glucoside (DON-3-G), culmorina, enniatine, moniliformina e tossine di alternaria (somma di tentoxina, alternariolo e alternariolo-metil-etere)**

Anno	Percorso agronomico	DON-3G		Culmorina		Enniatine		Moniliformina		Tossine da Alternaria	
		(µg kg <sup>-1</sup> )		(µg kg <sup>-1</sup> )		(µg kg <sup>-1</sup> )		(µg kg <sup>-1</sup> )		(µg kg <sup>-1</sup> )	
2011	tenero-fungicida	19	c	54	d	18	c	< LOQ	b	1,6	d
	tenero-non trattato	46	b	84	c	72	b	6	b	2,8	c
	duro-fungicida	386	a	749	b	501	a	117	a	5,9	b
	duro-non trattato	395	a	1038	a	620	a	117	a	7,6	a
2012	tenero-fungicida	52	d	99	c	41	b	19	a	0,9	c
	tenero-non trattato	264	c	579	b	97	ab	31	a	1,5	b
	duro-fungicida	440	b	791	b	147	ab	63	a	4,2	a
	duro-non trattato	1003	a	1988	a	265	a	112	a	5,4	a
2013	tenero-fungicida	38	c	275	c	10	c	< LOQ	b	0,6	b
	tenero-non trattato	75	b	587	b	27	bc	9	ab	1,0	b
	duro-fungicida	121	a	818	b	38	ab	18	a	4,5	a
	duro-non trattato	158	a	1203	a	87	a	31	a	5,1	a

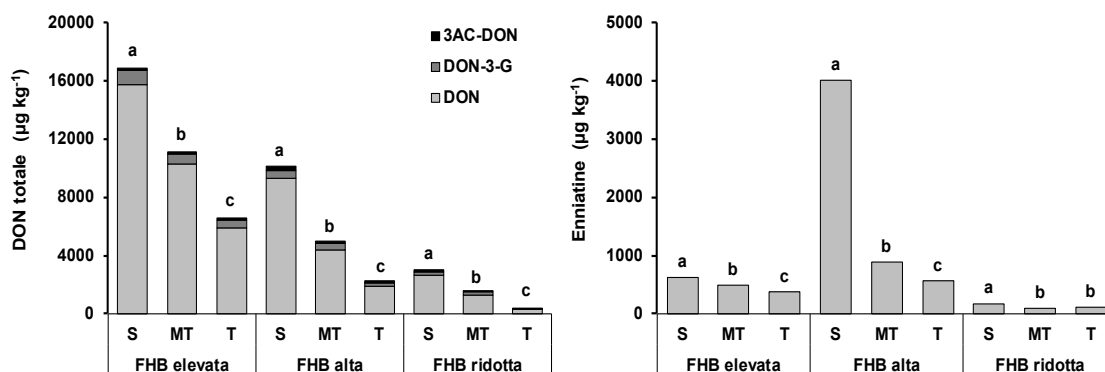
Sperimentazioni condotte a Cigliano (VC) e Carmagnola (TO) dal 2011 al 2013.

Lettere differenti in ciascuna colonna e per ciascuna campagna agraria indicano differenze statisticamente significative (P<0,05)

## Nuove varietà resistenti alla fusariosi della spiga

L'utilizzo di nuove varietà di frumento duro più tolleranti alla fusariosi della spiga permette una chiara riduzione del contenuto in DON totale (somma di DON e delle sue forme acetilate e glucosilodate) rispetto a varietà con elevata e media suscettibilità alla fusariosi della spiga (Figura 2).

Nelle varietà più tolleranti la malattia e nelle campagne con minor presenza della patologia il rapporto DON-3-G/DON risulta superiore, sebbene complessivamente questo non influenzi negativamente l'efficacia di queste varietà sul DON totale. Le varietà più tolleranti della malattia risultano inoltre essere anche quelle con una minor contaminazione da enniatine.



**Figura 2. Contenuto in deossinivalenolo totale (somma di DON, deossinivalenolo 3- glucoside DON-3G e 3 acetil-deossinivalenolo, 3AC-DON) in varietà di frumento duro suscettibili (S), mediamente tolleranti (MT) e tolleranti (T) alla fusariosi della spiga (FHB) in campagne agraria con differente pressione della malattia. Sperimentazioni condotte a Cigliano (VC) nel 2016-2018. Lettere differenti indicano differenze statisticamente significative (P<0,05)**

## Applicazione di composti naturali con azione antifungina

Rispetto all'applicazione di un fungicida fortemente efficace nel controllo degli agenti della fusariosi della spiga (miscela di tebuconazolo + prolioconazolo) l'applicazione di estratti dalle microalghe alla fioritura del frumento non ha permesso un paragonabile vantaggio produttivo, e soprattutto un'adeguata capacità di controllo della severità delle malattie fogliari (complesso della septoriosi). L'applicazione in campo evidenzia una significativa capacità di questi estratti naturali nel contenere i sintomi della fusariosi della spiga rispetto ad un testimone non trattato, con un'efficace simile a quella della s.a. fungicida tebuconazolo, sebbene inferiore rispetto a quella osservata con l'impiego di prolioconazolo (Tabella 2). Tuttavia, l'impiego di questi composti in pieno campo non ha permesso una significativa riduzione della contaminazione della granella in campo.

**Tabella 2. Effetto dell'applicazione in fioritura di estratti dalle microalghe *Spirulina* e *Nannochloropsis* sulla produzione di granella, la severità del complesso della septoriosi e della fusariosi della spiga (FHB) alla maturazione cerosa, e il contenuto in deossinivalenolo nella granella di frumento tenero**

Trattamento	Produzione granella (t/ha)	Severità (%)		DON	
		complesso septoriosi	FHB	T	N (µg/kg)
Testimone non trattato	6,7 c	43,1 a	5,1 a	7,1 a	1532
<i>Spirulina</i> sp.	6,9 bc	38,2 a	3,3 b	7,1 a	1479
<i>Nannochloropsis</i> sp.	6,9 bc	39,3 a	3,1 b	7,0 ab	1336
Tebuconazolo	7,3 ab	28,9 b	3,1 b	6,7 abc	1155
Prolioconazolo	7,7 a	17,6 c	1,1 c	5,7 bc	874
Tebuconazolo + Prolioconazolo	7,5 a	17,7 c	1,3 c	5,5 c	767

Dati medi di 2 anni e 4 ripetizioni. Sperimentazioni condotte a Buriasso (TO) nel 2015-2016. Lettere differenti in ciascuna colonna indicano differenze statisticamente significative (P<0,05)

## Conclusioni

I dati raccolti evidenziano che nei cereali vernini l'adozione delle soluzioni agronomiche e i metodi di lotta impiegati per il controllo del DON permettono anche una riduzione più o meno marcata a seconda della classe di metaboliti, delle micotossine emergenti. L'impatto di innovative strategie di controllo della fusariosi della spiga, quali la selezione di nuove varietà più tolleranti, l'utilizzo di composti naturali ad azione fungicida (estratti algali ad alto potere antiossidante), la distribuzione di biocompetitori al suolo per ostacolare la formazione dell'inoculo, si prospettano tra le soluzioni ecocompatibili nei confronti delle quali la ricerca si sta indirizzando per introdurre innovazioni per il controllo della contaminazione delle micotossine normate ed emergenti nei cereali. Le nuove soluzioni potranno contribuire a ridurre ulteriormente il rischio sanitario nei cereali vernini, ma per ottenere risposte positive debbono essere considerate con attenzione, in particolare per le applicazioni di biocompetitori, le interazioni con il sistema colturale e l'andamento meteorologico. Tuttavia perché queste soluzioni possano essere inserite nei sistemi colturali è fondamentale verificarne non solo l'azione nei confronti della fusariosi della spiga e del contenuto in micotossine, ma anche considerare l'impatto sulle patologie fogliari e il ritorno economico dell'investimento.

## Bibliografia

1. Europa. Regolamento (CE) n. 1881/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006, che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione europea* L 364 del 20.12.2006.
2. Europa. Regolamento (CE) n. 1126/2007 della commissione del 28 settembre 2007 che modifica il regolamento (CE) n. 1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari per quanto riguarda le *Fusarium*-tossine nel granoturco e nei prodotti a base di granoturco. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 255/14 del 29.9.2007.
3. Pirgozliev SR, Edwards SG, Hare MC, Jenkinson P. Strategies for the control of Fusarium head blight in cereals. *Eur J Plant Pathol* 2003;109:731-42.
4. Koch HJ, Pringas C, Maerlaender B. Evaluation of environmental and management effects on Fusarium head blight infection and deoxynivalenol concentration in the grain of winter wheat. *Eur J Agron* 2006;24:357-66.
5. Orlando B, Barrier-Guillot B, Gourdain E, Mourmené C. Identification of agronomic factors that influence the levels of T-2 and HT-2 toxins in barley grown in France. *World Mycotoxin J* 2010;3:169-74.
6. Blandino M, Haidukowski M, Pascale M, Plizzari L, Scudellari D, Reyneri A. Integrated strategies for the control of Fusarium head blight and deoxynivalenol contamination in winter wheat. *Field Crop Res* 2012;133:139-49.
7. Jestoi M. Emerging Fusarium-mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin—A review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2008;48:21-49.
8. Berthiller F, Crews C, Dall'Asta C, De Saeger S, Haesaert G, Karlovsky P, Oswald IP, Walburga S, Gerrit S, Stroka J. Masked mycotoxins: a review. *Mol Nutr Food Res* 2013;57(1):165-86.
9. EFSA Request for a scientific opinion on the risks for public health related to the presence of moniliformin in feed and food, Mandate M-2010-0312, Reception Date 21-07-2010, Acceptance Date 09-09-2010.
10. EFSA. Scientific Opinion on the risks to human and animal health related to the presence of beauvericin and enniatins in food and feed. *EFSA Journal* 2014;12(8):3802.

11. Sulyok M, Berthiller F, Krska R, Schuhmacher R. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2006;20:2649-59.
12. Malachova A, Sulyok M, Beltran E, Berthiller F, Krska R. Optimization and validation of a quantitative liquid chromatography - tandem mass spectrometric method covering 295 bacterial and fungal metabolites including all relevant mycotoxins in four model food matrices. *J Chromatogr A* 2014;1362:145-56.



# RIPARTIZIONE DELLE MICOTOSSINE NORMATE ED EMERGENTI DURANTE LA MOLITURA DEL MAIS

Valentina Scarpino (a), Francesca Vanara (a), Michael Sulyok (b), Amedeo Reyneri (a), Massimo Blandino (a)

(a) *Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Università degli Studi di Torino, Grugliasco, Italia*

(b) *Center for Analytical Chemistry, Department for Agrobiotechnology (IFA-Tulln), Tulln, Austria*

## Introduzione

Oggi giorno, risulta sempre più necessario raccogliere dati sulla presenza e diffusione delle cosiddette micotossine “emergenti” nelle più importanti aree cerealicole dell’Unione Europea (UE), al fine di salvaguardare la sicurezza alimentare del consumatore valutandone correttamente l’esposizione e il rischio in concomitanza alle micotossine normate. Infatti, recentemente è stata rivolta una crescente attenzione a tali metaboliti secondari, non ancora normati a livello internazionale, ma su cui è in corso un intenso esame per valutarne la diffusione e le implicazioni sanitarie.

Inoltre, non sono ancora note informazioni circa il ruolo della molitura del mais su tali micotossine. Per tale motivo, il presente studio ha l’obiettivo di valutare l’effetto dei processi molitori a secco sulla ripartizione delle micotossine normate quali: fumonisine B (FB), deossinivalenolo (DON), zearalenone (ZEA) e aflatossine (AF); e dei più diffusi metaboliti fungini cosiddetti “emergenti” nella granella di mais, nei semilavorati e nei prodotti finiti ad uso alimentare.

## Materiali e metodi

La sperimentazione è stata condotta presso un molino industriale processando 3 diversi lotti (2012-2014) con due sistemi di degerminazione:

- a secco: *Dry-Degermination*, DD;
- a umido: *Tempering-Degermination*, TD.

Campionando secondo il Regolamento (CE) 401/2006 (1) sono stati prelevati:

- la granella prima (Mais Non Pulito, MNP) e dopo la pulitura (Mais Pulito, MP);
- i sottoprodotti quali il germe, destinato essenzialmente all’industria olearia, e la farinetta ad uso zootecnico, un misto di crusca e parti di endosperma farinoso;
- i prodotti ad uso alimentare, quali le farine (bramata, fioretto e fumetto) dal processo di DD e gli *hominy grits* (grossi, medi e fini) dalla TD.

La granulometria delle particelle dei prodotti ad uso alimentare a base di mais ottenuti in seguito ai due processi di molitura è riportata in Tabella 1.

**Tabella 1. Ridistribuzione in base delle dimensioni delle particelle dei prodotti ad uso alimentare a base di mais in seguito ai due processi di molitura DD e TD**

Prodotti	Percentuale					
<b>Processo di molitura DD</b>						
	< 315 $\mu\text{m}$	315-500 $\mu\text{m}$	500-710 $\mu\text{m}$	710-800 $\mu\text{m}$	800-1000 $\mu\text{m}$	>1000 $\mu\text{m}$
Fioretto	95	5				
Fumetto	3	70	20	5	2	0
Bramata	4	12	35	22	25	2
<b>Processo di molitura TD</b>						
	< 2500 $\mu\text{m}$	2500-3000 $\mu\text{m}$	3000-4000 $\mu\text{m}$	>4000 $\mu\text{m}$		
<i>Hominy grits</i> fini	40	60				
<i>Hominy grits</i> medi	5	20	73			2
<i>Hominy grits</i> grossi						100

DD = dry-degermination; TD = tempering-degermination.

## Estrazione e clean-up

Durante la fase estrattiva 5 g di sfarinato di mais sono stati estratti con 20 mL di  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{COOH}$  79:20:1 (v/v/v) e posti in agitazione in un agitatore orbitale per 90 min. Il surnatante è stato successivamente diluito 1:1 con una soluzione di  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{COOH}$  20:79:1 (v/v/v) e sottoposto ad analisi UPLC-MS/MS (*Ultra Performance Liquid Chromatography - tandem Mass Spectrometry*) multi-micotossina.

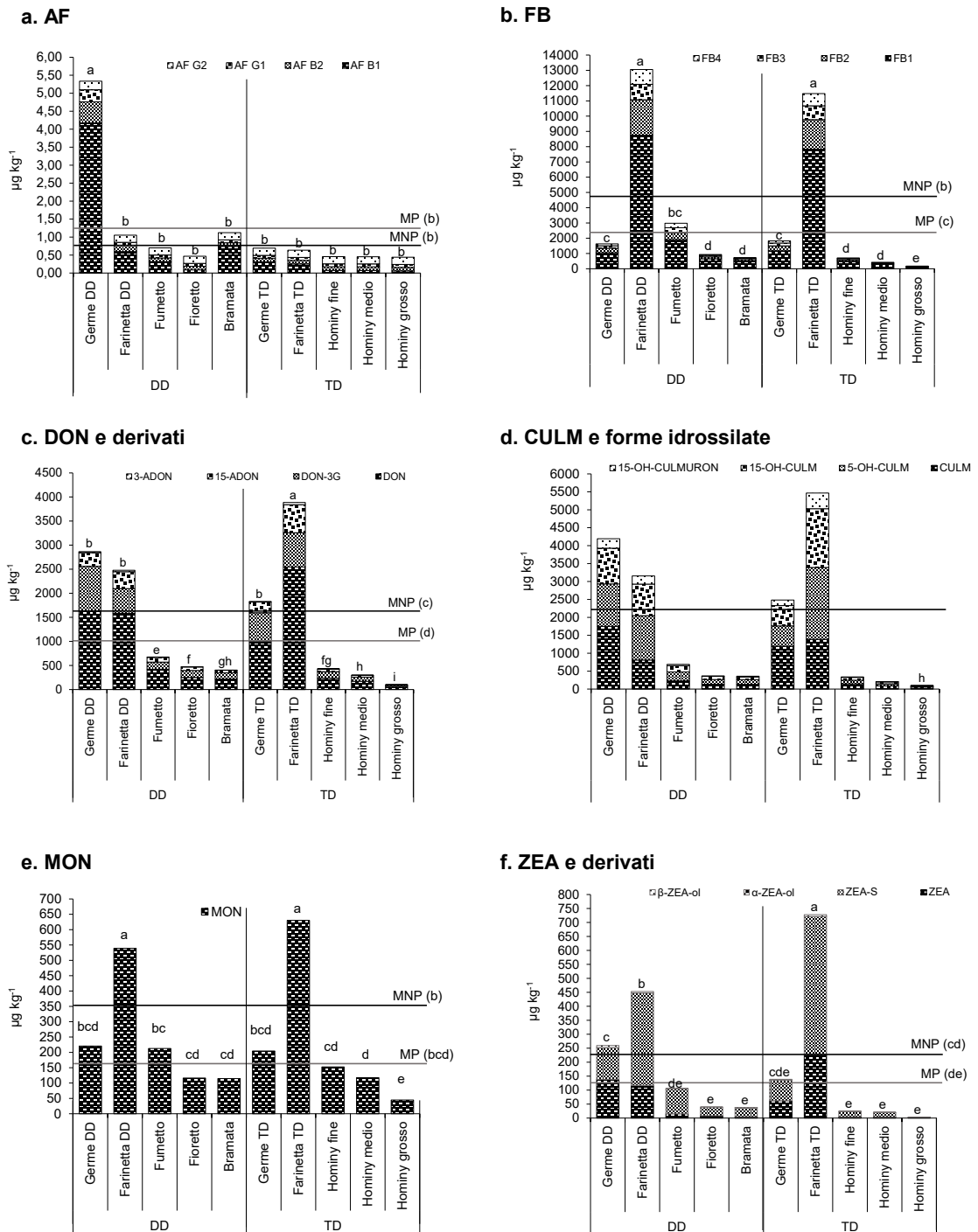
## Analisi UPLC-MS/MS Multi-micotossina

I campioni estratti sono stati analizzati con un metodo multi-micotossina mediante l'impiego di un sistema LC-MS/MS ibrido Qtrap 5500 equipaggiato con una sorgente di ionizzazione *TurboIonSpray electrospray* (ESI) e un Sistema UPLC, in grado di quantificare simultaneamente 295 diversi metaboliti batterici e fungini, tra cui le micotossine emergenti (2).

## Risultati e discussione

In tutti i campioni analizzati con il metodo LC-MS/MS multi-micotossina è stata rilevata la co-presenza delle micotossine normate e di 23 metaboliti fungini emergenti, tra cui: il 3- e il 15-acetildeossinivalenolo (3- e 15-ADON), l'aurofusarina, la beauvericina, la bikaverina, il butenolide, il deossinivalenolo-3-glucoside (DON-3-G), la culmorina (CULM) e le sue forme idrossilate (5- e 15-OH-CULM, 15-OH-CULMURON), le fumonisine A, la fusaproliferina (FUS), la fusarina C, la moniliformina (MON), il nivalenolo (NIV), le forme derivate dello ZEA –  $\alpha$ - e  $\beta$ -zearalenolo ( $\alpha$ -ZEA-ol e  $\beta$ -ZEA-ol), zearalenone-4-solfato (ZEA-S).

