

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

1° Congresso nazionale

**Le micotossine
nella filiera agro-alimentare**

Istituto Superiore di Sanità
Roma, 29-30 novembre 2004

RIASSUNTI

A cura di
Marina Miraglia e Carlo Brera

Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e i Rischi Alimentari

ISSN 0393-5620
ISTISAN Congressi
04/C5

Istituto Superiore di Sanità

1° Congresso nazionale. Le micotossine nella filiera agro-alimentare. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 29-30 novembre 2004. Riassunti.

A cura di Marina Miraglia e Carlo Brera
2004, vii, 103 p. ISTISAN Congressi 04/C5

Il Congresso si propone di focalizzare i principali aspetti dell'analisi del rischio in Italia relativamente alla contaminazione da micotossine in Italia, sulla base di un principio di osmosi fra la valutazione e la gestione del rischio lungo tutta la filiera alimentare. L'iniziativa si rivolge pertanto a tutti gli operatori del sistema alimentare e mangimistico, invitandoli a portare il loro contributo di esperienze tecnico scientifiche, operative e gestionali al fine di creare un quadro quanto più completo del problema delle micotossine nel nostro Paese. Ciò al fine di minimizzare l'impatto sanitario di questi contaminanti e le eventuali ricadute negative sul "sistema" alimenti e mangimi. Infine, gli argomenti trattati in questo Congresso saranno orientati sia alla diffusione di informazioni scientifiche in grado di tutelare il consumatore italiano, sia all'acquisizione degli strumenti operativi in grado di garantire una maggiore competitività sul mercato europeo ed internazionale.

Parole chiave: Micotossine, Analisi del rischio, Alimenti

Istituto Superiore di Sanità

1st National conference. Mycotoxins in agri-food chain. Istituto Superiore di Sanità. Rome, 29-30 November 2004. Abstract book.

Edited by Marina Miraglia and Carlo Brera (in Italian)
2004, vii, 103 p. ISTISAN Congressi 04/C5

The Conference is aimed at focusing on the main aspects of risk analysis in Italy relating to mycotoxin contamination, on the basis of the osmosis between the risk assessment and management throughout the food chain. Therefore, this initiative is addressed to all the stakeholders of the food and feed chain, and their contributions in the scientific, operating and managerial experiences that will create a scenario that is a complete representation of the mycotoxins problems in our country. This approach would contribute to decrease the sanitary impact of these xenobiotics on human and animal health and the negative consequences for the food and feed system. Finally, the topics addressed at this Conference can help the dissemination of scientific information related to safeguarding the Italian consumer to the exposure of such toxic substances and to achieve better competitiveness in the European and international markets.

Key words: Mycotoxins, Risk analysis, Foodstuffs

Comitato scientifico: Marina Miraglia e Carlo Brera

Si ringrazia Valentina Minardi per il lavoro svolto nell'organizzazione del Congresso.

Per informazioni su questo documento scrivere a: carlo.brera@iss.it.

Il rapporto è disponibile online sul sito di questo Istituto: www.iss.it.

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro, Sara Modigliani e Sandra Salinetti*
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© 2004 Istituto Superiore di Sanità (Viale Regina Elena, 299 - 00161 Roma)

INDICE

Programma	iii
Premessa	vii
Relazioni di apertura	1
Prima sessione	
Valutazione del rischio	5
Seconda sessione	
Gestione del rischio	11
Terza sessione	
Tecnologie alimentari	23
Quarta sessione	
Metodi di analisi e campionamento	35
Sessione poster	
Gestione del rischio	45
Tecnologie alimentari	71
Metodi di analisi e campionamento	83
Indice degli autori	101

PROGRAMMA

Lunedì 29 novembre 2004

8.00 Registrazione dei partecipanti

9.00 Indirizzi di benvenuto

Enrico Garaci

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità

Paolo Aureli

Direttore del Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti
e per i Rischi Alimentari

9.20 Relazioni di apertura

Micotossine, un tema globale

Gianfranco Piva

Approccio olistico nell'analisi del rischio da micotossine

Marina Miraglia

10.40 Intervallo

PRIMA SESSIONE – Valutazione del rischio

Moderatori: Romano Marabelli, Gianfranco Piva

11.00 Relazione plenaria

La valutazione tossicologica e la sicurezza degli alimenti

Giorgio Cantelli Forti

11.40 *Valutazione della esposizione della popolazione italiana alla Fumonisina B1:
uno studio di dieta totale*

Carlo Brera

12.00 *Micotossine nel latte materno: indagine epidemiologica*

Giovanna Turconi

12.20 *Valutazione della esposizione ad Ocratossina A in campioni di siero di donatori sani*

Francesca Debegnach

12.40 Discussione

13.00 Pranzo

SECONDA SESSIONE – Gestione del rischio

Moderatori: Carlo Brera, Aldo Laganà

- 14.00 Sessione poster
- 14.30 Relazione plenaria
Le micotossine: un problema per l'alimentazione dell'uomo e degli animali
Romano Marabelli
- 15.10 Relazione plenaria
Il ruolo della agricoltura per la sicurezza e la qualità degli alimenti
Augusto Bocchini
- 15.50 *Presenza di Tricoteceni e di Ocratossina A in alimenti per l'infanzia e in prodotti dietetici a base di crusca*
Amedeo Pietri
- 16.10 *Aflatossine in spezie, erbe aromatiche, infusionali e officinali*
Cecilia Bergamini
- 16.30 Intervallo
- 16.50 *Controllo e prevenzione della produzione di Ocratossina A nei cereali: risultati del progetto CEE QLK1-CT-1999-00433 (1999-2004)*
Corrado Fanelli
- 17.10 *Prevenzione dell'Ocratossina nell'uva e nel vino*
Paola Battilani
- 17.30 *Fusariosi della spiga di grano: 4 anni di indagini in Italia nell'ambito del progetto europeo RAMFIC del V programma quadro*
Antonio Logrieco
- 17.50 *Indagine pluriennale sulle caratteristiche qualitative e igienico-sanitarie delle granelle commerciali di mais*
Carla Corticelli, Alberto Verderio
- 18.10 *Approccio epidemiologico allo studio delle contaminazioni da Aflatossine B1 e M1 nel sistema di allevamento del bovino da latte*
Pier Paolo Danieli

Martedì 30 novembre 2004

TERZA SESSIONE – Tecnologie alimentari

Moderatori: Corrado Fanelli, Marina Miraglia

- 9.00 Relazione plenaria
Sicurezza nell'industria alimentare ed esigenze del consumatore
Daniele Rossi
- 9.40 *Dal campo alla tavola: gestione della filiera, tracciabilità e sicurezza. Indagini per la valutazione della presenza di Aflatossina M1 nel latte*
Costante Pinelli, Ivana Gandolfi
- 10.00 *Controllo della contaminazione da micotossine nella filiera del mais*
Amedeo Reyneri
- 10.20 *Coefficiente di trasferimento dell'Aflatossina M1 nel formaggio grana*
Roberto Piro
- 10.40 *Approccio integrato nella filiera agro-alimentare per la prevenzione del rischio micotossine*
Maurizio Zucchi
- 11.00 Intervallo
- 11.20 *Diminuzione della contaminazione da patulina mediante un agente di lotta biologica*
Raffaello Castoria
- 11.40 *La proteina b32 di mais: ruolo nella protezione contro patogeni fungini*
Mario Motto
- 12.00 *Presenza di Zearalenone e caratterizzazione di ceppi di Fusarium in mangimi per suini*
Maria Cesarina Abete
- 12.20 *Contaminanti micotici su uve e presenza di Ocratossina A su mosti e su vino in Italia*
Michele Borgo
- 12.40 Discussione
- 13.00 Pranzo
- 14.00 Sessione poster

QUARTA SESSIONE – Metodi di analisi e campionamento

Moderatori: Amedeo Pietri, Giuseppina Avantaggiato

- 14.00 Sessione poster
- 14.30 Relazione plenaria
Le problematiche legate alla fase analitica nella determinazione delle micotossine nei prodotti alimentari
Carlo Brera
- 14.50 *Spettrometria di massa tandem nella determinazione simultanea di Tricoteceni A e B, fumonisine e zeranoli nel mais*
Elisabetta Pastorini
- 15.10 *Determinazione della Tossina T-2 in cereali mediante HPLC con rivelatore a fluorescenza e derivatizzazione pre-colonna con 1-antrilnitrile*
Michelangelo Pascale
- 15.30 *Saggi immunoenzimatici: quale ruolo nel controllo delle micotossine?*
Maurizio Paleologo
- 15.50 *Olio extravergine di oliva: una matrice a rischio*
Alberto Ritieni
- 16.10 *Confronto di metodologie analitiche utilizzate nel dosaggio dell'Aflatossina M1 nel latte*
Carlo Nachtmann
- 16.30 *Sviluppo di nuovi approcci per la determinazione di micotossine*
Cinzia Tozzi
- 16.50 Discussione
- 17.30 Chiusura del Congresso

PREMESSA

Il primo Congresso sulle micotossine comprende quattro sessioni orali e tre sessioni poster distribuite su due giornate. Le presentazioni e i contributi dei poster focalizzano i principali aspetti che caratterizzano la problematica delle micotossine riguardando la valutazione e la gestione del rischio, i metodi di analisi e di campionamento.

Complessivamente, il programma presenta il contributo di 31 comunicazioni orali e 45 poster.

Le aree tematiche prese in considerazione sono:

- aspetti tossicologici;
- valutazione del rischio;
- gestione del rischio;
- tecnologie alimentari;
- metodi di analisi e di campionamento;
- monitoraggio di alimenti e mangimi;
- procedure di prevenzione e di decontaminazione.

**Relazioni
di apertura**

MICOTOSSINE, UN TEMA GLOBALE

Gianfranco Piva (a), Paola Battilani (b), Amedeo Pietri (a)

(a) *Istituto di Scienze degli Alimenti e della Nutrizione, Facoltà di Agraria, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza*

(b) *Istituto di Entomologia e Patologia vegetale, Facoltà di Agraria, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza*

Le micotossine rappresentano un problema le cui dimensioni cominciano solo ora ad essere intraviste. Coinvolgono tematiche che, da qualsiasi punto siano affrontate, presentano una dimensione globale in termini spaziali, temporali, conoscitivi, etici ed economici.

Le micotossine, anche se identificate e studiate di recente, certamente hanno causato problemi all'uomo e agli animali da sempre. La vita animale, nella forma che oggi si conosce, ha dovuto raggiungere un equilibrio dinamico con queste molecole.

Tutti i continenti sono interessati dai problemi connessi alla contaminazione da micotossine. Vi sono indubbiamente differenze di importanza, ma aflatoossine, fumonisine, ocratossine, Tricoteceni, zearalenoni, ecc., preoccupano tutti i Paesi, in particolare quelli caratterizzati da sistemi agricoli scarsamente sviluppati. I problemi non mancano, anche se a livello più episodico e, almeno parzialmente controllabile, anche nei Paesi con sistemi agricoli avanzati.

La presenza di micotossine negli alimenti coinvolge tutta la filiera produttiva, a partire dal campo, dove le caratteristiche degli areali climatici, quelle biologiche della coltura, le tecniche agronomiche e l'andamento meteorologico possono condizionare la contaminazione alla raccolta. Da qui le operazioni di essiccamento, movimentazione, stoccaggio o trasformazione, possono contribuire ad aumentare il rischio della contaminazione degli alimenti per gli animali e per l'uomo. Non sono esenti da questi rischi le fasi domestiche di conservazione o manipolazione degli alimenti.

Le colture a rischio sono diverse. In tutti i Paesi sono coinvolti prodotti base dell'alimentazione, quali i cereali, specie frumento, mais, segale, orzo. Anche altri prodotti vegetali, come certe oleaginose, e complementari, quali vino, caffè, cacao e spezie, non sono esenti dal problema.

Solo una visione globale della filiera, che coinvolga competenze di tipo agronomico, climatologico, fitopatologico, entomologico, chimico, molecolare, zootecnico, nutrizionale a livello animale e dell'uomo, medico e ingegneristico, può consentire un approccio gestionale sistemico. In questo modo si può mirare ad una corretta valutazione e gestione del rischio micotossine. In particolare, si possono avere elementi per la definizione degli aspetti normativi, a tutela del consumatore e del benessere animale, secondo un approccio etico che tenga presente la sostenibilità economica delle decisioni, alla luce del livello evolutivo dei sistemi produttivi dei differenti Paesi.

Le micotossine sono quindi una sfida. Una visione pessimistica ci farebbe dire che sono un problema, talvolta all'apparenza irrisolvibile, per tutti i Paesi, più grave per alcuni. Ma una visione ottimistica potrebbe invece individuarle come elemento base per costruire collaborazioni tra ricercatori di varie discipline, operatori della filiera produttiva e Paesi diversi.

APPROCCIO OLISTICO NELL'ANALISI DEL RISCHIO DA MICOTOSSINE

Marina Miraglia

Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Nel corso dei secoli il problema della contaminazione da micotossine ha progressivamente mutato il suo profilo: infatti, mentre nei tempi più antichi questo tipo di contaminazione aveva ripercussioni pressoché limitate alle aree di produzione dei raccolti, con il progressivo incremento della globalizzazione, la presenza di queste sostanze tossiche in una vastissima gamma di derrate alimentari, ha causato ripercussioni in svariati segmenti del mercato internazionale e su un'ampia varietà di operatori del settore alimentare. È per questo motivo che l'analisi del rischio per le micotossine comporta problematiche più complesse e sfaccettate rispetto ad altre tipologie di contaminanti. In particolare per quanto riguarda la valutazione del rischio, numerose sono le incertezze derivanti sia dalla molteplicità delle micotossine, sia dalla diversa suscettibilità dei vari segmenti di popolazione, sia dalla difficoltà di trasposizione delle valutazioni tossicologiche dagli animali all'uomo. Altre componenti che rendono multidisciplinari la valutazione del rischio delle micotossine, sono la variabilità geografica, stagionale e ambientale di questo tipo di contaminazione.

Ancora più complessa e articolata risulta la gestione del rischio per questa classe di xenobiotici: la prevenzione nell'ambito del settore primario s'interfaccia con le caratteristiche colturali, culturali, politiche ed economiche delle zone di coltivazione, mentre per il settore secondario si deve instaurare una relazione con la sensibilità della classe politica e del consumatore; peraltro tutta la filiera ha spesso la difficoltà oggettiva di confrontarsi con i limiti massimi stabiliti per questi contaminanti. Per quanto riguarda quest'ultimo aspetto della gestione del rischio, la forte differenziazione riscontrata nei limiti massimi stabiliti nei diversi Paesi fa emergere altrettanto forti conflitti economici e commerciali; inoltre limiti molto restrittivi in alcuni Paesi importatori risultano in una rilevante penalizzazione dei Paesi in via di sviluppo costretti spesso ad esportare materie prime di alta qualità compromettendo la qualità del prodotto commercializzato all'interno del Paese stesso. La comunicazione del rischio da micotossine presenta infine caratteristiche completamente diverse da quella relativa ad altre categorie di contaminanti: il consumatore non è, infatti, generalmente consapevole del problema. Va rilevato tuttavia che nonostante questa mancanza di consapevolezza, negli ultimi decenni il problema è stato preso in seria considerazione sia dalla programmazione delle ricerche sia dalla comunità scientifica, e anche le attività di gestione del rischio hanno registrato un notevole impegno.

Nell'ambito di questo approccio olistico dell'analisi del rischio da micotossine merita particolare attenzione la possibilità di intervenire preventivamente tramite la considerazione di tutte quelle variabili che intervengono nell'insorgenza del problema stesso, quali particolari eventi atmosferici nei Paesi di produzione, squilibri commerciali derivanti da eventi di varia natura e cambiamenti nella tecnologia alimentare.

Prima sessione
Valutazione del rischio

Moderatori
R. Marabelli, G. Piva

LA VALUTAZIONE TOSSICOLOGICA E LA SICUREZZA DEGLI ALIMENTI

Giorgio Cantelli Forti

Dipartimento di Farmacologia, Università degli Studi di Bologna, Bologna

Una adeguata valutazione dei potenziali effetti avversi associati all'alimentazione porta necessariamente ad una corretta definizione di sicurezza e di rischio tossicologico.

La sicurezza (*safety*) viene definita come la certezza pratica che l'uso di una sostanza in specifiche condizioni e modalità d'impiego non provochi un danno. La valutazione del rischio è la caratterizzazione scientifica e sistematica degli effetti avversi sulla salute che derivano dall'esposizione dell'uomo ad agenti o a situazioni dannose. La terminologia inglese più propriamente utilizza anche il termine pericolo (*hazard*), volendo distinguere e precisare la possibilità che un danno derivi da una sostanza in condizioni specifiche. Il rischio tossicologico è il prodotto di un azzardo (evento pericoloso) per la probabilità che si verifichi. La probabilità è funzione dell'esposizione (fonte e via di esposizione) e della suscettibilità individuale (differenze nel metabolismo, nella risposta immunitaria, nell'assetto ormonale) Una situazione di rischio derivante dall'uso di una sostanza e dalla sua esposizione comporta quindi l'interazione con un sistema biologico con induzione di danno dal quale scaturiscono dei conseguenti effetti. Per l'identificazione e la quantificazione dell'azzardo derivante da sostanze potenzialmente tossiche vengono impiegati metodi sperimentali a diversi livelli di informazione, che tutti insieme concorrono ad una corretta valutazione complessiva del rischio: 1) relazione tra struttura chimica e l'attività biologica, 2) analisi *in vitro* e di breve durata; 3) studi nel modello animale; 4) studi epidemiologici. La valutazione del rischio deve essere quindi orientata alla identificazione del pericolo, alla sua quantificazione (dose-risposta), alla valutazione dell'esposizione e della suscettibilità individuale, alla caratterizzazione del rischio, all'analisi costi-benefici e infine a decisioni operative. Per quanto concerne i limiti di sicurezza, i risultati ottenuti dalla sperimentazione della tossicità di una sostanza servono per elaborare "dosi soglia" al fine di rimanere entro al margine di sicurezza all'atto di emanare norme d'uso nell'utilizzo delle sostanze e nei controlli successivi.

Una fase fondamentale della ricerca tossicologica riguarda la gestione del rischio che si riferisce all'insieme dei procedimenti scelti dalle agenzie per gestire il pericolo identificato nel corso del processo di valutazione del rischio. Gli esperti prendono in considerazione l'evidenza scientifica e le valutazioni del rischio dal punto di vista legislativo, economico, sociale e politico nel corso del processo di valutazione delle regole alternative e nella scelta delle opzioni. La comunicazione del rischio è la fase finale del trasferimento dell'informazione della valutazione del rischio ai responsabili pubblici (Enti sanitari, Politici, Magistratura) e alla popolazione in generale. Questo aspetto è di cruciale importanza perché soltanto la corretta informazione e l'eventuale allarme sono in grado di evitare gli "allarmismi alimentari" che spesso possono diffondere nell'opinione pubblica creando delle mode alimentari dannose ovvero delle speculazioni dilaganti.

VALUTAZIONE DELLA ESPOSIZIONE DELLA POPOLAZIONE ITALIANA ALLA FUMONISINA B1: UNO STUDIO DI DIETA TOTALE

Carlo Brera, Silvana Grossi, Simona Angelini, Barbara De Santis, Francesca Debegnach e Marina Miraglia
Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari, Istituto Superiore di Sanità, Roma

L'analisi del rischio si compone essenzialmente di tre elementi: valutazione di rischio, comunicazione di rischio e gestione del rischio. In generale, la valutazione del rischio può essere sviluppata con l'identificazione e la valutazione dei pericoli e della quantificazione della valutazione di esposizione. L'esposizione attraverso la dieta rappresenta la fonte più rilevante con cui una sostanza chimica o agenti microbiologici possono venir assunti, con fattori di rischio dipendenti dal livello della sostanza tossica nell'alimento e dalla quantità di alimento consumato. Questo studio ha preso in considerazione la valutazione della esposizione da Fumonisina B1 attraverso lo sviluppo di un approccio basato sulla dieta totale, metodologia largamente considerata dall'Organizzazione Mondiale della Sanità come uno degli approcci più attendibili per i fini preposti. Questa metodologia è stata sviluppata prendendo in considerazione le differenti abitudini dietetiche presenti in differenti regioni geografiche dell'Italia e per differenti gruppi di popolazione. Gli obiettivi specifici di questo studio sono stati i seguenti:

- confrontare il livello di esposizione della popolazione italiana come calcolato dallo studio rispetto ai dati tossicologici disponibili per la fumonisina (PTWI, TDI);
- individuare i principali alimenti in grado di costituire una fonte di esposizione e di potenziale rischio per i gruppi di popolazione presi in esame;
- individuare le zone geografiche più suscettibili del rischio tossicologico relativo alla contaminazione da Fumonisina B1.

MICOTOSSINE NEL LATTE MATERNO: INDAGINE EPIDEMIOLOGICA

Giovanna Turconi (a), Marianna Guarcello(a), Sergio Comizzoli(a), Laura Maccarini(a),
Gianfranco Piva (b), Amedeo Pietri (b), Carla Roggi (a)

(a) *Dipartimento di Scienze Sanitarie Applicate e Psicocomportamentali, Facoltà di
Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Pavia*

(b) *Istituto di Scienze degli Alimenti e della Nutrizione, Facoltà di Agraria, Università
Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza*

Il latte materno rappresenta l'alimento principe per l'alimentazione del bambino fino ai sei mesi di vita, in quanto è in grado non solo di fornire i nutrienti e l'energia necessari per una crescita ottimale, ma anche costituisce la scelta alimentare migliore in quanto numerosi sono i vantaggi nei confronti di ogni possibile sostituto. Tuttavia il rischio dei neonati di esposizione a contaminanti, quali le micotossine, attraverso l'allattamento materno resta un problema reale di cui è necessario tenere conto e che deve essere attentamente e continuamente monitorato.

È stata condotta un'indagine epidemiologica sul latte materno al fine di valutare il dato espositivo alle micotossine e il conseguente carico somatico della madre, nonché stimare il potenziale *intake* da parte del neonato e il conseguente livello di rischio per la sua salute.

All'indagine hanno partecipato 231 donne. La popolazione campionata è stata selezionata tra le puerpere che si trovavano nella terza/quarta giornata dopo il parto in sette strutture ospedaliere della Lombardia. La numerosità del campione è stata definita sulla base del numero di parti avvenuti in Lombardia nel 1999 e sul dato di prevalenza delle micotossine nel latte materno in Paesi europei ed extra-europei pari mediamente al 18%.

Ad ogni soggetto è stato somministrato un questionario appositamente predisposto nel quale, oltre ai dati anagrafici, venivano richieste informazioni sull'attività lavorativa, le abitudini alimentari e personali. Per ciascun soggetto è stato prelevato un campione di 20 mL di latte per il dosaggio delle micotossine mediante HPLC. Le elaborazioni statistiche di tipo descrittivo sono state effettuate con pacchetto statistico SPSS/PC + V 2.0.

Dei 231 campioni di latte analizzati, uno solo conteneva aflatossine (11,4 ng/L di Aflatossina B1 e 194,0 ng/L di Aflatossina M1), mentre 198 campioni (85,7%) mostravano positività per l'Ocratossina A. Nessuna correlazione significativa tra le concentrazioni di Ocratossina A nel latte e potenziali fattori di rischio è stata evidenziata né in relazione alla distribuzione territoriale, né alle caratteristiche anagrafiche e personali. Per quanto riguarda le abitudini alimentari sono emerse differenze statisticamente significative solo per il consumo di pane. Relativamente ai lattanti è emerso che in sesta giornata, con un consumo presumibile di 300 grammi di latte, un'alta percentuale di soggetti (71,0%) è da considerarsi a rischio in quanto esposta a valori di Ocratossina A superiori al limite proposto da Kuiper-Goodmann e Scott (0,2 ng/kg p.c). In conclusione, i risultati dello studio possono rappresentare un punto di partenza per indagini future e confermano la necessità di continuare l'attività di monitoraggio per fornire informazioni sul livello di esposizione della puerpera e del neonato, soprattutto in relazione all'individuazione del ruolo dei possibili fattori di rischio sulla qualità del latte materno.

