

CONTROLLO UFFICIALE DI MICOTOSSINE IN DERRATE ALIMENTARI DI PROVENIENZA EXTRA- EUROPEA IN INGRESSO DAL PORTO DI RAVENNA

Maria Ferrari (a), Angela Guerrini (b), Davide Verna (b), Ivan Scaroni (b), Valerio Strocchi (b), Luciano Calò (c), Michele Buonaiuto (c), Giuseppe Marrali (c), Raffaella Patricelli (c), Raffaella Perfetti (c)

(a) *Agenzia regionale per la prevenzione e l'ambiente ARPA Emilia Romagna, Sezione Provinciale di Bologna, Bologna*

(b) *Agenzia regionale per la prevenzione e l'ambiente ARPA Emilia Romagna, Sezione Provinciale di Ravenna, Ravenna*

(c) *Ufficio di Sanità Marittima, Aerea e di Frontiera USMAF Bologna, Unità territoriale di Ravenna, Ravenna*

Introduzione

Ravenna è uno dei tredici punti di ingresso, presenti in Italia, per l'importazione sul territorio nazionale e comunitario di alimenti e mangimi provenienti da paesi extra-europei (1).

L'Ufficio di Sanità Marittima, Aerea e di Frontiera (USMAF) di Bologna - Unità territoriale di Ravenna, quale articolazione periferica del Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali esercita funzioni, in ambito portuale e aeroportuale, di vigilanza e controllo su passeggeri e merci in arrivo dai paesi extra-europei. I laboratori di ARPA (Agenzia regionale per la prevenzione e l'ambiente) Emilia Romagna operano a livello regionale per l'esecuzione degli accertamenti analitici finalizzati al controllo ufficiale di alimenti e bevande, verificandone la conformità alla normativa comunitaria.

I principali prodotti alimentari che transitano attraverso il porto di Ravenna sono: cereali, frutta a guscio (arachidi, pistacchi, nocciole, ecc.), frutta secca (fichi secchi, uva sultanina, albicocche, ecc.), spezie, vegetali freschi (frutta e verdura), legumi, oli e grassi vegetali, prodotti trasformati (frutta e verdura conservate, succhi e puree di frutta, sfarinati, ecc.).

Su queste derrate i parametri chimici più frequentemente ricercati sono: micotossine, residui di fitofarmaci, metalli pesanti, additivi, organismi geneticamente modificati e caratteristiche di composizione.

In questo lavoro viene esaminato il flusso di alimenti sottoposti a controllo per la ricerca di micotossine, provenienti da paesi extra-europei, negli anni 2001-08, prelevati da personale USMAF presso il porto di Ravenna e analizzati dal Laboratorio Integrato ARPA, Sezione Provinciale di Ravenna.

Materiali e metodi

Il campionamento di alimenti destinati alla ricerca di micotossine viene eseguito dal personale tecnico USMAF in base alle procedure stabilite dal Reg. CE 401/2006 (2). La merce all'interno di un container trasportato via nave può essere sfusa, o contenuta in 600-700 sacchi da 25-30 kg, o in una dozzina di sacchi da 650 kg (*big bag*). Nel caso di merce sfusa si ricorre al campionamento in stiva, tramite l'utilizzo di sonde; nell'altro caso, il container viene svuotato e i sacchi di merce riposti in un magazzino, dove avviene il campionamento. Le partite di frutta a

guscio, e spesso quelle di frutta secca, sono maggiori di 15 t, pertanto viene prelevato un campione globale di 30 kg che è mescolato e suddiviso in 3 campioni di laboratorio, del peso di 10 kg ognuno. I 3 campioni di laboratorio, sigillati e accompagnati dal verbale di prelievo, sono consegnati alle strutture di ARPA che si occupano della loro omogeneizzazione e dell'esecuzione delle analisi.

Attualmente, sono a disposizione due tipologie di apparecchiature in grado di processare fino a 10-30 kg di prodotto garantendo un elevato grado di omogeneizzazione: un mulino a coltelli di tipo industriale, per la macinazione a secco e un mixer verticale con testa disintegrante ad immersione, per la macinazione ad umido (3-5).