La Figura 1 riassume la ripartizione delle principali classi di micotossine rilevate in grafici separati: a) AF (AF B<sub>1</sub>, AF B<sub>2</sub>, AF G<sub>1</sub>, AF G<sub>2</sub>); b) FB (FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub>, FB<sub>3</sub>, FB<sub>4</sub>); c) DON e derivati (DON, DON-3-G, 3-ADON, 15-ADON); d) CULM e forme idrossilate (CULM, 5- e 15-OH-CULM, 15-OH-CULMURON); e) MON; f) ZEA e derivati (ZEA,  $\alpha$ -ZEA-ol e  $\beta$ -ZEA-ol, ZEA-S).



**Figura 1. Ripartizione delle micotossine normate ed emergenti durante la molitura del mais. I valori medi, relativi al contenuto di micotossine/metaboliti fungini nelle diverse frazioni, seguiti da lettere diverse sono significativamente diversi (livello di significatività,  $P < 0,001$ )**

Le operazioni di pulitura hanno ridotto in media di 1,2-2 volte il contenuto di tutti i metaboliti fungini rilevati rispetto alla granella di origine.

Per quanto riguarda il germe, il livello di contaminazione non si è differenziato da quello della granella pulita per la maggior parte dei metaboliti, ad eccezione di: AF, DON e derivati, NIV, ZEA e derivati, CULM e forme idrossilate, FUS, acido fusarico e fusarinolico, fusarina C e acido cogico; per i quali ha presentato un contenuto superiore di almeno 2 volte rispetto alla granella pulita. Un aumento di contaminazione paragonabile è stato anche registrato nella farinetta ad uso zootecnico, che assomma tegumenti e frazioni fini delle parti di endosperma farinoso, per tutti i metaboliti rilevati.

I prodotti destinati al consumo umano sono sempre risultati meno contaminati dei sottoprodotti precedentemente menzionati. Le farine bramata e fioretto hanno presentato mediamente per tutte le micotossine una decontaminazione superiore al 70% rispetto alla granella di partenza; mentre il fumetto, che presenta la granulometria più fine, solo del 50% e in alcuni casi addirittura inferiore. L'*hominy grits* grosso è risultata la frazione più decontaminata per tutti i metaboliti, con valori medi di decontaminazione superiori all'80%.

I prodotti con granulometria più fine sono risultati essere quelli maggiormente contaminati.

## Conclusioni

La sperimentazione evidenzia che la distribuzione delle micotossine emergenti nelle frazioni di molitura, seppur per alcune il tasso di abbattimento è risultato inferiore, è simile a quella delle micotossine già normate. Infatti, per la maggior parte delle micotossine rilevate la contaminazione nei prodotti della lavorazione molitoria della granella di mais si riduce all'aumentare della granulometria del prodotto finito. Tale comportamento si è osservato per entrambi i processi di trasformazione considerati. Per le micotossine che hanno mostrato un'intensità di decontaminazione nei prodotti finiti inferiore rispetto a quello delle FB, si può ipotizzare una loro più interna localizzazione nell'endosperma della cariosside di mais. Risulta, inoltre, importante sottolineare l'aumento significativo della contaminazione nel germe di: AF, DON e derivati, NIV, ZEA e derivati, CULM e forme idrossilate, FUS, acido fusarico e fusarinolico, fusarina C e acido cogico. I dati raccolti forniscono una prima base per la valutazione del rischio di contaminazione da micotossine normate ed "emergenti" nei prodotti molitori della filiera maidicola alimentare. Pertanto, occorre prestare attenzione ai livelli di co-contaminazione nei prodotti con granulometria più fine e nei sottoprodotti e adottare attenti interventi di pulitura, tramite l'impiego di metodi sia meccanici che ottici.

## Bibliografia

1. Europa. Regolamento (CE) n. 401/2006 della commissione del 23 febbraio relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari, *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 70/12 del 9.3.2006.
2. Malachova A, Sulyok M, Beltran E, Berthiller F, Krska R. Optimization and validation of a quantitative liquid chromatography - tandem mass spectrometric method covering 295 bacterial and fungal metabolites including all relevant mycotoxins in four model food matrices. *J Chromatogr A* 2014;1362:145-156.

# RISCHIO MICOTOSSINE: UNA POSSIBILE SOLUZIONE PER IL MAIS

Rolando Manfredini

Area Sicurezza Alimentare e produttiva, Coldiretti, Modena, Italia

## Introduzione

La cerealicoltura è uno dei comparti più importanti del panorama agricolo italiano: il valore della produzione ai prezzi di base del totale cereali ammonta a 3.660 milioni di euro, pari al 13,3% delle coltivazioni agricole. Nello specifico, le produzioni cerealicole più rilevanti sono frumento tenero, frumento duro, mais e orzo, dislocate sull'intero territorio nazionale, da nord a sud e indistintamente in pianura, collina e montagna, che nel complesso rappresentano l'82% del valore totale del comparto cerealicolo. È un settore di primaria importanza nell'alimentazione, qualificandosi come matrice originaria del nostro *Made in Italy* più tipico, come la pasta, la pizza, i dolci tipici, con fatturati importanti anche per il settore della prima trasformazione (3.467 milioni di euro per l'industria molitoria e 6.080 milioni per i mangimi) e per il complesso industriale di seconda trasformazione (4.735 milioni di euro per la pasta e 5.359 milioni per i prodotti da forno).

La strutturazione delle filiere cerealicole vede un sistema economico complesso e articolato, dove è significativo l'apporto delle importazioni: 5,3 milioni di tonnellate per il frumento tenero, 2,1 milioni di tonnellate per il frumento duro, 5,4 milioni di tonnellate per il mais. Ciò, oltre ad avere un impatto sui prezzi e sulla filiera produttiva italiana, ha anche conseguenze sul piano della sicurezza alimentare.

Secondo i dati del sistema di allerta rapido europeo (*Rapid Alert System for Food and Feed*, RASFF), che rileva se gli alimenti contengono sostanze vietate o quantità eccessive di sostanze ad alto rischio per cui l'allarme è diffuso in tutta l'Unione Europea (UE), il rischio di contaminazione di micotossine sui prodotti alimentari è tra quelli più presenti negli ultimi anni (quasi sempre al terzo posto). Anche l'Italia, che è tra i Paesi europei che effettua il maggior numero di notifiche nella rete RASFF, continua a segnalare la contaminazione da micotossine su una serie di prodotti, in particolare di aflatossine su nocciole e fichi secchi dalla Turchia. Considerato che la Turchia è il principale esportatore di nocciole in Italia, è evidente la minaccia alla sicurezza alimentare (*food safety*) per importazioni da Paesi che non hanno gli stessi standard produttivi e sanitari, come quelli europei/italiani.

## Rischio Micotossine

Le muffe produttrici di micotossine possono essere rinvenute su quasi tutte le colture d'interesse agrario e in ogni punto della catena alimentare. Tali muffe sono riconducibili essenzialmente a quattro generi fungini: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Alternaria*.

Fino ad ora sono stati identificati sei gruppi principali di micotossine: Aflatossine, Fumonisine, Tricoteceni, Ocratossina, Patulina e Zearalenone.

Il rischio della contaminazione è presente anche in Italia e affligge in particolare i produttori di cereali, soprattutto di mais, che subiscono il deprezzamento del prodotto a causa di condizioni sanitarie non adeguate delle cariossidi, con ricadute negative anche in termini di investimenti.

Gli alimenti più spesso contaminati dalle micotossine sono i cereali (mais in particolare, crusca di grano, orzo), i semi oleosi (arachidi, soia, girasole) e i semi di cotone.

Sensibili all'attacco delle muffe generatrici di micotossine sono anche i legumi, la frutta secca ed essiccata e le spezie. È possibile riscontrare micotossine anche nel vino, per precedenti attacchi fungini alle uve.

La contaminazione "diretta" può anche verificarsi nelle fasi di immagazzinamento: una cattiva conservazione può far comparire le aflatossine anche in prodotti non considerati a rischio. Inoltre, qualora mangimi contaminati vengano usati nella alimentazione degli animali, anche i prodotti da questi derivati (latte, carne e uova) possono risultare contaminati (contaminazione "indiretta").

Il settore primario è il punto iniziale della prevenzione della contaminazione da micotossine e gli agricoltori sono impegnati nell'applicazione delle buone pratiche per il controllo in ogni fase del processo:

- in campo, a partire dalla scelta dell'avvicendamento delle colture, che previene e ferma il propagarsi di ceppi fungini da un raccolto all'altro, alla scelta dell'epoca di semina e/o di ibridi adatti, così da poter effettuare la raccolta verso la fine dell'estate inizio dell'autunno, quando le temperature non sono eccessivamente elevate al raccolto, alla densità della semina, alla corretta concimazione, al diserbo, al controllo dei parassiti, ecc.
- in fase di raccolta, a partire dall'epoca di raccolta, che deve essere tempestiva e con umidità della granella preferibilmente superiore al 22-24%, alla scelta delle macchine di raccolta per limitare i danni meccanici alla granella;
- in fase post-raccolta di ricevimento del prodotto, pulitura, essiccazione e conservazione, che sono fondamentali per contenere lo sviluppo delle micotossine e non vanificare il lavoro fatto a monte.

Per offrire agli agricoltori uno strumento operativo pratico per controllare il ciclo produttivo, nonché alle autorità preposte per uniformare le procedure di controllo, Coldiretti ha predisposto un proprio "Manuale di corretta prassi operativa per la rintracciabilità e l'igiene dei prodotti alimentari e dei mangimi", validato dal Ministero della Salute nel 2008, che ha contribuito a implementare a livello delle imprese agricole le buone prassi per prevenire lo sviluppo delle micotossine, dal campo alla trasformazione.

Successivamente, nel 2016 il Ministero delle Politiche Agricole ha emanato le "Linee guida per il controllo delle micotossine nella granella di mais e frumento tenero e duro" (1), che riassume, con finalità operative, i punti critici e gli interventi opportuni per ridurre nella granella di mais e di frumento la probabilità di elevate contaminazioni di micotossine, attualmente normate a livello europeo (Aflatossine, Deossinivalenolo, Fumonisine, Ocratossina A, T2-HT2, Zearalenone).

Per prevenire efficacemente il problema delle micotossine nel mais, oltre alle necessarie buone pratiche agricole, c'è un ulteriore strumento, un prodotto innovativo e totalmente naturale, l'AF-X1, una miscela di funghi autoctoni non tossigeni del ceppo *Aspergillus flavus* appartenenti allo stesso genere dei funghi patogeni, messo a punto dall'Università Cattolica del Sacro Cuore di Piacenza, in collaborazione con Pioneer, Coldiretti e Consorzi Agrari d'Italia. Il ceppo, selezionato tra i 138 *Aspergillus* presenti in Italia, distribuito sulle coltivazioni in modo da inoculare le piante ospiti e occupare la nicchia ecologica prediletta dai funghi patogeni, ha l'obiettivo di impedirne lo sviluppo. I primi risultati fanno ben sperare: nelle prove eseguite sul mais il livello di aflatossine delle coltivazioni trattate con AF-X1 è stato < 20 ppb (limite attualmente in vigore per le materie prime destinate a mangimi) nel 99,8% e < 3 ppb nel 96,2% dei casi, consentendo a queste produzioni l'accesso alle filiere di qualità.

## Conclusioni

In conclusione, produrre alimenti sicuri e di qualità costa e il mercato dovrebbe riconoscere un giusto prezzo agli sforzi dei produttori. Il settore primario è il punto iniziale, ma le misure di prevenzione della contaminazione da micotossine devono essere adottate da tutti i soggetti della filiera ed è quindi indispensabile il loro coinvolgimento nell'individuazione delle misure da adottare e nell'applicazione delle stesse.

## Bibliografia

1. Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali. *Linee guida per il controllo delle micotossine nella granella di mais e frumento tenero e duro*. Roma: MIPAAF; 2016. Disponibile all'indirizzo: <https://www.politicheagricole.it/flex/cm/pages/ServeAttachment.php/L/IT/D/5%252F1%252F%252FD.0cca04fa41efbf8a68be/P/BLOB%3AID%3D9703/E/pdf>; ultima consultazione maggio 2020.

# MICOTOSSINE E TOSSINE VEGETALI: CRITICITÀ NEL SETTORE MOLITORIO

Lorenzo Cavalli

Presidente Associazione Nazionale Tecnici Industria Molitoria, Bologna, Italia

## Introduzione

Il continuo aumento di richiesta da parte del consumatore di prodotti ricchi di fibre, integrali, rende sempre più necessario fare maggiore attenzione alla fase di accettazione e pulitura della materia prima frumento.

La crusca è la parte esterna del chicco, è ciò che protegge la farina da tutti i rischi ambientali e igienico/sanitari, è la parte del chicco dove, purtroppo, si ha la maggior concentrazione di micotossine. Dovendola includere nel prodotto finito è ovvio che la fase di accettazione e pulizia prima della macinazione diventa di fondamentale importanza.

Una corretta analisi e gestione del rischio sul grano prima, durante e dopo l'accettazione è condizione necessaria per garantire perfette caratteristiche igienico-sanitarie delle farine o semole in uscita dai molini.

## Dove e come gestire il rischio micotossine

Sono sicuramente molti i punti dove si può lavorare per prevenire la formazione delle micotossine sul frumento:

- in campo;
- prima della ricezione;
- in accettazione;
- prepulitura;
- stoccaggio;
- pulitura.

### In campo

La rotazione delle colture è un mezzo efficace per ridurre il rischio di contaminazione da parte delle principali fusario-tossine che colpiscono i cereali autunno-vernini. Infatti, alternando la coltivazione del cereale con colture che non ospitano le medesime specie di *Fusarium* (es. barbabietola da zucchero, medica, patata e altre orticole in generale) è possibile ridurre la quantità d'inoculo dei funghi che si conservano nei residui colturali infetti. Al contrario, le precessioni con cereali autunno-vernini e primaverili estivi (mais, sorgo) contribuiscono ad incrementare la carica di inoculo, presentando un forte effetto moltiplicatore del rischio. *È quindi sconsigliabile seminare frumento su sodo in successione a mais o sorgo.*

I fattori che influenzano il deossinivalenolo (DON) sono molteplici e ciascuno di essi ha un peso differente sulla probabilità dell'insorgenza di tale micotossina.



Nel frumento tenero la gestione agronomica e il clima incidono entrambe per il 30%, la varietà 20%, il trattamento in fioritura 15% e infine la concia 5%.

Nel frumento duro la gestione agronomica acquista un'incidenza maggiore 40% a discapito della varietà 10% per gli altri fattori l'incidenza rimane pressoché invariata.

Da questi dati si evince che una corretta pratica di coltura abbatta notevolmente il rischio di micotossine sul frumento.

## Prima della ricezione

È buona norma per il molino rifornirsi da fornitori qualificati, meglio se certificati, una buona valutazione dei fornitori negli anni è fondamentale per l'approvvigionamento del frumento.

Effettuare delle considerazioni sull'andamento climatico nei vari areali di acquisto del frumento possono mettere in guardia il mugnaio sull'eventuale ricezione di grano affetto da DON, perché forti piogge durante il periodo della fioritura (circa 40/50 giorni prima della trebbiatura) aumentano notevolmente il rischio che il grano venga contaminato da DON.

## In accettazione

Il controllo del frumento in arrivo nello stabilimento è il principale punto critico del processo molitorio. Ricevere e accettare merce non conforme comporta gravi danni al prodotto finito. La prima fase al ricevimento della merce è il *campionamento* di tutti i mezzi in ingresso nel molino, che deve essere effettuato nel migliore dei modi. Si consiglia l'utilizzo di sonde preleva campioni automatiche che permettono di raggiungere in sicurezza e con maggior profondità ogni punto dell'automezzo prelevando un numero di aliquote che possono garantire un campione ben rappresentativo del carico (Figura 1).



Figura 1. Sonda preleva campioni automatica

Omogeneizzare il campione ottenuto, in quanto il DON non è uniforme ma si presenta a macchia di leopardo. Procedere con le analisi visive, olfattive, di setacciatura per individuare eventuali infestazioni e per quantificare gli scarti, controllo dell'umidità, peso ettolitrico e proteine e analisi del DON utilizzando kit rapidi.

La fase di accettazione della materia prima, essendo molto importante, richiede personale attento e formato.

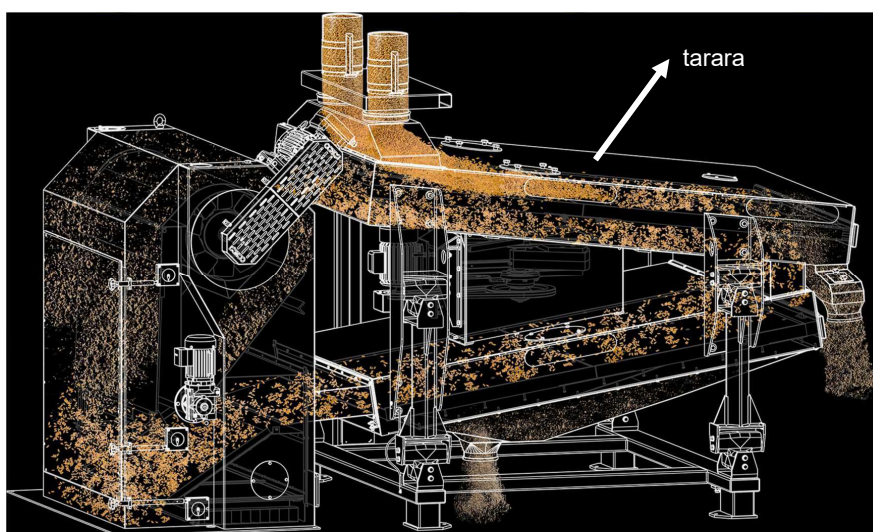
## Prepulitura

La prepulitura è la prima lavorazione che subisce il frumento dopo essere stato accettato e scaricato. Questa consiste nel pulire il grano con un *separatore*.

Il principio di funzionamento di questa macchina si basa sulla separazione per dimensione e la classificazione avviene tramite “crivelli” opportunamente dimensionati applicati a degli stacci.

Il movimento di questa macchina può essere rotatorio o a vibrazione ma lo scopo è lo stesso cioè quello di far scorrere il grano su due o più telai sovrapposti per selezionarlo per dimensione e scartare ciò che è più piccolo come semi estranei più piccoli del grano, grano spezzato o striminzito, sabbia e terra o più grande del chicco di frumento come mais, paglie, pietre ecc.

Il separatore è solitamente seguito da un canale aspirante detto *tarara* (Figura 2) il quale ha il compito, facendo passare il frumento attraverso una corrente di aria ascendente, di asportare tutte le parti più leggere che si possono trovare con il frumento durante lo scarico (paglia, polvere, pula, ecc.).



