

# CONTAMINAZIONE INDIRECTA E DIRETTA DA OCRATOSSINA A DI CARNI E SALUMI TIPICI

Amedeo Pietri, Terenzio Bertuzzi, Alessia Gualla, Mauro Morlacchini, Gianfranco Piva  
*Istituto di Scienze degli Alimenti e della Nutrizione, Facoltà di Agraria, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza*

## Introduzione

L'Ocratossina A (OTA) è una micotossina prodotta principalmente da *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium verrucosum* e *P. nordicum*; è cancerogena, teratogena e immunodepressiva, può provocare nefriti ed epatiti, ed è classificata dallo IARC (*International Agency for Research on Cancer*) nel gruppo 2B (possibile sostanza ad azione cancerogena nei confronti dell'uomo). Possono essere contaminati sia alimenti di origine vegetale, specialmente cereali, vino e spezie, sia di origine animale, in particolare carni suine e salumi. La presenza di OTA nei prodotti carnei può essere conseguenza o di una contaminazione indiretta, dovuta ad una dieta contaminata somministrata agli animali, o, nel caso di prodotti stagionati, di una contaminazione diretta, causata principalmente da alcuni ceppi di *Aspergilli* e *Penicillia*, presenti negli impianti di stagionatura (1,2). In Italia, è in vigore un limite massimo di contaminazione da OTA nei prodotti carnei pari a 1 µg/kg (Circolare del Ministero della Sanità n. 10 del 09/06/1999); la necessità di fissare un limite è stata espressa anche dalla Comunità Europea, che ha incluso questi prodotti tra quelli da regolamentare (Reg. UE 1881/2006). Alcune indagini, effettuate su prodotti a base di carne suina acquistati al dettaglio, hanno mostrato un'incidenza di OTA non trascurabile (3,4).

Scopo di questo lavoro è stato quello di valutare l'entità delle due differenti modalità di contaminazione. Inizialmente è stata determinata, dopo la macellazione, la concentrazione di OTA nel tessuto muscolare e adiposo di suini pesanti alimentati con mangimi naturalmente contaminati a diversi livelli; successivamente, l'OTA è stata ricercata in alcuni prodotti, preparati dai medesimi tessuti, stagionati in impianti industriali (salame, pancetta, coppa e prosciutto crudo).

## Materiali e metodi

### Prova su animali, carni fresche e stagionate

La prova è stata condotta utilizzando 24 suini adulti *Large White*, suddivisi in 4 gruppi di 6 soggetti ciascuno (3 femmine e 3 castrati). All'inizio della prova l'età era di circa 200 giorni e il peso vivo di circa 140-150 kg. Dopo un periodo di adattamento, è seguito un periodo sperimentale della durata di 14 giorni, durante il quale ogni gruppo è stato alimentato in modo differente. Al gruppo T0 è stato somministrato un mangime non contaminato da OTA, agli altri gruppi uno naturalmente contaminato a diversi livelli: 42 mg/kg per il gruppo T1, 83 mg/kg per il T2 e 171 mg/kg per il T3. La quantità di mangime somministrato (circa 3,6 kg al giorno) è stata calcolata in base al peso corporeo di ogni animale. Al termine del periodo sperimentale, gli animali sono stati macellati e di ciascuno le porzioni muscolari e adipose sono state lavorate per

la preparazione di alcuni prodotti tipici, quali salame, pancetta, coppa e prosciutto crudo. Le spezie usate per la preparazione dei prodotti stagionati sono risultate non contaminate da OTA. I prodotti sono stati successivamente stagionati in tre impianti industriali per tempi diversi: 50 giorni per i salami, 4, 6 e 14 mesi rispettivamente per le pancette, le coppe e i prosciutti. Dai tessuti muscolari, adiposi e dai prodotti stagionati sono stati prelevati campioni di 200 g per la determinazione dell'OTA; per i prosciutti l'analisi è stata condotta sia su un campione relativo alla parte interna, sia su uno prelevato in vari punti 1 cm sotto la superficie. I campioni sono stati conservati a -20°C fino al momento dell'analisi.