Il laboratorio ARPA di Ravenna utilizza principalmente la tecnica di omogeneizzazione ad umido, raccomandata dalle linee guida redatte da organismi tecnici della comunità europea (SANCO/1208/2009) (6). La macinazione e omogeneizzazione dei campioni ad umido prevede la preparazione di un impasto semi-fluido (*slurry*) costituito dal campione finemente macinato in presenza di acqua, rispettando le proporzioni indicate in Tabella 1. Queste proporzioni sono indicative e possono variare in base alla capacità del campione di assorbire acqua.

Tabella 1. Rapporto ponderale campione/acqua per l'omogeneizzazione dei campioni con preparazione di *slurry*

Tipologia di campione	Campione/Acqua (p/p)
Pistacchi in guscio	1/1
Arachidi in guscio	1/2
Arachidi, nocciole, pistacchi senza guscio, fichi secchi	1/1 o 1/0,8
Mais, grano e orzo	1/1 o 1/1,5
Derivati di cereali (cracker, ecc.)	1/1 o 1/2

Il laboratorio Integrato ARPA opera con un sistema di gestione della qualità conforme alla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025, in ottemperanza alle disposizioni dell'art.12 del Reg. CE 882/2004 (7). La determinazione delle Aflatossine viene eseguita secondo quanto previsto dal metodo AOAC 999.07 (8), soggetto ad accreditamento SINAL e ISS. Il metodo soddisfa i criteri di rendimento fissati dal Reg. CE 401/2006 (2). Periodicamente sono effettuate prove di recupero. Il valore di recupero medio è utilizzato per la correzione del dato analitico, come richiesto dal Reg. CE 401/2006. Il dato è corredato dall'incertezza estesa di misura, ottenuta moltiplicando per un fattore 2 il valore dell'incertezza composta, a sua volta calcolata con il metodo di Horwitz. L'incertezza estesa è indispensabile ai fini della valutazione di conformità del dato analitico rispetto ai limiti fissati dal Reg. CE 1881/2006 (9). Infine, almeno una volta all'anno, per ogni tipologia di matrice di interesse, il laboratorio partecipa a circuiti interlaboratoriali, organizzati da FAPAS.

Risultati e discussione

In Tabella 2 si riportano i quantitativi delle principali categorie di merce in ingresso dal Porto di Ravenna, per le quali è previsto il controllo di micotossine, espressi in tonnellate, per gli anni 2006-2008 e per i primi otto mesi del 2009. L'importazione di queste derrate è legata alle attività produttive dell'industria alimentare; pertanto si registrano flussi di ingresso più intensi nel periodo invernale, in ragione del maggiore consumo di frutta a guscio e frutta secca. Nel corso degli anni è stato notato un calo dei quantitativi di merce, probabilmente dovuto a

fattori economici. In particolare, negli ultimi 12 mesi, la recente crisi mondiale ha avuto pesanti ripercussioni sull'attività del porto di Ravenna, con una ulteriore diminuzione delle quantità di merci transitate, specialmente di frutta secca e cereali.

Tabella 2. Quantità delle principali categorie di merci soggette a controllo di micotossine

Tipologia di merce	t/a (2006)	t/a (2007)	t/a (2008)	t/a (2009*)
Cereali	324.476	3.563.831	427.896	156.610
Frutta secca/a guscio	32.170	35.626	24.690	7.384
Spezie	99	81	19	105

(*) dati disponibili fino al 31/08/2009

In Tabella 3 e 4 sono riportati i campioni sui quali sono state ricercate le Aflatossine e l'Ocratossina A, suddivisi per tipologia di matrice, analizzati dal 2001 al 2008. I campioni sono stati classificati rispetto ai limiti di legge (Reg. CE 1881/2006) (9) come conformi (C) e non conformi (NC). Nella voce "altra frutta" sono compresi pinoli, noci, mandorle, armelline, anacardi e albicocche secche. I campioni di spezie ed erbe infusionali sono costituiti principalmente da pepe, peperoncino ed erbe aromatiche. Nella voce "cereali" sono compresi legumi e prodotti derivati.