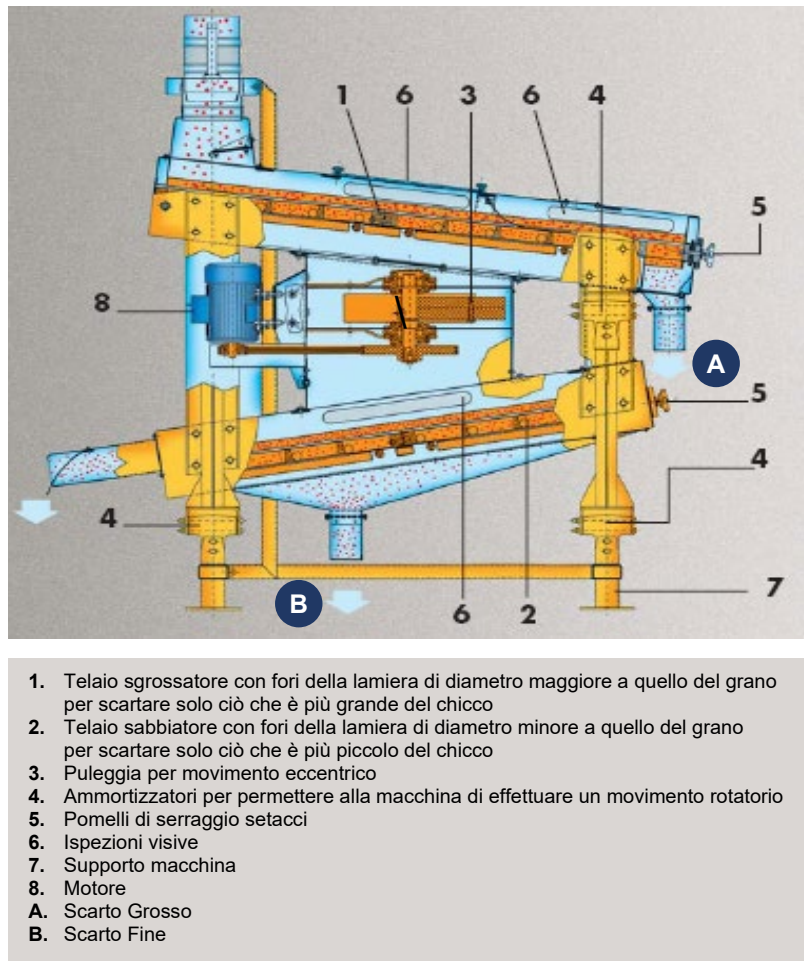
**Figura 2. Separatore delle frazioni di grano con tarara**

L'asportazione di questi scarti (Figura 3) attraverso la presenza di queste macchine in prepulitura permette di garantire una maggior salubrità e conservabilità del frumento.



**Figura 3. Scarti di grano del separatore con tarara**

Lo schema del separatore con tarara è riportato in Figura 4.



**Figura 4. Schema del separatore con tarara**

## Stoccaggio

Una corretta conservazione del frumento in attesa di trasformarlo in farina è importante. Il cereale deve essere conservato in Silos aventi superfici interne lisce per impedire depositi di prodotto che potrebbero nel tempo essere causa di infestazioni. Il monitoraggio costante della temperatura all'interno dei silos aiuta a prevenire il surriscaldamento del grano e quindi l'insorgenza di muffe o di infestazioni.

Conservare il cereale in silos verticali (Figura 5) permette di fare ricircolare il grano su se stesso o in altre celle, di effettuare nuovamente la prepulitura, facendogli prendere aria e abbassando la temperatura in caso di surriscaldamento. In alcune regioni dove le temperature ambiente sono elevate è necessario prevedere un apposito impianto di ventilazione del prodotto contenuto nei silos o addirittura l'immissione di aria trattata termicamente da refrigeratori. Inoltre la possibilità di poter fare ricircolare il cereale rende possibile prendere ulteriori campioni rappresentativi del prodotto.



**Figura 5. Silos di stoccaggio verticali**

## **Pulitura**

La pulitura è l'ultima fase per poter eliminare dal grano impurità che altrimenti verrebbero macinate e miscelate con la farina.

Le macchine che compongono una pulitura classica di un molino sono:

- separatore con tarara
- spietratore
- selezionatrice ottica
- spazzola grano con tarara

Il separatore utilizzato in pulitura è molto simile a quello utilizzato in prepulitura solo che con questa macchina si effettua una selezione maggiore dello scarto asportando tutto ciò che è leggermente più grosso o leggermente più piccolo del chicco.

La tarara, che segue il separatore, è una macchina che toglie tutta la polvere e le pagliuzze che con lo strofinio tra chicco e chicco si staccano (*vedi* Figura 2).

Lo spietratore (Figura 6) è una macchina che riesce a rimuovere dal flusso di grano in pulitura tutte le pietre anche se queste hanno la stessa dimensione dei chicchi di grano.

Questa macchina lavora per vibrazione è dotata di un telaio guarnito con una rete di acciaio armonico la cui particolare conformazione fa sì che le pietre sfruttando il movimento del vaglio riescono a risalire la rete mentre il grano la discende.

La selezionatrice ottica è il cuore delle puliture moderne, è una macchina altamente tecnologica, in quanto è in grado di controllare chicco per chicco, scartando ciò che non è grano.

Questa macchina, dapprima usata nella pulitura del riso ha nel tempo sostituito macchine e migliorato notevolmente l'efficienza delle puliture sia del grano duro che del grano tenero.

La selezionatrice ottica è una macchina dotata di telecamere che monitorano un flusso continuo di grano il quale scorre su degli scivoli in uno strato molto sottile e tutto ciò che non è grano viene espulso dal flusso mediante un getto d'aria emesso da centinaia di ugelli comandati da elettrovalvole (Figura 7).

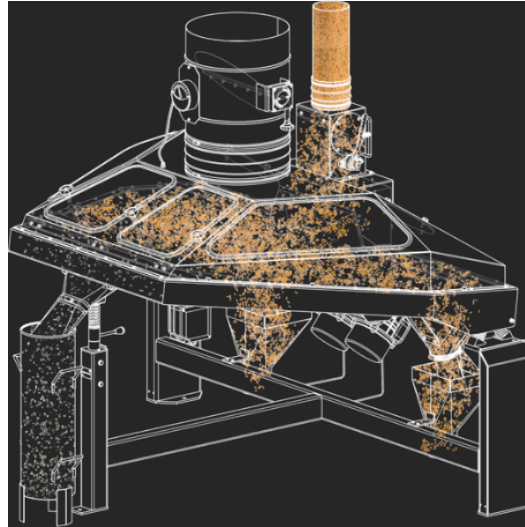


Figura 6. Spietratore di grano

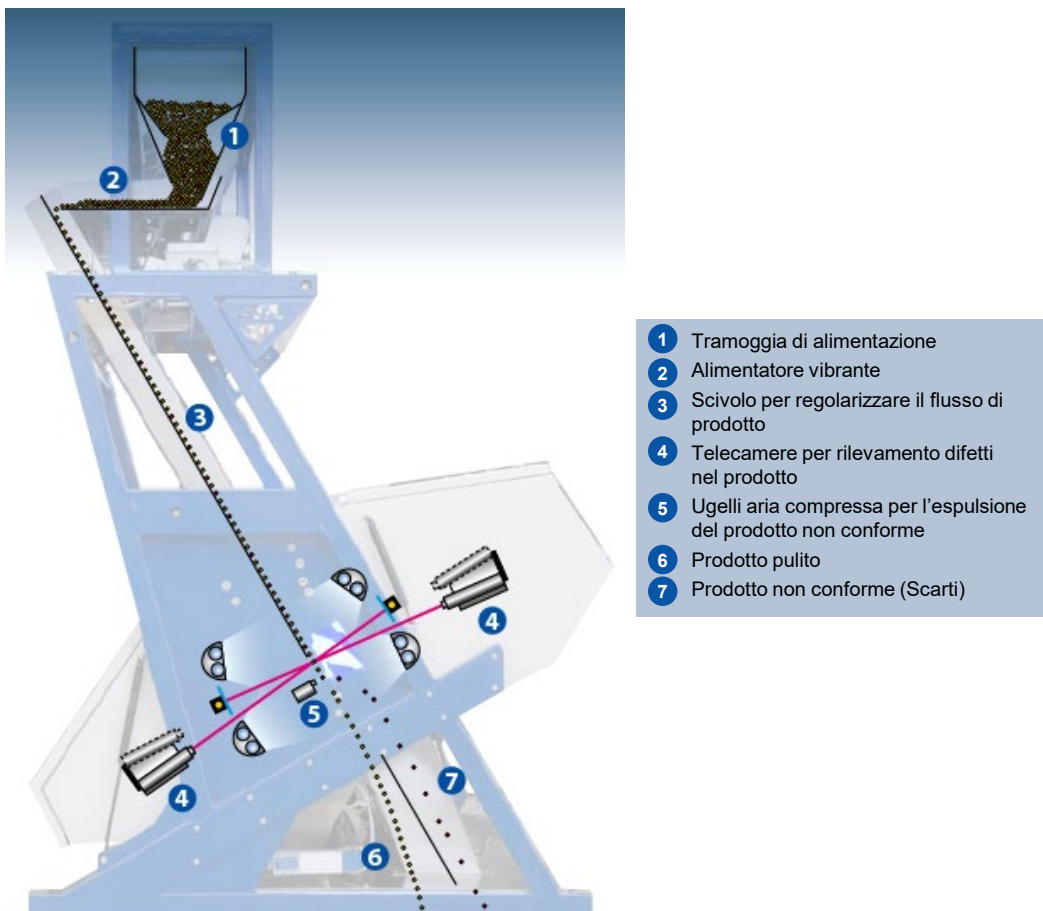
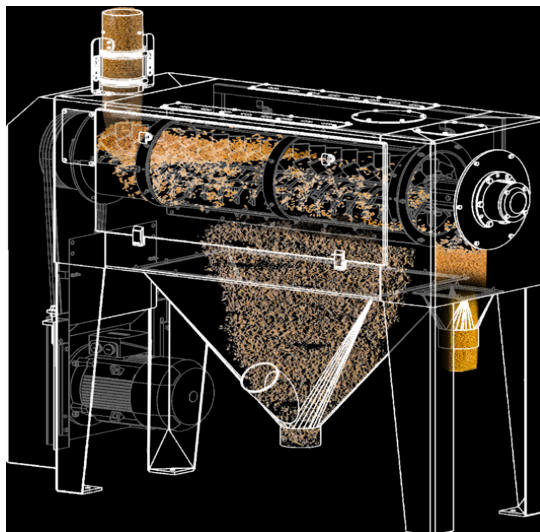


Figura 7. Schema di funzionamento della selezionatrice ottica per grano

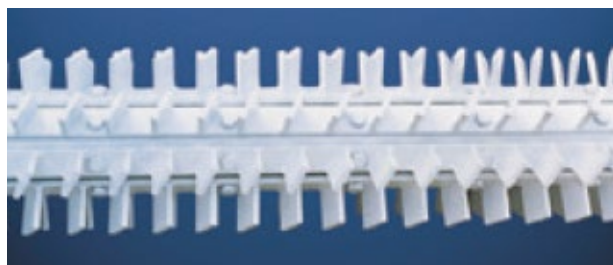
Questa macchina è fondamentale per eliminare i chicchi affetti da DON, i quali hanno una particolare conformazione organolettica che rende facile l'individuazione del difetto da parte delle telecamere a infrarosso.

Con la selezionatrice ottica si può abbattere del 30% il livello di DON del grano, dall'ingresso in pulitura al termine di essa. Questa non elimina solo chicchi malati ma anche semi estranei, come la segale cornuta, mais, soia, e malerbe in generale.

La spazzola da grano (Figura 8) è l'unica macchina che, a differenza delle altre sopra elencate che fanno una selezione tra il grano e lo scarto, esegue un'accurata pulizia del chicco di grano strofinandolo, mediante un rotore munito di aspi, su una rete ruvida e forata (Figura 9).



**Figura 8. Spazzola da grano**



**Figura 9. Particolare degli aspi montati sul rotore**

Questo strofinio tra chicco e chicco e contro la rete ruvida e forata fa sì che tutta la polvere e le impurità adese ai chicchi si stacchino e vengano espulse dal flusso di grano che a questo punto dopo essere stato privato da tutte le impurità è pronto per la macinazione.

## **Conclusioni**

Per ottenere prodotti di altissima qualità, l'attenta analisi di tutta la materia prima dell'ingresso in molino è condizione indispensabile e inderogabile.

La presenza e il continuo controllo dell'efficienza delle macchine di prepulitura e di pulitura sono per i molini industriali una realtà ormai affermata da molti anni, non certo scontata in piccole realtà dove ritenendo il grano un prodotto generato dalla terra e lavato dalle piogge non necessiti di alcuna pulizia.

## RETE QUALITÀ MAIS

Sabrina Locatelli, Stefania Mascheroni, Chiara Lanzaova, Nicola Pecchioni  
*Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria – Centro di Ricerca per la Cerealicoltura e le Colture Industriali, Bergamo, Italia*

### Introduzione

Il mais è la prima coltura nazionale in termini di produzione e di rese; è una coltura chiave per il sistema agroalimentare italiano; è elemento portante per l'alimentazione del patrimonio zootecnico, essenziale per quasi tutte le produzioni DOP, simboli del *Made in Italy* alimentare nel mondo.

Nonostante ciò, si sta assistendo da una decina di anni, ad un forte calo produttivo, sia in termini di rese che di superfici coltivate. Dati ISTAT e Ismea indicano che nel 1999 la coltivazione del mais in Italia interessava oltre 1 milione di ettari e garantiva una produzione di circa 10 mln di tonnellate, coprendo oltre il 90% del fabbisogno nazionale.

Oggi produciamo poco più di 6 milioni di tonnellate. Nel 2018, 614.000 gli ettari investiti a mais in Italia: il punto più basso di una lunga tendenza flessiva che ha portato le superfici destinate a questa coltivazione a ridursi del 40% negli ultimi 20 anni. Importazioni più che quadruplicate rispetto a 20 anni fa. La nostra dipendenza dall'estero è aumentata esponenzialmente, passando dall'11% nel 2000 al 47% nel 2017. Tra le cause che hanno provocato questa contrattura, oltre alle quotazioni poco remunerative, ha giocato un ruolo determinante la contaminazione da micotossine.

La granella di mais è soggetta ad infezione da parte di diverse specie fungine alcune delle quali provocano un accumulo di micotossine, prodotti del loro metabolismo secondario.

Le micotossine che si riscontrano con maggiore frequenza nella granella di mais sono: aflatossine, prodotte da *Aspergillus flavus*, e fumonisine, prodotte da *Fusarium verticillioides*.

Le micotossine sono tossiche per gli animali e per l'uomo; in particolare le aflatossine, la cui assunzione può avvenire tramite vegetali contaminati e alimenti di origine zootecnica.

I rischi potenziali per la salute umana derivati dal consumo di alimenti contaminati dalla presenza di micotossine, hanno indotto le istituzioni nazionali e internazionali a stabilire i valori limite del loro contenuto in granella di mais e prodotti da essa derivati (1, 2).

Dal 1999, il Centro di ricerca Cerealicoltura e Colture Industriali (CREA), sede di Bergamo, coordina la Rete Qualità Mais (3): da circa 40 impianti di essiccazione-stoccaggio, collocati entro gli areali di produzione di Piemonte, Lombardia, Veneto, Friuli Venezia Giulia, Emilia-Romagna, ogni anno vengono raccolti campioni di granella sui quali viene effettuata l'analisi del contenuto delle principali micotossine (aflatossina B<sub>1</sub>, fumonisine, deossinivalenolo e zearalenone).

L'obiettivo è di acquisire informazioni capillari e omogenee circa la presenza delle micotossine nella produzione maidicola nazionale, attraverso un diffuso monitoraggio territoriale presso le aziende, i centri di stoccaggio e di trasformazione del prodotto.

Il presente lavoro illustra i risultati relativi alle indagini condotte nel corso delle campagne maidicole dal 2015 al 2018.



## Materiali e metodi

### Raccolta e campionamento materiali

I campioni di granella di mais per le analisi sono stati ottenuti con metodi di campionamento dinamico: da prodotto in movimento (durante le operazioni di carico degli autotreni in uscita o in occasione delle movimentazioni interne) è stato derivato un campione globale di 8-20 kg da cui, con metodi di *sample sorting*, è stato ottenuto un campione di 1,5-2 kg per il laboratorio di analisi (4). Da ciascun centro di stoccaggio sono stati prelevati mediamente 8-12 campioni contrassegnati con un codice identificativo dell'anno e della zona agraria di provenienza. È noto, infatti, che le contaminazioni da micotossine su mais non sono omogeneamente distribuite ma di tipo puntiforme per cui, tanto più il campione da sottoporre ad analisi è rappresentativo dell'intera partita, tanto più il risultato analitico ritrarrà un dato reale di contaminazione.

### Estrazione e analisi delle micotossine

Il numero di centri di stoccaggio aderenti e dei campioni analizzati per ogni campagna maidicola è riportato in Tabella 1.

**Tabella 1. Numero di campioni analizzati e di centri di essiccazione - stoccaggio aderenti per ogni anno d'indagine**

Numero	2015	2016	2017	2018
Centri	58	44	36	42
Campioni	400	320	260	320

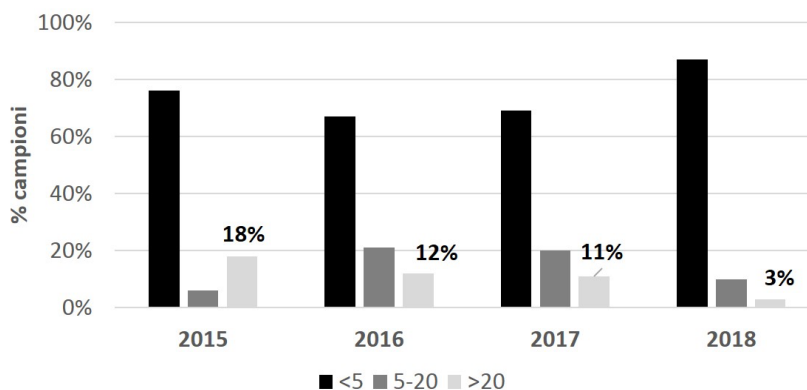
I campioni di granella sono stati macinati con mulino Retsch - ZM 200 con vaglio da 1 mm. I livelli di concentrazione di micotossine sono stati determinati con metodo immunoenzimatico ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). I test kit Ridascreen® R-Biopharm sono stati eseguiti utilizzando il preparatore automatico Chemwell (Awareness Technology, Inc.).

