

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
Scienze Veterinarie
Ciclo XXIX**

Settore Concorsuale di afferenza: 07/H4

Settore Scientifico disciplinare: VET 07

**VALUTAZIONE DELLA CONTAMINAZIONE
DA MICOTOSSINE
DI PRODOTTI ALIMENTARI
DESTINATI AL CONSUMO UMANO**

Presentata da: SARA ARMORINI

Relatore

Prof.ssa PAOLA RONCADA

Coordinatore Dottorato

Prof. ARCANGELO GENTILE

Esame finale anno 2017

1. INTRODUZIONE	2
2. LE MICOTOSSINE	4
2.1 LE AFLATOSSINE	8
2.1.1 L'AFLATOSSINA B ₁	10
2.1.2 L'AFLATOSSINA M ₁	17
2.2 LE OCRATOSSINE.....	20
2.2.1 L'OCRATOSSINA A	20
3. LEGISLAZIONE	32
4. TECNICHE ANALITICHE	37
5. SCOPO DELLA RICERCA	41
6. MATERIALI E METODI	43
6.1 FARINE E LATTE DI PRODUZIONE BIOLOGICA E CONVENZIONALE	43
6.1.2 <i>Farine</i>	44
6.1.3 <i>Latte</i>	48
6.2 LATTE D'ASINA	51
6.3 SALAMI	56
7. RISULTATI E DISCUSSIONE	60
7.1 RISULTATI DELLE ANALISI DEI CAMPIONI DI FARINA.....	60
7.2 DISCUSSIONE DEI RISULTATI DELLE ANALISI DEI CAMPIONI DI FARINA	71
7.3 RISULTATI DELLE ANALISI DEI CAMPIONI DI LATTE	75
7.4 DISCUSSIONE DEI RISULTATI DELLE ANALISI DEI CAMPIONI DI LATTE	83
7.5 RISULTATI DELLE ANALISI DEI CAMPIONI DI LATTE D'ASINA.....	85
7.6 DISCUSSIONE DEI RISULTATI DELLE ANALISI DEI CAMPIONI DI LATTE D'ASINA.....	89
7.7 RISULTATI DELLE ANALISI DEI CAMPIONI DI SALAME	91
7.8 DISCUSSIONE DEI RISULTATI DELLE ANALISI DEI CAMPIONI DI SALAME	100
8. CONCLUSIONI	102
APPENDICE I	104
APPENDICE II	119

1. INTRODUZIONE

L'attenzione della comunità scientifica verso le micotossine nasce negli anni '60, in seguito alla morte di centinaia di tacchini allevati in Inghilterra e alimentati con farina di arachidi contaminata dal fungo *Apergillus flavus* (Goldblatt, 1969; Tiecco, 2001; Turner *et al.*, 2009). Negli anni a seguire, le ricerche effettuate hanno portato all'identificazione, all'isolamento e alla caratterizzazione fisico-chimica di numerose micotossine ed oggi se ne conoscono circa 400 e quelle più studiate sono le aflatossine, l'ocratossina A, lo zearalenone, i tricoteceni, le fumonisine, la patulina, e la sterigmatocistina (Nesbitt *et al.*, 1963; Bhat *et al.*, 2010). Si tratta di metaboliti secondari tossici di alcune specie di muffe, la cui pericolosità è legata a doppio filo con la loro tossicità e il loro meccanismo d'azione. L'impatto delle micotossine sulla catena alimentare è un argomento di interesse mondiale. I consumatori percepiscono come meno pericolose le micotossine rispetto ad altri contaminanti degli alimenti come pesticidi, metalli pesanti e microrganismi. Ciò è dovuto al fatto che nei Paesi sviluppati le micotossine raramente causano intossicazioni acute che si concretizzano in emergenze sanitarie, ma più spesso seguono la via più lenta e temibile dell'accumulo, causando difficoltà in una tempestiva identificazione di intossicazione, tanto da essere spesso definite *hidden killers* (Galvano *et al.*, 2005). Le muffe produttrici di micotossine possono svilupparsi su una notevole gamma di alimenti, ad esempio cereali, caffè, cioccolato, uva, latte, carne, uova. Un gruppo eterogeneo di prodotti, indicatore della complessità del problema. L'esposizione alimentare alle micotossine rappresenta infatti un serio problema per la salute umana poiché questi metaboliti sono responsabili di intossicazioni di acuto, turbe della fertilità e dell'accrescimento, e sono dotati di potere cancerogeno, teratogeno, e immunosoppressivo. Date le condizioni ambientali favorevoli, le più alte concentrazioni di micotossine si hanno nei prodotti agricoli coltivati e stoccati nelle aree più calde del Mondo, ma considerato il commercio internazionale di questi prodotti è facile capire come le micotossine siano un problema mondiale. Una relazione del RASFF (Sistema di allerta rapido per alimenti e mangimi in ambito europeo) del 16 febbraio 2016, riporta circa 496 casi di contaminazione alimentare da micotossine notificati da tutti i Paesi europei durante il 2015. Le

micotossine sono considerate un problema non solo di tipo sanitario ma anche economico, poiché causano negli animali destinati alla produzione cali di ingestione di cibo e di fertilità. Allo scopo di tutelare la salute dei consumatori e prevenire o minimizzare i cali produttivi, la Comunità Europea (CE) ha stabilito Livelli Massimi Residuali (LMR) per molte delle micotossine presenti negli alimenti e metodi di campionamento ed analisi. Il presente progetto di ricerca nasce proprio con l'obiettivo di valutare presenza e livelli di alcune delle più importanti micotossine in vari prodotti alimentari. In particolare, l'attenzione è stata posta sulla ricerca di: A) aflatossina B₁ e aflatossina M₁ in farine e latte, rispettivamente, prodotti con metodo biologico e metodo tradizionale; B) aflatossina M₁ in latte d'asina; C) ocratossina A in salami prodotti artigianalmente.

2. LE MICOTOSSINE

Il termine *micotossina* deriva dalla fusione della parola greca *mikes*, cioè fungo, e della parola latina *toxicum*, che significa veleno (Turner *et al.*, 2009). Si tratta infatti di sostanze tossiche ubiquitarie che derivano dal metabolismo secondario di diversi generi di funghi, parassiti o saprofiti, ed in particolare da *Aspergillum*, *Penicillium*, e *Fusarium* (Zinedine *et al.*, 2017). Ad oggi le micotossine conosciute sono più di 400 e quelle più studiate risultano essere le aflatossine, l'ocratossina A, lo zearalenone, i tricoteceni, le fumonisine, la patulina, e la sterigmatocistina (Selvaray *et al.*, 2015). Una data micotossina può essere prodotta da più di una specie fungina e ciascuna specie può produrre diversi tipi di micotossine (Smith e Diaz-Llano, 2009). Cereali, frutta e vegetali possono essere contaminati dalle micotossine. I funghi produttori, in condizioni ambientali favorevoli, colonizzano le derrate alimentari e liberano tossine. La produzione di micotossine è condizionata da vari fattori: fattori intrinseci, come il livello di contaminazione ed il potenziale tossigeno del ceppo fungino produttore, ed estrinseci, tra questi temperatura, tipo di substrato, umidità, pH, presenza di O₂, presenza di vettori (Dragoni *et al.*, 2000; Delledonne, 2006). Secondo Girish *et al.* (2005), circa il 7% delle micotossine conosciute contamina gli alimenti in concentrazioni tali da risultare pericolose per la salute umana, e, secondo una stima fatta dall'EFSA (European Food Safety Authority) nel 2006, ben il 70% del mangime zootecnico è contaminato da micotossine. La contaminazione delle colture può avvenire in campo prima del raccolto, durante la fase di raccolta ed essiccazione, oppure nelle fasi di stoccaggio e trasporto (Cavaliere *et al.*, 2007; Bhat *et al.*, 2010; Marin *et al.*, 2013). Quello rappresentato dalle micotossine è un pericolo di tipo abiotico con origine biotica poiché sono solo le tossine e non i funghi produttori ad essere dannose.

Con il termine *micotossicosi* ci si riferisce alla sindrome causata dall'ingestione, dal contatto cutaneo o dall'inalazione di micotossine (Gallo *et al.*, 2015). La gravità della patologia dipende dalla tossicità della micotossina, dalla dose assunta, e dalla durata dell'esposizione, ma anche dall'età e dallo stato nutrizionale del soggetto. Le forme acute sono legate all'assunzione di un'elevata quantità di tossina in singola dose o in più dosi ripetute in un lasso di tempo ristretto (24 h). I sintomi generalmente mostrati dalle persone intossicate sono vomito, diarrea, ed altri sintomi gastroenterici

(Bhat *et al.*, 2010). Le micotossine, in particolare nei Paesi sviluppati, raramente causano intossicazioni di tipo acuto o emergenze sanitarie. Più di frequente si hanno manifestazioni morbose di tipo cronico, conseguenti all'assunzione di piccole quantità di tossine per lunghi periodi di tempo. Le micotossicosi di tipo cronico sono difficili da diagnosticare e per questo non si ha un'idea reale del livello di esposizione della popolazione a queste tossine, per questo motivo sono definite *hidden killers* (Galvano *et al.*, 2005). Le micotossine sono considerate un problema non solo di tipo sanitario ma anche economico. L'assunzione cronica di micotossine tramite mangimi contaminati causa in ambito zootecnico perdite produttive notevoli legate al calo dell'ingestione di cibo, delle rese produttive, e della fertilità negli animali (Gallo *et al.*, 2015). Le micotossine con il maggior impatto su quantità di cibo ingerito e crescita sono le aflatossine e la deossinivalenolo, che fa parte del gruppo dei tricoteceni (Andretta *et al.*, 2011). Da uno studio meta-analitico di Andretta *et al.* (2012), emerge che suini in accrescimento alimentati con diete contaminate da micotossine mostrano mediamente un calo dell'ingestione di cibo pari al 18%. Il calo La pericolosità delle micotossine è anche in funzione della loro capacità di infestare simultaneamente un prodotto (Arnau *et al.*, 2013). La compresenza di diverse micotossine in una stessa derrata alimentare può infatti definire lo scatenarsi di effetti antagonisti, sinergici o additivi caratterizzando nuove tossicità combinate, diverse dalle singole (Ibáñez-Vea *et al.*, 2012). Il rischio maggiore per l'uomo è quello cancerogeno. Molte di queste infatti hanno azione cancerogena genotossica, sono cioè capaci di interagire con il genoma, provocando mutazioni e/o aberrazioni cromosomiche che portano alla nascita di tumori. L'agenzia internazionale per la ricerca sul cancro (IARC) ha definito una suddivisione in classi per raggruppare le sostanze in base alla loro cancerogenicità (Fig. 1).

Classe di appartenenza	Identificazione del gruppo	Numero di sostanze
1	Cancerogene per l'uomo	111
2A	Probabilmente cancerogene per l'uomo	65
2B	Possibilmente cancerogene per l'uomo	274
3	Non classificabili come cancerogene per l'uomo	504
4	Probabilmente non cancerogene per l'uomo	1

Fig. 1. Classi IARC

In questa classificazione rientrano 11 micotossine: aflatossina B₁ (AFB₁), aflatossina B₂ (AFB₂), aflatossina G₁ (AFG₁), e aflatossina G₂ (AFG₂) appartenenti alla classe 1, aflatossine M₁ e M₂, fumonisine B₁ e B₂, ocratossina A, sterigmatocistina, appartenenti alla classe 2B (Tab. 1).

Gli interventi più efficaci da adottare per evitare la contaminazione fungina e, in seguito la formazione di micotossine, sono perlopiù di carattere preventivo e, nello specifico, risiedono nell'attenzione alle pratiche colturali e agli interventi di ordine genetico (Moretti *et al.*, 2006). Per prevenire o combattere la contaminazione da micotossine dei prodotti agricoli si possono attuare diverse strategie durante la fase di pre-raccolta o post-raccolta. Le strategie preventive che si attuano in campo sono finalizzate a evitare l'insorgenza di condizioni di stress per le colture, fattori predisponenti all'infestazione fungina e alla conseguente contaminazione da micotossine. Tra queste, le più importanti sono un'opportuna rotazione delle colture, la lavorazione del terreno (dissodamento, fertilizzazione), la semina nel rispetto dell'epoca, modalità e densità colturale, controllo chimico o biologico delle infestazioni, controllo di insetti e erba infestanti. Nella fase di post-raccolta, è necessario attuare misure volte a evitare la moltiplicazione fungina e la produzione di tossine. Per quanto riguarda i cereali, ad esempio, è importante stocarli avendo cura di conservare l'integrità della pianta, a basse temperature e con un contenuto d'acqua al di sotto del 13% (Jouany, 2007; Cleveland *et al.*, 2003; Shina et Bhatnagar, 1998; Jard *et al.*, 2011). Inoltre, sono state messe a punto alcune strategie mirate alla neutralizzazione delle micotossine nell'alimento al fine di proteggere gli animali dalla loro ingestione. Si tratta di aggiungere all'alimento sostanze adsorbenti, enzimi o microrganismi in grado di sequestrare o neutralizzare le micotossine (Kabak and Dobson, 2006; Murugesan *et al.*, 2015; Jouany, 2007). Allo scopo di prevenire o minimizzare i cali produttivi e tutelare la salute dei consumatori, la Comunità Europea (CE) ha stabilito Livelli Massimi Residuali (LMR) per molte delle micotossine presenti negli alimenti (Reg. CE No. 1881, 2006) e metodi di campionamento ed analisi per il loro controllo (Reg. CE No. 401, 2006).

MICOTOSSINE	SPECIE FUNGINE	EFFETTI SULLA SALUTE	GRUPPO IARC
<u>Aflatossine</u>	Aspergillus flavus, A. nomius, A. parasiticus, A. arachidicola, A. bombycis, A. pseudotamarii, A. minisclerotigenes, A. rambellii, A. ochraceoroseus	Immunosoppressione, cancerogenicità, teratogenicità, epatotossicità, mutagenicità	1,2 B
<u>Ocratossine</u>	A. ochraceus, A. alutaceus, A. alliaceus, A. niger, A. carbonarius, A. melleus, A. albertensis, A. citricus, Penicillium viridicatum, P. verrucosum, P. cyclopium, P. carbonarius	Immunosoppressione, cancerogenicità (tumori tratto urinario), teratogenicità, epatotossicità, mutagenicità, epatotossicità, nefrotossicità, inibizione della sintesi proteica	2 B
<u>Fumonisine</u>	Fusarium anthophilum, F. moniliforme, F. dlamini, F. napiforme, F. proliferatum, Alternaria alternata	Cancerogenicità (tumori epatici, renali, esofagei), epatotossicità, edema polmonare (suino), leucoencefalomalacia (cavallo)	2 B
<u>Tricoteceni</u>	Fusarium sporotrichioides, F. poae, F. culmorum, F. equiseti, F. graminearum, F. cerealis, F. moniliforme	Perdita di peso, diarrea, vomito, emorragie gastrointestinale, immunosoppressione, mutagenicità, neurotossicità	3
<u>Zearalenone</u>	F. graminearum, F. culmorum, F. crookwellense, F. equiseti, F. sporotrichioides	Infertilità, edema vulvare, prolasso vaginale ed ipertrofia mammaria nelle femmine, femminilizzazione nel maschio	2 B
<u>Patulina</u>	A. clavatus, A. longivesica, A. terreus, P. expansum, P. griseofulvum, Byssoschlamys sp	Immunosoppressione, genotossicità, teratogenicità, cancerogenicità, nausea vomito, edema cerebrale e polmonare, convulsioni, danno capillare	3

Tab. 1. Effetti sulla salute e suddivisione in classi IARC delle diverse micotossine (Catanante *et al.*, 2016)

2.1 LE AFLATOSSINE

Le aflatossine rappresentano il gruppo di micotossine più studiate (>5000 pubblicazioni scientifiche). Sono prodotte da funghi del genere *Aspergillus*, soprattutto da *A. flavus* e *A. parasiticus*, e con meno frequenza da *A. bombycis*, *A. ochraceoroseus*, *A. nomius* e *A. pseudotamari* (Turner *et al.*, 2009; Nidhina *et al.*, 2017). Il termine “aflatossina” deriva proprio dal fungo *A. Flavus*, isolato ed identificato per la prima volta nel 1961 dopo la morte di oltre 100.000 tacchini allevati in Inghilterra. Dalle ricerche effettuate, scaturì che la causa del decesso di massa era dovuta al consumo da parte degli animali di farina di arachidi contaminata da tossine prodotte da funghi (Martini, 2008; Catanante *et al.*, 2016). Sono circa 20 le micotossine facenti parte di questo gruppo, le quali possono contaminare numerosi prodotti alimentari, tra cui cereali (mais, sorgo, riso, frumento, miglio perlato), spezie (pepe nero, coriandolo, zenzero, curcuma, peperoncino), semi oleaginosi (soia, girasole, arachidi, semi di cotone), frutta a guscio (mandorle, pistacchi, noci, noci di cocco), latte, e prodotti lattiero-caseari (Bhat *et al.*, 2010). L'*A. flavus* produce l'aflatossina B₁ (AFB₁) e B₂ (AFB₂), l'*A. parasiticus* e l'*A. nomius* le aflatossine B₁, B₂, G₁ (AFG₁), G₂ (AFG₂). Le aflatossine M₁ e M₂ (M = *milk*) non vengono prodotte direttamente ma derivano dal metabolismo delle AFLB₁ e AFLB₂, rispettivamente, e possono ritrovarsi nel latte animale o umano a seguito dell'ingestione e della metabolizzazione epatica di aflatossine del gruppo B (Yao *et al.*, 2015).

Le aflatossine sono derivati difuranocumarinici con forma cristallina, solubili in solventi moderatamente polari quali cloroformio, metanolo e solfossido metilico, solubili in acqua nella misura di 10-20 mg/litro, e con punto di fusione pari a 250 °C. Lo stato cristallino conferisce loro una estrema stabilità in assenza di luce, in assenza di radiazioni UV e a temperature superiori a 100°C. Sono composti eterociclici contenenti ossigeno e un anello bisfuranico. Sono classificate in due gruppi a seconda della presenza nella struttura principale di un gruppo pentanoico (gruppo B) o di un lattone a sei atomi di carbonio (gruppo G) (Marsilio *et al.*, 1996; Tabata, 2003; EFSA, 2004; Delledonne, 2006). Presentano differenze nella struttura molecolare e sono classificate in base alle loro caratteristiche di fluorescenza alla luce ultravioletta. Le aflatossine del gruppo B hanno un

anello di ciclopentano che gli conferisce fluorescenza blu (B = *blue*), le aflatossine del gruppo G posseggono un anello lattonico e mostrano fluorescenza giallo-verde alla luce ultravioletta (G = *green*) (Catanante *et al.*, 2016). Organi target delle aflatossine sono fegato, sistema immunitario, e rene (Smith e Diaz-Llano, 1995).

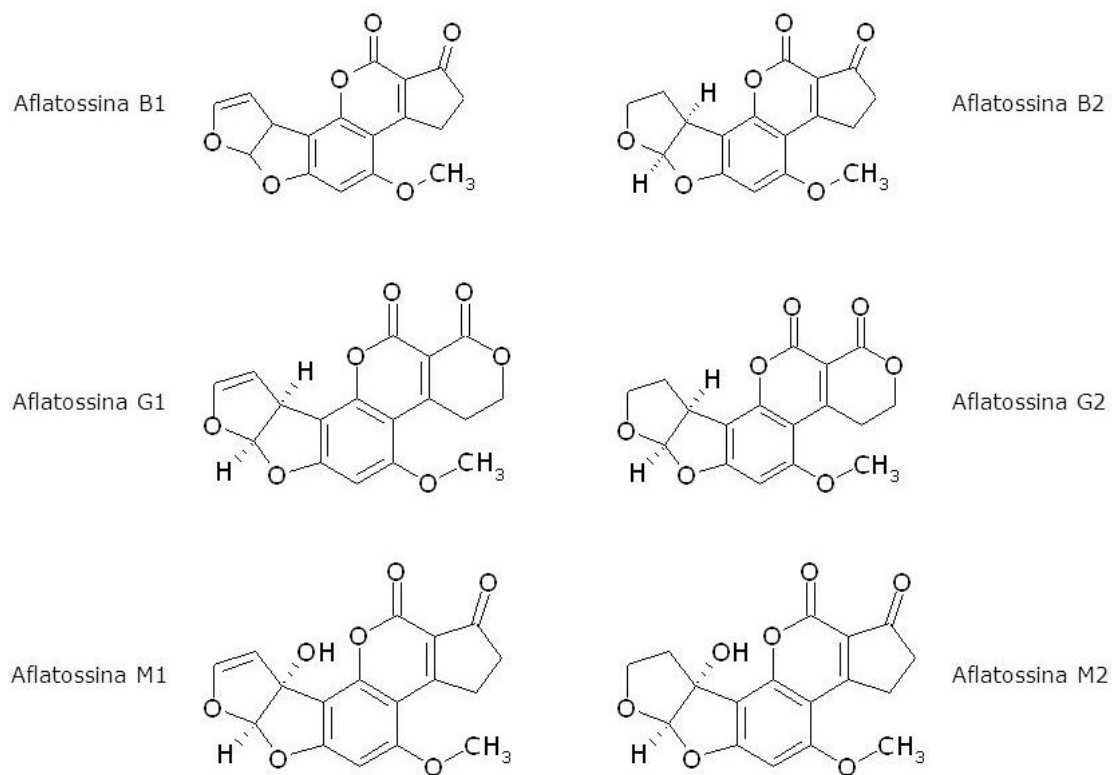


Fig. 2. Struttura chimica delle principali aflatossine

2.1.1 L'AFLATOSSINA B₁

Tossicocinetica

L'aflatossina B₁ può essere assunta dall'uomo e dagli animali per ingestione di alimenti contaminanti o per inalazione di spore fungine disperse nell'aria durante la lavorazione di granaglie e farine contaminate. Se ingerita, dato il basso peso molecolare e l'elevata lipofilicità, viene assorbita a livello duodenale grazie ad un meccanismo di diffusione passiva ed entra nel circolo sanguigno, dove si lega alle albumine, le quali fungono da trasportatori (Jouany e Diaz, 2005; Nebbia e Caloni, 2009; Gallo e Masoero, 2012). Se inalata, le sue spore raggiungono gli alveoli polmonari e possono causare la comparsa di micosi polmonari in soggetti a rischio, come gli immunodepressi, gli anziani e i bambini (Delledonne, 2006; Nebbia e Caloni, 2009). Viene metabolizzata a livello epatico attraverso reazioni di fase I e fase II. Durante le reazioni di fase I, le monossidasi a funzione mista (MFO) citocromo P450 dipendenti trasformano l'aflatossina B₁ formando i metaboliti aflatossina Q₁, P₁, B_{2a}, M₁, M₂, e aflatossicolo. Nel corso delle reazioni di fase I, si può anche formare l'aflatossina B₁ 8,9-epossido, un intermedio epossidico ad alto potere cancerogeno, e due suoi isomeri, l'endo-8,9-epossido e l'eso-8,9-epossido, capaci di reagire con il DNA e determinare effetti citotossici e cancerogeni. Le reazioni di fase 2 portano generalmente alla formazione di molecole prive di tossicità, polari ed idrosolubili, facilmente eliminabili. L'8,9-epossido può essere coniugato con glutatione ad opera dell'enzima glutatione S-transferasi (GST), formando la GS-idrossi-AFB₁, poi escreta con le urine, oppure subire una idrossilazione ad opera dell'enzima epossido idrolasi ed essere convertito in AFB₁ 8,9-diidrodiole. Quest'ultima è una molecola instabile che tende a formare, per rottura del diolo, l'AFB₁ 8,9-dialdeide, che può legarsi all'amminoacido lisina e provocare citotossicità (Allameh *et al.*, 2000; Nebbia e Caloni, 2009). Le aflatossine e i loro metaboliti sono escreti principalmente attraverso la bile, in minor misura con le urine (Masoero *et al.*, 2007; Rawal e Coulombe, 2010). Nella bile si ritrova in particolare il GS-idrossi-AFB₁, il quale può essere escreto anche attraverso le urine dopo esser stato convertito in AFB₁-Cys-Gly dall'enzima γ -glutamyl transpeptidasi (Raj e Lotlikar, 1984). I metaboliti dell'aflatossina B₁ possono anche ritrovarsi in latte, uova e sperma (Gupta, 2012). La diversa sensibilità mostrata dalle specie animali all'aflatossina B₁ dipende da due fattori, dal

grado di bioattivazione operato dal sistema enzimatico P-450 e, soprattutto, dalla conseguente detossificazione dell'intermedio reattivo AFB₁-8,9-epossido (Monson *et al.*, 2015). Come dimostrano alcuni studi su animali da laboratorio, il metabolismo e la sensibilità all'aflatossina B₁ è specie-specifica. Nel topo, gli enzimi di fase I P450 2A5, 3A11, e 3A13 sono molto attivi nel processo di bioattivazione dell'AFLB₁ e determinano la formazione di grandi quantità di AFB₁-8,9-epossido. Allo stesso tempo, l'enzima glutatione S-transferasi A3 (GSTA3) possiede una elevata affinità per l'epossido, il quale è rapidamente convertito in metaboliti non tossici, rendendo questa specie molto resistente all'azione tossica delle aflatossine (Ramsdell *et al.*, 1990; Pelkonen *et al.*, 1994; Yanagimoto *et al.*, 1997; Ilic *et al.*, 2010). I ratti, invece, possiedono enzimi epatici GST con attività 50 volte inferiore rispetto a quella dei topi nei confronti dell'epossido tossico e ciò li rende maggiormente suscettibili ai danni indotti dall' AFLB₁ (Monroe e Eaton, 1987; Imaoka *et al.*, 1992). Tra gli animali di interesse zootecnico, il pollame risulta essere tra i più sensibili all'azione tossica dell'AFLB₁ (Leason *et al.*, 1995; Rewal *et al.*, 2010). Come descritto in uno studio di Rawal e Coulombe (2010), i tacchini possiedono enzimi di fase I P4501A e P4503A particolarmente attivi nelle reazioni di epossidazione dell'AFLB₁, responsabili di una rapida e massiva formazione del B₁ 8,9-epossido. L'attività di questi enzimi e, di conseguenza la produzione dell'epossido, è inversamente proporzionale all'età, i giovani sono infatti i più sensibili (Giambrone *et al.*, 1985; Klein *et al.*; 2002). A contribuire alla sensibilità mostrata dai tacchini sono gli enzimi epatici GSTA. Questi infatti non possiedono attività di coniugazione del AFB₁-8,9-epossido e ciò comporta un accumulo nell'organismo del metabolita tossico (Kim *et al.*, 2011). Per quanto riguarda i suini, non sono ancora del tutto chiari i processi metabolici ai quali va incontro l'AFLB₁. Da un recente studio effettuato *in vitro* è emerso che ad operare la bioattivazione dell'AFLB₁ sarebbe principalmente l'isoforma CYP3A29 del gruppo enzimatico CYP3A del citocromo epatico P450 (Wu *et al.*, 2016). I ruminanti invece sono considerati tra le specie di interesse zootecnico meno sensibili all'azione tossica dell'AFLB₁. Questo perché la microflora ruminale e le particelle alimentari degradano, disattivano e/o legano le molecole tossiche favorendone l'eliminazione (Gallo *et al.*, 2015). La quota di AFB₁ che viene biotrasformata a livello ruminale varia a seconda della specie considerata, dello stato di salute del soggetto e del tipo di dieta (Jiang *et al.*, 2012). Secondo Upadhaya *et al.* (2009),

la degradazione ruminale dell'AFLB₁ è maggiore nelle capre che nei bovini. I suini sono una delle specie maggiormente suscettibili alle micotossicosi di origine alimentare. Nell'uomo, la bioattivazione dell'AFLB₁ avviene principalmente ad opera degli enzimi P450 1A2 e 3A4 (Guengerich *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 2016). Nonostante la produzione di AFLB₁-8,9-epossido sia minore rispetto a quella che si ha nei roditori, la sensibilità della specie umana alle aflatossicosi è maggiore rispetto a quella di topi e ratti (Ramsdell e Eaton, 1990). Questo perché l'uomo possiede un sistema enzimatico deputato alla detossificazione poco attivo nei confronti dell'epossido. È stato visto infatti che l'attività del GST epatico umano è circa 3000 volte inferiore rispetto a quella del topo (Slone *et al.*, 1995).

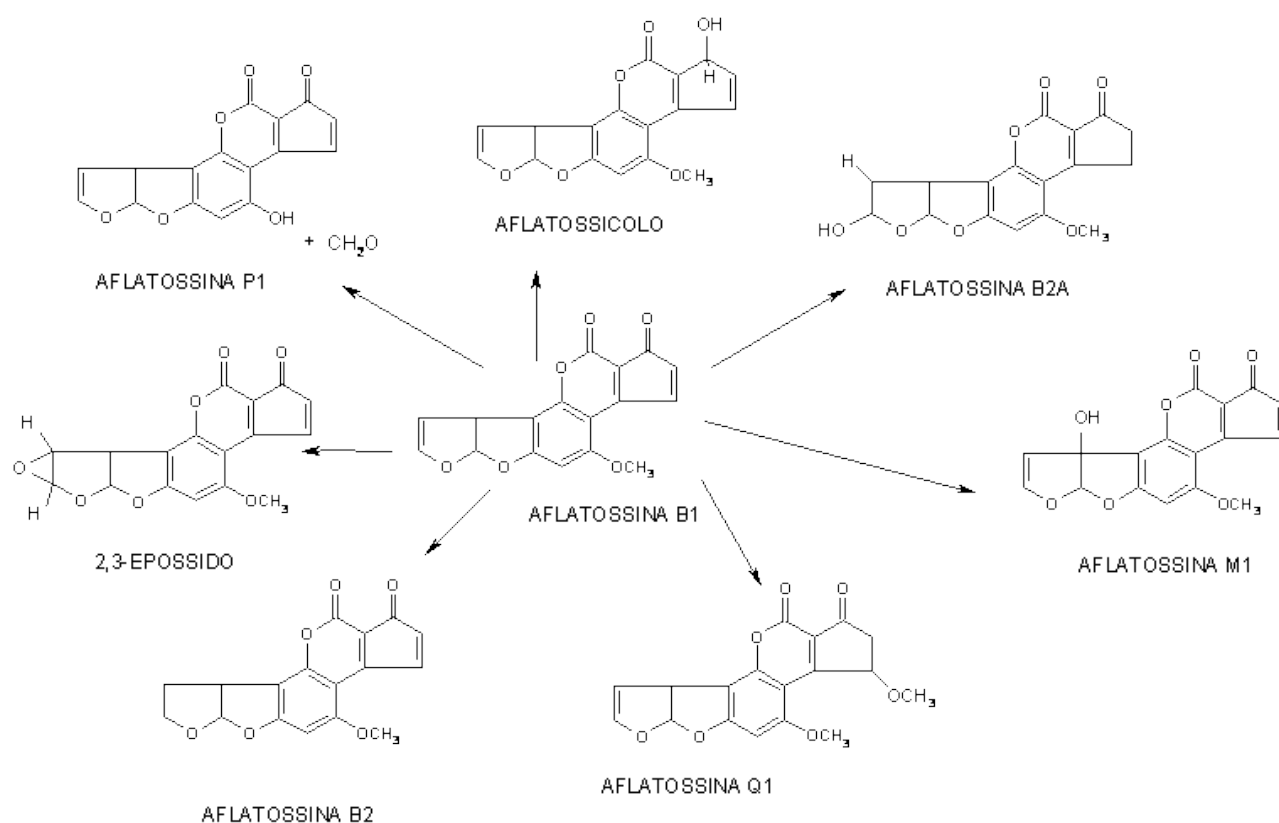


Fig. 3. Metaboliti dall'AFLB₁ che si formano durante le reazioni di fase I e fase II a livello epatico

Tossicità

Per aflatossicosi si intende la patologia causata dall'assunzione di aflatossine che può manifestarsi in forma acuta o cronica. L'assunzione di aflatossine avviene primariamente attraverso l'ingestione

di alimenti o mangimi contaminati, ma è possibile, anche se meno frequente, quella per via inalatoria. Oluwafemi *et al.* (2012), riporta infatti aflatossicosi occupazionali dovute all'inalazione di spore fungine di *Aspergillus*. Sia per l'uomo che per gli animali il rischio maggiore di danni da aflatossine è legato all'ingestione di basse o moderate quantità di micotossine che portano a deficit nutrizionali, immunitari e allo sviluppo di forme cancerose (Womack *et al.*, 2016). L'AFB₁ è la più diffusa e tossica e, al pari delle altre aflatossine, ha come principale organo bersaglio il fegato (Giray *et al.*, 2007). Altri organi target delle aflatossine sono il sistema immunitario e il rene (Smith e Diaz-Llano, 1995). Le tossicosi acute si caratterizzano per la comparsa di lesioni necrotiche ed emorragiche principalmente a livello epatico, e, nei casi più gravi, per la morte del soggetto in tempi relativamente brevi (Iqbal *et al.*, 2015). A dosi elevate, ci può anche essere un coinvolgimento di altri distretti, come quello cardiocircolatorio, urinario, e riproduttivo (Bhat *et al.*, 2010). Nell'uomo l'intossicazione acuta è generalmente conseguente all'assunzione di cereali contaminati (mais, riso, arachidi) o loro prodotti derivati e i sintomi riportati sono soprattutto gastroenterici (EFSA, 2007). L'AFB₁ è considerata il più potente cancerogeno epatico presente in natura (Mc Kean *et al.*, 2006). È stata infatti inserita nel Gruppo 1 dalla IARC (IARC, 2008). La sua azione tossica è dovuta al fatto che a livello epatico viene metabolizzata ad opera del citocromo P450 e si ha la formazione del metabolita AFB₁-8,9-epossido in grado di formare un legame covalente, irreversibile, con i siti reattivi dell'acido desossiribonucleico, e, di conseguenza, bloccare la trascrizione da parte della RNA-polimerasi DNA-dipendente (Fig. 4). Tra le specie animali, la più sensibile agli effetti dell'aflatossina B₁ si è dimostrata essere la trota, per la quale lesioni cancerose a livello epatico compaiono, nel giro di 5 giorni, con l'assunzione di una dieta contenente 0,004 ppm di tossina (Pompa, 1994). Anche i suini sono particolarmente sensibili alle micotossine. Southern e Clawson (1987) hanno effettuato uno studio sperimentale in cui ai suini è stato somministrato aflatossina a 4 diverse concentrazioni (0.02, 0.385, 0.75 e 1.48 mg/kg di mangime). Già alla dose di 0,385mg/kg, gli animali mostravano un calo sulla resa giornaliera. Con la somministrazione della dose più alta (1.48 mg/kg) i suini mostravano una notevole perdita di peso e all'esame istologico lesioni epatocellulari. I ruminanti invece mostrano una maggior resistenza all'azione tossica dell'AFB₁ grazie all'azione della microflora ruminale e delle particelle alimentari che degradano,

disattivano e/o legano le molecole tossiche (Gallo *et al.*, 2015). Per quanto riguarda l'uomo, ogni anno a livello mondiale si registrano 0.55-0.60 milioni di tumori epatici e di questi circa 0.025-0.15 sono attribuibili alle aflatossine (Ismail *et al.*, 2015). Le aflatossine svolgono un ruolo sinergico con il virus HBV o virus dell'epatite B nella formazione di carcinomi epatocellulari. Infatti la presenza di entrambi in un soggetto aumenta la percentuale di rischio di sviluppare tale patologia del 60 % (IARC, 2002; Delledonne, 2006). Alla base del meccanismo patogenetico che porta allo sviluppo della forma tumorale, ci sarebbe una mutazione nel codone 249 del gene soppressore del tumore TP53, come dimostrano studi sperimentali ed epidemiologici (Jackson *et al.*, 2001; Stern *et al.*, 2001). Nei bambini affetti da aflatossicosi si possono sviluppare malattie molto gravi come la *Sindrome di Reye* e la *Kwashiorkor*. La prima è una patologia caratterizzata da encefalopatia acuta e degenerazione grassa delle viscere, la seconda dall'insorgenza di quadri di epatite, immunosoppressione e proteinemia (IARC, 2002; Cabras e Martelli, 2004; EFSA, 2007; Roggi e Turcani, 2009).

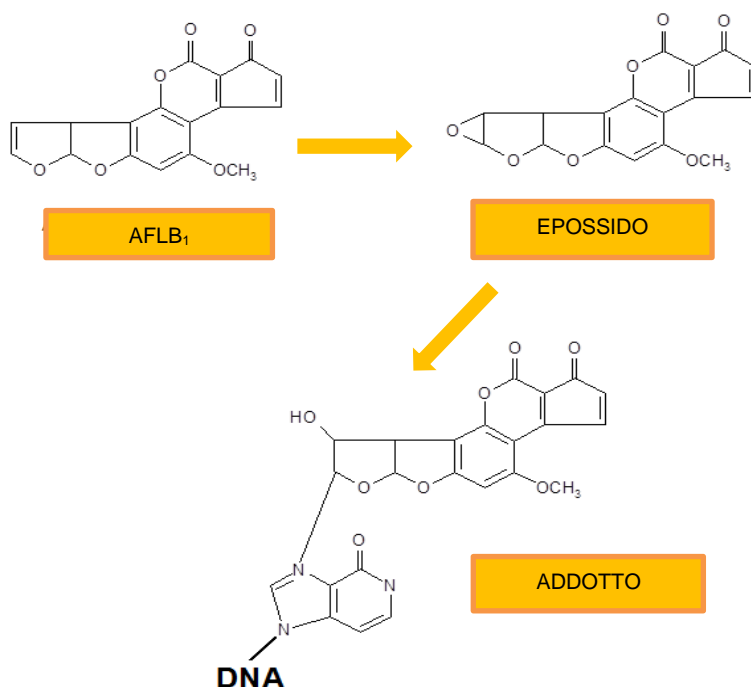


Fig. 4. Formazione dell'eossido dell'AFLB₁ e legame al DNA

L'aflatossina B₁ negli alimenti destinati all'uomo

L'AFB₁ è stata ritrovata in molti prodotti alimentari, ma quelli con livelli di contaminazione maggiore risultano essere cereali, arachidi, semi di cotone, e noci (IARC, 2012). Secondo un rapporto FAO (Food and Agriculture Organisation) pubblicato nel 2015, la produzione mondiale di cereali ha raggiunto negli ultimi anni 2,532 miliardi di tonnellate. I cereali e i loro prodotti derivati, come farine, pane, e pasta, sono consumati da milioni di persone a livello mondiale e sono considerati, dal punto di vista nutrizionale, la principale fonte di carboidrati per l'uomo e per gli animali da produzione. I cereali possono essere facilmente colonizzati da muffe produttrici di micotossine, in quanto il loro substrato fornisce ottime condizioni di crescita per i funghi, in campo, dopo la raccolta e durante lo stoccaggio. Tra i cereali, il mais è quello che più frequente è contaminato da micotossine, in particolare da aflatossine, mentre riso, sorgo, frumento, e orzo sono meno suscettibili (Galvano *et al.*, 2005). I funghi, che persistono nel suolo sotto forma di ascospore e macroconidi, possono attaccare i cereali durante la coltivazione (Fig. 5) o lo stoccaggio in ambienti con temperatura superiore a 15°C e superficie umida per 48-60 ore. Sembra infatti che il più alto contenuto di micotossine nei cereali sia associato ad abbondanti piogge nelle fasi ultime di accrescimento e nel periodo immediatamente precedente la raccolta (Haouet & Altissimi, 2003; Jard *et al.*, 2011). Secondo quanto riportato in uno studio di Piro e Biancardi del 2010, le condizioni ambientali che favoriscono la produzione fungina di aflatossine sono: A) temperatura tra i 25 e 28 °C; B) elevata umidità sia del substrato che dell'ambiente circostante; C) Water activity (Aw) > 0,83; presenza di ossigeno; D) pH acidi, che favoriscono la produzione di B1 e B2, e pH neutri o tendenti all'alcalino, che incentivano la formazione di G1 e G2; E) quantità di carboidrati del substrato, i quali favoriscono la moltiplicazione fungina e la produzione di aflatossine; F) presenza di vettori, cioè di insetti che, passando da una coltura contaminata ad un'altra, favoriscono la diffusione delle muffe tra derrate. Le strategie di prevenzione della contaminazione da micotossine si basano proprio sull'evitare o ridurre la colonizzazione e la proliferazione dei funghi sulle colture. Bisogna scegliere semi esenti da parassiti e malattie, così da garantire una pianta sana e più resistente agli attacchi fungini durante la crescita. Nella fase di coltivazione è importante evitare le infestazioni da insetti, la cui attività metabolica tende a far aumentare la temperatura e l'umidità della pianta, rendendo

l'endosperma più facilmente attaccabile dalle muffe. Inoltre, il materiale fecale degli insetti arricchisce i substrati favorendo la moltiplicazione fungina. Ad esempio, la Piralide del mais (*Ostrinia nubilalis*) è un insetto capace di infestare un considerevole numero di piante erbacee e di favorire la penetrazione e la crescita di funghi del genere *Fusarium* e *Aspergillus* (Dragoni *et al.*, 1997; Park *et al.*, 1999). Durante lo stoccaggio è fondamentale ridurre il più possibile il contenuto d'acqua della pianta, creare un ambiente di conservazione con concentrazione di ossigeno molto bassa (<1%) ed evitare danni ai cereali (Kebak *et al.*, 2006; Driehuis e Oude-Elferink, 2000).