Tabella 3. Numero di campioni conformi (C) e non conformi (NC) rispetto ai limiti di legge, analizzati negli anni 2001-2008, per la ricerca di Aflatossine

Anno	C o NC	Arachidi	Pistacchi	Nocciole	Fichi secchi	Altra frutta	Cereali	Spezie	Totale	% NC
2001	C	134	32	2	21	13	60*	6	208	/
	NC	1	13	0	5	0	0	0	19	10
2002	C	251	33	11	4	35	119*	19	353	/
	NC	2	10	0	0	0	1	1	14	4
2003	C	123	7	3	6	10	11	28	188	/
	NC	1	20	0	1	0	0	0	22	12
2004	C	100	2	28	15	37	23	15	220	/
	NC	6	7	0	0	0	0	0	13	6
2005	C	125	0	48	10	6	1	0	190	/
	NC	11	4	2	0	0	0	0	17	9
2006	C	63	1	51	13	20	2	0	150	/
	NC	21	1	6	1	0	0	0	29	19
2007	C	94	4	37	4	20	11	4	174	/
	NC	8	2	2	5	0	0	0	17	10
2008	C	60	2	27	3	12	8	3	115	/
	NC	17	4	4	3	1	0	0	29	25

*Sono compresi campioni di cereali destinati ad uso zootecnico

I campioni sui quali è stata effettuata la ricerca di Aflatossine (Tabella 3) sono più numerosi rispetto a quelli sui quali è stato determinato il contenuto di Ocratossina A (Tabella 4). Le altre micotossine (Deossinivalenolo, Zearalenone, Patulina) sono state ricercate solo su alcuni campioni di cereali e prodotti derivati dalle mele.

Tabella 4. Numero di campioni conformi analizzati negli anni 2001-2008, per la ricerca di Ocratossina A

Campione	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
Uva sultanina	30	39*	16	18	20	13	9	9
Vino/birra	0	0	13	15	0	0	2	0
Frutta secca	0	0	7	0	6	5	1	1
Cacao/caffè e derivati	1	4	5	7	3	5	1	1
Cereali	1	1	0	1	0	0	9	7
Totale	32	44	41	41	29	23	22	18

* 2 NC

Arachidi, pistacchi e nocciole sono le matrici più frequentemente analizzate, rappresentano infatti il 60-80% dei campioni sui quali sono state ricercate le Aflatossine. In generale il maggior numero di non conformità è stato riscontrato in campioni di arachidi, nocciole, pistacchi e fichi secchi, in percentuali variabili nell'arco degli anni esaminati; inoltre dal 2004 sono drasticamente diminuiti i campioni di pistacchi, mentre sono aumentati quelli di nocciole. Relativamente a tali categorie si effettua un'analisi più approfondita sui risultati analitici ottenuti. Per quanto riguarda l'Ocratossina A, l'unica matrice sulla quale sono state riscontrate non conformità è l'uva sultanina nel 2002 (vedi Tabella 4).

In Figura 1a è riportato il numero di campioni di arachidi analizzati, suddivisi in conformi e non conformi, con le percentuali di questi ultimi. I campioni di arachidi sono sempre elevati (50-70% dei campioni per la ricerca di Aflatossine), si osserva tuttavia un calo delle partite di merce controllate: 132 campioni nel 2001, 250 nel 2002, 110-120 negli anni 2003-2005, circa 100 nel 2006 e 2007, solo 77 nel 2008. Sono cambiati, nel corso degli anni, i paesi di origine: Israele ed Etiopia sono i principali paesi di provenienza nel 2001; a partire dal 2002 si sono aggiunti Egitto e Cina; dal 2003 l'Egitto è il principale paese da cui provengono le derrate di arachidi. La percentuale di campioni non conformi è aumentata passando da 1% nel 2001 e 2002, a 6-8% nel 2004, 2005 e 2007; nel 2006 e 2008 si sono raggiunte percentuali di non conformità pari a 22-25%. La concentrazione di Aflatossina B₁ è aumentata. Negli anni 2001-2004 si sono in genere osservati livelli inferiori ai 10 µg/kg, mentre dal 2005 si sono presentati sempre più casi di contaminazioni a concentrazioni superiori a 30 µg/kg. L'aumento delle non conformità è stato riscontrato in coincidenza con l'applicazione, a partire dall'inizio del 2003, delle modalità di campionamento stabilite dalla Direttiva 98/53/CE, recepita in Italia dal DM 23/12/2000, e successivamente abrogata dal Reg. CE 401/2006 (2). Al contrario, fino al 2002, per ogni partita di merce veniva prelevato un unico campione di 2-3 kg. Queste tendenze indicano che le procedure definite dalla normativa comunitaria permettono di individuare un maggior numero di partite non conformi nonostante, nel corso degli anni, gli importatori abbiano messo in atto misure finalizzate a migliorare la qualità del prodotto, attraverso una più attenta selezione dei fornitori, un migliore controllo in loco del processo produttivo e la presentazione di un certificato di analisi al momento dell'importazione.