## Risultati e discussione

### Aflatossina B<sub>1</sub>

L'aflatossina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) è prodotta dal fungo *Aspergillus flavus*, la cui crescita è favorita da temperature elevate (optimum 32-36°C; T min 12°C; T max 42°C) e valori di umidità contenuti. Le fasi fisiologiche nelle quali la coltura del mais risulta più sensibile all'attacco fungino sono quelle della fioritura e del successivo riempimento delle cariossidi. In particolare, quando le setole sono in via di senescenza (color giallo-bruno) e quando, in un secondo momento, l'umidità della granella scende sotto il valore del 28%.

In Figura 1, sono rappresentati i risultati delle analisi effettuate dal 2015 al 2018 relativamente al contenuto in AFB<sub>1</sub>: l'incidenza massima si è verificata nel 2015 quando il 18% dei campioni di mais ha mostrato un superiore ai 20 µg/kg, valore di riferimento per il mais destinato a materia prima per i mangimi (6), mentre la percentuale minima si è avuta nel 2018 con il 3%.

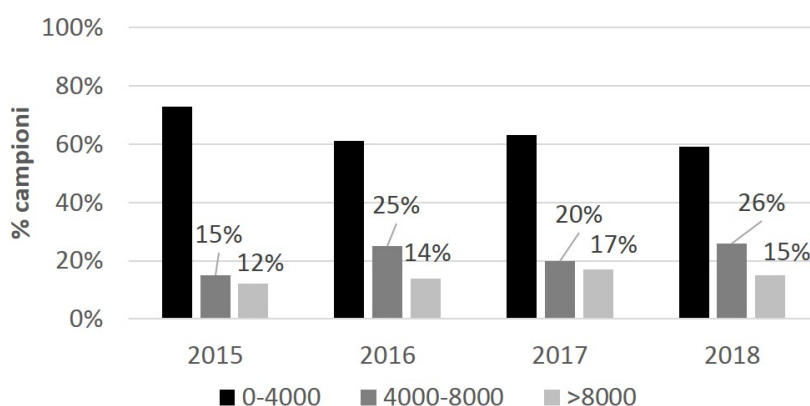


**Figura 1. Distribuzione percentuale del contenuto in aflatoxina B<sub>1</sub> (µg/kg) in campioni provenienti dalla Rete Qualità Mais dal 2015 al 2018**

## Fumonisine

Le fumonisine (FB) sono le micotossine più diffuse nell'areale maidicolo italiano e la distribuzione della loro frequenza fra classi di concentrazione risulta essere, negli anni, la più omogenea e costante nell'ambito di tutte le micotossine considerate. Le fumonisine sono prodotte dal fungo *Fusarium verticillioides* che, come *Aspergillus flavus* è ubiquitario, ma a differenza di questo non tollera siccità e temperature particolarmente elevate e predilige un clima più mite (temperatura ottimale fra i 22 e i 27°C) e umido, soprattutto in post fioritura.

In Figura 2 sono riportate le percentuali di campioni di granella di mais provenienti dalle Rete di monitoraggio, con un tenore di FB superiore ai 4000 µg/kg, valore limite per l'utilizzo della granella di mais a uso alimentare umano diretto (1): l'intervallo percentuale va da un minimo di 27 % nel 2015 a un massimo di 41% nel 2018. Tali dati confermano che le FB siano le micotossine più diffuse nell'areale maidicolo italiano e la distribuzione della loro frequenza fra classi di concentrazione risulti essere, negli anni, la più omogenea e costante nell'ambito di tutte le micotossine considerate (5).



**Figura 2. Distribuzione percentuale del contenuto in fumonisine (µg/kg) in campioni provenienti dalla Rete Qualità Mais dal 2015 al 2018**

## Deossinivalenolo e Zearalenone

Tutti i campioni di granella analizzati negli anni di indagine hanno valori di deossinivalenolo (DON) e zearalenone (ZEA) inferiori, rispettivamente, a 8000 µg/kg e 2000 µg/kg, valori di riferimento per il mais destinato a materia prima per mangimi (6). Nelle campagne maidicole dal 2015 al 2018 non si sono verificate le condizioni climatiche favorevoli allo sviluppo di *Fusarium graminearum* (forma di riproduzione sessuata *Gibberella zeae*), che produce DON e ZEA. *F. graminearum*, infatti, predilige clima piovoso e temperature basse dalla fioritura della pianta alla raccolta. La temperatura ideale per la sua crescita si colloca fra i 24 e i 26°C. Per quanto riguarda l'umidità, invece, è stata rilevata un'esigenza maggiore rispetto a *Fusarium verticillioides*.

## Conclusioni

Le indagini condotte nel corso delle campagne maidicole, dal 2015 al 2018, confermano una frequente contaminazione da fumonisine in quantità variabile a seconda dell'andamento climatico stagionale mentre in annate particolarmente calde e siccitose, come ad esempio il 2015, si aggiungono le aflatossine. I risultati, allineati con i dati omogenei degli anni precedenti e correlati con l'andamento climatico, i bacini di raccolta e le aree di produzione, costituiscono elementi di un database utilizzabile per le attività di previsione-prevenzione e gestione del rischio micotossine. La disponibilità dei dati di monitoraggio riveste un ruolo di utilità immediata, in quanto fornisce agli operatori e ai trasformatori del settore maidicolo indicazioni utili per la programmazione e gestione degli approvvigionamenti.

## Ringraziamenti

Questo lavoro è stato realizzato nell'ambito dei progetti: RQC-Mais "Rete Qualità Cereali plus – Mais" (2014-2018) e "Osservatorio territoriale qualità cereali: mais, frumento tenero, duro e orzo" in collaborazione con Ismea (2019), del Piano Cerealicolo Nazionale, finanziati dal Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali.

## Bibliografia

1. Europa. Regolamento (CE) n. 1126/2007 della commissione del 28 settembre 2007 che modifica il regolamento (CE) n. 1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari per quanto riguarda le *Fusarium*-tossine nel granoturco e nei prodotti a base di granoturco. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 255/14 del 29.9.2007.
2. Europa. Regolamento (UE) n. 574/2011 della commissione del 16 giugno 2011 che modifica l'allegato I della direttiva 2002/32/CE del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda i livelli massimi di nitrito, melamina, *Ambrosia* spp. e carry-over di alcuni coccidiostatici e istomonostatici e che consolida gli allegati I e II. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 159/7 del 17.6.2011.
3. Locatelli S, Lanzanova C, Mascheroni S, Facchinetti F, Balconi C. Monitoraggio delle micotossine nelle produzioni italiane di mais. In: D'Egidio MG, Marano ML, Ripa C (Ed.). *Atti Progetto Micoprinceps, 2014. Micotossine principali ed emergenti nei cereali*. Roma: CRA, MIPAAF; 2014. p. 71-5. Disponibile all'indirizzo: <https://www.politicheagricole.it/flex/cm/pages/ServeAttachment.php/L/IT/D/8%252F6%252F6%252FD.1757cacf0cc7fcdbe0b6/P/BLOB%3AID%3D1942/E/pdf>; ultima consultazione maggio 2020.

4. Europa. Regolamento (CE) n. 401/2006 della commissione del 23 febbraio relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari, *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 70/12 del 9.3.2006.
5. Locatelli S, Mascheroni S, Lanzaova C, Pecchioni N. Nel mais 2018 le fumonisine sono ancora le più diffuse. *L'Informatore Agrario* 2019;6:50-1.
6. Europa. Raccomandazione (CE) n. 576/2006 della commissione del 17 agosto 2006 sulla presenza di deossinivalenolo, zearalenone, ocratossina A, tossine T-2 e HT-2 e fumonisine in prodotti destinati all'alimentazione degli animali. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 229/7 del 23.8.2006.

# TOSSINE DELL'ALTERNARIA SPP. NEL FRUMENTO: EFFETTI DELLA DIGESTIONE ANAEROBICA E BMP

Gabriella Aureli (a), Angela Iori (a), Claudio Fabbri (c), Francesco Gallucci (b), Mariangela Soldano (c)  
(a) CREA Centro di ricerca Ingegneria e Trasformazioni agroalimentari, Roma, Italia  
(b) CREA Centro di ricerca Ingegneria e Trasformazioni agroalimentari, Monterotondo, Italia  
(c) Centro Ricerche Produzioni Animali, Reggio Emilia, Italia

## Introduzione

L'importanza della sostenibilità del processo nell'ambito di un sistema di "economia circolare" per le aziende agricole si basa non solo sulla possibilità di abbattimento della concentrazione dei contaminanti organici presenti in fase di pre-trattamento ma anche sul vantaggio dello sfruttamento energetico di matrici cerealicole per la produzione di biogas (biometano).

La potenzialità di sfruttamento offerta dalla digestione anaerobica di substrati di diversa origine è supportata, fra l'altro, dall'interesse che sull'argomento suscitano gli aspetti normativi i quali, soprattutto in tempi recenti, ne hanno qualificato ulteriormente i vantaggi e le possibilità di applicazione. Un passo decisivo in tal senso è costituito dalle disposizioni legislative in merito al riconoscimento della digestione anaerobica come "trattamento" per ridurre i rischi igienico-sanitari dei substrati e, non ultimo, la definizione del prodotto di digestione (digestato) come "sottoprodotto" e non "rifiuto" se sono soddisfatte, fra l'altro, le norme igienico-sanitarie e di tutela ambientale (1).

La valorizzazione energetica di substrati contaminati da micotossine attraverso la digestione anaerobica rappresenta un mezzo efficace per la gestione sostenibile di prodotti cerealicoli, non utilizzabili per l'alimentazione umana o animale, che si inquadra nell'ambito di un sistema potenzialmente vantaggioso per le aziende agricole. L'alternariolo (AOH) è una micotossina diffusa in diverse derrate alimentari, anche cerealicole, attualmente all'attenzione della Commissione Europea ai fini della valutazione dei livelli di esposizione della popolazione agli effetti tossici della micotossina nonché di altri metaboliti derivanti dagli stessi funghi produttori e per questo definiti, nell'insieme, come "tossine dell'*Alternaria*". L'alternariolo, infatti, è una delle micotossine prodotte da funghi tossigeni del genere *Alternaria*, largamente diffusi nelle colture cerealicole (2-4). Nel 2011 l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (*European Food Safety Authority*, EFSA) ha espresso un'opinione scientifica in merito al rischio per l'uomo e per gli animali in relazione alla contaminazione di alimenti e mangimi da parte di questi composti tossici e, successivamente, una valutazione dell'esposizione della popolazione europea attraverso la dieta. Nel parere espresso dall'EFSA è stata messa in evidenza, fra l'altro, la preminenza dell'acido tenuazonico (TeA) fra le tossine dell'*Alternaria* rilevate negli alimenti analizzati (5-6).

Lo scopo del lavoro è stato quello di valutare l'efficacia del processo di digestione anaerobica, in termini di capacità di abbattimento della concentrazione di micotossine nel digestato e di potenziale biochimico di metanazione (BMP), su prodotti di prima trasformazione (sfarinati integrali, frazioni cruscali, semole e farine) ottenuti da granella di frumento contaminata, sia con infezione naturale sia mediante inoculazioni artificiali, da tossine prodotte dall'*Alternaria* spp. A tal fine sono state considerate le seguenti micotossine: alternariolo (AOH), alternariolo monometil-etero (AME) e acido tenuazonico (TeA).

## Materiali e metodi

I campioni di granella di frumento duro (*Triticum durum* Desf.) e di frumento tenero (*Triticum aestivum* L.) sono stati reperiti da coltivazioni sperimentali e, in alcuni casi, da fonti commerciali. I campioni sono stati utilizzati come matrici cerealicole naturalmente contaminate ad eccezione di alcuni di essi per i quali si è proceduto con inoculazioni artificiali della granella con sospensioni fungine a concentrazione nota di conidi di *Alternaria* spp. (v. sotto). Lo sfarinato integrale, sia per il frumento duro che per il tenero, è stato ottenuto con l'impiego del molino Cyclotec™ (FOSS) mod. 1093 (Ø <0,500 mm) mentre per la trasformazione in frazioni di molitura è stato utilizzato l'impianto pilota MLU 202 (Bühler) per il frumento duro; per il frumento tenero, e in caso di quantitativi limitati di granella di frumento duro, sono stati impiegati impianti di molitura di dimensioni ridotte (rispettivamente molini BONA e CHOPIN) ma con caratteristiche tecniche analoghe agli impianti di più grandi dimensioni. Le caratteristiche granulometriche delle frazioni di molitura ottenute sono state le seguenti: crusca (rimacinata con Cyclotec™ (FOSS) mod. 1093 (Ø <0,500 mm), cruschello (Ø <1,00 mm), semola (0,180 mm < Ø <0,500 mm), farinetta (Ø <0,180 mm), farina di frumento tenero) (Ø <0,200 mm).

Le analisi con metodo immunoenzimatico (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) sono state svolte con l'Alternariol Plate Kit (Beacon Analytical Systems), con limite di quantificazione (*Limit of Quantification*, LOQ) nel campione di 22,5 µg/kg, utilizzato con modifiche minori. Lo standard di alternariolo in acetonitrile (Alternariol RK-102076, 10 µg/mL, OR SELL) è stato utilizzato per la preparazione di campioni di sfarinato integrale di frumento addizionati con concentrazioni note di micotossina (50 e 250 µg/kg) per la verifica della percentuale di recupero nella matrice d'interesse. È stato utilizzato il preparatore automatico per immunodosaggi (BRIO, SEAC, Radim Group), il lettore per micropiastre Sirio-S Microplate Reader (SEAC, Radim Group) e, per l'elaborazione dei dati di concentrazione, il RIDA® Soft Win software (R-Biopharm AG). Le analisi in cromatografia liquida (*Liquid Chromatography - tandem Mass Spectrometry*, LC-MS/MS) sono state eseguite presso l'Università Cattolica del Sacro Cuore di Piacenza, Facoltà di Scienze agrarie, alimentari e ambientali, Dipartimento di Scienze animali, della nutrizione e degli alimenti (DIANA).

Le inoculazioni artificiali sono state effettuate utilizzando un isolato di *Alternaria* spp. ottenuto presso il CREA Centro di ricerca Ingegneria e Trasformazioni agroalimentari di Roma da carioidi di frumento duro con infezione naturale. Dopo la sterilizzazione il materiale infetto è stato posto in piastre Petri contenenti agar (Agar-Agar 15g/L Merck) ed è stato incubato a 20°C con fotoperiodo di 12 h. Con l'ausilio dello stereomicroscopio, i conidi sono stati prelevati e inoculati in piastre Petri contenenti Potato Dextrose Agar (PDA 41 g/L, Formedium), poi le capsule sono state trasferite in un armadio climatico per circa 7-10 giorni alle stesse condizioni di temperatura e di ciclo luce/buio suddette. Al termine di tale periodo, sulle colture fungine sono stati aggiunti 10 mL di acqua distillata sterile e la superficie delle colonie è stata strofinata delicatamente con una bacchetta di vetro; quindi, la sospensione fungina è stata filtrata e diluita al fine di ottenere la concentrazione finale di  $5 \times 10^6$  conidi/mL. Tale sospensione è stata utilizzata per inoculare i campioni di granella di frumento duro e tenero, risultati negativi al precedente test ELISA per l'alternariolo ( $c < 22,5$  µg/kg). e sterilizzati in autoclave a 121°C per 20 minuti. Il controllo negativo è stato allestito con aggiunta di acqua sterile. Il campione inoculato e il controllo sono stati incubati a 20°C con fotoperiodo di 12 h per 30-40 giorni, e, successivamente, sono stati posti in stufa a 55°C per 24 ore.

La verifica della resistenza dell'alternariolo alle condizioni termiche di essiccazione (55°C) adottate è stata effettuata con la misura (test ELISA) della concentrazione della micotossina su sfarinato integrale di frumento precedentemente inoculato con conidi di *Alternaria* spp. e suddiviso in due gruppi di 5 campioni ciascuno: 1) n. 5 beute contenenti 2,0 g di sfarinato integrale

poste in stufa a 55°C per 3 giorni, 2) n. 5 beute contenenti 2,0 g di sfarinato integrale conservate a -20°C per 3 giorni (controllo).

Il test BMP (*Bio-Methane Potential*) è una prova di laboratorio di digestione anaerobica in batch che consente di misurare la massima quantità di metano producibile da una determinata matrice organica sottoposta a digestione anaerobica, espressa come Nm<sup>3</sup>/t di solido volatile (SV) o sostanza organica caricata. L'analisi viene effettuata secondo la norma UNI 11703/2018 (7). Il sistema di misura è costituito da reattori di vetro del volume utile di 1,35 litri, posti in armadi termostati alla temperatura di 38°C, completi di valvole, flussimetri e sistemi di misura manometrici per la quantificazione del biogas prodotto. La metodica prevede l'aggiunta nel reattore di prova di un inoculo, pre-incubato 7 giorni, prelevato da un digestore di un impianto di biogas operante alla stessa temperatura e costituito da un equilibrato consorzio batterico. Per garantire la crescita batterica anaerobica e una adeguata capacità tampone, viene aggiunta una soluzione di sali e di micro e macronutrienti. La misura della qualità del gas prodotto (percentuale di CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> e concentrazione di H<sub>2</sub>S) è effettuata mediante analizzatore dei gas a infrarossi. Nella presente sperimentazione sono stati condotti test BMP della durata di 27 giorni in doppio, su campioni di frumento duro e tenero di diverso tipo (sfarinato integrale, crusca, cruschetto, semola, farina, farinetta), contaminato in modo naturale o artificiale dalle micotossine d'interesse. Ciascun reattore di prova è stato riempito con 25,0 g di substrato, in miscela con 700 g di inoculo, in modo da ottenere un rapporto tra gli SV dell'inoculo e gli SV del substrato di circa 2, come indicato nella norma UNI. All'inizio di ciascun test BMP, e successivamente all'analisi di screening con il test ELISA, i campioni sono stati sottoposti all'analisi cromatografica per la determinazione della concentrazione delle tossine dell'*Alternaria* spp. (AOH, AME e TeA) (LC-MS/MS triplo quadrupolo, limite di quantificazione = 5 µg/kg); l'analisi della concentrazione di micotossine è stata ripetuta sui campioni di digestato ottenuti al termine di ciascun test di digestione anaerobica.

L'analisi statistica dei dati analitici è stata effettuata con software Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis (PAST) ed Excel di Microsoft Windows® 8. Ai fini dell'elaborazione dei dati i risultati negativi sono stati considerati come LOD/2 o LOQ/6 in funzione della metodica utilizzata (8).

## Risultati e discussione

I risultati ottenuti hanno permesso di approfondire le conoscenze, su base sperimentale, sui seguenti aspetti: 1) efficienza del processo di fermentazione anaerobica nell'abbattimento (in post-digestione) della concentrazione delle tossine dell'*Alternaria* (AOH, AME e TeA) rispetto alla condizione iniziale (in pre-digestione) di substrati a base di frumento, naturalmente e/o artificialmente contaminati; 2) resa in biogas e biometano; 3) influenza della concentrazione di micotossine, presenti nel substrato nella fase di pre-digestione, sia sull'efficienza del processo di digestione anaerobica e quindi sulla resa nella produzione di biogas che di abbattimento delle stesse.