## Analisi dell'OTA

L'estrazione di OTA nei campioni è stata effettuata mediante digestione enzimatica del campione con pancreatina (5). Per avere un campione il più possibile omogeneo, ai campioni esterni di prosciutto crudo, prima dell'estrazione, è stato aggiunto lentamente un volume noto di H<sub>2</sub>O distillata sotto continua agitazione, fino ad ottenere una pasta omogenea (*slurry*). Ad un'aliquota di 5 g di campione (o di una quantità di *slurry* equivalente a 5 g di campione iniziale), pesati in un provettone da centrifuga da 250 mL, sono stati aggiunti 100 mL di soluzione di pancreatina all'1% in tampone fosfato 0,2 M a pH 7,5 (160 mL di NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O 0,2 M + 840 mL di Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 M); il campione è stato quindi posto in stufa termostata a 37°C per 3 ore sotto continua agitazione. Al termine della digestione, dopo centrifugazione a 8000 g a 4°C per 15 minuti, un'aliquota di 5 mL di surnatante, diluita con 5 mL di PBS (*Phosphate Buffered Saline*), è stata purificata mediante colonna ad immunoaffinità (Ochratest, Vicam). Dopo lavaggio della colonna con 2,5 mL di PBS, l'OTA è stata eluita in provetta graduata con 3 mL di CH<sub>3</sub>CN. L'estratto è stato concentrato sotto flusso di N<sub>2</sub>, quindi riportato ad 1 mL con la miscela CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (35+65 v/v), agitando in bagno ad ultrasuoni e su vortex; infine, il campione è stato filtrato (0,45 µm). L'OTA è stata quindi determinata mediante analisi HPLC; la separazione è stata effettuata con colonna Luna Phenyl-Hexyl (Phenomenex) e, come fase mobile, con un gradiente CH<sub>3</sub>CN:soluzione acquosa al 2% di CH<sub>3</sub>COOH a flusso di 1,0 mL/min (da 35 a 67% di CH<sub>3</sub>CN in 9 minuti). La rivelazione è stata effettuata mediante fluorimetro impostato a  $\lambda_{eccitazione}=333$  nm e  $\lambda_{emissione}=470$  nm.

## Risultati e discussione

### Percentuali di recupero, limiti di rivelazione e quantificazione dell'OTA

Le percentuali di recupero sono state calcolate aggiungendo a campioni non contaminati di tessuto muscolare, adiposo e di prosciutto crudo, volumi noti di una soluzione standard di OTA in modo da avere un livello di contaminazione pari a 1,0 e 2,0 mg/kg. I valori ottenuti sono risultati compresi tra 83,2 e 92,0%. I limiti di rivelazione (*Limit of Detection*, LOD) e di quantificazione (*Limit of Quantification*, LOQ) sono stati rispettivamente di 0,03 e 0,08 mg/kg.

### OTA in tessuto muscolare e adiposo

Dai valori di OTA relativi al tessuto muscolare e adiposo (Tabella 1), si può osservare per i gruppi T2 e T3 una contaminazione media di poco superiore a 1,00 µg/kg (limite massimo per le carni fissato dalla legislazione italiana). Come riportato in precedenti lavori, il tessuto muscolare è risultato più contaminato di quello adiposo. Il rapporto percentuale tra la

concentrazione nel tessuto e quella nel mangime diminuisce dal gruppo T1 al T3: da 1,76 a 1,30 per il tessuto muscolare, da 1,62 a 1,00 per quello adiposo. Questi risultati indicano che, nel caso di una somministrazione non molto prolungata nel tempo, il passaggio di OTA dalla dieta ai tessuti è basso e diventa non trascurabile solo ad alte concentrazioni nel mangime. Con una contaminazione di 50 µg/kg, valore di riferimento per i mangimi per suini proposto dalla Commissione Europea nella Raccomandazione 2006/576, si possono avere concentrazioni di OTA nelle carni ad un livello vicino ad 1 µg/kg.

**Tabella1. Media dei livelli di OTA nei campioni di tessuto muscolare e adiposo**

Gruppo	Tessuto muscolare (µg/kg)		Tessuto adiposo (µg/kg)	
	media	min-max	media	min-max
T0	< LOD	/	< LOD	/
T1	0,74	0,60-0,89	0,68	0,57-0,79
T2	1,27	1,08-1,45	1,04	0,86-1,26
T3	2,23	1,67-3,40	1,71	1,33-2,58

### OTA in pancetta, salame, coppa e prosciutto crudo

I risultati (Tabelle 2 e 3) relativi ai diversi prodotti stagionati permettono diverse considerazioni. Per i gruppi T1, T2 e T3, i campioni di salame, di coppa e di pancetta, mostrano un aumento di concentrazione di OTA rispetto ai valori del tessuto muscolare e del tessuto adiposo con i quali sono stati preparati, mentre per i campioni interni di prosciutto i valori sono rimasti simili.