Fig. 5. Mais colonizzato da muffe durante la coltivazione (www.assomais.it)

2.1.2 L'AFLATOSSINA M₁

Tossicocinetica

L'aflatossina M₁ si forma a livello epatico mediante idrossilazione dell'AFLB₁ ad opera degli enzimi del citocromo P450 (Haouet & Altissimi, 2003). AFLM₁ può essere poi coniugata con l'acido glucuronico ed escreta con la bile, oppure entrare nel circolo sistemico ed essere eliminata attraverso le urine o il latte (Jouany e Diaz, 2005). Nelle bovine, la micotossina si ritrova nel latte già nelle 12 ore successive all'assunzione di AFLB₁, con un picco a 24 ore (Diaz *et al.*, 2004). Altrettanto velocemente l'AFLM₁ viene eliminata. A 4 giorni dal termine della somministrazione di AFLB₁ non è infatti possibile rilevare il metabolita nel latte. Secondo Smith e Korosteleva (2010), nelle bovine in lattazione la percentuale di AFLM₁ che viene trasferita nel latte varia dall'1% al 6% della quantità di AFLB₁ ingerita con l'alimento. Vari fattori nutrizionali e fisiologici possono influire sull'entità del trasferimento, tra questi regime alimentare, quantità di cibo ingerito, stato di salute, capacità di biotrasformazione epatica, e livello di produzione lattea (Ismail *et al.*, 2016). È stato dimostrato infatti che il passaggio di AFLM₁ nel latte è 3,3-3,5 volte maggiore all'inizio della lattazione rispetto alla fase di lattazione avanzata (Succi *et al.*, 2001). La quota di AFLB₁ che viene convertita in M₁ varia notevolmente ed è compresa nel range 0.3-6.2% (Var e Kebak; 2009). Il passaggio dell'AFLM₁ nel latte è possibile anche nella donna. Alcuni studi hanno infatti dimostrato la presenza di livelli apprezzabili di AFM₁ nel cordone ombelicale e nel sangue materno di giovani donne in Africa, Australia, Cina, Thailandia, Turchia (El Nezami *et al.*, 1995; Galvano *et al.* 1996; Keskin *et al.*, 2009).

Tossicità

L'AFM₁ può determinare quadri di tossicità acuta o cronica. Dopo esser stata assorbita a livello di piccolo intestino, arriva al fegato dove esplica la sua principale attività tossica (Prandini *et al.*, 2009). Le aflatossicosi acute da AFM₁ sono state individuate come causa di ittero, malnutrizione, e maggior predisposizione alle malattie infettive nei bambini. Come dimostrano studi effettuati *in vitro*,

AFLM₁ è citotossica e può causare danni al DNA, mutazioni genetiche, anomalie cromosomiche e trasformazioni cellulari nei mammiferi, con lo stesso meccanismo patogenetico dell'AFB₁ (Banes *et al.*, 1970; Lafont *et al.*, 1989; IARC, 2012). Nonostante sia considerata dalla IARC 10 volte meno tossica rispetto al suo composto progenitore, è comunque oggetto di preoccupazione per la salute umana, in particolare se si considerano quelle fasce di popolazione più deboli dal punto di vista immunitario e metabolico, come i bambini e gli anziani (Ismail *et al.*, 2015). Inoltre, l'AFM₁ non necessita di esser attivata a livello epatico, come l'AFB₁, e ciò la rende potenzialmente più pericolosa.

L'aflatossina M1 negli alimenti destinati all'uomo

La contaminazione da parte dell'AFLM₁ di latte e prodotti lattiero-caseari può avvenire per

- A. contaminazione indiretta (o *carry-over*): l'AFB₁ assunta tramite mangimi contaminati viene convertita a livello epatico in AFM₁ e quest'ultima passa nel latte;
- B. contaminazione diretta: la contaminazione dei prodotti lattiero-caseari può avvenire ad opera di funghi (colture starter) lasciati intenzionalmente crescere sul prodotto al fine di fermentarlo oppure di funghi che accidentalmente lo hanno colonizzato (Prandini *et al.*, 2009).

Grazie all'elevata affinità con le proteine del latte, in particolare le caseine, la concentrazione di AFLM₁ risulta maggiore nei formaggi rispetto a quella presente nel latte dai quali sono ottenuti (Ismail *et al.*, 2016). L'AFLM₁ è termo-resistente, per questo non viene completamente inattivata durante i processi di pastorizzazione e stoccaggio del latte, e durante i processi di trasformazione dei prodotti lattiero-caseari (Assem *et al.*, 2011). L'unico modo efficace per ridurre il rischio di contaminazione del latte è prevenire o ridurre la contaminazione da AFB₁ delle materie prime e dei mangimi (Diaz e Espitia, 2006; Prandini *et al.*, 2009; Rahimi *et al.*, 2010).

Il latte

Stando ai dati pubblicati da Eurostat e dallo FAO nel 2015, la produzione totale di latte nei 28 Stati Membri dell'Unione Europea è pari a 165 milioni di tonnellate e rappresenta il 25% della produzione

globale. Francia e Germania sono i principali produttori (40% della produzione totale europea), seguiti da Regno Unito (10%), Paesi Bassi (8%), e Italia (7%). Una elevata percentuale del latte prodotto (92%) è destinato ad aziende lattiero-casearie per essere trasformato. La maggior parte del latte destinato al consumo umano è prodotto da bovine (96,8%), la restante quota da pecore, capre, bufale, cammelli, equini, ed asine (Eurostat, 2015; FAO Stat, 2015). Il livello di contaminazione da AFM₁ del latte può variare in relazione a numerosi fattori, tra questi area geografica, stagione, condizioni ambientali, tipologia di allevamento, e tipo di alimento assunto dagli animali, con particolare riferimento alla quantità di foraggio verde e di mangimi concentrati (Tajkarimi *et al.*, 2008; Dashti *et al.*, 2009; Pei *et al.*, 2009; Xiong *et al.*, 2013). Secondo Dashti *et al.* (2009), la maggior incidenza di livelli elevati di contaminazione da AFM₁ nei mesi invernali sarebbe dovuta al fatto i foraggi sono conservati per periodi più lunghi, e ciò può portare all'instaurarsi di condizioni favorevoli alla crescita fungina.

Il latte d'asina

Il latte d'asina è un alimento consumato fin dai tempi antichi. In epoca Romana, infatti, venivano prodotti formaggi di latte d'asina. Alla fine del IX secolo, in Francia il latte d'asina veniva impiegato per nutrire bambini rimasti orfani (D'Arval, 1992). Oggi, viene utilizzato come alimento alternativo per neonati e bambini intolleranti alle proteine del latte bovino, e come componente della dieta di soggetti anziani allo scopo di stimolarne la ripresa della funzione immunitaria (Salimei e Fantuz, 2012). Nonostante l'interesse dei consumatori verso questo prodotto sia in aumento ed esso stia assumendo sempre più importanza e considerazione a livello mondiale, il latte d'asina resta ancora oggi un alimento di nicchia, prodotto su piccola scala e con valore commerciale molto alto (Jirillo *et al.*, 2010). Le razze asinine maggiormente usate in Italia per la produzione di latte sono la Ragusana e la Martina Franca. L'alimentazione è basata su foraggio e, allo scopo di aumentare la produzione latte, su prodotti altamente energetici come i cereali, i quali rappresentano una possibile fonte di AFB₁ (Tozzi *et al.*, 2016).

2.2 LE OCRATOSSINE

Le ocratossine sono prodotte da funghi appartenenti ai generi *Aspergillum* e *Penicillium* e prevalentemente da *Aspergillum ochraceus* nelle aree tropicali e *Penicillium verrucosum* nelle regioni con clima temperato (Smith e Diaz-Llano, 2009). Questo gruppo comprende l'ocratossina A (OTA), il suo estere metilico, il suo estere etilico, anche conosciuto come ocratossina C (OTC), la 4-idrossiocratossina A (4-OH OTA), l'ocratossina B (OTB) e i suoi esteri, e l'ocratossina α (OT α) (metabolita inattivo dell'OTA). Tra queste, l'OTA è la più tossica e diffusa. Fu isolata per la prima volta nel 1965 da una coltura di *Aspergillus ochraceus* e nello stesso anno van der Merwe e coll. la descrissero in un articolo scientifico pubblicato su *Nature*. Da un punto di vista strutturale, è un pentachetide e presenta una metà diidrocumarinica ciclica, molto stabile, legata ad un residuo di L- β -fenilalanina. Si presenta sotto forma cristallina, incolore, è solubile nei solventi organici polari e poco solubile in acqua (Cole *et al.*, 2003). L'OTA è un acido organico debole e possiede una intensa fluorescenza verde se viene esposta a raggi UV in un mezzo acido, fluorescenza blu in un mezzo alcalino (Bredenkamp *et al.*, 1989).

2.2.1 L'OCRATOSSINA A

L'ocratossina A è un composto tossico rapidamente assorbito dall'organismo e, al contrario, eliminato molto lentamente, ragione per cui tende ad accumularsi in uomo ed animali. A seguito dell'ingestione di alimenti contaminati, l'OTA viene assorbita per diffusione passiva a livello gastrico e, soprattutto, a livello duodenale. La quota di OTA assorbita varia in base alle specie considerata, nei suini si aggira attorno al 66% della quantità assunta, nei ratti e nei conigli al 56%, nei conigli al 40%. Arrivata in circolo si lega per oltre il 99% alle proteine plasmatiche, in particolare alle albumine, e si distribuisce in vari distretti corporei, accumulandosi a livello ematico, epatico e renale. Studi effettuati su animali da laboratorio hanno dimostrato che parte dell'OTA assunta entra nel circolo enteroepatico (Kumagai e Aibara, 1982; Roth *et al.*, 1988; Sreemannarayana *et al.*,

1988). L'OTA viene poi idrossilata, per distacco di un legame peptidico, formando il metabolita meno tossico OT α . In uno studio effettuato su tessuti omogenati di ratti, Suzuky *et al.* (1977) hanno dimostrato che la maggior attività di idrolisi è posseduta da pancreas, ileo e duodeno, al contrario è scarsa a livello epatico e renale. In uno studio di qualche anno dopo, eseguito sempre su ratti grazie all'ausilio di OTA marcata con ^{14}C , è stata confermata l'ipotesi che l'idrolisi dell'OTA avvenga principalmente a livello intestinale e sia scarsa negli altri distretti corporei (Galtier *et al.*, 1979). In altre ricerche effettuate su animali da laboratorio, è stato visto che la microflora cecale possiede un'elevata capacità di idrolizzare l'OTA (Galtier, 1991; Galtier e Alvinerie, 1976). Analogamente a quanto accade nei roditori a livello intestinale, nei ruminanti l'OTA è degradata dai protozoi presenti nel rumine, e ciò rende questa specie particolarmente resistente all'azione tossica dell'OTA. Nei ruminanti la capacità di idrolizzare la micotossina è influenzata dal tipo di dieta. È infatti direttamente proporzionale alla quota di amido in essa contenuta: all'aumentare dell'amido contenuto nell'alimento corrisponde l'incremento della popolazione protozoaria e, di conseguenza, la quota di OTA convertita in metaboliti non tossici (Kiessling *et al.*, 1984; Xiao *et al.*, 1991; Muller *et al.*, 1998). Grazie all'azione di vari citocromi P450, una quota dell'OTA assunta viene idrolizzata a livello di fegato e rene con formazione dei metaboliti (4R)- e (4S)- 4idrossiocratossina A (Marquardt e Frohlich, 1992). Come dimostrano alcuni studi *in vitro*, questi metaboliti sono prodotti in diverse specie a livello epatico (uomo, suino, capra, pollo, e ratto), ma anche dalle cellule epiteliali del tessuto bronchiale umano (Størmer *et al.*, 1981; Pinelli *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2015). Altro tipo di reazione enzimatica alla quale l'OTA ed i suoi metaboliti sono sottoposti è la glucuronazione. Studi *in vivo* ed *in vitro* effettuati su topi e ratti hanno dimostrato che tale reazione avviene a livello di microsomi epatici e che i principali metaboliti che ne derivano si ritrovano soprattutto nella bile, mentre solo in piccola parte sono presenti a livello intestinale ed epatico (Han *et al.*, 2013; Roth *et al.*, 1988). Anche nel suino i coniugati glucuronidi sono stati ritrovati principalmente nella bile (Kuhn *et al.*, 1995). L'eliminazione della micotossina e dei suoi metaboliti avviene principalmente per via urinaria e fecale, mentre una piccola parte è eliminata attraverso il latte (Ringot *et al.*, 2006; Galtier *et al.*, 1981). Dato il suo elevato legame alle proteine plasmatiche, il riassorbimento a livello glomerulare è scarso e la micotossina è eliminata e riassorbita in maggior parte a livello tubulare. IL

riassorbimento dell'OTA filtrata avviene in tutti i segmenti del nefrone e ciò ne ritarda l'escrezione, favorendone l'accumulo a livello renale e la tossicità (Ringot *et al.*, 2006). Sia l'OTA che il suo metabolita OT α sono escreti nelle feci. In uno studio effettuato sulle capre, si è visto che a seguito di una singola somministrazione di OTA alla dose di 0.5 mg/kg il 53% della tossina era eliminato con le feci (Nip e Chu, 1979; Kumagai e Aibara, 1982; Roth *et al.*, 1988).

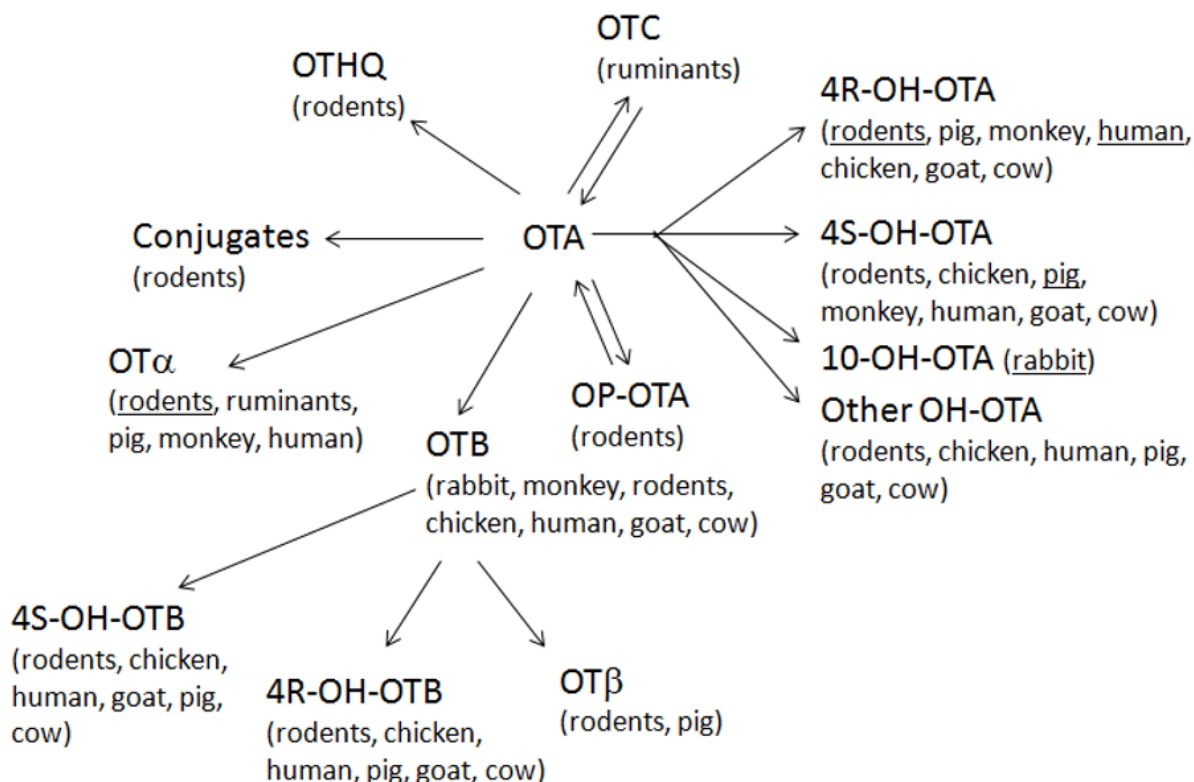


Fig. 6. Metaboliti dell'OTA che possono formarsi in uomo e animali (Heussner *et al.*, 2015)

Tossicità

L'OTA è una micotossina nefrotossica, epatotossica, neurotossica, teratogena, immunosoppressiva, e cancerogena per l'uomo e per numerose specie animali. Il suo principale organo bersaglio è il rene, dove le lesioni si localizzano principalmente a livello di epitelio del tubulo prossimale (Mally *et al.*, 2005). La sua assunzione può determinare intossicazioni di tipo acuto caratterizzate dalla comparsa di anoressia, perdita di peso, poliuria, polidipsia, disidratazione, e, nei casi più gravi, morte. Come altre micotossine, OTA è più spesso causa di una tossicità di tipo

cronico, dovuta all'assunzione protratta nel tempo di modeste quantità di micotossina. La tossicità cronica di OTA si manifesta con effetti cancerogeni, genotossici, teratogeni ed immunosoppressivi (Khoury e Atoui, 2010). La sua azione tossica si ha principalmente a carico del rene, ma anche altri organi, come fegato e sistema immunitario, ne sono colpiti (Coronel *et al.*, 2010; Smith e Diaz-Llano, 2009). Come dimostrano alcuni studi effettuati in animali da laboratorio, le neoplasie renali sono quelle che più frequentemente si riscontrano in caso di esposizione ad OTA (Kanisawa, 1984; Bendele *et al.*, 1985; National Toxicology Program, 1989). Boorman *et al.* (1992) hanno valutato la tossicità cronica e gli effetti cancerogeni di OTA in ratti ai quali è stato somministrato olio di mais contaminato. I soggetti testati hanno presentato la comparsa di adenomi e carcinomi renali, originati a livello del segmento retto del tubulo prossimale, caratterizzati da rapida insorgenza, aggressività, e tendenza alle metastasi. Se da un lato si è ormai certi che OTA sia dotato di potere cancerogeno, dall'altra il meccanismo della sua azione tossica e cancerogena non è ancora ben chiaro. Sembra ormai superata l'ipotesi che OTA possa esercitare un'azione di tipo genotossico, in grado di determinare la formazione di metaboliti reattivi e di addotti del DNA (Pfohl-Leszkowicz, 1991; Castegnaro e Dirheimer, 1998). Infatti, studi effettuati con l'ausilio di OTA radiomarcata associata al conteggio in scintillazione liquida o alla spettrometria di massa hanno dimostrato chiaramente che OTA non forma addotti covalenti con il DNA (Schlatter *et al.*, 1996; Gautier *et al.*, 2001; Gross-Steinmeyer *et al.*, 2002; Mally *et al.*, 2004). Nel 2006 anche il gruppo di esperti scientifici sui contaminanti nella catena alimentare dell'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA) ha espresso il proprio parere a riguardo, concludendo che non c'è evidenza scientifica che OTA agisca come reattivo del DNA causando una mutazione genetica responsabile della comparsa delle forme tumorali. Ricerche svolte negli anni a seguire hanno posto l'attenzione su altri possibili meccanismi d'azione della micotossina. Secondo Marin-Kuan *et al.* (2008), alla base dell'azione cancerogena di OTA ci sarebbero vari meccanismi epigenetici, tra cui lo stress ossidativo e l'interferenza con specifiche vie di trasduzione dei segnali cellulari. Czakai *et al.*, in uno studio del 2011, affermano che OTA non interferisce solo con la mitosi, ma inibisce diversi enzimi coinvolti in vari processi di regolazione cellulare, tra cui l'espressione dei geni. Gli effetti dell'azione tossica di OTA variano oltre che in base alla dose e al tempo di esposizione (Krogh & Elling, 1977; Elling, 1979; Elling,

1983; Elling *et al.*, 1985; Meisner & Krogh, 1986; FAO/WHO, 2001), anche in relazione a specie e sesso considerati (Walker & Larsen, 2005). Tra le specie di interesse veterinario, i monogastrici risultano essere i più sensibili alla sua azione tossica. In particolare, cani e maiali (LD₅₀ 0.2 e 1 mg/kg p. v., rispettivamente) sono i più suscettibili alla tossicità acuta di OTA, seguiti da ratti (LD₅₀ 20-30 mg/kg p.v.) e topi (LD₅₀ 46-58 mg/kg p.v.) (Walker e Larsen, 2005; Mally e Dekant, 2009). Per quanto riguarda gli effetti a lungo termine, maiali ai quali è stata somministrata per 90 giorni una quantità di OTA pari a 8 µg/kg p.v. hanno presentato un calo della funzionalità renale, mentre soggetti alimentati per periodi più lunghi con diete contaminate hanno sviluppato una nefropatia caratterizzata da degenerazione ed atrofia dei tubuli prossimali e fibrosi interstiziale (Krogh *et al.*, 1976; Krogh *et al.*, 1979; Stoev *et al.*, 2002). I ruminanti, al contrario, sono tra i più resistenti agli effetti tossici dell'OTA e ciò è dovuto al fatto che gran parte della micotossina assunta viene convertita in OTA α, metabolita non tossico. Somministrazioni protratte nel tempo hanno comunque degli effetti in questi animali. È stato infatti dimostrato che somministrando a bovini adulti per 4 settimane 0.05 mg/kg di OTA si ha abbattimento, diminuzione dell'incremento ponderale, disidratazione, e poliuria (Haouet & Altissimi, 2003). L'azione cancerogena dell'OTA non è però limitata ai reni. Studi effettuati su topi hanno mostrato che, a seguito di somministrazione orale, la micotossina provoca la formazione non solo di tumori renali, ma anche epatocellulari, e di epatomi maligni ed iperplasie epatiche nodulari (Huff *et al.*, 1991; Kanisawa & Suzuki, 1978).

L'OTA possiede anche azione neurotossica ed immunosoppressiva. Belmadani *et al.* (1998) riportano che, a seguito di una somministrazione durata 8 giorni di 289 µg/kg/giorno di ocratossina A, i ratti testati presentavano lesioni a livello di mesencefalo ventrale, ippocampo, corpo striato e cervelletto. I danni al sistema nervoso centrale risultano esser ancora più gravi se la micotossina viene assunta nel periodo di gestazione (Pfohl-Leszkowicz e Castegnaro, 1999). Per quanto riguarda l'immunosensibilità, OTA è in grado di inibire la risposta umorale e cellulo-mediata, determinando così il calo della produzione di linfociti B e T periferici e il blocco della produzione di interleuchina 2 e dei suoi recettori (Lea *et al.*, 1989; Stoev *et al.*, 2000). L'OTA interferisce anche con l'attività dei linfociti NK (*Natural Killer*) e con la produzione di interferone (Pfohl-Leszkowicz e Castegnaro, 1999). Da alcune ricerche svolte, è emerso che, se assunta ad alte dosi per tempi

relativamente lunghi, determina decremento dei livelli plasmatici di immunoglobuline, necrosi di tessuto linfoide, deplezione degli organi linfoidei centrali e ridotta chemiotassi (Muller *et al.*, 1995; Cabassi *et al.*, 2006).

Gli effetti teratogeni dell'OTA sono stati dimostrati in diverse specie animali (Malir *et al.*, 2014). Ciò che più frequentemente si osserva è riduzione di peso alla nascita e deformazioni cranio-facciali (Patil *et al.*, 2006). La maggior parte dei dati ottenuti deriva da studi condotti su ratti in gestazione, nei quali la micotossina è stata somministrata per via intraperitoneale o sottocutanea (Hayes *et al.*, 1974; Gilani *et al.*, 1978; Mayura *et al.*, 1982; Wei and Sulik, 1993). Il suo meccanismo d'azione non è stato ancora del tutto chiarito. Ciò che ad oggi è noto è che la sua azione citotossica a livello di cellule nervose non è selettiva, OTA agisce infatti allo stesso modo nei confronti di neuroni o astrociti (Wilk-Zasadna e Minta, 2009). I ruminanti, conosciuti per la loro naturale resistenza alla micotossina, non mostrano invece effetti sul feto anche a seguito dell'esposizione ad alte dosi di OTA durante la gestazione (Munro *et al.*, 1973).

La nefropatia endemica dei Balcani

Oltre ad essere stato riconosciuto il possibile ruolo di OTA nella comparsa di nefropatie e tumori uroteliali nell'uomo, è stata anche ipotizzata una sua possibile implicazione nella eziopatogenesi della Nefropatia Endemica dei Balcani o BEN (*Balkan Endemic Nephropathy*). A suggerire ciò, le caratteristiche simili che la BEN condivide con le nefropatie indotte da OTA che si hanno nei suini. La BEN è una malattia cronica a carico dei reni ad eziologia sconosciuta, prevalentemente diffusa in alcune aree rurali di Bulgaria, Bosnia, Croazia e Romania. La patologia si caratterizza per la ristretta localizzazione geografica, per il fatto di colpire prevalentemente famiglie agricole, e per l'elevata mortalità conseguente alla progressiva atrofia renale e all'uremia (Fuchs e Peraica, 2005; Mally 2007). I sintomi clinici che comunemente compaiono in corso di BEN sono anemia, affaticabilità, anoressia, poliuria, e proteinuria (Austwick, 1981). Studi condotti nell'area endemica della patologia al fine di valutare i livelli di OTA nel sangue di soggetti affetti da BEN e negli alimenti fonte di esposizione alla micotossina, non hanno fornito dati utili a stabilire se davvero esiste una

correlazione tra sviluppo della malattia e assunzione di determinati cibi per tempi relativamente lunghi (Kuiper-Gooman e Scott; 1989). I dati forniti da diverse ricerche svolte nell'arco degli ultimi trent'anni suggeriscono però che i pazienti affetti da patologie renali o urinarie presentano livelli plasmatici di OTA più alti rispetto a soggetti sani (Hult *et al.*, 1982; Radic *et al.*, 1997; Castegnaro *et al.*, 2006; Breitholtz-Emanuelsson, 1994; Ozcelik *et al.*, 2001). Ad oggi, quindi, il ruolo eziologico di OTA nello sviluppo della BEN non ancora stato chiarito.

L'ocratossina A negli alimenti destinati all'uomo

La presenza di OTA si riscontra in genere in tutti i tipi di cereali e prodotti derivati, ma anche in caffè, cacao, uva, soia, spezie, legumi, noci, liquirizia e birra (Streit *et al.*, 2012; Bellver Soto *et al.*, 2014; European Community, 2002; Haighton *et al.*, 2012). Secondo la Comunità Europea (2002), l'esposizione umana all'OTA è legata in gran parte all'assunzione di cereali (44%), seguita da quella di vino (10%), caffè (9%), birra (7%), cacao (5%), frutta secca (4%), carne (3%), e spezie (3%). È stato stimato che in Europa l'esposizione alimentare all'OTA di un adulto è pari a 15-60 ng/kg p.v. per settimana (EFSA, 2006; Mally, 2012). Condizioni ambientali favorevoli allo sviluppo dei funghi e alla produzione di micotossine nelle derrate alimentari sono un tenore di umidità almeno del 15-17% e temperature comprese fra i 4 e i 37 °C (Haouet & Altissimi, 2003). La pericolosità dell'OTA deriva dalla sua grande stabilità, si dimostra infatti fortemente resistente alle alte temperature ed anche ad ambienti fortemente acidi, questo fa sì che una volta contaminato, un alimento, sia difficilmente separabile dal composto tossico. La sua resistenza è dimostrata dalla sola parziale distruzione subita sia alle normali temperature di cottura (Müller, 1984) sia a ben tre ore di sterilizzazione con vapore saturo a 121 °C (Trivedi *et al.*, 1992). L'OTA possiede una spiccata affinità per le proteine, in particolare per le albumine sieriche. Tale caratteristica ne favorisce l'accumulo a livello di sistema vascolare, fegato, muscolo, e tessuto adiposo. I prodotti di origine animale contribuiscono quindi all'assunzione di OTA da parte dell'uomo. La sua presenza si riscontra in muscolo, frattaglie, latte e uova, ma i livelli più alti si registrano in prodotti carnei trasformati come salumi, sanguinacci, paté, e salsicce (Duarte *et al.*, 2012; Perši *et al.*, 2014). Oltre a questa contaminazione di tipo indiretto, che

avviene per ingestione da parte degli animali di mangimi naturalmente contaminati e successivo passaggio ed accumulo di OTA nei tessuti (*carry over*), è possibile una contaminazione di tipo diretto legata alla crescita di muffe produttrici di OTA sulla superficie dei prodotti carnei durante la stagionatura o all'aggiunta di spezie contaminate durante la fase di lavorazione del prodotto (Gareis, 1996; Pietri *et al.*, 2006). Tra gli animali da produzione, il rischio è limitato alle specie monogastriche poiché i ruminanti sono in grado di idrolizzare il legame ammidico dell'OTA formando un composto non tossico che è l'OTA α (Bertuzzi *et al.*, 2013). In particolare, i suini risultano essere quelli più sensibili all'accumulo di OTA, la quale si deposita a livello tissutale seguendo il modello rene>fegato>muscolo>grasso (Peršič *et al.*, 2014). In considerazione di ciò, la Commissione delle Comunità Europee consiglia un valore guida di OTA che non superi i 0.05 mg/kg nei mangimi complementari e completi destinati ai suini (Bertuzzi *et al.*, 2013).

I salami

Si definisce *salame* quel prodotto carneo derivato dalla fermentazione lattica di carne cruda salata, alla quale viene aggiunto grasso, tritato o a cubetti, varie spezie, nitriti e/o nitrati, prima di essere insaccata in budelli che possono essere naturali o sintetici (Fongaro *et al.*, 2015). La carne utilizzata è più spesso quella suina, ma esistono anche varianti create con carni di altre specie sia di allevamento che di selvaggina. I salami prodotti con carne diversa da quella suina devono per legge riportare in etichetta il riferimento alla carne utilizzata. A differenza della componente carnea, il grasso impiegato è sempre di origine suina, data la sua peculiare attitudine alla trasformazione. Il salame è un tipico prodotto italiano che presenta differenze nella ricetta di preparazione, o in parte di essa, in relazione al territorio di produzione. Ogni regione italiana produce specifiche tipologie di salame che si differenziano per il tipo di carne impiegata, il metodo di taglio e preparazione sia del taglio magro che del grasso, il rapporto tra le due componenti, la salatura, l'aggiunta di spezie, il tipo di budello, la dimensione del prodotto finito, e il metodo di stagionatura. Per valorizzare e salvaguardare tali differenze, spesso legate a tradizioni locali, i produttori e/o gli enti locali si sono organizzati in Consorzi di tutela dei loro prodotti ottenendo riconoscimenti sul territorio nazionale e

comunitario come il marchio DOP (Denominazione di Origine Protetta) e IGP (Indicazione Geografica Protetta). La parte della carcassa suina generalmente utilizzata nella trasformazione dei salami corrisponde ai muscoli della spalla, al cosiddetto magro da banco (la porzione posta tra spalla e carré) e spesso a rifilature magre di altre lavorazioni, come il prosciutto. Il rapporto fra carne e grasso è un parametro che designerà in maniera preponderante tutto l'aspetto esteriore e qualitativo del salame. A volte può essere sufficiente il grasso presente nella parte muscolare impiegata per la preparazione di un impasto adeguato, ma in altri casi, si può ricorrere a un'integrazione con grasso proveniente o da rifilature di pancette o da punti specifici come il dorso o la gola. Il grasso proveniente da dorso e gola è considerato essere il più idoneo alla lavorazione perché presenta livelli di saturazione elevati che permetteranno in lavorazione di evitare problemi di scioglimento causati dalla triturazione (Grazia *et al.*, 2011). Altro ingrediente presente nell'impasto è il sale. Viene impiegato cloruro di sodio sotto forma di sale fine in quantità compresa fra il 2,5% e il 4%. Il sale ha molteplici funzioni, fra queste quella di determinare la selezione di batteri virtuosi alotolleranti, come micrococchi e batteri lattici, di favorire la precipitazione delle proteine che porta alla formazione di vari composti azotati, come peptidi e amminoacidi liberi, fondamentali nella determinazione delle caratteristiche organolettiche tipiche al prodotto (Cocolin *et al.*, 2009; Zanardi *et al.*, 2010). L'aggiunta di zuccheri nell'impasto ha lo scopo di rendere più intensa la fermentazione lattica operata prima dai micrococchi e successivamente dai batteri lattici, portando così il pH del salame intorno a 5 e prevenendo così lo sviluppo di batteri alteranti. Si tratta di una pratica antica, infatti in passato veniva aggiunto miele all'impasto carneo per favorire l'acidificazione. Si utilizzano in genere glucosio (0,2-0,4%), saccarosio (0,2-0,4%), o lattosio (1-2%). Nitriti e nitrati sono composti chimici aggiunti al prodotto per la loro azione conservante ed antiossidante, ma anche per conferirgli il tipico aroma e colore. Questi, aggiunti sotto forma di sali di sodio e di potassio, inibiscono la crescita di batteri sporigeni anaerobi, come il *Clostridium botulinum*, e di altri come la *Listeria monocytogenes* (Tompkin, 2005). Inoltre, contribuiscono alla stabilizzazione del colore del prodotto formando con la mioglobina la nitrosomioglobina. Se da un lato svolgono tutte queste funzioni vantaggiose, dall'altro sono però responsabili della formazione di composti organici cancerogeni come le N-nitrosamine. In considerazione di ciò, la legislazione vigente consente

un'aggiunta massima di 250 mg/kg per i nitrati e 150 mg/kg per i nitriti (D. Min. Sanità No 209, 27/02/1996). La grande varietà di salami prodotti sul territorio italiano presenta importanti differenze per quanto riguarda tipo e quantità di spezie utilizzate. Queste sono aggiunte all'impasto allo scopo di migliorare le caratteristiche del prodotto finito, rendendolo più serbevole e migliorandone aroma e sapore. Nelle regioni del Nord Italia sono maggiormente impiegate spezie come pepe, finocchio e aglio, mentre al Sud è più comune l'uso di peperoncino e paprica. Alcuni salami calabresi, ad esempio, si caratterizzano per l'elevata presenza di peperoncino piccante (Zambonelli *et al.*, 1992).

Le fermentazioni batteriche sono fondamentali per il processo produttivo dei salami perché permettono di garantirne la conservabilità, la sicurezza e le tipiche caratteristiche organolettiche. Queste avvengono ad opera di batteri virtuosi presenti nell'impasto che si moltiplicano prendendo il sopravvento su quelli alteranti e tossigeni. Si tratta o di microflora autoctona, naturalmente presente nel prodotto proveniente dall'ambiente e dagli animali, o di colture batteriche starter, aggiunte intenzionalmente. Quest'ultime sono messe in commercio sotto forma di preparati liofilizzati da aggiungere all'impasto e il loro impiego è regolamentato dal Decreto Ministeriale del 28/12/1994. I batteri utilizzati sono micrococchi e stafilococchi aerobi i quali consumano l'ossigeno presente e creano così un ambiente anaerobio adatto alla moltiplicazione di batteri lattici che subentrano ai micrococchi e utilizzano come substrato metabolico lo zucchero presente nell'impasto dando luogo alla fermentazione lattica fondamentale per ottenere un prodotto finito con determinate caratteristiche. I micrococchi e gli stafilococchi appartenengono alle specie *Kocuria kristinae* e *Staphilococcus xylosus*, i lattobacilli a *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus* e *Lactobacillus casei* (Francesca *et al.*, 2013). L'impiego di colture starter è in genere consigliato data l'imprevedibilità delle fermentazioni derivanti da una carica microbica numericamente sconosciuta ma molti salami sono oggi ancora prodotti con tecniche tradizionali che non ne prevedono l'utilizzo e ciò determina un vasto range di prodotti con diverso sapore, consistenza e qualità microbiologica (Coppola *et al.*, 2000 and Zambonelli *et al.*, 1992). I salami sono definiti prodotti "insaccati" poiché l'impasto è inserito in contenitori, chiamati budelli, i quali possono essere naturali o sintetici. Il budello naturale è rappresentato dall'intestino di diversi animali, tra cui suini, bovini, equini e ovini. Per alcuni disciplinari di produzione di salami DOP ed

IGP è previsto l'uso esclusivo budelli naturali. Valida alternativa a questa tipologia di budelli, sono quelli sintetici. Sono costituiti o da fibre animali, ottenute da pelli opportunamente trattate, o da fibre vegetali, ricavate dalla lavorazione del cotone. Funzioni fondamentali del budello sono: conferire l'aspetto tipico al prodotto finito e influenzare il processo di stagionatura regolandone le condizioni di temperatura e gli scambi di umidità fra impasto ed esterno (Grazia *et al.*, 2011).