VALUTAZIONE DELL'ESPOSIZIONE A OCRATOSSINA A IN CAMPIONI DI SIERO DI DONATORI SANI

Carlo Brera, Francesca Debegnach, Valentina Minardi, Barnaba Pazzaglini e Marina Miraglia

Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari, Istituto Superiore di Sanità, Roma

I dati d'incidenza di contaminazione da micotossine sulle derrate alimentari, disponibili in letteratura, non sempre sono dotati di una sufficiente attendibilità a causa delle numerose fonti di errore che possono intervenire nella valutazione del livello di contaminazione. Per ovviare al grado di incertezza legato all'informazione ottenuta sui prodotti alimentari, secondo un'ottica più recente e moderna adottata nella valutazione della esposizione da micotossine, sono stati affiancati ai monitoraggi eseguiti sulle derrate alimentari quelli relativi ai fluidi biologici.

Lo studio condotto ha investigato le correlazioni esistenti tra il livello di Ocratossina A rilevato nel siero e le abitudini alimentari dei donatori. Allo studio hanno partecipato 690 soggetti (donatori sani di sangue); ogni partecipante ha sottoscritto un consenso informato, nel quale era reso noto lo scopo del prelievo e il tipo di ricerca in atto. I campioni di siero sono stati raccolti presso i centri trasfusionali di Verona, Firenze, Benevento e Lecce in modo da ottenere una buona rappresentatività di tutto il territorio nazionale. Inoltre ogni partecipante ha compilato un questionario nel quale venivano richiesti i dati sensibili, ovvero peso, altezza età, etc. e dettagli sulle abitudini alimentari con particolare riguardo alle matrici suscettibili alla contaminazione da Ocratossina A quali ad esempio cereali (pane, pasta, dolci), vino, caffè, carne di maiale o frutta secca. I campioni di siero sono stati analizzati seguendo il metodo di Breitholtz al quale sono state apportate alcune modifiche.

Dall'analisi statistica dei risultati è emersa una decisa correlazione tra i livelli di Ocratossina A rilevati nel siero e l'area geografica di provenienza dei donatori. In particolare il Nord Italia ha presentato un valore medio di contaminazione maggiore rispetto a quello riscontrato nelle aree del Centro e del Sud del Paese. Altri aspetti quali ad esempio quelli legati ai dati sensibili non hanno invece indicato alcuna correlazione con i livelli di OTA nel siero. Inoltre dall'analisi dei dati è emerso che alcuni alimenti quali vino, pane, pasta, hanno dato correlazione positiva pur non consentendo di definire in maniera univoca un trend. Sui dati è stata inoltre effettuata l'analisi delle componenti principali (ACP) nella quale è stata valutata la presenza di OTA rilevata nel siero di sotto-gruppi caratterizzati da profili comuni (es. provenienza, abitudini alimentari, fumatori/non fumatori). Tale analisi statistica ha messo in relazione una maggiore contaminazione per un sotto-gruppo di donatori caratterizzato dal consumo, superiore alla media della popolazione in esame, di vino, pane e pasta; altra caratteristica comune ai soggetti del sotto-gruppo è la provenienza geografica, confermando ancora una volta una maggiore esposizione per la popolazione del Nord Italia.

Seconda sessione
Gestione del rischio

Moderatori
C. Brera, A. Laganà

LE MICOTOSSINE: UN PROBLEMA PER L'ALIMENTAZIONE DELL'UOMO E DEGLI ANIMALI

Romano Marabelli

Direzione Generale della Sanità Veterinaria e degli Alimenti, Ministero della Salute, Roma

Le micotossine sono sostanze tossiche prodotte dal metabolismo di funghi (o muffe) che si sviluppano in particolari condizioni su foraggi insilati, cereali e mangimi aziendali od industriali.

I principali gruppi di micotossine, ritenute dannose per il bestiame, sono prodotte da muffe del genere *Aspergillus* (Aflatossine, Ocratossine); *Fusarium* (Zearalenone, Fumonisina, DON, Tossina T-2); *Penicillium* (Ocratossine).

Le micotossine posseggono azione cancerogena, mutagena e teratogena sulla salute umana. Tra gli alimenti d'origine animale, e quindi d'interesse per l'alimentazione umana, il latte e i suoi derivati sono i prodotti più frequentemente contaminati dalla presenza di micotossine, a causa del trasferimento di questi metaboliti dai mangimi contaminati di cui si nutrono le bovine. I bovini sono in grado di operare una bioconversione ruminale delle micotossine in prodotti meno dannosi, tuttavia sono comunque suscettibili all'azione nociva di queste sostanze, cosa intuibile da alcuni sintomi di tipo generale o specifico:

- L'ingestione di sostanza secca può aumentare o diminuire in modo incoerente con la produzione della bovina; in genere se c'è calo d'assunzione si può pensare ad una presenza d'aflatossine, mentre aumenti d'ingestione stanno ad indicare presenza di DON o Zearalenone.
- Si verificano facilmente disordini digestivi, come diarrea (anche emorragica), mancanza d'appetito e rifiuto del cibo, stasi ruminale, chetosi, dislocazione dell'abomaso, anomale quantità di muco nelle feci.
- Un'alta incidenza d'aborti, riassorbimento embrionale, ridotto grado di fertilità e concepimento sono indice di presenza di micotossine, così come vulva e capezzoli ingrossati, prolapsi rettali o vaginali, ecc.
- Le forti lattifere sono particolarmente sensibili alla presenza di tossine, cosa evidenziata anche dall'immediato calo produttivo e dall'aspetto arruffato del pelame.

Nel novembre 2003 la Direzione Generale Sanità Veterinaria ha concordato con gli Enti preposti alla gestione del rischio per le micotossine, alcune modalità operative per una corretta applicazione dei controlli e monitoraggio a livello territoriale.

Analogamente a quanto previsto nel Piano nazionale Residui per l'anno 2003 con cui sono stati incrementati i controlli dell'Aflatossina B1 nei mangimi destinati alle bovine da latte, il Piano nazionale alimentazione animale ha previsto un incremento dei controlli nei mangimi per gli animali legato alla consistenza produttiva regionale per poter avere un quadro esaustivo sull'effettiva contaminazione da micotossine negli alimenti per animali.

Nel suddetto piano sono stati presi in considerazione oltre che le norme di riferimento, anche le modalità di campionamento (per le aflatossine prelievo di campioni ufficiali), le metodiche di analisi e i provvedimenti da adottare in caso di irregolarità dei campioni.

IL RUOLO DELLA AGRICOLTURA PER LA SICUREZZA E LA QUALITÀ DEGLI ALIMENTI

Augusto Bocchini
Presidenza, Confagricoltura, Roma

Abstract non pervenuto.

PRESENZA DI TRICOTECENI E DI OCRATOSSINA A IN ALIMENTI PER L'INFANZIA E IN PRODOTTI DIETETICI A BASE DI CRUSCA

Amedeo Pietri, Terenzio Bertuzzi, Marco Zanetti, Silvia Rastelli
Istituto di Scienze degli Alimenti e della Nutrizione, Facoltà di Agraria, Università Cattolica del S. Cuore, Piacenza

Ocratossina A (OTA) e Tricoteceni (TCT, in particolare il deossinivalenolo, DON) sono le micotossine che più frequentemente contaminano i cereali a paglia e in particolare il frumento. Nella UE, per l'OTA è stato fissato un limite di 3 µg/kg per i prodotti derivati dai cereali; per i TCT sono stati proposti valori massimi per il DON di 500 e 150 µg/kg, rispettivamente per vari prodotti (da forno e cereali da colazione) e alimenti per l'infanzia. Scopo del lavoro è stato quello di condurre una indagine sulla presenza di queste micotossine negli alimenti a base di cereali per la prima infanzia e nei prodotti dietetici ricchi di crusca. L'indagine è stata condotta su 30 campioni di *baby-food* e 52 campioni di alimenti dietetici a base di crusca, acquistati in diversi punti vendita durante il 2003. Per i TCT, il campione è stato estratto con una miscela acetonitrile:acqua 84:16, l'estratto purificato su colonna Mycosep e i TCT (DON, NIV, 3Ac-DON, 15Ac-DON, HT-2 e T-2) determinati mediante GC-MS con rivelatore a trappola ionica, con tecnica SIM. Per l'OTA, il campione è stato estratto con una miscela metanolo:soluzione di bicarbonato 50:50, l'estratto purificato su colonna ad immunoaffinità e l'OTA analizzata mediante HPLC con rivelazione fluorimetrica.

Nei campioni di *baby-food* l'incidenza di contaminazione per l'OTA (limite di rivelazione pari a 0,020 µg/kg) è stata del 20%, con un valore massimo di 0,450 µg/kg. Tra i Tricoteceni è stato rilevato solo il DON, con un'incidenza (limite di rivelazione di 2,0 µg/kg) pari al 77% e un valore massimo di 187 µg/kg. I valori medi di OTA e DON sono risultati pari a 0,046 e 91 µg/kg, rispettivamente. Nei prodotti dietetici a base di crusca l'OTA è risultata presente nel 65% dei campioni, con un valore massimo di 2,597 µg/kg e con il 6% dei campioni superiore a 1 µg/kg. Il DON è stato rilevato nel 96% dei campioni, con un valore massimo di 1498 µg/kg e con il 30% dei campioni superiore a 500 µg/kg. Gli altri TCT sono stati rilevati a bassi livelli solo dove il DON era superiore a 500 µg/kg. I valori medi sono risultati di 0,209 e 306 µg/kg per l'OTA e il DON, rispettivamente. La UE ha indicato come valori di TDI (*Tolerable Daily Intake*) limiti di 0,005 e 1 µg/kg, rispettivamente per OTA e DON. Considerando un peso medio di un bambino a inizio svezzamento (6 mesi) pari a 7,5 kg e un consumo di 0,1 kg di prodotti a base di cereali, dai dati medi di questo lavoro si può stimare che questi alimenti apportano il 12,3% del TDI per l'OTA, ma soprattutto superano (121%) il TDI per il DON. Per i prodotti dietetici a base di crusca, considerando un consumo di 0,05 kg da parte di una persona di 70 kg, gli apporti di OTA e DON risultano essere rispettivamente il 3 e 22% del TDI.

AFLATOSSINE IN SPEZIE, ERBE AROMATICHE, INFUSIONALI E OFFICINALI

Cecilia Bergamini, Nadia Gruppioni, Veronica Menna, Barbara Romagnoli
ARPA Emilia Romagna, Sezione di Bologna, Bologna

I laboratori di ARPA ER analizzano circa 500 campioni/anno di alimenti per la ricerca di micotossine, considerando frutta secca, semi oleaginosi, cereali e derivati, erbe aromatiche, spezie, erbe infusiunali, caffè, cacao, vino, ecc.

In questo lavoro si sono raccolti i dati delle analisi effettuate su: 20 campioni di erbe aromatiche (basilico, semi di coriandolo, aglio intero/scaglie, rosmarino, lauro, maggiorana, prezzemolo, origano, salvia, semi di finocchio), 24 di spezie (cannella, cumino, semi di papavero, semi di sesamo, pepe nero, peperoncino), e 41 di erbe infusionali e officinali (guaranà, tè, tè verde, succo di aloe, rosa canina, karkadè, iperico, erbe svizzere, succo di betulla, bissaps secco, gombo secco, erbe cinesi, melissa e biancospino), per la ricerca delle aflatossine.

Tali campioni sono stati analizzati impiegando il metodo ufficiale AOAC 999.07 con derivatizzazione post-colonna mediante Kobra cell.

I campioni provengono da prelievi effettuati tra il 2000 e il 2003, sia dall'AUSL in mercati, negozi, super-market della regione Emilia Romagna e quindi rappresentano merce alla libera vendita, sia dall'USMA sulla merce ancora allo stato estero per la verifica della conformità alle leggi italiane ed europee.

Degli 85 campioni analizzati sono risultati contaminati prevalentemente i campioni di spezie (25%), mentre le erbe aromatiche, infusionali e officinali non hanno presentato particolari problemi di contaminazione.

Valori positivi di aflatossine sono stati riscontrati in 6 campioni di spezie: 5 peperoncini presentano una contaminazione da Aflatossina B1 che va da 0,6 a 27 ppb mentre presentano tracce delle aflatossine B2, G1 e G2. Due campioni superano i valori normati. Un campione di cannella contiene 1 ppb di Aflatossina B1.

Interessante è notare che le erbe aromatiche, infusionali, compreso tè e tè verde, e officinali nonostante provengano da diversi Paesi, la maggior parte dei quali tropicali, non presentino contaminazione da aflatossine.

CONTROLLO E PREVENZIONE DELLA PRODUZIONE DI OCRATOSSINA A NEI CEREALI: RISULTATI DEL PROGETTO CEE QLK1-CT-1999-00433 (1999-2004)

Corrado Fanelli e Anna Adele Fabbri

Dipartimento di Biologia Vegetale, Università di Roma "La Sapienza", Roma

Il principale obiettivo del progetto è stato l'individuazione di strategie per prevenire e controllare la presenza di Ocratossina A nei cereali coltivati in Europa. La realizzazione di questo obiettivo è considerata di grande rilevanza per la produzione di "safe food" e quindi per la protezione della salute dei consumatori. Al termine del progetto sono stati identificati alcuni punti chiave nell'ambito di un programma HACCP riguardante l'Ocratossina A per i cereali e sono state proposte le strategie di intervento preventive e correttive. Il progetto includeva 11 *workpackage* che coprivano l'intera filiera dalla produzione dei cereali fino al prodotto finale lavorato. Gli obiettivi sono stati suddivisi in quattro differenti attività di ricerca:

1. identificazione dei punti critici da controllare;
2. stabilire i limiti critici dei punti critici;
3. sviluppo di rapidi metodi di monitoraggio;
4. stabilire azioni correttive nel caso si verificano deviazioni dai punti critici.

Si è anche evidenziato che nel Nord Europa il *P.verrucosum* rappresenta il principale produttore di Ocratossina A, in particolare a valori di bassa attività di acqua libera e a temperature intorno a 15 °C. Per contro l'*A.ochraceus* è il più ricorrente tra i funghi produttori di tossine nel sud Europa a più alti valori di attività di acqua libera e temperature più alte. Inoltre non sempre è stata rilevata una diretta proporzionalità tra lo sviluppo dei funghi produttori e la produzione della tossina. È stato sviluppato un modello matematico per stabilire il rischio dello sviluppo di *P.verrucosum* e la conseguente produzione di Ocratossina A in silos correlando i valori dell'attività dell'acqua e la temperatura. Sono state descritte alcune metodologie di intervento per il controllo della crescita dei funghi produttori e della produzione di Ocratossina A mediante l'impiego di differenti oli essenziali, resveratrolo e batteri lattici. In particolare molto efficaci sono apparsi il timo, il cinnamomo e il resveratrolo che a talune concentrazioni inibivano la produzione di Ocratossina A di oltre il 90%. Sono stati messi a punto nuovi metodi di monitoraggio per una rapida determinazione della tossina nei cereali. Particolarmente interessanti sono stati gli studi di sintesi di polimeri specifici per l'Ocratossina A e la loro integrazione in fase solida per il loro sviluppo come biosensori.

Infine il progetto ha proposto nuove misure correttive per le industrie cerealicole e produttrici di birra per facilitare il rispetto dei limiti massimi di accettabilità di Ocratossina A descritti nella normativa comunitaria n. 472/2002 del 12/3/2002.

PREVENZIONE DELL'OCRATOSSINA NELL'UVA E NEL VINO

Paola Battilani (a), Paola Giorni (a), Terenzio Bertuzzi (b), Silvia Formenti (a),
Amedeo Pietri (b)

(a) *Istituto di Entomologia e Patologia Vegetale, Facoltà di Agraria, Università Cattolica
del Sacro Cuore, Piacenza*

(b) *Istituto di Scienze degli Alimenti e della Nutrizione, Facoltà di Agraria, Università
Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza*

La presenza di tossine nei derivati dell'uva è stata segnalata di recente, dal 1996. In seguito ad un'indagine su vini di diversa provenienza è stata individuata la presenza di Ocratossina A (OTA). I funghi responsabili della presenza di questa tossina sono gli aspergilli della sezione Nigri (*Black Aspergilli*, BA). *A. carbonarius*, appartenente a questa sezione, è considerato il fungo più rilevante per la produzione di OTA, dato che la quasi totalità dei ceppi appartenenti a questa specie è in grado di produrre la tossina e generalmente in quantità rilevanti.

I BA si conservano nel terreno, sono presenti sui grappoli già dall'allegagione, ma la loro incidenza è rilevante solo da inizio invaiatura. L'OTA viene prodotta in vigneto; in genere è assente dai grappoli fino a inizio invaiatura anche quando è presente in quantità rilevanti a maturazione. La presenza dei funghi non è necessariamente correlata a quella di OTA. La tossina può essere rilevata anche in grappoli privi di muffe nere visibili, ma in acini danneggiati e con muffe nere evidenti il contenuto è normalmente maggiore.

L'ambiente gioca un ruolo di primo piano per questa problematica; infatti, l'area geografica e l'andamento climatico possono determinare la presenza o l'assenza di OTA. Monitoraggi svolti sul territorio europeo evidenziano una costanza delle aree in cui la tossina viene rilevata nei grappoli a maturazione, anche se vi sono annate in cui, anche in queste zone, OTA non viene rilevata nei campioni di grappoli. Con riferimento al territorio italiano, il sud è certamente una zona a maggiore rischio, con differenze fra le annate.

Anche il sistema colturale è importante, almeno in relazione alle varietà e alla forma di allevamento. Riguardo ai fungicidi, al momento gli unici fungicidi che hanno mostrato un'azione di controllo sia sul fungo che sulla tossina sono stati Fludioxonil e Cyprodinil usati in miscela.

Come detto, OTA viene sintetizzata in vigneto, quindi la prevenzione deve avvenire durante la coltivazione. Molteplici sono i fattori che intervengono nel determinare la presenza dei funghi responsabili, ma soprattutto la sintesi della tossina. Per questo il migliore approccio per gestire questa problematica consiste nella messa a punto di un Sistema di Supporto alle Decisioni (DSS), che consente di organizzare tutte le informazioni disponibili al fine di guidare gli interventi colturali; lo scopo di minimizzare il rischio, in questo caso il rischio di presenza di OTA nei grappoli.

Lavoro svolto nell'ambito del progetto "WINE-OCHRA RISK", supportato da EC nel V Framework Programme

FUSARIOSI DELLA SPIGA DI GRANO: 4 ANNI DI INDAGINI IN ITALIA NELL'AMBITO DEL PROGETTO EUROPEO RAMFIC DEL V PROGRAMMA QUADRO

Antonio Moretti (a), Alberto Ritieni (B), Antonio Logrieco (a) e Antonio Bottalico (b)

(a) Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, CNR, Bari

*(b) Dipartimento di Scienza degli Alimenti, Università degli Studi di Napoli "Federico II",
Portici*

La fusariosi della spiga (FSG) è una malattia che negli ultimi anni colpisce le coltivazioni di frumento con una crescente gravità e frequenza. Tra le specie fungine che causano infezioni o contaminazioni delle spighe e delle cariossidi di frumento, sono associate diverse specie di *Fusarium* in grado di produrre micotossine, in particolare deossinivalenolo, un potente inibitore della sintesi proteica, che sono fonte di rischio per la salute umana e animale. La gravità con la quale questa malattia si manifesta dipende oltre che dal potenziale di inoculo del terreno, da favorevoli condizioni climatiche. Il progetto europeo RAMFIC ha avuto come obiettivo principale di conseguire su larga scala in Europa dati quantitativi sulla FSG, sulla relativa produzione di micotossine da parte delle specie coinvolte e sui dati meteorologici (temperatura, umidità relativa e precipitazioni) delle zone indagate. Tali dati verranno integrati con quelli ottenuti da esperimenti sullo sviluppo della malattia condotti in condizioni climatiche controllate, al fine di sviluppare modelli previsionali per lo sviluppo della malattia e l'eventuale accumulo di micotossine. I dati presentati riguardano l'indagine svolta in Italia, dal 2001 al 2004, su 20 campi di grano, duro e tenero, collocati in diverse aree geografiche del Paese, dal Nord al Sud. I dati raccolti riguardano il livello di contaminazione delle principali specie di *Fusarium* in tre diversi stadi fenologici della pianta (infiorescenza, maturazione latte e maturazione vitrea delle cariossidi) ottenuto attraverso l'uso di primer specie-specifici, la presenza di micotossine nelle cariossidi e i principali parametri meteorologici. I dati hanno confermato che il deossinivalenolo è un comune contaminante del grano in Italia, ma anche che i livelli di contaminazione possono fortemente cambiare di anno in anno e da luogo a luogo in funzione soprattutto delle condizioni climatiche.

INDAGINE PLURIENNALE SULLE CARATTERISTICHE QUALITATIVE E IGIENICO-SANITARIE DELLE GRANELLE COMMERCIALI DI MAIS

Carla Corticelli (a), Alberto Verderio (b)

(a) Associazione Interprofessionale Cerealicola (ASS.IN.CER), Bologna

(b) Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura, Sezione di Bergamo

L'Associazione Interprofessionale Cerealicola, con l'intento di rappresentare un punto di riferimento per gli operatori che vogliono perseguire l'obiettivo di aumentare la competitività dell'offerta cerealicola nazionale, analizza le caratteristiche della filiera, promuove la comunicazione e la diffusione di informazioni diversificate e di strumenti innovativi indispensabili per la valorizzazione della qualità.

Relativamente alla problematica delle micotossine, ASS.IN.CER, attraverso la costituzione del gruppo di lavoro "qualità del mais", nell'ambito del progetto Pro.Cla.Ma. (criteri di classificazione del mais per caratteristiche qualitative e requisiti igienico sanitari delle granelle) finanziato dalla Regione Lombardia, DG Agricoltura, ha intrapreso attività riguardanti oltre le diverse tematiche inerenti la valorizzazione della filiera del mais anche le possibili soluzioni tecniche in campo e nello stoccaggio per contribuire a ridurre il rischio delle micotossine.

Da 5 anni ASS.IN.CER., in collaborazione con l'Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura, realizza un campionamento sistematico a livello nazionale, cofinanziato dalla Regione Lombardia, sulle caratteristiche qualitative e igienico - sanitarie del mais sulle granelle commerciali, organizzato in serie storiche poliennali omogenee e confrontabili.

Vengono illustrati i dati della serie storica e alcuni dati relativi al campionamento sul raccolto 2004 (aflatossine, fumonisine, DON, ocratossine).

APPROCCIO EPIDEMIOLOGICO ALLO STUDIO DELLE CONTAMINAZIONI DA AFLATOSSINE B1 E M1 NEL SISTEMA DI ALLEVAMENTO DEL BOVINO DA LATTE

Pier Paolo Danieli (a), Gilberto Giangolini (b), Domenico Giontella (a),
Umberto Bernabucci (a) e Bruno Ronchi (a)

(a) *Dipartimento di Produzioni Animali, Università degli Studi della Tuscia, Viterbo*

(b) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Roma*

L'intensificarsi dei controlli di legge evidenzia una presenza diffusa delle contaminazioni da Aflatossina B1 negli alimenti per bovini da latte e di Aflatossina M1 nel latte, che pregiudica la salubrità delle produzioni dell'intero comparto lattiero-caseario. Lo studio si pone il duplice obiettivo di analizzare la distribuzione della contaminazione da AFB1 (*unifeed*) e AFM1 (latte) in alcuni allevamenti di bovini da latte delle province di Latina (10 aziende), Roma (16 aziende) e Viterbo (10 aziende) e di evidenziare quei fattori, legati alla tipologia e alla gestione aziendale che possano contribuire a spiegare la distribuzione di tali contaminazioni. Campioni di *unifeed* e latte sono stati raccolti durante tre campagne di prelievi negli anni 2002-2003 contestualmente alle informazioni relative al quadro aziendale e alla composizione delle razioni. I campioni, dopo specifico pre-trattamento, sono stati analizzati per la determinazione di AFB1 (*unifeed*) e AFM1 (latte) mediante clean-up d'immunoaffinità e separazione in RP-HPLC con rivelazione fluorimetrica. Il quadro della contaminazione da AFM1 nel latte, ha evidenziato una positività (LOQ = 6,3 ngAFM1/kg) nel 75% dei casi; un ulteriore 13,9% dei casi ha presentato livelli superiori a 0,050 µgAFM1/kg. La situazione è risultata difforme soprattutto in relazione alla provenienza: per le province di Roma e Viterbo, sull'intero periodo, le contaminazioni da AFM1 sono significativamente maggiori a quelle riscontrate nei lattini di Latina (Kruskal-Wallis ANOVA: $p=0,0001$). Il trasferimento di massa AFB1ingerita/AFM1escreta (*carry-over*), che mediamente su tutti i casi si è attestato su valori prossimi allo 0,6%, è risultato differente tra le province con valori tendenzialmente superiori per gli allevamenti dell'area romana ($p=0,0001$). Tra i fattori aziendali considerati, sono risultati significativi ($p<0,05$), e con effetto positivo sulla contaminazione da AFM1 nel latte, le dimensioni degli allevamenti, la sostanza secca ingerita e le quantità di insilato di mais e di cotone presenti nella razione; mentre la concentrazione di AFM1 è risultata più bassa nelle diete con maggiori quantità di soia e di fieni. Inoltre, l'utilizzo di fieni spiega significativamente ($p=0,0117$) la riduzione del *carry-over* che invece tende ad aumentare con l'impiego di mais ($p=0,0189$). Il quadro complessivo, porta a concludere che il problema delle contaminazioni da Aflatossine nel sistema di allevamento del bovino da latte, è presente in maniera estesa anche in assenza di situazioni particolarmente critiche. La gestione del problema deve necessariamente tenere conto della complessità del sistema d'allevamento e dei diversi fattori che di volta in volta possono incidere sulla qualità e la salubrità del latte prodotto.