L'unico paese da cui provengono le nocciole è la Turchia. Il numero di campioni (Figura 1b) ha registrato un aumento, si passa da una decina di campioni nel 2002 fino a circa 50 campioni nel 2005 e 2006, per poi scendere a 25 campioni nel 2008. La percentuale di non conformità è al massimo 10% (anno 2008) e, come osservato per i campioni di arachidi, è aumentata negli ultimi anni.

In Figura 1c sono riportati i dati relativi ai pistacchi; Iran e Turchia sono i paesi da cui principalmente provengono questi prodotti. Nel 2009, sono stati analizzati per la prima volta prodotti provenienti dagli USA. Nel 2004 è stato osservato un drastico decremento dei campioni analizzati, imputabile, forse, ad un calo della domanda dell'industria alimentare, oppure alla scelta, da parte degli importatori, di un altro punto di ingresso. Le non conformità riguardano in

prevalenza i prodotti di origine iraniana, con una percentuale di non conformità sul totale dei campioni analizzati in 8 anni, del 40%. Solo tre campioni di provenienza turca sono risultati non conformi. Nel corso degli anni si evidenzia un'inversione nel rapporto conformità/non conformità: nei primi due anni considerati la percentuale di non conformità è intorno al 25%, successivamente sale al 74% nel 2003, al 78% nel 2004 fino ad arrivare al 100% nel 2005. Negli anni successivi, tale percentuale è calata, pur rimanendo elevata. Come osservato per le altre tipologie di campioni tale aumento è riconducibile all'applicazione delle procedure di campionamento previste dalla normativa comunitaria.

Il principale paese da cui provengono i fichi secchi è la Turchia. Il numero di campioni (Figura 1d) ha subito un decremento nel corso degli anni. Contrariamente a tale tendenza, a partire dal 2007 le non conformità sono aumentate sensibilmente, interessando il 50% dei campioni totali.

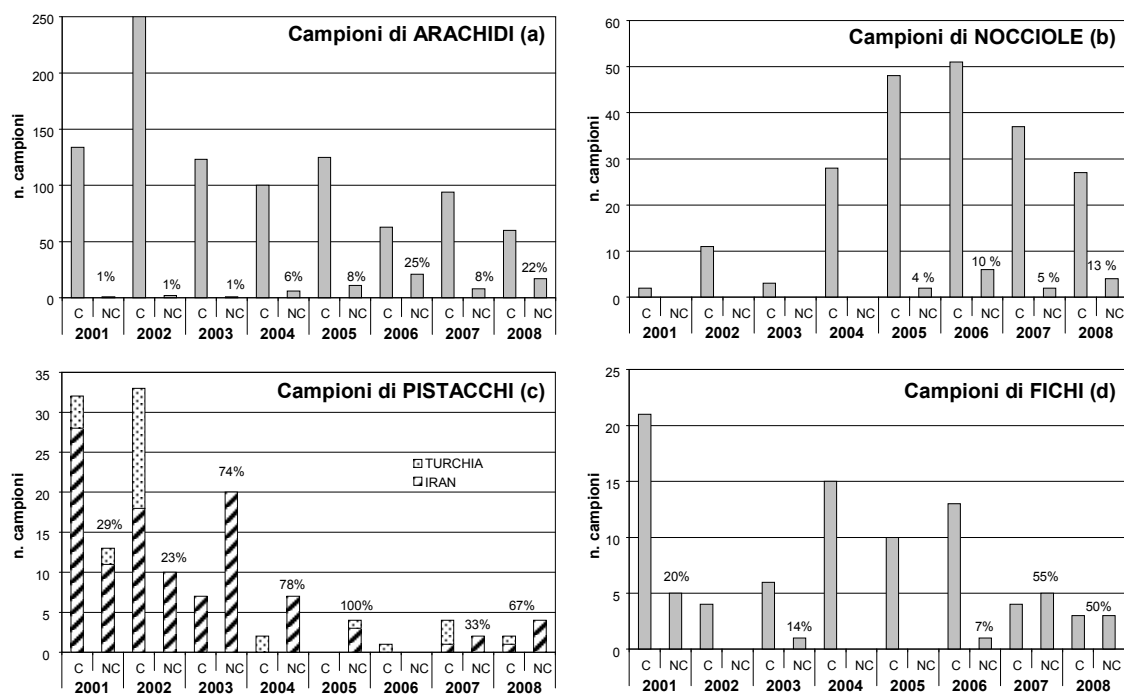


Figura 1. Campioni conformi (C) e non conformi (NC) di arachidi (a), noccioline (b), pistacchi (c) e fichi (d) analizzati nel periodo 2001-2008