I salami calabresi

Secondo i disciplinari di produzione, i quattro "Salumi di Calabria DOP", Soppresata, Capocollo, Salsiccia e Pancetta, devono essere ottenuti dalla lavorazione di carni di suini nati nel territorio delle regioni: Calabria, Basilicata, Sicilia, Puglia e Campania e allevati nella regione Calabria dall'età massima di quattro mesi. Macellazione e lavorazione delle carni devono aver luogo nel territorio calabrese. I suini devono essere di peso medio non superiore a 140 kg, di età non inferiore agli otto mesi, e devono presentare le caratteristiche proprie del suino pesante italiano. Le razze che possono essere impiegate sono la Calabrese, la Large White e la Landrace Italiana, inoltre suini figli di verri della razza Duroc, e suini figli di verri di altre razze o di verri ibridi purché tali verri, nati in Italia o all'estero, provengano da schemi di selezione o incrocio attuati con finalità non incompatibili con quelle del Libro Genealogico Italiano per la produzione del suino pesante. Sono invece esclusi suini di razza Landrance Belga, Hampshire, Pietrain e Spot. I suini devono inoltre presentare il marchio di qualità "suino allevato in Calabria" e rispettare le prescrizioni per quanto concerne razze, alimentazione e tecniche di allevamento. I mangimi per l'alimentazione dei suini devono essere mangimi composti integrati di orzo, favino, mais, ghiande, soia, ceci, in misura non inferiore al 50% del contenuto. Non viene consentito l'uso nell'alimentazione di manioca e patate e di sottoprodotti che potrebbero conferire alle carni ed al grasso sapori e odori sgradevoli. Per avere carni più compatte per l'ingrasso è vietata l'alimentazione a brodo al fine di ottenere carni di maggiore compattezza e quindi più facili da trasformare.

Nella preparazione dell'impasto, viene ammesso l'impiego di soli ingredienti naturali quali sale (cloruro di sodio), pepe nero in grani o in polvere, pepe rosso piccante, pepe rosso dolce, crema di

peperoni, vino ed aromi naturali. Possono essere inoltre impiegati caseinato, acido ascorbico e/o sale sodico, lattato di sodio, nitrato di sodio e/o di potassio, nitrito di sodio e/o di potassio.

I salami siciliani

Il salame S. Angelo è uno dei prodotti della tradizione culinaria del comune di Sant'Angelo di Brolo, situato sui Monti Nebrodi, in provincia di Messina. Secondo il disciplinare di produzione, le materie prime ammesse per la sua produzione sono rappresentate da carni fresche di suini di razza Large White, Landrace, Duroc, o animali derivati da incroci fra le suddette razze, e razze autoctone come il Suino Nero dei Nebrodi, utilizzato in purezza o incrociato con le razze menzionate (www.agraria.org). Il Suino Nero dei Nebrodi (o Nero Siciliano) è un'animale rustico dal mantello di colore nero. Viene allevato principalmente all'aperto e alimentato con orzo, favino, e mangimi commerciali. La lavorazione, l'asciugatura e la stagionatura del salame S. Angelo devono avvenire in locali ben distinti, con un periodo minimo di stagionatura che non è mai inferiore ai 30 giorni e varia dai 2 ai 4 mesi in funzione della pezzatura e delle caratteristiche fisico-chimiche e merceologiche (Barberis *et al.*, 1990; D'Aquino, 2008). Nel 2008 ha ricevuto il riconoscimento comunitario del marchio IGP (CE, 2008). Marchio che identifica un prodotto originario di una regione e di un paese le cui qualità, ricetta e caratteristiche si possano ricondurre all'origine geografica, di cui almeno una fase della produzione e/o trasformazione e/o elaborazione avvenga nell'area delimitata (Grazia *et al.*, 2011).

3. LEGISLAZIONE

La normativa in materia di micotossine negli alimenti è stata armonizzata a livello comunitario. Il primo regolamento relativo ai limiti massimi di residui per diversi contaminanti nei prodotti alimentari ad essere emanato è stato il Regolamento (CE) n. 466/2001. Questo è stato poi modificato dai regolamenti (CE) n.472/2002, 683/2004 e 123/2005. Nel 2006, è stato abrogato unitamente alle sue modifiche ed è stato sostituito dal Regolamento (CE) n. 1881/2006. Sue modifiche sono: il Regolamento (CE) n.105/2010 e il Regolamento (CE) n. 594/2012, che riguardano l'OTA, ed il Regolamento (UE) N. 165/2010, che riguarda le aflatossine. Per quanto riguarda gli alimenti destinati al consumo animale, si fa riferimento al Decreto Legislativo 149/2004. Il controllo del rispetto di queste condizioni è responsabilità dell'Autorità competente, con metodi di campionamento e analisi di controlli ufficiali definiti dal Regolamento (CE) n. 401/2006. Merita di essere citato il Regolamento (CE) n. 178/2002, che per primo ha stabilito i principi ed i requisiti generali della legislazione alimentare. Rappresenta una pietra miliare nell'ambito della sicurezza alimentare poiché disciplina tutte le fasi della produzione, della trasformazione e della distribuzione degli alimenti e dei mangimi. Inoltre, è con questo Regolamento che nasce l'EFSA (*European Food Safety Authority*) ed il RASFF (*Rapid Alert System for Food and Feed*). L'EFSA fornisce consulenza scientifica e consente alla Commissione europea, al Parlamento europeo e agli Stati membri dell'UE di prendere decisioni in materia di gestione del rischio, esistenti ed emergenti, associati alla catena alimentare (www.efsa.europa.eu). Il RASFF, il sistema di allarme rapido per gli alimenti e i mangimi, è una procedura comunitaria codificata creata allo scopo di garantire uno scambio rapido tra i soggetti membri del sistema di informazioni relative al rischio diretto o indiretto per la salute umana dovuto agli alimenti, ai materiali a contatto con gli alimenti o ai mangimi, oltre che sulle misure e sulle azioni adottate o da adottare per fare fronte a tali rischi (www.rivistadirittoalimentare.it).

Prodotti alimentari ⁽¹⁾ : AFLATOSSINE	Tenori massimi (µg/kg o ppb)		
	B ₁	Somma di B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂	M ₁
Arachidi e altri semi oleosi ⁽⁴⁰⁾ da sottoporre a cernita o ad altro trattamento fisico prima del consumo umano o dell'impiego quale ingrediente di prodotti alimentari (ad eccezione delle arachidi e degli altri semi oleosi da sottoporre a pressatura per la produzione di oli vegetali raffinati)	8,0 ⁽⁵⁾	15,0 ⁽⁵⁾	-
Arachidi e altri semi oleosi ⁽⁴⁰⁾ e relativi prodotti di trasformazione, destinati al consumo umano diretto o all'impiego quali ingredienti di prodotti alimentari, ad eccezione degli oli vegetali crudi destinati alla raffinazione e degli oli vegetali raffinati	2,0 ⁽⁵⁾	4,0 ⁽⁵⁾	-
Arachidi, frutta a guscio e relativi prodotti di trasformazione, destinati al consumo umano diretto o all'impiego quali ingredienti di prodotti alimentari	2,0 ⁽⁵⁾	4,0 ⁽⁵⁾	-
Frutta secca da sottoporre a cernita o ad altro trattamento fisico prima del consumo umano o dell'impiego quale ingrediente di prodotti alimentari	5,0	10,0	-
Frutta secca e relativi prodotti di trasformazione, destinati al consumo umano diretto o all'impiego quale ingrediente di prodotti alimentari	2,0	4,0	-
Mandorle, pistacchi e semi di albicocca da sottoporre a cernita o ad altro trattamento fisico prima del consumo umano o dell'impiego quale ingrediente di prodotti alimentari	12,0	15,0 ⁽⁵⁾	-
Nocciole e noci del Brasile da sottoporre a cernita o ad altro trattamento fisico prima del consumo umano o dell'impiego quale ingrediente di prodotti alimentari	8,0 ⁽⁵⁾	15,0 ⁽⁵⁾	-
Mandorle, pistacchi e semi di albicocca destinati al consumo umano diretto o all'impiego quale ingrediente di prodotti alimentari ⁽⁴¹⁾	8,0 ⁽⁵⁾	10,0 ⁽⁵⁾	-
Nocciole e noci del Brasile destinate al consumo umano diretto o all'impiego quale ingrediente di prodotti alimentari ⁽⁴¹⁾	5,0 ⁽⁵⁾	10,0 ⁽⁵⁾	-
Frutta a guscio (diversa da mandorle, pistacchi, semi di albicocca, nocciole e noci del Brasile, destinati al consumo umano diretto o dell'impiego quale ingrediente di prodotti alimentari) e relativi prodotti di trasformazione, destinati al consumo umano diretto o all'impiego quali ingredienti di prodotti alimentari	2,0 ⁽⁵⁾	4,0 ⁽⁵⁾	-
Frutta a guscio (diversa da mandorle, pistacchi, semi di albicocca e noci del Brasile da sottoporre a cernita o ad altro trattamento fisico prima del consumo umano o dell'impiego quale ingrediente di prodotti alimentari) da sottoporre a cernita o ad altro trattamento fisico prima del consumo umano o dell'impiego quale ingrediente di prodotti alimentari	5,0 ⁽⁵⁾	10,0 ⁽⁵⁾	-

Tutti i cereali e loro prodotti derivati, compresi i prodotti trasformati a base di cereali (eccetto: granturco e riso da sottoporre a cernita o ad altro trattamento fisico prima del consumo umano o dell'impiego quale ingrediente di prodotti alimentari; alimenti a base di cereali e altri alimenti destinati ai lattanti e ai bambini; alimenti dietetici a fini medici speciali destinati specificatamente ai lattanti)	2,0	4,0	-
Granturco da sottoporre a cernita o ad altro trattamento fisico prima del consumo umano o dell'impiego quale ingrediente di prodotti alimentari	5,0	10,0	-
Latte crudo ⁽⁶⁾ , latte trattato termicamente e latte destinato alla fabbricazione di prodotti a base di latte	-	-	0,05
Le seguenti specie di spezie: <i>Capsicum spp.</i> (frutti secchi dello stesso, interi o macinati, compresi peperoncini rossi, peperoncino rosso in polvere, pepe di Caienna e paprica); <i>Piper spp.</i> (frutti dello stesso, compreso il pepe bianco e nero); <i>Myristica fragrans</i> (noce moscata); <i>Zingiber officinale</i> (zenzero); <i>Curcuma longa</i> (curcuma). Miscele di spezie contenenti una o più delle suddette spezie	5,0	10,0	-
Alimenti a base di cereali e altri alimenti destinati ai lattanti e ai bambini ^{(3) (7)}	0,1	-	-
Alimenti per lattanti e alimenti di proseguimento, compresi il latte per lattanti e il latte di proseguimento ^{(4) (8)}	-	-	0,025
Alimenti dietetici a fini medici speciali ^{(9) (10)} , destinati specificatamente ai lattanti	0,1	-	0,025
<p>(1) Per gli ortaggi, la frutta e i cereali, si rimanda ai prodotti alimentari elencati nelle categorie di appartenenza secondo le definizioni di cui al regolamento (CE) n. 396/2005 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 23 febbraio 2005, concernente i livelli massimi di residui di antiparassitari nei o sui prodotti alimentari e mangimi di origine vegetale e animale e che modifica la direttiva 91/414/CEE del Consiglio (GU L 70 del 16.3.2005, p.1), modificato da ultimo dal regolamento (CE) n. 178/2006 (GU L 29 del 2.2.2006, p.3). Ciò significa tra l'altro che il grano saraceno (<i>Fagopyrum spp.</i>) è compreso tra i <<cereali>> e i prodotti a base di grano saraceno sono compresi tra i <<prodotti a base di cereali>>.</p>			
<p>(3) Per i prodotti alimentari indicati in questa categoria, si rimanda alla definizione di cui alla direttiva 96/5/CE della Commissione, del 16 febbraio 1996, sugli alimenti a base di cereali e gli altri alimenti destinati ai lattanti e ai bambini (GU L 49 del 28.2.1996, p.17), modificata da ultimo dalla direttiva 2003/13/CE (GU L 41 del 14.2.2003, p.33).</p>			
<p>(4) I tenori massimi di riferimento ai prodotti pronti all'uso (commercializzati come tali o ricostituiti secondo le istruzioni del fabbricante).</p>			
<p>Segue tabella 2.3</p>			
<p>(5) I tenori massimi si riferiscono alla parte commestibile delle arachidi e della frutta a guscio. Se le arachidi e i frutti a guscio vengono analizzati interi, nel calcolo del tenore di aflatossine si suppone che tutta la contaminazione sia nella parte commestibile, tranne nel caso delle noci del Brasile.</p>			
<p>(6) Per i prodotti alimentari indicati in questa categoria si rimanda alla definizione di cui al regolamento (CE) n. 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 29 aprile 2004, che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale (GU L 226 del 25.6.2004, p.22).</p>			
<p>(7) I tenori massimi si riferiscono alla materia secca, che è definita conformemente al regolamento (CE) n. 401/2006.</p>			
<p>(8) Per i prodotti alimentari indicati in questa categoria si rimanda alla definizione di cui alla direttiva 91/321/CEE della Commissione, del 14 maggio 1991, sugli alimenti per lattanti e alimenti di proseguimento (GU L 175 del 4.7.1991, p.35) modificata da ultimo dalla direttiva 2003/14/CE (GU L 41 del 14.2.2003, p.37).</p>			

<p>(9) Per i prodotti alimentari elencati in questa categoria si rimanda alla definizione di cui alla direttiva 1999/21/CE della Commissione, del 25 marzo 1999, sugli alimenti dietetici destinati a fini medici speciali (GU L 91 del 7.4.1999, p.29).</p>
<p>(10) I tenori massimi si riferiscono, nel caso del latte e dei prodotti lattiero-caseari, ai prodotti pronti per il consumo (commercializzati come tali o ricostituiti secondo le istruzioni del produttore), mentre nel caso dei prodotti diversi dal latte e dai prodotti lattiero-caseari si riferiscono alla materia secca. La materia secca è definita conformemente al regolamento (CE) n. 401/2006.</p>
<p>(40) Semi oleosi di cui ai codici NC 1201, 1202, 1203, 1204, 1205, 1206, 1207 e prodotti derivati di cui al codice NC 1208; i semi di melone rientrano nel codice ex 1207 99.</p>
<p>(41) Nel caso in cui i relativi prodotti derivati/di trasformazione siano derivati/trasformati esclusivamente o quasi esclusivamente a partire dalla frutta a guscio in questione, i tenori massimi definiti per la corrispondente frutta a guscio si applicano anche ai prodotti derivati/di trasformazione. Negli altri casi si applica ai prodotti derivati/di trasformazione l'articolo 2, paragrafo 1 e 2 del regolamento (CE) n.1881/2006.</p>

Tab. 2. Tenori massimi di aflatossine definiti nei prodotti alimentari dal Reg (CE) n. 1881/2006 e le successive modifiche apportate dal Reg (UE) n. 165/2010

<p align="center">PRODOTTO ALIMENTARE</p>	<p align="center">Tenori massimi di OTA (µg/kg)</p>
Cerali non trasformati	5
Tutti i prodotti derivati dai cereali non trasformati, compresi i prodotti trasformati a base di cereali ed i cereali destinati al consumo umano diretto (eccetto: alimenti a base di cereali e altri alimenti destinati ai lattanti e ai bambini e alimenti dietetici a fini medici speciali destinati specificatamente ai lattanti)	3
Uve secche (uva passa di Corinto, uva passa, uva sultanina)	10
Caffè torrefatto in grani e caffè torrefatto macinato, escluso il caffè solubile	5
Caffè solubile (istantaneo)	10
Vini (compreso il vino spumante ed esclusi i vini liquorosi e i vini con un titolo alcolometrico non inferiore al 15% vol) e i vini di frutta	2
Vini aromatizzati, bevande aromatizzate a base di vino e cocktail aromatizzati riprodotti vitivinicoli	2
Succo d'uva, succo d'uva concentrato ricostituito, nettare d'uva, mosto d'uva e mosto d'uva concentrato ricostituito, destinati al consumo umano diretto	2
Alimenti a base di cereali e altri alimenti destinati ai lattanti e ai bambini	0,5
Alimenti dietetici a fini medici speciali, destinati specificatamente ai lattanti	0,5
Spezie: Capsicum spp.(suoi frutti secchi, interi o macinati, tra cui peperoncini, peperoncini in polvere, pepe di Caienna e paprika); Piper spp.(suoi frutti, compreso il pepe bianco e nero); Myristica fragrans (noce moscata); Zingiber officinale (zenzero) e Curcuma longa (curcuma). Miscele di spezie contenenti una o più delle suddette	15
Liquirizia (Glycyrrhiza glabra, Glycyrrhiza gonfia e altre specie). Radice di liquirizia, ingrediente per infusioni a base di erbe	20
Liquirizia (Glycyrrhiza glabra, Glycyrrhiza gonfia e altre specie). Estratto di liquirizia, usato nei prodotti alimentari, soprattutto nelle bevande e nella confetteria.	80
Glutine di frumento non venduto direttamente ai consumatori	8

Tabella 3: Regolamento (CE) 1881/2006 e modifiche apportate dal Regolamento (CE) 594/2012

4. TECNICHE ANALITICHE

Per determinare presenza e livelli delle micotossine negli alimenti sono necessari metodi analitici in grado di quantificare contaminanti a bassissime concentrazioni e in un numero svariato di matrici (Dall'Asta *et al.*, 2006).

Le fasi che generalmente caratterizzano i metodi di analisi per la determinazione di micotossine negli alimenti sono:

- A. estrazione;
- B. purificazione o *clean-up*;
- C. rivelazione mediante tecnica strumentale.

Fase preliminare è il campionamento. Ogni qual volta si eseguono analisi su matrici, questo passaggio è di fondamentale importanza poiché, se eseguito correttamente, permette di ottenere un campione rappresentativo dell'intero materiale. Questo concetto assume ancora più valore per le micotossine a causa della loro distribuzione eterogenea all'intero degli alimenti (Whitaker *et al.*, 1991; Rahmani *et al.*, 2009).

L'estrazione in fase liquida dell'analita dall'alimento ne permette la distribuzione omogenea in un solvente (Cast, 2003). Nel caso di campioni solidi, quali per esempio i cereali, le micotossine vengono estratte dal campione con solventi polari (Rahmani *et al.*, 2009). La scelta del solvente deve rappresentare sempre il giusto compromesso tra compatibilità del sistema analitico, volatilità, stabilità, trasparenza ai raggi UV e impatto ambientale (Rahmani *et al.*, 2009). Nell'estrazione delle aflatossine vengono normalmente impiegate soluzioni di solventi organici polari, come metanolo, acetone o acetonitrile e acqua, che nel caso dei cereali, idrata le cellule e ne facilita l'estrazione (Steyn *et al.*, 1991).

La fase di estrazione è seguita da quella di *clean-up*, un passaggio di isolamento, purificazione e concentrazione dell'eventuale tossina presente nel campione. Questa ha lo scopo di eliminare, o comunque ridurre, gli interferenti della matrice che potrebbero alterare i risultati dell'analisi (Turner *et al.*, 2009).

Le colonnine di immunoaffinità (IAC – *Immuno Affinity Column*) sono oggi la metodica di elezione nelle analisi di micotossine negli alimenti (Senyuva & Gilbert, 2010). Si tratta di una tecnica che prevede l'utilizzo di colonnine, piccoli tubi di plastica a forma di siringa, contenenti un supporto chimico inerte (il gel di agarosio) sul quale sono immobilizzati opportuni anticorpi monoclonali o policlonali capaci di trattenere selettivamente la micotossina di interesse (Turner *et al.*, 2009). Nel caso di matrici liquide, il campione viene fatto fluire direttamente, attraverso la colonnina (Senyuva & Gilbert, 2010). Durante questo passaggio, condotto ad una determinata velocità, la tossina, separandosi dal resto delle sostanze presenti nella matrice di campionamento, crea un legame con gli anticorpi della colonna. Dopo un lavaggio con acqua, allo scopo di eliminare le sostanze estranee dalla colonna, l'aflatossina legata agli anticorpi viene fatta fluire con un solvente polare che determina la rottura del legame antigene-anticorpo. Il vantaggio di questo metodo di analisi risiede nella specificità e selettività degli anticorpi, caratteristiche che consentono di eliminare la maggior parte degli interferenti e ottenere un'ottima percentuale di recupero (Turner *et al.*, 2009). Lo svantaggio è il costo gestionale relativamente elevato dovuto al fatto che le colonnine sono solitamente monouso. Per la necessità di quantificare concentrazioni molto basse di micotossine negli alimenti l'utilizzo di un clean-up ad immunoaffinità si rende praticamente insostituibile.

La quantificazione dell'analita può esser condotta tramite metodiche chimico-fisiche, come le tecniche cromatografiche; o biologiche, come quelle immunochimiche. Secondo la definizione IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) la cromatografia è un metodo fisico di separazione dei componenti di una miscela, nel quale gli stessi vengono distribuiti tra due fasi, una fissa (fase stazionaria) e l'altra in movimento secondo una precisa direzione (fase mobile). La miscela da analizzare viene inserita all'interno del sistema per opera della fase mobile che, in relazione a particolari affinità, trattiene per maggior o minor tempo i componenti della miscela e scandisce i diversi momenti in cui questi fluiranno dalla colonna. All'uscita le specifiche proprietà chimico-fisiche dei vari componenti vengono riconosciute da un sistema rivelatore, convertite in un segnale elettrico e registrate sotto forma di picchi. Dallo studio dei picchi (o cromatogrammi) è quindi possibile condurre una valutazione quali-quantitativa dei componenti analizzati. I risultati dei campioni incogniti, per una corretta quantificazione, vengono rapportati a quelli ottenuti

analizzando una serie di campioni a concentrazione nota. In relazione alla fase mobile adoperata è possibile distinguere la gas cromatografia (GC), la cromatografia liquida (LC) e la cromatografia a fluido supercritico (SFC) (Rahmani *et al.*, 2009). L'HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) è attualmente considerata la tecnica strumentale di elezione per l'analisi delle micotossine. Alla normale separazione in HPLC, per uso di colonne di tipo C₁₈ e fasi mobili generalmente costituite da H₂O, CH₃OH e CH₃CN, viene solitamente abbinata la determinazione mediante rivelazione a fluorescenza (Dall'Asta *et al.*, 2006). La tecnologia si basa sul fatto che molti composti sono capaci di assorbire la radiazione ultravioletta e, come conseguenza, emetterne una di maggiore lunghezza d'onda, sia istantaneamente (fluorescenza) che dopo un certo periodo (fosforescenza), successivamente misurabile (Lindsay, 1992). I vantaggi della tecnica HPLC sono sicuramente la notevole sensibilità e riproducibilità. Gli svantaggi ricadono però sui costi di investimento relativamente alti (ammortamento e manutenzione degli strumenti, costo delle colonne e precolonne, costo dei reagenti per cromatografia e degli standard certificati) e sull'addestramento del personale, sia nel condurre le analisi che nell'elaborare i dati ottenuti.

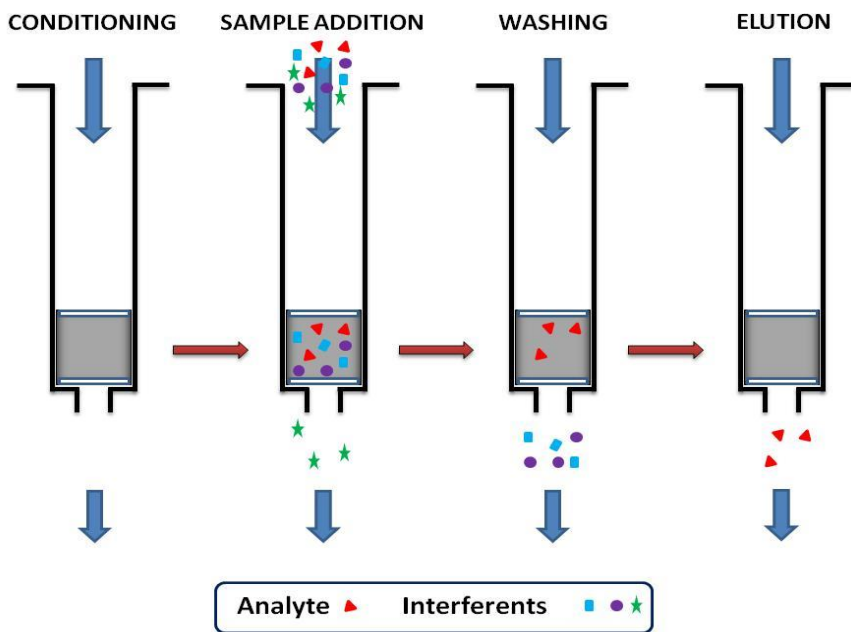


Fig. 7. Clean-up mediante utilizzo di IAC (www.intechopen.com)



Fig. 8. Sistema HPLC

5. SCOPO DELLA RICERCA

Il presente progetto di ricerca nasce con l'obiettivo di monitorare la contaminazione da alcune delle più importanti micotossine in vari prodotti alimentari. In particolare, l'attenzione è stata posta sulla ricerca di

A. aflatossina B₁ e aflatossina M₁ in farine e latte, rispettivamente, prodotti con metodo biologico e metodo tradizionale;

B. aflatossina M₁ in latte d'asina;

C. ocratossina A in salami prodotti artigianalmente.

La ricerca di AFB₁ e di AFM₁ è stata condotta su confezioni di latte e di farina acquistate in alcuni punti vendita distribuiti sul territorio di Bologna e provincia per avere, nella panoramica a disposizione del consumatore, un monitoraggio soddisfacente dei prodotti sullo "scaffale" e confrontare i risultati ottenuti dalle analisi di prodotti convenzionali e biologici. È noto che esista una certa difficoltà a prevenire, o comunque limitare in modo costante, la contaminazione delle colture da parte dei funghi produttori di micotossine. Se tale problematica si presenta nelle produzioni di tipo convenzionale, è logico pensare che sia sentita anche nell'ambito dell'agricoltura biologica, dove vige il divieto d'utilizzo di agenti antifungini e chimici in generale. Oltre a monitorare i livelli di contaminazione dei campioni presi in esame, la ricerca ha avuto lo scopo di determinare, limitatamente alle farine, il quantitativo minimo di campione per valutare in maniera attendibile la contaminazione da parte di AFB₁. Questo perché la preoccupazione dell'ottenimento di un campione significativo, nell'ambito delle analisi delle micotossine, è ad oggi ancora alta. La particolare distribuzione di queste tossine, in un ambiente come un silos di magazzinaggio di cereali, definisce una loro contaminazione poco omogenea, nominata a "macchia di leopardo", che si ripercuote sulla rappresentatività di un campione scelto, sul totale, per la conduzione delle analisi.

La ricerca dell'AFM₁ è stata in seguito effettuata sul latte d'asina, alimento di nicchia e ancora poco diffuso sul mercato italiano ed internazionale, ma il cui consumo è in costante crescita. Le classi di popolazione alle quali è destinato sono neonati, bambini della prima infanzia, e anziani. È

importante quindi un attento controllo di questo alimento, per evitare che fasce di popolazione particolarmente suscettibili assumano micotossine in quantità superiori a quelle fissate per legge. L'OTA è stata analizzata in prodotti carnei ed in particolare in salami di produzione prevalentemente artigianale provenienti dal territorio calabrese e siciliano. Tale scelta è stata motivata dalla complessità intrinseca di questi alimenti. Il loro processo di lavorazione prevede, infatti, non solo fermentazioni legate alla presenza di microrganismi nell'impasto, ma anche la crescita di muffe sul budello. Queste ultime possono essere causa di contaminazione del prodotto, se appartenenti a ceppi produttori di micotossine. Inoltre, le produzioni calabresi e siciliane di salami tipici del territorio sono legate a procedimenti tradizionali tramandati nel corso di generazioni, che, da un lato, ne determinano la qualità, dall'altro li rendono maggiormente esposti ai rischi derivanti dalla mancata attuazione di tecnologie moderne. In particolare, il mancato utilizzo di colture starter costituite da muffe selezionate per la loro incapacità di produrre micotossine, potrebbe aumentare la possibilità di contaminazione dei salami da parte di OTA. Inoltre, al contrario delle grandi aziende, queste piccole realtà produttive sono prive di sistemi di autocontrollo. Per tutte queste ragioni si è deciso di valutare se OTA fosse presente in questi prodotti e se rappresentasse un pericolo per la salute umana.

6. MATERIALI E METODI

6.1 FARINE E LATTE DI PRODUZIONE BIOLOGICA E CONVENZIONALE

Raccolta dei campioni

L'indagine è stata condotta su 90 campioni di farina e 58 di latte. I prodotti sono stati acquistati in diversi punti vendita (negozi della GDO, supermercati, piccoli alimentari, fornitori specializzati) situati a Bologna e provincia e sono i seguenti:

- ✓ 19 farine di grano
- ✓ 42 farine di mais
- ✓ 19 farine biologiche di grano
- ✓ 8 farine biologiche di mais
- ✓ 1 preparato per pane nero ai 7 cereali
- ✓ 1 farina biologica di orzo
- ✓ 5 confezioni di latte intero UHT
- ✓ 8 confezioni di latte parzialmente scremato UHT
- ✓ 9 confezioni di latte scremato UHT
- ✓ 2 confezioni di latte biologico intero UHT
- ✓ 2 confezioni di latte biologico parzialmente scremato UHT
- ✓ 3 confezione di latte fresco intero
- ✓ 5 confezioni di latte fresco parzialmente scremato
- ✓ 8 confezioni di latte biologico fresco intero
- ✓ 5 confezioni di latte biologico fresco parzialmente scremato
- ✓ 1 confezione di latte di capra intero UHT
- ✓ 2 confezioni di latte di capra parzialmente scremato UHT
- ✓ 1 confezione di latte di capra biologico intero UHT
- ✓ 1 confezione di latte di capra biologico parzialmente scremato UHT

- ✓ 1 confezioni di latte di capra biologico fresco intero
- ✓ 1 confezioni di latte di capra biologico fresco parzialmente scremato
- ✓ 3 litri di latte fresco crudo acquistati da diversi distributori alla spina
- ✓ 1 litro di latte biologico crudo prelevato da un distributore alla spina

Tutti i prodotti sono stati opportunamente catalogati, sotto un proprio codice identificativo e registrati nel quaderno di laboratorio dedicato (FT 0001/13).

6.1.2 Farine

Fase di estrazione-purificazione

I campioni sono stati analizzati presso i laboratori di Farmacologia e Tossicologia - Servizio di Bioscienze e Biotecnologie del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, dell'Università di Bologna. Nella conduzione delle analisi delle farine è stata seguita la Procedura Operativa Standard riportata in appendice I, messa a punto nel corso delle prove eseguite in occasione di questo lavoro. Nel definire la quantità di campione da analizzare, si è partiti da quella proposta da molti dei produttori di kit immunoenzimatici per i test di screening, cioè un'aliquota da 5 g per campione. Al fine di ottimizzare la metodica di estrazione e mettere a punto le condizioni cromatografiche migliori, sono state eseguite numerose prove finalizzate alla messa a punto del metodo estrattivo-analitico. Si è partiti da una metodica precedentemente realizzata nei laboratori sopra menzionati (SOP FT 7.5-02-002 Determinazione di aflatossina B1 in granelle e foraggio mediante HPLC), la quale prevedeva l'estrazione con diclorometano previa acidificazione con acido citrico al 20%, un passaggio in bagno ad ultrasuoni, la filtrazione dell'estratto diclorometanico mediante imbuti di Büchner, la concentrazione fino alla portata a secco di un'aliquota dell'estratto in UNIVAPO e la derivatizzazione con acido trifluoracetico. Questa è stata modificata riducendo i volumi di solvente utilizzati e sostituendo la fase di filtrazione con due passaggi in centrifuga ed utilizzando per questi ultimi materiale monouso (provettoni tipo Falcon da 50 ml e da 15 ml). Inoltre, si è scelto di aumentare a 20 g la quantità di campione da prelevare per le analisi, da suddividere in quattro aliquote, soddisfacendo in proporzione quanto definito dal Regolamento

(CE) n. 401/2006 della Commissione. Per la valutazione quantitativa di aflatossina B1 nelle farine sono state preparate soluzioni standard a concentrazione nota con le quali è stata allestita una curva di taratura (curva di riferimento). Quindi opportune aliquote di farina indenne sono state rinforzate con quantitativi noti di AFB1 e sottoposte alla stessa procedura di estrazione che è stata poi applicata ai campioni incogniti. Le soluzioni ottenute da questo processo (standard di calibrazione o standard estratti) sono state utilizzate per allestire una curva di taratura (curva di calibrazione). Dal confronto tra gli standard di riferimento e gli standard di calibrazione si può evincere la percentuale di recupero dell'analita dalla matrice che, secondo i criteri di accettazione del laboratorio in cui si è lavorato, deve essere compresa tra il 60 e il 100%. Per la descrizione più completa di questi passaggi si rimanda all'istruzione operativa riportata in appendice I.

Fase analitica

Per le analisi è stato utilizzato un sistema HPLC Beckman System Gold costituito da una pompa System Gold Programmable Solvent Module 126, un campionatore automatico HTA HT 800 L e un detector fluorimetrico Jasco 821 FP. Il sistema è stato controllato mediante il Software 32 Karat (Beckman Coulter) che ha permesso l'elaborazione e la gestione dei dati analitici. Per le prove preliminari è stata impiegata una colonna "classica" C18 150 x 4,6 mm 5 μ m; successivamente si è passati all'utilizzo di colonne di tipo "monolitico", utilizzate sia singolarmente che in serie. Sono state eseguite quindi numerose prove di eluizione, sia isocratiche che in gradiente. In ultimo si è optato per l'utilizzo della colonna "monolitica" Phenomenex Onyx 100 x 4,6 mm, particolarmente innovativa. La peculiarità è dovuta essenzialmente alla sua costituzione in una barra di silice ad elevata porosità, caratterizzata dalla combinazione di una struttura macroporosa ed una mesoporosa. I macropori hanno un diametro medio di 2 μ m e il loro insieme forma una fitta rete attraverso cui la fase mobile può scorrere ad alto flusso ed a bassa pressione, riducendo sensibilmente il tempo di separazione. I mesopori formano la struttura porosa fine (130 Å) del materiale e assicurano un'alta area superficiale, requisito fondamentale per aumentare le interazioni con gli analiti e la probabilità di separazione. Questa particolare struttura permette rapide variazioni di flusso senza elevate contropressioni, intasamento minimo da eventuali

contaminanti dei campioni e, nelle eluizioni in gradiente, tempi di riequilibrio molto ridotti. Tutto ciò si traduce in analisi di minor durata e minore sollecitazione dei sistemi HPLC. Per la conduzione delle analisi con questa colonna si è messa a punto una eluizione in gradiente, utilizzando le seguenti fasi mobili:

- fase mobile A: H₂O : CH₃CN : CH₃CHOHCH₃ : CH₃COOH 1% (91 : 1 : 1 : 7)
- fase mobile B: H₂O : CH₃CN : CH₃CHOHCH₃ : CH₃COOH 1% (43 : 25 : 25 : 7)

<i>Time (min)</i>	<i>B (%)</i>	<i>Flow (ml/min)</i>	<i>Duration (min)</i>
0	16	1,3	
4,5	47,5		4,5
6		1	1
9	16		1
10		1,3	1

Il volume di iniezione è stato stabilito a 20 µl, mentre il detector fluorimetrico è stato impostato alle seguenti condizioni: λ Ex: 365 µm, λ Em: 418 µm. A queste condizioni il tempo di ritenzione dell'aflatossina B1 è di circa 8 minuti con una durata della corsa cromatografica di 11 minuti.

Validazione del metodo

Per la validazione del metodo analitico, sono stati considerati i seguenti parametri:

- ✓ **Precisione**, definita come la concordanza tra i risultati di prove mutuamente indipendenti effettuate in condizioni stabilite. La precisione esprime il grado di ripetibilità di un valore su un gruppo di misure individuali di un analita, quando la procedura viene applicata in modo ripetitivo ad aliquote multiple provenienti da un singolo volume di campione. Viene calcolata con il coefficiente di variazione (CV%).
- ✓ **Accuratezza**, definita come il grado di concordanza tra il risultato di una misurazione (o tra la media di una serie di misure) ed il valore convenzionalmente vero del misurando. L'accuratezza esprime il grado di corrispondenza dei risultati ottenuti dal metodo rispetto al valore vero dell'analita. Viene quantificata in termini di errore relativo (ER%).
- ✓ **Limite di rilevabilità** (LOD), che rappresenta la minima concentrazione di analita che può

essere rilevata, ma non necessariamente quantificata, con ragionevole affidabilità da una certa procedura analitica. In altre parole, il LOD esprime la concentrazione di analita corrispondente al minimo segnale significativo, un segnale vicino a quello del bianco (soluzione in cui l'analita è virtualmente assente) ma da esso significativamente diverso. Generalmente viene accettato un rapporto segnale-rumore di 3:1.

- ✓ Limite di quantificazione (LOQ), che rappresenta la minima concentrazione di analita che può essere quantificata con accettabile accuratezza e precisione da una certa procedura analitica. Il Loq esprime, nell'analisi quantitativa, lo standard più basso nella curva di calibrazione.
- ✓ Specificità, definita come la capacità di un metodo analitico di misurare accuratamente e specificatamente un analita in presenza di altre specie nel campione allo studio. Nella cromatografia un metodo è specifico se, applicando la stessa procedura estrattivo-analitica ad un campione "bianco", questo non mostra interferenze significative al tempo di ritenzione dell'analita di interesse.
- ✓ Linearità, definita come la capacità di un metodo di produrre risultati, direttamente o attraverso trasformazioni matematiche ben definite, proporzionali alla concentrazione degli analiti nei campioni nell'ambito di un determinato intervallo. La correlazione è una misura della forza di una relazione lineare tra due variabili quantitative. Il coefficiente di correlazione (R) o di determinazione (R^2) esprimono il grado di interdipendenza tra due variabili quantitative.
- ✓ Range, che definisce l'intervallo tra la concentrazione più alta e quella più bassa dell'analita, determinate dimostrando precisione, accuratezza e linearità.
- ✓ Recupero, definito come il confronto tra la risposta che si ottiene dal rilevatore nell'analisi di un campione, costituito dalla matrice biologica addizionata con una quantità nota dell'analita (dopo estrazione), con quella di una soluzione della stessa concentrazione dell'analita sciolto in un solvente.