Terza sessione
Tecnologie alimentari

Moderatori
C. Fanelli, M. Miraglia

SICUREZZA NELL'INDUSTRIA ALIMENTARE ED ESIGENZE DEL CONSUMATORE

Daniele Rossi
Direzione, Federalimentare, Roma

Abstract non pervenuto.

DAL CAMPO ALLA TAVOLA: GESTIONE DELLA FILIERA, TRACCIABILITÀ E SICUREZZA. INDAGINI PER LA VALUTAZIONE DELLA PRESENZA DI AFLATOSSINA M1 NEL LATTE

Lucio Schianchi (b), Gabriele Besia (a), Elisabetta Bassi (a), Andrea Messori (a), Francesco Venè (b), Patrizio Cagnasso (a), Costante Pinelli (b) e Ivana Gandolfi (a)

(a) Ricerca & Sviluppo Parmalat SpA, Castellaro di Sala Baganza, Parma

(b) Assicurazione Qualità Parmalat SpA, Collecchio, Parma

Oggi Istituzioni e Industria sono consapevoli che per produrre alimenti sicuri e di qualità occorre organizzare un piano di gestione di tutta la filiera produttiva, che richiede la definizione di un sistema di rintracciabilità, di identificazione dei punti critici, di attuazione delle procedure di monitoraggio e di quelle correttive, responsabilizzando ciascun anello della filiera stessa. La dimostrazione dell'efficacia di tale impostazione è fornita da un capillare monitoraggio della presenza di Aflatossina M1 nel latte, che permette inoltre di risalire in tempo utile agli allevamenti responsabili di un aumentato livello di contaminazione e intervenire all'occorrenza sulla qualità e origine degli alimenti zootecnici impiegati.

A tal fine, già dal 1994/1995, è stato ottimizzato un sistema HPLC (in particolare la fase di purificazione, il limite di determinazione -5 ng/L-, il controllo dell'affidabilità del sistema), in grado di eseguire migliaia di determinazioni/anno di AFM1, e un metodo fluorimetrico, in grado di valutare il tenore di aflatossine totali (B1, B2, G1, G2) sugli alimenti delle lattifere. Entrambi prevedono la purificazione del campione per cromatografia di immuno-affinità. I risultati dell'attività di miglioramento, a seguito di azioni preventive alle stalle, coadiuvate da un piano di monitoraggio analitico, per una vasta zona di raccolta del nord-Italia sono stati significativi. Solo una parziale inversione di tendenza dovuta a sfavorevoli condizioni climatiche, causa di una maggior proliferazione fungina, soprattutto nel mais destinato agli animali da latte, è stata riscontrata nel 2001.

La disponibilità di metodi analitici rapidi e affidabili per bassissimi livelli di concentrazione di AFM1 (pochi ng/L), integrati con un metodo rapido ed economico di screening semi-quantitativo (valore on-off a intorno a 0,03 ppb in 15 min.), sperimentato sul campo e opportunamente validato in parallelo tramite analisi HPLC, ha consentito l'attuazione di un piano di controllo in grado di garantire, assieme con le azioni preventive all'origine, un livello trascurabile di contaminazione del latte alimentare confezionato (<0,02 ppb), significativamente inferiore al valore limite di legge (0,05 ppb), anche nella situazione di emergenza verificatasi nell'autunno-inverno 2003.

CONTROLLO DELLA CONTAMINAZIONE DA MICOTOSSINE NELLA FILIERA DEL MAIS

Amedeo Reyneri, Massimo Blandino, Andrea Maiorano, Francesca Vanara
*Dipartimento di Agronomia, Selvicoltura e Gestione del territorio, Università di Torino,
Grugliasco, (TO)*

Il contenuto di micotossine della granella e dei prodotti derivati è determinato dall'insieme delle operazioni condotte dalla produzione in campo fino alla trasformazione della granella.

Ricerche svolte dal 1996, sulle fasi colturali, del post raccolta e della trasformazione hanno permesso di evidenziare e quantificare le possibilità di controllare le micotossine durante tutta la filiera.

Dai dati emersi a seguito di oltre 2000 analisi sulle principali micotossine, è emerso che i singoli elementi della filiera possono contribuire al controllo della contaminazione secondo le modalità seguenti:

- *Coltivazione* (campo): tecniche agronomiche in grado di contrastare le condizioni di sviluppo dei funghi tossigeni, del genere *Fusarium* e *Aspergillus*, e favorire lo sviluppo della coltura così da indurre una maggiore resistenza alla contaminazione fungina. Le tecniche agronomiche con maggiore influenza sono la scelta varietale, l'epoca e la densità di semina, la concimazione, la lotta alla piralide e l'epoca di raccolta.
- *Post raccolta e prima trasformazione* (centro di essiccazione e stoccaggio): l'efficace pulitura e la pronta essiccazione della granella, unite a condizioni di stoccaggio corrette, possono non solo contenere lo sviluppo dei funghi tossigeni ma ridurre la concentrazione delle micotossine.
- *Seconda trasformazione* (molino, mangimificio, amideria): la trasformazione della granella di mais è in grado di migliorare la qualità dei prodotti finiti concentrando le tossine in sottoprodotti con diversi livelli di efficacia a seconda delle trasformazioni poste in atto.

La quantificazione attenta della possibile decontaminazione attuabile dai diversi elementi della filiera consente di tracciare diversi scenari possibili, ma pone in luce soprattutto la necessità di partire da un prodotto in campo più sano e controllato.

Il controllo del tenore in micotossine è possibile con il coordinamento dei soggetti della filiera, attraverso la costituzione di una filiera controllata in grado di applicare disciplinari di produzione in campo e poi mantenere la tracciabilità del prodotto al centro di stoccaggio e negli impianti di seconda trasformazione.

Nel lavoro sono discusse le difficoltà nell'applicazione dei disciplinari e di una adeguata tracciabilità per la frammentazione del settore cerealicolo e per il ridotto valore della granella e dei prodotti derivati (mangimi, farine alimentari) che rende più difficile lo sviluppo della qualità e la giustificazione economica dell'applicazione delle azioni necessarie per il miglioramento del prodotto.

COEFFICIENTE DI TRASFERIMENTO DELL'AFLATOSSINA M1 NEL FORMAGGIO GRANA

Roberto Piro, Paolo Daminelli, Alberto Biancardi, Guido Finazzi, Paolo Boni
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia

A seguito dell'emergenza Aflatossina M1 nel latte è stato ritenuto di fondamentale importanza condurre uno studio sperimentale per valutare il trasferimento di Aflatossina M1 dal latte alla cagliata/siero a seguito del processo di caseificazione del formaggio Grana. Sono stati esaminati 28 diversi lotti di produzione di grana padano in differenti stabilimenti di trasformazione.

Lo studio condotto ha consentito di determinare una correlazione lineare tra la concentrazione di Aflatossina M1 riscontrata nella cagliata in funzione della corrispondente concentrazione del latte.

Mediante questa equazione, conoscendo la concentrazione dell'Aflatossina M1 nel latte è stata calcolata la concentrazione nella cagliata, risultata pari a 3,11 come valore medio e 4,40 come valore massimo. Questi coefficienti, riferiti al momento della messa in fascera della cagliata, devono tuttavia essere raddoppiati in considerazione della perdita di peso da questo momento fino alla commercializzazione.

Sulla base del lavoro svolto, si è potuto presentare al Ministero della Salute la base sperimentale atta alla determinazione di un limite di Aflatossina M1 nel prodotto posto in commercio pari a 450 ppt, corrispondente al valore massimo riscontrabile in un formaggio Grana prodotto con un latte contaminato da 0,05 µg di aflatossine M1 per chilogrammo e stagionato per un periodo anche superiore a 24-30 mesi.

Nel mese di agosto 2004 il Ministero della Salute ha emesso un decreto con il quale viene stabilito che "sulla base delle sperimentazioni sinora effettuate devono essere considerati conformi i lotti di forme per le quali le analisi hanno dato risultati non superiori a 0,45 µg/kg ... (omissis). Tale valore di accettabilità deve essere ... applicato ... nelle diverse forme di commercializzazione della stessa tipologia di formaggio (porzionato, grattugiato)".

Il formaggio prodotto in concomitanza con la presenza sul mercato di partite di latte contaminato da Aflatossina M1 (fine settembre-inizio ottobre 2003) ha iniziato ad essere commercializzato a partire da luglio 2004 (Grana Padano DOP stagionatura minima 9 mesi).

Vengono riportati gli esiti di 846 lotti esaminati appartenenti ai 166 caseifici considerati sull'intero territorio e disaggregati per ciascuna delle regioni comprese nel comprensorio del consorzio.

Sono stati riscontrati 61 campioni positivi, pari al 7,2%, in prevalenza relativi alle produzioni di ottobre, rispecchiando in tal modo anche nel formaggio grana quanto riscontrato nel latte di raccolta.

APPROCCIO INTEGRATO NELLA FILIERA AGRO-ALIMENTARE PER LA PREVENZIONE DEL RISCHIO MICOTOSSINE

Maurizio Zucchi
COOP Italia Sc, Casalecchio di Reno (BO)

Per tutta la filiera agro-alimentare le micotossine rappresentano attualmente uno dei problemi più critici, da tenere sotto controllo per scongiurare gli ormai ben noti e pericolosi effetti avversi sulla salute umana e animale. Dagli anni '90 ad oggi le metodologie attuate per la gestione del rischio micotossine hanno subito una importante trasformazione.

Nei sistemi più evoluti si è passati da un approccio quasi esclusivamente analitico, basato sul controllo a campione, ad un approccio "di filiera", consistente nella qualifica dei fornitori e sub-fornitori di materie prime al fine di considerare le misure specifiche adottate nelle fasi a monte. Infatti, è proprio risalendo la filiera che ci si può rendere conto della debolezza di taluni sistemi, incentrati soltanto su analisi di laboratorio saltuarie, magari con metodiche discutibili, su una griglia non completa, e con metodi campionari non rappresentativi della massa. Oggi, un sistema di garanzie efficace deve evolvere verso un approccio integrato basato su disciplinari di filiera definiti dopo un'attenta analisi dei rischi, con individuazione di GMP e punti critici di monitoraggio efficaci e praticabili, verificati con piani di controllo affidabili.

Per quanto riguarda Coop, dopo la prima linea-guida stilata nel 2001 basata su documento FAO/WHO, è oggi impegnata nella redazione di un nuovo e più approfondito linea guida, coinvolgendo un comitato tecnico-scientifico costituito da un team di esperti multi-disciplinare, che ha potuto affrontare l'argomento da differenti punti di vista.

In particolare le fasi critiche sotto esame sono quelle di pre-trasformazione delle derrate, vale a dire quelle di produzione agricola, prima lavorazione (essiccazione, molitura ecc.) e stoccaggio, per le quali vengono richieste specifiche buone pratiche di lavorazione.

Un'area di attenzione particolare è rappresentata da alcune micotossine (quali fumonisine, Ocratossina): talune importanti produzioni italiane sono coinvolte e stanno avendo serie difficoltà nel rispettare come valori guida le proposte di limiti attualmente all'attenzione in sede comunitaria.

Naturalmente le difficoltà maggiori di controllo del rischio vi possono essere nel caso delle produzioni provenienti da Paesi extra UE in particolare per cacao e caffè.

Per contro risultati positivi sono stati raggiunti individuando aziende direttamente in tali Paesi e sensibilizzandole sul tema.

Inoltre, sempre sul tema prevenzione del rischio un altro aspetto che si sta approfondendo è quello rappresentato dallo studio degli eventuali effetti indotti da eventi transgenici.

Le prove condotte sia negli Stati Uniti che in Europa ad oggi non risolvono i dubbi in quanto i risultati sono discordanti o spesso parziali. Questa opzione deve essere ulteriormente indagata attraverso studi indipendenti e quindi, al momento, non risulta utile al fine della prevenzione del rischio micotossine.

DIMINUZIONE DELLA CONTAMINAZIONE DA PATULINA MEDIANTE UN AGENTE DI LOTTA BIOLOGICA

Valeria Morena (a), Leonardo Caputo (b), Gianfranco Panfili (c), Filippo De Curtis (a),
Vincenzo De Cicco (a) e Raffaello Castoria (a)

(a) Dipartimento di SAVA, Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, CNR, Bari

(b) Dipartimento di STAAM, Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, CNR, Bari

(c) Facoltà di Agraria, Università del Molise, Campobasso

La Patulina è una micotossina prodotta dal fungo patogeno postraccolta *Penicillium expansum*. La presenza della tossina e di fungicidi in mele conservate e nei succhi derivati rappresenta uno dei principali problemi legati alla sicurezza alimentare. Gli agenti di biocontrollo rappresentano un'alternativa/integrazione all'uso di fungicidi. I nostri dati mostrano che questi microrganismi potrebbero contribuire anche a ridurre attivamente l'accumulo di Patulina nelle mele conservate. Tre agenti di lotta biologica, *Rhodotorula glutinis* ceppo LS11, *Cryptococcus laurentii* ceppo LS28 e *Aureobasidium pullulans* ceppo LS30, sono stati testati per la loro capacità di crescere *in vitro* in presenza di Patulina e di ridurre i livelli di tossina nel terreno colturale. Il ceppo LS11 ha evidenziato i più elevati valori di crescita in presenza di Patulina e ha determinato la maggior riduzione di recupero di tossina, valutato mediante HPLC. Inoltre, analisi TLC degli stessi campioni hanno mostrato che LS11 determina la concomitante comparsa di due principali *spot*, suggerendo una possibile metabolizzazione della micotossina. *In vivo*, cioè nella bassa percentuale di mele pretrattate con LS11 e comunque infettate da *P. expansum*, abbiamo registrato una significativa riduzione di accumulo di Patulina rispetto ai frutti infetti non trattati con il lievito. Le cellule di LS11 sopravvivono e si moltiplicano nelle mele infette e, in un sistema modello riprodotto tessuto di mela marcescente ed emendato con Patulina, hanno accelerato la degradazione della micotossina ed evidenziato, su lastre TLC la comparsa degli stessi *spot* rilevati negli esperimenti *in vitro*. Questi dati suggeriscono che le cellule dell'agente di lotta biologica sopravvivenuti in tessuto marcescente di mela potrebbero metabolizzare la Patulina e/o influire negativamente sul suo accumulo e/o sintesi. I prodotti della possibile metabolizzazione della Patulina da parte di LS11 sono in via di caratterizzazione. È questa la prima volta che si descrive l'influenza di un agente di lotta biologica sull'accumulo di Patulina *in vivo*.

LA PROTEINA b32 DI MAIS: RUOLO NELLA PROTEZIONE CONTRO PATOGENI FUNGINI

Mario Motto (a), Carlotta Balconi (a), Tiziana Triulzi (a), Chiara Lanzanova (a), Luca Gualdi (a), Fabio Forlani (b), Nicola Berardo (a) e Elisabetta Lupotto (a)

(a) Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura, Bergamo, (b) Dipartimento di Scienze Molecolari Agroalimentari, Università degli Studi di Milano

La proteina b32 di mais è un'albumina monomerica presente nel citoplasma dell'endosperma, con peso molecolare apparente di 32 KDa. Questa proteina viene sintetizzata e immagazzinata nell'endosperma in coordinazione temporale e quantitativa con le proteine di riserva. Il clonaggio e il sequenziamento di 3 geni b32 hanno evidenziato che essi formano una famiglia genica polimorfica. I geni b32, come quelli delle zeine, sono sotto il controllo del fattore trascrizionale Opaque-2(O2) specifico per il seme, e in linee mutate per questo fattore trascrizionale la proteina b32 è prodotta a livelli molto bassi.

Un'analisi di sequenza ha mostrato omologie tra il clone λ b-32.66 e proteine che inattivano i ribosomi (*Ribosome Inactivating Protein*, RIP). Dati ottenuti in precedenza da saggi biochimici *in vitro* hanno confermato che la proteina b32 è dotata di attività RIP; in aggiunta, piante di tabacco trasformate con il gene b32, hanno mostrato un aumento della protezione contro il patogeno fungino *Rhizoctonia solani* rispetto al controllo non trasformato. Piante transgeniche di mais sono state ottenute tramite trasformazione genica, utilizzando il plasmide pSC1.b32, nel quale il promotore costitutivo 35S del virus del mosaico del cavolfiore (CaMV-35S) guida l'espressione del gene b32. Le piante trasformate (T0) sono state ottenute da eventi di rigenerazione da callo e caratterizzate per la resistenza all'erbicida Basta. La linea T1 (Tt) corrisponde a semi risultanti dall'incrocio tra la linea T0 (Tt) e la B73 (tt) di mais. Le plantule derivanti da semi T1 sono state trattate con erbicida Basta e le piante resistenti (Tt) sono state portate a maturazione e autofecondate, ottenendo progenie che sono state controllate per livello di espressione della b32 nei diversi tessuti. Sei progenie PCR-b32 e western-b32 positive, e come controllo negativo, una progenie PCR positiva e western negativa, sono state utilizzate per un'analisi fitopatologia. Le piante Tt e/o TT di ciascuna progenie sono state portate a maturità in una serra a contenimento. Allo stadio di fioritura, due individui per ogni progenie sono stati analizzati a livello di tessuto fogliare per quanto riguarda l'espressione della b32 e la risposta ad attacco di *Fusarium verticillioides*. L'espressione di b32, valutata tramite immuno-blot, è risultata differenziata tra le varie progenie.

Tale indagine ha consentito l'identificazione di progenie con alta, intermedia e bassa espressione di b32 in tessuti fogliari, utili nell'ambito di esperimenti di patogenicità volti a valutare la risposta differenziale all'attacco di *Fusarium*. A tale scopo, contemporaneamente al prelievo di tessuto fogliare destinato all'indagine di immuno-blot, sono stati prelevati campioni da utilizzare per bioassay *in vitro* di resistenza a *Fusarium*. Esperimenti preliminari hanno consentito di identificare le condizioni di bioassay (concentrazione di inoculo, tempo di rilevamento) utili per un'accurata valutazione dei materiali. Il controllo negativo è risultato più suscettibile all'attacco di *F. verticillioides* rispetto a tutte le altre progenie saggiate. In questo caso, il diametro fungino misurato attorno al tessuto fogliare

inoculato, è significativamente superiore a quello osservato per le progenie che esprimono b32. È stata osservata una buona correlazione tra il livello di b32 rilevato nelle foglie e il grado di resistenza all'attacco di *Fusarium*. Per ciascun genotipo sono state registrate le osservazioni relative alle diverse modalità di attacco e di invasione da parte del *Fusarium*.

PRESENZA DI ZEARELENONE E CARATTERIZZAZIONE DI CEPPI DI *FUSARIUM* IN MANGIMI PER SUINI

Maria Cesarina Abete (a), Lucia Decastelli (a), Elisa Piccin (a), Stefania Gavinelli (a),
Silvia Gallina (a), Giovanni Falsetta (a), Angelo Millone (b)

(a) *Centro di Referenza Nazionale per la sorveglianza ed il controllo degli alimenti per animali (C.Re.A.A.) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino*, (b) *Servizio Veterinario Area C ASL 17/2, Saluzzo*

Questa indagine, finanziata dalla Regione Piemonte e organizzata dal Centro di Referenza per l'Alimentazione Animale (C.Re.A.A.) dell'Istituto Zooprofilattico del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, s'inserisce nell'ambito della sicurezza alimentare con particolare riferimento all'alimentazione zootecnica e alle contaminazioni che possono interessarla.

La ricerca si propone di effettuare uno screening sulla presenza dello Zearalenone in mangimi semplici e composti per suini, presenti nei mangimifici e negli allevamenti del territorio dell'ASL 17/2 del Piemonte.

L'attenzione è stata focalizzata sui suini, perché è la specie più sensibile agli effetti ormonali dello Zearalenone che induce ipofertilità e sindrome estrogenica già a basse concentrazioni.

Per il prelievo dei mangimi sono stati considerati tutti i mangimifici industriali e alcuni degli allevamenti presenti nel territorio di competenza del Servizio Veterinario dell'ASL 17/2 e precisamente nell'area di Saluzzo (provincia di Cuneo). Per quanto riguarda gli allevamenti, questi sono stati selezionati mediante un campionamento stratificato in base al numero di capi presenti. Complessivamente sono stati raccolti circa 200 campioni (50% mangimi semplici, 50% materie prime) nel periodo marzo-luglio'04. I mangimi sono stati prelevati secondo le specifiche indicazioni riportate sia dal D.M. 23 dicembre 2000 sia dal Piano Nazionale Alimentazione Animale (PNAA).

Le analisi sono condotte utilizzando metodi immunoenzimatici (kit ELISA) previa estrazione con una soluzione idroalcolica. Il kit utilizzato ha un detection limit nei mangimi di 1,75 ppb. Parallelamente ai campioni, al fine di verificare l'efficacia del test, sono analizzati controlli negativi e controlli positivi a 2 livelli di concentrazione (50 e 100 ppb).

Sui campioni risultati positivi per la ricerca di Zearalenone è stato effettuato l'isolamento e l'identificazione di ceppi di *Fusarium* spp.

I risultati ottenuti saranno elaborati con il programma statistico SPSS 11.0 sarà stimata la prevalenza della diffusione di Zearalenone nonché le eventuali correlazioni tra la provenienza dei mangimi e/o il tipo di coltura (biologica/tradizionale). Sarà inoltre valutata la possibilità di tracciare, nell'area geografica presa in considerazione, una mappa territoriale con le zone più a rischio.

Questa ricerca consentirà, quindi, di migliorare la conoscenza della realtà piemontese in termini di sicurezza alimentare implementando i dati provenienti dall'attività di controllo routinaria prevista dal PNAA.

CONTAMINANTI MICOTICI SU UVE E PRESENZA DI OCRATOSSINA A SU MOSTI E SU VINO IN ITALIA

Michele Borgo (a), Michele Savino (b), Emilia Garcia Moruno (c)
(a) Istituto Sperimentale per la Viticoltura, Conegliano (TV); (b) Istituto Sperimentale per l'Enologia, Barletta; (c) Istituto Sperimentale per l'Enologia, Asti

A seguito della segnalazione sulla presenza di Ocratossina A (OTA) su vini prodotti in ambienti viticoli del bacino del Mediterraneo, sono stati avviati vari studi per valutare i possibili rischi di contaminazione da micotossine sulle produzioni viticole nazionali. A partire dal 1999 il Ministero delle Politiche Agricole e Forestali (MiPAF) avviò un'attività di ricerca finalizzata a monitorare la situazione viticola ed enologica.

L'attività di ricerca e sperimentazione è tuttora in corso per valutare vari aspetti della filiera di produzione viticola ed enologica. Lo scopo principale è quello di individuare i principali punti critici che possono portare alla produzione di OTA e di mettere a punto possibili strategie agronomiche ed enologiche utili a minimizzarne la presenza.

Differenti tematiche sono state affrontate nel corso delle attività e hanno riguardato i seguenti aspetti:

- fitopatologia viticola: composizione delle micoflora del grappolo in relazione agli ambienti viticoli, alle cultivar, ai fattori agronomici e all'influenza dei trattamenti antiparassitari,
- enologia: vinificazioni e interventi di abbattimenti di OTA,
- OTA e aspetti tossicologici.