Per approfondire le criticità legate all'eterogeneità della contaminazione da Aflatossine, sono stati raccolti i dati della concentrazione di Aflatossina B₁ nei campioni non conformi per il consumo umano diretto (limite di legge: 2 µg/kg) (9) analizzati nel 2008. Ogni campione rappresentativo di una partita di arachidi, pistacchi, o noccioline (campione globale) è costituito da tre campioni di laboratorio (due, nel caso dei fichi secchi); ciascun campione di laboratorio, del peso di 10 kg, è omogeneizzato e singolarmente analizzato, come descritto nella parte sperimentale. In Figura 2 sono riportate le concentrazioni di Aflatossina B₁ nei tre campioni di laboratorio e la concentrazione nel campione globale, calcolata come media della concentrazione dei tre campioni di laboratorio. L'Aflatossina B₁ rappresenta in generale il principale contributo alle Aflatossine totali.

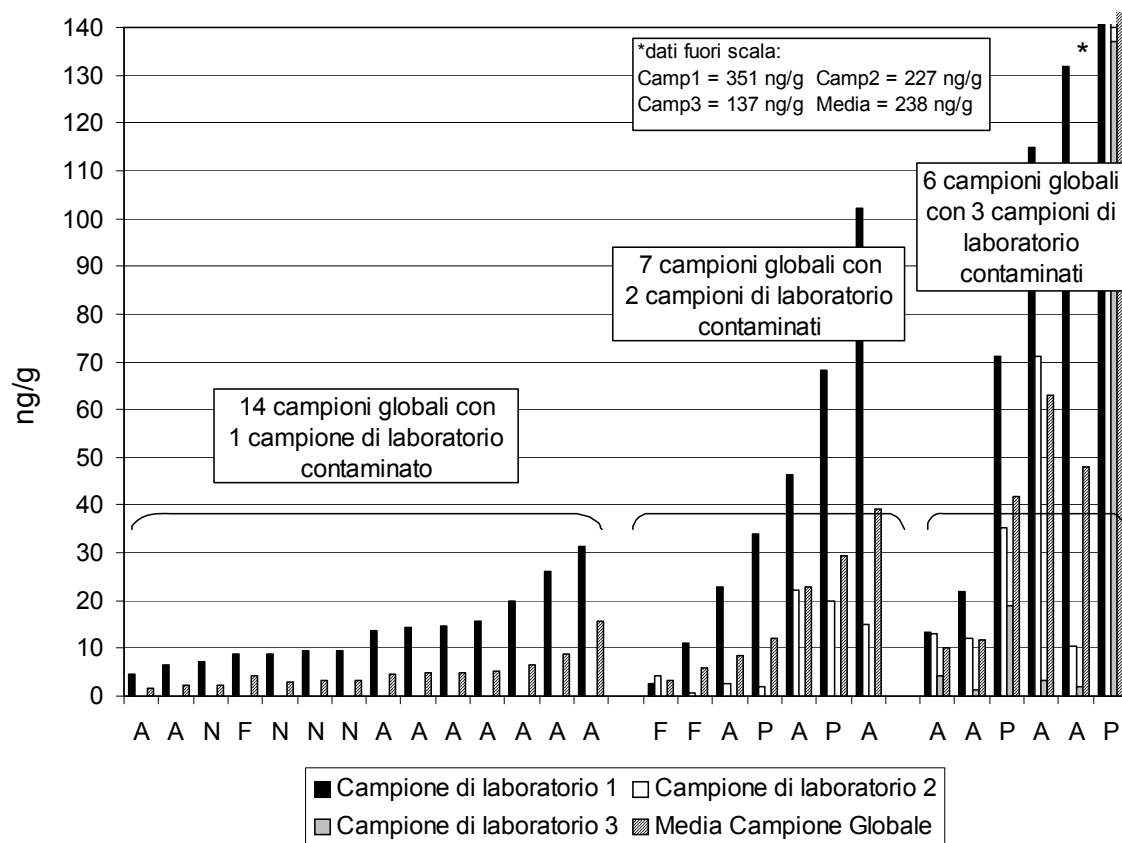


Figura 2. Concentrazione (ng/g) di Aflatossina B₁ nei tre campioni di laboratorio (anno 2008) e concentrazione media del campione globale (A = arachidi; N = nocciole; P = pistacchi; F = fichi)