I risultati relativi alle prove preliminari di resistenza al calore (55°C) di campioni di sfarinato integrale di frumento artificialmente contaminato con la sospensione fungina di *Alternaria* spp. hanno evidenziato la non significatività (P-same = 0,38) delle differenze tra i valori medi di concentrazione dell'alternariolo (Tabella 1), determinati con test immunoenzimatico, a ulteriore conferma di quanto riportato in letteratura (9).

**Tabella 1. Alternariolo (AOH): concentrazione ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) (test ELISA) in campioni di sfarinato integrale di frumento conservati a due diverse temperature ( $55^\circ\text{C}$  e  $-20^\circ\text{C}$ ). T-test su distribuzione Log-normale: P-same = 0,38**

N. campioni	T ( $^\circ\text{C}$ ) di incubazione	
	$-20^\circ\text{C}$	$55^\circ\text{C}$
1	936	1025
2	747	735
3	710	1147
4	809	920
5	1008	823
Media	842	930
DS*	126	163

\*DS=Deviazione Standard

Per quanto riguarda i risultati dello screening ELISA in confronto con l'analisi cromatografica è stata evidenziata una risposta positiva al test immunoenzimatico anche nel caso di assenza della micotossina principale (AOH) (Tabella 2). Ciò nonostante, l'andamento dei valori di concentrazione ottenuti con test ELISA per l'AOH e la somma dei valori di concentrazione delle tre tossine sopra citate, ottenuti tramite analisi LC-MS/MS, sono risultati positivamente, anche se debolmente, correlati ( $r = 0,60$ ). Considerato che le prove di recupero su matrice (sfarinato integrale di frumento) addizionata con quantità note di AOH (50 e 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) hanno messo in evidenza un buon livello di riconoscimento e quantificazione della micotossina (valore medio:  $115 \pm 29$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ , n totali = 9), i risultati ottenuti hanno delineato una elevata specificità del test nel caso in cui la contaminazione sia stata limitata alla sola presenza dell'AOH. Nel caso, invece, di una contaminazione da più tossine dell'*Alternaria* spp., relativa cioè a campioni naturalmente contaminati e/o a matrici addizionate con funghi produttori, dai risultati ottenuti si potrebbe ipotizzare un effetto di *cross-reaction* anche verso altri metaboliti fungini non compresi tra quelli analizzati in LC-MS/MS. A tale riguardo è noto che le *Alternaria*-tossine conosciute appartengono ad un gruppo di più di 70 composti ma soltanto alcune di esse sono state caratterizzate dal punto di vista chimico-fisico (10).

**Tabella 2. Livelli di contaminazione ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) $\pm$ DS delle tossine dell'*Alternaria* spp. su substrati a base di frumento (pre-digestione)**

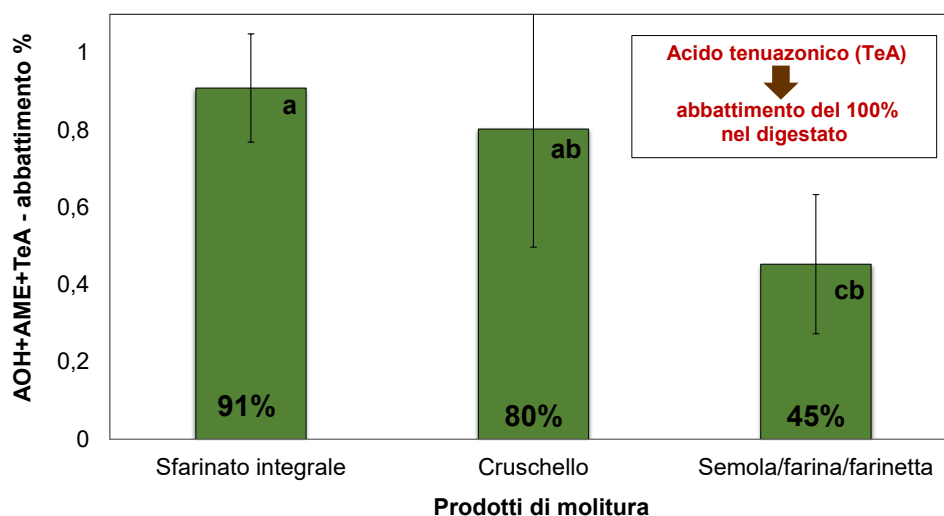
Prove	ELISA	AOH	LC-MS/MS	
	AOH		AME	TeA
#1	208 $\pm$ 36	19	17	<5
#2	190 $\pm$ 51	18	23	<5
#3	99 $\pm$ 39	<5	<5	<5
#4	137 $\pm$ 25	12	36	2500
#5	1729 $\pm$ 21	625	5690	748000
#6	1956 $\pm$ 415	<5	32	439
#7	2139 $\pm$ 651	<5	16	391
#8	2745 $\pm$ 909	<5	111	1461
#9	1380 $\pm$ 207	<5	24	2457
#10	706 $\pm$ 23	<5	<5	394
#11	1253 $\pm$ 223	<5	29	353
#12	353 $\pm$ 58	<5	<5	559
#13	610 $\pm$ 113	<5	<5	468

AOH alternariolo; AME alternariolo monometil-etero; TeA acido tenuazonico

ELISA: valori medi ( $n \geq 2$ ), LOQ = 22,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; LC-MS/MS: LOQ = 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; DS = deviazione standard



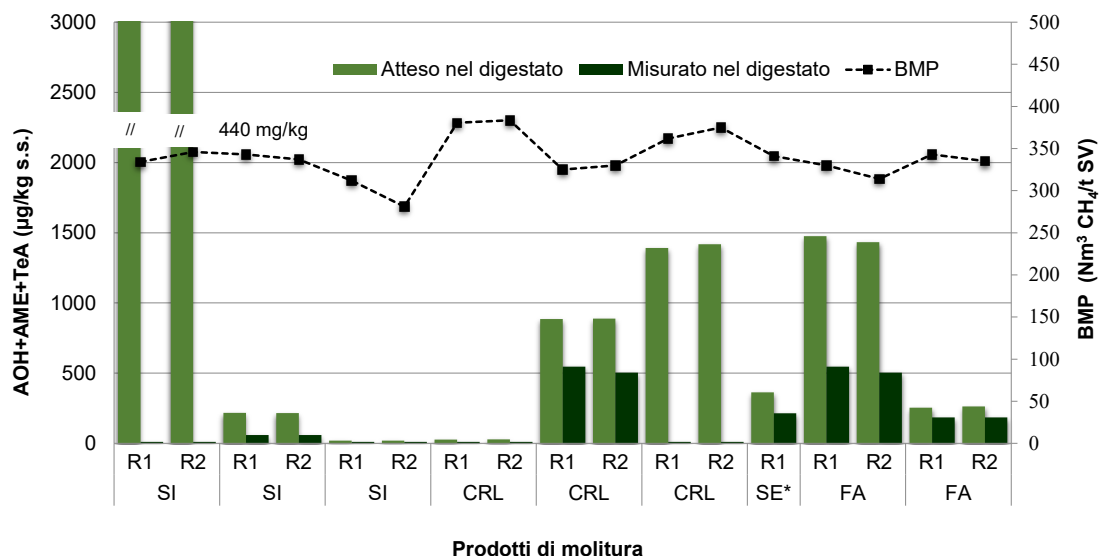
In merito all'efficacia del processo di digestione anaerobica nel ridurre la concentrazione delle micotossine nel substrato le percentuali di abbattimento registrate per la somma delle tossine AOH, AME e TeA sono state comprese nell'intervallo 27,7-100% nel 71% dei campioni analizzati (17/24 repliche totali). L'elaborazione statistica dei dati, effettuata tramite analisi della varianza, ha evidenziato che le differenze di tali percentuali di abbattimento sono risultate significative ( $P < 0,05$ ) solo relativamente allo sfarinato integrale e alle frazioni di molitura considerate nel loro insieme (semola/farina/farinetta) (Figura 1). Per i restanti campioni analizzati (29% del totale) l'abbattimento delle tre tossine considerate, inteso come somma totale delle concentrazioni, non è risultato efficace per la presenza dell'AME nel digestato finale. Quest'ultimo aspetto dovrà quindi essere oggetto di ulteriori sperimentazioni e approfondimento.



**Figura 1. Abbattimento medio (%) ± DS della concentrazione della somma delle tossine AOH, AME e TeA nel digestato (n= 17) (i valori sono riferiti ai solidi totali del digestato); analisi LC-MS/MS; lettere uguali: differenze non significative ( $P > 0,05$ )**

Tuttavia, occorre sottolineare che l'abbattimento percentuale della concentrazione dell'acido tenuazonico (TeA) nel post-digestato è risultato pari al 100% in tutti i campioni analizzati, indipendentemente dai livelli di concentrazione in pre-digestione. Quest'ultimo aspetto riveste una particolare importanza tenuto conto, come sopra già accennato, della prevalenza di questo tipo di micotossina, fra quelle prodotte dall'*Alternaria* spp. e dell'elevato grado di tossicità finora riscontrato (11-12).

Il BMP, misurato nei test di digestione anaerobica dei campioni analizzati (totale = 24 repliche) è risultato compreso nell'intervallo 280,8-383,4 Nm<sup>3</sup> CH<sub>4</sub>/t SV (normal metri cubi di metano per tonnellata di solidi volatili), con una media di 338,6 ± 22,3 Nm<sup>3</sup> CH<sub>4</sub>/t SV e quindi sostanzialmente confrontabile con la resa media in metano, misurata in condizioni di digestione analoghe (mesofilia), ottenuta dall'impiego di scarti e/o residui vegetali (Figura 2) (13). L'analisi statistica ha evidenziato che la resa in biogas (BMP) non è risultata correlata in modo significativo ( $P > 0,05$ ) né con la somma dei valori di contaminazione delle micotossine esaminate dei campioni in pre-digestione né con le diverse tipologie di matrice a base di frumento (sfarinato integrale, frazioni cruscali e farine/farinette) impiegate.



**Figura 2. Concentrazioni attese e misurate della somma delle tossine AOH, AME e TeA nel digestato (i valori sono riferiti ai solidi totali del digestato) e resa BMP; R1, R2 (n=17): campione replicato; SI = sfarinato integrale; CRL = cruschello; SE = semola; FA = farina/farinetta; analisi LC-MS/MS; \*campione singolo**

Sono già noti sia gli effetti di riduzione tramite digestione anaerobica della concentrazione di alcune fra le micotossine più diffuse nei cereali (es. DON, aflatossine, fumonisine, tossine T-2 e HT-2, ecc.) in sfarinati di mais e/o frumento sia le potenzialità di sfruttamento a fini energetici (BMP) di substrati a base di frumento (14-17). I risultati ottenuti in questo lavoro, se da un lato confermano quanto riportato in letteratura in merito all'efficacia del processo di fermentazione anaerobica nel ridurre i livelli di contaminazione di micotossine in matrici vegetali, dall'altro contribuiscono ad ampliare le conoscenze sull'argomento sia per la tipologia dei substrati cerealicoli utilizzati, sia per i tipi di micotossine esaminate e sia per il tipo di contaminazione (naturale e/o artificiale). In particolare, nell'ottica di un eventuale impiego come risorsa energetica anche dei "residui dell'attività agroalimentare" il lavoro svolto ha permesso di acquisire informazioni non solo su sfarinati integrali ottenuti da granella macinata "in toto" ma anche su prodotti di prima trasformazione del frumento contaminati da micotossine dell'*Alternaria* spp., e con diverse concentrazioni delle stesse.

## Conclusioni

Il lavoro svolto ha permesso di acquisire ulteriori conoscenze sulla possibilità di impiego di matrici cerealicole contaminate da micotossine sfruttabili come substrati dal punto di vista energetico e forse valutabili per un possibile ulteriore impiego. È stata studiata la fattibilità applicativa del processo fermentativo anaerobico per l'abbattimento della concentrazione di micotossine dell'*Alternaria* spp. anche a substrati cerealicoli naturalmente o artificialmente

contaminati e derivanti da processi di prima trasformazione del frumento (sfarinati integrali e frazioni di molitura con diversa granulometria).

I risultati hanno dimostrato l'efficacia del processo di digestione adottato nella riduzione della concentrazione totale delle tre micotossine esaminate (AOH, AME e TeA) nel 71% dei campioni analizzati e compresa tra il 27,7% e il 100,0 % della concentrazione attesa. In particolare, per quanto riguarda l'acido tenuazonico, la riduzione nella fase di post-digestione è risultata del 100%, rispetto alla fase di pre-digestione, a prescindere dal tipo di contaminazione (naturale/artificiale) e dal livello della stessa in pre-digestione.

È stata dimostrata una buona/ottima potenzialità di produzione in biogas con un livello medio di resa in metano pari a  $338,6 \pm 22,3 \text{ Nm}^3 \text{ CH}_4/\text{t SV}$  e quindi comparabile con le produzioni medie ottenute dall'impiego di scarti e/o residui vegetali.

## Ringraziamenti

Si ringraziano: il prof. Amedeo Pietri dell'Università Cattolica del Sacro Cuore di Piacenza, Facoltà di Scienze agrarie, alimentari e ambientali, Dipartimento di Scienze animali, della nutrizione e degli alimenti (DIANA) per le analisi delle micotossine; il Dr. Fabrizio Quaranta e la Dr.ssa Francesca Nocente per la disponibilità riguardo ai campioni da analizzare e i Sig.ri Alessandra Arcangeli e Roberto Mortaro per la collaborazione tecnica.

## Ringraziamenti

Il lavoro è stato svolto nell'ambito del progetto AGROENER (Energia dall'agricoltura: innovazioni sostenibili per la bioeconomia), finanziamento MiPAAFT D.D. n. 26329 dell'1/04/2016 - <http://agroener.crea.gov.it/>

## Bibliografia

1. Italia. Decreto Interministeriale 25 febbraio 2016 - Criteri e norme tecniche generali per la disciplina regionale dell'utilizzazione agronomica degli effluenti di allevamento e delle acque reflue, nonché per la produzione e l'utilizzazione agronomica del digestato. *Gazzetta Ufficiale* n. 90, Supplemento Ordinario n. 9 del 18 aprile 2016.
2. Patriarca A. Alternaria in food products. *Current Opinion in Food Science* 2016;11:1-9.
3. Solfrizzo M. Recent advances on *Alternaria* mycotoxins. *Current Opinion in Food Science* 2017;17:57-61.
4. Rychlik M, Lepper H, Weidner C, Asam S. Risk evaluation of the *Alternaria* mycotoxin tenuazonic acid in foods for adults and infants and subsequent risk management. *Food Control* 2016;68:181-5.
5. Europa. Scientific Opinion on the risks for animal and Public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food. *EFSA Journal* 2011;9(10):2407.
6. Scientific Report – Dietary exposure assessment to *Alternaria* toxins in the European population. *EFSA Journal* 2016;14(12):4654.
7. UNI/TS 11703:2018. Metodo per la misura della produzione potenziale di metano da digestione anaerobica ad umido - Matrici in alimentazione. Milano: Ente Italiano di Normazione; 2018.
8. SCOOP TASK 3.2.10. *Report of experts participating in Task 3.2.10. Collection of occurrence data of Fusarium toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU Member States.* Brussels: European Commission, Directorate General- Health and Consumer Protection; 2003

9. Müller MEH, Korn U. *Alternaria* mycotoxins in wheat - A 10 years survey in the Northeast of Germany. *Food Control*, 2013;34,191-197.
10. Brera C. Micotossine note ed emergenti, discussione aperta. *Molini d'Italia* 2012;5/6:50-8.
11. Escrivà L, Oueslati S, Font G, Manyes L. *Alternaria* mycotoxins in food and feed: an overview. *Journal of Food Quality* 2017; Article ID 1569748.
12. Gotthardt M, Asam S, Gunkel K, Moghaddam AF, Baumann E, Kietz R, Rychlich M. Quantitation of six *Alternaria* toxins in infant foods applying stable isotope labeled standards. *Frontiers in Microbiol.* 2019;10:109. doi: 10.3389/fmicb.2019.00109.
13. Soldano M, Garuti M. Il valore dei sottoprodotti agricoli e agroindustriali. *Agricoltura* 2014;46-7.
14. De Gelder L, Audenaert K, Willems B, Schelfhout K, De Saeger S, De Boevre M. Processing of mycotoxin contaminated waste streams through anaerobic digestion. *Wast Manage* 2018;71:122-8.
15. Goux X, Bourguet L, Giraud F, Cocco E, Guignard C, Hoffmann L, Delfosse P. Deoxynivalenol concentration decrease during mesophilic anaerobic digestion of wheat flour. In: *Proceedings of 3th International Symposium on Energy from Biomass and Waste. 2010; Venice, Italy.*
16. Giorni P, Pietri A, Bertuzzi T, Soldano M, Piccinini S, Rossi L, Battilani P. Fate of mycotoxins and related fungi in the anaerobic digestion process. *Bioresource Technology* 2014;265, 554-57.
17. Rincón B, Banks CJ, Heaven S. Biochemical methane potential of winter wheat (*Triticum aestivum* L.): influence of growth stage and storage practice. *Bioresource Technology* 2010;101:8179-84.
18. ISO-11734:1995. *Water Quality - Evaluation of the Ultimate Anaerobic Biodegradability of Organic Compounds in Digested Sludge - Method by Measurement of the Biogas Production*. Geneva: International Organization for Standardization; 1995.

# STUDIO DEL COMPORTAMENTO DEL MAIS CONTAMINATO DA AFLATOSSINE IN DIGESTIONE ANAEROBICA

Mariangela Soldano (a), Sergio Piccinini (a), Francesco Gallucci (b), Claudio Fabbri (a)

(a) *Centro Ricerche Produzioni Animali, Reggio Emilia, Italia*

(b) *CREA Centro di ricerca Ingegneria e Trasformazioni agroalimentari, Monterotondo (RM), Italia*

## Introduzione

Le note problematiche igienico-sanitarie dovute alle micotossine, stanno contribuendo alla crisi del comparto maidicolo nazionale, colpendo sempre più spesso questa produzione e coinvolgendo anche alcune eccellenze agroalimentari del nostro Paese. A seguito di questa emergenza, sono state redatte dalle regioni interessate e dal Ministero della Salute, delle linee guida per la gestione del rischio aflatossine che hanno previsto l'utilizzo del prodotto anche fini energetici. Il granturco con tenore di aflatossina superiore al limite previsto dalla normativa, può essere destinato ad usi alternativi quali ad esempio la produzione di biogas. Non esistono limiti di legge sulla concentrazione di aflatossine del granturco da destinare al processo di digestione anaerobica e allo spandimento in campo del digestato che ne deriva. La sperimentazione riportata in questo rapporto, ha avuto come obiettivo quello di verificare eventuali effetti inibenti delle aflatossine sulla corretta funzionalità del processo di digestione anaerobica, le conseguenze sul processo biologico e sulla loro eventuale degradazione, verificandone il livello di abbattimento rispetto alla concentrazione iniziale. Lo studio è stato condotto mediante lo svolgimento di test con reattori di digestione anaerobica pilota, presso il laboratorio di CRPA (Centro Ricerche Produzioni Animali).