Le indagini fitopatologiche condotte su varietà diverse in condizioni colturali di vario tipo ed estese ad ambienti viticoli del nord, centro, sud Italia e isole, hanno permesso di evidenziare alcuni aspetti di rilievo:

- la composizione della micoflora del grappolo presenta ampia variabilità tra gli anni,
- le condizioni climatiche e i periodi stagionali esercitano un ruolo di fondamentale importanza nel favorire lo sviluppo di generi e specie fungine diverse,
- approfondimenti sui vari isolati fungini hanno portato alla identificazione di un elevato numero di specie fungine tossinogene prevalentemente nel genere *Aspergillus* e, più limitatamente, nel genere *Penicillium*,
- la sanità delle uve, integre da lesioni e da attacchi parassitari, appare di estrema importanza per assicurare l'assenza di OTA,
- l'uso di alcuni prodotti antibotritici riduce la presenza di funghi responsabili della formazione dei marciumi anomali delle uve.

Gli studi effettuati in ambito enologico hanno permesso di constatare come la tecnica di vinificazione non influisca sul contenuto di OTA nel vino, se non per quanto riguarda la durata della macerazione, essendo questa la causa delle differenze riscontrate tra vini rossi e vini bianchi. Per quanto riguarda i trattamenti volti ad abbattere il contenuto della tossina nel vino, i migliori risultati si ottengono con l'uso del carbone decolorante; il trattamento con 15 g/hL di carbone decolorante, è sufficiente per asportare almeno l'85% dell'OTA presente. In alternativa al carbone decolorante risultati interessanti si ottengono trattando i vini con le fecce di fermentazione.

Quarta sessione
Metodi di analisi e campionamento

Moderatori
A. Pietri, G. Avanzato

LE PROBLEMATICHE LEGATE ALLA FASE ANALITICA NELLA DETERMINAZIONE DELLE MICOTOSSINE NEI PRODOTTI ALIMENTARI

Carlo Brera

Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Negli ultimi anni, la standardizzazione delle metodologie per la determinazione dei contaminanti nei prodotti alimentari è risultata come un aspetto primario e assolutamente essenziale ai fini della garanzia della affidabilità del dato analitico. Uno tra i più rilevanti elementi strettamente correlati alla standardizzazione è quello di disporre di procedure validate. Questo aspetto ha spinto la Commissione Europea, nel campo delle micotossine, a sostenere recentemente progetti di ricerca finalizzati all'ottenimento di metodologie validate attraverso studi interlaboratorio per diverse micotossine e in diverse matrici alimentari.

Va inoltre ricordato che la disponibilità di metodi analitici validati è il primo elemento per poter fissare limiti massimi tollerabili di micotossine nei prodotti alimentari.

Per quanto riguarda la determinazione analitica delle micotossine, deve necessariamente essere chiarito che si deve parlare di “filiera analitica o fase analitica” e non di singole metodologie in quanto l'errore attribuibile alla natura estremamente eterogenea con cui le micotossine sono distribuite in una derrata alimentare non è uniformemente distribuito nelle singole fasi ma varia da fase a fase, risultando notevolmente più rilevante nella procedura di campionamento. Le fasi della “filiera analitica” sono nell'ordine: campionamento, preparazione del campione, estrazione della tossina dalla matrice, purificazione dell'estratto, quantificazione e successiva conferma, e infine la analisi statistica del dato ottenuto.

Le maggiori problematiche che si riscontrano nella effettuazione della fase analitica nella determinazione delle micotossine nei prodotti alimentari, riguardano per la fase di campionamento un basso numero di campioni incrementali prelevati, una scarsa rappresentatività del campione prelevato, una estrema difficoltà di prelevare in condizioni sia dinamiche che statiche e ad un elevato costo di campionamento; la fase legata alla preparazione del campione presenta difficoltà legate ad una non omogenea granulometria del campione da destinare alla analisi, e alle dimensioni delle parti granulari; per quanto riguarda l'analisi, le maggiori difficoltà sono da attribuirsi all'uso di metodi non validati, alle procedure per calcolare il fattore di recupero, all'esistenza di procedure operative standard e nell'ambito della assicurazione di qualità, all'uso di materiali di riferimento certificati o non.

SPETTROMETRIA DI MASSA TANDEM PER LA DETERMINAZIONE SIMULTANEA DI TRICOTECENI, FUMONISINE E ZERANOLI NEL MAIS

Angelo Faberi, Giovanna Fago, Patrizia Foglia, Elisabetta Pastorini, Roberto Samperi e Aldo Laganà

Dipartimento di Chimica, Università "La Sapienza", Roma

Le micotossine sono prodotti del metabolismo di funghi parassiti, che infestano le colture cerealicole in particolari condizioni ambientali. Il *Fusarium* è una specie fungina che si sviluppa prevalentemente nelle zone a clima temperato, producendo micotossine di differente struttura chimica, come Tricoteceni A e B, zeranoli e fumonisine.

Il nostro gruppo di ricerca ha messo a punto un metodo analitico multiresiduale, sensibile e affidabile, basato sulla cromatografia liquida/spettrometria di massa tandem con ionizzazione elettrospray (LC-ESI-MS/MS) per la determinazione simultanea delle più importanti fusariotossine: Tricoteceni A e B, fumonisine e zeranoli.

Poiché gli analiti in studio mostrano un diverso comportamento mass-spettrometrico e cromatografico, tutti i parametri che influenzano l'analisi LC-MS/MS (scelta dello ione precursore, colonna cromatografica, natura e composizione della fase mobile, gradiente di eluizione etc.) sono stati valutati singolarmente sia in termini di efficienza di ionizzazione che di risoluzione dei picchi. In particolare è stato cercato un compromesso tra la necessità di operare in entrambe le polarità di ionizzazione e quella di utilizzare una fase mobile acida contenente ioni ammonio. Infatti le fumonisine sono eluite con picchi stretti e simmetrici solo in fase mobile acida, condizione in cui, tuttavia, la risposta dei Tricoteceni B e zeranoli è meno intensa. Inoltre i Tricoteceni A possono essere rivelati solo in positivo come addotti dello ione ammonio. Le migliori condizioni consistono nella separazione lungo una colonna C18 mediante gradiente di fase mobile H₂O/MeOH contenente tampone acido formico/formiato d'ammonio a pH4, T = 45 °C. Le fumonisine e i Tricoteceni sono acquisiti in positivo, tranne NIV e DON, che analogamente agli zeranoli sono acquisiti in negativo e per tutti è stata impiegata la modalità multiple reaction monitoring (2 transizioni per composto). La preparazione del campione consiste nell'estrazione degli analiti dal mais mediante omogeneizzazione di 1 g di campione, utilizzando acetonitrile/acqua come solvente, e nella purificazione dell'estratto mediante estrazione in fase solida (SPE). Per l'ottimizzazione del clean-up è stato valutato il comportamento in termini di recupero ed effetto matrice di due sistemi adsorbenti (OASIS HLB e Carbograph-4) entrambi in grado di "estrarre" composti in un ampio range di polarità. Processando un'aliquota di estratto mediante Carbograph-4 si è osservato il minor effetto matrice sulla soppressione del segnale e sono stati ottenuti i migliori risultati in termini di recupero (83-104%) e limiti di rivelabilità (pochi ng/g per tutti i composti ad eccezione di NIV e DON). È stato possibile raggiungere una buona accuratezza e precisione effettuando la calibrazione in seguito all'aggiunta degli analiti all'estratto di mais non contaminato (range di linearità = 10³).

DETERMINAZIONE DELLA TOSSINA T-2 IN CEREALI MEDIANTE HPLC CON RIVELATORE A FLUORESCENZA E DERIVATIZZAZIONE PRE-COLONNA CON 1-ANTROILNITRILE

Michelangelo Pascale, Miriam Haidukowski, Angelo Visconti
Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, CNR, Bari

I Tricoteceni sono un gruppo di micotossine prodotte principalmente da diverse specie di *Fusarium* che in condizioni ambientali favorevoli possono colonizzare in campo vari cereali, in particolare frumento e mais. Tra tutti i Tricoteceni conosciuti, la Tossina T-2 è quello con effetti tossici più acuti. È stato dimostrato che la Tossina T-2 è un potente inibitore della sintesi delle proteine, della sintesi del DNA e RNA sia *in vitro* che *in vivo*, ha effetti ematotossici, immunosoppressivi e dermatossici. L'ingestione umana di alimenti contaminati con Tricoteceni è stata associata a casi di Leucopenia Tossico-Alimentare (ATA) nell'ex-Unione Sovietica negli anni 1942-1947. A causa della carestia che persisteva in quel periodo, la popolazione era costretta a mangiare cereali, risultati poi contaminati con funghi del genere *Fusarium* (in particolare *F. sporotrichioides*, noto produttore di Tossina T-2), che provocarono casi di leucopenia, rash cutanei, emorragia, febbre ed episodi di mortalità nell'epidemia del 1944. Metodi sensibili e accurati per la determinazione della Tossina T-2 in diverse matrici agro-alimentari sono altamente desiderabili allo scopo di proteggere la salute dei consumatori dai rischi connessi alla loro esposizione. I metodi analitici più utilizzati sono quelli gas-cromatografici (GC), tuttavia, recentemente uno studio interlaboratorio ha messo in evidenza che i metodi GC hanno recuperi troppo alti (>110%), scarsa precisione, tempi lunghi di analisi, non linearità delle curve di calibrazione, effetto memoria e soprattutto interferenze dovute alla matrice che portano ad una sovrastima della tossina nel campione analizzato.

Presso l'ISPA, è stato messo a punto un nuovo metodo di analisi per la determinazione della Tossina T-2 in frumento, mais, orzo, avena, riso e sorgo. I campioni di cereali sono estratti con metanolo-acqua e gli estratti purificati con colonne ad immunoaffinità contenenti anticorpi specifici per la Tossina T-2. La tossina è quantificata mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) con rivelatore a fluorescenza, previa derivatizzazione con 1-antroilnitrile. I recuperi del metodo, applicato ai vari cereali contaminati con Tossina T-2 a livelli da 0,05 µg/g a 1,5 µg/g, sono risultati superiori all'80% con deviazioni standard relative minori del 6%. Il limite di rivelabilità del metodo è di 0,005 µg/g.

SAGGI IMMUNOENZIMATICI: QUALE RUOLO NEL CONTROLLO DELLE MICOTOSSINE?

Maurizio Paleologo
Tecna srl, Area Science Park, Padriciano, Trieste

Durante gli ultimi 15 anni sono stati sviluppati nel mondo centinaia di immunosaggi per la rivelazione di micotossine. Decine di questi saggi sono stati poi trasformati in prodotti industriali da aziende operanti nella diagnostica *in vitro*. Sono quindi disponibili sul mercato decine di kit analitici di tipo ELISA. Grazie alla convenienza economica e alla praticità tali kit sono largamente utilizzati dall'industria per l'autocontrollo, in particolare nel settore mangimistico e lattiero caseario. In alcuni casi gli stessi laboratori di controllo pubblico, data la numerosità dei campioni, hanno deciso di adottare i kit ELISA come metodo di screening.

Si esamina lo spettro dei formati disponibili (card test, lateral flow, saggi in provetta, saggi in micropiastra). Si presentano i limiti di rivelazione dei kit attualmente disponibili, adatti a permettere la sorveglianza delle contaminazioni ai limiti di legge. Si analizzano i costi evidenti e nascosti, i pregi e i difetti, anche in confronto con le alternative (es. immuno-affinità-fluorimetria). A volte l'utilizzatore lamenta esiti molto diversi rispetto a contro-analisi eseguite con metodo cromatografico (HPLC). Si analizzano le cause: mancato addestramento degli operatori, applicazione improprie del kit, confronto degli esiti di una prova eseguita con kit ELISA con una prova effettuata in cromatografia. Questo tipo di confronti porta a giudizi superficiali sulla validità del metodo. I risultati degli studi collaborativi per la validazione di alcuni metodi ufficiali HPLC e i risultati dei proficiency test mostrano come per la B1 o l'M1 le riproducibilità possano sconcertare i non addetti ai lavori. Gli ottimi risultati ottenibili dai kit ELISA nei casi in cui la calibrazione può avvenire in matrice oppure la procedura di preparazione del campione prevede un clean-up confermano che il saggio immunoenzimatico può essere accurato e riproducibile. D'altra parte, esistono differenze rilevanti tra i valori ELISA e HPLC, in alcune matrici, nel dosaggio di fumonisine e DON. Si sottolinea la carenza di materiali di riferimento che soli potranno permettere validazioni efficaci anche dei metodi di screening.

Il giudizio e quindi il ruolo dei kit ELISA non può che essere molto articolato. L'impiego di tali kit è certamente conveniente per il controllo delle materie prime nell'industria, anche grazie a saggi qualitativi rapidi; il livello di accuratezza e quindi di affidabilità dei saggi ELISA quantitativi da laboratorio è molto dipendente dalla matrice e dall'analita indagati.

OLIO VERGINE DI OLIVA: UNA MATRICE A RISCHIO

Rosalia Ferracane (a), Alessio Tafuri (a), Antonio Logrieco (b), Dolores Balzano (a), Alberto Ritieni (a)

(a) *Dipartimento di Scienza degli Alimenti, Università di Napoli Federico II, Napoli*

(b) *Istituto Scienze delle Produzioni Alimentari CNR, Bari*

La dieta mediterranea, oggi, è considerata giustamente uno dei rimedi naturali a numerose patologie di tipo croniche e da accumulo e l'olio di oliva è uno dei suoi componenti più importanti e come tale riconosciuto nella "piramide degli alimenti".

L'olio di oliva è perciò stato oggetto di molti studi soprattutto incentrati sulla valutazione delle caratteristiche chimico-fisiche, organolettico-sensoriali e nutrizionali. Numerosi sono i lavori che investigano l'olio per le sue qualità antiossidanti, il contenuto in vitamina E, polifenoli etc e ancora più numerosi sono gli studi sulla sua composizione in acidi grassi.

Solo recentemente si ritrovano in letteratura studi sull'olio di oliva anche dal punto di vista della sicurezza alimentare e dei possibili rischi correlati ad un consumo di oli di scadente qualità o ancora peggio che veicolano sostanze indesiderate e nocive per l'uomo.

Uno dei fattori che può compromettere la sicurezza dell'olio di oliva è la presenza di micotossine prodotte da funghi che, in condizioni favorevoli, possono svilupparsi sulla drupa (*Penicillium expansum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*). Lo scopo di questo lavoro è pertanto la messa a punto di un metodo di estrazione dell'Ocratossina A e dell'Aflatossina B1, semplice, efficiente e rapido che consenta l'estrazione di entrambi gli analiti contemporaneamente. In secondo luogo si è validato tale metodo su campioni d'olio sfuso ed etichettato provenienti da coltivazioni convenzionali oppure biologiche e da diverse aree del bacino del Mediterraneo. La determinazione qualitativa e quantitativa delle due micotossine è stata condotta con metodiche estrattive e cromatografiche convenzionali e la conferma strutturale mediante l'applicazione della spettrometria di massa tandem. L'analisi delle micotossine, infine, è stata affiancata dalla valutazione dei parametri che, secondo la normativa, consentono la classificazione dei vari tipi di olio, in modo da avere un quadro più chiaro e completo della "salute" dei campioni d'olio analizzati. I primi dati raccolti su 30 campioni hanno dimostrato la presenza di micotossine, nel 74% dei campioni che si sono dimostrati positivi per l'Ocratossina nell'intervallo da 0,13 a 17 ppb mentre il 10% dei campioni risultava positivo alla ricerca per Aflatossina B1 nell'intervallo 0,55-2,45 ppb. Infine il 10% dei campioni era co-contaminato da Aflatossina B1 e Ocratossina A e di questi il 66% di origine nord Africana. Questa serie di dati pone all'attenzione sia degli operatori primari che dei trasformatori il possibile rischio di veicolazione di micotossine da parte di una matrice alimentare così importante come l'olio di oliva.

CONFRONTO DI METODOLOGIE ANALITICHE UTILIZZATE NEL DOSAGGIO DELL'AFLATOSSINA M1 NEL LATTE

Carlo Nachtmann, Monica Gramaglia, Giuseppina Marellò, Marina Rastelli, Gian Luca Ferro

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino

La necessità di eseguire un elevato numero di accertamenti analitici in un limitato arco di tempo ha sviluppato la predisposizione dei metodi di screening, particolarmente utilizzati nella esecuzione di piani di controllo ad ampio respiro (Piano Nazionale Residui) e nell'arginare situazioni di emergenza sanitaria, quale quella intercorsa a far data dal novembre 2003 per quanto attiene l'Aflatossina M1 nel latte e le Aflatossine del gruppo B/G nei prodotti ad uso zootecnico utilizzati nella dieta delle lattifere. Considerata la connotazione della metodologia ELISA utilizzata per il dosaggio dell'Aflatossina M1 nel latte vaccino (metodo di terzo livello), l'influenza di variabili esterne (interferenti) che possono incidere sull'esattezza del dato quantitativo e le implicazioni economiche e giuridiche correlate al superamento dei limiti massimi ammessi per questa tossina (Circolare 9 giugno 1999, n. 10 – *Gazzetta Ufficiale* n. 135 del 11 giugno 1999), si impone l'accostamento al metodo di screening di un metodo di conferma analitica (metodo di secondo livello o di primo livello) idoneo alla verifica dei dati dubbi o positivi emergenti dal test ELISA ovvero della percentuale di falsa negatività ad esso correlata.

L'emergenza aflatossine comparsa al nord Italia nell'autunno 2003 e concretizzatasi nei prodotti lattiero-caseari a far data dal novembre dello stesso anno, ha reso inevitabile tanto l'utilizzo del test ELISA per fronteggiare il pressante afflusso dei campioni quanto la predisposizione di un metodo di conferma, preciso e riproducibile.

La presente nota vuole mettere a confronto le prestazioni del metodo di primo livello (ELISA) e del metodo di conferma cromatografica con rivelazione fluorimetrica (IAC-HPLC/FLD) utilizzati presso il laboratorio Centro Latte e il laboratorio Ricerca Residui dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta. Viene inoltre proposta una correlazione sui risultati quantitativi forniti dai due metodi.

SVILUPPO DI NUOVI APPROCCI PER LA DETERMINAZIONE DI MICOTOSSINE

Cinzia Tozzi, Laura Anfossi, Claudio Baggiani, Cristina Giovannoli, Gianfranco Giraudi
*Laboratorio di Bioanalitica, Dipartimento di Chimica Analitica, Università degli Studi di
Torino, Torino*

Il termine micotossine identifica un gruppo di sostanze tossiche per l'uomo prodotte da muffe e funghi che si sviluppano in molte varietà di alimenti (cereali, mais, frutta secca, caffè e spezie). Questo tipo di composti sono molto stabili chimicamente e inoltre sono resistenti alle lavorazioni cui sono sottoposti i cibi normalmente. Con queste premesse assumono grande importanza i controlli per l'identificazione e la quantificazione di queste tossine durante tutta la filiera agro-alimentare. Esistono numerosi metodi per l'analisi della concentrazione delle diverse micotossine, essi devono essere sensibili e riproducibili poiché le concentrazioni a cui le tossine sono nocive sono molto basse. I kit immunoenzimatici sono tra le tecniche più utilizzate per la quantificazione delle micotossine, offrendo una sensibilità analitica elevata, possibilità di preparare anticorpi specifici per un composto o per una classe di composti, possibilità di rilevare sostanze fortemente legate alla matrice. Per molecole di piccole dimensioni, quali le micotossine, si applicano solitamente saggi immunochimici di tipo competitivo ma le sensibilità non sono sempre soddisfacenti per questa classe di composti. Inoltre bisogna anche tenere presente che le matrici in cui si trovano gli analiti sono piuttosto complesse, e spesso può essere necessaria una fase di clean-up o di pre-concentrazione della tossina. Anche in questo caso ci sono in commercio numerose colonne di immunoaffinità che permettono il loro allontanamento dalla matrice e contemporaneamente la loro pre-concentrazione semplificando l'analisi successiva. La preparazione di queste colonne comporta però un elevato consumo di anticorpo, non sempre disponibile a costi contenuti.

Negli ultimi anni nel nostro laboratorio sono stati sviluppati due approcci diversi per intervenire sui punti critici sopra indicati: ovvero è stato sviluppato un saggio per piccole molecole con un formato non competitivo che prevede un approccio di tipo immunocromatografico al fine di aumentare la sensibilità dell'analisi di 1-2 ordini di grandezza e contemporaneamente la preparazione di leganti sintetici che mimano il comportamento degli anticorpi e possiedono proprietà di riconoscimento molecolare tali da poter essere impiegati nelle fasi di clean-up con costi molto ridotti rispetto ai leganti biologici classici e con notevoli possibilità di riutilizzo delle colonne.

In questo lavoro sono presentati entrambi gli approcci applicati alla determinazione e pre-concentrazione di aflatossine e Ocratossina A.

Sessione poster
Gestione del rischio

USO DI UN MODELLO GASTROINTESTINALE PER STUDI DI DETOSSIFICAZIONE DELLE MICOTOSSINE CON MATERIALI ADSORBENTI

Giuseppina Avanti (a), Robert Havenaar (b), Angelo Visconti (a)
(a) Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, CNR, Bari; (b) TNO Nutrition and Food
Research, Zeist, Paesi Bassi

L'aggiunta di adsorbenti a mangimi contaminati da micotossine rappresenta il metodo più innovativo ed efficace per ridurre i rischi di micotossicosi e per evitare, a causa del fenomeno del carry over, il trasferimento di tossine in prodotti di origine animale.

Viene descritto un metodo alternativo alla sperimentazione con animali per verificare la capacità di materiali adsorbenti a ridurre l'assorbimento intestinale delle micotossine. Il metodo consiste nell'uso di un modello di laboratorio dinamico, computerizzato, validato mediante esperimenti *in vivo* e capace di riprodurre condizioni fisiologiche (normali o patologiche) dell'apparato gastrointestinale di animali mono- o poligastrici. In particolare, un modello gastrointestinale in grado di simulare lo stomaco e il piccolo intestino di suino è stato usato, per la prima volta, per misurare l'assorbimento intestinale di micotossine di *Fusarium* (Zearalenone, deossinivalenolo e nivalenolo) e per valutare la capacità di alcuni materiali adsorbenti (carbone attivo e colestiramina) di ridurre la biodisponibilità. Gli esperimenti di "alimentazione" del modello gastrointestinale sono stati eseguiti con campioni di frumento contenenti 4 mg/kg di Zearalenone (ZEA) o 2,8 mg/kg di deossinivalenolo (DON) e 3,8 mg/kg di nivalenolo (NIV), con o senza l'aggiunta di carbone attivo o colestiramina a diverso livello di inclusione. Dopo 6 ore di digestione e in assenza di adsorbenti (esperimenti di controllo), l'assorbimento intestinale delle tossine riferito alla quantità assunta con la dieta è risultato essere del 32% per lo ZEA, del 51% per il DON e del 21% per il NIV. La maggior parte dell'assorbimento delle tre tossine ha avuto luogo a livello del digiuno. Questi dati sull'assorbimento intestinale di ZEA, DON e NIV, ottenuti con un modello di laboratorio, sono simili a quelli ottenuti *in vivo* mediante esperimenti con suini. L'aggiunta alla dieta di concentrazioni diverse di colestiramina o carbone attivo (0,25-2%) ha prodotto una riduzione significativa dell'assorbimento delle tossine. In particolare, il carbone attivo riduceva del 29-45% l'assorbimento del DON, del 23-41% quello del NIV e del 43-84% quello dello ZEA, mentre la colestiramina riduceva del 19-52% l'assorbimento dello ZEA. In conclusione, questi studi mostrano che modelli gastrointestinali, dinamici e validati, possono essere usati con successo per determinare l'assorbimento intestinale delle micotossine assunte con la dieta e per valutarne il reale rischio. Questi modelli rappresentano, inoltre, un sistema rapido e fisiologicamente efficace per condurre studi detossificazione e per selezionare materiali adsorbenti capaci di ridurre la biodisponibilità delle micotossine.

Lavoro eseguito nell'ambito del Progetto Europeo del Quinto Programma Quadro "QLK1-CT-1999-996: Hazard analysis control of food contamination: prevention of Fusarium toxins entering the human and animal food chain".