Nel 2008 sono stati trovati 27 campioni globali non conformi, nei quali almeno uno dei tre campioni di laboratorio presenta una concentrazione di Aflatossina B₁ superiore, tenuto conto dell'incertezza di misura ($3,6 \pm 1,6 \mu\text{g/kg}$), all'attuale limite di legge ($2 \mu\text{g/kg}$) (9) per la frutta a guscio e la frutta secca destinata al consumo umano diretto. Di questi 27 campioni 16 sono di arachidi, 4 di nocciole, 4 di pistacchi e 3 di fichi secchi.

14 campioni, cioè la metà dei 27 campioni non conformi, presentano solo 1 campione di laboratorio positivo, con concentrazioni di Aflatossina B₁ comprese tra 4,5 e 31 $\mu\text{g/kg}$. In 7 di questi 14 campioni la concentrazione di Aflatossina B₁ è inferiore a 10 $\mu\text{g/kg}$, in 5 è compresa tra 10 e 20 $\mu\text{g/kg}$, solo in 2 è superiore a 20 $\mu\text{g/kg}$. La concentrazione di Aflatossina B₁ nel campione globale, calcolata come media dei tre campioni di laboratorio, risulta inferiore a 5 $\mu\text{g/kg}$ in 10 casi, compresa tra 5 e 10 $\mu\text{g/kg}$ in 3 e superiore a 10 $\mu\text{g/kg}$ in uno solo. Per 7 campioni globali (2 di fichi, 2 di pistacchi e 3 di arachidi) è stata trovata una concentrazione di Aflatossina B₁ superiore a 2 $\mu\text{g/kg}$ in 2 campioni di laboratorio (si ricorda che nel caso dei fichi il campione globale è costituito da 2 soli campioni di laboratorio). Infine in 6 casi (4 di arachidi e 2 di pistacchi) tutti e tre i campioni di laboratorio sono risultati contaminati a concentrazioni superiori a 2 $\mu\text{g/kg}$.

Nei campioni che presentano 2 o 3 campioni di laboratorio contaminati, i livelli di concentrazione sono mediamente superiori rispetto a quelli con 1 solo campione contaminato;

tranne nel caso di un campione di fichi, è stato sempre trovato almeno un campione di laboratorio con valori di Aflatossina B₁ maggiori di 10 µg/kg, fino ad arrivare a contaminazioni molto elevate di 50-100 µg/kg. Di conseguenza anche i valori di contaminazione media del campione globale sono spesso superiori a 10 µg/kg.

Considerando in generale i livelli di contaminazione trovati, si osserva che solo in 16 dei 27 campioni con almeno 1 campione di laboratorio non conforme rispetto all'attuale limite di legge di 2 µg/kg sono state trovate concentrazioni superiori a 14,2 µg/kg. Questo valore, tenuto conto dell'incertezza di misura ($\pm 6,2$ µg/kg), risulterebbe compatibile con un limite di 8 µg/kg. Attualmente, un comitato scientifico incaricato dalla commissione europea sta valutando i rischi sulla salute umana potenzialmente legati ad un innalzamento a 8 µg/kg per l'Aflatossina B₁ e a 15 µg/kg per le Aflatossine totali dei livelli massimi consentiti in arachidi e pistacchi (10).

Dall'analisi di questi risultati emerge che nella maggior parte dei casi, i due/tre campioni di laboratorio, che formano il campione globale, sono caratterizzati da concentrazioni di Aflatossine molto diverse tra loro. Queste osservazioni sono in accordo con quanto riportato da Spanjer *et al.* (3). Pertanto, nonostante l'applicazione delle procedure di campionamento stabilite dalla normativa comunitaria contribuisca a ridurre la variabilità derivante dal tipo di contaminazione "a macchia di leopardo", tale criticità permane.