## Materiali e metodi

Al fine di raggiungere gli obiettivi sopra descritti, in questa attività è stata utilizzata granelle di mais “non conforme” all'alimentazione umana e animale, naturalmente contaminata da aflatossine. L'aflatossina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) è quella sulla quale si è focalizzato il maggiore interesse, essendo quantitativamente la più presente e ad elevata tossicità. Lo studio è stato condotto con un impianto pilota di biogas con alimentazione in continuo, che simula la scala reale. Tale impianto è costituito da digestori in acciaio *Continuous-flow Stirred Tank Reactor* (CSTR), di 23 dm<sup>3</sup> di volume, miscelati e riscaldati, con misura della quantità di biogas prodotto (tramite sistema manometrico) e misura della qualità del gas (con analizzatore a cella infrarosso non dispersivo: *Nondispersive Infrared sensor*, NDIR). La metodologia prevede giornalmente l'alimentazione di miscele di biomasse tramite un sistema di carico e lo scarico di digestato.

In questa attività sono state utilizzate due partite di granelle di mais “non conformi”, con concentrazioni di AFB<sub>1</sub> pari a 276 µg/kg e 942 µg/kg, macinate Ø <0,500 mm per ottenere la farina. In Tabella 1 le concentrazioni di aflatossine misurate nelle biomasse utilizzate per il carico dei reattori.

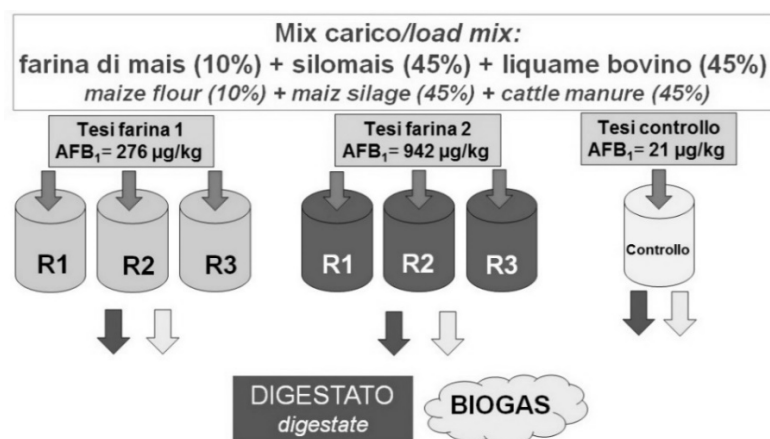
**Tabella 1. Concentrazioni di aflatossine nelle biomasse utilizzate nella sperimentazione. Le analisi si riferiscono a campioni essiccati a 50°C**

Tipologia di prodotto	AFB <sub>1</sub> (µg/kg)	AFB <sub>2</sub> (µg/kg)	AFG <sub>1</sub> (µg/kg)	AFG <sub>2</sub> (µg/kg)
Farina 1	276,4 ± 61,1	14,3 ± 4,2	2,1 ± 1,8	< 0,05
Farina 2	941,7 ± 95,6	57,7 ± 7,5	83,2 ± 27,8	< 0,05
Farina controllo	21,2 ± 10,2	1,4 ± 0,4	0,5 ± 0,8	< 0,05
Liquame bovino	5,6 ± 7,8	3,8 ± 5,4	0,2 ± 0,3	< 0,05
Silomais	0,3 ± 0,5	< 0,05	< 0,05	< 0,05
Inoculo*	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05

AFB<sub>2</sub> Aflatossina B<sub>2</sub>; AFG<sub>1</sub> Aflatossina G<sub>1</sub>; AFG<sub>2</sub> Aflatossina G<sub>2</sub>

\* digestato proveniente da un impianto di biogas agricolo, utilizzato nei reattori per avviare la sperimentazione, grazie alla disponibilità di una flora batterica già in parte adattata.

Oltre alla farina (10% del carico), la miscela di carico era costituita da liquame bovino (45%) e silomais (45%) per alimentare 6 reattori anaerobici (3 per ogni partita di granella di mais); in parallelo è stato allestito un reattore con funzione di controllo alimentato con la stessa miscela, ma utilizzando una farina con contenuto basso di aflatossina, AFB<sub>1</sub>= 21 µg/kg. In Figura 1 si riporta lo schema della sperimentazione.

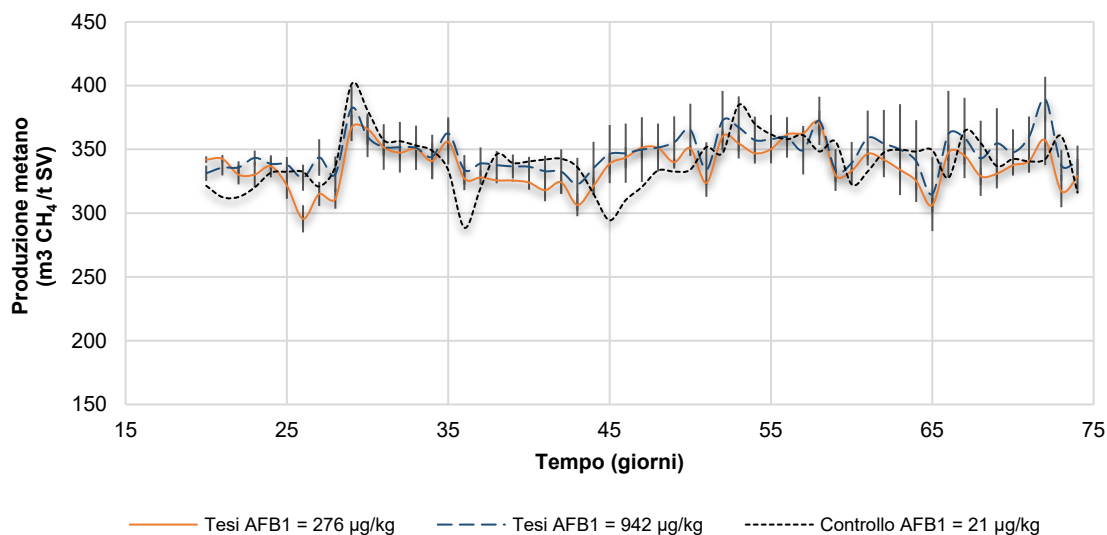


**Figura 1. Schema della sperimentazione effettuata con i digestori anaerobici di laboratorio (R=replica)**

Il test ha avuto una durata di 11 settimane. Durante questo periodo, il digestato estratto da ciascun reattore è stato raccolto settimanalmente e analizzato per i parametri necessari per il calcolo dei bilanci di massa (solidi totali e solidi volatili) e per il monitoraggio del processo biologico (pH, acidità e alcalinità). Nelle ultime quattro settimane di prova è stata misurata nel digestato anche la concentrazione di aflatossina (AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>) tramite cromatografia HPLC dall'Università Cattolica del Sacro Cuore di Piacenza. La temperatura dei reattori è stata impostata a 40°C (condizioni mesofile); l'HRT (*Hydraulic Retention Time*, tempo di ritenzione idraulica, inteso come il tempo in cui il substrato caricato rimane nel digestore) è risultato pari a 45 giorni. Il COV (Carico Organico Volumetrico, ovvero la capacità di conversione biologica di un sistema di digestione anaerobica quantificando l'efficacia del volume del digestore utilizzato), è stato pari a 4,0 kg SV/giorno per m<sup>3</sup> di reattore. L'efficienza di produzione di metano è stata calcolata come il rapporto tra la quantità di metano prodotto e la somma dei solidi volatili, ovvero della sostanza organica, caricata in ciascun reattore.

## Risultati

Sulla base di tutti i dati raccolti durante il monitoraggio, si è proceduto al calcolo delle rese specifiche in biogas/metano della miscela caricata per ciascuna tesi. I risultati riportati in Figura 2 sono le medie delle produzioni specifiche di metano delle tre tesi, calcolate escludendo il periodo di avviamento.



**Figura 2. Produzione specifica di metano, media e DS, misurata nei reattori alimentati con la miscela costituita da: farina di mais, tre diverse concentrazioni di AFB<sub>1</sub>, silomais e liquame bovino**

Nessun effetto di inibizione del processo biologico si è osservato nei risultati ottenuti: la produzione in biogas/metano misurata nelle due tesi con utilizzo di farina ad alta contaminazione di AFB<sub>1</sub> non è risultata significativamente differente dalla tesi con contaminazione trascurabile (controllo), come mostrato in Tabella 2.

**Tabella 2. Valori medi  $\pm$  deviazione standard delle rese specifiche in biogas e metano di ciascuna tesi (miscela)**

Prova	Resa in biogas (Nm <sup>3</sup> /t SV)*	Resa in metano (Nm <sup>3</sup> /t SV)	Metano (%)
Tesi farina 1 – 276 µg/kg	623,8 $\pm$ 3,1	337,5 $\pm$ 1,4	54,1 $\pm$ 0,3
Tesi farina 2 – 942 µg/kg	652,4 $\pm$ 14,1	349,4 $\pm$ 0,6	53,6 $\pm$ 22,7
Tesi controllo	625,7	340,4	54,4

\* normal metro cubo di biogas per kg di solido volatile

Al fine di valutare l'eventuale degradazione delle micotossine in digestione anaerobica, verificandone il livello di riduzione rispetto alla concentrazione iniziale, sono state effettuate analisi della quantità di aflatoxina nelle biomasse caricate nei reattori, nell'inoculo iniziale e nei digestati estratti dai reattori pilota durante la sperimentazione. Dal bilancio di massa complessivo (aflatoxina IN e OUT dal reattore) si è calcolata la riduzione percentuale della tossina per ciascuna tesi. I risultati mostrano una chiara riduzione della AFB<sub>1</sub> in tutte le tesi. Nelle condizioni

di prova, l'abbattimento medio misurato è risultato del 90,9% della quantità caricata, nelle tesi con alta concentrazione di aflatoxina (Tabella 3).

**Tabella 3. Riduzione percentuale della AFB<sub>1</sub> ottenuta dal bilancio delle tossine in entrata e uscita dai digestori (media delle tre repliche per ciascuna dose caricata)**

Tesi farina 1 - 276 µg/kg	Tesi farina 2 - 942 µg/kg	Tesi controllo
90,3 ± 1,1%	91,4 ± 0,3%	89,9%

## Conclusioni

L'attività sperimentale ha permesso di verificare il comportamento in digestione anaerobica delle aflatoxine, in particolare per la AFB<sub>1</sub> ritenuta più pericolosa e maggiormente presente nei cereali. Non si sono osservati effetti di inibizione del processo biologico e i risultati della produzione in biogas delle tesi con farine con alta contaminazione AFB<sub>1</sub> non sono significativamente differenti dal risultato ottenuto dalla tesi con contaminazione trascurabile (controllo). Non sono stati misurati effetti di accumulo, come conseguenza del carico giornaliero di micotossine, e la concentrazione di AFB<sub>1</sub> misurata nei digestati è risultata inferiore a quella attesa. Nelle condizioni di prova precisate (farina pari al 10% in peso tal quale della dieta giornaliera), la riduzione misurata è risultata per tutte le tesi con alta contaminazione di AFB<sub>1</sub>, circa il 91% della quantità caricata.

I risultati ottenuti confermano quanto verificato in una precedente sperimentazione condotta da CRPA nell'ambito del progetto "Biogas micotossine clostridi" finanziato dalla regione Emilia Romagna nel 2015.

## Ringraziamenti

Il lavoro è stato svolto nell'ambito del progetto AGROENER (Energia dall'agricoltura: innovazioni sostenibili per la bioeconomia), finanziamento MiPAAFT D.D. n. 26329 dell'1/04/2016 e del progetto MICOtrollo "Micotossine dei cereali: strategie di controllo e integrazione di filiera per uso energetico", PSR 2014-2020 Reg. Emilia-Romagna Misura 16.1.01.

## Bibliografia

1. Salati S, D'Imporzano G, Panseri S, Pasquale E, Adani F. Degradation of aflatoxin B1 during anaerobic digestion and its effect on process stability. *Int Biodeter Biodegr* 2014;94:19-23.
2. De Gelder L, Audenaert K, Willems B, Schelfhout K, De Saeger S, De Boevre M. Processing of mycotoxin contaminated waste streams through anaerobic digestion. *Waste Manage* 2018;71:122-8.
3. Giorni P, Pietri A., Bertuzzi T, Soldano M, Piccinini S, Rossi L, Battilani P. Fate of mycotoxins and related fungi in the anaerobic digestion process. *Bioresource Technol* 2018;265:554-7.
4. Rossi L, Soldano M, Piccinini S, Pietri A. Uso di farine contaminate a fini energetici (biogas): risultati di test in continuo in impianto pilota. In: Brera C, De Santis B, Debegnach F, Gregori E, Barea Toscan MC (Ed.). *V Congresso Nazionale. Le micotossine nella filiera agro-alimentare. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 28-30 settembre 2015. Atti.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2016. (Rapporti ISTISAN 16/28). p. 113-116.



# RIDUZIONE DELLA CONTAMINAZIONE DA MICOTOSSINE NEL MAIS MEDIANTE PULIZIA DELLA GRANELLA SU SCALA INDUSTRIALE

Michelangelo Pascale (a), Katarina Slettengren (b), Anna N. Vega (b), Vincenzo Lippolis (a), Salvatore Cervellieri (a), Annalisa De Girolamo (a), Veronica M.T. Lattanzio (a), Biancamaria Ciasca (a), Antonio F. Logrieco (a)

(a) Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari, Italia

(b) Bühler AG, Uzwil, Svizzera

## Introduzione

Il mais, primo cereale nel mondo per produzione, risulta essere molto suscettibile alla contaminazione da micotossine i cui livelli dipendono fortemente dall'annata agraria. Tra le micotossine che possono contaminare il mais, le aflatossine e alcune tossine di *Fusarium* (fumonisine, deossinivalenolo e zearalenone) sono quelle considerate di maggiore preoccupazione a causa dei loro effetti tossici sull'uomo e sugli animali (1, 2). È noto che cariossidi di mais ammuffite, scolorite, danneggiate o rotte, così come le polveri all'interno di una partita contaminata, contengono alti livelli di micotossine (3). Una combinazione di tecnologie in grado di rimuovere efficacemente le frazioni contaminate può quindi ridurre significativamente la contaminazione da micotossine nel prodotto finale (4-9).

In letteratura sono riportati solo due studi condotti su scala industriale finalizzati a valutare l'efficacia dei processi di pulizia delle cariossidi nel ridurre il contenuto di micotossine nel mais. In particolare, è stata valutata l'efficacia della pulizia del mais sui livelli di aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) e fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) in un processo industriale finalizzato a valutare la distribuzione di queste micotossine nelle frazioni ottenute dalla macinazione a secco della granella. Tale studio ha mostrato una riduzione dei livelli di AFB<sub>1</sub> e FB<sub>1</sub> molto variabile, nell'intervallo 8-57% e 11-34%, rispettivamente. L'entità della decontaminazione ottenuta dipendeva dai livelli di contaminazione del mais non processato (10). In uno studio più recente, la pulizia del mais con un separatore meccanico, un aspiratore e una selezionatrice ottica ha mostrato una riduzione delle fumonisine di circa il 42% (11).

Lo scopo del presente studio è stato quello di valutare l'efficacia di differenti tecniche di pulizia delle cariossidi a livello industriale nel ridurre i livelli di aflatoxine (AF), deossinivalenolo (DON), fumonisine (somma di FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub>) e zearalenone (ZEA) nel prodotto pulito.

Le tecniche includevano:

- i) separazione meccanica delle cariossidi sulla base delle loro dimensioni allo scopo di eliminare le frazioni grosse, piccole e gli spezzati;
- ii) rimozione delle polveri/particelle sottili attraverso un sistema di aspirazione;
- iii) separazione delle cariossidi basata sulla loro densità
- iv) selezione ottica delle cariossidi con difetti cromatici e di forma.

A tale scopo, diversi lotti di mais (3-25 tonnellate) contaminato da AF, DON, FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub> e ZEA sono stati processati in tre diversi impianti industriali, in Italia, Germania e Spagna, per valutare l'effetto della pulizia delle cariossidi sulla riduzione dei livelli di tali micotossine.

## Materiali e metodi

### Campionamento e analisi delle micotossine

Il campionamento è stato eseguito lungo l'intera linea di processo in accordo al Regolamento (CE) 401/2006 tenendo conto del peso del lotto e della velocità di scarico (tonnellate/ora). È stato raccolto un numero di campioni incrementali da 3 a 100 (circa 100-300 g ciascuno) mediante campionamento dinamico o statico, a seconda delle frazioni campionate (Figura 1).



**Figura 1. Alcune fasi del campionamento lungo la linea di pulizia del mais**

Le analisi delle micotossine sono state eseguite con metodi HPLC previa purificazione degli estratti mediante colonnine ad immunoaffinità. Quando possibile, sono stati utilizzati metodi standard AOAC o CEN.

## Risultati e discussione

È stata osservata una riduzione significativa del contenuto di micotossine nel prodotto pulito con percentuali fino al 90% per le aflatossine (AFB<sub>1</sub> e aflatossine totali), fino all'88% per lo zearalenone (ZEA), fino all'82% per il deossinivalenolo (DON) e fino al 69% per le fumonisine (somma di FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub>), rispetto al prodotto iniziale non pulito. L'efficacia della riduzione dipendeva dalla concentrazione iniziale delle micotossine nel prodotto non processato e dalla percentuale di materiale di scarto.

Tutte le frazioni degli scarti di pulitura, ed in particolare le polveri e le frazioni di scarto prodotte dall'aspiratore e dalla selezionatrice ottica, contenevano elevati livelli di micotossine, con concentrazioni fino a 340 µg/kg per le aflatossine, 78.540 µg/kg per il DON, 27.850 µg/kg per FB<sub>1</sub>+FB<sub>2</sub> e 26.920 µg/kg per lo ZEA.

In Tabelle 1 e 2 sono riportati, a titolo di esempio, i risultati di alcune prove sperimentali. In particolare, nella prova con le tossine di *Fusarium*, le percentuali di riduzione più basse osservate nel lotto B (Tabella 2) per DON e FB<sub>1</sub>+FB<sub>2</sub> possono essere spiegate dai bassi livelli di micotossine nel prodotto non processato e dalle percentuali più basse di materiale scartato.