6.1.3 Latte

Fase di estrazione-purificazione

Nella conduzione delle analisi del latte è stato scelto di utilizzare la tecnica di estrazione-purificazione dei campioni mediante colonnine di immunoaffinità. Le colonnine di immunoaffinità utilizzate sono prodotte dalla VICAM (U.S.A.). La scelta è ricaduta su questo tipo di prodotto in quanto già testato nei laboratori del Servizio di Farmacologia e Tossicologia in occasione di un proficiency-test dimostrandosi robusto ed affidabile. È stata seguita la procedura indicata nelle istruzioni fornite dal produttore che prevede i seguenti passaggi:

- Portare le colonnine, i solventi ed i campioni di latte a temperatura ambiente (18-22 °C), circa un'ora prima dell'uso;
- previa accurata miscelazione dell'intera confezione, misurare 50 ml di latte in cilindri graduati e trasferirli in provettoni tipo Falcon da 50 ml;
- centrifugare in centrifuga refrigerata a 5 °C a 1540 xg per 15 minuti;
- rimuovere la fase di grasso affiorata in superficie;
- allestire l'apposito sistema da vuoto posizionandovi le colonnine;
- eluire il tampone fosfato salino di conservazione contenuto nelle colonnine;
- montare i "column reservoir" e caricare il latte sgrassato;
- lasciarlo fluire a velocità di 1-2 gocce/secondo e trascinare le ultime gocce con il vuoto;
- cambiare "column reservoir" e lavare con 10 ml di H₂O per HPLC a velocità di 1-2 gocce/secondo;
- lavare nuovamente con 10 ml di H₂O per HPLC a velocità di 1-2 gocce/secondo, asciugando le cartucce con il vuoto;
- lavare con 1,25 ml di soluzione CH₃CN : MeOH (3 : 2) a velocità di 1 goccia/2-3 secondi e raccogliere l'eluato in una provetta di vetro;
- lavare con 1,25 ml di H₂O per HPLC a velocità di 1 goccia/2-3 secondi e raccogliere l'eluato nella stessa provetta di vetro. Il volume totale corrisponde a 2,5 ml e la concentrazione finale del campione è 20:1. La soluzione risultante dalle due eluizioni è la seguente: H₂O :

CH₃CN : MeOH (5 : 3 : 2);

- agitare su Vortex e filtrare su filtri di nylon di porosità 0,45 µm.

Analogamente a quanto già riportato per le analisi delle farine, per la valutazione quantitativa di aflatoxina M₁ nel latte sono state preparate soluzioni standard a concentrazione nota con le quali è stata allestita una curva di taratura (curva di riferimento). Quindi opportune aliquote di latte indenne sono state rinforzate con quantitativi noti di AFM₁ e sottoposte alla stessa procedura di estrazione/purificazione che è stata poi applicata ai campioni incogniti. Le soluzioni ottenute da questo processo (standard di calibrazione o standard estratti) sono state utilizzate per allestire una curva di taratura (curva di calibrazione). Dal confronto tra gli standard di riferimento e gli standard di calibrazione si può evincere la percentuale di recupero dell'analita dalla matrice che, secondo i criteri di accettazione del laboratorio in cui si è lavorato, deve essere compresa tra il 60 e il 100%.

Preparazione delle curve di riferimento e di calibrazione

A partire da una soluzione standard certificata di AFM₁ 10 ppm in CH₃CN sono state allestite per diluizione le seguenti soluzioni standard di lavoro:

100 µl soluzione 10 ppm + 900 µl CH₃CN = 1 ppm

200 µl soluzione 1 ppm + 800 µl H₂O = 200 ppb

200 µl soluzione 200 ppb + 1800 µl H₂O = 20 ppb

Partendo poi dalla soluzione con concentrazione di 20 ppb sono state allestite per diluizione con una soluzione H₂O : CH₃CN : MeOH (5 : 3 : 2) le seguenti soluzioni standard di riferimento:

125 µl soluzione 20 ppb + 875 µl soluzione fase mobile = 2,5 ppb

100 µl soluzione 20 ppb + 900 µl soluzione fase mobile = 2 ppb

75 µl soluzione 20 ppb + 925 µl soluzione fase mobile = 1,5 ppb

50 µl soluzione 20 ppb + 950 µl soluzione fase mobile = 1 ppb

25 µl soluzione 20 ppb + 975 µl soluzione fase mobile = 0,5 ppb

Per l'allestimento delle soluzioni standard di calibrazione, aliquote di 50 ml di latte indenne sono state rinforzate con i quantitativi della soluzione AFM₁ 20 ppb di seguito riportati:

50 ml di latte + 312,5 µl soluzione 20 ppb = 2,5 ppb (0,125 ppb in matrice)

50 ml di latte + 250 µl soluzione 20 ppb = 2 ppb (0,100 ppb in matrice)

50 ml di latte + 187,5 µl soluzione 20 ppb = 1,5 ppb (0,075 ppb in matrice)

50 ml di latte + 125 µl soluzione 20 ppb = 1 ppb (0,05 ppb in matrice)

50 ml di latte + 62,5 µl soluzione 20 ppb = 0,5 ppb (0,0025 ppb in matrice)

Le concentrazioni indicate fanno riferimento alle soluzioni risultanti al termine della procedura di estrazione/purificazione cui sono sottoposti i campioni di latte. Tenendo presente il fattore di concentrazione insito alla metodica (20:1), la concentrazione effettiva di AFM₁ in matrice è 20 volte inferiore a quella delle soluzioni di cui sopra. Le analisi sono state condotte con la stessa strumentazione descritta per le farine.

Fase analitica

Le condizioni cromatografiche di lavoro ritenute migliori a seguito delle numerose prove condotte sono le seguenti:

- ✓ colonna Agilent Zorbax C18 250 x 4,6 mm 5 µm
- ✓ eluizione isocratica
- ✓ fase mobile A: H₂O : CH₃OH (89,5 : 10,5) al 67%
- ✓ fase mobile B: CH₃CN al 33%
- ✓ flusso 0,9 ml/min
- ✓ volume di iniezione pari a 100 µl
- ✓ detector fluorimetrico impostato alle condizioni λ Ex: 360 µm, λ Em: 440 µm

A queste condizioni il tempo di ritenzione dell'aflatossina M₁ è di circa 5,6 minuti con una durata della corsa cromatografica di 8 minuti.

Validazione del metodo analitico

Per la validazione del metodo analitico, sono stati considerati gli stessi parametri precedentemente descritti (par. 6.1.2).

6.2 LATTE D'ASINA

Raccolta dei campioni

Il monitoraggio è stato condotto su 62 campioni di latte d'asina provenienti da un allevamento situato in Nord Italia:

- ✓ 11 prelevati durante la singola mungitura di ogni asina tra Giugno 2015 e Agosto 2015
- ✓ 50 prelevati durante la singola mungitura di ogni asina a Novembre 2015
- ✓ 1 prelevato come latte di massa a Novembre 2015

Le asine oggetto dello studio erano di razza Martina Franca, Amiata, S. Andrea, S. Domenico, Sologno, Sardo, Ragusana, Poitou. Erano allevate a stabulazione libera ed alimentate con erba fresca al pascolo e mangime. Quest'ultimo era composto da orzo, orzo fioccato, crusca di frumento, granoturco fioccato, fave e favino fioccate, farine di estrazione di soia fioccata, farine di erba medica disidratata, polpa di bietola da zucchero, melasso di canna da zucchero, acidi grassi (grasso di origine vegetale), fosfato bicalcico, carbonato di calcio da rocce calciche macinate, cloruro di sodio e lievito di birra. Il latte raccolto e destinato alle analisi è stato trasferito in provette tipo Falcon e congelato -20 °C, senza subire alcun tipo di trattamento termico. In laboratorio, i campioni sono stati opportunamente catalogati così da potere essere identificati univocamente, e registrati nel quaderno di laboratorio dedicato (FT 0003/15).

Fase di estrazione-purificazione

I campioni sono stati estratti ed analizzati presso i laboratori di Farmacologia e Tossicologia - Servizio di Bioscienze e Biotecnologie del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, dell'Università di Bologna. La metodica impiegata per la ricerca di AFM₁ nei campioni di latte d'asina prevede l'estrazione-purificazione mediante colonnine di immunoaffinità (IAC), e la successiva analisi in HPLC con rivelatore fluorimetrico (FD), come descritto precedentemente per il latte bovino e caprino.



Fig. 9. Colonnina di immunoaffinit 



Fig. 10. Colonnine nelle quali   caricato un campione bianco e una matrice contaminata

Preparazione delle curve di riferimento e di calibrazione

Per la preparazione delle soluzioni standard di AFM₁ si   partiti da una soluzione commerciale di AFM₁ a concentrazione di 10 ppm in CH₃CN (Supelco,USA) e sono state effettuate le seguenti diluizioni:

100  l [soluzione 10 ppm] + 900  l di CH₃CN = 1 ppm

200  l [soluzione 1 ppb] + 800  l di H₂O = 200 ppb

200  l [soluzione 200 ppb] + 1800  l di H₂O = 20 ppb

A partire dalla soluzione di AFM₁ 20 ppb si   proceduto a preparare le seguenti soluzioni standard di riferimento utilizzando per la diluizione una soluzione contenente H₂O : CH₃CN : MeOH in rapporto 5 : 3 : 2:

125  l [soluzione 20 ppb] + 875  l di soluzione H₂O : CH₃CN : MeOH = 2,5 ppb

100  l [soluzione 20 ppb] + 900  l di soluzione H₂O : CH₃CN : MeOH = 2 ppb

75  l [soluzione 20 ppb] + 925  l di soluzione H₂O : CH₃CN : MeOH = 1,5 ppb

50 µl [soluzione 20 ppb] + 950 µl di soluzione H₂O : CH₃CN : MeOH = 1 ppb

25 µl [soluzione 20 ppb] + 975 µl di soluzione H₂O : CH₃CN : MeOH = 0,5 ppb

12,5 µl [soluzione 20 ppb] + 987,5 µl di soluzione H₂O : CH₃CN : MeOH = 0,25 ppb

Per preparare la curva di calibrazione, si è proceduto rinforzando aliquote di 40 ml di latte indenne con volumi noti di soluzione AFM₁ 20 ppb in H₂O. Successivamente, questi campioni sono stati sottoposti alla metodica di estrazione-purificazione riportata nel paragrafo precedente. Di seguito sono riportati i volumi di soluzione AFM₁ addizionati e le concentrazioni delle soluzioni finali ottenute:

40 ml di latte + 250 µl di AFM₁ 20 ppb = 2,5 ppb (0,125 ppb in matrice)

40 ml di latte + 200 µl di AFM₁ 20 ppb = 2 ppb (0,100 ppb in matrice)

40 ml di latte + 150 µl di AFM₁ 20 ppb = 1,5 ppb (0,075 ppb in matrice)

40 ml di latte + 100 µl di AFM₁ 20 ppb = 1 ppb (0,05 ppb in matrice)

40 ml di latte + 50 µl di AFM₁ 20 ppb = 0,5 ppb (0,025 ppb in matrice)

40 ml di latte + 25 µl di AFM₁ 20 ppb = 0,25 ppb (0,0125 ppb in matrice)

Le concentrazioni di AFM₁ sopra riportate sono quelle delle soluzioni risultanti al termine della procedura di estrazione-purificazione cui sono sottoposti i campioni di latte. Questi valori sono 20 volte superiori rispetto alle concentrazioni nel latte contaminato (indicate tra parentesi) in virtù del fattore di concentrazione della procedura applicata. Dal confronto tra gli standard di riferimento e gli standard di calibrazione si ottiene la percentuale di recupero della tossina dalla matrice; secondo gli standard di qualità stabiliti dal Laboratorio FT in cui sono state effettuate le analisi, la percentuale di recupero si definisce accettabile quando è compresa tra il 60% e il 100%.

Fase analitica

Il sistema HPLC usato per le analisi dei campioni è costituito da una pompa Beckman System Gold Programmable Solvent Module 126, un campionatore automatico HTA HT 800 L e un detector fluorimetrico Jasco 821 FP. L'intero sistema HPLC veniva controllato dal Software 32 Karat (Beckman Coulter), il quale ha effettuato anche l'elaborazione dei dati. Per la messa a punto delle condizioni analitiche ottimali, inizialmente sono stati provati diversi tipi di colonne. Per le

prime prove, è stata usata una colonna Luna C18 250 x 4,6 mm 5 µm. I cromatogrammi risultanti dai test mostravano picchi poco simmetrici, con marcato "fronting", ovvero salivano lentamente per raggiungere il massimo per poi discendere con rapidità. Effettuate le opportune verifiche, si è deciso di cambiare colonna e installare una Zorbax C18 250 x 4,6 mm 5 µm già utilizzata per delle analisi su AFM1. I cromatogrammi relativi alle analisi con questa colonna mostravano picchi soddisfacenti. Tuttavia dopo varie prove, la pressione all'interno delle pompe si mostrava elevata (circa 1950 psi). Per ovviare a questo problema, la colonna usata è stata sostituita con un'altra nuova dello stesso modello; i risultati ottenuti con quest'ultima erano sovrapponibili a quelli della precedente ma con una contropressione decisamente più bassa. In seguito, al fine di ridurre la durata delle corse cromatografiche, abbiamo deciso di provare due colonne più corte, differenti solo per le dimensioni del particolato dell'impaccamento. Dapprima è stata testata la Zorbax C18 150 x 4,6 mm 3,5 µm che tuttavia, non appena condizionata, ha dato subito una contropressione troppo alta (circa 2800 psi), nonostante le precauzioni prese precedentemente (fase mobile e campioni filtrati prima di essere immessi nel sistema); successivamente, è stata installata la Zorbax C18 150 x 4,6 mm 5 µm. Quest'ultima è quella che si è dimostrata più performante, e quindi è stata utilizzata per la validazione del metodo e le analisi dei campioni incogniti. Le prove eseguite con le varie colonne sono state sia con eluizione isocratica (la composizione della fase mobile rimane costante durante l'intera corsa cromatografica), sia in gradiente (la composizione della fase mobile cambia durante la corsa).

Le condizioni cromatografiche definitive sono le seguenti:

- ✓ Eluizione Isocratica
- ✓ Detector fluorimetrico impostato: λ_{ex} : 360 nm
- ✓ λ_{em} : 440 nm
- ✓ Fase mobile A: H₂O 61 %
- ✓ Fase mobile B: CH₃CN 39 %
- ✓ Volume iniezione stabilito di 100 µl
- ✓ Flow: 0,7 ml/min

A queste condizioni, il tempo di ritenzione dell'aflatossina M₁ era di circa 3,8 minuti e la durata

della corsa cromatografica di 5 minuti.

Validazione del metodo

Per la validazione del metodo analitico, sono stati considerati gli stessi parametri precedentemente descritti (par. 6.1.2.)

6.3 SALAMI

Raccolta dei campioni

La ricerca è stata condotta su 50 campioni di salami calabresi (19 salsicce piccanti, 15 salsicce dolci, 7 soppressate piccanti, 1 soppressata dolce, 8 nduje) e 50 campioni di salami siciliani acquistati in piccoli salumifici o aziende agricole. I campioni sono stati opportunamente catalogati e ad ognuno è stato assegnato un codice identificativo.

Fase di estrazione-purificazione

Tutte le fasi di estrazione-purificazione e le successive analisi dei campioni sono stati analizzati presso i laboratori di Farmacologia e Tossicologia - Servizio di Bioscienze e Biotecnologie del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, dell'Università di Bologna. Per ottenere un'aliquota rappresentativa dai 50 salami testati, il cui peso variava dai 220 g ai 625 g, è stato effettuato, per ciascuno di essi, un prelievo a livello delle due estremità e dal centro, pari al 40% dell'intero salame. Le aliquote sono state riunite ed omogeneizzate; dall'omogeneizzato sono stati poi prelevati 2.5 g, che rappresentavano il "test sample".

Le fasi successive sono le seguenti:

- trasferimento in provette tipo Falcon da 50 ml
- aggiunta di 1,5 ml di soluzione H₃PO₄ e 5 ml di etile acetato
- omogeneizzazione con Ultraturrax per 3'
- centrifugazione a 3000 RPM per 3'
- raffreddamento in ghiaccio per 30"
- raccolta della fase organica in provettoni di tipo Falcon da 15ml
- ripetizione dell'estrazione con 5 ml di etile acetato e 1,5 di H₃PO₄
- omogeneizzazione con Ultraturrax per 3'
- immissione in bagno ad ultrasuoni per 15'
- centrifugazione a 3000 RPM per 3', raccolta della fase organica unendola alla prima

raccolta;

- congelamento alcune ore o overnight
- centrifugazione a 3000 RPM per 10' al fine di separare la fase acquosa
- trasferimento di 8ml dell'estratto organico (pari a 2g di campione) in provette coniche graduate di vetro
- riduzione dell'estratto organico a 2ml in evaporatore
- aggiunta di 2ml di NaHCO₃ e agitazione su rotating shaker per 30'
- centrifugazione, congelamento, scongelamento e di nuovo centrifugazione per 10' a 3000 RPM allontanando poi la fase organica, ripetendo più volte in caso di emulsione

La purificazione dei campioni (o clean-up) è stata, anche per i salami, effettuata con l'ausilio di colonnine di immunoaffinità (*immunoaffinity-column* o IAC).

L'operazione si è svolta in più passaggi:

- trasferimento di 1,5 ml dell'estratto bicarbonatico (pari a 1,5 g di campione) in un'altra provetta e diluizione con 3,5 ml di PBS buffer
- caricamento dell'estratto bicarbonatico diluito su colonnina di immuno-affinità, lavando la provetta che lo conteneva con 1 ml di PBS buffer e caricando anche quest'ultimo sulla stessa colonnina
- lavaggio con 10 ml di PBS buffer
- lavaggio con 10 ml di H₂O
- asciugatura della colonnina mediante vacuum
- eluizione con 1,5 ml di MeOH
- riduzione a secco e risolubilizzazione in 150 µl di MeOH
- agitazione su vortex, eventualmente sonicando alcuni secondi
- aggiunta di 150 µl di H₂O
- agitazione su vortex e analisi (campioni concentrati 5:1)

Per la descrizione più completa di questi passaggi si rimanda all'istruzione operativa riportata in appendice II.

Preparazione delle curve di riferimento e di calibrazione

Per la valutazione quantitativa di OTA nei salami sono state preparate soluzioni standard a concentrazione nota con le quali è stata poi allestita una curva di taratura curva di riferimento (o curva di taratura non estratta). Per la costruzione della curva di calibrazione (o curva di taratura estratta) si è provveduto a rinforzare delle aliquote di $2,5 \pm 0,01$ g di salame indenne con quantitativi noti di ocratossina, per poi sottoporli alla stessa procedura di estrazione applicata ai campioni incogniti.

Le soluzioni standard di riferimento ottenute sono le seguenti:

St. OTA 1 ppb: 20 μ l [sol. 50ppb] portati a secco e ripresi in 500 μ l CH₃OH+500 μ l H₂O (1:1)

St. OTA 2 ppb: 40 μ l [sol. 50ppb] portati a secco e ripresi in 500 μ l CH₃OH+500 μ l H₂O (1:1)

St. OTA 5 ppb: 100 μ l [sol. 50ppb] portati a secco e ripresi in 500 μ l CH₃OH+500 μ l H₂O (1:1)

St. OTA 7,5 ppb: 150 μ l [sol. 50ppb] portati a secco e ripresi in 500 μ l CH₃OH+500 μ l H₂O (1:1)

St. OTA 10 ppb: 200 μ l [sol. 50ppb] portati a secco e ripresi in 500 μ l CH₃OH+500 μ l H₂O (1:1)

Per l'allestimento delle soluzioni standard di calibrazione, aliquote di salame del peso di $2,5 \pm 0,01$ g indenne sono state rinforzate con i quantitativi della soluzione OTA 50 ppb come riportato di seguito:

St. OTA 1ppb: 10 μ l[sol. 50ppb]

St. OTA 2ppb: 20 μ l[sol. 50ppb]

St. OTA 5ppb: 50 μ l[sol. 50ppb]

St. OTA 7,5ppb: 75 μ l[sol. 50ppb]

St. OTA 10ppb:100 μ l[sol. 50ppb]

Le concentrazioni indicate fanno riferimento alle soluzioni analitiche risultanti al termine della procedura di estrazione/purificazione a cui sono sottoposti i campioni di salame. Tenendo presente il fattore di concentrazione insito nella metodica (5:1), la concentrazione effettiva di OTA in matrice è cinque volte inferiore a quella delle soluzioni di cui sopra.

Fase analitica

Per l'analisi dei campioni è stato utilizzato un sistema HPLC Beckman System Gold dotato di una postazione di controllo IBM Thinkcenter-Software 32 Karat (Beckman Coulter), una pompa System Gold Programmable Solvent Module 126, un campionatore automatico HTA-HT 800 L, due colonne monolitiche HPLC in serie: una Merk Chromolith Performance RP-18e 100 x 4,6 mm e l'altra Phenomenex Onyx Monolithic C18 100 x 4,6 mm, un rilevatore spettrofluorimetrico Jasco 821 FP, programmato con lunghezza d'onda d'eccitazione (λ_{ex}) di 340 nm e lunghezza d'onda d'emissione (λ_{em}) di 460 nm.

Le condizioni cromatografiche stabilite sono le seguenti:

- ✓ Eluizione isocratica
- ✓ Fase mobile A: H₂O:CH₃CN:CH₃CHOHCH₃:CH₃COOH 1% (79:7:7:7) 58%
- ✓ Fase mobile B CH₃CN 42%.
- ✓ Volume di iniezione 20 μ l
- ✓ Flow: 1,1 ml/min

Validazione del metodo analitico

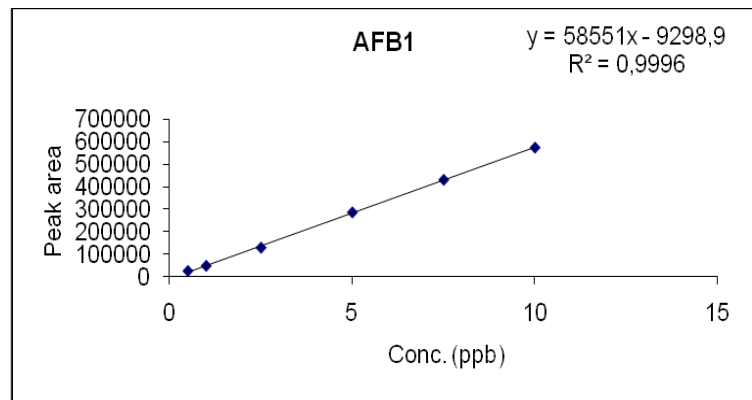
Per la validazione del metodo analitico, sono stati considerati gli stessi parametri presi in esame per le precedenti analisi (par. 6.1.2.).

7. RISULTATI E DISCUSSIONE

7.1 RISULTATI DELLE ANALISI DEI CAMPIONI DI FARINA

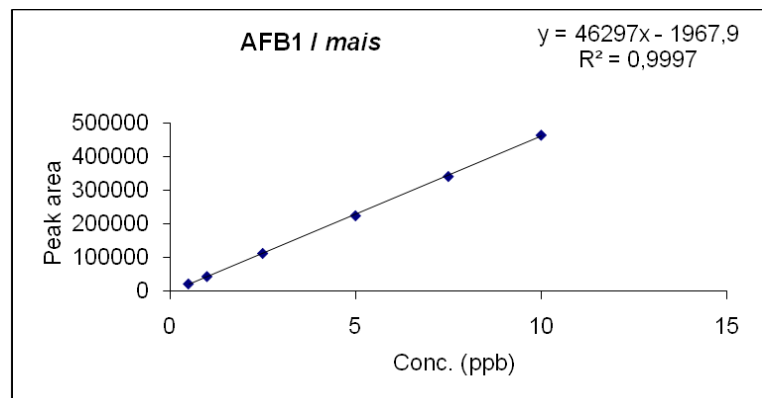
AFB₁ – Curva di riferimento

Conc. (ppb)	Peak area
0,5	25201
1	48231
2,5	129098
5	286363
7,5	431773
10	575132



AFB₁/mais – Curva di calibrazione

Conc. (ppb)	Peak area
0,5	23165
1	45093
2,5	113847
5	225729
7,5	342337
10	464900



Concentrazioni degli standard di riferimento e di calibrazione ricalcolate con l'equazione (*) della curva di regressione e le % di recupero.

Standard di riferimento	
Conc. (ppb)	Peak area
0,5	25201
1	48231
2,5	129098
5	286363
7,5	431773
10	575132

Standard di calibrazione	
Conc.(ppb)	Peak area
0,5	23165
1	45093
2,5	113847
5	225729
7,5	342337
10	464900

Equazione della retta di regressione (o curva di riferimento)

$$y = 58551x - 9298,9$$

$$x = (y + 9298,9) / 58551 \text{ (*)}$$

y = area picco x = concentrazione AFB₁

Standard di riferimento	
Conc. nom. (ppb)	Conc. ricalcolata ^(*) (ppb)
0,5	0,59
1	0,98
2,5	2,36
5	5,05
7,5	7,53
10	9,98

Standard di calibrazione	
Conc.nom. (ppb)	Conc. ricalcolata ^(*) (ppb)
0,5	0,55
1	0,93
2,5	2,10
5	4,01
7,5	6,01
10	8,10

Conc.nom. (ppb)	% Recupero
0,5	94,1%
1	94,5%
2,5	89,0%
5	79,5%
7,5	79,7%
10	81,1%
media rec.	84,78%

Recupero %= Valore med. St. di calibrazione / Valore med. St.di riferimento) x 100

LOD (=0,15 ppb) e LOQ (=0,5 ppb)

Il LOD è stato calcolato come il valore corrispondente al triplo del rumore di fondo determinato al tempo di ritenzione di AFB1 in farine indenni. Il valore medio di 6 determinazioni per le matrici considerate (farina di mais e grano) è stato moltiplicato per 3 e rapportato al segnale di uno standard di riferimento.

I dati ottenuti dalle analisi dei campioni di farina sono riportati di seguito (Tab. 9):

Campioni analizzati		
N. di Riferimento	Specifiche del prodotto	Concentrazione di AFB₁ in ppb
10	grano bio	n.d.
11	grano bio	n.d.
12	grano bio	n.d.
13	grano bio	n.d.
14	grano bio	n.d.
15	grano bio	n.d.
16	grano bio	n.d.
17	mais	n.d.
18	mais	n.d.
19	mais	0,40
20	mais	n.d.
21	mais	0,28
22	mais	n.d.
23	mais	n.d.
24	mais	n.d.
25	mais	n.d.
26	mais	n.d.
27	mais	n.d.
31	mais bio	n.d.
32	mais bio	0,64
33	mais bio	n.d.
34	mais bio	n.d.
35	mais bio	n.d.
36	grano bio	n.d.
37	grano bio	n.d.

39	grano bio	n.d.
40	grano bio	n.d.
45	grano	n.d.
46	grano	n.d.
47	grano	n.d.
48	mais	n.d.
49	mais	3,75
50	mais	n.d.
51	mais	n.d.
52	mais	n.d.
53	mais	n.d.
54	mais	n.d.
55	mais	n.d.
56	mais	n.d.
57	mais	n.d.
58	mais	n.d.
59	grano bio	n.d.
60	grano	n.d.
61	mais bio	0,64
62	mais	n.d.
63	mais	n.d.
64	mais	n.d.
65	mais	n.d.
66	mais	0,21
67	grano	n.d.
68	mais	n.d.
69	mais	0,08
70	mais	0,08
71	mais	n.d.

72	mais	0,18
73	grano	n.d.
74	grano	n.d.
75	grano	n.d.
76	grano	n.d.
77	grano	n.d.
78	grano	n.d.
79	grano	n.d.
80	grano	n.d.
81	prep pane nero	n.d.
82	grano bio	n.d.
83	mais	n.d.
84	mais	0,29
85	mais	n.d.
86	mais	0,63
87	mais	n.d.
98	mais	n.d.
99	mais	n.d.
100	grano	n.d.
101	grano	n.d.
102	mais	n.d.
103	mais	1,69
104	mais	n.d.
105	grano	n.d.
106	grano	n.d.
107	grano	n.d.
108	mais bio	0,98
109	grano bio	n.d.
110	grano bio	n.d.

111	mais bio	0,17
112	farina di orzo	n.d.
113	grano bio	n.d.
114	grano bio	n.d.
115	grano bio	n.d.
116	grano bio	n.d.
117	grano	n.d.

Tab. 9. Elenco dei campioni di farina e concentrazioni di AFB₁ rilevate nel corso della prima tornata di analisi.

Dai campioni risultati positivi è stata prelevata, dopo accurato mescolamento, un'aliquota di 20 grammi, la quale è stata suddivisa in 4 sub-aliquote da 5 grammi da sottoporre alla procedura estrattivo-analitica.

I risultati ottenuti sono i seguenti (Tab. 10):

Campione	Aliquota A (in ppb)	Aliquota B (in ppb)	Aliquota C (in ppb)	Aliquota D (in ppb)	Media (A-D) (in ppb)	Deviazione standard	Coefficiente divariazione %
19	0,53	0,32	0,31	0,45	0,40	0,11	27%
21	0,75	0,23	0,08	0,08	0,28	0,32	114%
32	0,83	0,38	1,19	0,16	0,64	0,46	72%
49	2,39	0,85	11,25	0,51	3,75	5,07	135%
61	0,08	2,34	0,08	0,08	0,64	1,13	177%
66	0,39	0,17	0,08	0,22	0,21	0,13	62%
69	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,00	0%
70	0,08	0,15	0,19	0,32	0,18	0,10	56%
72	0,08	0,15	0,19	0,32	0,18	0,10	56%
84	0,57	0,08	0,15	0,38	0,29	0,22	77%
86	1,04	0,26	0,92	0,29	0,63	0,41	65%
103	1,66	1,39	2,19	1,51	1,69	0,35	21%
108	0,08	0,08	3,67	0,08	0,98	1,80	183%
111	0,17	0,18	0,18	0,17	0,17	0,01	3%

Tab. 10. Risultati analisi campioni positivi

Per cinque di questi campioni si è deciso di prelevare un'ulteriore aliquota di 20 grammi e, analogamente a quanto già fatto, di suddividerla in 4 sub-aliquote da 5 grammi da sottoporre alla procedura estrattivo-analitica. Inoltre, nel corso della procedura di estrazione, da ciascuna delle 4 aliquote di ogni campione sono stati prelevati 2,5 ml di estratto diclorometanico, sono stati riuniti ottenendo un volume totale di 10 ml e poi sono stati portati a secco e derivatizzati analogamente agli altri campioni.

Di seguito si riportano i risultati ottenuti (Tab. 11):

Campione	Aliquota E (in ppb)	Aliquota F (in ppb)	Aliquota G (in ppb)	Aliquota H (in ppb)	Media (EH) (in ppb)	Dev. standard	Coefficiente di variazione (%)	Mix E-H (in ppb)
32	0,22	0,53	0,22	0,31	0,32	0,15	46%	0,31
49	13,16	0,40	0,46	0,87	3,72	6,30	169%	3,70
66	0,48	0,14	0,13	0,08	0,21	0,18	87%	0,22
103	2,45	1,66	1,40	1,44	1,74	0,49	28%	1,83
108	0,37	0,22	0,15	0,19	0,23	0,10	42%	0,23

Tab. 11. Risultati delle analisi di 5 dei campioni positivi

Infine per valutare l'attendibilità di un risultato negativo derivante da uno screening con un'aliquota di 5 grammi di campione, si è deciso di procedere, analogamente a quanto già fatto per i primi campioni positivi, con altri, risultati negativi alla prima analisi.

I risultati ottenuti sono i seguenti (Tab. 12):

Campione	Aliquota A (in ppb)	Aliquota B (in ppb)	Aliquota C (in ppb)	Aliquota D (in ppb)	Media (A-D) (in ppb)	Deviazion e standard	Coefficient e di variazione %
18	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,00	0%
31	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,00	0%
33	0,08	0,08	0,09	0,21	0,11	0,06	51%
63	0,46	0,08	0,08	0,15	0,19	0,16	83%

Tab. 12. Risultati analisi di 5 campioni negativi

Nel calcolo della concentrazione media di AFB₁, i valori rilevati nelle diverse aliquote inferiori al LOD sono stati convenzionalmente considerati pari a ½ LOD: 0,075 ppb (Rapporti ISTISAN, 04/15).

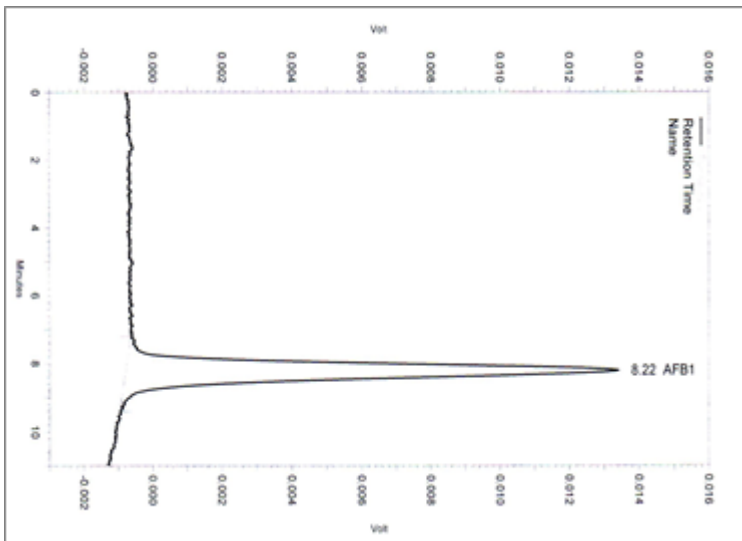


Fig. 11. Cromatogramma standard AFB₁ 7,5 ppb non estratto

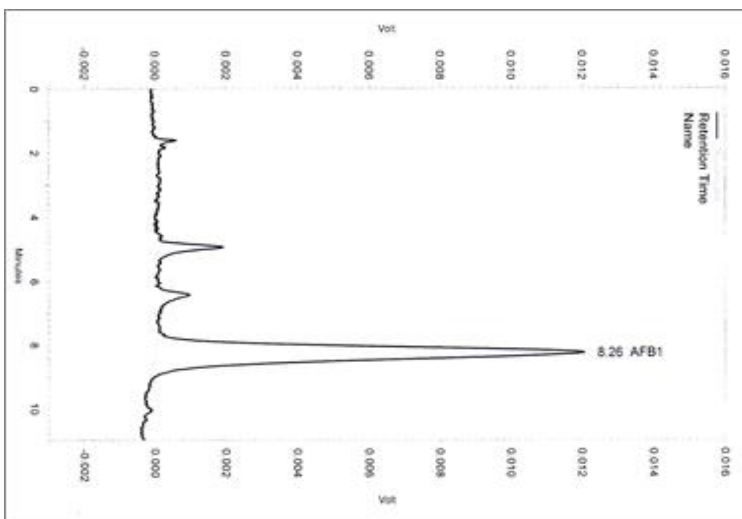


Fig. 12. Cromatogramma standard AFB₁ 7,5 ppb estratto

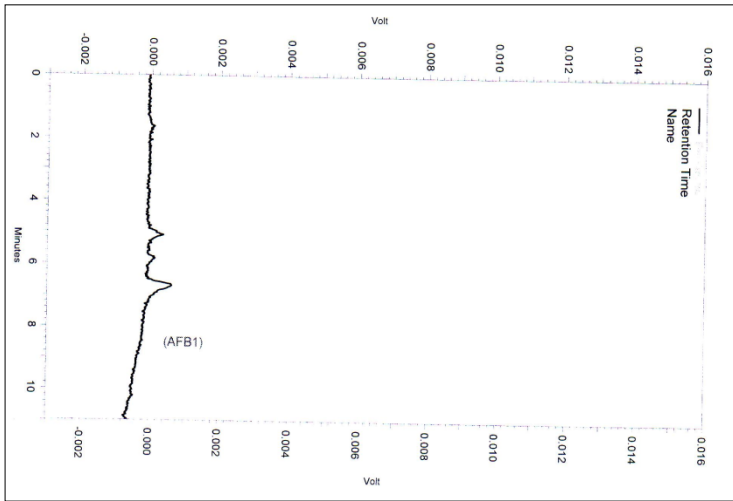


Fig. 13. Cromatogramma campione bianco

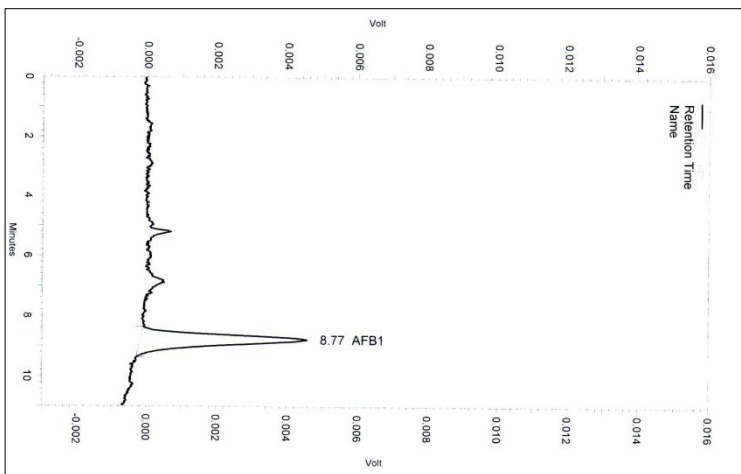


Fig.14. Cromatogramma campione incognito

7.2 DISCUSSIONE DEI RISULTATI DELLE ANALISI DEI CAMPIONI DI FARINA

Come precedentemente riportato il metodo analitico utilizzato è stato messo a punto con alcune modifiche a partire dalla SOP FT 7.5-02-002 Determinazione di aflatossina B₁ in granelle e foraggio mediante HPLC. I risultati sono stati soddisfacenti, in quanto hanno permesso una riduzione dei volumi di solventi utilizzati e dei tempi di processazione dei campioni in analisi. La metodica ha infatti garantito un'elevata percentuale di recupero (circa 85%), un LOD e un LOQ rispettivamente di 0,15 ppb e di 0,5 ppb, valori molto inferiori al limite di legge, che in tutti i cereali e loro prodotti derivati, risulta essere pari a 2 ppb, per quanto stabilito nel Reg (CE) n. 1881/2006. È importante sottolineare la validità della procedura di estrazione che, pur non prevedendo un passaggio di clean-up su colonnine SPE o di immunoaffinità, ha consentito di ottenere dei campioni analitici caratterizzati dall'assenza di interferenti nel tracciato cromatografico. Ottima è risultata la linearità delle curve di taratura, sia nella curva di riferimento che in quella di calibrazione, con un coefficiente di determinazione sempre maggiore di 0,999. In ultimo il gradiente messo a punto per la conduzione delle analisi in HPLC, insieme all'uso di una colonna di tipo monolitico, ha consentito un miglioramento dell'efficienza ed una riduzione della durata delle corse cromatografiche. Sono stati analizzati 90 campioni di farina di cui 14 sono risultati positivi alla prima analisi di screening, rappresentando il 15,5% sul totale dei campioni. Si tratta di farine di mais, nello specifico 4 biologiche (rappresentando il 28,6% sul totale dei positivi) e 10 convenzionali (rappresentando il 71,4% sul totale dei positivi). Si è deciso quindi di proseguire con ulteriori accertamenti su questi campioni positivi. Per ciascuno di essi, previa accurata miscelazione, è stata prelevata un'aliquota di 20 grammi a sua volta accuratamente miscelata, e suddivisa in quattro sub-aliquote da 5 grammi e successivamente analizzate. Un ulteriore prelievo di 20 grammi poi suddiviso in 4 sub-aliquote è stato condotto su 5 di questi campioni positivi e quindi analizzato. Per le considerazioni di seguito riportate è stato preso come riferimento, nella concentrazione da attribuire a ciascun campione di farina, la media delle concentrazioni rilevate nelle prime 4 aliquote da 5 grammi analizzate. I dati ottenuti confermano quanto già riportato in letteratura: una maggiore incidenza di contaminazione nel mais rispetto al frumento. Considerando

il dato dei campioni positivi in rapporto al totale dei soli campioni di farina di mais, la loro percentuale sale al 28%, un valore in questi termini non trascurabile. D'altra parte invece, se si pone l'attenzione sulla concentrazione di AFB₁ in questi campioni, si nota come i valori non superino il limite di legge, salvo che per un unico isolato caso (campione 49, concentrazione media 3,75 ppb). Questi risultati sembrerebbero confermare che i controlli effettuati a monte della messa in commercio di questi prodotti, garantiscono quantomeno tenori di contaminazione al di sotto dei limiti di legge. Prendendo in esame i soli campioni di farina di mais biologica, la percentuale di positivi è del 50%. Il dato è senz'altro elevato, ma considerando il numero esiguo di campioni di questa categoria analizzati (8), non è possibile affermare che in generale i campioni biologici siano più contaminati da AFB₁. Confrontando i risultati riportati di seguito (Tab. 13) ottenuti nella prima analisi e la media dei risultati relativi alle analisi sulle quattro aliquote da 5 grammi è possibile notare una certa variabilità:

Campione	1^a analisi (screening)	Media Aliquote A-D	Deviazione standard	Coefficiente di variazione (%)
19	0,59	0,40	0,13	27%
21	0,22	0,28	0,04	17%
32	0,37	0,64	0,19	38%
49	0,84	3,75	2,06	90%
61	0,55	0,64	0,06	11%
66	0,29	0,21	0,06	23%
69	0,57	0,08	0,35	107%
70	0,75	0,08	0,47	114%
72	0,20	0,18	0,01	7%
84	3,89	0,29	2,55	122%
86	0,81	0,63	0,13	18%
103	1,31	1,69	0,27	18%
108	0,19	0,98	0,56	95%
111	0,18	0,17	0,01	4%

Tab.. 13. Risultati ottenuti dalla prima analisi e media dei risultati ottenuti dalle analisi delle 4 aliquote

Considerando invece i dati relativi alla concentrazione di AFB₁ nelle singole quattro aliquote A, B, C, D di ogni campione, si può notare una più elevata variabilità. Nello specifico, facendo riferimento alla Tab. 10, la concentrazione di alcune aliquote (campione 49 aliquote A e C, campione 61 aliquota B, campione 103 aliquota C, campione 108 aliquota C) è risultata essere superiore al limite di legge. La stessa considerazione va fatta per le seconde quattro aliquote analizzate (in particolare nel campione 49 aliquota E, campione 103 aliquota E), come illustrato in Tab. 11. Sommando le concentrazioni di AFB₁ nelle diverse aliquote e facendo la media, si sono ottenuti valori largamente rientrati nel limite di legge, salvo che per un unico campione: il 49. Questi dati sembrerebbero avallare la tesi che una aliquota di 5 grammi, pur essendo una sub-aliquota di un totale di 20 grammi, a sua volta accuratamente miscelata, non garantisce una buona rappresentatività. D'altra parte invece, confrontando i valori medi ottenuti dalle prime quattro aliquote, con quelli delle seconde quattro (Tab.14), si evince una variabilità decisamente più bassa, e ciò dimostra una migliore rappresentatività dei 20 grammi nelle analisi.