Conclusioni

Il controllo di prodotti all'importazione è strettamente legato ad aspetti economici. Nel corso degli anni è stato osservato un calo dei quantitativi di merci alimentari (soprattutto frutta secca e cereali) in ingresso dal porto di Ravenna e conseguentemente del numero di campioni analizzati. In particolare, la recente crisi mondiale ha avuto pesanti ripercussioni su queste attività.

In questo lavoro sono stati presi in esame i risultati ottenuti durante otto anni di attività di controllo delle micotossine in prodotti all'importazione. Sono stati analizzati 1758 campioni per la ricerca di Aflatossine (di cui 1016 arachidi, 141 pistacchi, 221 nocciole e 91 fichi secchi) e 252 per la ricerca di Ocratossina A. La contaminazione da Aflatossine si presenta con una maggiore incidenza (quasi il 10% di campioni non conformi) rispetto a quella da Ocratossina A (meno dell'1%). Tali percentuali sono decisamente superiori rispetto a quelle riscontrate per la ricerca di fitofarmaci in prodotti ortofrutticoli (max 2-3%) (11) ed evidenziano un elevato rischio per la salute umana legato alla contaminazione da Aflatossine in frutta a guscio e frutta secca. A partire dal 2003, con l'applicazione delle procedure di campionamento previste dalla normativa comunitaria, è stato riscontrato un aumento della percentuale di non conformità per Aflatossina B₁ e totali (10-20% negli ultimi cinque anni), le matrici più interessate sono: pistacchi, arachidi, nocciole e fichi secchi. Il 60% dei campioni non conformi presenta concentrazioni di Aflatossina B₁ > di 14 µg/kg in almeno 1 dei 3 campioni di laboratorio. Nonostante l'attuazione delle nuove procedure di campionamento, le criticità legate alla contaminazione eterogenea da micotossine permangono, come indicato dalle diverse concentrazioni di Aflatossina B₁ trovate nei 3 campioni di laboratorio appartenenti allo stesso campione globale.

Bibliografia

1. Unione Europea. Decisione della Commissione n. 2006/504/CE del 12 luglio 2006 che stabilisce condizioni particolari per l'importazione di determinati prodotti alimentari da alcuni paesi terzi a causa del rischio di contaminazione da Aflatossine di tali prodotti. GUCE L 199/21, 21 luglio 2006.

2. Unione Europea. Regolamento (CE) n. 401/2006 della Commissione del 23 febbraio 2006 relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari. *GUCE* L70/12, 9 marzo 2006.
3. Spanjer MC, Scholten JM, Kastrup S, Jorissen U, Schatzki TF, Toyofuku N. Sample comminution for mycotoxin analysis: dry milling or slurry mixing? *Food Additives and Contaminants* 2006;23(1):73-83.
4. Schatzi TF, Toyofuku N. Sample preparation and presampling of pistachios, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003;51:6068-72
5. Ozay G, Seyhan F, Yilmaz A, Whitaker TB, Slate AB, Giesbrecht F. Sampling hazelnuts for aflatoxin: uncertainty associated with sampling preparation and analysis, *Journal of AOAC International* 2006;89(4):1004-11.
6. SANCO/1208. Guidance document for competent authorities for the control of compliance with EU legislation on aflatoxin; 2009.
7. Unione Europea. Regolamento (CE) n. 882/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004, relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali. *GUCE* L 165/1, 30 aprile 2004.
8. AOAC Official method 999.07. *Aflatoxin B1 and total Aflatoxins in peanuts butter, pistacchio paste, fig paste, and paprika powder*. AOAC International; 2000.
9. Unione Europea. Regolamento (CE) n. 1881/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. *GUCE* L364/5, 20 dicembre 2006, aggiornato il 23.07.2008.
10. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products. Question N° EFSA-Q-2006-174. *The EFSA Journal* 2007;446:1-127.
11. ARPA Emilia Romagna. *Residui di prodotti fitosanitari su ortofrutticoli freschi ed in altre matrici alimentari, campionati in Emilia Romagna nell'anno 2008*. Ferrara: ARPA Emilia Romagna; 2009. Disponibile all'indirizzo: http://www.arpa.emr.it/cms3/documenti/ferrara/dt/ef/relazione_alimenti_2008.pdf; ultima consultazione settembre 2009