**Tabella 1. Riduzione del contenuto di aflatossine in mais sottoposto a processo di pulizia (separazione meccanica, aspirazione e selezionatrice ottica)**

Lotto	Frazione	Aflatossine (µg/kg)	Riduzione (%)
A*	Prodotto prima della pulizia	30,2	84
	Prodotto dopo la pulizia	4,7	
B*	Prodotto prima della pulizia	24,5	76
	Prodotto dopo la pulizia	6,0	

\* flusso: 15 t/h; prodotto eliminato: 6,6%

**Tabella 2. Riduzione del contenuto di Deossinivalenolo (DON), Zearalenone (ZEA) e Fumonisine (FB<sub>1</sub>+FB<sub>2</sub>) in mais sottoposto a processo di pulizia (separazione meccanica, aspirazione e selezionatrice ottica)**

Lotto	Frazione	DON (µg/kg)	Riduzione DON (%)	ZEA (µg/kg)	Riduzione ZEA (%)	FB <sub>1</sub> +FB <sub>2</sub> (µg/kg)	Riduzione FB <sub>1</sub> +FB <sub>2</sub> (%)
A*	Prodotto prima della pulizia	10160	82	1900	88	5810	69
	Prodotto dopo la pulizia	1780		220		1830	
B**	Prodotto prima della pulizia	250	36	50	80	1660	49
	Prodotto dopo la pulizia	160		10		850	

\* flusso: 25 t/h; prodotto eliminato: 17%; \*\* flusso: 17 t/h; prodotto eliminato: 4%.

Il confronto tra i dati riportati in letteratura (10, 11) e i risultati ottenuti in questo studio mettono in evidenza l'elevata variabilità delle percentuali di riduzione dovuta soprattutto alla difficoltà di condurre un campionamento affidabile a livello industriale. Tuttavia, il risultato che va sottolineato è che in tutte le prove sperimentali, tutti i prodotti di scarto contenevano livelli elevati di micotossine confermando la bontà dei sistemi di pulizia utilizzati, sia meccanici che ottici, nel rimuovere materiale contaminato.

Qualora i livelli di micotossine dopo la pulizia non dovessero rientrare nei livelli massimi ammissibili, è sempre possibile ripetere il processo di pulizia. Questo eviterà il mancato utilizzo del lotto contaminato che dovrebbe quindi essere distrutto o destinato ad altro uso (es. per la produzione di biogas o bioetanolo) con notevoli danni economici per il produttore.

La pulitura delle cariossidi svolge anche un'azione preventiva in quanto l'allontanamento di frazioni facilmente attaccabili da funghi come cariossidi striminzite, spezzate e polveri riduce notevolmente il rischio di colonizzazione fungina e produzione di micotossine durante la fase di conservazione dei cereali.

## Conclusioni

I risultati di questo studio dimostrano che l'impiego di una linea di pulizia che combina tecnologie di selezione sia meccaniche che ottiche è una soluzione affidabile per ridurre sensibilmente la contaminazione da micotossine nel mais. Il processo di pulizia andrebbe ottimizzato in maniera da minimizzare gli scarti ottenendo prodotti finali con livelli di micotossine al di sotto dei limiti massimi ammissibili delle micotossine in materie prime per mangimi e derrate alimentari.

## Ringraziamenti

Lavoro è stato svolto nell'ambito del progetto MYCOKEY (H2020-Grant Agreement No 678781).

## Bibliografia

1. Wild CP, Gong YY. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. *Carcinogenesis* 2009;31(1):71-82.
2. Gashaw M. Review on mycotoxins in feeds: implications to livestock and human health. *Journal of Agricultural Research and Development* 2015;5(3):137-144.
3. Shi H, Stroshine RL, Ileleji K. Differences in kernel shape, size, and density between healthy kernels and mold discolored kernels and their relationship to reduction in aflatoxin levels in a sample of shelled corn. *Applied Engineering in Agriculture* 2017; 33(3):421-431.
4. Schaarschmidt S, Fahl-Hassek C. The Fate of mycotoxins during the processing of wheat for human consumption. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2018; 17(3):556-593.
5. Stasiewicz MJ, Falade TDO, Mutuma M, Mutiga SK, Harvey JJW, Fox G, Pearson TC, Muthomi JW, Nelson RJ. Multi-spectral kernel sorting to reduce aflatoxins and fumonisins in Kenyan maize. *Food Control* 2017; 78:203-214.
6. Tibola CS, Fernandes JMC, Guarienti EM. Effect of cleaning, sorting and milling processes in wheat mycotoxin content. *Food Control* 2016; 60:174-179.
7. Pearson TC, Wicklow DT, Brabec DL. Characteristics and sorting of white food corn contaminated with mycotoxins. *Applied Engineering in Agriculture* 2010; 26(1):109-113.
8. Brera C, Catano C, De Santis B, Debegnach F, De Giacomo M, Pannunzi E, Miraglia M. Effect of industrial processing on the distribution of aflatoxins and zearalenone in corn-milling fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006; 54(14):5014-5019.
9. Visconti A, Haidukowski M, Pascale M, Silvestri M. Reduction of deoxynivalenol during durum wheat processing and spaghetti cooking. *Toxicology Letters* 2004; 153:181-189.
10. Pietri A, Zanetti M, Bertuzzi T. Distribution of aflatoxins and fumonisins in dry-milled maize fractions. *Food Additives and Contaminants Part A* 2009; 26(3):372-380.
11. Vanara F, Scarpino V, Blandino M. Fumonisin distribution in maize dry-milling products and by-products: impact of two industrial degermination systems. *Toxins* 2018;10(9):357.

**SESSIONE**  
**Valutazione del rischio**



## PERCEZIONE DEL RISCHIO DEL CONSUMATORE ALLE MICOTOSSINE E ALLE TOSSINE NATURALI

Agostino Macrì (a), Martina Bernardi (b)

(a) *Unione Nazionale Consumatori, Roma, Italia*

(b) *Università Campus Bio-medico di Roma, Italia*

Il numero di micotossine è molto elevato e, al momento attuale, se ne conoscono in misura relativamente ridotta.

Anche se per gli esperti l'argomento è molto chiaro, non altrettanto si può dire dei cittadini; nella stragrande maggioranza dei casi non sanno che, con il termine "micotossine", si intendono delle sostanze naturali tossiche prodotte da alcuni funghi microscopici i quali, in condizioni ambientali a loro favorevoli (es. tasso di umidità e temperatura elevate specialmente come quelle estive), possono svilupparsi all'interno di diversi alimenti. Si tratta di condizioni che si verificano spesso nei campi adibiti alla produzione di foraggi, di cereali e/o di leguminose.

Il pericolo maggiore si manifesta però durante le fasi di trasporto e di conservazione e, soprattutto in tal contesto, in quelle successive al raccolto. La contaminazione con micotossine può riguardare molti alimenti destinati all'uomo, come ad esempio, nella frutta secca (arachidi, pistacchi, ecc.), nei cereali (frumento, riso, mais, ecc.), nei legumi, nel caffè, nelle marmellate, nelle conserve, nella birra, nel vino e in altri ancora.

Per alcune sono stati definiti dei limiti di tolleranza nei diversi alimenti e i controlli effettuati garantiscono un buon livello di sicurezza degli alimenti che troviamo in commercio.

Più subdola è la contaminazione dei foraggi e dei mangimi destinati agli animali da allevamento. Può infatti accadere che le micotossine assunte con l'alimentazione siano "trasferite" al latte, alla carne o alle uova e quindi raggiungere indirettamente i consumatori. Per scongiurare questo pericolo sono stati definiti dei limiti di "tolleranza" nei foraggi e nei mangimi per evitare che quelli maggiormente contaminati siano destinati all'alimentazione degli animali.

Un importante ausilio ad accrescere le conoscenze sulle micotossine arriva dalle sempre più accurate e precise tecniche analitiche. Tuttavia, sono ancora molte le lacune conoscitive sulla loro pericolosità. Ciò dipende in gran parte dal fatto che non vi è molto interesse a sviluppare delle ricerche da parte delle grandi aziende alimentari. Esse infatti preferiscono investire in ricerche i cui risultati possono trovare delle applicazioni pratiche. I contaminanti alimentari rappresentano un problema da eliminare e quindi non risulta produttivo studiarne la tossicità o altri effetti biologici. Le informazioni disponibili derivano in gran parte da studi indipendenti condotti da enti di ricerca e/o dalle Università. Le risorse economiche di queste strutture sono spesso molto modeste e legate a finanziamenti pubblici (Stato, Unione Europea, organizzazioni internazionali, ecc.).

Non esiste quindi una precisa strategia sulle ricerche da effettuare e alle volte alcuni studi sono ripetitivi oppure condotti non rispettando le Buone Pratiche di Laboratorio.

Gli Organismi scientifici incaricati della valutazione dei rischi, come ad esempio l'EFSA, per la carenza di informazioni scientifiche, non sono in grado di esprimere un parere motivato e sono costrette ad essere molto prudenti e magari adottare il principio di precauzione che, di fatto, esclude dall'uso un alimento contaminato con la sostanza per cui non è stato possibile fare una valutazione adeguata.

Questa evenienza può comportare gravi sprechi e anche seri problemi di smaltimento. È capitato di dover buttare interi carichi di navi perché quello che trasportavano era contaminato da micotossine.

Vale la pena di ricordare che non è consentito “diluire” un alimento contaminato con uno “sano” in modo da diminuire la concentrazione del contaminante; ciò vale anche per i mangimi destinati agli animali da allevamento.

Fortunatamente, nei prodotti alimentari destinati all’uomo, la concentrazione delle micotossine, sconosciute o poco conosciute, è generalmente molto bassa, di conseguenza, presumibilmente, il rischio che provochino danni significativi alla salute dei cittadini è modesto.

Risulta pertanto di fondamentale importanza sostenere e porre in essere delle misure di prevenzione che siano utili ed efficaci, a partire dalle colture in campo e successivamente lungo tutte le fasi produttive della filiera, al fine di evitare il consumo di alimenti potenzialmente dannosi per la salute e inutili sprechi. La contaminazione degli alimenti difatti può avvenire lungo l’intera “filiera” di produzione, dal campo alla tavola ed esistono norme che obbligano, i produttori e i trasformatori alimentari, a rispettare misure di sicurezza molto stringenti e rigorose, così da minimizzare la presenza di micotossine negli alimenti acquistati dai cittadini.

Per quanto riguarda la pericolosità essa è legata alla dose che viene assunta e alla tipologia di micotossine interessata; infatti sono molto diverse tra loro e alcune sono molto più tossiche di altre. Onde prevenire il potenziale sviluppo di un tale pericolo è opportuno che i consumatori seguano alcune semplici norme e accorgimenti, che vengono riportati di seguito, utili per il riconoscimento e la prevenzione delle intossicazioni alimentari da tossine naturali, da applicare a partire dall’acquisto, durante la fase di conservazione e sino al consumo finale.

Per ciò che concerne l’acquisto degli alimenti è sempre bene rivolgersi a canali di vendita e distribuzione legali (negozi di alimentari, mercati rionali, supermercati, ecc.), diffidando dai venditori occasionali o non autorizzati. Anche un prezzo troppo basso, rispetto alla media, può rappresentare un campanello di allarme, così come un confezionamento “diverso” cioè non usuale per il tipo di prodotto in questione. È opportuno porre attenzione alla data di scadenza del prodotto nonché fare un esame visivo per verificarne lo stato di conservazione, la freschezza e, soprattutto, la presenza eventuale di muffe (sebbene le micotossine possano formarsi anche in assenza di evidenti ammuffimenti).

In particolare, se si acquistano dei cereali “integrali” da utilizzare per fare pane, dolci o altri prodotti, è necessario fare molta attenzione che non ci siano “anomalie” cromatiche o tracce di muffe. Analoga cautela deve essere posta nell’acquisto di prodotti “sfusi” come arachidi, pistacchi e altra frutta secca.

Per contro, riguardo la gestione domestica degli alimenti, è bene porre attenzione ai luoghi destinati alla conservazione degli alimenti, che devono essere sempre freschi e asciutti in quanto le muffe si sviluppano in ambienti umidi, addirittura alcune di esse si formano anche sugli alimenti riposti in frigorifero. Qualora l’alimento acquistato, durante la fase di conservazione, presenti tracce di muffa è bene non consumarlo anche perché “ripulire” gli alimenti dalle muffe può non essere sufficiente ad eliminare le eventuali micotossine prodotte. Si precisa inoltre che la cottura, e in generale i vari livelli di temperature utilizzati per i diversi prodotti, sono in grado di eliminare le muffe ma non di inattivare le micotossine.

In conclusione, si può affermare che il rischio di una contaminazione con micotossine dei nostri alimenti esiste, ma che è possibile prevenirla facendo degli acquisti oculati, attuando una corretta gestione degli alimenti in ambiente domestico (conservazione e preparazione). In questo modo è anche possibile ridurre gli sprechi alimentari che sono purtroppo una piaga della quale i consumatori sono in gran parte responsabili.

Non molti sono informati della presenza in natura di sostanze molto tossiche soprattutto di origine vegetale. Per le piante tali sostanze sono un mezzo di difesa dalla aggressione degli



animali e infatti molte di esse sono dei potenti insetticidi. L’Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (*European Food Safety Authority*, EFSA) ha valutato molte delle sostanze “biotiche”. Sul sito web dell’EFSA è infatti possibile reperirne i rapporti specifici (es. alcaloidi pirrolizidinici, curcumina, derivati del lupino, cannabinoidi, ecc.). Molto importante è un rapporto pubblicato dal Ministero della Salute sui principi attivi velenosi dei vegetali (1). Si tratta di un documento che dovrebbe essere divulgato tra i “raccoltori” di vegetali spontanei. Una maggiore conoscenza potrebbe evitare delle tragedie come quelle che purtroppo si verificano a seguito del consumo di funghi velenosi, mandragora, stramonio, ecc.

Un accenno al ruolo dei media. Essi hanno il compito di comunicare e trasferire le informazioni ai cittadini in modo trasparente ed esaustivo; purtroppo però sembra prevalere la tendenza a diffonderle in modo allarmistico, mettendo per lo più in evidenza gli aspetti che maggiormente ne attirano l’attenzione e senza tenere nella dovuta considerazione le valutazioni scientifiche che sono state condotte sull’argomento. Un ulteriore punto, che è opportuno evidenziare, riguarda la ridotta conoscenza, da parte dei consumatori, delle fonti ufficiali di informazioni (es. Enti Pubblici, EFSA, ecc.).

In generale, i consumatori sono giustamente preoccupati delle sostanze xenobiotiche (contaminanti ambientali, materie plastiche, residui di farmaci e di pesticidi, ecc.) e anche delle sostanze naturali di cui si hanno informazioni tossicologiche “negative” (es. aflatossina), ma che raramente danno intossicazioni acute. Paradossalmente l’attenzione decresce per le sostanze naturali molto tossiche e che possono provocare anche la morte quasi immediata a seguito della loro ingestione. Sembra fare più notizia la presenza di tracce di un antibiotico nella carne, piuttosto che il consumo di un integratore contenente curcuma e che può dare gravi intossicazioni acute epatiche.

Ne consegue che sarebbe utile e opportuno contrastare la diffusione di “fake news”, sia “terroristiche” sia “superficialmente tranquillizzanti”, nonché, contestualmente, promuovere la puntuale e corretta divulgazione delle notizie ai cittadini, ponendosi come obiettivo anche quello di contribuire ad incrementare la loro fiducia nei confronti delle istituzioni e delle autorità competenti.

In conclusione, per garantire un elevato livello di sicurezza del consumatore e quindi minimizzare i potenziali rischi, occorre gestire le informazioni in modo semplice, puntuale e completo al fine di migliorare la consapevolezza dei cittadini su temi di rilevante importanza per la salute. Altresì il consumatore deve mettere in pratica le linee guida, precedentemente indicate, sin dall’acquisto, alla conservazione e infine al consumo degli alimenti. Ciò può avvenire solo conoscendo i pericoli determinati dal consumo incauto di alcuni prodotti naturali (come ad esempio funghi, piante, preparazioni domestiche, ecc.), sfatando di fatto la credenza che ciò che è naturale non fa male.

## Bibliografia

1. Assisi F (Ed.). *Le intossicazioni alimentari da tossine naturali: guida al riconoscimento e alla prevenzione*. Roma: Ministero della Salute; 2016.

# **VALUTAZIONE DELL'ESPOSIZIONE DEL CONSUMATORE ALLE MICOTOSSINE: ANALISI DEI DATI NSIS 2016-2017**

Carlo Brera, Emanuela Gregori, Francesca Debegnach e Barbara De Santis  
*Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria, Istituto Superiore di Sanità Roma, Italia*

## **Introduzione**

La rilevanza sanitaria che scaturisce dalla presenza negli alimenti e mangimi delle micotossine pone ancora all'attenzione del ricercatore e dei vari operatori della filiera agro-alimentare molteplici spunti di riflessione che sono strettamente riconducibili alla valutazione del rischio, alla gestione del rischio e alla comunicazione del rischio. Tra essi si riportano di seguito i più importanti come la declinazione delle più appropriate modalità con cui mettere in atto le attività di prevenzione lungo tutto il ciclo produttivo, la individuazione di efficienti strumenti operativi per monitorare in tempo reale la contaminazione sia in campo sia nelle fasi di trasformazione della materia prima, la individuazione delle necessarie azioni di autocontrollo, prime fra tutte la definizione dei criteri di accettazione della materia prima precedente la successiva trasformazione nei prodotti finiti e la modalità di conservazione del prodotto in tempi medio-lunghi, così come l'adozione di idonee condizioni di trasporto per salvaguardare l'integrità sanitaria del prodotto, la attivazione di una corretta distribuzione dei prodotti alimentari al consumatore finale, ma anche la messa in atto di efficienti attività di controllo ufficiale da parte delle Autorità territoriali, così come l'utilizzo di appropriati strumenti diagnostici, opportunamente validati e accreditati, da parte dei laboratori che operano sul territorio, e infine le attività di valutazione dell'esposizione al consumatore finalizzate alla individuazione di potenziali rischi per la salute pubblica.

Gli aspetti precedentemente elencati riguardanti le attività di prevenzione, autocontrollo e controllo ufficiale sono state ampiamente presentate nell'ambito di questo Congresso sia dalle Autorità preposte alla sicurezza alimentare, che da autorevoli ricercatori, sia infine dagli operatori del sistema alimentare. I relativi contributi sono presenti nel corpo di questo Rapporto.

In questo contributo, saranno affrontate le criticità che, secondo l'Autore, ancora sussistono nella valutazione del rischio ed esposizione derivanti dalla presenza delle micotossine nei prodotti alimentari.

## **Valutazione dell'esposizione: aspetti generali**

Come considerazione generale, è noto che, nell'ambito dell'analisi del rischio, la valutazione del rischio è un processo scientifico finalizzato a valutare la probabilità che potenziali effetti dannosi per la salute pubblica possano avvenire in seguito alla esposizione con la dieta a pericoli di natura chimica, biologica e fisica.

In accordo con l'articolo 3 del Regolamento CE/178/2002 (1), consiste di quattro fasi: 1) identificazione del pericolo, 2) caratterizzazione del pericolo, 3) valutazione dell'esposizione e 4) caratterizzazione del rischio.