Campione	Media A-D	Media E-H	Media A-H	Deviazione standard	Coefficiente di variazione (%)
32	0,64	0,32	0,48	0,23	47%
49	3,75	3,72	3,74	0,02	1%
66	0,21	0,21	0,21	0,00	0%
103	1,69	1,74	1,72	0,04	2%
108	0,98	0,23	0,61	0,53	88%

Tab. 14. Confronto della media delle prime e delle seconde aliquote da 4

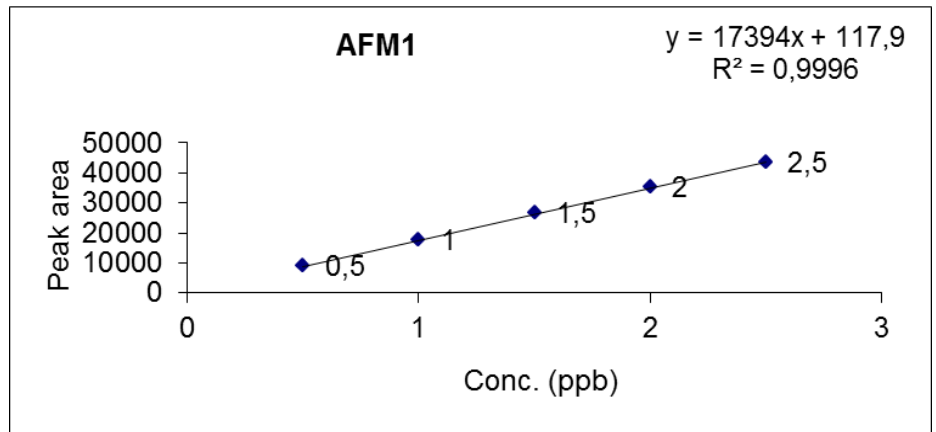
In ultimo, anche per i campioni negativi per la presenza di AFB₁, si è voluto constatare se lo screening con 5 grammi fosse sufficiente a comprovare la loro negatività. I risultati ottenuti mostrano come in due campioni (18, 31) tutte quattro le aliquote sono risultate negative, mentre nei rimanenti due (33, 63) l'aliquota D per il primo e le aliquote A e D per il secondo, riportano una minima positività (rispettivamente 0,21; 0,46 e 0,15 ppb). Questi ultimi risultati però non permettono di promuovere i soli 5 grammi come un attendibile metodo di screening in quanto,

anche nell'ambito delle prove sui campioni positivi condotte con quattro aliquote da 5 grammi, qualche valore è risultato inferiore al LOD.

7.3 RISULTATI DELLE ANALISI DEI CAMPIONI DI LATTE

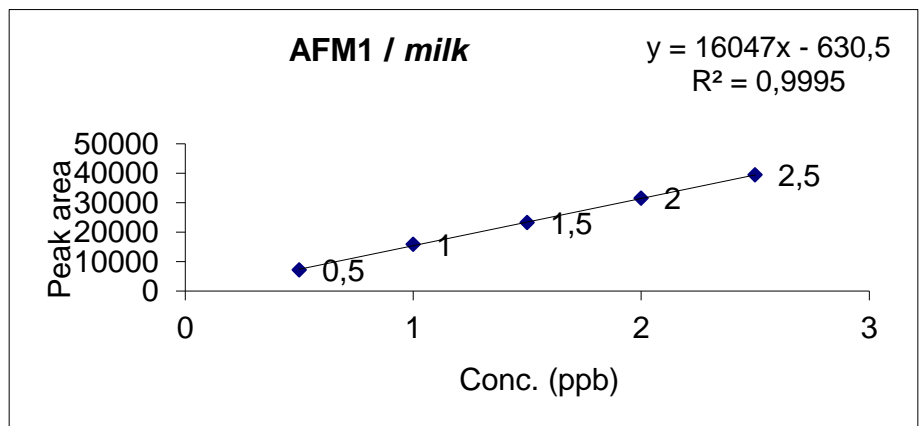
AFM₁ – Curva di riferimento

Conc. (ppb)	Peak area
0,5	8730
1	17361
1,5	26458
2	35198
2,5	43296



AFM₁ – Curva di calibrazione

Conc. (ppb)	Peak area
0,5	7171
1	15850
1,5	23199
2	31537
2,5	39446



Concentrazioni degli standard di riferimento e di calibrazione ricalcolate con l'equazione (*) della curva di regressione e le % di recupero.

Standard di riferimento	
Conc. (ppb)	Peak area
0,5	8730
1	17361
1,5	26458
2	35198
2,5	43296

Standard di calibrazione	
Conc. (ppb)	Peak area
0,5	7171
1	15850
1,5	23199
2	31537
2,5	39446

Equazione della retta di regressione (curva di riferimento):

$$y = 17394x - 117,9$$

$$x = (y + 117,9) / 17394 (*)$$

Dove y = area picco x = concentrazione AFM₁

Standard di riferimento	
Conc. nom. (ppb)	Conc. ricalcolata (*) (ppb)
0,5	0,50
1	0,99
1,5	1,51
2	2,02
2,5	2,48

Standard di calibrazione	
Conc. nom. (ppb)	Conc. ricalcolata (*) (ppb)
0,5	0,41
1	0,90
1,5	1,33
2	1,81
2,5	2,26

Conc. nom. (ppb)	% Recupero
0,5	81,9%
1	91,2%
1,5	87,6%
2	89,5%
2,5	91,1%
media rec.	88,28%

Recupero %= (Valore med. St. di calibrazione / Valore med. St. di riferimento) x 100

LOD (=0,008 ppb) e LOQ (=0,025 ppb)

Analogamente a quanto fatto per le analisi delle farine, il LOD è stato calcolato come il valore corrispondente al triplo del rumore di fondo determinato al tempo di ritenzione di AFM1 in campioni di latte indenne. Il valore medio di 6 determinazioni è stato moltiplicato per 3 e rapportato al segnale di uno standard di riferimento.

I risultati ottenuti dalle analisi dei 153 campioni di latte oggetto della ricerca sono riportati di seguito (Tab. 15):

Campioni analizzati		Concentrazione di AFM₁ in ppb
N. di Riferimento	Specifiche del prodotto	
1	fresco intero bio	n.d.
2	fresco parz scr bio	0,026
3	fresco parz scr bio	0,017
4	fresco parz scr bio	0,017
5	capra intero bio	n.d.
6	UHT intero bio	0,023
7	capra parz scr bio	0,010
8	capra parz scr UHT bio	n.d.
9	UHT parz scr bio	0,021
28	fresco intero bio	n.d.
29	fresco intero bio	n.d.
30	frescointero bio	0,019
88	UHT intero	0,018
89	UHT scremato	0,026
90	capra parz scr UHT	0,010
91	UHT scremato	n.d.
92	UHT parz scr	0,012
93	fresco intero bio	n.d.
94	fresco parz scr bio	0,016
95	capra fresco bio	n.d.
96	UHT parz scr bio	0,014
97	UHT intero bio	n.d.

118	fresco distributore	0,019
119	fresco distributore	0,013
120	fresco intero	0,018
121	UHT parz scr	0,020
122	fresco distributore	n.d.
123	fresco parz scr bio	0,016
124	fresco intero bio	n.d.
125	UHT intero	0,009
126	UHT scremato	0,023
127	UHT scremato	0,016
128	fresco parz scr	0,022
129	fresco parz scr	0,010
130	fresco parz scr	0,010
131	fresco intero	0,025
132	fresco intero bio	n.d.
133	fresco intero	0,015
134	fresco distributore bio	0,009
135	UHT parz scr	0,017
136	UHT scremato	0,009
137	UHT parz scr	0,021
138	UHT scremato	n.d.
139	UHT parz scr	n.d.
140	UHT parz scr	n.d.
141	capra UHT parz scr	n.d.
142	UHT scremato	0,010
143	UHT intero	0,009

144	UHT intero	n.d.
145	UHT parz scr	n.d.
146	UHT intero	0,010
147	capra UHT intero	n.d.
148	UHT parz scr	0,020
149	UHT parz scr	n.d.
150	UHT scremato	n.d.
151	UHT scremato	n.d.
152	fresco parz scr	0,025
153	fresco intero bio	n.d.

Tab.15. Elenco dei campioni di latte e concentrazioni di AFM₁ rilevate

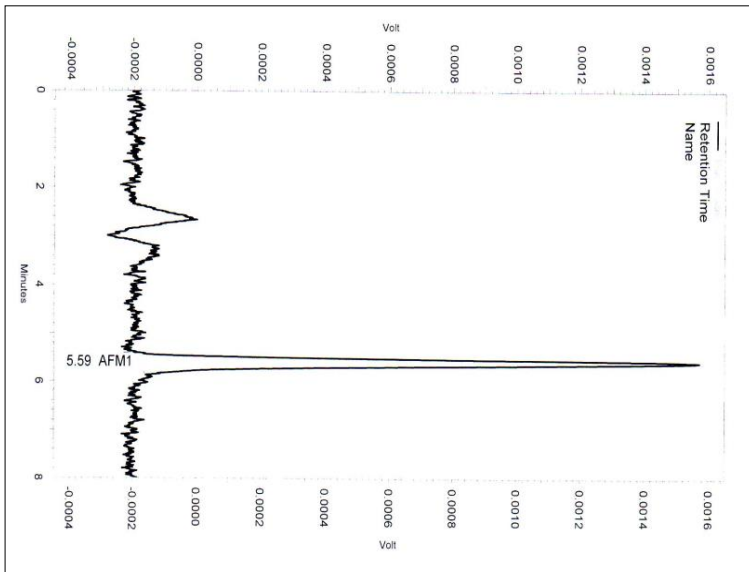


Fig. 15 Cromatogramma standard AFM₁ 1 ppb non estratto

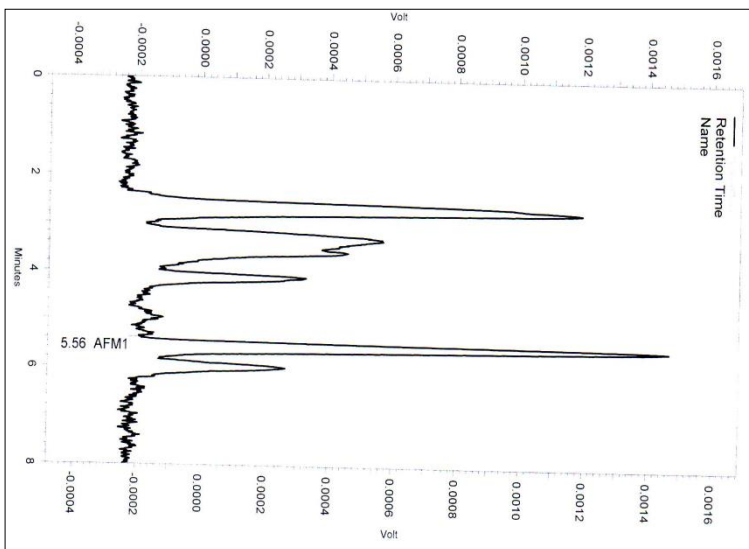


Fig. 16. Cromatogramma Standard AFM₁ 1 ppb estratto

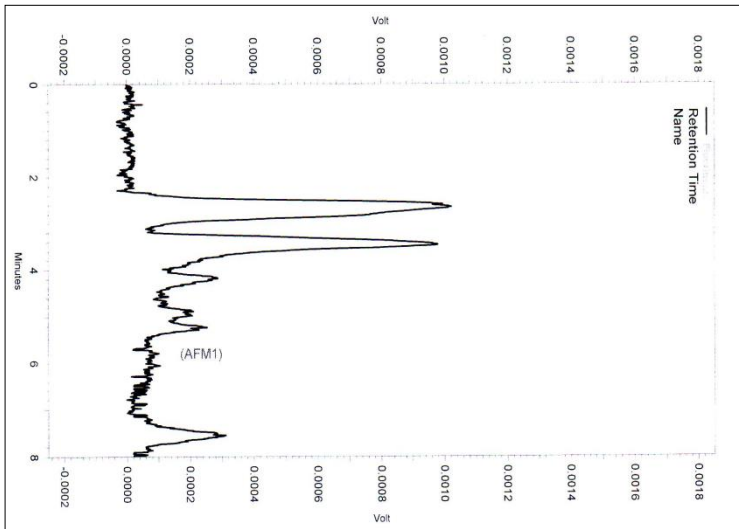


Fig. 17. Cromatogramma campione bianco

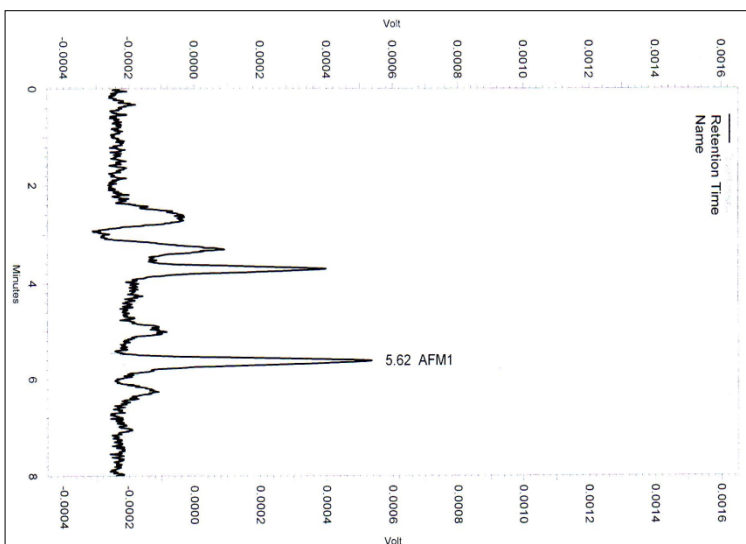


Fig. 18. Cromatogramma campione incognito

7.4 DISCUSSIONE DEI RISULTATI DELLE ANALISI DEI CAMPIONI DI LATTE

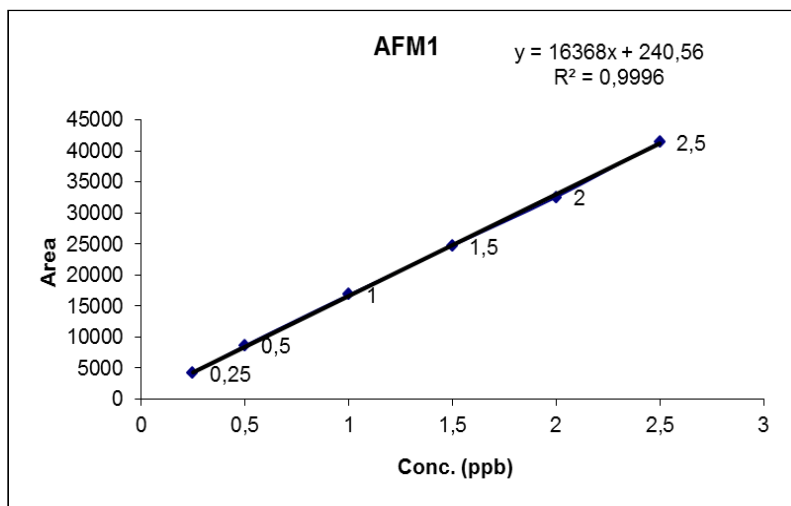
Come precedentemente riportato, per la ricerca di AFM₁ nel latte, è stato scelto di utilizzare la tecnica di estrazione-purificazione dei campioni mediante colonnine di immunoaffinità. È stata dunque seguita la procedura indicata nelle istruzioni fornite dal produttore (VICAM, U.S.A.). Questa procedura rappresenta lo stato dell'arte nella analisi di micotossine nella matrice latte. La praticità della tecnica permette, a monte di un solo passaggio in centrifuga per la scrematura del latte, di caricare direttamente il campione in colonnina. Sono sufficienti quindi due soli lavaggi con acqua e l'eluizione dell'AFM₁ eventualmente presente nel campione, viene effettuata con due brevi passaggi, il primo di soluzione acetonitrile metanolo (3:2) e il secondo di acqua. La metodica ha garantito un'elevata percentuale di recupero (circa 90%), un LOD di 0,008 ppb e un LOQ di 0,025 ppb, valori molto inferiori al limite di legge, che per quanto stabilito nel Reg (CE) n. 1881/2006 nel latte (crudo, trattato termicamente o destinato alla fabbricazione di prodotti a base di latte) risulta essere pari a 0,05 ppb. È importante sottolineare la validità della procedura di clean-up che ha consentito di ottenere dei campioni analitici, pur concentrati 20 volte, caratterizzati dall'assenza di interferenti nel tracciato cromatografico. Ciò ha consentito di valutare concentrazioni di AFM₁ anche molto basse. Ottima è risultata la linearità delle curve di taratura, sia nella curva di riferimento che in quella di calibrazione, con un coefficiente di determinazione sempre maggiore di 0,999. Per quanto riguarda le condizioni cromatografiche, si è fatto riferimento ad analisi di AFM₁ già effettuate in passato presso i laboratori del Servizio di Farmacologia e Tossicologia, con aggiustamenti nella percentuale della fase mobile utilizzata, che hanno consentito un leggero accorciamento della corsa cromatografica. Sono stati analizzati 58 campioni di latte di cui 35 sono risultati positivi per l'AFM₁ rappresentando il 60,3% sul totale dei campioni esaminati. Nello specifico di questi 35 positivi, 11 provengono da produzione biologica (rappresentando il 31,4% sul totale dei positivi) e 24 da produzione convenzionale (rappresentando il 68,6% sul totale dei positivi). Prendendo in esame i soli campioni di latte biologico (22), la percentuale di positivi è del 50%, mentre considerando i soli campioni di produzione convenzionale (36), la percentuale è del 67%. Le percentuali di positività sono senz'altro elevate, ma se si pone l'attenzione sulla

concentrazione di AFM₁ in questi campioni, si nota come nessuno dei valori superi il limite di legge. Inoltre il livello medio è particolarmente basso (media 0,017 ppb) e la concentrazione massima rilevata è di 0,026 ppb, valore appena superiore al limite più rigoroso definito, da regolamento, per gli alimenti per lattanti (0,025 ppb). Alla luce di questi risultati, valgono analoghe considerazioni già fatte per le farine: i controlli effettuati a monte della messa in commercio di questi prodotti sembrerebbero garantire livelli di contaminazione al di sotto dei limiti di legge. Come ultima considerazione, dal confronto delle concentrazioni di AFM₁ nei campioni di latte (tab. 7) non emergono differenze significative nelle due categorie di prodotti.

7.5 RISULTATI DELLE ANALISI DEI CAMPIONI DI LATTE D'ASINA

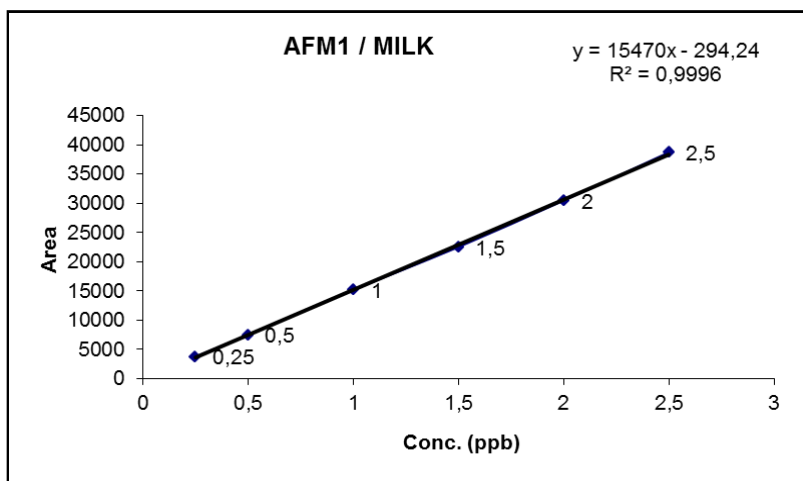
AFM₁ - Curva di riferimento elaborata sulla base di soluzioni standard di AFM₁.

Conc. (ppb)	Peak area
0,25	4141
0,5	8633
1	16835
1,5	24702
2	32509
2,5	41477



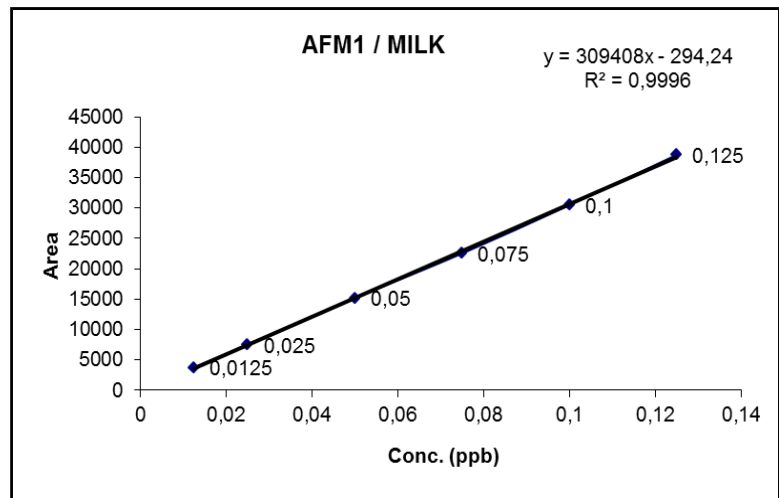
AFM₁ / MILK - Curva di calibrazione elaborata sulla base di soluzioni di AFM₁ estratte da campioni di latte contaminato.

Conc.(ppb)	Peak area
0,25	3763
0,5	7496
1	15155
1,5	22503
2	30453
2,5	38760



AFM₁ / MILK - Curva di calibrazione elaborata con le concentrazioni di AFM₁ in matrice.

Conc. (ppb)	Peak area
0,0125	3763
0,025	7496
0,05	15155
0,075	22503
0,1	30453
0,125	38760



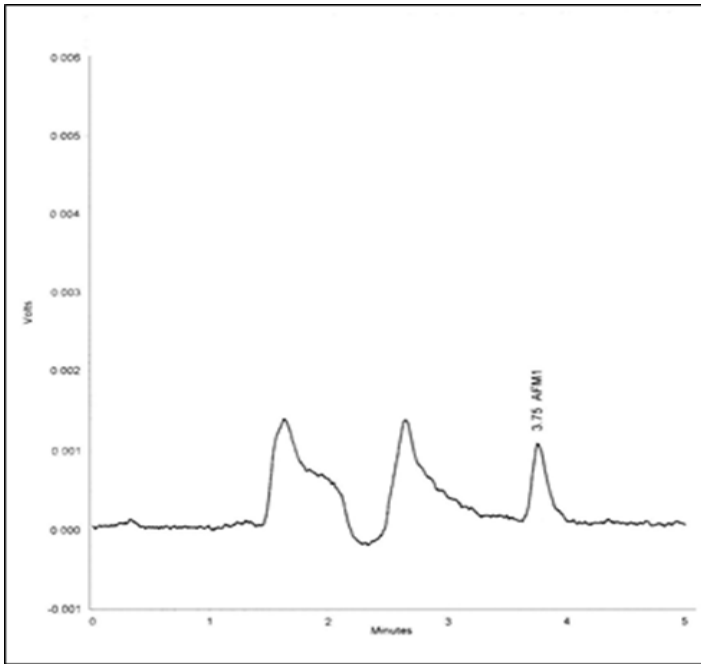


Fig. 19. Cromatogramma relativo ad una soluzione standard di AFM1 0,5 ppb

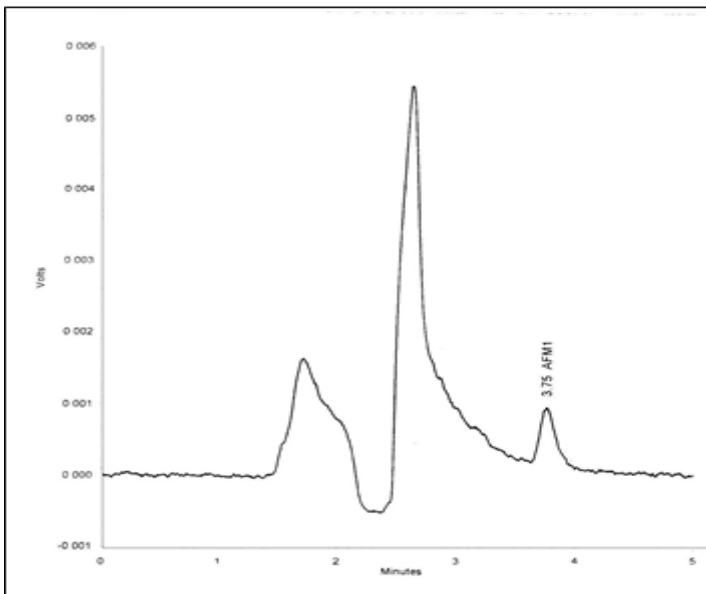


Fig 20. Cromatogramma relativo a un campione latte contaminato con AFM1 (concentrazione finale 0,5 ppb, concentrazione reale nel latte 0,025 ppb corrispondente al limite massimo stabilito per AFM1 nel latte destinato ai lattanti).

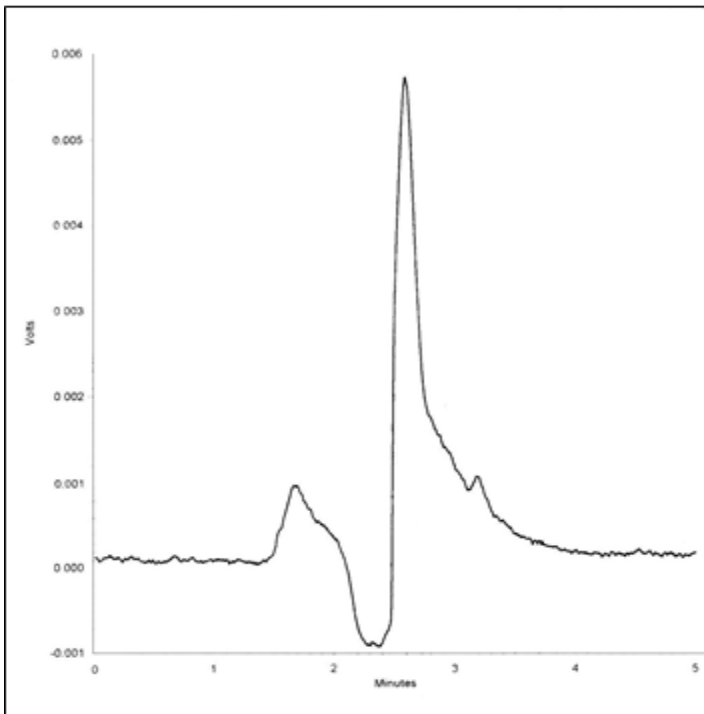


Fig.21. Cromatogramma relativo a un campione bianco

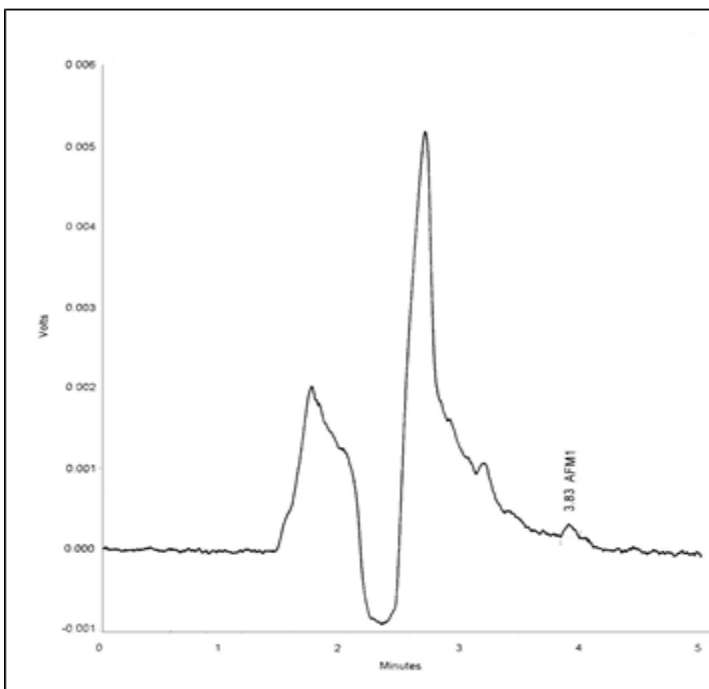


Fig. 22. Cromatogramma relativo al campione di latte risultato positivo all'AFM₁

Dei 63 campioni analizzati, solo il n° 46 è risultato positivo (Fig. 21) , mostrando una concentrazione di micotossina pari a 0,0044 ppb. Tale concentrazione è superiore al limite di rilevabilità (0,0025 ppb), ma inferiore al limite di quantificazione (0,0125 ppb).

7.6 DISCUSSIONE DEI RISULTATI DELLE ANALISI DEI CAMPIONI DI LATTE D'ASINA

Partendo da condizioni analitiche già sperimentate nel nostro laboratorio per questo tipo di analisi, si è lavorato su alcuni parametri al fine di ridurre i tempi della corsa cromatografica e migliorarne la qualità, soprattutto in termini di efficienza. Le condizioni analitiche con cui abbiamo eseguito le prime prove prevedevano una fase mobile composta dal 67% di soluzione H₂O : MeOH (89,5 : 10,5) e dal 33% di CH₃CN. La corsa cromatografica è stata eseguita con eluizione isocratica. Con il flusso impostato a 0,9 ml/minuto, il tempo di ritenzione della AFM₁ era di circa 9 minuti. Successivamente si è provato ad effettuare una eluizione in gradiente, aumentando durante la corsa la percentuale di acetonitrile, che essendo un solvente forte determina tempi di ritenzione minori. Il tempo di ritenzione si è infatti ridotto 6,5 minuti. Nelle prove successive, si sono utilizzati diversi tipi di colonne e si è eliminato il metanolo dalla fase mobile, ottenendo un flusso di 0,7 ml/minuto ed ottimizzando così le condizioni cromatografiche. Tali condizioni analitiche hanno permesso di ottenere un tempo di ritenzione dell'AFM₁ di 3,7 minuti e una corsa totale di soli 5 minuti. I vantaggi ottenuti con tali modifiche sono stati un minor consumo di fase mobile ed un minor tempo necessario per le analisi dei campioni, che si concretizzano in una riduzione dei costi complessivi. Durante la sperimentazione, in tutte le curve di calibrazione allestite, il parametro "linearità", nell'intervallo di concentrazione preso in esame (0,125-0,0125 ppb), è sempre stato soddisfatto. Il coefficiente di determinazione (R²) è risultato > 0,999, mostrando così una buona relazione tra l'area del picco e la concentrazione corrispondente di AFM₁. È stata effettuata una valutazione dei possibili interferenti durante le analisi dei campioni bianchi e dei campioni di latte contaminati con differenti concentrazioni di AFM₁. Al tempo di ritenzione dell'AFM₁ non è stato osservato nessun picco interferente. Il tempo di ritenzione dell'AFM₁, sia in matrici contaminate sia in soluzioni standard, è stato di circa 3,8 minuti, valore che si è mantenuto stabile per tutta la durata della sperimentazione. La durata della corsa cromatografica è stata di 5 minuti. L'accuratezza e la precisione sono state calcolate considerando 9 determinazioni effettuate su tre standard di calibrazione alla concentrazione di 0,5, 1, 2 ppb, preparati e analizzati in tre giorni diversi. Il coefficiente di variazione (CV%) era nel range 5-11,5% e l'errore relativo (Er%) variava

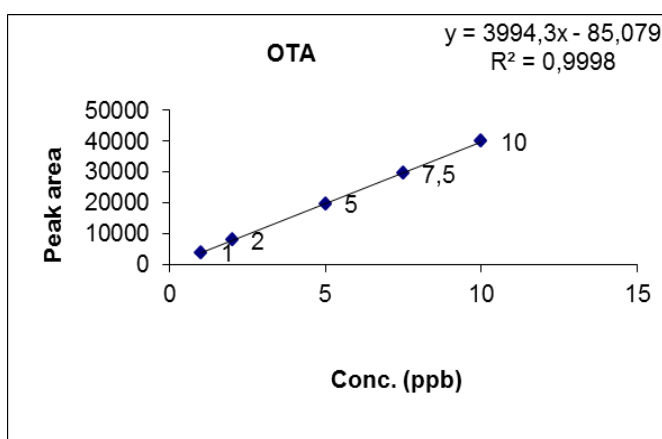
da -3,1% a -5,9%. Il LOD e il LOQ del metodo erano rispettivamente 0,0025 ppb e 0,0125 ppb. Il LOD è stato ricavato come descritto nel paragrafo *Materiali e Metodi* prendendo in esame 15 campioni diversi. La percentuale di recupero media nell'intervallo testato (0,0125-0,125 ppb) è risultata dell'87,7%. Come riportato nel paragrafo 5.2.2, per la determinazione di aflatossina M₁ nel latte, è stata adottata la tecnica di estrazione-purificazione basata sull'uso delle colonnine di immunoaffinità. Questa metodica non presenta passaggi laboriosi, infatti, una volta sgrassati, i campioni, vengono caricati direttamente sulle colonnine di immunoaffinità. Sono quindi richiesti solo pochi passaggi, e cioè due lavaggi con acqua e due passaggi per l'eluizione di AFM₁, prima con soluzione acetonitrile-metanolo, poi con acqua. Effettuando l'estrazione con questa tecnica, si è ottenuto un cromatogramma di elevata qualità, infatti al tempo di ritenzione dell'AFM₁ non si presentava nessun interferente. La tecnica di estrazione-purificazione adottata consentiva di concentrare l'analita di 20 volte e di conseguenza di valutare concentrazioni molto piccole, ben al di sotto del limite di legge (0,025 µg/kg). Inoltre, gli estratti purificati permettevano un elevato volume di iniezione (100 µl) che, unito alle condizioni cromatografiche adottate, hanno portato a un metodo di analisi molto sensibile. Inoltre tutti i parametri presi in considerazione per la validazione del metodo sono stati soddisfacenti.

7.7 RISULTATI DELLE ANALISI DEI CAMPIONI DI SALAME

Nel corso delle sessioni analitiche sono state preparate ed analizzate 4 curve di riferimento e 2 curve di calibrazione su 5 livelli di concentrazione nel range 1- 10 ppb; sono stati inoltre preparati ed analizzati 5 controlli qualità (QC, standard estratti) a concentrazione 1, 2, 5, 7,5 e 10 ppb.