**Tabella 2. Valori medi di OTA (µg/kg) nei campioni di pancetta, salame e coppa.**

Gruppo	Pancetta		Salame		Coppa	
	media	min-max	media	min-max	media	min-max
T0	< LOD	-	0,54	0,41-0,76	0,18	<0,03-0,72
T1	0,65	0,56-0,85	1,62	0,87-2,88	1,53	0,66-3,20
T2	1,33	0,99-1,69	2,41	1,65-3,67	2,93	2,38-4,48
T3	2,30	1,95-2,59	3,60	2,76-5,62	3,72	2,74-5,38

**Tabella 3. Valori medi di OTA (µg/kg) nei campioni di prosciutto crudo.**

Gruppo	Prosciutto interno		Prosciutto esterno	
	media	min-max	media	min-max
T0	<0,03	/	21,44	<0,03-104,68
T1	1,04	0,58-1,59	69,39	1,25-314,09
T2	1,21	1,10-1,35	1,85	1,22-2,36
T3	2,46	2,13-2,91	73,12	3,27-258,77

L'aumento di concentrazione rivelato nei campioni di coppa, salame e pancetta è in parte dovuto alla perdita di acqua dei prodotti stagionati con conseguente concentrazione dell'OTA, ma anche ad una possibile contaminazione diretta, dovuta alla presenza di muffe ocratossigene negli stabilimenti di stagionatura. Invece, il non riscontrato aumento per i campioni interni di prosciutto potrebbe essere dovuto ad una possibile idrolisi del legame peptidico dell'OTA ad

opera di enzimi proteolitici, avvenuta durante il lungo tempo di stagionatura (14 mesi). Come conseguenza di questi fattori, si può osservare che all'interno di ogni gruppo, i prodotti contenenti concentrazioni più elevate di OTA sono la coppa e il salame. La distribuzione della tossina nei diversi prodotti non è quindi in accordo con il fatto che l'OTA, molecola abbastanza polare, si accumula maggiormente nel tessuto muscolare rispetto a quello adiposo, poiché il prosciutto crudo, che ha un tenore lipidico normalmente inferiore al salame e alla coppa, mostra livelli di contaminazione inferiori. Oltre all'attesa contaminazione indiretta, si può osservare, dalla presenza di OTA in alcuni prodotti del gruppo T0 (tutti i campioni di salame, due di coppa e 5 esterni di prosciutto crudo) e soprattutto dai valori molto alti riscontrati nei campioni esterni di prosciutto (10 campioni con una contaminazione superiore a 10 µg/kg, massimo 314,1 µg/kg), che si è verificata una elevata contaminazione diretta in due dei tre impianti di stagionatura, confermando i risultati di alcuni precedenti lavori (1, 5).

## Conclusioni

Da questo studio si può osservare come la somministrazione ai suini di una dieta contaminata da OTA, determina preoccupanti concentrazioni della tossina nei tessuti e nei prodotti carnei stagionati solo a concentrazioni nei mangimi molto elevate, superiori a 50 µg/kg, limite massimo proposto dalla CE. Una presenza di muffe ocratossigene negli impianti di stagionatura può invece aumentare sensibilmente la concentrazione di OTA nei prodotti stagionati, in modo molto più rilevante rispetto alla contaminazione indiretta. Particolarmente a rischio possono essere i prosciutti crudi, che subiscono una stagionatura molto lunga. Oltre ad effettuare un costante monitoraggio della contaminazione da OTA nei mangimi per suini, è quindi importante prevenire la proliferazione di muffe ocratossigene negli impianti di stagionatura.

## Bibliografia

1. Battilani P, Pietri A, Giorni P, Formenti S, Bertuzzi T, Toscani T, Virgili R, Kozakiewicz Z. Penicillium populations in dry-cured ham manufacturing plants. *Journal of Food Protection* 2007;70, 4, 975-80.
2. Spotti E, Chiavaro E, Lepiani A, Colla F. Mould and ochratoxin A contamination of pre-ripened and fully ripened hams. *Industria Conserve* 2001;76:341.
3. Pietri A, Bertuzzi T, Gualla A, Piva G. Occurrence of ochratoxin A in raw ham muscle and pork products from Northern Italy. *Italian Journal of Food Science*, 2006;1(18):1-8.
4. Zannotti M, Malagutti L, Sciaraffa F, Corti M. Indagine preliminare sul contenuto di Ocratossina in salumi provenienti dalla grande distribuzione. In: Greppi GF, Enne G (Ed.). *Atti 36° Simposio Internazionale di Zootecnia*, Ancona, 27 aprile 2001. p. 78-84.
5. Pietri A, Bertuzzi T, Gualla A, Piva G. Determinazione dell'Ocratossina in prodotti carnei: nuovo metodo enzimatico di estrazione. In: Miraglia M, Brera C (Ed.). *1° Congresso nazionale. Le micotossine nella filiera agro-alimentare. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 29-30 novembre 2004. Atti*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2005. (Rapporti ISTISAN 05/42). p. 322-5.