EFFETTO DEL TRATTAMENTO CONTRO OSTRINIA NUBILALIS SULLA PRESENZA DI FUNGHI TOSSIGENI NELLE CARIOSSIDI DI MAIS

Gloria Innocenti (a), Viviana Babini (b), Roberta Piccaglia (b)

(a) *Dipartimento di Protezione Valorizzazione Agro-alimentare, Università di Bologna, Bologna*; (b) *Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-ambientali, Università di Bologna, Bologna*

Il mais è facilmente attaccabile da funghi il cui metabolismo secondario produce sostanze tossiche per l'uomo e gli animali: le micotossine. Tra i funghi che rivestono una particolare importanza micotossicologica per la loro diffusione ed elevata tossicità vi sono i generi *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*. Gli insetti, possono favorire la diffusione di questi funghi nei tessuti vegetali mediante le ferite determinate dall'attività trofica, pertanto il trattamento insetticida potrebbe avere un potenziale effetto di contenimento nei confronti di tali funghi. Per studiare l'effetto del trattamento contro *Ostrinia nubilalis* sulla presenza dei funghi micotossigeni, in due aziende sperimentali ubicate a Cadriano e Ozzano (BO) nell'anno 2003, piante di mais ibrido PR34N43 Pioneer sono state trattate con λ -cicalotrina (Karate, Syngenta) (20 g h⁻¹). La determinazione della componente fungina nello sfarinato ottenuto dalle cariossidi è stata eseguita mediante la tecnica delle diluizioni seriali e la semina su substrati agarizzati (PDA, CZA, AFPA) che ha permesso di ottenere il numero di unità formanti colonia/g di sfarinato (UFC). I funghi appartenenti al genere *Aspergillus*, in particolare *A. flavus* e *A. parasiticus* sono risultati nettamente prevalenti rispetto ai Fusaria, in particolare *F. moniliforme*; mentre assai sporadica è stata la presenza di *Penicillium*. La popolazione di *A. flavus* e *A. parasiticus* è risultata nettamente più alta nello sfarinato ottenuto dalle cariossidi provenienti da Ozzano rispetto a quella rilevata nello sfarinato ottenuto dalla granella proveniente da Cadriano. Il trattamento contro la piralide ha significativamente ($P \leq 0,01$) ridotto il numero delle UFC di entrambe le specie di *Aspergillus* a Ozzano, mentre a Cadriano non sono state rilevate differenze significative fra il campione trattato e quello non trattato. In entrambe le località il trattamento non ha evidenziato alcun effetto sulla popolazione di *Fusarium*. Dal confronto statistico dei dati relativi alle due aziende, è emerso che la popolazione di *A. flavus* e *A. parasiticus* era significativamente influenzata ($P \leq 0,01$) sia dal fattore trattamento, sia dal fattore ambiente.

RUOLO DELLE FASI FENOLOGICHE SULLA SINTESI DI MICOTOSSINE NEL MAIS

Paola Battilani (a), Vittorio Rossi (a), Andrea Scandolara (a), Paola Giorni (a), Terenzio Bertuzzi (b), Silvia Formenti (a), Amedeo Pietri (b)

(a) Istituto di Entomologia e Patologia Vegetale, Facoltà di Agraria, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza; (b) Istituto di Scienze degli Alimenti e della Nutrizione, Facoltà di Agraria, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza

La presenza di fumonisine nella granella di mais è un problema rilevante in tutte le zone maidicole italiane. I fattori che regolano la sintesi di queste micotossine sono stati studiati utilizzando farina o cariossidi mature, in particolare per quanto concerne la temperatura e la disponibilità di acqua libera. È però noto che la sintesi di fumonisine inizia in planta, durante la maturazione delle cariossidi. Di norma, queste tossine vengono rilevate a partire da 30 giorni dopo l'impollinazione, quindi dalla maturazione cerosa, mentre nelle fasi precedenti esse risultano assenti o presenti al di sotto dei limiti di determinazione. Le infezioni fungine, con particolare riferimento a *Fusarium verticillioides*, possono al contrario instaurarsi a partire dalla emissione delle setole, pur trovando condizioni ottimali con il loro invecchiamento. Una delle possibili spiegazioni per l'assenza di fumonisine nelle prime fasi di sviluppo della spiga, pur in presenza di infezioni fungine, è legata alla composizione chimica delle cariossidi. Al fine di indagare questo aspetto, sono state eseguite prove *in vitro* utilizzando terreni colturali a base di farina ottenuta dalla macinazione delle spighe raccolte in diverse fasi fenologiche, dall'emissione delle setole fino alla maturazione fisiologica del mais. Le prove sono state condotte per studiare *F. verticillioides* e la relativa produzione di fumonisine, come pure *Aspergillus flavus* e aflatossine.

Isolati micotossigeni dei due funghi sono stati inoculati sui vari substrati di crescita e incubati a 30 °C per 14 giorni. Al termine di tale periodo è stata misurata la crescita fungina e, mediante HPLC, la presenza di fumonisine e aflatossine. Inoltre, in corrispondenza della maturazione fisiologica, è stato valutato il ruolo della temperatura nell'intervallo 5-40 °C.

I risultati hanno evidenziato che la fase fenologica dell'ospite non svolge alcun ruolo sullo sviluppo miceliare dei due funghi, ma ha un effetto significativo sulla sintesi delle micotossine. In particolare, *F. verticillioides* non ha prodotto fumonisine sui terreni ottenuti da spighe fino ad inizio maturazione lattea, ha avuto un picco di produzione ad inizio maturazione cerosa, e ha quindi mostrato una tendenza decrescente con il procedere della maturazione. *A. flavus* ha avuto un picco di produzione di aflatossine sul substrato costituito con le cariossidi a fine della maturazione lattea e valori molto più contenuti sia nelle fasi precedenti che in quelle successive. A maturazione fisiologica, le fumonisine sono state sintetizzate solo tra 20 e 30 °C, mentre le aflatossine sono state prodotte a tutte le temperature, con un optimum a 25 °C.

SCREENING DI GENOTIPI DI MAIS PER LA RESISTENZA A *FUSARIUM VERTICILLIOIDES*

Carlotta Balconi, Chiara Lanza, Elena Conti, Luca Gualdi, Vincenza Pisacane,
Paolo Valoti, Nicola Berardo, Mario Motto, Elisabetta Lupotto
Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura, Bergamo

La disponibilità di metodi affidabili di screening e di valutazione di genotipi di mais all'attacco di *Fusarium* rappresenta un supporto di grande valore in programmi di miglioramento per resistenza all'attacco di patogeni fungini. Numerose specie di *Fusarium* sono patogeni diffusi tra i cereali. *F. verticillioides* attacca il mais causando marciume della radice, del fusto e della spiga; inoltre, è in grado di produrre micotossine (fumonisine) nelle piante infette prima della raccolta, o nella granella conservata. La presenza di micotossine nei semi dei cereali rappresenta una grande preoccupazione in tutto il mondo, dato che la loro presenza nei foraggi e nei cibi è spesso associata a micotossicosi croniche o acute nel bestiame e anche negli uomini. In questo contesto, risulta importante lo sviluppo di genotipi di mais con maggior resistenza a *F. verticillioides*, tramite breeding tradizionale e metodologie biotecnologiche. Lo scopo della nostra ricerca consiste nel mettere a punto un metodo di screening affidabile per valutare la resistenza di genotipi di mais all'attacco di tale patogeno fungino. A questo scopo, le due linee di riferimento W64A e A69Y, in versione normale (wild-type, wt) e in versione mutante opaco-2 (o2), in aggiunta alle sei linee inbred di mais rilasciate dall'Istituto per la Cerealicoltura, Sezione di Bergamo (Lo904, Lo1010, Lo1096, Lo1067, Lo1095, Lo1124) sono state utilizzate come materiale sperimentale. Tutte le linee di mais sono state saggiate in esperimenti di campo tramite metodo SCIA (*Silk Channel Inoculation Assay*, saggio di inoculo nel canale delle setole) su piante adulte. *F. verticillioides* è stato utilizzato per la produzione di un inoculo fresco di spore; le piante sono state impollinate manualmente e a due diversi stadi di sviluppo del seme, 3 e 6 giorni dopo l'impollinazione (*Days After Pollination*, DAP), sono state inoculate due diverse concentrazioni di spore tramite il metodo SCIA; controlli sono stati rappresentati da piante non inoculate e da piante inoculate con acqua sterile. L'inoculo è stato effettuato mediante iniezione nel canale delle setole di ciascuna spiga primaria. La severità dei sintomi di marciume della spiga è stata valutata assegnando un punteggio (*Disease Severity Rating*, DSR), in riferimento ad una scala visiva di valutazione, basata sulla percentuale di semi con sintomi visibili dell'infezione. In aggiunta, è stato valutato il contenuto delle principali tossine associate a *F. verticillioides* (fumonisine). Lo stadio di sviluppo del seme al momento dell'inoculo, è risultato essere un importante parametro tecnico; in tutti i genotipi sotto studio, l'inoculo è risultato più efficace se effettuato a 3DAP. A questo stadio le setole appaiono allungate e verdi. I punteggi di intensità di attacco (DSR) sono risultati più bassi per spighe degli stessi genotipi, ma inoculate a 6DAP: questo ultimo stadio può corrispondere ad un invecchiamento delle setole, un cambiamento fisiologico che apparentemente può alterare la suscettibilità delle setole all'attacco di organismi che causano il marciume della spiga. La versione mutante o2, sia per la linea W64A che per A69Y, è risultata più suscettibile all'attacco di *F. verticillioides*, rispetto alla corrispondente versione wt, ad entrambe le concentrazioni di spore utilizzate per l'inoculo.

La concentrazione di spore più bassa, utilizzata per l'inoculo a 3DAP, ha consentito di evidenziare la massima differenziazione tra le sei linee inbred Lo, spaziando dal più resistente Lo904, al più suscettibile Lo1124. In aggiunta ad Lo904, anche Lo1010 e Lo1096 sono risultati più resistenti rispetto a Lo1124, Lo1067 e Lo1095. I controlli, non hanno mostrato alcun segno di infezione. I punteggi assegnati alle singole spighe utilizzando la scala visiva di valutazione, descritta in precedenza, hanno consentito di poter discriminare in modo distinguibile i sei genotipi Lo valutati per la resistenza a *Fusarium*. Attualmente è in corso una valutazione del contenuto di fumonisine, alla luce del punteggio di intensità di attacco assegnato alla spiga, in base alla percentuale di semi con sintomi visibili dell'infezione. Una delle considerazioni più importanti della nostra ricerca, consiste nell'aver individuato il metodo più efficiente e riproducibile di inoculo della pianta, dimostrandone l'efficacia nell'evidenziare differenze nella risposta dei diversi genotipi all'attacco di patogeni fungini.

CONTENUTO DI FUMONISINE IN MAIS DA MONITORAGGIO AMBIENTALE E DA PROVE AGRONOMICHE (2002-2003)

Nicola Berardo (a), Vincenza Pisacane (a), Tommaso Maggiore (b), Mario Baldini (c), GianPaolo Vannozzi (c), Sergio Miele (d), Estilio Salera (d)

(a) Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura, Bergamo

(b) DIPROVE, Università di Milano, Milano

(c) DPVTA, Università di Udine

(d) Dipartimento di Agronomia e Gestione Agroecosistema, Università di Pisa, Pisa

La coltura del mais ha un ruolo essenziale a sostegno delle produzioni zootecniche per le sue capacità produttive e di adattamento pedoclimatico, ma risulta anche preziosa perché assicura la materia prima da impiegare per una molteplicità di prodotti alimentari e industriali. Significative quantità di granella di mais vengono, infatti, lavorate dalle industrie di trasformazione. Anche se a tutt'oggi il mais prodotto per i diversi usi non ha ancora ricevuto un riconoscimento per la qualità, è tuttavia auspicabile che in un futuro prossimo questo possa avvenire, producendo un maggior reddito per gli agricoltori che producono materiali di qualità. Le differenze qualitative nel mais da granella sono riconducibili a due categorie: 1) differenze di struttura e composizione naturali o ereditabili; 2) differenze dovute a danni fisici o biologici. Le prime possono essere variate con il miglioramento genetico. Le seconde sono dovute spesso a negligenze nella conservazione del materiale prodotto o a danni ambientali non facilmente controllabili. Nell'ambito del progetto "Sviluppo di un sistema produttivo integrato per migliorare la qualità della produzione agricola e in particolare, ridurre il rischio di contaminazione da micotossine nelle derrate alimentari", cofinanziato dal MIUR e dal MIPA è stata avviata una ricerca che ha previsto negli anni 2002 e 2003 le seguenti attività:

- 1) Valutazione in più ambienti dell'Italia centro-nord e raccolta a due diverse epoche di maturità di otto ibridi di mais commerciali a diversa maturità FAO;
- 2) Monitoraggio ambientale di materiali da diversi areali di attenzione.

Su tutti i campioni di granella di mais raccolti è stato misurato, mediante test ELISA, il livello di infezione da *Fusarium verticillioides* espresso come contenuto in una delle sue tossine più rappresentative, la fumonisina FB1.

OCRATOSSINA IN VINI E ACETI

Paolo Branca, Sara Coluccia, Francesca Alesso, Marisa Bodda, Sara Ciacciarelli, Marisa Garnero, Francesco Ricci, Luca Mammoliti
Polo Regionale Alimenti, ARPA Piemonte

L'Ocratossina A (OTA) è una micotossina biosintetizzata da funghi del genere *Aspergillus* e *Penicillium* la cui presenza è analizzata e quantificata in diverse matrici alimentari, in particolare su cereali e derivati, quali la birra.

Recentemente la contaminazione è stata riscontrata anche in vino e succo d'uva e sono stati promossi diversi studi di screening che permettano di stabilire i valori critici di controllo e i tenori massimi ammissibili per poter programmare dei sistemi di monitoraggio ed eventualmente suggerire azioni di prevenzione e correzione.

Nel nostro laboratorio abbiamo messo a punto un metodo per la ricerca dell'Ocratossina A per la birra, per i vini e, con qualche modifica, per gli aceti e dal 2002 si esegue di routine questo tipo di determinazione analitica.

La procedura operativa prevede una fase di estrazione dell'analita, la purificazione con colonnine di immunoaffinità VICAM e successiva analisi in HPLC con annesso rivelatore fluorimetrico. Nel caso degli aceti è necessario controllare e correggere il valore del pH dopo l'aggiunta del tampone fosfato che precede il caricamento in colonnina.

Il metodo è stato validato e i valori di CV% e recupero sui livelli analizzati sono conformi alle direttive prescritte dal DM 31/5/2003 "Recepimento dir. CEE 2002/26/CEE 31/3/2002 campionamento e metodi analisi OTA in cereali e frutta secca"; inoltre la procedura è risultata particolarmente sensibile: nelle condizioni sperimentali proposte si raggiunge un limite di determinazione di 0,04 µg/kg.

Ad oggi sono stati analizzati 47 campioni di vino di provenienza nazionale di cui 7 si sono rivelati positivi con concentrazioni comprese fra 0,18 e 1,22 µg/kg e 13 campioni di aceto di cui uno solo positivo con concentrazione di 0,28 µg/kg.

In caso di positività, vista l'assenza di legislazione in merito, si è fatto riferimento al Reg. CEE/UE n. 472 del 12/03/2002 che indica genericamente il limite giornaliero ammissibile in 5 ng/kg peso corporeo/giorno; è però difficile stabilire l'entità di un consumo medio per un adulto, e in molti casi la tossina assunta tramite il vino potrebbe da sola superare la dose raccomandata; in questo contesto è auspicabile una regolamentazione che preveda dei limiti dell'Ocratossina A oltre che sui cereali e sulla birra anche su vino e aceti.

VALUTAZIONE DI ALCUNI PARAMETRI CORRELATI ALLO SVILUPPO DELLA MICOTOSSINA

Clarita Cavallucci, Clotilde Villeri, Luciano Terni, Mare Battistelli,
Francesca Della Monica, Elena Fioriti, Mauro Migni
Centro Studi e Formazione, Petrini 1822 SpA, Bastia Umbra (PG)

La presenza di micotossine negli alimenti è spesso legata ad inadeguate condizioni di raccolta e di stoccaggio delle derrate alimentari, ma può anche essere dovuta ad attacchi di ceppi fitopatogeni e tossigeni alle colture in campo che rappresentano un grave pregiudizio per la successiva conservazione e trasformazione del prodotto. Molti funghi tossigeni sono ubiquitari e possono svilupparsi in diverse condizioni ambientali. L'accrescimento delle muffe e la produzione di micotossine sono in relazione a molteplici fattori di natura fisica, chimica e biologica, e i prodotti vegetali sono soggetti a contaminazioni durante tutto il loro ciclo produttivo: dalla coltura in campo, alla raccolta, all'essiccazione e stoccaggio sino al trasporto in mangimificio, insilaggio e infine anche nella mangiatoia. Le contaminazioni di campo hanno un peso considerevole sulla sanità finale dei prodotti alimentari e tutti sono suscettibili di contaminazioni micotossiche, ma vi sono alcuni alimenti che sono più di altri soggetti a contenerne. Vi sono inoltre aree geografiche più soggette di altre ai rischi di contaminazioni micotossiche, pertanto un parametro da considerare è anche l'area di produzione, nonché le pratiche colturali e agronomiche utilizzate; per le aflatossine, le aree geografiche a rischio più elevato sono quelle con condizioni meteorologiche di caldo-umido. Le micotossine possono restare nelle derrate alimentari per molto tempo dopo la morte del fungo produttore ed essere in seguito ritrovate negli alimenti e nei mangimi ottenuti con materie prime contaminate.

Lo scopo della attività di ricerca è stato quello di valutare la presenza della Aflatossina B1 in differenti campioni di alimento, di diversa provenienza geografica e di diverso metodo di lavorazione. È stato evidenziato che nessun campione di cereale analizzato dai silos è risultato esente da contaminazione, anche se di entità tale da consentire di rientrare nei parametri di controllo qualità applicati dalla azienda. Il processo di macinazione è risultato avere una influenza negativa sulla carica micotossica. I risultati sin qui ritrovati saranno oggetto di studi e verifiche al fine di controllare un'importante fase del processo produttivo e poter consolidare e confermare la validità di tale ipotesi.

STUDIO DI SISTEMI DI DECONTAMINAZIONE DELL'ALIMENTO

Clarita Cavallucci, Clotilde Villeri, Luciano Terni, Mare Battistelli,
Francesca Della Monica, Elena Fioriti, Mauro Migni
Centro Studi e Formazione, Petrini1822 SpA, Bastia Umbra (PG)

La presenza di un'elevata carica microbica può incidere profondamente sia sulla qualità che sulla conservabilità degli alimenti destinati agli animali. Poiché la qualità microbiologica dei mangimi è correlata oltre che alla qualità della materia prima, anche alle condizioni e ai trattamenti in cui avviene la lavorazione del prodotto, si è voluto verificare se alcuni procedimenti di decontaminazione potessero modificare la carica micotossica del cereale in esame. Sono state effettuate prove di tipo meccanico e chimico al fine di determinarne l'efficacia nella entità della decontaminazione. Il prodotto che va facilmente incontro a contaminazione è il mais e dato che è un cereale ampiamente utilizzato per la produzione di alimenti per animali, va debitamente controllato. Infatti anche se è possibile contenere al minimo il livello finale delle contaminazioni micotossiche, la loro presenza nei mangimi non è completamente scongiurata. Pertanto per cercare di ottenere alimenti destinati agli animali che abbiano una qualità nutrizionale è necessario porre attenzione a numerosi aspetti, quali le condizioni igieniche della materia prima e del processo tecnologico, la gestione dei programmi di sanificazione e trattamento delle materie prime. Per garantire una qualità microbiologica occorre perciò effettuare dei controlli e attivare delle operazioni di decontaminazione che siano in grado di abbattere la carica micotossica della granella. L'obiettivo del presente lavoro è stato quello di sperimentare alcuni sistemi di decontaminazione cercando di valutarne l'efficacia. Dalle prove effettuate risulta che sia i metodi meccanici che quelli chimici sono metodi validi per l'abbattimento del contenuto di Aflatossina B1 nella granella di mais.

EFFETTO DEL TRATTAMENTO ANTIPIRALIDE SULLA PRESENZA DI TOSSINE IN GRANELLA DI MAIS

Franco Cinti (a), Silvia Grandi (a), Mirco Casagrandi (b)

(a) Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali, Università di Bologna, Bologna

(b) AgriOK SpA, Bologna

Le rosure e le gallerie scavate nelle spighe di mais dalla seconda generazione di piralide (*Ostrinia nubilalis* Hb.), rappresentano delle potenziali vie di accesso per attacchi fungini e perciò condizioni predisponenti per la presenza di aflatossine nella granella.

In otto aziende agricole (5 in provincia di Bologna e 1 rispettivamente in quelle di Modena, Ferrara e Mantova), su colture di mais condotte secondo il protocollo AgriOK (esclusione dove possibile del ristoppio, ibridi di ciclo medio, raccolte non troppo ritardate, ecc.; trattasi, in definitiva, di “buone norme agronomiche”), è stata verificata l’efficacia del trattamento con λ cialotrina (prodotto commerciale “Karate”), contro la seconda generazione della piralide, effettuando il trattamento intorno alla metà di luglio (in base al monitoraggio dell’insetto con trappole a feromoni e fenilacetaldeide) e impiegando 20 g/ha-1 di principio attivo per ettaro (diluiti in 300-350 litri di acqua). In tutte le aziende si è adottato uno schema a blocchi randomizzati con quattro ripetizioni e parcelle di 800-2000 m². In due sole aziende è stato misurato il livello di infestazione della piralide su 100 spighe di mais, mentre in tutte su un campione globale di 30 kg è stata determinata la contaminazione con aflatossine (B1-B2-G1- G2), Ocratossina A, fumonisine (B1 - B2), deossinivalenolo e Zearalenone.

Il trattamento con Karate ha ridotto di oltre il 60% il danno da piralide. La presenza di Aflatossina, in particolare della B1, è risultata rilevante soltanto in un’azienda (57 ppb), mentre la media generale è risultata di appena 11 ppb. Tenuto conto che il 2003 è stata un’annata di elevata contaminazione, questo andamento tenderebbe ad evidenziare l’importanza dell’applicazione di buone tecniche agronomiche per favorire la salubrità della granella. Il trattamento con Karate non ha evidenziato differenze statisticamente significative nel livello di contaminazione della granella con aflatossine.

La presenza di livelli significativi di Ocratossina A è stata rilevata in 3 aziende su 8. In tali realtà il trattamento con Karate ha determinato una nettissima riduzione della contaminazione della granella (da 28 a 2,3 ppb, pari ad un calo di oltre il 90%). Fumonisine, deossinivalenolo e Zearalenone sono risultati quasi assenti.

In definitiva il trattamento con Karate si è rivelato efficace per contenere l’infestazione della piralide con evidentissimi benefici al fine di contenere la presenza di Ocratossina A, mentre per quanto riguarda la contaminazione con aflatossine, visto il basso valore registrato nel testimone non trattato in 7 casi su 8, non si è in grado di fornire elementi sufficientemente probatori.

USMAF GENOVA: RICERCA DI MICOTOSSINE NELLE MERCI IN IMPORTAZIONE

Marina De Mattia, Anita Farre, Anna Camoriano, Antonello Campagna, Roberto Donnini, Aldo Lucantoni, Antonella Mofferdin, Massimo Lobrano
USMAF Genova, Ministero della Salute, Genova

USMAF Genova – istituzionalmente l'Ufficio di Sanità Marittima, Aerea e di Frontiera (USMAF) di Genova con le sue Unità Territoriali di Genova, Savona, Imperia e La Spezia – rappresenta un organo periferico di controllo del Ministero della Salute. Svolge attività di vigilanza igienico-sanitaria sulle merci in importazione da Paesi terzi che viene effettuata anche tramite il prelievo di campioni e successivo controllo analitico.

In seguito all'esito favorevole delle analisi di laboratorio, l'USMAF rilascia il nulla osta sanitario all'importazione.

Controlli micotossine – Dall'esame dei dati statistici relativi all'attività di campionamento per la ricerca di micotossine nel 2003, è risultato che sono state ricercate aflatoxine (61%) e ocratoxine (39%). La tipologia di merce campionata per la ricerca di aflatoxine è stata rappresentata prevalentemente da frutta secca (84%), armelline (8%), spezie (5%) e cereali (2%). Le ocratoxine sono state controllate invece nelle partite di caffè (91%), nell'uva sultanina (8%) e nel cacao (1%). Le aflatoxine sono state ricercate in partite di frutta secca provenienti dal Medioriente (61%), Sudamerica (14%), Africa e Asia (9%) e dal Nordamerica (7%); spezie dall'Asia (50%), Medioriente (30%) e Africa (20%); armelline dall'Asia (7%) e dal Medioriente (93%) e cereali dall'Asia e dal Nordamerica. Le ocratoxine sono state ricercate nel caffè importato dal Sudamerica (39%), America centrale (14%), Africa (16%) e dall'Asia (31%); nell'uva sultanina proveniente dal Medioriente (89%) e dall'Africa (11%) e nel cacao dall'Africa. In seguito a Decisioni della Commissione Europea, è stata posta una particolare attenzione sui controlli di partite di arachidi provenienti dalla Cina e dall'Egitto; sui pistacchi provenienti dall'Iran e dalla Turchia; nocciole e fichi secchi dalla Turchia e su noci del Brasile con percentuali di controlli tra il 10% e il 100%.