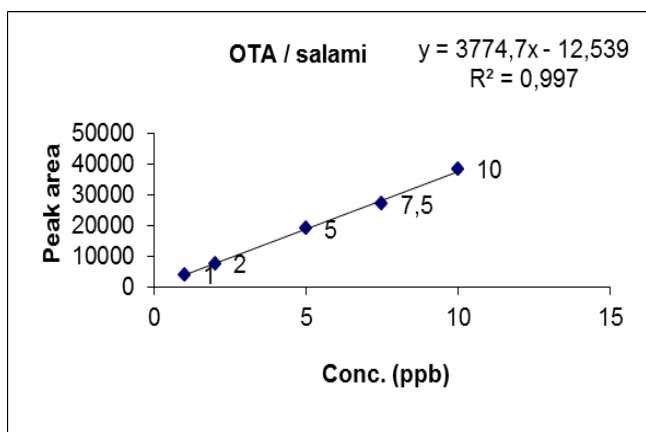
OTA- Curva di riferimento

Conc. nom (ppb)	Peak area
1	3958
2	8022
5	19738
7,5	29614
10	40097



OTA/salami - Curva di calibrazione

Conc. nom (ppb)	Peak area
1	4033
2	7522
5	19025
7,5	27042
10	38570



Conc.	Rec. (%)^a	RSD (%)^a
(ppb)		
2	87.90%	4.12%
5	86.63%	7.32%
8	85.56%	2.76%
10	85.11%	3.72%
media	86.30%	
^a numero di repliche: 3		

Recupero %= (Valore med. St. di calibrazione / Valore med. St. di riferimento) x 100

Il LOD è stato calcolato come il valore corrispondente al triplo del rumore di fondo determinato al tempo di ritenzione di OTA in campioni di salame indenne. Il valore medio di 10 determinazioni è stato moltiplicato per 3 e rapportato ad uno standard di calibrazione. I valori di LOD e di LOQ sono risultati essere rispettivamente 0,05 ppb e 0,2 ppb.

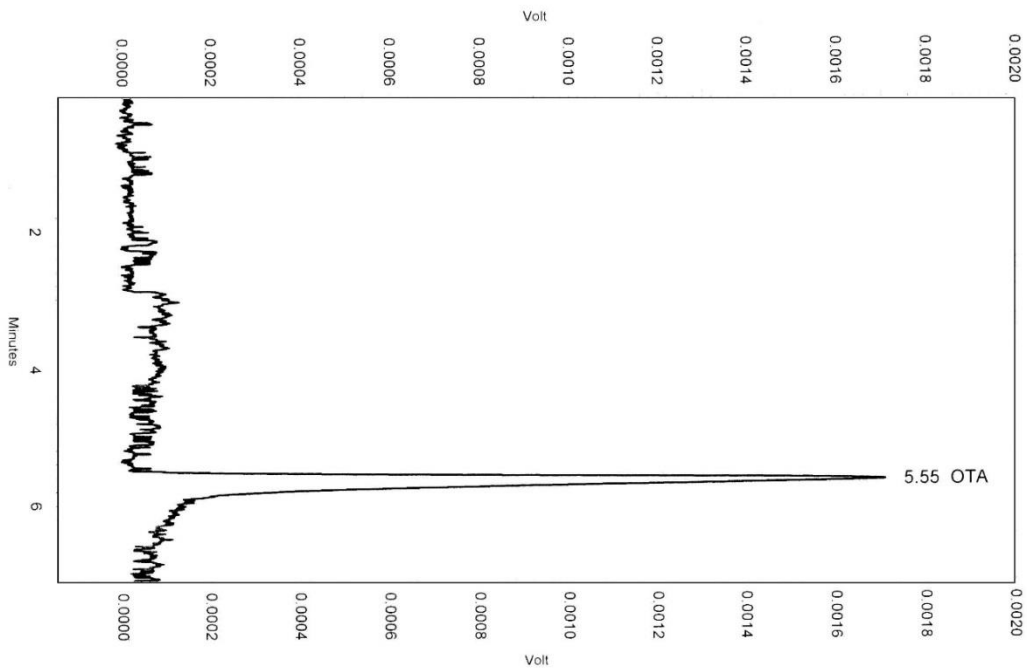


Fig.23. Cromatogramma di uno standard di riferimento di OTA (concentrazione 5ppb)

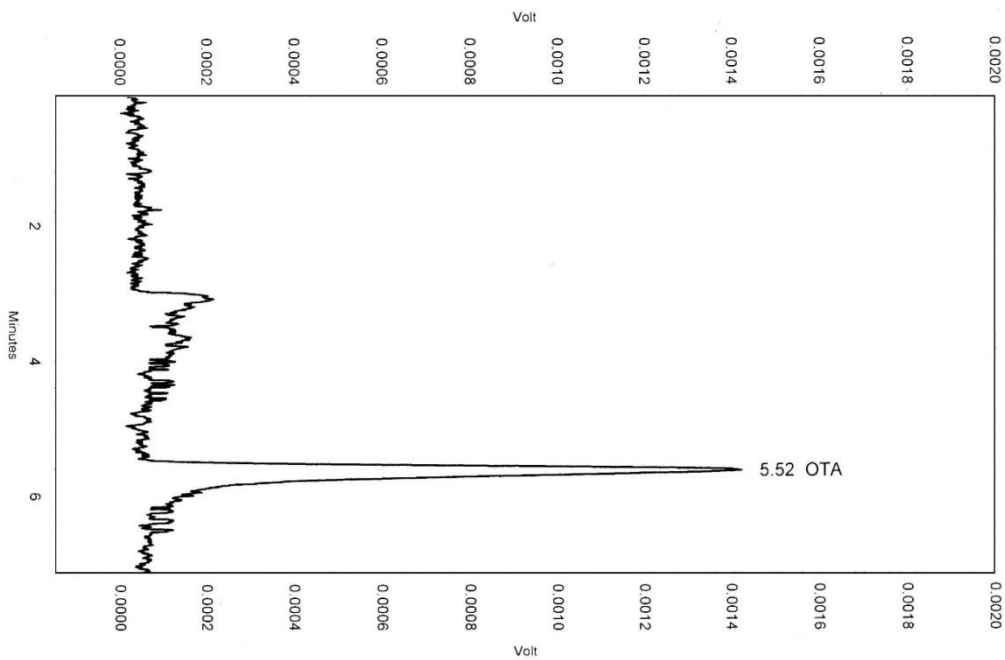


Fig.24. Cromatogramma di uno standard di calibrazione di OTA (concentrazione 5ppb)

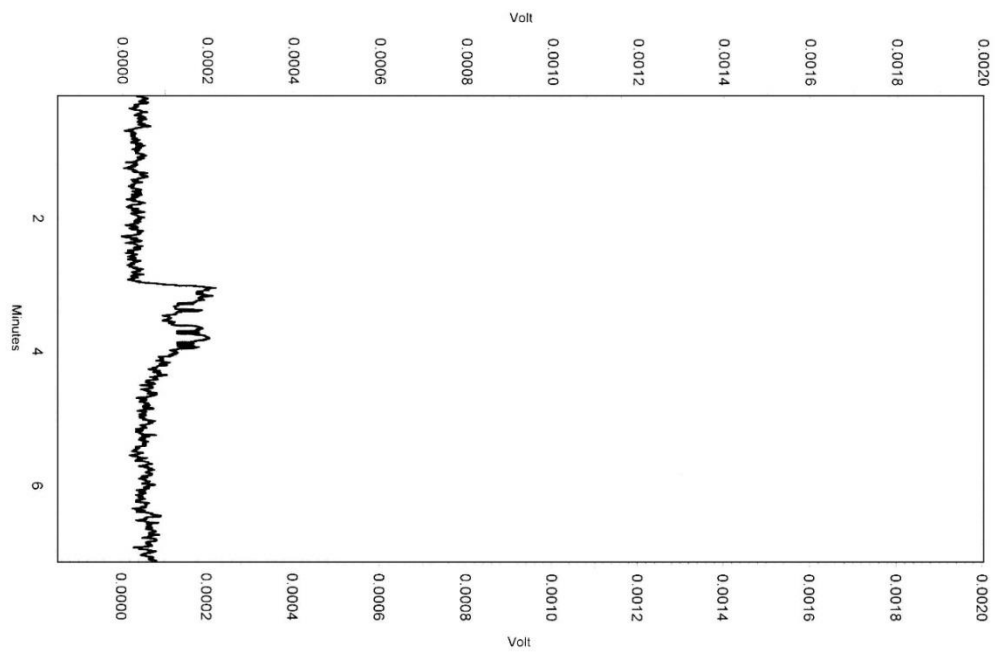


Fig. 25. Cromatogramma di un campione "bianco"

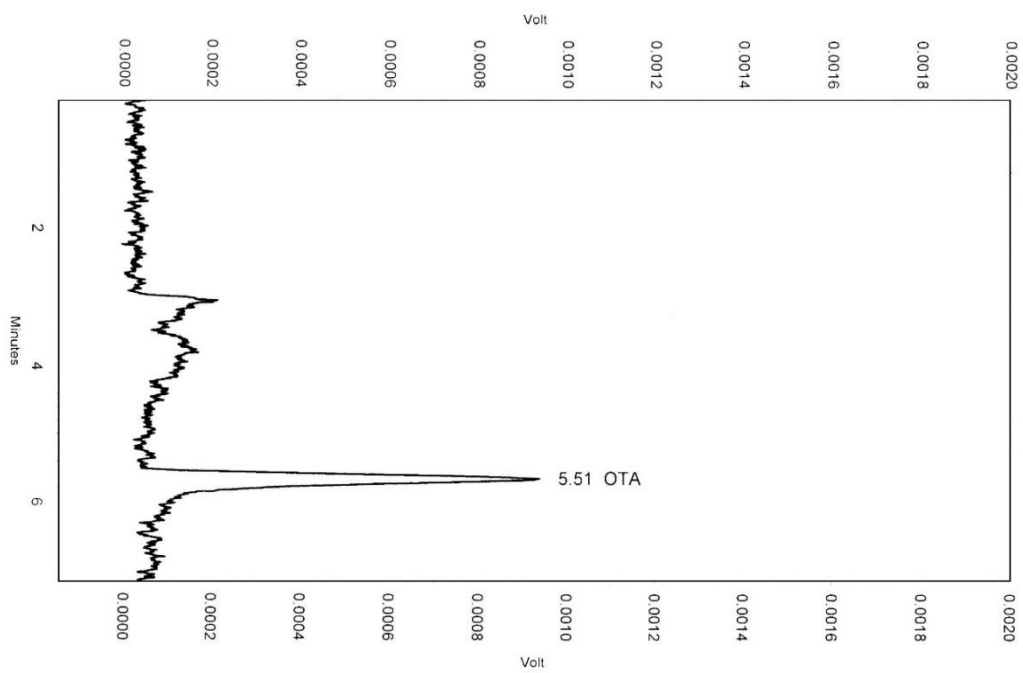


Fig. 26. Cromatogramma di un campione incognito

N. di riferimento	Località di provenienza (provincia)	Tipologia	Concentrazione di OTA in ppb
1	Reggio Calabria	Salciccia dolce	n.d.
2	Reggio Calabria	Salsiccia piccante	n.d.
3	Vibo Valentia	Nduja	0,08
4	Reggio Calabria	Nduja	Tracce
5	Reggio Calabria	Nduja	0,14
6	Reggio Calabria	Soppresata piccante	n.d.
7	Reggio Calabria	Soppresata piccante	Tracce
8	Cosenza	Soppresata dolce	n.d.
9	Reggio Calabria	Soppresata piccante	n.d.
10	Cosenza	Soppresata piccante	n.d.
11	Cosenza	Salsiccia piccante	n.d.
12	Reggio Calabria	Salsiccia dolce	n.d.
13	Reggio Calabria	Salsiccia piccante	Tracce
14	Reggio Calabria	Salsiccia dolce	n.d.
15	Reggio Calabria	Soppresata piccante	n.d.
16	Cosenza	Salsiccia piccante	n.d.
17	Cosenza	Salsiccia piccante	n.d.
18	Cosenza	Nduja	0,13
19	Vibo Valentia	Nduja	0,12
20	Reggio Calabria	Nduja	0,24
21	Cosenza	Salsiccia dolce	n.d.

22	Vibo Valentia	Salsiccia piccante	n.d.
23	Reggio Calabria	Salsiccia dolce	n.d.
24	Reggio Calabria	Salsiccia dolce	n.d.
25	Vibo Valentia	Salsiccia piccante	n.d.
26	Reggio Calabria	Salsiccia piccante	n.d.
27	Reggio Calabria	Salsiccia piccante	Tracce
28	Reggio Calabria	Salsiccia dolce	n.d.
29	Reggio Calabria	Salsiccia dolce	Tracce
30	Reggio Calabria	Salsiccia dolce	n.d.
31	Reggio Calabria	Salsiccia dolce	n.d.
32	Reggio Calabria	Salsiccia dolce	n.d.
33	Reggio Calabria	Salsiccia dolce	n.d.
34	Reggio Calabria	Salsiccia dolce	n.d.
35	Reggio Calabria	Salsiccia piccante	0,16
36	Reggio Calabria	Salsiccia piccante	0,16
37	Reggio Calabria	Salsiccia piccante	0,10
38	Cosenza	Salsiccia piccante	n.d.
39	Cosenza	Salsiccia piccante	0,12
40	Vibo Valentia	Salsiccia piccante	0,20
41	Vibo Valentia	Salsiccia piccante	0,14
42	Reggio Calabria	Salsiccia dolce	0,07
43	Reggio Calabria	Salsiccia piccante	Tracce
44	Reggio Calabria	Salsiccia piccante	n.d.
45	Reggio Calabria	Salsiccia piccante	n.d.
46	Reggio Calabria	Soppresata piccante	n.d.
47	Reggio Calabria	Soppresata piccante	n.d.
48	Reggio Calabria	Nduja	n.d.

49	Vibo Valentia	Nduja	0,62
50	Cosenza	Salsiccia dolce	Tracce

Tab. 16. Elenco dei campioni di salami calabresi e relative concentrazioni di OTA

N. di riferimento	Località di provenienza (provincia)	Tipologia	Concentrazione di OTA in ppb
1	Messina	Salame Sant'Angelo	n.d.
2	Messina	Salame Sant'Angelo	n.d.
3	Messina	Salame tipo Ungherese	0,08
4	Messina	Salame tipo Napoli	Tracce
5	Messina	Salame tipo Milano	0,14
6	Messina	Salame Sant'Angelo	n.d.
7	Messina	Salame piccante	Tracce
8	Messina	Salame di suino nero	n.d.
9	Messina	Salame Sant'Angelo	n.d.
10	Messina	Salame al pistacchio	n.d.
11	Messina	Salame Sant'Angelo	n.d.
12	Messina	Salame Sant'Angelo	n.d.
13	Messina	Salame Sant'Angelo	Tracce
14	Messina	Salame Sant'Angelo	n.d.
15	Messina	Salame Sant'Angelo	n.d.
16	Messina	Salame Sant'Angelo	n.d.
17	Messina	Salame piccante	n.d.
18	Messina	Salame al pistacchio	0,13
20	Messina	Salsiccia dolce	0,24
21	Messina	Salame Sant'Angelo	n.d.

22	Messina	Salame di suino nero	n.d.
23	Messina	Salame Sant'Angelo	n.d.
24	Messina	Salsiccia di suino nero	n.d.
25	Messina	Salame Sant'Angelo	n.d.
26	Messina	Salame Sant'Angelo	n.d.
27	Messina	Salame al pistacchio	Tracce
28	Messina	Salame al pepe nero	n.d.
29	Messina	Salame al peperoncino	Tracce
30	Messina	Salsiccia dolce	n.d.
31	Messina	Salsiccia al peperoncino	n.d.
32	Messina	Salame al pistacchio	n.d.
33	Messina	Salame Sant'Angelo	n.d.
34	Messina	Salame piccante	n.d.
35	Messina	Salame Sant'Angelo	0,16
36	Messina	Salsiccia piccante	0,16
37	Messina	Salsiccia dolce	0,10
38	Messina	Salame piccante	
39	Messina	Salame dolce	
40	Messina	Salame al pistacchio	
41	Messina	Salame suino nero	
42	Messina	Salame Sant'Angelo	
43	Messina	Salame piccante	
44	Messina	Salame piccante	
45	Messina	Lonzino di suino nero	
46	Messina	Salsiccia piccante	
47	Messina	Salsiccia al finocchio	
48	Messina	Salame piccante	

49	Messina	Salame piccante	
50	Messina	Salame dolce	

Tab.17. Elenco dei campioni di salami siciliani e relative concentrazioni di OTA

7.8 DISCUSSIONE DEI RISULTATI DELLE ANALISI DEI CAMPIONI DI SALAME

Per la valutazione quali-quantitativa dell'OTA nei salami calabresi e siciliani è stata ottimizzata una metodica estrattiva già utilizzata nel nostro laboratorio per matrici simili. A tale metodica sono state apportate le dovute modifiche per rendere più efficiente la stessa in matrici come i salami calabresi. La metodica definitiva è descritta nella SOP (Standard Operative Procedure) riportata in Appendice 1. La metodica ha assicurato un'elevata percentuale media di recupero (86,30%), un limite di rilevabilità (LOD) di 0,05 ppb e un limite di quantificazione (LOQ) di 0,2 ppb; questi ultimi valori sono ampiamente al di sotto del limite di legge che, per carne suina e prodotti derivati, risulta essere 1 ppb come stabilito nella Circolare del Ministero della Sanità n.10 del 9/1/1999. La linearità delle curve di taratura è risultata ottima, sia la curva di riferimento, sia quella di calibrazione (coefficiente di determinazione $[R^2]$ sempre maggiore di 0,999). La procedura, che consta di una fase di estrazione e una di purificazione mediante colonnine di immuno-affinità (IAC), ha permesso di ottenere dei campioni analitici concentrati 5 volte e privi di interferenti di matrice a livello cromatografico. Questo ha permesso di valutare concentrazioni di ocratossina A molto basse. Relativamente ai salami calabresi, è stata rilevata la presenza di OTA in 20 campioni. Di questi 3 sono risultati sopra il LOQ e 10 sopra il LOD. Inoltre, altri 7 campioni presentavano tracce di ocratossina, cioè in concentrazioni al di sotto del LOD. Va sottolineato il fatto che le concentrazioni rilevate nei campioni analizzati sono risultate ampiamente inferiori al limite di legge pari a 1 ppb stabilito per questo tipo di matrice. Infatti, la concentrazione più elevata, riscontrata in una Nduja di produzione artigianale proveniente dalla provincia di Reggio Calabria (campione 49), è risultata essere di 0,62 ppb. Nel complesso i campioni che hanno riportato una seppur minima traccia di contaminazione sono stati il 40% del totale, senza distinzioni significative in base alla provenienza (diversa all'interno della regione Calabria). Tra le varie tipologie di salami calabresi considerati, la più contaminata è risultata essere la Nduja. Infatti, se sul totale dei campioni la percentuale di salami contaminati da OTA non supera il 40%, lo stesso non si può dire per quanto riguarda i campioni di Nduja analizzati, che riportano una percentuale di contaminazione dell'87,5%. In ben 7 campioni di Nduja su 8 è stata rilevata la presenza di OTA, seppure in concentrazioni molto basse.

Per quanto riguarda il salame piccante, la percentuale di contaminati è risultata del 40% (10 campioni contaminati su 25). Nei salami dolci, nei quali è utilizzata crema di peperoni e non peperoncini, la percentuale scende ancora, arrivando al 17,6% (3 campioni contaminati su 17). Dall'analisi statistica condotta con il test del t di Student sulle concentrazioni di OTA nei campioni di Nduja e di salame dolce, risulta che le prime sono significativamente maggiori ($P < 0,05$). Diversamente, secondo il test, non risultano differenze significative né fra le concentrazioni di OTA in Nduja e salame piccante, né fra quelle rilevate in salame piccante e salame dolce. Infine, considerando l'intera categoria di salami che contengono peperoncino (Nduja e salami piccanti) e confrontandone le concentrazioni di OTA con quelle del salame che non contiene tale spezia, risultano le concentrazioni dei primi essere significativamente maggiori. Questi dati sembrano indicare che la quantità di peperoncino presente nelle varie classi di salami influisce sul livello di contaminazione di tali prodotti. Per quanto riguarda i salami siciliani, l'OTA è stata riscontrata in 5 campioni, di questi solo uno presentava una concentrazione di micotossina (1.03 mg/kg-1) al di sopra del limite raccomandato dalla legge.

8. CONCLUSIONI

È ormai noto che le micotossine rappresentano un rischio per la salute umana. Data la loro variegata distribuzione, possono giungere all'uomo attraverso numerosi alimenti. Il punto di partenza è solitamente rappresentato dalla contaminazione fungina dei cereali, sia in campo sia in magazzino. I cereali sono i costituenti basilari della dieta degli animali da produzione, e proprio attraverso la contaminazione dei prodotti derivati da essi possono essere assunti dall'uomo. I livelli di contaminazione registrati in latte e farina acquistati a Bologna e provincia non hanno superato, salvo in un unico caso, il limite definito a livello comunitario, dimostrando un funzionale filtro di controlli prima della messa in commercio di prodotti alimentari come le farine e il latte. I risultati ottenuti dalle analisi dei prodotti biologici non permettono di riscontrare una significativa differenza nella contaminazione da aflatossine. In virtù di questi dati si può ipotizzare come le stesse buone pratiche colturali promosse dal biologico, come ad esempio la rotazione delle colture o l'accurata scelta delle specie da coltivare, si presentino come alternative vincenti all'uso di pesticidi nella cura dello stress delle piante, e quindi anche nella lotta alle micotossine. Relativamente al latte d'asina, in un unico campione è stata riscontrata la presenza della micotossina ma, anche in questo caso, molto al di sotto del limite di 0,025 µg/kg fissato per legge. Dai dati ottenuti si evince che alle asine è stato fornito mangime non contaminato, grazie a controlli efficaci sui cereali. Dal momento che i principali consumatori di latte d'asina sono neonati, bambini ed anziani, è molto importante monitorare regolarmente sia il latte che i mangimi destinati agli animali produttori. Per quanto riguarda i salami, il numero di campioni risultati contaminati da OTA è stato di 21 su 100. In matrici complesse come i salami è difficile identificare un'unica via di contaminazione. Nei salami inoltre si utilizzano notevoli quantità di spezie, le quali sono un possibile fonte di OTA, come si può intuire dai risultati da noi ottenuti. Un'altra possibilità fonte di contaminazione è il budello. Quando non si utilizzano colture microbiche starter, come spesso accade nelle produzioni artigianali, esso può costituire un eccellente substrato per lo sviluppo di muffe ocratossigene, come riportano Grazia *et al.* (2011). Dalla ricerca effettuata è emerso che la

Nduja è tra i prodotti tipici calabresi quello più contaminato, in 7 degli 8 campioni analizzati è stata infatti riscontrata la presenza di OTA. I prodotti analizzati provenivano da diverse province del territorio calabrese e sono stati realizzati in maniera artigianale seguendo i tradizionali sistemi di lavorazione e stagionatura. È importante sottolineare che in nessuno di essi, come in tutti i campioni da noi analizzati, è stato superato il valore guida di 1 µg/kg, tuttavia tali dati conducono a considerare la Nduja come un prodotto ad elevato rischio di contaminazione di OTA. Questa considerazione ha diverse possibili spiegazioni. Numerosi studi hanno sottolineato come la distribuzione e l'accumulo di OTA sia diverso nelle varie parti della carcassa del suino, variando in ordine decrescente da plasma, polmone, cuore, rene, bile, fegato, grasso e infine muscolo (Rossi, 2009; Giordani, 2010). Una delle cause della contaminazione della Nduja potrebbe quindi essere l'utilizzo nel suo impasto di organi come polmone e cuore. Altra possibile causa potrebbe essere l'elevata quantità di peperoncino contenuta al suo interno, caratteristica che la differenzia dalle altre preparazioni tipiche calabresi. In conclusione, i risultati acquisiti indicano che un continuo monitoraggio è importante al fine di assicurare al consumatore prodotti sicuri, considerando anche l'interesse sempre maggiore per i prodotti tradizionali, biologici e di nicchia. Unitamente ai controlli, bisogna incoraggiare la prevenzione della contaminazione degli alimenti. Questi sono attualmente gli unici mezzi di cui si dispone per combattere le micotossine, in quanto i metodi di decontaminazione degli alimenti sono oggi ancora in fase sperimentale.

APPENDICE I

SOP (Standard Operating Procedure)



Alma Mater Studiorum –Università di Bologna
Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie

Procedura Operativa Standard

Pag. 105 di 146

SOP FT

Rev. 0


L'utilizzatore si impegna, una volta ricevuta l'informazione di una nuova revisione del documento, a distruggere la copia della revisione precedente in suo possesso.

DETERMINAZIONE DI AFLATOSSINA B1 IN FARINE DI MAIS E GRANO MEDIANTE HPLC

Lista di distribuzione

Funzione	Nome e Cognome	Firma	Data
	(inserire solo se i destinatari non sono raggiungibili elettronicamente)		
Docenti afferenti al Servizio FT			
Tecnici afferenti al Servizio FT			
Personale non strutturato afferente al Servizio FT			

Preparato	Data	Verificato	Data	Approvato	Data

 Alma Mater Studiorum –Università di Bologna Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie	Procedura Operativa Standard	Pag. 106 di 146
	SOP FT	Rev. 0

INDICE

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE 3
2. RIFERIMENTI 3
3. DEFINIZIONI E ABBREVIAZIONI 3
4. QUALIFICA DEL PERSONALE 4
5. PARAMETRI AMBIENTALI 4
6. MATERIALI ED APPARECCHIATURE DA UTILIZZARE 4
7. MODALITA' OPERATIVE 9
8. INDICAZIONE PER LA PRESENTAZIONE DEI RISULTATI DI PROVA 10
9. PRESCRIZIONI DI SICUREZZA 12
10. PRESCRIZIONI AMBIENTALI 13



Alma Mater Studiorum –Università di Bologna
Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie

Procedura Operativa Standard

Pag. 107 di 146

SOP FT

Rev. 0

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

1.1. Scopo e campo di applicazione

Lo scopo dello studio è la messa a punto di un metodo HPLC per la valutazione quali-quantitativa di Aflatossina B1 (AFB1) in farine di mais e grano.

1.2. Quantità di campione

I campioni devono essere separati per tipo di matrice. La quantità di campione non dovrebbe essere inferiore a 100 g.

1.3. Campi di misura

1.3.1. La quantità di Aflatossina B1 nelle diverse matrici sarà espressa come ng di AFB1 per g di matrice (ng/g o ppb).

1.3.2. La concentrazione di AFB1 degli standard di riferimento sarà espressa come µg o ng di AFB1 per ml di solvente (µg/ml o ppm; ng/ml o ppb).

1.3.3. LOD (vedi punto 3.1.) = 0,15 ng/ml

1.3.4. LOQ (vedi punto 3.2.) = 0,5 ng/ml

2. RIFERIMENTI

2.1. Simonella et al., (1990) Atti S.I.S.Vet, **XLIV**, 1149-1155

2.2. Cirilli et al., (1986) Tecnica molitoria, **37**, 98-106

2.3. Decreto Legislativo 81/2008 e successive modifiche ed integrazioni

3. DEFINIZIONI E ABBREVIAZIONI

3.1. LOD (Limit of Detection) = limite di rilevabilità = concentrazione minima di un analita che può essere rilevata in modo attendibile.

3.2. LOQ (Limit of Quantitation) = limite di quantificazione = concentrazione minima di un analita che può essere quantificata con accettabile accuratezza e precisione.



Alma Mater Studiorum –Università di Bologna
Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie

Procedura Operativa Standard

Pag. 4 di 146

SOP FT

Rev. 0

3.3. Campione di controllo = campione delle diverse matrici (mais e grano) nel quale non sono state rilevate, dopo valutazione quali-quantitativa per la presenza di aflatossina B1 secondo il procedimento analitico descritto al punto 7.1., tracce cromatografiche dello stesso.

3.4. Campione arricchito = campione di controllo (vedi punto 3.3.) delle diverse matrici (mais e grano) addizionato di opportune quantità di standard puro di AFB1 (vedi punto 6.1.3.5.).

3.4. Standard di riferimento = standard non estratto = soluzione dell'analita di identità e purezza documentata a concentrazione nota.

3.5. Standard di calibrazione = standard estratto = soluzione dell'analita ottenuta da un campione arricchito sottoposto alla procedura di estrazione.

3.6. AFB1 = Aflatossina B1

3.7. D.P.I. = Dispositivi di Protezione Individuale

3.8. IARC = International Agency for Research on Cancer

4. QUALIFICA DEL PERSONALE

Per l'esecuzione della metodica è possibile impiegare personale privo di particolari specializzazioni, ma opportunamente affiancato da un supervisore (personale docente, ricercatore o responsabile tecnico del Servizio) per quanto concerne il procedimento estrattivo cui sottoporre i campioni in esame; è necessario invece un certo grado di specializzazione ed esperienza per l'esecuzione delle analisi in HPLC, l'interpretazione dei risultati e l'elaborazione dei dati, mansioni riservate alle figure sopra citate o anche a personale non strutturato (dottorandi e assegnisti di ricerca, contrattisti, ecc..) debitamente addestrato ed autorizzato a svolgere le suddette attività.

5. PARAMETRI AMBIENTALI

n.a.

6. MATERIALI ED APPARECCHIATURE DA UTILIZZARE

6.1. PRODOTTI CHIMICI

6.1.1. Reattivi chimici

6.1.1.1. Aflatossina B1, analytical standard grade

6.1.1.2. Acetonitrile (CH₃CN), HPLC grade

6.1.1.3. Acqua (H₂O), HPLC grade

6.1.1.4. Alcool Isopropilico (CH₃CHOHCH₃), HPLC grade

6.1.1.5. Metilene cloruro (CH₂Cl₂), RPE

6.1.1.6. Acido acetico glaciale (CH₃COOH)(99,9%), HPLC grade



6.1.1.7. Acido citrico [COOHCH₂C(OH)COOHCH₂COOH•H₂O] ACS-ISO

6.1.1.8. Acido Trifluoroacetico (TFA) (C₂HF₃O₂) (99%)

6.1.1.9. Acido Solforico (H₂SO₄) (96%), RPE

6.1.1.10. Bombola Azoto Ricerca

☺!!! L'AFLATOSSINA B1 E' UN AGENTE CANCEROGENO PER L'UOMO - TUTTI I SOLVENTI ORGANICI DEVONO ESSERE CONSIDERATI COME POTENZIALMENTE PERICOLOSI - Tutti i passaggi in cui ne è previsto l'uso devono essere condotti sotto una adeguata cappa aspirante (classe A) - Gli operatori devono munirsi di adeguati D.P.I. (camice, guanti e occhiali).

6.1.2. Soluzioni

6.1.2.1. Acido acetico 1%

- Misurare accuratamente 198 ml di H₂O in un cilindro da 250 ml.
- Usando una pipetta graduata da 2 ml, aggiungere 2 ml di CH₃COOH .
- Agitare con una bacchetta di vetro.
- Trasferire in un matraccio da 200 ml.
- Tappare e agitare per inversione.
- Etichettare e conservare a 5 ± 3 °C.
- Questa soluzione è stabile per 6 mesi a 5 ± 3 °C.

6.1.2.2. Acido citrico 20%

- Pesare 50 ± 0.01 g di acido citrico in un matraccio tarato da 250 ml.
- Aggiungere 200 ml di H₂O.
- Tappare e agitare per inversione.
- Sonicare per 5 minuti.
- Portare a volume.
- Etichettare e conservare a 5 ± 3 °C.
- Questa soluzione è stabile per 6 mesi a 5 ± 3 °C.

6.1.2.3. Acqua:Acetonitrile (90:10 v/v)

- Misurare accuratamente 80 ml di H₂O con un cilindro da 100 ml.
- Trasferire in un matraccio da 100 ml.
- Aggiungere 10 ml di CH₃CN con una pipetta tarata da 10 ml.
- Tappare e agitare per inversione.
- Attendere 10 min e portare a volume con H₂O.
- Etichettare e conservare a 5 ± 3 °C.
- Questa soluzione è stabile per 6 mesi a 5 ± 3 °C.

6.1.2.4. Acqua:Acetonitrile:Isopropanolo:Acido acetico1% (91:1:1:7 v/v) (fase mobile A)



- Misurare accuratamente 910 ml di H₂O con un cilindro da 1000 ml.
- Usando una pipetta graduata da 10 ml, aggiungere 10 ml di di CH₃CN
- Usando una pipetta graduata da 10 ml, aggiungere 10 ml di di CH₃CHOHCH₃
- Misurare accuratamente 70 ml di CH₃COOH 1% con un cilindro da 100 ml.
- Aggiungere agli altri tre solventi nello stesso cilindro da 1000 ml.
- Agitare con una bacchetta di vetro.
- Trasferire in un matraccio o direttamente in bottiglia per solventi HPLC.
- Agitare per inversione.
- Etichettare e conservare a temperatura ambiente.
- Questa soluzione è stabile per 6 mesi.

6.1.2.5. Acqua:Acetonitrile:Isopropanolo:Acido acetico1% (43:25:25:7 v/v) (fase mobile B)

- Misurare accuratamente 430 ml di H₂O in un cilindro da 1000 ml.
- Misurare accuratamente 250 ml di CH₃CN in un cilindro da 250 ml.
- Aggiungere al primo solvente nello stesso cilindro da 1000 ml.
- Misurare accuratamente 250 ml di CH₃CHOHCH₃ in un cilindro da 250 ml.
- Aggiungere agli altri due solventi nello stesso cilindro da 1000 ml.
- Misurare accuratamente 70 ml di CH₃COOH 1% in un cilindro da 100 ml.
- Aggiungere agli altri tre solventi nello stesso cilindro da 1000 ml.
- Agitare con una bacchetta di vetro.
- Trasferire in un matraccio o direttamente in bottiglia per solventi HPLC.
- Agitare per inversione.
- Etichettare e conservare a temperatura ambiente.
- Questa soluzione è stabile per 6 mesi.

6.1.2.6. Acido Solforico 1% (soluzione per acidificare vetreria)

- Misurare accuratamente 495 ml di H₂O in un cilindro da 500 ml.
- Usando una pipetta graduata da 5 ml, aggiungere 5 ml di H₂SO₄.
- Agitare con una bacchetta di vetro.
- Trasferire in un matraccio da 500 ml.
- Tappare e agitare per inversione.
- Etichettare e conservare a temperatura ambiente.
- Questa soluzione è stabile per 12 mesi.

6.1.3. Soluzioni standard

6.1.3.1. Soluzione madre di AFB1 (0.5 mg/ml)

- Solubilizzare 1 mg di AFB1 polvere cristallina con 2 ml di Acetonitrile.
- Conservare a temperatura < -18 °C.
- Questa soluzione è stabile per 36 mesi a temperatura < -18 °C.



6.1.3.2. Soluzioni standard di stoccaggio (in Acetonitrile)

- 1 ml Soluzione AFB1 0.5 mg/ml + 9 ml Acetonitrile = **50 µg/ml** (50 ppm)
- 1 ml Soluzione AFB1 50 µg/ml + 9 ml Acetonitrile = **5 µg/ml** (5 ppm)
- 1 ml Soluzione AFB1 5 µg/ml + 4 ml Acetonitrile = **1 µg/ml** (1 ppm)

6.1.3.3. Soluzioni standard di lavoro (in Metilene cloruro)

- Trasferire 1 ml di soluzione AFB1 1 µg/ml in una provetta di vetro da 10 ml precedentemente acidificata (vedi punto 7.).
- Essiccare sotto azoto o in evaporatore-concentratore Univapo.
- Solubilizzare il residuo con 5 ml di CH₂Cl₂ = **200 ng/ml**
- Vortexare (1 min).

6.1.3.4. Preparazione degli standard di AFB1 per le curve di riferimento

- Trasferire 100 µl di soluzione AFB1 200 ng/ml in provette di vetro 16x100 mm precedentemente acidificate ed essiccare sotto azoto o in evaporatore-concentratore Univapo.
- Derivatizzare nel modo seguente:
 - Solubilizzare il residuo essiccato con 20 µl di TFA.
 - Vortexare (5 sec), attendere 10 min.
 - Aggiungere 1.980 ml di Soluzione 6 = **10 ng/ml**
 - Vortexare (1 min) e lasciare reagire al buio per almeno 20 min.

La derivatizzazione viene effettuata allo stesso modo per tutti gli standard, indipendentemente dalla loro concentrazione.

- Trasferire 75 µl di soluzione AFB1 200 ng/ml in provette di vetro 16x100 mm precedentemente acidificate ed essiccare sotto azoto o in evaporatore-concentratore Univapo.
- Derivatizzare = **7.5 ng/ml**
- Trasferire 50 µl di soluzione AFB1 200 ng/ml in provette di vetro 16x100 mm precedentemente acidificate ed essiccare sotto azoto o in evaporatore-concentratore Univapo.
- Derivatizzare = **5 ng/ml**
- Trasferire 25 µl di soluzione AFB1 50 ng/ml in provette di vetro 16x100 mm precedentemente acidificate ed essiccare sotto azoto o in evaporatore-concentratore Univapo.
- Derivatizzare = **2.5 ng/ml**



- Trasferire 10 µl di soluzione AFB1 50 ng/ml in provette di vetro 16x100 mm precedentemente acidificate ed essiccare sotto azoto o in evaporatore-concentratore Univapo.
- Derivatizzare = **1 ng/ml**
- Trasferire 5 µl di soluzione AFB1 50 ng/ml in provette di vetro 16x100 mm precedentemente acidificate ed essiccare sotto azoto o in evaporatore-concentratore Univapo.
- Derivatizzare = **0.5 ng/ml**

6.1.3.5. Preparazione degli standard di AFB1 estratti per le curve di calibrazione

Le curve di calibrazione devono essere allestite separatamente per ogni matrice.

Per preparare gli standard di calibrazione, aliquote di 5 ± 0.01 g di campione di controllo vanno arricchite con i seguenti volumi delle soluzioni standard di lavoro di seguito riportate (in grassetto la concentrazione risultante di ciascuno standard di calibrazione).

- 250 µl di soluzione AFB1 200 ng/ml = **10 ng/ml**
- 187.5 µl di soluzione AFB1 200 ng/ml = **7.5 ng/ml**
- 125 µl di soluzione AFB1 200 ng/ml = **5 ng/ml**
- 62.5 µl di soluzione AFB1 200 ng/ml = **2.5 ng/ml**
- 25 µl di soluzione AFB1 200 ng/ml = **1 ng/ml**
- 12.5 µl di soluzione AFB1 200 ng/ml = **0.5 ng/ml**

I campioni così arricchiti vanno quindi sottoposti allo stesso procedimento estrattivo- analitico dei campioni incogniti (vedi punto 7.1.).