La gestione del rischio è finalizzata alla individuazione degli interventi operative per minimizzare la presenza dei pericoli in base ad aspetti scientifici, economici, produttivi, sociali, culturali ed etici.

Infine, la comunicazione del rischio ha sia lo scopo di diffondere la informazione utile a prevenire, ridurre o minimizzare i rischi alimentari per raggiungere livelli sicuri per la popolazione, sia di incorporare la gestione del rischio nel processo decisionale ad opera dell'Autorità Competente.

È ormai consolidato che le misure di gestione del rischio che offrono i migliori risultati in fatto di minimizzazione del rischio sono una corretta implementazione delle misure preventive e un'adeguata normativa sia relativa alla fissazione di limiti massimi tollerabili sia alla declinazione di procedure operative che consentano una effettuazione delle misure di controllo in modo accurato e armonizzato.

Relativamente alla presenza di limiti massimi tollerabili l'aspetto che deve essere ancora chiarito è la risposta alla domanda: Quale è la relazione tra il limite di legge (LL) e il livello di contaminazione giudicato "sicuro" (LS) per il consumatore?

Tale interrelazione deve necessariamente tenere conto di alcune criticità di seguito riportate:

i criteri su cui si basa la creazione di un LL devono essere strettamente correlati alla necessità di ridurre il più possibile la presenza di contaminanti negli alimenti. A questo proposito, gli elementi da considerare sono la conoscenza della gravità del rischio, i dati di occorrenza della tossina negli alimenti, i dati di consumo, la conoscenza dell'effetto del trattamento delle materie prime e la disponibilità di metodi di analisi validati ad alta sensibilità. Parallelamente, un LS è definito come quella dose alla quale corrisponde un rischio tollerabile per la salute pubblica. Viene valutato sulle informazioni disponibili sulla frequenza di assunzione della tossina attraverso il cibo, la quantità ingerita del cibo contaminato su base giornaliera, il livello di dose della tossina negli alimenti, la proprietà tossica intrinseca della tossina e il gruppo di consumatori considerato.

LL e LS dovrebbero teoricamente coincidere, ma varie considerazioni relative alla sostenibilità della libera circolazione delle merci imposta dalla globalizzazione e agli approcci utilizzati nella definizione delle soglie tossicologiche di riferimento, portano ad altri scenari. Più specificamente, un limite di legge dovrebbe essere impostato al livello più basso ragionevolmente raggiungibile in grado di proteggere la salute del consumatore.

In pratica, la fissazione del limite massimo di legge corrisponde nella maggior parte dei casi al 95° percentile della distribuzione dei livelli di contaminazione disponibili in letteratura.

Inoltre, un altro criterio comunemente utilizzato per la fissazione del limite massimo porta ad una oscillazione da valori più alti a più bassi a seguito dei livelli di consumo del relativo prodotto alimentare.

Infine, le soglie tossicologiche di riferimento che sono attualmente considerate sono state calcolate in modo correlato ad una persona adulta e non ad un gruppo di consumatori particolarmente vulnerabile come quello dei bambini di età post-infantile.

Per quanto riportato, è necessario individuare le procedure più accurate per definire il livello di rischio per il consumatore, analizzando le specifiche criticità che caratterizzano la valutazione del rischio e dell'esposizione per il consumatore.

Attualmente, per valutare il rischio di esposizione del consumatore derivante dalla presenza delle micotossine nella dieta, sono ancora ampiamente utilizzati approcci deterministici e/o probabilistici, sia attraverso la valutazione della contaminazione nei prodotti alimentari attraverso metodologie diverse come gli studi di dieta totale o la dieta in doppio, o attraverso l'analisi dei biomarcatori nei fluidi biologici (sangue, urine, feci, latte materno).

In tutti i casi citati, sussistono numerose variabilità (quote di consumo, durata della esposizione, tempi di vita attesi, ecc.) e incertezze (processi di estrapolazione all'uomo della dose

tossica e la durata dell'effetto, differenti suscettibilità tra uomo e specie animali, così come tra i gruppi di popolazione considerati, stima dei valori inseriti, calcolo, interpretazione e documentazione dei risultati ottenuti) che possono condizionare l'attendibilità dei risultati che si ottengono ed è quindi imperativo, per diminuirne gli effetti, valutarne la loro presenza sia qualitativamente che quantitativamente.

## Criticità nella valutazione dell'esposizione alle micotossine con la dieta

Poiché a livello globale la presenza di micotossine negli alimenti costituisce uno dei principali temi di sicurezza alimentare, è necessario effettuare una puntuale valutazione dell'esposizione al rischio sulla base di dati di incidenza di contaminazione e di consumo disponibili a livello nazionale, in relazione a differenti pesi corporei delle varie fasce di consumatori.

La valutazione dell'esposizione è stata effettuata utilizzando l'algoritmo:

$$\text{esposizione} = \frac{\text{concentrazione micotossina (C)} \times \text{consumo alimento(Cons)}}{\text{peso corporeo (PC)}} \quad [1]$$

Successivamente, al fine di individuare il livello di rischio del consumatore (caratterizzazione), per le sostanze genotossiche e cancerogene deve essere utilizzato l'approccio del Margine di Esposizione (*Margin of Exposure*, MoE) che è definito come il rapporto tra il punto di riferimento nella curva dose-risposta derivante da studi sugli animali e la stima dell'esposizione. È noto che per valori di MoE superiori a 10000 si può concludere che non sussista un rischio per la salute pubblica. Valori tendenti a livelli significativamente inferiori a 10000 corrispondono ad alti livelli di rischio per il consumatore. Viceversa, per tutte le sostanze cancerogene non genotossiche per le quali è disponibile un *Health Based Guidance Value* (HBGV) come ad esempio la dose tollerabile giornaliera (*Tolerable Daily Intake*, TDI) si valuta il rapporto percentuale tra il livello di HBGV e l'esposizione calcolata (2).

Ciascuno dei fattori che compongono l'equazione [1] comporta un'incertezza e una variabilità come precedentemente riportato. In particolare, il livello di concentrazione della micotossina (C) deve necessariamente corrispondere al livello medio ottenuto da una distribuzione di dati di incidenza per una specifica combinazione micotossina/prodotto alimentare.

Relativamente ai dati di incidenza, Il Nuovo Sistema Informativo Sanitario (NSIS) rappresenta lo strumento di riferimento per poter disporre di una preziosa banca dati su base annua relativa alla presenza di sostanze contaminanti nei prodotti alimentari.

NSIS nasce, quindi, con l'obiettivo di rendere disponibile, a livello nazionale e regionale, un archivio di dati che può essere utilizzato anche per la valutazione del rischio di esposizione del consumatore.

Con riferimento, infine, ai dati di consumo (Cons), è fondamentale poter disporre di una banca dati ufficiale in cui siano riportati i livelli di consumo diversificati possibilmente almeno per età e genere, e che consideri le quote di consumo almeno medie e al 95° percentile, oltre distinguere la quota di consumo di tutta la popolazione da quello relativo ai soli consumatori.

Infine i pesi corporei devono necessariamente essere riconducibili a dati ufficiali rilasciati da organizzazioni nazionali e/o internazionali preposte.

Le principali criticità relative ai dati di incidenza di contaminazione disponibili nel database NSIS risiedono nella rilevante paucità dei dati a causa della presenza di una limitata numerosità campionaria, poco rappresentativa della situazione nazionale, sia della disomogeneità dei dati stessi in termini di specificità delle combinazioni micotossina/prodotto alimentare, in quanto in

alcuni casi la classificazione dei prodotti alimentari non è riportata in modo corretto e soprattutto in modo armonizzato. A questo proposito si ricorda che l'unica classificazione che deve essere considerata è quella relativa al sistema FoodEX2 che la *European Food Safety Authority* (EFSA) ha recentemente reso disponibile in un suo rapporto (3).

Altra fonte di incertezza è rappresentata dalla presenza di limiti di quantificazione dei metodi di analisi sensibilmente differenti da laboratorio a laboratorio rendendo molto difficile la stima della distribuzione dei valori negativi e di quelli positivi, e di conseguenza la stima della media dei valori stessi da inserire nell'equazione.

Infine, costituisce un'altra fonte di incertezza la presenza di dati di incidenza su materie prime o intermedi di produzione che non possono essere utilizzati in caso di mancanza dei fattori di conversione corrispondenti sia alla quantità con cui la materia prima è presente nel prodotto finito sia alla quota di tossina che residua nel prodotto finale come effetto della stabilità della tossina durante il processo produttivo conseguente alle condizioni termiche, di raffinazione, di ripartizione delle frazioni processate nel processo produttivo.

Nella valutazione dell'esposizione considerando i dati NSIS, è necessario ricordare che l'indagine deve necessariamente avvalersi di altre banche dati ufficiali relative ai consumi e ai pesi corporei, non previsti nel database NSIS. Relativamente ai dati di consumo, i dati ufficiali attualmente disponibili sono reperibili nel documento dell'ex INRAN (Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione) dove sono riportati i valori disaggregati per età (infanti, bambini, adolescenti, adulti, anziani), sesso, gruppi di popolazione ("tutta la popolazione" e "soli consumatori") e valori di consumo corrispondenti alla media, mediana, 95° e 99° percentile.

Per contro, la banca dati risente oggettivamente di una significativa fonte di incertezza in quanto i dati si riferiscono allo studio pubblicato nel 2005 e pertanto da considerare alquanto obsoleti.

Inoltre, una fonte di incertezza aggiuntiva risiede, in alcuni casi, nella estrema aggregazione dei dati portando inevitabilmente ad una sovrastima della esposizione come ad esempio nei dati di consumo del prosciutto, non presente nella banca dati ufficiale a fronte di un dato aggregato relativo al consumo di prodotti vari a base di carne di maiale.

Infine per i pesi corporei, si possono considerare i dati ufficiali della Organizzazione Mondiale della Sanità, così come riportati nella pubblicazione di riferimento dei dati di consumo presente nell'indagine INRAN-SCAI (4).

Considerando le citate variabilità e incertezze, di seguito sono riportate le conclusioni tratte dalla valutazione dell'esposizione considerando i dati di incidenza riportati nel sistema NSIS relativamente agli anni 2016-2017.

## Valutazione dell'esposizione: conclusioni 2016-2017

Complessivamente, i dati NSIS considerati nella valutazione del rischio sono stati N= 6969 (3858 nel 2006 e 3111 nel 2017).

Sono state prese in esame le seguenti micotossine: Aflatossina B<sub>1</sub> e Totali, Aflatossina M<sub>1</sub>, Ocratossina A, Zearalenone, Fumonisine, Deossinivalenolo, Citrinina, T2/HT2, Patulina, Alcaloidi dell'ergot, Tossine dell'Alternaria. I prodotti alimentari investigati sono stati tutti quelli che comunemente sono associati alle micotossine citate.

A seconda della natura dell'effetto tossico delle micotossine considerate si sono presi in considerazioni approcci differenti, vale a dire per le sostanze genotossiche come l'Aflatossina B<sub>1</sub> il MoE definito come:

[*BMDL10/Exp osservata*] con valore soglia pari a 10000,

per le sostanze cancerogene non genotossiche come l'aflatossina M<sub>1</sub> l'Hazard Index definito come il rapporto Q/Q<sub>L</sub> dove Q corrisponde all'esposizione calcolata e Q<sub>L</sub> alla soglia tossicologica di riferimento; per tutte le altre micotossine con proprietà non cancerogene è stato valutato il contributo percentuale alla soglia tossicologica di riferimento (TDI, TWI, ecc.).

## **Aflatossina B<sub>1</sub> e totali**

Nel 2016, l'esposizione del consumatore alle aflatossine ha mostrato solo in alcuni casi un andamento da tenere sotto stretto controllo, segnatamente nei casi seguenti:

- categoria SOLO CONSUMATORI;
- categoria dei bambini da 3 a 9,9 anni risulta la più esposta;
- frutta secca ed essiccata;
- grano, mais e farine di cereali.

Nel 2017, si è rilevata, negli stessi prodotti alimentari, una esposizione leggermente superiore rispetto a quella del 2016, con valori di gran lunga inferiori a 10000 anche per le altre categorie di consumatori, anche se a valori più alti rispetto a quelli valutati per la categoria bambini di età compresa tra 3 e 9,9 anni.

## **Aflatossina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>)**

L'andamento nei due anni è risultato il medesimo, con evidenza di maggiore contributo alla esposizione derivante dalla presenza di AFM<sub>1</sub> nel formaggio piuttosto che nel latte.

Il picco di esposizione si è registrato per i bambini dai 3 ai 9,9 anni, con particolare enfasi per i forti consumatori.

## **Ocratossina A (OTA)**

Relativamente ai dati NSIS 2016, l'esposizione alla OTA non ha destato particolare preoccupazione in quanto è risultata piuttosto contenuta per tutte le categorie di consumatori in tutte le matrici considerate (caffè, vino, cereali, spezie). Nel 2017, l'esposizione alla OTA non ha destato particolare preoccupazione in quanto è risultata piuttosto contenuta fatta eccezione per la matrice caffè, the e altri derivati da parte dei bambini da 3 a 9,9 anni.

Costituiscono un caso a parte i prodotti a base di liquirizia, per i quali, si sono registrati, nonostante il limitato numero di campioni analizzati (N=8), livelli di contaminazione significativamente alti con un valore medio pari a 59,3 µg/kg. Si rileva comunque che non essendo disponibili dati di consumo disaggregati per le varie fasce di popolazione, non è stato possibile valutare l'esposizione.

Si è rilevato, altresì, che un consumo pari a 3,5 grammi al giorno da parte dei bambini di età compresa tra i 3 e i 10 anni comporterebbe una esposizione pari al 20% della TDI della OTA.

## **Fumonisine**

L'andamento mostrato nel biennio, ha rivelato in modo evidente come la presenza di fumonisine riguardi essenzialmente la farina di mais. Analogamente agli altri casi, la categoria che risulta maggiormente esposta è risultata quella dei bambini da 3 a 10 anni, con valori percentuali rispetto alla soglia tossicologica di riferimento pari al 44% della TDI nel 2016 e al 38,5% della TDI nel 2017.

## **Deossinivalenolo (DON)**

In entrambi gli anni, l'andamento ottenuto rivela in modo evidente come la presenza del DON sia largamente diffusa nei prodotti a base di cereali, raggiungendo i valori massimi di esposizione sempre nel caso dei bambini da 3 a 9,9 anni forti consumatori nel caso del pane (72% della TDI, nel 2016 e 61,7% nel 2017) e della pasta (44% della TDI nel 2016 e 64,3% nel 2017).

È necessario rilevare che l'esposizione al DON riveste una considerazione a parte rispetto alle altre micotossine. Data, infatti, la sua diffusa presenza nei prodotti alimentari a base di cereali, si dovrebbero valutare anche scenari di esposizione cumulativa, derivante cioè dalla somma dei contributi derivanti dal consumo di alimenti caratteristici della dieta alimentare nazionale italiana, quali il pane, la pasta, la pizza, i biscotti, i cereali per la prima colazione, e altri prodotti come i dolci, le merendine, ecc.

## **Citrinina, zearalenone, T2-HT2 e patulina**

Le indagini condotte nel 2016 e 2017 hanno mostrato una esposizione del tutto tranquillizzante per tutte le categorie di consumatori relativamente ai prodotti alimentari comunemente interessati alla contaminazione da queste micotossine, segnatamente cereali (zearalenone, tossine T2/HT2 e citrinina) e prodotti a base di mela (patulina).

## **Alcaloidi degli ergot e tossine dell'*Alternaria***

In entrambi gli anni si è rivelata una esposizione significativa relativamente ai prodotti a base di grano e segale per la presenza degli alcaloidi dell'ergot e alla salsa di pomodoro e dei semi di girasole nel caso dell'acido tenuazonico.

## **Conclusioni**

L'andamento dei dati di contaminazione rilevabili dal database NSIS per gli anni 2016-2017 ha mostrato una situazione generale risulta sufficientemente tranquillizzante, fatta eccezione per la categoria bambini di età compresa nell'intervallo 3-9,9 anni e, in parte, adolescenti, dove si sono registrati in alcuni casi, valori di esposizione degni di approfondimento e di controllo sistematico.

In particolare, si ritiene di intensificare i controlli di:

- frutta secca ed essiccata e dei prodotti a base di mais relativamente all'aflatossina B<sub>1</sub>;
- prodotti lattiero-caseari (formaggi e latticini) per la presenza di aflatossina M<sub>1</sub>;
- caffè e integratori a base di liquirizia per la ocratossina A;
- prodotti a base di cereali (in particolare pizza, pane, cereali per la prima colazione e pasta) per la presenza del deossinivalenolo e suoi derivati;
- olio di mais per lo zearalenone.

Inoltre, al fine di migliorare la qualità dei dati di incidenza da inserire nel database NSIS, si suggerisce di orientare il campionamento sul territorio attenendosi il più possibile a quanto indicato nel Piano Nazionale di Controllo delle Micotossine, in modo tale da poter disporre di una numerosità campionaria quantitativamente significativa, univocamente individuabile e maggiormente rappresentativa.

È consigliato l'utilizzo di metodi di analisi con limiti di quantificazione più bassi possibile o quantomeno valutati utilizzando metodi di analisi concertati con il Laboratorio Nazionale di Riferimento.

In riferimento all'analisi delle incertezze legate alla valutazione dell'esposizione riportata, si rileva che il database NSIS contiene un certo grado di disomogeneità nella tipologia di prodotto campionato, nel numero di unità campionarie prelevato e nel limite di quantificazione del metodo di analisi utilizzato, pur rimanendo un utilissimo strumento di raccolta dati da destinare all'EFSA.

Si auspica, infine, la disponibilità di dati di consumo disaggregati più aggiornati in modo tale da poter valutare l'esposizione in modo più accurato.

## Bibliografia

1. Europa. Regolamento CE 178/2002 del Parlamento europeo e del Consiglio del 28 gennaio 2002 che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 31/1 del 1.2.2002.
2. Europa. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a harmonised approach for risk assessment of substances which are both genotoxic and carcinogenic. *EFSA Journal* 2005;282:1-31
3. European Food Safety Authority Autorità. *The food classification and description system FoodEx2 (revision 2)*. Parma: EFSA; 2015. (EFSA supporting publication 2015:EN-804). Disponibile all'indirizzo: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/sp.efsa.2015.EN-804>; ultima consultazione maggio 2020.
4. Leclercq C, Arcella D, Piccinelli R, Sette S, Le Donne C, Turrini A. The Italian National Food Consumption Survey INRAN-SCAI 2005–06: main results in terms of food consumption. *Public Health Nutrition* 2009;12(12):2504-32



*Serie Rapporti ISTISAN  
numero di ottobre 2020, 3° Suppl.*

*Stampato in proprio  
Servizio Comunicazione Scientifica – Istituto Superiore di Sanità*

*Roma, ottobre 2020*