Respingimenti – Nei casi in cui l'esito del controllo analitico ha dato valori di micotossine superiori ai limiti consentiti dalla legge, le merci sono state respinte. La quasi totalità dei respingimenti è avvenuta in seguito alla ricerca di aflatoxine (95%). Per l'Aflatoxina B1 sono stati riscontrati valori compresi tra un minimo di 2,6 microgrammi/chilo e un valore massimo di 282 microgrammi/chilo. I valori relativi alla presenza delle aflatoxine totali sono risultati compresi tra 5,01 microgrammi/chilo e 295 microgrammi/chilo. Dallo studio dei dati statistici è emerso che questi respingimenti hanno costituito circa il 6% del totale delle merci campionate per la ricerca di micotossine.

DETERMINAZIONE DI MICOTOSSINE IN PRODOTTI ALIMENTARI DA AGRICOLTURA BIOLOGICA E CONVENZIONALE

Barbara De Santis, Carlo Brera, Francesca Debegnach e Marina Miraglia
Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari, Istituto Superiore di Sanità, Roma

L'agricoltura biologica costituisce un modello di produttività che trova riscontri concettualmente differenti nelle diverse realtà socio-economiche. Per i Paesi in via di sviluppo essa costituisce una delle alternative possibili per un programma di educazione agricola autosostenibile e strutture quali la FAO e l'OMS si stanno infatti indirizzando in tal senso; per i Paesi industrializzati invece l'agricoltura biologica può costituire la risposta ad oggettivi problemi ecologici e alle esigenze del consumatore, sempre più attento alla qualità igienico-sanitaria e nutrizionale degli alimenti.

Lo scopo del lavoro è stato quello di individuare indicatori chimici di danno biologico che consentissero di caratterizzare la qualità dei prodotti alimentari oggetto dello studio. Si è inoltre cercato di identificare le eventuali differenze tra la produzione biologica e quella convenzionale. A tale scopo è stato valutato il livello di contaminazione da patulina in prodotti di frutta fresca e di deossinivalenolo in campioni di grano tenero e duro provenienti dai due tipi di coltivazione.

Le specie di frutta analizzate (pesche, pere, susine e arance) provenivano da due campi di confronto diversificati nella gestione agronomica. La frutta convenzionale proveniva da alberi cresciuti su un campo coltivato con prodotti di sintesi e concimato con fertilizzanti minerali. La frutta biologica proveniva da alberi cresciuti su campi biologici protetti da parassiti con prodotti ammessi dalla Direttiva della Unione Europea 2092/91. Inoltre sono state prese in esame numerose varietà di grano tenero e duro provenienti da agrotecnica biologica e convenzionale. Tra le tipologie di frutta analizzate, le susine e le pesche sia convenzionali che derivanti da differenti tipologie di lavorazione del terreno, hanno mostrato livelli apprezzabili di patulina, mentre le arance e le pere hanno mostrato livelli di contaminazione inferiori. Analogamente per la campionatura di grano tenero e duro l'analisi e il confronto dei dati non hanno mostrato una differenza dei livelli di contaminazione da deossinivalenolo riconducibile al tipo di agrotecnica impiegata. La contaminazione media riscontrata è comunque inferiore a quella suggerita come limite di legge.

Pertanto i risultati ottenuti non suggeriscono un livello di contaminazione diversificato in funzione della tecnica culturale impiegata. Questo porterebbe a concludere che non è nella diversa modalità di coltivazione che si alterano le specifiche condizioni nelle quali il fungo incrementa o diminuisce la produzione di micotossina.

Tuttavia è necessario verificare tali risultati in quanto la contaminazione da micotossine può variare significativamente nelle diverse annate in relazione a vari fattori quali ad esempio quelli climatici e le condizioni del campo di coltura.

MICOTOSSINE NEGLI ALIMENTI AD USO ZOOTECNICO: SITUAZIONE IN PIEMONTE

Lucia Decastelli, Jeanne Lai, Chiara Modena, Paola Mogliotti, Fulvio Brusa,
Maria Cesarina Abete, Marina Rastelli, Carlo Nachtmann
*C.Re.A.A. Centro di Referenza Nazionale per la Sorveglianza ed il Controllo degli Alimenti
per Animali, Istituto Zooprofilattico del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino*

Le micotossine sono sostanze tossiche prodotte dal metabolismo di alcuni funghi (*Aspergillus*, *Stachybotris*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Cephalosporium*, ecc.), caratterizzate da struttura chimica molto variabile. La loro presenza negli alimenti ad uso zootecnico, a causa della possibile contaminazione del latte prodotto da animali che si alimentano con derrate contaminate, può essere pericolosa per la salute del consumatore e richiede particolare attenzione visti gli sviluppi legislativi in materia di contaminanti ambientali (Raccomandazione 2004/163/CE).

La Direttiva 2003/100/CE, che modifica l'allegato I della Direttiva 2002/32/CE, e il suo recepimento a livello nazionale (DL.vo del 10/05/2004 n. 149) fissano i limiti per la sola Aflatossina B1, in termini di mg/kg (ppm) di mangime al tasso di umidità del 12% sia per quel che riguarda le materie prime sia i mangimi nelle varie formulazioni destinati alle differenti produzioni.

Per quel che riguarda le altre micotossine non esistono riferimenti legislativi a tutt'oggi che ne fissino i limiti per quanto riguarda gli alimenti ad uso zootecnico.

In seguito all'emergenza Aflatossina M1 nel latte dell'estate 2003, sono stati istituiti piani di sorveglianza, a partire da novembre 2003, nei mangimi e nelle materie prime per verificarne il livello di contaminazione in micotossine.

È prevista infatti nel Piano Nazionale per l'Alimentazione Animale della Regione Piemonte la ricerca delle aflatossine (B1, B2, G1, G2) e delle altre micotossine (Ocratossina, Zearalenone e deossinivalenolo o DON): i campionamenti vengono effettuati in modo ufficiale per l'Aflatossina B1 e a scopo di monitoraggio per le altre.

Nell'anno 2004 al 30/06/04 sono stati analizzati 250 campioni per aflatossine, di cui 3 (1,2%) sono risultati non conformi per l'Aflatossina B1. Tutti e tre i campioni sono mangimi complementari per bovine da latte (limite di Aflatossina B1 5 ppb). Ad oggi sono stati inoltre analizzati dei campioni di mangime per la presenza delle altre micotossine: 11 campioni per la presenza di Ocratossina, risultati tutti negativi; 3 per il DON in cui sono stati riscontrati valori tra i 100 e i 300 ppb (di questi 2 sono mangimi completi e 1 complementare); 6 per lo Zearalenone di cui 1 è risultato averne una quantità pari a 40 ppb (mangime complementare). Da questi dati emerge una bassa percentuale di non conformità per quanto riguarda l'Aflatossina B1 che sta ad indicare una diminuzione nell'utilizzo di derrate contaminate. D'altra parte le positività che riguardano le altre micotossine pongono in rilievo il problema della loro presenza e della necessità di un regolamento legislativo che ne determini i limiti.

AFLATOSSINE B1, B2, G1 E G2 IN ALIMENTI DI ORIGINE VEGETALE PROVENIENTI DA PAESI NON UE

Michele Mazzetti (a), Roberto Fascioli (a), Alessia Barontini (a), Guido Spinelli (a),
Ivano Morelli (b), Alessandra Bertoli (b)

*(a) Dipartimento Provinciale di Livorno, Settore Chimica degli Alimenti, Agenzia
Regionale per la Protezione Ambientale (ARPAT), Livorno*

(b) Dipartimento di Chimica Bioorganica e Biofarmacia, Università degli Studi di Pisa

Il seguente lavoro raccoglie i risultati della attività di controllo analitico relativo alla contaminazione da aflatossine in campioni di alimenti di origine vegetale in ingresso nel territorio UE attraverso il porto di Livorno nel triennio 2001-2003.

Alcune centinaia di campioni di alimenti di origine vegetale (pistacchi, arachidi e noci del Brasile) sono stati analizzati apportando alcune modifiche alla metodica descritta da Scholten M.J. e Spanjer M.C (Scholten & Spanjer, 1996).

I principali parametri statistici del metodo (esattezza, ripetibilità, limite di quantificazione e limite di rilevabilità), determinati durante la fase di validazione, sono stati confermati in uno studio indipendente effettuato dai "Laboratori di Ricerche Analitiche sugli Alimenti" (LRAA) del Di.Pro.Ve. - Facoltà di Agraria - Università degli Studi di Milano.

Il metodo garantisce i requisiti della Direttiva 98/53 (recepita con DM 23/12/2000) e risulta conforme a quanto richiesto dalla norma ISO-CEI-EN-ISO/IEC17025.

I risultati ottenuti mostrano chiaramente come l'incidenza e l'entità della contaminazione da aflatossine su questo tipo di alimenti sia tale da richiedere un attento e qualificato controllo nella fase del loro ingresso nel territorio UE.

OCRATOSSINA A: DECONTAMINAZIONE BIOLOGICA DEI MOSTI NEL CORSO DELLA FERMENTAZIONE ALCOLICA

Massimo Morassut (a), Francesca Cecchini (b), Emilia Garcia Moruno (a),
Michele Savino (b)

(a) Istituto Sperimentale per l'Enologia soc, Asti, Asti

(b) Istituto Sperimentale per l'Enologia sop, Barletta, Bari

La presenza di Ocratossina A (OTA) nei vini, contaminante di origine micotica, è stata chiaramente evidenziata da numerose ricerche. La contaminazione è collegata allo sviluppo sulle uve, in campo e nel corso delle operazioni di post raccolta, di organismi fungini dei generi *Aspergillus* e *Penicillium*. Lo sviluppo di queste muffe ocratossinogene dipende da diversi fattori. Tra questi, le condizioni agro-meteorologiche delle zone di produzione rappresenta uno dei principali fattori di rischio. Il fenomeno risulta particolarmente diffuso tra i Paesi dell'area mediterranea. Attualmente, diverse attività di ricerca, sollecitate dalla prossima definizione di un limite massimo di presenza di OTA nei prodotti enologici, sono finalizzate alla definizione di azioni a carattere preventivo e correttivo in grado di ridurre il livello di contaminazione iniziale di OTA.

Anche se la prevenzione in campo, soprattutto nelle zone definite a rischio, rappresenta sempre la migliore strategia di controllo per ridurre il rischio della contaminazione di OTA, lo sviluppo di tecniche di decontaminazione può risultare di notevole utilità.

Nell'ambito della individuazione di eventuali azioni correttive è stata verificata l'evoluzione del contenuto di OTA nel corso della fermentazione alcolica ad opera dei lieviti enologici. Nel corso di diverse esperienze si è riscontrato che, il processo fermentativo di trasformazione ad opera dei lieviti del mosto in vino, determina una significativa riduzione del contenuto di OTA. La presenza di sostanze fenoliche di natura antocianica, in alcuni casi, ha incrementato l'azione decontaminante dei lieviti. L'azione decontaminante dei lieviti appare in gran parte attribuibile a fenomeni di assorbimento sulla parete cellulare con la successiva separazione delle fecce al termine della fermentazione. La riduzione media, registrata nei vari campioni, è compresa in un intervallo tra il 40 e il 70%. In questa esposizione sono riportati i dati relativi a diverse esperienze.

AFLATOSSINE NEL LATTE IN COMMERCIO: LA SITUAZIONE PIEMONTESE

Carlo Nachtmann, Silvia Gallina, Monica Gramaglia, Marina Rastelli, Gian Luca Ferro,
Lucia Decastelli

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino

Le aflatossine, metaboliti prodotti da miceti del genere *Aspergillus*, sono in grado di causare significative patologie nell'uomo e negli animali; infatti, oltre a manifestare tossicità acuta, possono sviluppare effetti cancerogeni nel bovino. L'Aflatossina M1 è un catabolita idrossiderivato della Aflatossina B1 assimilata con la dieta: dalla Aflatossina B1, infatti, attraverso un processo di idrossilazione, si forma, in sede epatica e renale, la Aflatossina M1 che viene successivamente eliminata nel latte. L'escrezione mammaria inizia a comparire circa 12 ore dall'inizio della somministrazione di alimento contaminato e scompare dopo circa 24 ore dalla sua eliminazione dalla dieta. Il suo effetto tossico è dovuto al legame tossina-acidi nucleici, tossina-nucleoproteine, comportando la comparsa di immunodepressione, cancerogenesi e teratogenesi secondo i livelli e le modalità di esposizione.

In seguito all'emergenza aflatossine avvenuta nell'estate 2003, con la particolare annata climatica caratterizzata da temperature molto elevate già durante i primi mesi estivi, si sono create le condizioni ideali per lo sviluppo, sulle derrate cerealicole (in particolare mais), di miceti del genere *Aspergillus*. Su tutto il territorio regionale si è provveduto, quindi, ad un piano di monitoraggio per verificare la contaminazione del latte commercializzato nella nostra Regione. Da novembre 2003 a maggio 2004 sono stati prelevati dagli operatori del Servizio Sanitario Nazionale e analizzati, presso i laboratori dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, 116 campioni di latte fresco e a lunga conservazione (UHT) prelevati in fase di commercio per la ricerca di Aflatossina M1 mediante l'utilizzo di cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC). Esclusivamente 2 campioni (1,7%) sono risultati non conformi, avendo rilevato concentrazioni superiori ai limiti previsti (Circolare 9 giugno 1999, n. 10: 50 ppt); entrambi i campioni si riferiscono al mese di novembre 2003 e riportano rispettivamente valori di 90 ppt e 70 ppt. Si sottolinea, inoltre, che in 5 campioni (4,3%), 2 del mese di novembre 2003, 2 di febbraio 2004 e 1 di aprile 2004, sono stati evidenziati valori di 50 ppt. Tale andamento sottolinea lo stretto legame che esiste tra l'utilizzo di alimenti contaminati e l'escrezione mammaria di Aflatossina M1. Verificando le concentrazioni riscontrate di Aflatossina M1 è possibile evidenziare un progressivo decremento della tossina per tutto il periodo di osservazione, ad eccezione di un picco di ricomparsa (aprile 2004) a livelli paragonabili al mese di novembre 2003. Tale andamento indicherebbe un utilizzo di mangimi contaminati, anche se a livelli più bassi, e consiglia una costante e continua attività di sorveglianza da parte degli organi del controllo ufficiale.

INDAGINE SULLA PRESENZA DI AFLATOSSINE IN MANGIMI PRODOTTI DA DIVERSE AZIENDE

Roberta Piccaglia (a), Silvia Grandi (a), Alessandra Canever (b), Erika Transerici (c)

(a) Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali, Università di Bologna

(b) Granarolo SpA, Bologna

(c) AgriOK SpA, Bologna

La presenza di aflatossine nella razione per le bovine da latte è la conseguenza dell'impiego di alimenti contaminati, tra i quali la granella di mais e i mangimi sono quelli più a rischio. È perciò evidente l'importanza per gli allevatori di far riferimento a fornitori "sicuri", e per questi ultimi di operare in modo corretto e rigoroso per soddisfare la clientela.

Nel 2003-2004 sono stati monitorati 17 mangimifici di rilevanza nazionale o regionale, prelevando campioni di mangime in periodi successivi, passando da un minimo di tre prelievi (1 mangimificio), ad un massimo di nove (3 ditte), per una media di 7 "ispezioni", e per un totale di 118 campioni.

Ogni campione globale, del peso di 10 kg, era la risultante di numerosi campioni elementari prelevati sulla linea produttiva dei mangimi per lattifere.

In tutti i campioni si sono determinati, via HPLC, i tenori di aflatossine (B1 - B2 - G1 - G2).

L'Aflatossina maggiormente presente è stata la B1: essa ha raggiunto valori medi di 1,96 ppb, un limite, tuttavia, nettamente inferiore a quello massimo consentito per i mangimi composti per lattifere (5 ppb). Nel 15% dei campioni tale tossina era presente a livelli indeterminabili, mentre nel 7,6% dei rilievi essa superava il limite di legge (valore medio di tali campioni: 7,9 ppb).

La media delle osservazioni in ciascun mangimificio non ha mai superato il valore soglia di 5 ppb; il maggior livello registrato è stato di 3,7 ppb.

Il complesso delle osservazioni testimonia un buon livello di attenzione delle imprese mangimistiche monitorate, le quali si sono rivelate molto attente nel rifornirsi di materie prime poco contaminate con aflatossine (si rammenta che nel 2003 la granella di mais è sovente risultata ad elevato tasso di aflatossine) e in grado di operare molto correttamente nelle fasi di conservazione e lavorazione di tali materie prime. Nel contempo non vanno taciuti i casi di "sforamento" dei valori di legge, per cui non sembra fuori luogo considerare il monitoraggio non già quale evento straordinario, bensì come una prassi da consolidare.

DECONTAMINAZIONE DA *FUSARIUM*-TOSSINE DELLA GRANELLA DI MAIS CON IL PROCESSO DI MOLITURA A SECCO

Amedeo Reyneri (a), Francesca Vanara (a), Laura Bertetto (b), Ugo Peila (b)

(a) *Dipartimento di Agronomia, Selvicoltura e Gestione del territorio, Università di Torino, Grugliasco*

(b) *Molino F.lli Peila srl, Responsabili qualità e produzione, Valperga (TO)*

Le farine per uso alimentare umano e tutti i prodotti e sottoprodotti della lavorazione industriale della granella di mais, sono il risultato di un processo di trasformazione in grado di separare le componenti della cariosside. In particolare, la molitura a secco separa il germe, la crusca e le farine di diversa granulometria ottenute tramite la degerminazione e la raffinazione.

Tra le conseguenze della trasformazione industriale è da registrare la ripartizione delle principali *Fusarium*-tossine (fumonisine, Zearalenone, deossinivalenolo) contenute nella cariosside intera. Lo studio condotto in un molino a mais piemontese nel 2003, su 7 lotti derivati da produzioni granarie del biennio 2002-2003, ha permesso di definire il livello di decontaminazione delle cariossidi operato con la trasformazione. Le farine e i grits hanno un contenuto medio di 5-9 volte inferiore rispetto alla contaminazione da micotossine della granella di origine. La contaminazione del fumetto è ridotta di 2-3 volte. Al contrario, il germe e in particolare le farinette hanno un contenuto pari o di 2-3 volte maggiore rispetto alla cariosside intera.

Le componenti della cariosside che risultano più contaminate da micotossine sono quindi le crusche, cioè le parti più esterne (pericarpo), e il germe. L'endosperma, frazione da cui si separano le farine e i grits, risulta invece solo parzialmente contaminato. Più in dettaglio, lo stesso contenuto in micotossine è risultato inversamente proporzionale alla granulometria delle farine esaminate. La lavorazione è risultata più efficace nell'abbattimento delle fumonisine e dello Zearalenone rispetto al DON.

Dall'analisi della composizione chimica delle frazioni è emersa una relazione tra contenuto in grassi della matrice e tenore in micotossine. Il processo di molitura è quindi un processo selettivo di decontaminazione in grado di migliorare la sanità delle farine di mais, in misura variabile e in parte dipendente da una serie di accorgimenti operativi.

MICOTOSSINE: LA GESTIONE DEL RISCHIO NELLE AZIENDE LOMBARDE

Nicoletta Rizzi, Paola Amodeo
Laboratorio Foraggi ARAL, Crema (CR)

La presenza di micotossine in allevamento è un problema economico, oltre che gestionale a causa della diminuzione dei parametri qualitativi del prodotto finale e dell'induzione di immunodepressione della mandria, con alterazioni anche importanti del quadro sanitario.

Dal punto di vista dell'allevatore il problema non riguarda solo ciò che produce in azienda ma anche le forniture esterne, al fine di evitare di introdurre in azienda prodotti già contaminati.

È in base a questi presupposti che L'Associazione Regionale Allevatori della Lombardia (ARAL), già da anni, si occupa in modo continuo e finalizzato del monitoraggio alla produzione (aziende agricole) dell'inquinamento da micotossine intervenendo sia con l'assistenza tecnica (SATA), che come laboratorio d'analisi per una gestione controllata del rischio, ma, soprattutto, per una sua prevenzione, mediante la sensibilizzazione del produttore al problema e il controllo costante del latte e degli alimenti zootecnici anche con l'attivazione di sistemi di autocontrollo.

All'entrata in vigore della legge riguardante le aflatossine, era stata svolta dall'ARAL e dalla Regione Lombardia un'indagine sul territorio lombardo per valutare l'entità del problema, la sua ripercussione sulla sanità della mandria e le modalità per il controllo della produzione e dello stoccaggio degli alimenti. Negli anni successivi l'attenzione del SATA si è estesa anche a tossine non normate per legge ma ugualmente critiche per la gestione aziendale e la salute animale; le condizioni meteorologiche dell'estate 2003 hanno riportato l'attenzione verso l'Aflatossina sia nel latte e derivati sia negli alimenti

Il lavoro intende presentare i risultati del monitoraggio delle micotossine su oltre 6.500 allevamenti per un totale di 15.000 analisi di M1 nel latte e di 4.300 tossine negli alimenti nel periodo gennaio 2003-luglio 2004 e gli interventi attuati dal SATA e dal laboratorio foraggi dell'ARAL al fine di salvaguardare non solo la catena produttiva ma soprattutto i consumatori.

I controlli hanno riguardato: l'analisi dell'Aflatossina nel latte, in modo sistematico, in quanto matrice privilegiata per seguire l'andamento della contaminazione in azienda, e, per tutte le micotossine, il monitoraggio dei mangimi sia di produzione aziendale sia acquistati, con conseguente riformulazione delle razioni con alimenti alternativi, e una forte sensibilizzazione degli allevatori al problema.

In conclusione vengono proposti e richiesti strumenti di allarme più adeguati per un monitoraggio dinamico e correlato all'andamento climatico stagionale che influenza le specie di miceti produttori di tossine e di conseguenza definisce il piano di autocontrollo aziendale relativamente alle micotossine orientandolo di volta in volta verso quelle a maggior rischio.

AFLATOSSINA M1 NEL LATTE: UN PROBLEMA RISOLVIBILE

Luca Sillari, Enzo Casarini, Alberto Zaniboni, Kalinka Grozeva
Controllo Qualità, Newlat srl, Reggio Emilia

Il problema dell'Aflatossina M1 nel latte è salito alla ribalta durante l'autunno 2003, in quanto il raccolto di mais per uso zootecnico, si è rivelato fortemente contaminato con Aflatossina BeG, in seguito all'estate particolarmente calda e secca.

Alcune regioni (Emilia Romagna, Lombardia e Veneto) hanno emanato regolamenti speciali intensificando i controlli ufficiali, e obbligando le aziende ad intensificare le analisi sul latte per tenere sotto controllo la contaminazione.

Nonostante si sia riusciti a controllare il fenomeno, la necessità di misure d'urgenza ha evidenziato lacune in un sistema di gestione del rischio Aflatossina non continuativo e sistematico.

In primo luogo manca uniformità del dato analitico. Un alto numero di analisi da effettuare in tempi brevi, ha imposto di affidarsi a metodi di screening rapidi (es. ELISA) con falsi positivi che hanno dovuto essere verificati all'HPLC; analisi con HPLC commissionate da aziende presso diversi laboratori, hanno dato risultati spesso contraddittori per mancanza di uniformità nella taratura degli strumenti o delle procedure d'analisi, provocando confusione, in alcuni casi blocco di latte risultato poi in regola, e innalzamento dei costi d'analisi.

In secondo luogo viene affrontato il problema concentrandosi sul latte, quando cioè la contaminazione ha già interessato largamente la filiera, mentre bisognerebbe prevenirla concentrandosi di più sui mangimi che ne sono all'origine.

Newlat srl, impegnata da molti anni nello studio dell'Aflatossina M1 nel latte, ha messo a punto un protocollo di gestione del rischio micotossine, che si è rivelato efficace anche durante l'emergenza del 2003.