6.2. APPARECCHIATURE ED ALTRO MATERIALE

6.2.1. Vetreria tarata (classe B)

- Matracci: 200 ml; 250 ml; 500 ml; 1000 ml
- Cilindri: 100 ml; 250 ml; 500 ml; 1000 ml

6.2.2. Pipette graduate in vetro (classe B): 10 ml; 25 ml

6.2.3. Bottiglie per solventi HPLC (1000 ml)

6.2.4. Apparecchio in vetro per filtrazione

6.2.5. Filtri a membrana, porosità 0.22 µm

6.2.6. Provettoni fondo conico con tappo a vite tipo Falcon da 50 ml

6.2.7. Provette fondo conico con tappo a vite tipo Falcon da 15 ml

6.2.8. Provette batteriologia in vetro da 16x100 mm

6.2.9. Provette coniche graduate di vetro da 10ml

6.2.10. Pipette Pasteur e bacchette in vetro

6.2.11. Bilancia elettronica (cl. precisione: 0,002 g)

6.2.12. Centrifuga GPK Beckman

6.2.13. Centrifuga refrigerata 4239R ALC



- 6.2.14. Pompa da vuoto ad acqua
- 6.2.15. Pipette a volume variabile: 20, 100, 200, 1000 μ l
- 6.2.16. Puntali per pipette: 200, 1000 μ l
- 6.2.17. Bagno ad ultrasuoni
- 6.2.18. Colonna analitica HPLC Phenomenex ONYX Monolithic C18 100x4.6 mm
- 6.2.19. Sistema HPLC System Gold Beckman
 - Pompa: Programmable solvent module 126
 - Autocampionatore: HTA 800L
 - Loop: 20 μ l
 - Detector (Fluorimetro): Jasco 821 FP Jasco

7. MODALITA' OPERATIVE

Acidificazione delle provette in vetro

Le provette in vetro in cui vengono portate a secco le soluzioni di AFB1 devono essere preventivamente acidificate: vanno lasciate a contatto con una soluzione di acido solforico 1% per alcune ore e quindi risciacquate con acqua demineralizzata.

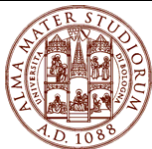
7.1. PROCEDIMENTO ESTRATTIVO-ANALITICO CAMPIONI INCOGNITI

7.1.1. Estrazione

- Pesare $5 \pm 0,01$ g di campione in provettoni tipo Falcon da 50ml.
- Aggiungere 2.5 ml di Soluzione Acido citrico 20% e 25 ml CH_2Cl_2 .
- Porre in ultrasuoni per 30 min.
- Centrifugare su centrifuga refrigerata a 5 °C a 6000 RPM (5400 x g) per 15 min.
- Trasferire circa 14 ml di estratto diclorometanico in provette tipo Falcon da 15ml.
- Centrifugare a 3000 RPM su centrifuga GPK (1850 x g) per 10 min.
- Utilizzando come strumento di misura provette graduate in vetro da 10 ml, trasferire in esse 10 ml di estratto diclorometanico.
- Essiccare sotto azoto o in evaporatore-concentratore Univapo.
- Derivatizzare solubilizzando il residuo essiccato con 20 μ l di TFA.
- Vortexare (5 sec), attendere 10 min.
- Aggiungere 1.980 ml di soluzione Acqua:Acetonitrile (90:10 v/v).
- Vortexare (1 min) e lasciare reagire al buio per almeno 20 min.
- Separare il residuo lipidico centrifugando a 3000 RPM su centrifuga GPK (1850 x g) per 8 min.
- Trasferire un'adeguata aliquota di fase acquosa in vials per HPLC e analizzare.
- Per i soli campioni di farina di grano, prima del trasferimento in vials, trasferire la fase acquosa in provette tipo Eppendorf e centrifugare a 12000 RPM su centrifuga refrigerata (13200 x g) per 10 min.

7.1.2. Condizioni analitiche

- Detector Fluorimetro



- Lunghezza d'onda di eccitazione 365 nm
- Lunghezza d'onda di emissione 418 nm
- Volume di iniezione 20 μ l
- Temperatura della colonna ambiente
- Fase mobile H₂O:CH₃CN:CH₃CHOHCH₃:CH₃COOH 1% (91:1:1:7) (A)
H₂O:CH₃CN:CH₃CHOHCH₃:CH₃COOH 1% (43:25:25:7) (B)
- Eluizione in gradiente secondo lo schema seguente:

Time (min)	B%	Flow (ml/min)	Duration (min)
0	16	1.3	
4.5	47.5		4.5
6		1	1
9	16		1
10		1.3	1
11	Alarm		

7.1.3. Controllo del sistema

Iniettare ripetutamente una soluzione standard di riferimento nell'arco di giorni diversi. Calcolare i valori medi delle aree, la deviazione standard ed il CV % (vedi punto 8.7) per verificare la ripetibilità del sistema.

8. INDICAZIONI PER LA PRESENTAZIONE DEI RISULTATI DI PROVA

8.1. Sequenza analitica dei campioni

Ciascuna corsa cromatografica comprende, in sequenza, le iniezioni di: standard di riferimento, campioni di controllo, standard di calibrazione, campioni sconosciuti.

8.2. Registrazione

Per ogni serie di analisi, devono essere registrati i tempi di ritenzione e le aree dei picchi cromatografici corrispondenti agli standard e ai campioni.

8.3. Elaborazione dei risultati

- I valori medi delle aree dei picchi degli standard di riferimento vanno riportati vs le concentrazioni di AFB1; si calcola quindi la retta di regressione (punto 8.4).
- I valori medi delle aree dei picchi degli standard di calibrazione vanno riportati vs le concentrazioni di AFB1; si calcola quindi la retta di regressione (punto 8.4).



- Le concentrazioni di AFB1 nei campioni sconosciuti vanno ottenute utilizzando l'equazione della retta di regressione calcolata con gli standard di riferimento e moltiplicate per il recupero % (punto 8.6) oppure utilizzando l'equazione della retta di regressione calcolata con gli standard di calibrazione.

8.4. Linearità

A partire dai valori medi delle aree degli standard, calcolare la retta di regressione secondo l'equazione: $Y = aX + b$

dove Y = area degli standard

X = concentrazione degli standard in ng/ml

a = pendenza della retta

ed il coefficiente di correlazione lineare R tra la risposta analitica e le concentrazioni degli analiti. La linearità è stabilita sulla base di $R \geq 0.990$.

8.5. Specificità

L'assenza di interferenze sulla risposta degli analiti da parte di componenti della matrice viene valutata utilizzando i campioni di controllo sottoposti alla procedura di estrazione e quindi ad analisi cromatografica nelle condizioni descritte al punto 7.1.

8.6. Recupero %

Utilizzando l'equazione della retta sono state ricalcolate le concentrazioni singole degli standard di riferimento (standard di riferimento ricalcolati).

La percentuale di recupero va così calcolata:


$$\text{Recupero \%} = \frac{\text{Valore medio degli standard di calibrazione}}{\text{Valore medio degli standard di riferimento ricalcolati}} \times 100$$

La percentuale di recupero viene accettata per valori $\geq 60\% \leq 100\%$

8.7. Precisione

Per ciascuna serie di standard di riferimento e di calibrazione iniettati, si deve calcolare la deviazione standard ed il coefficiente di variazione; quest'ultimo si ricava con la seguente formula:

$$\text{CV \%} = \frac{\text{Deviazione standard dalla media}}{\text{media}} \times 100$$

 <p>Alma Mater Studiorum –Università di Bologna Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie</p>	Procedura Operativa Standard	Pag. 12 di 146
	SOP FT	Rev. 0

CV % viene accettato per valori $\leq 20\%$

9. PRESCRIZIONI DI SICUREZZA

- Prima dell'uso, controllare sempre sulle etichette dei contenitori la pericolosità dei solventi e dei prodotti chimici; per avere maggiori informazioni, consultare le relative schede di sicurezza.
- L'Alatossina B1 è classificata dalla IARC tra gli agenti cancerogeni per l'uomo. Deve essere pertanto maneggiata adottando le opportune misure di protezione:

- Cappa aspirante di classe A
- D.P.I. come di seguito esplicitati

Protezione respiratoria: se il respiratore costituisce il solo mezzo di protezione, utilizzare una maschera a pieno facciale con filtri combinati di tipo ABEKP (EN 14387) come supporto alle misure tecniche; nel caso di polveri tossiche o potenzialmente tali, può essere sufficiente utilizzare un facciale filtrante con filtri di tipo P2 (EN 143).

Protezione delle mani: i guanti di protezione selezionati devono soddisfare le esigenze della direttiva UE 89/686/CEE e gli standard EN 374 che ne derivano. Indossare due paia di guanti.

Protezione degli occhi: occhiali di protezione.

Protezione della pelle e del corpo: camice.

Scegliere un tipo di protezione in funzione della forma fisica e della concentrazione delle sostanze pericolose.

- Si riportano di seguito le misure da adottare in caso di emergenza.

- MISURE DI PRIMO SOCCORSO

Soluzioni o polveri tossiche

Informazione generale

Consultare un medico. Mostrare la scheda di sicurezza al medico curante.

Se inalato

Se viene respirato, trasportare la persona all'aria fresca. In caso di arresto della respirazione, procedere con la respirazione artificiale. Consultare un medico.

In caso di contatto con la pelle

Lavare con sapone e molta acqua. Consultare un medico.

In caso di contatto con gli occhi

Sciacquare accuratamente ed abbondantemente con acqua per almeno 15 minuti e rivolgersi ad un medico.

Se ingerito

Non indurre il vomito. Non somministrare alcunchè a persone svenute. Sciacquare la bocca con acqua. Consultare un medico.



- MISURE IN CASO DI RILASCIO ACCIDENTALE

Soluzioni tossiche

Precauzioni individuali

Usare i dispositivi di protezione individuali. Evitare di respirare vapori/nebbia/gas. Prevedere una ventilazione adeguata. Eliminare tutte le sorgenti di combustione. Evacuare il personale in aree di sicurezza. Attenti ai vapori addensati che possono formare delle concentrazioni esplosive.

Metodi di pulizia

Contenere e raccogliere quanto sversato accidentalmente con materiale assorbente non combustibile (come ad esempio sabbia, terra, farina fossile, vermiculite) e porlo in un apposito contenitore per l'eliminazione (vedi punto 10.1).

Polveri tossiche

Precauzioni individuali

Usare una protezione respiratoria. Evitare la formazione di polvere. Non inalare polvere. Prevedere una ventilazione adeguata. Evacuare il personale in aree di sicurezza.

Metodi di pulizia

Ritirare e provvedere allo smaltimento senza creare polvere. Conservare in contenitori adatti e chiusi per lo smaltimento.

10. PRESCRIZIONI AMBIENTALI

10.1. Trattamento dei rifiuti

10.1.1. Residuo solido del campione


Il residuo solido del campione sottoposto al procedimento analitico, viene smaltito negli appositi contenitori per materiale ospedaliero.

10.1.2. Rifiuti tossico-nocivi

Tutti i rifiuti considerati tossico-nocivi (acetone, etere etilico, n-esano, acetone, tetraidrofurano, alcool isopropilico, metilene cloruro, e loro miscele con solventi acquosi, nonché soluzioni di contenenti aflatossina B1) vanno stoccati negli appositi contenitori.

10.1.3. Materiale usa e getta

Tutto il materiale usa e getta va eliminato di volta in volta negli appositi contenitori per materiale ospedaliero.

 Alma Mater Studiorum –Università di Bologna Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie	Procedura Operativa Standard	Pag. 14 di 146
	SOP FT	Rev. 0

10.1.4. Misure in caso di rilascio accidentale

Evitare sversamenti o perdite supplementari di soluzioni e/o polveri tossiche, se questo può essere fatto senza pericolo. Non lasciar penetrare il prodotto negli scarichi.

10.2. Lavaggio della vetreria

Dato il potere altamente tossico e cancerogeno dell'Aflatossina B1, tutta la vetreria utilizzata nel corso delle varie fasi analitiche va sottoposta ad un **pretrattamento per la degradazione della tossina mediante immersione in ipoclorito di sodio (soluzione commerciale) per una notte.** La vetreria così trattata viene quindi sottoposta ad adeguati cicli di lavaggio in lavavetreria.

APPENDICE II
SOP (Standard Operating Procedure)



Alma Mater Studiorum –Università di Bologna
Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie

Procedura Operativa Standard

Pag. 120 di 146

SOP FT

Rev. ...


L'utilizzatore si impegna, una volta ricevuta l'informazione di una nuova revisione del documento, a distruggere la copia della revisione precedente in suo possesso.

DETERMINAZIONE DI OCRATOSSINA A NEI SALAMI MEDIANTE HPLC

Lista di distribuzione

Funzione	Nome e Cognome	Firma	Data
	(inserire solo se i destinatari non sono raggiungibili elettronicamente)		

Preparato	Data	Verificato	Data	Approvato	Data

 Alma Mater Studiorum –Università di Bologna Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie	Procedura Operativa Standard	Pag. 2 di 146
	SOP FT	Rev. ...

INDICE

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE 3
2. RIFERIMENTI 3
3. DEFINIZIONI E ABBREVIAZIONI 3
4. QUALIFICA DEL PERSONALE 4
5. PARAMETRI AMBIENTALI 4
6. MATERIALI ED APPARECCHIATURE DA UTILIZZARE 4
7. MODALITA' OPERATIVE 8
8. INDICAZIONE PER LA PRESENTAZIONE DEI RISULTATI DI PROVA 10
9. PRESCRIZIONI DI SICUREZZA 11
10. PRESCRIZIONI AMBIENTALI 12



1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

1.1. Scopo e campo di applicazione Scopo della presente istruzione operativa è la messa a punto di una metodica per la valutazione quali-quantitativa di Ocratossina A (OTA) nei salami.

1.2. Quantità di campione

La quantità di campione deve essere almeno 20g.

1.3. Campi di misura

- La quantità di Ocratossina A nei salami sarà espressa come ng di OTA per g di matrice (o ppb)
- La concentrazione di OTA degli standard di riferimento sarà espressa come µg o ng di OTA per ml di solvente (µg/ml o ppm; ng/ml o ppb)
- LOD (vedi punto 3.): 0.05 ppb
- LOQ (vedi punto 3.): 0.2 ppb


2. RIFERIMENTI

Bozzo *et al.* (2012) Occurrence of ochratoxin A in wild boar (*Sus scrofa*): chemical and histological analysis. *Toxins*, 4: 1440-1450

- Decreto Legislativo 81/2008 e successive modifiche ed integrazioni

3. DEFINIZIONI E ABBREVIAZIONI

- LOD (Limit of Detection) = limite di rilevabilità = concentrazione minima di un analita che può essere rilevata in modo attendibile
- LOQ (Limit of Quantitation) = limite di quantificazione = concentrazione minima di un analita che può essere quantificata con accettabile accuratezza e precisione
- Campione di controllo = campione di salame nel quale sono state rilevate, dopo valutazione quali-quantitativa per la presenza di Ocratossina A secondo il procedimento analitico descritto al punto 7.1, tracce cromatografiche relative all'Ocratossina A inferiori al LOD
- Campione arricchito = campione di controllo addizionato di una quantità nota di analita (vedi punto 6.1.3.4)
- Standard di riferimento = standard non estratto = soluzione dell'analita di identità e purezza documentata a concentrazione nota
- Standard di calibrazione = standard estratto = soluzione dell'analita ottenuta da un campione arricchito sottoposto alla procedura di estrazione

 Alma Mater Studiorum –Università di Bologna Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie	Procedura Operativa Standard	Pag. 4 di 146
	SOP FT	Rev. ...

Recupero % = Il recupero è il confronto tra la risposta analitica che si ottiene nell'analisi di un campione costituito dalla matrice biologica addizionata con una quantità nota dell'analita (dopo estrazione), con quella di una soluzione della stessa concentrazione dell'analita.

- OTA = Ocratossina A
- D.P.I. = Dispositivi di Protezione Individuali

IARC = International Agency for Research on Cancer

4. QUALIFICA DEL PERSONALE

Per l'esecuzione della metodica è possibile impiegare personale privo di particolari specializzazioni, ma opportunamente affiancato da un supervisore (personale docente, ricercatore o responsabile tecnico del Servizio) per quanto concerne il procedimento estrattivo cui sottoporre i campioni in esame; è necessario invece un certo grado di specializzazione ed esperienza per l'esecuzione delle analisi in HPLC, l'interpretazione dei risultati e l'elaborazione dei dati, mansioni riservate alle figure sopra citate o anche a personale non strutturato (dottorandi e assegnisti di ricerca, contrattisti, ecc..) debitamente addestrato ed autorizzato a svolgere le suddette attività.

5. PARAMETRI AMBIENTALI

I campioni devono essere conservati in congelatore a temperatura < -18 °C fino al momento del procedimento di estrazione; le soluzioni e le soluzioni standard di ocratossina A devono essere conservate alle temperature indicate nella presente SOP.

6. MATERIALI ED APPARECCHIATURE DA UTILIZZARE

6.1. Prodotti chimici

6.1.1. Reattivi chimici

- 6.1.1.1. Acetonitrile (CH₃CN), HPLC grade
- 6.1.1.2. Acido acetico (CH₃COOH), analytical grade
- 6.1.1.3. Acido cloridrico 37% (HCl), analytical grade
- 6.1.1.4. Acido fosforico 85% (H₃PO₄), ACS-ISO
- 6.1.1.5. Acqua (H₂O), HPLC grade
- 6.1.1.6. Alcool etilico assoluto (C₂H₅OH), RPE
- 6.1.1.7. Alcool isopropilico (CH₃CHOHCH₃), HPLC grade
- 6.1.1.8. Alcool metilico (CH₃OH), HPLC grade
- 6.1.1.9. Bombola Azoto Ricerca
- 6.1.1.10. Colonnine di immunoaffinità Ochratest WB VICAM
- 6.1.1.11. Etile acetato (CH₃COOC₂H₅), RPE ACS
- 6.1.1.12. Ocratossina A (polvere cristallina)
- 6.1.1.13. Potassio cloruro (KCl), RPE



6.1.1.14. Potassio fosfato monobasico (KH_2PO_4), RPE ACS

6.1.1.15. Sodio bicarbonato (NaHCO_3), RPE ACS

6.1.1.16. Sodio cloruro (NaCl), RPE

6.1.1.17. Sodio fosfato bibasico anidro (Na_2HPO_4), RPE ACS

☺!!! L'OCRATOSSINA A È UN POSSIBILE CANCEROGENO PER L'UOMO - TUTTI I SOLVENTI ORGANICI DEVONO ESSERE CONSIDERATI COME POTENZIALMENTE PERICOLOSI - Tutti i passaggi in cui ne è previsto l'uso devono essere condotti sotto una adeguata cappa aspirante (classe A) - Gli operatori devono munirsi di adeguati D.P.I. (camice, guanti e occhiali).

6.1.2. Soluzioni

6.1.2.1. Acido fosforico 1M

- Misurare accuratamente 6.8 ml di H_3PO_4 85%
- Trasferire in un matraccio tarato da 100 ml
- Aggiungere 90 ml di H_2O
- Tappare e agitare per inversione
- Portare a volume
- Etichettare e conservare a temperatura ambiente
- Questa soluzione è stabile per 6 mesi

6.1.2.2. Sodio bicarbonato 0.5 M

- Pesare 4.2 ± 0.01 g di NaHCO_3
- Trasferire in un matraccio tarato da 100 ml
- Aggiungere 80 ml di H_2O
- Tappare e agitare per inversione
- Portare a volume
- Etichettare e conservare a temperatura ambiente
- Questa soluzione è stabile per 1 mese

6.1.2.3. PBS buffer

- Pesare:
 - NaCl : 4 ± 0.001 g
 - Na_2HPO_4 : 0.6 ± 0.001 g
 - KH_2PO_4 : 0.1 ± 0.001 g
 - KCl : 0.1 ± 0.001 g
- Trasferire in un beaker da 600 ml
- Aggiungere 495 ml di H_2O e mescolare fino a completa solubilizzazione
- Aggiustare il pH a 7.0 con qualche goccia di HCl 1M
- Trasferire in un matraccio tarato da 500 ml
- Portare a volume
- Etichettare e conservare al riparo dalla luce a $5 \pm 3^\circ$
- Questa soluzione è stabile per 1 mese



6.1.2.4. Acido cloridrico 1M

- Misurare accuratamente 8.3 ml di HCl 37%
- Trasferire in un matraccio tarato da 100 ml
- Aggiungere 90 ml di H₂O
- Tappare e agitare per inversione
- Portare a volume
- Etichettare e conservare a temperatura ambiente
- Questa soluzione è stabile per 6 mesi

6.1.2.5. Acido acetico 1%

- Misurare accuratamente 198 ml di H₂O in un cilindro da 200 ml.
- Usando una pipetta graduata da 2 ml, aggiungere 2 ml di CH₃COOH .
- Agitare con una bacchetta di vetro.
- Trasferire in un matraccio da 200 ml.
- Tappare e agitare per inversione.
- Etichettare e conservare a temperatura ambiente
- Questa soluzione è stabile per 6 mesi

6.1.2.6. Acqua:Alcool isopropilico:Acetonitrile:Acido acetico 1% (79:7:7:7; v/v) (fase mobile)

- Misurare accuratamente 790 ml di H₂O con un cilindro da 1000 ml
- Misurare accuratamente 70 ml di CH₃CHOHCH₃ con un cilindro da 100 ml
- Unire al primo solvente nello stesso cilindro da 1000 ml
- Misurare accuratamente 70 ml di CH₃CN con un cilindro da 100 ml
- Unire agli altri due solventi nello stesso cilindro da 1000 ml
- Misurare accuratamente 70 ml di CH₃COOH 1% con un cilindro da 100 ml
- Unire agli altri tre solventi nello stesso cilindro da 1000 ml
- Agitare con una bacchetta di vetro
- Trasferire in un matraccio o direttamente in bottiglia per solventi HPLC
- Agitare per inversione
- Etichettare e conservare a temperatura ambiente
- Questa soluzione è stabile per 6 mesi

6.1.3. Soluzioni standard

6.1.3.1. Soluzione madre di OTA (500 µg/ml)

- Solubilizzare 1 mg di OTA polvere cristallina con 2 ml di etanolo
- Conservare a temperatura < -18 °C
- Questa soluzione è stabile per 36 mesi a temperatura < -18 °C

6.1.3.2. Soluzioni standard di lavoro

- 0,5 ml Soluzione OTA 500 µg/ml + 4,5 ml Etanolo = **50 µg/ml**
- 0,5 ml Soluzione OTA 50 µg/ml + 4,5 ml Etanolo = **5 µg/ml**
- 0,5 ml Soluzione OTA 5 µg/ml + 4,5 ml Etanolo = **0,5 µg/ml**
- 0,5 ml Soluzione OTA 0,5 µg/ml + 4,5 ml Etanolo = **0,05 µg/ml (50 ng/ml)**
- Queste soluzioni sono stabili per 36 mesi a temperatura < -18 °C



6.1.3.3. Preparazione degli standard per le curve di riferimento

- Trasferire 200 μ l di Soluzione OTA 50 ng/ml in provette di vetro 12x75 mm
- Essiccare sotto azoto o in evaporatore-concentratore Univapo
- Risolubilizzare il residuo con 0.5 ml di MeOH
- Agitare su Vortex (1 min)
- Aggiungere 0.5ml di H₂O = **10 ng/ml**
- Agitare su Vortex (10 sec)
- Trasferire 150 μ l di Soluzione OTA 50 ng/ml in provette di vetro 12x75 mm
- Essiccare sotto azoto o in evaporatore-concentratore Univapo
- Risolubilizzare il residuo con 0.5 ml di MeOH
- Agitare su Vortex (1 min)
- Aggiungere 0.5ml di H₂O = **7.5 ng/ml**
- Agitare su Vortex (10 sec)
- Trasferire 100 μ l di Soluzione OTA 50 ng/ml in provette di vetro 12x75 mm
- Essiccare sotto azoto o in evaporatore-concentratore Univapo
- Risolubilizzare il residuo con 0.5 ml di MeOH
- Agitare su Vortex (1 min)
- Aggiungere 0.5ml di H₂O = **5 ng/ml**
- Agitare su Vortex (10 sec)
- Trasferire 40 μ l di Soluzione OTA 50 ng/ml in provette di vetro 12x75 mm
- Essiccare sotto azoto o in evaporatore-concentratore Univapo
- Risolubilizzare il residuo con 0.5 ml di MeOH
- Agitare su Vortex (1 min)
- Aggiungere 0.5ml di H₂O = **2 ng/ml**
- Agitare su Vortex (10 sec)
- Trasferire 20 μ l di Soluzione OTA 50 ng/ml in provette di vetro 12x75 mm
- Essiccare sotto azoto o in evaporatore-concentratore Univapo
- Risolubilizzare il residuo con 0.5 ml di MeOH
- Agitare su Vortex (1 min)
- Aggiungere 0.5ml di H₂O = **1 ng/ml**
- Agitare su Vortex (10 sec)

6.1.3.4. Preparazione degli standard per le curve di calibrazione

Per preparare gli standard di calibrazione, aliquote di $2.5 \pm 0,01$ g di campione di controllo vanno arricchite con i seguenti volumi di Soluzione OTA 50 ng/ml (in grassetto la concentrazione finale di ciascuno standard di calibrazione).

- 100 μ l di soluzione OTA 50 ng/ml = **10 ng/ml**
- 75 μ l di soluzione OTA 50 ng/ml = **7.5 ng/ml**
- 50 μ l di soluzione OTA 50 ng/ml = **5 ng/ml**
- 20 μ l di soluzione OTA 50 ng/ml = **2 ng/ml**
- 10 μ l di soluzione OTA 50 ng/ml = **1 ng/ml**



I campioni così arricchiti vanno quindi sottoposti allo stesso procedimento estrattivo- analitico dei campioni incogniti (vedi punto 7.1.).

6.2. Apparecchiature ed altro materiale

6.2.1 Vetreria tarata (classe B)

- Matracci: 100 ml; 200 ml; 500 ml; 1000 ml
- Cilindri: 100 ml; 200 ml; 500 ml; 1000 ml
- Beaker: 50ml, 100ml, 600ml

6.2.2. Pipette graduate in vetro (classe B): 2 ml; 5 ml; 10 ml

6.2.3. Bottiglie per solventi HPLC (1000 ml)

6.2.4. Beute codate (1000 ml)

6.2.5. Provette fondo conico con tappo a vite tipo Falcon: 50 ml; 15 ml

6.2.6. Provette coniche graduate da centrifuga in vetro da 10 ml

6.2.7. Pipette Pasteur e bacchette in vetro

6.2.8. Bilancia elettronica (classe di precisione: 0,002 g)

6.2.9. pHmetro

6.2.10. Tritatutto Moulinex Illico

6.2.11. Omogeneizzatore Ultra-Turrax

6.2.12. Rotating shaker

6.2.13. Centrifuga Beckman GPK

6.2.14. Pompa da vuoto ad acqua

6.2.15. Pipette a volume variabile: 20, 100, 200, 1000, 5000 μ l

6.2.16. Puntali per pipette: 200, 1000, 5000 μ l

6.2.17. Bagno ad ultrasuoni

6.2.18. Sistema da vuoto per colonnine

6.2.19. Sistema di evaporazione sotto vuoto Uniequip

6.2.20. Colonna HPLC Merck Chromolith Performance RP-18e 100 x 4,6mm

6.2.21. Colonna HPLC Phenomenex Onyx Monolithic C18 100 x 4,6mm

6.2.22. Sistema HPLC Beckman System Gold

- Pompa System Gold Programmable Solvent Module 126
- Campionatore automatico HTA HT800L
- Rivelatore spettrofluorimetrico Jasco 821 FP
- Postazione di controllo IBM Thinkcenter – Software 32 Karat (Beckman Coulter)

7. MODALITÀ OPERATIVE

7.1. Procedimento analitico campioni incogniti

7.1.1. Estrazione

- Pesare $20 \pm 0,01$ g di salame e omogeneizzare con tritatutto Moulinex Illico
- Trasferire $2,5 \pm 0,01$ g di omogeneizzato in provettoni tipo Falcon da 50 ml
- Aggiungere 1.5 ml di soluzione H_3PO_4 1M e 5 ml di etile acetato
- Omogeneizzare con Ultraturax per 3 min
- Centrifugare a 3000 RPM per 3 min
- Raccogliere la fase liquida in provettoni tipo Falcon da 15ml
-



Ripetere l'estrazione con altri 5 ml di etile acetato previa acidificazione con 1.5 ml di soluzione H_3PO_4 1M

- Omogeneizzare con Ultraturrax per 3 min
- Porre in bagno ad ultrasuoni per 15 min
- Centrifugare a 3000 RPM per 3 min, raccogliere la fase liquida unendola alla prima raccolta
- Congelare alcune ore o overnight
- Centrifugare a 3000 RPM per 10' per separare la fase acquosa dalla fase organica estraente
- Trasferire 8 ml dell'estratto organico (pari a 2 g di campione) in provette coniche graduate di vetro
- Ridurre l'estratto organico a 2 ml in evaporatore UNIVAPO
- Aggiungere 2 ml di $NaHCO_3$ 0.5 M
- Agitare su rotating shaker per 30 min
- Congelare alcune ore, centrifugare 10 min a 3000 RPM e allontanare la fase organica

7.1.2. Clean Up

- Trasferire 1.5 ml dell'estratto bicarbonatico (pari a 1.5 g di campione) in un'altra provetta e diluire con 3.5 ml di PBS buffer
- Caricare l'estratto bicarbonatico diluito su una colonnina di immunoaffinità; lavare la provetta che lo conteneva con 1 ml di PBS buffer e caricarlo sulla stessa colonnina
- Lavare con 10 ml di PBS buffer
- Lavare con 10 ml di H_2O
- Eluire con 1.5 ml di MeOH
- Portare a secco in evaporatore Univapo e risolubilizzare con 150 μ l di MeOH
- Agitare su vortex per 1 min, eventualmente sonicare alcuni secondi
- Aggiungere 150 μ l di H_2O (campioni concentrati 5:1)
- Agitare su vortex per 10 sec e analizzare


7.2. Campioni arricchiti per l'allestimento delle curve di calibrazione

- Per i campioni arricchiti (vedi punto 6.1.3.4.), si procede come per i campioni incogniti

7.3. Condizioni analitiche

- Detector Fluorimetro
- Lunghezze d'onda 340 nm (λ Ex); 460 nm (λ Em)
- Volume di iniezione 20 μ l
- Colonna 2 colonne in serie (vedi punto 6.2.20. e 6.2.21.)
- Fase mobile $H_2O:CH_3CN:CH_3CHOHCH_3:CH_3COOH$ 1% (79:7:7:7) (A)
 CH_3CN (B)
Fase A: 58%; fase B: 42%
- Eluizione in gradiente:

Time	B%	Flow	Duration
0	49	1.1ml/min	3.5'
3.5'	42	1.1ml/min	1'

 Alma Mater Studiorum –Università di Bologna Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie	Procedura Operativa Standard	Pag. 10 di 146
	SOP FT	Rev. ...

7.4. Controllo del sistema

Iniettare ripetutamente una soluzione standard di riferimento nell'arco di giorni diversi. Calcolare i valori medi delle aree, la deviazione standard ed il CV % (vedi punto 8.7) per verificare la ripetibilità del sistema.

8. INDICAZIONI PER LA PRESENTAZIONE DEI RISULTATI

8.1. Sequenza analitica dei campioni

Ciascuna corsa cromatografica comprende, in sequenza, le iniezioni di: standard di riferimento, campioni di controllo, standard di calibrazione, campioni incogniti.

8.2. Registrazione

Per ogni serie di analisi, devono essere registrati i tempi di ritenzione e le aree dei picchi cromatografici corrispondenti agli standard e ai campioni.

8.3. Elaborazione dei risultati

- I valori medi delle aree dei picchi degli standard di riferimento vanno riportati vs le concentrazioni di OTA; si calcola quindi la retta di regressione (punto 8.4)
- I valori medi delle aree dei picchi degli standard di calibrazione vanno riportati vs le concentrazioni di OTA; si calcola quindi la retta di regressione (punto 8.4)
- Le concentrazioni di OTA nei campioni sconosciuti vanno ottenute utilizzando l'equazione della retta di regressione calcolata con gli standard di riferimento e moltiplicate per il recupero % (punto 8.6) oppure utilizzando l'equazione della retta di regressione calcolata con gli standard di calibrazione

8.4. Linearità

Viene calcolata sia per la curva di riferimento che per la curva di calibrazione.

In entrambi i casi, a partire dai valori medi delle aree degli standard di OTA, calcolare la retta di regressione secondo l'equazione: $Y = a X + b$

dove: Y = area degli standard


X = concentrazione degli standard in ng/ml

a = pendenza della retta

ed il coefficiente di correlazione lineare R tra la risposta analitica e le concentrazioni degli analiti. La linearità è stabilita sulla base di $R \geq 0.990$

8.5. Specificità

L'assenza di interferenze sulla risposta degli analiti da parte di componenti della matrice viene valutata utilizzando i campioni di controllo sottoposti alla procedura di estrazione e quindi ad analisi cromatografica nelle condizioni descritte al punto 7.3.

 Alma Mater Studiorum –Università di Bologna Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie	Procedura Operativa Standard	Pag. 11 di 146
	SOP FT	Rev. ...

8.6. Recupero %

Le prove di recupero vengono valutate con standard estratti ad almeno tre concentrazioni diverse confrontando i risultati analitici con standard non estratti di pari concentrazione che rappresentano un recupero del 100%. La percentuale di recupero su ogni concentrazione va così calcolata:

$$\text{Recupero \%} = \frac{\text{Peak area standard di calibrazione}}{\text{Peak area standard di riferimento}} \times 100$$

La percentuale di recupero viene accettata per valori $\geq 60\% \leq 110\%$

8.7. Precisione

Per ciascuna serie di standard di riferimento e di calibrazione iniettati, si deve calcolare la deviazione standard ed il coefficiente di variazione; quest'ultimo si ricava con la seguente formula:

$$\text{CV \%} = \frac{\text{Deviazione standard dalla media}}{\text{Media}} \times 100$$

CV % viene accettato per valori $\leq 20\%$

8. PRESCRIZIONI DI SICUREZZA

- Prima dell'uso, controllare sempre sulle etichette dei contenitori la pericolosità dei solventi e dei prodotti chimici; per avere maggiori informazioni, consultare le relative schede di sicurezza.
- Tutti i solventi organici, come pure gli acidi e le basi concentrate, devono essere considerati potenzialmente pericolosi. L'Ocratossina A è classificata dalla IARC tra gli *agenti possibilmente cancerogeni*.

Tutte le lavorazioni che ne prevedono l'uso devono essere effettuate adottando le opportune misure di sicurezza (cappa di classe A ed appropriati D.P.I.: camice, guanti in nitrile, occhiali).

10. PRESCRIZIONI AMBIENTALI

10.1. Trattamento dei rifiuti

10.1.1. Residui biologici dei campioni

I residui biologici dei campioni sottoposti al procedimento analitico, vengono smaltiti negli appositi contenitori per materiale ospedaliero.



Alma Mater Studiorum –Università di Bologna
Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie

Procedura Operativa Standard

Pag. 12 di 146

SOP FT

Rev. ...

10.1.2. Rifiuti tossico-nocivi

Tutti i rifiuti considerati tossico-nocivi (acetonitrile, metanolo, etile acetato, alcool isopropilico, acido acetico, acido cloridrico, acido fosforico, potassio cloruro) e loro miscele con solventi acquosi, vanno stoccati negli appositi contenitori.

10.1.3. Materiale usa e getta

Tutto il materiale usa e getta va eliminato di volta in volta negli appositi contenitori per materiale ospedaliero.

10.2. Lavaggio della vetreria

Dato il potere altamente tossico e potenzialmente cancerogeno dell'Ocratossina A, tutta la vetreria utilizzata nel corso delle varie fasi analitiche va sottoposta ad un **pretrattamento per la degradazione della tossina mediante immersione in ipoclorito di sodio (soluzione commerciale) per una notte**. La vetreria così trattata viene quindi sottoposta ad adeguati cicli di lavaggio in lavavetreria.