Il protocollo si basa su: una quota massima per il contenuto in Aflatossina M1 nel latte crudo (Newlat lo ha fissato in 20 ppt, contro i 50 ppt di legge), controllo almeno settimanale latte crudo in entrata e giornaliero sul confezionato mediante HPLC, sensibilizzazione e collaborazione con i produttori di latte con assistenza in caso di contaminazione elevata analizzando latte e mangimi, dialogo con gli organi di controllo, ring tests con vari laboratori per avere uniformità di risultati.

Quest'azione continuativa e ad ampio spettro, permette di affrontare il problema Aflatossina garantendo latte con livelli di contaminazione molto bassi o nulli.

Consente inoltre di intervenire sulle cause, contaminazione dei mangimi, potendo così operare un serio ed efficace controllo della filiera.

LOTTA ALLA PIRALIDE E RACCOLTA ANTICIPATA PER RIDURRE LE MICOTOSSINE IN MAIS

Mariolino Snidaro

Servizio ricerca e sperimentazione, ERSA, Pozzuolo del Friuli (UD)

Per un quadriennio, dal 2000 al 2003, sono state condotte, in due località del Friuli-Venezia Giulia, delle prove per verificare quali agrotecniche potevano consentire una riduzione dei livelli di micotossine e in particolare di fumonisina nella granella di mais. Sono stati messi a confronto: due epoche di semina, tre livelli di concimazione azotata, due investimenti, tre trattamenti di difesa contro la piralide, quattro epoche di raccolta.

Dalla sperimentazione è emerso che minori quantità di azoto, l'anticipo nell'epoca di semina, e gli investimenti non fitti offrono un contributo modesto nella riduzione della presenza di micotossine in mais. Gli interventi agronomici che hanno determinato una forte riduzione di micotossine nella granella di mais sono stati la lotta contro la piralide e l'anticipo nell'epoca di raccolta. Significativa è risultata la differenza tra i diversi insetticidi impiegati e l'epoca di trattamento contro la piralide. La raccolta anticipata è risultata molto importante per evitare che la granella di mais rimanga esposta per lungo tempo alle intemperie e ai funghi.

INDAGINE EUROPEA DI SYNGENTA SEEDS SULLA PRESENZA DI FUNGHI E MICOTOSSINE SU MAIS NEGLI ULTIMI ANNI

Bernard Charpentier, Franco Tanzi
Syngenta Seeds

I funghi si sono sempre sviluppati su tutte le colture; oggi è dimostrato che essi possono produrre differenti micotossine dannose per la salute dei consumatori.

Obiettivo di Syngenta è quello di effettuare una indagine a livello europeo sulla presenza di funghi e micotossine su mais, e determinare le migliori pratiche agronomiche per una gestione ottimale del rischio; d'altro lato riteniamo che il miglioramento genetico sia uno strumento fondamentale per migliorare la sanità della spiga alle infezioni fungine e quindi allo sviluppo di micotossine. Negli ultimi 5 anni Syngenta ha effettuato una indagine per valutare la presenza di funghi su mais in Europa. In particolare abbiamo concentrato la ricerca sui più importanti funghi produttori di micotossine sul mais, i *Fusarii*:

- *Fusarium Subglutinans*, *F. Moniliforme*, *F. proliferatum*; Fumonisine;
- *Fusarium Graminearum* e *F. Culmorum*; Deoxynivalenol e Zearalenone.

Dal 1999 al 2003 abbiamo analizzato 5500 campioni di granella di mais provenienti da aziende agricole e soggetti alla presenza naturale di funghi.

Le più importanti aree maidicole europee sono state interessate dalla ricerca.

Abbiamo effettuato le seguenti analisi:

- Microbiologica in capsule Petri dopo disinfezione esterna delle cariossidi, per valutare la presenza di funghi;
- Test ELISA per valutare la presenza di micotossine - fumonisine è il totale di tutte le fumonisine (B1;B2;B3).

Più di 20 funghi sono stati osservati nella granella di mais proveniente dai campi. I più frequentemente osservati sono i seguenti tipi: *Fusarium*, *Acremonium*, *Alternaria*, *Nigrospora* e *Rhizopus*.

I diversi funghi sono potenzialmente presenti ovunque, e la loro presenza è fortemente influenzata dai fattori ambientali e meteorologici. Per questo la probabilità di trovarli ad alte concentrazioni cambia nei diversi ambienti osservati.

All'interno della sezione liseola possiamo osservare:

- Negli ambienti più caldi troviamo più facilmente il *Fusarium proliferatum* rispetto al *Fusarium moniliforme/verticilloides*;
- Negli ambienti più freschi prevale il *F.subglutinans* che è stato riscontrato fin nelle aree maidicole più settentrionali.

Il *Fusarium graminearum* è più problematico nelle aree fresche e piovose, ma può essere presente in qualsiasi ambiente, anche nelle aree più meridionali.

Questa indagine è un supporto al lavoro di breeding e al posizionamento dei prodotti di Syngenta Seeds.

L'argomento sul quale ora Syngenta sta lavorando è la relazione tra pratiche agronomiche e presenza di micotossine.

LA GESTIONE DEL RISCHIO NELLA AZIENDA PETRINI 1822 SPA

Clotilde Villeri, Luciano Terni, Clarita Cavallucci, Mare Battistelli,
Francesca Della Monica, Elena Fioriti, Mauro Migni
Centro Studi e Formazione, Petrini1822 SpA, Bastia Umbra (PG)

Quasi tutti i prodotti vegetali sono idonei per la crescita di funghi tossigeni e pertanto l'accumulo di micotossine nelle piante infette in campo, nonché durante tutte le successive operazioni di raccolta, trasporto, conservazione e trasformazione tecnologica, è una eventualità incombente che si può tradurre con la comparsa di micotossine nei mangimi e nel latte. Il sistema di gestione qualità Petrini ha analizzato tutte le fasi dell'attività aziendale e le loro interazioni e infine ha focalizzato i vari processi, da quelli gestionali a quelli operativi, e ognuno di essi ha individuato appropriati indicatori realizzando così un modello organizzativo in grado di garantire l'allevatore e il consumatore finale. È stato attuato un programma di monitoraggio per ottenere prodotti alimentari sicuri e instaurare rapporti duraturi con i fornitori. Definito un capitolato d'acquisto delle materie prime con specifiche per i limiti delle micotossine in conformità ai limiti di legge, sono stati selezionati in maniera oculata i fornitori e le fonti di approvvigionamento. In funzione del livello di conoscenza del fornitore e dell'origine delle materie prime, sono stati attuati controlli analitici in entrata, sul diagramma di flusso delle lavorazioni per identificare i punti critici, e sui prodotti finiti, facendo ricorso a metodi analitici ufficiali. Lo sviluppo di misure di controllo operanti ad ogni livello della filiera di produzione potranno permettere di garantire la sicurezza igienico-sanitaria dei mangimi e dei prodotti di origine animale da loro derivanti.

Sessione poster
Tecnologie alimentari

VERIFICA DEL LEGAME TRA CONTENUTI DI AFLATOSSINE DELLA GRANELLA DI MAIS E DEI MANGIMI CHE LA CONTENGONO

Franco Cinti (a), Marco Bortolotti (a), Mirco Casagrandi (b)

(a) *Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali, Università di Bologna, Bologna*

(b) *AgriOK SpA, Cariano, Bologna*

La presenza di aflatossine nei mangimi è generalmente la conseguenza dell'impiego di materie prime contaminate. Notevole è l'impegno delle aziende mangimistiche per rifornirsi di prodotti "sani" e per conservarli correttamente, onde poter garantire la produzione di mangimi conformi alle vigenti normative e comunque di elevata qualità.

Sono stati monitorati otto mangimifici, sette nel 2003 (riforniti di granella di mais prodotta nel 2002, annata notoriamente poco favorevole alla presenza di aflatossine), uno nel 2004 (granella del 2003, annata con forte contaminazione). In quest'ultimo caso sono stati controllati due lotti di granella, uno prodotto ed essiccato in modo ordinario, l'altro seguendo il disciplinare AgriOK (un insieme di "buone norme agronomiche"). Presso ogni mangimificio è stato prelevato un campione sia di granella di mais che di mangime per lattifere contenente la suddetta granella (in media il 32%), formato ognuno da 100 campioni di 300 g rappresentativi della produzione giornaliera. Sono state determinate le aflatossine (B1-B2-G1-G2), l'Ocratossina A, le fumonisine (B1-B2), il deossinivalenolo e lo Zearalenone.

Per quanto riguarda i primi sette mangimifici il contenuto di aflatossine B1 in granella di mais (campagna 2002) è risultato mediamente inferiore a 1 ppb, mentre l'Ocratossina e il deossinivalenolo erano presenti in tracce, le fumonisine avevano valori di 5 e 4 ppm (rispettivamente per la B1 e la B2) e lo Zearalenone raggiungeva i 120 ppm. La presenza di tossine nei mangimi è risultata strettamente connessa alla contaminazione del mais. Facendo riferimento alle aflatossine, le uniche a presentare limiti di legge, questo andamento sta ad indicare un comportamento molto attento e responsabile delle aziende mangimistiche nella fase di approvvigionamento delle materie prime (granella di mais e altro). In merito all'indagine del 2004 (granella 2003) si è rilevata una netta differenza di contaminazione con Aflatossina B1 della granella di mais prodotta ordinariamente (35 ppb di B1) oppure su protocollo AgriOK (15 ppb), che si è riverberata in modo proporzionale sul livello di contaminazione del mangime, che nel caso della granella "convenzionale" ha raggiunto valori di 8 ppb, superiore a quanto stabilito dalle norme vigenti (5 ppb).

Queste indagini, in ultima analisi, tendono ad evidenziare che operando in modo corretto sia in campo che nella preparazione dei mangimi è possibile contenere

L'INFLUENZA DELLA MODALITÀ DI COLTIVAZIONE, DELL'ESSICCAMENTO E DELLO STOCCAGGIO SULLA PRESENZA DI AFLATOSSINE IN GRANELLA DI MAIS

Franco Cinti (a), Fiorindo Gaspari (a), Mirco Casagrandi (b)

(a) Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali, Università di Bologna

(b) AgriOK SpA, Cariano, Bologna

La presenza di aflatossine in granella di mais è la risultante di numerosi fattori tra i quali rivestono notevole importanza le modalità di coltivazione, la “lavorazione” post-raccolta (pulitura ed essiccamento) e lo stoccaggio.

Nel 2003-2004 è stata condotta una ricerca in 3 province emiliane (Reggio Emilia, Modena, Bologna) seguendo 8 partite di granella di mais consegnate a quattro diversi stocicatori, di dimensioni comprese tra 12 e 1.151 t (totale: 3.926 t) e aventi un contenuto medio di umidità compreso tra 14 e 25,1%, quattro delle quali ottenute con le tecniche agronomiche ordinarie della zona e quattro realizzate con il protocollo predisposto da AgriOK, il quale tra l'altro prevede l'impiego di ibridi a ciclo medio e trattamenti antiparassitari (soprattutto contro la seconda generazione di *Ostrinia nubilalis* Hb.).

Sono stati prelevati campioni di granella sia all'atto del conferimento delle partite alle aziende stoccatrici, sia, dopo periodi diversi di conservazione (mediamente 260 giorni), alla consegna del prodotto agli utilizzatori. Su tutti i campioni si sono determinati, via HPLC, i contenuti di aflatossine B1 - B2 - G1 - G2.

È stato prelevato un campione globale di 30 kg ogni 200 tonnellate di granella conferita, composto ognuno da 100 campioni elementari di 300 grammi. Ogni campione globale, dopo miscelazione, è stato suddiviso in 3 campioni per il laboratorio. Nel complesso si è operato su 40 campioni globali (20 al conferimento, 20 alla consegna).

La granella ottenuta con il protocollo AgriOK ha presentato un contenuto di Aflatossina B1 nettamente inferiore a quello registrato sulla granella di provenienza “convenzionale” (10,7 contro 28,4 ppb, pari ad una riduzione del 62%).

In media la granella all'uscita ha presentato un tenore di Aflatossina B1 inferiore a quello rilevato all'atto del conferimento (16,0 contro 19,6 ppb, pari ad un calo del 28%). Poiché non si sono verificati andamenti significativi sui valori dei prelievi successivi dai silos di stoccaggio, è da ritenere che la riduzione della contaminazione nei centri di stoccaggio vada attribuita pressoché totalmente alla pulitura.

In definitiva un'attenta gestione dei seminati e delle fasi di stoccaggio appaiono in grado di ridurre il livello di contaminazione con aflatossine della granella di mais.

RIDUZIONE DI OCRATOSSINA A NEI VINI MEDIANTE BATTERI LATTICI

Maria Daria Fumi

*Istituto di Enologia e Ingegneria Alimentare, Università Cattolica del Sacro Cuore,
Piacenza*

Recentemente alcune indagini hanno messo in evidenza che la fermentazione malolattica può comportare una riduzione di Ocratossina A nei vini.

Tale fermentazione rientra in particolare nella tecnologia di preparazione dei vini rossi in quanto la metabolizzazione dell'acido malico consente di ridurre l'acidità dei vini con un conseguente miglioramento delle caratteristiche gusto-olfattive dei prodotti. Generalmente la fermentazione malolattica avviene al termine della fermentazione alcolica ad opera dei batteri lattici naturalmente presenti nei vini, ma l'impiego di starters selezionati per una migliore gestione del processo è una pratica enologica sempre più utilizzata. Nella ricerca ci si è posti l'obiettivo di selezionare batteri lattici in grado non solo di metabolizzare l'acido malico, ma anche di ridurre biologicamente l'Ocratossina A presente nei vini. Tra gli isolati da vini in fermentazione malolattica ceppi di *Lactobacillus plantarum* sono stati caratterizzati per la capacità di degradare l'OTA in vini con diverso contenuto di etanolo e di Ocratossina ed è stata valutata la cinetica di detossificazione in relazione alla composizione azotata del substrato.

Lo studio ha messo in evidenza che la diminuzione della tossina dipende dal ceppo e dal contenuto di tossina presente e non è influenzata significativamente dal contenuto in etanolo e dal pH nell'ambito dei valori normalmente riscontrati nei vini. Studi sono in corso per chiarire il meccanismo di riduzione dell'Ocratossina da parte dei ceppi studiati al fine di ottimizzare l'uso del *Lactobacillus plantarum* nel vino per ottenere un prodotto a basso rischio.

Progetto finanziato dalla Comunità Europea FP5, KA1, contratto n. QLK1-CT-2001-01761- WINE-OCHRA RISK; Università Cattolica S. Cuore

L'INFLUENZA DEL SEQUESTRANTE "ATOXTM-BENTO-NITE" SULLA RIDUZIONE DI AFLATOSSINA M1 NEL LATTE

Fiorindo Gaspari (a), Roberta Piccaglia (a), Andrea Borsari (b), Anna Tampieri (c)

(a) *Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali, Università di Bologna*

(b) *Granarolo SpA, Bologna*

(c) *AgriOK SpA, Bologna*

Può verificarsi, nonostante le attenzioni poste nelle fasi di produzione, acquisto e stoccaggio degli alimenti, un'eccessiva presenza di Aflatossina M1 nel latte. In questi casi l'intervento più immediato per riguadagnare la qualità dell'alimento è rappresentato dall'impiego nella formulazione della razione di "sequestranti", cioè di sostanze in grado di catturare l'Aflatossina, riducendone il carry-over (cioè il "passaggio" nel latte), favorendo il superamento della "crisi" e consentendo di predisporre gli accorgimenti (individuazione ed esclusione degli alimenti contaminati) per rientrare in condizioni di normalità.

Per verificare l'efficacia di uno di tali sequestranti, l'AtoxTM-bentonite, nel 2003-2004 è stata condotta una ricerca presso dieci allevamenti di bovine da latte dislocate in Emilia Romagna e Veneto. In tali allevamenti si è determinata la presenza di Aflatossina M1 nel latte, campionando altresì sia i singoli componenti della razione che l'unifeed (cioè la razione già mescolata). Successivamente si sono distribuiti per 4 giorni 120 g·capo⁻¹·giorno⁻¹ di AtoxTM-bentonite, riverificando poi il livello di M1 nel latte. Le dimensioni del campione globale dei singoli alimenti, dell'unifeed e del latte giornaliero della mandria era rispettivamente 10 kg, 30 kg, 1 kg.

La presenza media di Aflatossina B1 nella razione è risultata 4,09 ppb, corrispondenti ad un'ingestione giornaliera di 99,4 µg per capo (in base alla sommatoria degli apporti dei singoli alimenti, risulterebbe un valore, molto simile, di 92,7 µg). Le componenti della razione che hanno maggiormente determinato la presenza di Aflatossina B1 nella razione, quindi nel latte, sono state la farina di mais (con un'incidenza ponderata del 57% nelle nove realtà in cui era presente), i semi di cotone e girasole (30%), il mangime (17%) e le polpe esauste di bietola da zucchero (13%), mentre irrilevante è risultato l'apporto dei foraggi (es. il silomais ha contribuito per appena il 3%). La presenza di Aflatossina M1 nel latte, prima del trattamento, è mediamente risultata di 169 ppt, pari a 4,78 µg escreti da ogni bovina al giorno, con un carry-over del 4,81% (valore min 2,4%, valore max 11,0%).

Il trattamento con AtoxTM-bentonite ha abbassato il livello di contaminazione del latte a valori medi di 61,1 ppt, cui corrisponde un carry-over di 1,74.

In definitiva il trattamento con il sequestrante si è rivelato molto efficace, determinando un calo del livello di contaminazione del latte con Aflatossina M1 di ben il 64%.

L'INFLUENZA DELL'UMIDITÀ ALLA RACCOLTA E DELLA SOSTA IN ATTESA DELL'ESSICCAMENTO SULLA CONTAMINAZIONE CON AFLATOSSINE DELLA GRANELLA DI MAIS

Fiorindo Gaspari, Marco Bortolotti, Franco Cinti

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali, Università di Bologna

Raccolte tendenzialmente anticipate (23-25% di umidità) e rapido essiccamento sono considerate due condizioni da un lato antitetiche (più umida è la granella, maggiori sono infatti i tempi di essiccamento), dall'altro favorevoli per ottenere granella di mais con bassi livelli di contaminazione con aflatossine; la prima consentirebbe di evitare eventuali condizioni di stress alla coltura (evento altamente predisponente per la produzione delle tossine) nella fase finale del ciclo, mentre la seconda permette di scongiurare o ridurre fortemente l'attività di tutti gli organismi aerobi in grado di attaccare e deteriorare la derrata.

Nel 2003 è stata condotta una prova, presso un'azienda sperimentale dell'Università di Bologna (AUB-Terreni di Cadriano), utilizzando un'ordinaria coltura di mais da granella (ibrido a ciclo medio Pioneer PR34N43; densità di semina 7 piante m²), sulla quale sono state eseguite due raccolte (11 agosto 2003, granella avente il 23,7% di umidità; 19 agosto con il 13,5% di umidità), prevedendo l'essiccamento immediato e dopo 24, 48 e 72 ore. La conservazione della granella in attesa di essiccamento è stata realizzata sia in contenitori di cemento (0,8 t), parzialmente isolati, sia in cassoni di plastica (0,4 t).

Per ognuno dei trattamenti è stato prelevato un campione globale di 30 kg per la determinazione, via HPLC, del contenuto di aflatossine (B₁ - B₂ - G₁ - G₂).

La granella della prima raccolta in attesa di essiccamento ha subito un innalzamento termico notevole, segno evidente di attività aerobica, il quale è risultato più elevato nel caso dei contenitori di cemento rispetto ai cassoni di plastica; tale diverso riscaldamento non ha tuttavia influito sul tenore di aflatossine della granella.

La granella della seconda raccolta era già secca e non ha subito alcuna alterazione e perciò nessuna variazione termica.

La presenza di aflatossine è risultata piuttosto contenuta (la media per la B₁ è stata 4,4 ppb) e nessuna differenza significativa si è riscontrata tra le tesi. E forse sta proprio nel basso livello generale di contaminazione la chiave di lettura di questi risultati, i quali tendono ad evidenziare che non sempre raccolte tardive della granella e soste prolungate in attesa di essiccamento si traducono in aumento della presenza di aflatossine.

L'UTILIZZO DEL GLUCOMANNANO MODIFICATO DERIVATO DALLA PARETE CELLULARE DEL LIEVITO PER RIDURRE GLI EFFETTI DELLE MICOTOSSINE E DEI RELATIVI RESIDUI

Patrick Géliot (a), Declan O'Sullivan (b)

(a) *Alltech Italia Srl, Bologna*

(b) *Alltech Ireland, Dunbyine, Irlanda*

Le micotossine vengono trasmesse alle diete umane principalmente tramite i cereali e gli alimenti a base di vegetali. Una certa quantità di micotossine si accumula comunque nella carne, e alcuni cibi, come le uova e il latte, sono particolarmente sensibili al trasferimento di micotossine.

Sono stati condotti alcuni esperimenti *in vivo* che dimostrano l'efficacia del glucomannano modificato (Mycosorb prodotto da Alltech Inc.) nel controllare i livelli dei residui di micotossine nelle diverse specie animali.

In uno studio condotto alla North Carolina University, grazie a Mycosorb incluso allo 0,05% nella dieta secca si sono ottenute riduzioni nelle concentrazioni di Aflatossina nel latte del 58%, nelle vacche da latte che consumavano mangimi contaminati da aflatossine. La diminuzione dei residui di aflatossine nel latte non era statisticamente diversa da quella registrata con la bentonite di sodio inclusa però nella dieta ad un contenuto 25 volte superiore (1,25%) rispetto a Mycosorb.

In un esperimento condotto alla Chulalongkorn University di Bangkok, in Thailandia è stato studiato l'impatto di Mycosorb sui residui di Aflatossina B1 e i suoi metaboliti nel tessuto commestibile delle anatre. Alle anatre è stata somministrata una dieta contenente 100 ppb di Aflatossina B1 con o senza Mycosorb. È stato dimostrato che Mycosorb riduceva i residui di Aflatossina M1 nel tessuto muscolare.

In un esperimento condotto per osservare la capacità di Mycosorb di impedire il deterioramento della qualità delle uova causato dall'aurofusarinotossicosi, l'aggiunta di Mycosorb alla dieta ha avuto un effetto protettivo. In particolare, il colore del tuorlo era soltanto leggermente diverso da quello dei controlli, e il color verdastro causato dall'aurofusarina non era presente nel gruppo con Mycosorb nella dieta. È stato osservato anche un effetto protettivo di Mycosorb per quanto riguarda la composizione degli acidi grassi e degli antiossidanti nel tuorlo.

Un esperimento realizzato presso la University of Guelph in Ontario, Canada ha inteso studiare gli effetti dell'utilizzo di miscele di cereali contaminati con micotossine da *Fusarium* sui parametri di crescita e il colore di petto e cosce dei broiler, e se l'integrazione di Mycosorb nella dieta potesse bilanciare gli effetti negativi delle micotossine. È stato osservato che il conteggio dei globuli rossi e la concentrazione di emoglobina e acido urico aumentavano con l'ingestione di quantità sempre maggiori di cereali contaminati. Si riscontrava anche un colore rosso più acceso della carne del petto. L'utilizzo di Mycosorb ha invertito questi effetti negativi.

EFFICACIA DI FUNGICIDI SULLA “FUSARIOSI DELLA SPIGA” ED EFFETTO SUL CONTENUTO DI DEOSSINIVALENOLO NEL FRUMENTO

Miriam Haidukowski (a), Michelangelo Pascale (a), Giancarlo Perrone (a),
Angelo Visconti (a), Davide Pancaldi (b), Claudio Campagna (c)

(a) *Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, CNR, Bari*

(b) *Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agro-alimentare, Università di Bologna*

(c) *Syngenta Crop Protection SpA, Milano*

La “fusariosi della spiga” è una sindrome dovuta al concorso di più miceti appartenenti ai generi *Fusarium* e *Microdochium*. La malattia è causa di disseccamenti parziali o totali della spiga con ripercussioni sulla resa in granella, che in presenza di gravi attacchi può diminuire dal 30 al 70%. Le cariossidi infette determinano inoltre problemi di sicurezza di carattere sanitario poiché diverse specie di *Fusarium*, in condizioni di crescita favorevoli, producono dei metaboliti secondari dotati di attività tossica nei riguardi dell'uomo e degli animali. In particolar modo, *F. graminearum* e *F. culmorum* producono il deossinivalenolo (DON), una micotossina che nei mammiferi causa effetti neurotossici e immunotossici ed è responsabile di sindromi emetiche e anoressiche negli allevamenti zootecnici. La presenza di DON è stata frequentemente rilevata, anche ad elevate concentrazioni, in cariossidi di frumento duro e tenero provenienti da coltivazioni colpite da “fusariosi della spiga” in diverse aree cerealicole dell'Emilia Romagna e altre regioni italiane.