9. MODULISTICA ED ALLEGATI

NA

Bibliografia

- Andretta I., Kipper M., Lehnen C. R., Hauschild L., Vale M. M., Lovatto P. A. (2012). Meta-analytical study of productive and nutritional interactions of mycotoxins in growing. *Animal* 6(9):1476-1482
- Arnau V., Marín S., Ramos A.J., Cano-Sancho G., Sanchis V. (2013). Determination of aflatoxins, deoxynivalenol, ochratoxin A and zearalenone in wheat and oat based bran supplements sold in the Spanish market. *Food and Chemical Toxicology* 53:133-138.
- Assem E., Mohamad A., Oula E. A. (2011). A survey on the occurrence of aflatoxin M₁ in raw and processed milk samples marketed in Lebanon. *Food Control* 22:1856-8
- Austwick P.K. (1981). Balkan nephropathy. *Practitioner* 225(1357):1031-1038
- Boorman G. A., McDonald M.R, Imoto S, Persing R. (1992)Renal lesions induced by ochratoxin A exposure in the F344 rat. *Toxicologic Pathology* 20:236-245
- Breitholtz-Emmanuelsson A., Minervini F., Hult K., Visconti A. (1994). Ochratoxin A in human serum samples collected in southern Italy from healthy individuals and individuals suffering from different kidney disorders. *Toxins* 2:366-370
- Battilani, P., Camardo Leggieri M., Rossi V., Giorni P. (2013). AFLA-maize, a mechanistic model for *Aspergillus Flavus* infection and aflatoxin B1 contamination in maize. *Computers and Electronics in Agriculture* 94: 38-46
- Bauer J., Gareis M. (1987). Ochratoxin A in der Nahrungsmittelkette. *Journal of Veterinary Medicine B* 34:613-627
- Bellver Soto J., Fernández-Franzon M., Ruiz M., Juan-Garcia A. Presence of ochratoxin A (OTA) mycotoxin in alcoholic drinks from southern European countries: Wine and Beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62(31): 7643-7651
- Belmadani A., Tramu G., Betbeder A.M., Steyn P.S., Creppy E.E. (1998). Regional selectivity to ochratoxin A, distribution and cytotoxicity in rat brain.. *Archives of Toxicology* 72(10):656-662
- Belmadani A., Tramu G., Betbeder A.M., Creppy E.E. (1998). Subchronic effects of ochratoxin A on young adult rat brain and partial prevention by aspartame, a sweetener. *Human and Experimental Toxicology* 17:380-386
- Bendele A. M., Carlton W. W., Krogh P., Lillehoj E. B. (1985). Ochratoxin A carcinogenesis in the (C57BL/6J X C3H)F1 mouse. *Journal of National Cancer Institute* 75:733-742
- Bertuzzi T., Gualla A., Morlacchini M., Pietri A. (2013). Direct and indirect contamination with ochratoxin A of ripened pork products. *Food Control* 34:79-83
- Bhat R., Rai R.V., Karim A.A. (2010). Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns. *Comprehensive Reviews. Food Science and Food Safety* 9: 57-81
- Bredenkamp M.W., Dillen J.L.M., Van Rooyen P.H., Steyn P.S. (1989). Crystal structures and conformational analysis of ochratoxin A and B: Probing the chemical structure causing toxicity. *Journal of Chemical Society* 2:1835–1839
- Cabassi E., Miduri F., Pinotti L., Valente L. (2006). Ochratoxin A contaminated and vitamin A and E supplemented diets: effects in pregnant sows and in their offspring. *AGRIS Records* 32:283-289
- Cast (2003). Council for agricultural science and technology. Mycotoxins: risk in plant, animal and human systems. Task force report n. 139. Ames, Iowa, USA

- Castegnaro M., Dirheimer G. (1998). Occurrence and significance of ochratoxin A in food. *Food Additives and Contaminants* 15:123-124
- Castegnaro M., Canadas D., Vrabcheva T., Petkova-Bocharova T., Chernozemsky I. N., Pfohl-Leszkowicz A. (2006). Balkan endemic nephropathy: Role of ochratoxins A through biomarkers. *Molecular Nutrition & Food Research* 50:519-529
- Cleveland T. E., Dowd P. F., Desjardins A. E., Bhatnagar D., Cotty P. J. (2003). United States Department of Agriculture—Agricultural Research Service research on pre-harvest prevention of mycotoxins and mycotoxigenic fungi in US crops. *Pest Management Science* 52: 629-642
- Cocolin L., Dolci P., Rantsiou K., Urso R., Cantoni C., Comi G. (2009). Lactic acid bacteria ecology of three traditional fermented sausages produced in the North of Italy as determined by molecular methods. *Meat Science* 82(1):125–132
- Catanante G., Rhouati A., Hayat A., and Marty J. L. (2015). An Overview of Recent Electrochemical Immunosensing Strategies for Mycotoxins Detection. *Electroanalysis* 28: 1750 – 1763
- Cavaliere C, Foglia P, Guarino C, Nazzari M, Samperi R, Laganà A (2007). A sensitive confirmatory method for aflatoxins in maize based on liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 21: 550 - 556
- Cole R.J., Jarvis B.B., Schweikert M.A. (2003). Ochratoxins and related metabolites. In: Handbook of Secondary Fungal Metabolites. Academic Press, San Diego, California, USA.
- Coppola S., Mauriello G., Aponte M., Moschetti G., Villani F. (2000). Microbial succession during ripening of Naples-type salami, a Southern Italian fermented sausage. *Meat Science* 56:321–329
- Coronel M. B, Sanchis V., Ramos A. J., Marin S. (2010). Review. Ochratoxin A: Presence in Human Plasma and Intake Estimation. *Food Science and Technology International* 16(1):5-18
- Czakai K., Muller K., Mosesso P., Pepe G., Schulze M., Gohla A. Patnaik D., Dekant, W., Higgins J.M., Mally A. (2011). Perturbation of mitosis through inhibition of histone acetyltransferases: The key to ochratoxin a toxicity and carcinogenicity? *Toxicological Science* 122 :317–329
- Dall'Asta C., Moseriti A., Galaverna G., Dossena A., Marchelli R. (2006). Metodi per la determinazione di micotossine negli alimenti. Dipartimento di Chimica Organica e Industriale, Università degli studi di Parma. Informatore fitopatologico 2. Disponibile all'indirizzo: <http://venetoagricoltura.regione.veneto.it/archive/00000865/>
- D'Arval C. (1912). Il latte nella produzione e nell'igiene dell'alimentazione. Ed. Vallardi, Milano, Italia
- Dashti B., Al-Hamli S., Alomirah H., Al-Zenki S., Abbas A. B., Sawaya W. (2009). Levels of aflatoxin M1 in milk, cheese consumed in Kuwait and occurrence of total aflatoxin in local and imported animal feed. *Food Control* 20(7):686-690
- Delledonne M (2006). Micotossine. Riconoscimento e prevenzione delle micotossicosi di interesse medico. Ed. agricole (Ed.) 3: 21-22.
- Diaz G., Espitia E. (2006). Occurrence of aflatoxin M1 in retail milk samples from Bogotá, Colombia. *Food Additives and Contaminants* 23:811-815
- Dragoni I., Cantoni C., Papa A., Vallone L. (1997). Muffe, alimenti e micotossicosi. In: Fumispore opp. Lotta alle muffe ed ai batteri nelle aziende alimentari. Ed. Città Studi, Milano, Italia. Disponibile all'indirizzo: <http://www.internationalpbi.it/docs/PBI/note-applicative/raccolta-fumispore.pdf>

- Driehuis F., Oude-Elferink S. J. (2000). The impact of the quality of silage on animal health and food safety: a review. *Veterinary Quarterly* 22:212-216
- Duarte S., Lino C., Pena A. (2012). Food safety implications of ochratoxin A in animal-derived food products. *Veterinary Journal* 192:286-292
- EC (European Community) (2002). Assessment of Dietary Intake of Ochratoxin A by the Population of EU Member States. Report of the Scientific Cooperation, Task 3.2.7. Directorate-General Health and Consumer Protection
- EFSA (European Food Safety Authority) (2004). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to aflatoxin B1 as undesirable substance in animal feed. *EFSA journal* 39:1-27
- EFSA (European Food Safety Authority) (2006). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin A in food. *EFSA Journal* 365:1-56
- El-Nezami H. S., Nicoletti G., Neal G. E., Donohue D. C., Ahokas J. T. (1995). Aflatoxin M1 in human breast milk samples from Victoria, Australia and Thailand. *Food Chemistry and Toxicology* 33:173-179
- Eurostat (2015). Milk and milk products statistics. Disponibile all'indirizzo: http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Milk_and_milk_product_statistics
- FAO Stat (2015). Production - livestock primary. Disponibile all'indirizzo: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QL/E>
- Francesca N., Sannino C., Moschetti G., Settanini L. (2013). Microbial characterisation of fermented meat products from the Sicilian swine breed "Suino Nero Dei Nebrodi". *Annals of Microbiology* 63(1):53-62
- Fongaro L., Alamprese C., Casiraghi E. (2015). Ripening of salami: Assessment of colour and aspect evolution using image analysis and multivariate image analysis. *Meat science* 101:73-77.
- Fuchs R., Peraica M. (2005). Ochratoxin A in human kidney diseases. *Food Additives & Contaminants* 22: 53–57
- Gallagher E.P., Kunze K.L., Stapleton P.L., Eaton D.L. (1996). The kinetics of aflatoxin B1 oxidation by human cDNA – Expressed and human liver microsomal cytochromes P450 1A2 and 3A4. *Toxicology and Applied Pharmacology* 141: 595-606
- Gallo A., Giuberti G., Frisvad J. C., Bertuzzi T., Nielsen K. F. (2015). *Review on Mycotoxin Issues in Ruminants: Occurrence in Forages, Effects of Mycotoxin Ingestion on Health Status and animal Performance and practical Strategies to Counteract Their Negative Effect.* *Toxins* 7:3057-3111
- Gallo A., Masoero F. (2012). Aflatossine nel latte: un pericolo sempre in agguato. *Informatore agrario* 39:30-32
- Galtier P. (1991). Pharmacokinetics of ochratoxin A in animals. *IARC scientific publications* 115:187-200
- Galtier P., Alvinerie M. (1976). In vitro transformation of ochratoxin A by animal microbial floras. *Annals of veterinary research* 7:91-98
- Galtier P., Alvinerie M., Charpentreau J. L. (1981). The pharmacokinetic profiles of ochratoxin A in pigs, rabbit and chicken. *Food and Cosmetics toxicology* 19:735-738
- Galtier P., Charpentreau J. L., Alvinerie M., Labouche C. (1981). The pharmacokinetic profile of ochratoxin A in the rat after oral and intravenous administration. *Drug Metabolism and Disposition* 7:429-434

- Galvano F., Galofaro V., Galvano G. (1996). Occurrence and stability of aflatoxin M1 in milk and milk products. A worldwide review. *Journal of Food Protection* 59:1079-1090
- Galvano F, Ritieni A, Piva G, Pietri A (2005). Mycotoxins in the Human food Chain. In: *The mycotoxin blue book*. Ed Diaz D.E. Nottingham University Press pp. 187-224.
- Gareis, M. (1996). Fate of ochratoxin A on processing of meat products. *Food Additives & Contaminants* 13:35–37.
- Gautier J., Richoz J., Welti D. H., Markovic J., Gremaud E., Guengerich F. P., Turesky R. J. (2001). Gautier Metabolism of Ochratoxin A: Absence of Formation of Genotoxic Derivatives by Human and Rat Enzymes. *Chemical Research in Toxicology* 14(1):34-45
- Giambrone J.J., Diener U. L., Davis N.D., Panangala V.S., Hoerr F.J. (1985). Effects of aflatoxin on young turkeys and broiler chickens. *Poultry Science* 64: 1678-1684
- Gilani S.H., Bancroft, J., Reily, M. Teratogenicity of ochratoxin A in chick embryos. *Toxicology and Applied Pharmacology* 46(2):543-546
- Giray B, Girgin G, Basak-Engin A, Aydin S, Sahin G (2007). *Aflatoxin levels in wheat sample consumed in some regions of Turkey*. Food Control. 18:23-29.
- Girish C.K., Devegowda G. (2005). Efficacy of glucomannan-containing yeast product (Mycocord) and hydrated sodium calcium aluminosilicate in preventing the individual and combined toxicity of aflatoxin and T-2 toxin in commercial broilers. *Asian - Australasian Journal of Animal Sciences* 19:877-883
- Grazia L., Coloretti F., Zambonelli C. (2011). *Tecnologie dei salumi* (1a ed.). Ed. Edagricole-New Business Media, Bologna, Italia
- Gross-Steinmeyer K., Weymann J., Hege H. G., Metzler M. (2002). Metabolism and lack of DNA reactivity of the mycotoxin ochratoxin A in cultured rat and human primary hepatocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:938-945
- Gupta C.R. (2012). *Veterinary toxicology. Basic and clinical principles*. Ed. Accademic, Londra, Inghilterra
- Haighton L. A., Lynch B. S., Magnuson B. A. (2012). A reassessment of risk associated with dietary intake of Ochratoxin A based on a lifetime exposure model. *Critical Reviews in Toxicology* 42(2):147-68
- Han Z., Tangni E.K., di Mavungu J. D., Vanhaecke L., de Saeger S., Wu A., Callebaut A. (2013). In vitro glucuronidation of ochratoxin A by rat liver microsomes. *Toxins* 5:2671-2685
- Haouet M.N., Altissimi M.S. (2003). Micotossine negli alimenti e micotossicosi animale umana. Webzine Sanità Pubblica Veterinaria, n.18. Disponibile all'indirizzo: http://www.spvet.it/arretrati/numero_18/micot.html (Ultima consultazione 31 maggio 2013)
- Hayes A.W., Hood R.D., Lee H.L. (1974). Teratogenic effects of ochratoxin A in mice. *Teratology* 9:93-98
- Heussner A. H., Lewis E. H. Bingle (2015). Comparative Ochratoxin Toxicity: A Review of the Available Data. *Toxins* 7:4253-4282
- Huff J. (1992). Carcinogenicity of ochratoxin A in experimental animals. In: *IARC scientific publications* 115(115):229-244
- Hult K., Pleština R., Habazin-Novak V., Radić B., Čeović S. (1982). Ochratoxin A in Human Blood and Balkan Endemic Nephropathy. *Archives of Toxicology* 51(4):313–321
- International Agency of Research on Cancer (IARC). (2012). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. In: *IARC Monographs* 100: 225-248

- Ibáñez-Vea M, González-Peñas E, Lizarraga E, López de Cerain A (2012). Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in barley from a northern region of Spain. *Food Chemistry* 132: 35-42
- Ilic Z., Crawford D., Vakharia D., Egner P. A., Sell S. (2010). *Glutathione S-transferase A3 knockout mice are sensitive to acute cytotoxic and genotoxic effects of aflatoxin B₁*. *Toxicology and Applied Pharmacology* 242: 241-246
- IARC (International Agency for Research on Cancer) (1993). Some naturally occurring substances: food items and constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks on Humans 56:489-521
- Imaoka S., Ikemoto S., Shimada T., Funae Y. (1992). *Mutagenic activation of aflatoxin B₁ by pulmonary, renal, and hepatic cytochrome P450s from rats*. *Mutation research* 269: 231-236
- Iqbal S.Z., Jinap S., Pirouz A.A., Ahmadfaizal A.R. (2015). Aflatoxin M1 in milk and dairy products, occurrence and recent challenges: a review. *Trends in food science e technology* 46:110-119
- Ismail A., Akhtar S., Levin R. E., Ismail T., Riaz M. (2016). Aflatoxin M1: Prevalence and decontamination strategies in milk. *Critical reviews in Microbiology* 42(3):418-427
- Jackson P. E., Qian G. S., Friesen M. D. Zhu Y., Lu P., Wang J., Wu Y., Kensler T., Vogelstein B., Groopman J. D. (2001). Specific p53 Mutations Detected in Plasma and Tumors of Hepatocellular Carcinoma Patients by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Cancer Research* 61(1):33-35
- Jirillo F., Jirillo E., Magrone T. (2010). Donkey's and goat's milk consumption and benefit to human health with special reference to the inflammatory status. *Current Pharmaceutical Design* 16:859-863
- Jouany J.P. (2007). *Methods of preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds*. *Animal Feed Science and Technology* 137(3):342-362
- Jiang Y.H., Yang H.J., Lund P. (2012). *Effect of aflatoxin B1 on in vitro ruminal fermentation of rations high in alfalfa hay or ryegrass hay*. *Animal Feed Science and Tecnology*. 175:85-89
- Jirillo E., D'Alessandro A., A. G., Amati L., Tafaro A. Jirillo F., Pugliese V. (2010). Modulation of the human aged immune response by donkey milk intake. In: *61st annual meeting of the European Association for the Animal Production*. Ed. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, Olanda. pp.16:45
- Kanisawa M. & Suzuki S. (1978). Induction of renal and hepatic tumors in mice by ochratoxin A, a mycotoxin. *G69*: 599-600
- Kanisawa M. (1984). Synergistic effect of citrinin on hepatorenal carcinogenesis of OA in mice. In: *Toxigenic Fungi – Their Toxins and Health Hazard*. Ed. Kurata H. e Ueno Y. Elsevier, Tokyo, Giappone pp. 245-254
- Kebak B., Dobson A. D. W., Var I. (2006). *Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: A review*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 46:593- 619
- Keskin Y., Baskaya R., Karsli S., Yurdun T., Ozyaral O. (2009). Detection of aflatoxin M1 in human breast milk and raw cow's milk in Istanbul, Turkey. *Journal of Food Protection* 7:885-889
- Khoury E. A., Atoui A. (2010). Ochratoxin A: General overview and actual molecular status. *Toxins* 2:461-493
- Kiessling K. H., Pettersson H., Sandholm K., Olsen M. (1984). Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 47:1070-1073
- Kim J. E., Bunderson B. R., Croasdel A., Coulombe R. A. Jr. (2011). Functional characterization of alpha-class genes within the avian glutathione S-transferase from the turkey (*Meleagris gallopavo*). *Toxicology Science* 124: 45-53

- Klein P. J., van Vleet T. R., Hall J. O., Coulombe R. A. Jr. (2002). Biochemical factors underlying the age-related sensitivity of turkeys to aflatoxin B₁. *Comparative Biochemistry and Physiology- Part C: Toxicology & Pharmacology* 132:193-201
- Krogh P., Elling F., Gyrd-Hansen N., Hald B., Larsen A.E., Lillehoj E.B., Madsen A., Mortensen H.P., Ravnskov U. (1976). Experimental porcine nephropathy: changes of renal function and structure perorally induced by crystalline ochratoxin A. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica. Section B* 84:429-434
- Krogh P., Elling F., Friis C., Hald B., LARSEN A. E., Lillehoj E. B., Madsen A., Mortensen P., Rasmussen F., Ravnskov U. (1979). Porcine Nephropathy Induced by Long-Term Ingestion of Ochratoxin A. *Veterinary Pathology* 16: 466-475
- Kuhn I., Valenta H., Rohr K. (1995). Determination of ochratoxin A in bile of swine by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 668:333-337
- Kuiper-Goodman T., Scott P.M. (1989). Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomedical Environmental Science* 2:179–248
- Kumagai S., Aibara K. (1982). Intestinal absorption and secretion of ochratoxin A in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology* 64(1):94-102
- Lea T., Steien K., Størmer F.C. (1989). Mechanism of ochratoxin A-induced immunosuppression. *Mycopathologia* 107(2):153–159
- Leason S., Diaz G. J., Summers J. D. (1995). Aflatoxins. In: *Poultry Metabolic Disorders and Mycotoxins*. University Books, Guelph (Canada)
- Lindsay S. (1992). High Performance Liquid Chromatography. In: *Analytical Chemistry by open learning*. Ed. John Barnes. London, U.K
- Malir F., Ostry V., Pfohl-leszkowicz A., Novotna E. (2014). Ochratoxin A: Developmental and Reproductive Toxicity: An Overview. *Birth Defects Research Part B* 98:493-502
- Mally A., Zepnik H., Wanek P., Eder E., Dingley K., Ihmels H., Völkel W., Dekant W. (2004). Ochratoxin A: Lack of Formation of Covalent DNA Adducts. *Chemical Research in Toxicology* 17(2):234-42
- Mally A., Volkel W., Amberg A., Kurz M., Wanek P., Eder E., Hard G., Dekant W. (2005). Functional, Biochemical, and Pathological Effects of Repeated Oral Administration of Ochratoxin A to Rats. *Chemical Research in Toxicology* 18(8):1242-52
- Mally A., Hard G. C., Dekant W. (2007). Ochratoxin A as a potential etiologic factor in endemic nephropathy: Lessons from toxicity studies in rats. *Food and Chemical Toxicology* 45:2254-2260
- Mally A., Dekant W. (2009). Mycotoxin and the kidney: Modes of action for renal tumor formation by ochratoxin A in rodents. *Molecular Nutrition & Food Research* 53:467-478
- Mally A. (2012). Ochratoxin A and mitotic disruption: mode of action analysis of renal tumor formation by ochratoxin A. *Toxicological Sciences* 127: 315-330
- Marin-Kuan M., Cavin C., Delatour T., Schilter B. (2008). Ochratoxin A carcinogenicity involves a complex network of epigenetic mechanism. *Toxicol* 52:195-202
- Marin S., Ramos A.J., Cano-Sancho G., Sanchis V. (2013). Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and chemical toxicology* 60: 218-237
- Markaki P., Delpont-binet C., Grosso F., Dragacci S. (2001). Determination of Ochratoxin A in Red Wine and Vinegar by Immunoaffinity High-Pressure Liquid Chromatography. *Journal of Food Protection* 64: 533-537.
- Marquardt R. R., Frohlich A. A. (1992). A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. *Journal of Animal Science* 70:3968-3988

- Marsilio R., Fellin A., Tealdo E. (1996). Le Micotossine nei prodotti vegetali. In: *Microbiologia dei prodotti di origine vegetale*. Ed. Chiriotti, Torino, Italia pp. 367-382
- Martini M. (2008). I funghi micotossigeni e le micotossine. *Rivista on-line di agricoltura, zootecnia e ambiente* n. 60. Disponibile all'indirizzo: http://www.rivistadiagraria.org/riviste/vedi.php?news_id=205&cat_id=70
- Masoero F., Gallo A., Moschini M., Piva G., Diaz D. (2007). Carryover of aflatoxin from feed to milk in dairy cows with low or high somatic cell counts. *Animal* 1(9):1344-1350
- Mayura K., Reddy R.V., Hayes A.W., Berndt W.O. (1982). Embryocidal, fetotoxic and teratogenic effects of ochratoxin A in rats. *Toxicology* 25:175-185
- Mc Kean C., Tang L., Tang M., Billiam M., Wang Z., Theodorakis C. W., Kendall R. J., Wang Z. (2006). Comparative acute and combinative toxicity of aflatoxin B1 and T-2 toxin in animals and immortalized human cell lines. *Journal of Applied Toxicology* 44: 868-876
- Monroe D. H., Eaton D. L. (1987). Comparative effects of butylated hydroxyanisole on hepatic in vivo DNA binding and in vitro biotrasformation of aflatoxin B₁ in the rat and mouse. *Toxicology and Applied Pharmacology* 90:401-409
- Monson M. S., Coulombe R. A., Reed K. M. (2015). Aflatoxicosis: Lessons from Toxicity and Responses to Aflatoxin B₁ in Poultry. *Agriculture* 5:742-777
- Moretti A, Logrieco A, Bottalico A. (2006). Micotossine nella filiera cerealicola. *Informatore fitopatologico* 2. Disponibile all'indirizzo: <http://www.caip.it/immagini/allegati/Fusariosi%20frumento%20timing%20interventi%2024.pdf>
- Morugesan G. R., Ledoux D. R., Naehrer K., Berthiller F., Applegate T. J., Grenier B. Phillips T. D., Schatzmayr G. (2015). Prevalence and Effects of Mycotoxins on Poultry Health and Performance, and Recent Development in Mycotoxin Counteracting Strategies. *Poultry Science* 94:1298-1315
- Mucchetti G. e Neviani E. (2006). *Microbiologia e tecnologia lattiero-casearia*. Ed. Tecniche Nuove, Milano, Italia
- Muller G., Kielstein P., Kohler H., Berndtand A., Rosner H. (1995). Studies of the influence of ochratoxin A on immune and defence reactions in the mouse model. *Mycoses* 38:85-95
- Muller H. M., Lerch C., Muller K., Eggert W. (1998). Kinetic profiles of ochratoxin A and ochratoxin α during in vitro incubation in buffered forestomach and abomasal contents from cows. *Natural Toxins* 6:251-258
- Munro I.C., Scott P.M., Moodie, C.A., Willes, R.F. (1973). Ochratoxin A, occurrence and toxicity. *National Toxicology Program technical report series* 358:1-142
- Nebbia C., Caloni F. (2009). Micotossine. In: *Residui di farmaci e contaminanti ambientali nelle produzioni animali*. Ed. EdiSES, Napoli, Italia
- Nidhina N., Bhavya M.L., Bhaskar N., Muthukumar S.P., Murthy S. (2017). Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in rumen liquor and its implications. *Food Control* 71:26–31
- Ozçelik N., Koşar A., Soysal D. (2001). Ochratoxin A in human serum samples collected in Isparta-Turkey from healthy Individuals and individuals suffering from different urinary disorders. *Toxicology Letters* 121(1):9-13

- Park D.L., Njapau H., Boutrif E. (1999). Minimizing risks posed by mycotoxins utilizing the HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point) concept. *FAO* 23: 49-56.
- Patil R.D., Dwivedi P., Sharma A.K. (2006). Critical period and minimum single oral dose of ochratoxin A for inducing developmental toxicity in pregnant Wistar rats. *Reproductive Toxicology* 22:679-687
- Pei S. C., Zhang Y. Y., Eremin S. A., Lee W. J. (2009). Detection of aflatoxin M1 in milk products from China by ELISA using monoclonal antibodies. *Food Control* 20:1080-1085
- Pelkonen P., Lang M. A., Wild C. P., Negishi M., Juvonen R. O. (1994). Activation of aflatoxin B₁ by mouse CYP2A enzymes and cytotoxicity in recombinant yeast cells. *European Journal of Pharmacology* 292: 67-73
- Peršič N., Pleadin J., Kovačević D., Scortichini G., Milone S. (2013). Ochratoxin A in raw materials and cooked meat products made from OTA-treated pigs. *Meat Science* 96(1):203-210
- Pfohl-leszkowicz A., Castegnaro M. (1999). L'ochratoxin A. In: *Les mycotoxines dans l'alimentation: Evaluation et gestion du risque*. Ed. Tec & Doc. 249-278.
- Pfohl-leszkowicz A., Chakor K., Creppy E. E., Dirheimer G. (1991). DNA Adduct Formation in Mice treated with Ochratoxin A. In: *IARC Scientific Publications* 245-253
- Pietri A., Bertuzzi T., Gualla A., Piva G. (2006). Occurrence of ochratoxin a in raw ham muscles and in pork products from Northern Italy. *Italian Journal of Food Science* 18:99-106
- Pinelli E., El Adlouni C., Pipy B., Quartulli F., Pfohl-Leszkowicz A. (1999). Roles of cyclooxygenase and lipoxygenases in ochratoxin A genotoxicity in human epithelial lung cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 7(2):95-107
- Piro R., Biancardi A. (2010). Micotossine. Disponibile all'indirizzo: www.izsler.it.
- Piva G., Pietri A., Moschini M. (1994). Formation and carry-over of mycotoxins. In: *Residues of veterinary drugs and mycotoxins in animal products*. Edizione Wageningen Pers. 154
- Pompa G. (1994). Aflatossine. In: *Tossicologia veterinaria*. Ed. Ambrosiana, Milano, Italia
- Prandini A., Tansini G., Sigolo S., Filippi L., Laporta M., Piva G. (2009). On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food and Chemical Toxicology* 47:984-991
- Radic B., Fuchs R., Peraica M., Lucic A. (1997). Ochratoxin A in human sera in the area with endemic nephropathy in Croatia. *Toxicology Letters* 91:105-109
- Rahimi E., Bonyadian M., Rafei M., Kazemeini H. R. (2010). Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk of five dairy species in Ahvaz, Iran. *Food and Chemical Toxicology* 48:129-131
- Rahmani A., Jinap S., Soleimany F. (2009). Qualitative and quantitative analysis of mycotoxin. *Food Science and Food Safety* 8(3): 202-251
- Ramsdell H. S., Eaton D. L. (1990). Species susceptibility to aflatoxin B₁ carcinogenesis: Comparative kinetics of microsomal biotransformation. *Cancer Research* 50:615-620
- Raj H.G., Lotlikar P.D. (1984). Urinary excretion of thiol conjugates of aflatoxin B1 in rats and hamsters. *Cancer Letters* 22:125-133
- RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed) (2016). Relazione sul sistema di allerta rapido per gli alimenti e i mangimi.
- Rawal S., Coulombe R. A. Jr. (2010). Cloning expression and functional characterization of cytochrome P450 3A37 from turkey liver with high aflatoxin B1 epoxidation activity. *American Chemical Society* 23:1322-1329.

- Rawal S., Kim J. E., Coulombe R. (2010). Aflatoxin B₁ in poultry: Toxicology, metabolism and prevention. *Research in Veterinary Science* 89:325-331
- Ringot D., Chango A., Schneider Y., Larondelle Y. (2006). Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chemico-Biological Interaction* 159:18-46
- Roth A., Chakor K., Creppy E. E., Kane A., Roschenthaler R., Dirheimer G. (1988). Evidence for an enterohepatic circulation of ochratoxin A in mice. *Toxicology* 48:293-308
- Salimei E., Fantuz F. (2012). Equid milk for human consumption. *International Dairy Journal* 24:130-142
- Schlatter C., Studer-Rohr J., Rasonyi T. (1996). Carcinogenicity and kinetic aspects of ochratoxin A. *Food additives and Contaminants* 13:43-44
- Senyuva H.Z., Gilbert J. (2010). Immunoaffinity column clean-up techniques in food analysis: a review. Special issue: Immunoaffinity techniques in analysis. *Journal of Chromatography B* 878(2):115-132
- Selvaray J.N., Wang Y., Zhou L., Zhao Y., Xing F., Dai X., Liu Y. (2015). Recent mycotoxin survey data and advanced mycotoxin detection techniques reported from China: a review. Taylor e Francis. 32:440-452.
- Shina K. K., Bhatnagar D. (1998). Mycotoxins in Agriculture and Food Safety. *Plant Pathology* 49(1):166-167
- Shuib N.S., Makahleh A., Salhimi S.M., Saad B. (2016). Natural occurrence of aflatoxin M1 in fresh cow milk and human milk in Penang, Malaysia. *Food Control* 32(4):518–532
- Smith T. K. and Gabriel Diaz-Llano (1995). A review of the effect of feed-borne mycotoxins on pig health and reproduction. In: *Sustainable animal production* Ed. Aland A. e Madec F., Wageningen, Olanda
- Smith T. K., Korosteleva S. N. (2012). The significance of feed-borne mycotoxins in ruminant nutrition. In: *Micotoxicoses. In animals Economically Important*. Ed. Gonzalez E. et al.
- Southern L.L., Clawson A.J. (1979). Effect of aflatoxins on finishing swine. *Journal of Animal Science* 49:1006-1011
- Sreemannarayana O., Frohlich A. A., Vitti T.G., Marquardt R.R., Abramson D. Studies of the Tolerance and Disposition of Ochratoxin A in Young Calves. *Journal of Animal Science* 66(7):1703-1711
- Stern M. C., Umbach D. M., Yu M .C., London S., Zhang Z. Q. Taylor J. A., Hepatitis B, aflatoxin B₁, and p53 codon 249 mutation in hepatocellular carcinomas from Guangxi, People's Republic of China, and a meta-analysis of existing studies. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 10(6):617-625
- Steyn P.S., Thiel P.G., Trinder D.W. (1991). Detection and quantification of mycotoxins in animal feed by chemical analysis. In: *Mycotoxins and animal foods*. Ed..Smith J.E., Henderson R.S., Boca Raton, Florida, USA
- Streit E., Schatzmayr G., Tassis P., Tzika E., Marin D., Taranu I., Tabuc C., Nicolau A., Aprodu I., Puel O., Oswald Isabelle P. (2012). Current Situation of Mycotoxin Contamination and Co-occurrence in Animal Feed—Focus on Europe. *Toxins* 4:788-809
- Stoev S.D., Goundasheva D., Mirtcheva T., Mantle P.G. (2000). Susceptibility to secondary bacterial infections in growing pigs as an early response in ochratoxicosis. *Experimental and Toxicologic Pathology* 52:287-296
- Stoev S. D. Paskalev M., MacDonald S., Mantle P. G. (2002). Experimental 1 year ochratoxin A toxicosis in pigs. *Experimental and Toxicologic Pathology* 53(6):481-487
- Størmer F.C., Støren O., Hansen C.E., Pedersen J.I., Aasen A.J.(1981). Formation of (4R)- and (4S)-4-hydroxyochratoxin A and 10-hydroxyochratoxin A from Ochratoxin A by rabbit liver microsomes. *Applied and Environmental Microbiology* 42:1051-1056

- Succi G., Tamburini A., Sandrucci A. (2001). Aflatossine e gestione aziendale: relazioni tra performance della mandria e contaminazione di alimenti e latte. In *Aflatossine nel latte e negli alimenti zootecnici: metodiche analitiche e anamnesi di allevamento. Progetto regionale: ricerca dei determinanti la qualità del latte per l'applicazione del Reg. CE 1525 del 16 luglio 1998*. Disponibile all'indirizzo: http://www.cialombardia.org/documenti/produzioni_vegetali/aflatossine_metodiche.pdf
- Suzuky S., Satoh T., Yamakazi M. (1977). The pharmacokinetics of ochratoxin A in rats. *Japan Journal of Pharmacology* 27:735-744
- Tabata S (2003). Aflatoxins and related compounds. In: *Encyclopedia of dairy sciences*. Ed. Roginsky, Amsterdam, Olanda
- Tajkarimi M., Aliabadi-Sh F., Salahnejhad A., Poursoltani H., Motallebi A.A., Mahdavi H., (2008). Aflatoxin M₁ contamination in winter and summer milk in 14 states in Iran. *Food Control* 19:1033-1036
- Tompkin R. B. (2005). Nitrite. In *Antimicrobials in food* (3rd ed.). Ed. Davidson P. M., Sofos J. N., Branen A. L.. Boca Raton, Florida, USA
- Tozzi B., Liponi G. B., Meucci V., Casini L., Dall'Asta C., Intorre L., Gatta D. (2016). Aflatoxins M1 and M2 in the milk of donkeys fed with naturally contaminated diet. *Dairy Science & Technology* 96(4) :513–523
- Trivedi A.B., Doi E., Kitabatake N. (1992). Detoxification of ochratoxin A on heating under acidic and alkaline conditions. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 56:741-745
- Turner NW, Subrahmanyam S, Piletsky SA (2009). Analytical for determination of mycotoxins. A review. *Analytica Chimica Acta* 632: 168-180.
- Upadhaya, S.D., Sung, H.G., Lee C.H., Cho K.J., Ha J.K. (2009). Document Comparative study on the aflatoxin B1 degradation ability of rumen fluid from Holstein steers and Korean native goats. *Journal of Veterinary Science* 10(1):29-34
- Van der Merwe K., Steyn P., Fourie L., Scott D., Theron J. (1965). Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature* 205:1112-1113
- Var I., Kebak B. (2009). Detection of aflatoxin M1 in milk and dairy products consumed in Adana, Turkey. *International Journal of Dairy Technology* 62(1):15-18
- Walker R., Larsen J.C. (2005). Ochratoxin A: previous risk assessments and issues arising. *Food Additives and Contaminants* (part A) 22:6-9
- Wei X., Sulik K.K. (1993). Pathogenesis of craniofacial and body wall malformations induced by ochratoxin A in mice. *American Journal of Medical Genetics* 47:862-871
- Whitaker T.B., Dickens J.W., Giesbrecht F.G. (1991). Testing animal feedstuffs for mycotoxins: sampling, subsampling and analysis. In: *Mycotoxins and animal food*. Ed. Smith J.E. e Henderson R.S.
- Wilk-zasadna I., Minta M. (2009). Developmental toxicity of ochratoxin A in rat embryo midbrain micromass cultures. *International Journal of Molecular Science* 10:37-49
- Womack E. D., Sparks D. L., Brown A. E. Aflatoxin M1 in milk and milk products: a short review. *World Mycotoxin Journal* 9 (2): 305-315
- Wu J., Chen R., Zhang C., Li K., Xu W., Wang L., Chen Q., Mu P., Jiang J., Wen J., Deng Y. (2016). Bioactivation and Regioselectivity of Pig Cytochrome P450 3A29 towards Aflatoxin B1. *Toxins* 8(9):267

- Yanagimoto T., Itoh S., Sawada M., Hashimoto H., Kamataki T. (1997). Mouse cytochrome P450 (Cyp3a-11): Predominant expression in liver and capacity to activate aflatoxin B₁. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 340: 215-218
- Xiao H., Marquardt R. R., Frohlich A. A., Phillips G. D., Vitti T. G. (1991). Effect of a hay and a grain diet on the rate of hydrolysis of ochratoxin A in the rumen of sheep. *Journal of Animal Science* 69:3706-3714
- Xiong J. L., wang Y. M., Mac M. R., Liu J. X. (2013). Seasonal variation of aflatoxin M₁ in raw milk from the Yangtze River Delta region of China. *Food Control* 34:703-706
- Yang S., Zhang H., de Saeger S., de Boevre M., Sun F., Zhang S., Cao X., Wang Z. (2015). *In vitro* and *in vivo* metabolism of Ochratoxin A: A comparative study using ultra-performance liquid chromatography-quadrupole/time-of-flight hybrid mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407(13):3579-3589
- Yard G., Liboz T., Mathieu F., Guyonvarc'h A., Lebrihi A. (2011). Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. *Food additives & Contaminants: Part A* 28(11):1590-609
- Zambonelli C., Papa F., Romano P., Suzzi G., Grazia L. (1992). *Microbiologia dei salumi* Ed. Edagricole, Bologna, Italia
- Zanardi E., Ghidini S., Conter M., Ianieri A. (2010). Mineral composition of Italian salami and effect of NaCl partial replacement on compositional, physico-chemical and sensory parameters. *Meat Science* 94:742-747
- Zinedine A, Fernández-Franzón M., Mañes J, Manyes L. (2017). Multi-mycotoxin contamination of couscous semolina commercialized in Morocco. *Food Chemistry* 214: 440 – 446

Sitografia

- http://www.conorziosalumidicalabriadop.it/disciplinare_capocolloDOP.pdf
- http://www.conorziosalumidicalabriadop.it/disciplinare_soppressataDOP.pdf
- http://www.conorziosalumidicalabriadop.it/disciplinare_pancettaDOP.pdf
- http://www.conorziosalumidicalabriadop.it/disciplinare_salsicciaDOP.pdf
- <http://www.agraria.org>
- <http://www.rivistadirittoalimentare.it/rivista/2010-04/PETRELLI.pdf>
- <http://www.efsa.europa.eu/>
- http://www.assomais.it/cambiamento_climatico_aflatossine/
- www.intechopen.com

Normativa

Decreto Ministeriale, 28 Dicembre 1994. Autorizzazione all'impiego di colture di avviamento "starters microbici" nella preparazione degli insaccati carnei la cui tecnologia produttiva non comporti trattamenti con il calore. Gazzetta Ufficiale n.89, 15-04-1995

Decreto Ministeriale, 27 febbraio 1996, n. 209. Regolamento concernente la disciplina degli additivi alimentari consentiti nella preparazione e per la conservazione delle sostanze alimentari in attuazione delle Direttive n.94/34/CE, n. 94/35/CE, n. 94/36/CE, n. 95/2/CE e n.95/31/CE. Gazzetta Ufficiale n. 96, 24-4-96, Supplemento Ordinario

Regolamento (CE) n. 466/2001 della Commissione del 8 Marzo 2001. Definizione dei tenori massimi di taluni contaminanti presenti nelle derrate alimentari. Gazzetta Ufficiale della Comunità europea del 16-3-2001. L 77, pp.1-13.

Regolamento (CE) n. 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 delle Comunità europee del 1-2-2002. L 31, pp.1-24

Regolamento (CE) n. 472/2002 della Commissione, 12 febbraio 2002. Modifica il regolamento (CE) n. 466/2001 che definisce i tenori massimi di taluni contaminanti presenti nelle derrate alimentari. Gazzetta ufficiale delle Comunità Europee del 16 marzo 2002, n. L 75: 18-20

Regolamento (CE) n. 683/2004 della Commissione del 13 Aprile 2004. Modifica il Regolamento CE n. 466/2001 riguardo le aflatossine e l'ocratossina A negli alimenti per lattanti e prima infanzia. Gazzetta Ufficiale della Comunità europea del 15-4-2004, L 106, pp. 3-5

Regolamento (CE) n. 401/2006 della Commissione, 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 del 9 marzo 2006, n. L 70: 12-34

Regolamento (CE) n. 1881/2006 della Commissione, del 19 dicembre 2006, che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari (Testo rilevante ai fini del SEE). Gazzetta ufficiale dell'Unione europea del 20-12-2006. L 364, pp. 5-24

Regolamento (CE) n. 105/2010 della Commissione del 5 Febbraio 2010. Modifica del Regolamento (CE) n. 1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari, per quanto riguarda l'ocratossina A. Gazzetta Ufficiale della Comunità europea del 27-2-2010, L 50, pp 8-12

Regolamento (UE) n. 165/2010 della Commissione, 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 del 27 febbraio 2010, n. L 50: 8-12

Regolamento (CE) n. 594/2012 della Commissione del 5 Luglio 2012. Modifica il regolamento (CE) n. 1881/2006 per quanto riguarda i tenori massimi dei contaminanti ocratossina A, PCB non diossina-simili e melamina nei prodotti alimentari. Gazzetta Ufficiale della Comunità europea del 6-7-2012, L 176, pp.43-45