È stata valutata, su tre varietà di frumento duro (Bracco, Duilio e Orobel) e due varietà di frumento tenero (Genio e Serio) comunemente coltivate in Emilia Romagna, l'azione preventiva di alcuni fungicidi sullo sviluppo della “fusariosi della spiga” del frumento dopo inoculazione artificiale in campo con isolati di *Fusarium graminearum* e *F. culmorum*, noti agenti causali della malattia. Sono stati inoltre valutati gli effetti dei trattamenti sulla produzione di granella (tonnellate per ettaro e peso di mille semi) e sul contenuto di DON nelle cariossidi. L'impiego di ciproconazolo + prochloraz e della miscela tebuconazolo + azoxystrobin ha ridotto significativamente sia la gravità della malattia (fino al 77%), sia il contenuto di DON (fino all'89%), rispetto al testimone inoculato e non trattato con fungicidi. Anche tetraconazolo si è dimostrato efficace nel ridurre sia la malattia sia i livelli di DON, sebbene con risultati inferiori rispetto agli altri fungicidi. La produzione di granella è risultata più elevata in tutte le tesi trattate con i fungicidi.

OCRATOSSINA A: DECONTAMINAZIONE FISICA DEI VINI MEDIANTE USO DI CARBONE ENOLOGICO

Michele Savino (a), Massimo Morassut (b), Francesca Cecchini (b),
Emilia Garcia Moruno (c), Barbara Boccaccino (c)

(a) Istituto Sperimentale per l'Enologia sop, Barletta, Bari

(b) Istituto Sperimentale per l'Enologia sop, Velletri, Roma

(c) Istituto Sperimentale per l'Enologia soc, Asti

La presenza di Ocratossina A (OTA) nei vini, contaminante di origine micotica, è stata chiaramente evidenziata da numerose ricerche. La contaminazione è collegata allo sviluppo sulle uve, in campo e nel corso delle operazioni di post raccolta, di organismi fungini dei generi *Aspergillus* e *Penicillium*. Lo sviluppo di queste muffe ocratossinogene dipende da diversi fattori. Tra questi, le condizioni agro-meteorologiche delle zone di produzione rappresentano uno dei principali fattori di rischio. Il fenomeno risulta particolarmente diffuso tra i Paesi dell'area mediterranea. Attualmente, diverse attività di ricerca, sollecitate dalla prossima definizione di un limite massimo di presenza di OTA nei prodotti enologici, sono finalizzate alla definizione di azioni a carattere preventivo e correttivo in grado di ridurre il livello di contaminazione iniziale di OTA.

Nell'ambito della individuazione di eventuali azioni correttive è stata verificata l'azione di alcuni coadiuvanti di uso enologico sui vini. Tra questi, a seguito di test preliminari, è stato evidenziato, già a dosi minime, un significativo abbattimento del contenuto di OTA nei vini con l'impiego di carbone vegetale. In particolare si è voluta studiare l'azione di questo trattamento sui composti volatili e sui polifenoli responsabili, rispettivamente, dell'aroma e del gusto dei vini. Sono stati realizzati trattamenti con carbone decolorante, alle dosi da 5 a 15 g/hL, su diverse tipologie di vini. In questa sede riportiamo i dati relativi ad un vino rosso e uno bianco, rappresentativi dell'esperienza complessiva. I risultati dimostrano che, alle dosi consigliate per l'abbattimento dell'OTA, viene sostanzialmente rispettata la composizione dei vini, sia per quanto riguarda i composti fenolici che quelli aromatici. Nel caso dei composti aromatici l'assorbimento, riguarda prevalentemente i composti lipofili, mentre i composti aromatici idrofili, non sono asportati.

DESTINO DELL' OCRATOSSINA A NELLA VINIFICAZIONE

Angela Silva

*Istituto di Enologia e Ingegneria Alimentare, Università Cattolica del Sacro Cuore,
Piacenza*

Nella filiera vitivinicola l'Ocratossina A (OTA) risulta attualmente l'unica micotossina segnalata e l'uva e i suoi derivati fanno parte degli alimenti e delle bevande sotto osservazione per il possibile apporto di OTA alla nostra dieta. Dal 1996, anno in cui per la prima volta è stata segnalata la presenza della micotossina nei vini, varie indagini sono state condotte in diversi Paesi che hanno confermato la presenza di OTA nel vino e hanno messo in luce l'esistenza di un gradiente di OTA sia su base geografica che in relazione al colore del vino. Partendo dal presupposto che l'OTA è presente nel vino solamente quando l'uva è contaminata e che spesso gli interventi di buona pratica viticola non sono sufficienti ad evitare il problema, perlomeno in certe zone ad alto rischio, attualmente risulta importante verificare quale influenza possa avere la pratica enologica sul livello di OTA nel vino e quali strategie tecnologiche possono essere attuate per limitare la presenza di tale micotossina. Il presente lavoro è rivolto allo studio del destino dell'OTA durante le fasi principali del processo di vinificazione al fine di individuare i punti critici di controllo (CCP). L'attenzione è stata focalizzata sulla vinificazione in rosso, mediante prove con due cultivars (Negroamaro e Primitivo) e in tre vendemmie (2001, 2002 e 2003). I risultati mostrano che l'OTA non è prodotta durante la vinificazione, ma ogni operazione tecnologica può modificarne il contenuto: la macerazione causa un aumento (20-30%), mentre le fermentazioni alcolica e malolattica provocano una riduzione di tale micotossina. Lo studio evidenzia che il monitoraggio durante la vinificazione è indispensabile se l'OTA è presente alla raccolta e che nel processo di vinificazione in rosso i CCP sono le fasi di separazione solido-liquido e le fermentazioni alcolica e malolattica ma si tratta di CCP2 in quanto il rischio può essere ridotto ma non eliminato.

Progetto finanziato dalla Comunità Europea FP5, KAI, contratto n. QLK1-CT-2001-01761

Sessione poster
Metodi di analisi e campionamento

TECNICHE DI CAMPIONAMENTO DI GRAPPOLI IN VIGNETO PER LA STIMA DEL CONTENUTO DI OCRATOSSINA A NEL MOSTO

Carlo Barbano (a), Paola Battilani (a), Vittorio Rossi (a), Terenzio Bertuzzi (b), Amedeo Pietri (b)

(a) *Istituto di Entomologia e Patologia Vegetale, Facoltà di Agraria, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza*

(b) *Istituto di Scienze degli alimenti e della nutrizione; Facoltà di Agraria, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza*

Il campionamento è un momento cruciale nella determinazione del contenuto di micotossine degli alimenti. Nelle uve si rilevano notevoli differenze di contenuto di Ocratossina A (OTA) in acini dello stesso grappolo e in grappoli della stessa pianta.

È stata organizzata una prova di campo per valutare l'attitudine di diverse tecniche di campionamento a stimare correttamente il contenuto di OTA nel mosto.

Alla vendemmia sono stati raccolti grappoli in due vigneti localizzati in Puglia, uno con "Negroamaro" allevato ad Alberello e il secondo con 'Sangiovese' allevato a Tendone. In entrambi gli appezzamenti, i grappoli sono stati raccolti da dieci piante, individuate lungo le diagonali, e dieci distribuite lungo gli assi perpendicolari. In entrambe le forme di allevamento, per ciascuna pianta sono stati raccolti tutti i grappoli presenti su una delle branche. I grappoli prelevati dalle 10 piante lungo le diagonali sono stati pigiati separatamente e il contenuto di OTA è stato quantificato mediante HPLC; i valori ottenuti sono poi stati utilizzati per calcolare valori medi per pianta di contenuto di OTA. I grappoli di ciascuna delle 10 piante distribuite lungo gli assi perpendicolari del vigneto sono stati pigiati insieme, ottenendo così un valore medio per pianta di contenuto di OTA. Su questi 20 valori è stata calcolata, per ciascun vigneto, la media e la deviazione standard.

A causa dell'elevata variabilità del campione, i contenuti di OTA del mosto sono stati trasformati secondo la funzione logaritmo naturale prima di essere elaborati.

Successivamente sono state simulate diverse metodologie di campionamento e ne è stata testata la bontà in termini di corretta stima della media. In particolare, è stata eseguita: l'estrazione casuale di 10 set di 10, 20 e 40 grappoli scelti mediante generazione di numeri casuali; il campionamento di tutti i grappoli di una pianta scelta casualmente tra quelle presenti nel vigneto; il campionamento, da piante diverse, di grappoli che occupano sulla pianta sempre la medesima posizione.

Le migliori stime del contenuto di OTA sono state ottenute prelevando grappoli, da piante diverse, che occupavano sulla pianta sempre la medesima posizione. Il protocollo di campionamento proposto è stato in grado di stimare in modo soddisfacente il contenuto di OTA nei mosti, sia quando il livello di contaminazione era elevato (5,5 µg/kg), che quando era scarso (1,0 µg/kg). In particolare, nei vigneti a maggiore contaminazione lo scarto rispetto alla media non è stato mai superiore al 15%.

METODO RAPIDO PER LA MISURA DELLA CONTAMINAZIONE DA FUNGHI TOSSIGENI IN CARIOSSIDI DI MAIS

Nicola Berardo (a), Vincenza Pisacane (a), Andrea Scandolara (b), Paola Battilani (b),
Vincenzo Rossi (b), Amedeo Pietri (b), Tommaso Maggiore (c), Mario Baldini (d),
GianPaolo Vannozzi (d), Sergio Miele (e), Estilio Salera (e), Adriano Marocco (b)

(a) Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura, Bergamo

(b) Università Cattolica S. Cuore, Piacenza

(c) DIPROVE, Università di Milano

(d) DPVTA, Università di Udine

(e) Dipartimento di Agronomia e Gestione Agroecosistema, Università di Pisa

Uno dei maggiori problemi che negli ultimi tempi stà interessando l'agricoltura mondiale è la contaminazione delle derrate destinate all'alimentazione umana e animale provocata dalla sporadica presenza di funghi tossigeni. A livello nazionale è in corso un progetto per il monitoraggio del contenuto in micotossine in mais che coinvolge cinque istituzioni pubbliche, presenti nei maggiori areali di coltivazione di questa specie. Vengono monitorate 120 aree di coltivazione misurando il livello di contaminazione fungina e da *Fusarium verticillioides* e la produzione di metaboliti, quali ergosterolo e fumonisina B1. Le misurazioni di questi parametri sono state eseguite con tecniche micologiche e con l'impiego di metodologie chimiche (GC e HPLC) e immunologiche (ELISA). La necessità per gli utilizzatori delle derrate alimentari (aziende agricole e zootecniche, stoccatore, mulini, industrie mangimistiche e agro-alimentari, nutrizionisti) di poter effettuare valutazioni in tempi rapidi della contaminazione, ha introdotto l'uso della spettroscopia nel vicino infrarosso (NIRS) per accelerare la misurazione dei parametri mico-tossicologici. Nell'ambito di questo lavoro sono state avviate calibrazioni NIRS relative alla determinazione delle infezioni fungine, del contenuto in ergosterolo e in fumonisina B1. L'ampia variabilità ottenuta dai campionamenti eseguiti in svariati areali di coltivazione del mais, ha consentito di ottenere risultati statisticamente significativi per il modello matematico sviluppato relativo ai singoli parametri con valori di coefficiente di determinazione (R^2) e errore standard di calibrazione (SEC) compresi tra 0,79 e 0,91 e 1,31 e 9,02 per le infezioni da fungo e da *F. verticilloides* della granella di mais e ergosterolo e *F. verticilloides* della farina, rispettivamente. La tecnica NIRS si propone, pertanto, come strumento alternativo da utilizzare per stimare in modo rapido e affidabile il livello di infezione da funghi tossigeni e dei relativi metaboliti prodotti.

CONTROLLO CON METODO ELISA DEL TENORE DI OCRATOSSINA A NEL CAFFÈ VERDE IN ARRIVO ALLA TORREFAZIONE DOPO SDOGANAMENTO

Faustina Marcella Bertollo, Luca Gradassi, Emiliano Dragoni, Serena Pancioni
Laboratorio CSA Srl, Centro Servizi & Analisi, Arezzo

Il lavoro presentato nel poster ha lo scopo di illustrare lo screening sui campioni delle partite di caffè verde di origine arabica e robusta in arrivo ad una torrefazione, con sistema certificato secondo la norma UNI EN ISO 9001:2000 e Sistema di Autocontrollo certificato BRC, dopo lo sdoganamento, ai fini dell'attuazione delle procedure di qualità dell'azienda.

Le analisi sono state eseguite su campioni prelevati dagli spedizionieri, secondo una specifica tecnica in loro possesso, sigillati e inviati tramite corriere direttamente al laboratorio prima del carico del caffè su mezzi di trasporto destinati alla torrefazione.

La tecnica di analisi usata prevede una macinazione del campione, estrazione con solvente, un passaggio su colonna di immunoaffinità per la purificazione del campione e il saggio immunoenzimatico con lettore di micropiastre ELISA.

I risultati ottenuti dalle indagini su caffè di origine arabica e robusta provenienti da vari Paesi produttori, sono stati messi a paragone fra loro per confrontare i sistemi di raccolta, lavorazione e stoccaggio dei vari Paesi.

Gli stessi risultati hanno evidenziato che nelle produzioni di caffè arabica provenienti dal Sud America e Africa Orientale il rischio di contaminazione da Ocratossina A è abbastanza ridotto in quanto viene prestata molta cura ai processi di lavorazione, sia in piantagione che in fase di produzione e commercializzazione.

I risultati ottenuti sui campioni di caffè robusta provenienti da Africa Occidentale e estremo oriente evidenziano una presenza abbastanza rilevante di Ocratossina A, a volte anche oltre i limiti stabiliti dalla normativa vigente, dovuti sia a condizioni di peggiore qualità della varietà botanica, sia a peggiori sistemi di raccolta, lavorazione e stoccaggio del caffè stesso.

STUDIO DELLE CONTAMINAZIONI IN CAMPO DA FUMONISINE SU MAIS MEDIANTE TECNICHE DI ANALISI ELISA E RP-HPLC

Pier Paolo Danieli (a), Francesco Rossini (b), Umberto Bernabucci (a),
Carlo Fausto Cereti (b) e Bruno Ronchi (a)

(a) *Dipartimento di Produzioni Animali, Università degli Studi della Tuscia, Viterbo*

(b) *Dipartimento di Produzione Vegetale, Università degli Studi della Tuscia, Viterbo*

La contaminazione da micotossine sui vegetali in campo è imputabile principalmente allo sviluppo di ceppi fungini tossigeni appartenenti a specie del genere *Fusarium*. Tra le produzioni vegetali di rilievo, quella maidicola trova impiego in diversi settori agro-industriali e agro-zootecnici. Il presente studio si pone come obiettivo quello di verificare l'effetto di differenti fattori agronomici sulla presenza di micotossine, in particolare modo le Fumonisine. Inoltre, è stata messa a confronto la risposta di due differenti tecniche d'analisi: saggio ELISA e cromatografia liquida a fase inversa. La sperimentazione, ha riguardato la quantificazione di Fumonisine e altre micotossine in mais (ibrido Suarta) proveniente da prove parcellari sottoposte a differenti itinerari tecnici. Il quadro della sperimentazione agronomica, estesa su due annualità (2001-2002), ha previsto: due regimi irrigui, tre epoche di semina e quattro densità colturali. Aliquote da 200 g di granella sono state raccolte per singola prova e stoccate a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ fino al momento dell'analisi. I campioni essiccati e finemente macinati, sono stati sottoposti ad estrazione secondo i protocolli per il saggio ELISA e per il clean-up d'immunoaffinità (propedeutico alla separazione in HPLC). I dati analitici sono stati trasformati logaritmicamente per soddisfare i requisiti di normalità richiesti nell'applicazione di test parametrici. La correlazione tra i risultati del saggio ELISA e la concentrazione di Fumonina B1 con RP-HPLC, anche se statisticamente significativa risulta molto bassa ($r=0,46$, $p<0,01$), stando a denotare una scarsa comparabilità dei due metodi anche in relazione ai differenti valori delle medie ($6,42\pm 3,86$ e $1,60\pm 1,15$ ppm, rispettivamente). L'analisi della varianza ha evidenziato ulteriori differenze: nel primo caso (ELISA) nessuno dei fattori del piano sperimentale ha presentato effetti significativi sulla distribuzione della contaminazione, mentre per i dati ottenuti con HPLC, l'interazione tra regime irriguo ed epoca di semina, per l'anno 2001, e la sola epoca di semina, per l'anno 2002, hanno presentato effetto significativo sulla contaminazione in campo da Fumonisine ($p<0,05$). L'analisi della situazione meteorologica relativa alle due annualità, può contribuire ad interpretare le differenze interannuali rilevate. I risultati dell'indagine consentono di concludere che la comparazione diretta delle due metodiche, anche nel caso mais di norma impiegato per la validazione dei protocolli ELISA, porta a differenti risultati. Inoltre, in vista dei limiti Comunitari di prossima applicazione, riguardanti solo FB1 e FB2, gli attuali saggi ELISA possono non essere adeguati soprattutto nel caso di kit, come quello impiegato nella presente indagine, dove la cross-reattività per la FB3 non è trascurabile.

DETERMINAZIONE DELLE FUMONISINE NEL MAIS E PRODOTTI DERIVATI MEDIANTE HPLC-MS/MS

David Agugiario, Alessandro Bacaloni, Chiara Cavaliere, Patrizia Foglia,
Elisabetta Pastorini, Roberto Samperi, Aldo Laganà
Dipartimento di Chimica, Università "La Sapienza", Roma

Le fumonisine sono una classe di micotossine prodotte dal metabolismo di alcuni funghi parassiti della specie *Fusarium* (principalmente *F. moniliforme* e *F. proliferatum*). Tali funghi si sviluppano prevalentemente nelle zone a clima temperato infestando colture cerealicole sia in campo che durante le fasi di raccolta, stoccaggio e lavorazione. Nonostante le fumonisine finora identificate siano più di 11, generalmente negli alimenti contaminati vengono rinvenute quelle di tipo B (FB1>FB2□FB3>FB4). Numerosi studi hanno evidenziato la tossicità delle FB in animali da allevamento e da laboratorio; studi epidemiologici in Sud Africa, Cina e Italia le hanno collegate all'aumento di incidenza di cancro umano all'esofago. Sono state inoltre classificate dallo IARC come possibili cancerogeni per l'uomo (2B). Nel 2003 la CE ha proposto i limiti massimi ammissibili di FB1+FB2: 2 ppm per il mais destinato a consumo umano, solo 0,1 ppm nel caso di alimenti per bambini.

In questo lavoro viene presentato un metodo analitico basato sulla cromatografia liquida/spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS) con interfaccia elettrospray per la determinazione delle fumonisine FB1-4 nel mais e prodotti derivati. 1g di campione viene omogeneizzato con solvente estraente acidificato e l'omogeneizzato passato su C18. Questa procedura, oltre ad essere rapida e accurata, consente la parziale rimozione della frazione lipidica dal campione. L'estratto viene purificato mediante Carbograph-4, che per le sue caratteristiche peculiari permette di separare efficacemente gli analiti in studio dagli interferenti, eluendoli selettivamente. In questo modo l'effetto matrice osservato è praticamente trascurabile. In questo lavoro si è fatto uso dello spettrometro di massa ibrido Q TRAP™ in cui il terzo quadrupolo (Q3) può funzionare anche come trappola ionica lineare (LIT), con il vantaggio di poter scegliere tra numerose modalità di scansione.

Per la valutazione del metodo sono stati addizionati campioni non contaminati con diversi livelli di concentrazione degli analiti nell'intervallo 20-5000 ng/g e analizzati in Multiple Reaction Monitoring (2 transizioni per composto) ottenendo recuperi compresi tra 91% e 105% (RSD% ≤ 8%) e limiti di rivelabilità ≤ 1 ng/g per FB1 e ≤ 2 ng/g per FB2. Poiché gli standard di FB3-4 non sono commercialmente disponibili, è stato applicato il cosiddetto protocollo IDA (Information Acquisition Dependent) presente nel software del Q TRAP™ per l'identificazione di queste due fumonisine in campioni di polenta naturalmente contaminati. Ciò è stato realizzato imponendo la scansione dei precursori che generano la perdita neutra caratteristica di questa classe (-370 Da). I precursori sono stati confermati dalla scansione ad alta risoluzione e dalla loro frammentazione in trappola ionica lineare. Il metodo sviluppato è stato, quindi, applicato per l'analisi delle FB1-4 B in alcuni prodotti a base di mais (polenta, cornflakes e popcorn).

METODO HIGH-THROUGHPUT PER LA DETERMINAZIONE DI OCRATOSSINA A NEL VINO

Marta Letizia Antonelli, Chiara Cavaliere, Angelo Faberi, Giovanna Fago, Roberto Samperi, Aldo Laganà
Dipartimento di Chimica, Università "La Sapienza", Roma

L'Ocratossina A è una micotossina ad ampia diffusione, prodotta dal metabolismo secondario di svariati funghi dei generi *Aspergillus* e *Penicillium*. Essa può essere presente quale contaminante in diverse tipologie di derrate alimentari.

Particolare interesse assume la matrice vino dal momento che vari studi, effettuati a livello internazionale, hanno messo in luce una presenza di Ocratossina A rilevante sia per quantità di campioni positivi, sia per livello di concentrazione. Essendo il vino una bevanda di particolare pregio, nonché di larga diffusione, risulta molto importante avere a disposizione metodi analitici che consentano di determinare l'eventuale contaminazione da Ocratossina A in un gran numero di campioni, con elevata affidabilità.

A questo scopo il nostro gruppo di ricerca ha messo a punto un metodo analitico completamente automatizzato, basato su estrazione in fase solida - cromatografia liquida - spettrometria di massa tandem, per l'analisi dell'Ocratossina A nella matrice vino.

Il metodo messo a punto ha consentito di analizzare fino a 60 campioni al giorno in un unico batch, senza ricorrere a complicate procedure di pre-trattamento del campione. I campioni di vino possono essere analizzati con questo metodo in maniera completamente automatica con un'elevata produttività. Ogni ciclo analitico, infatti, richiede soltanto 23 minuti senza la presenza dell'operatore.

Per l'estrazione e l'arricchimento dell'analita, che si effettua mediante un autocampionatore, due pompe binarie HPLC, una valvola diverter ad otto porte e una cartuccia di silice derivatizzata C18, è sufficiente una piccolissima quantità di campione (200 microlitri di vino). Successivamente si esegue la determinazione quali-quantitativa dell'analita mediante cromatografia liquida accoppiata con la spettrometria di massa tandem. Quale sistema di rivelazione si è utilizzato uno spettrometro di massa ibrido quadrupolo-trappola ionica provvisto di un interfaccia elettrospray, operante in modalità di ionizzazione negativa.

Il metodo messo a punto ha permesso la determinazione quantitativa dell'Ocratossina A nel range di concentrazioni compreso tra 0,01 e 25 ng mL⁻¹.

Tutte le variabili che influenzano la performance del metodo sono state studiate e valutate utilizzando soluzioni standard di Ocratossina A e campioni fortificati di vino (vini bianchi e rossi di diversa origine e tipologia). Il metodo è risultato accurato, preciso, sensibile, specifico e con un limite di rilevabilità inferiore a 0,01 ng mL⁻¹.

Infine, si è effettuato un monitoraggio su alcuni campioni di vino acquistati in supermercati locali. Questo ha messo in luce un elevato tasso di positività fra tutti i campioni analizzati (circa 70%). Il range di concentrazione di Ocratossina A rinvenuto è risultato compreso tra 0,03 e 1,41 ng mL⁻¹, con valori mediamente più elevati nel caso di vini rossi.

STUDIO DI IMMUNOSENSORI PER LA DETERMINAZIONE DELL'AFLATOSSINA M1 E B1

Laura Micheli, Silvia Piermarini, Emanuela Cotroneo, Nagwa Ammida, Danila Moscone,
Giuseppe Palleschi

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, Università di Roma "Tor Vergata", Roma

Nel latte di animali in lattazione, alimentati con mangimi contaminati con Aflatossina B1 prodotta da ceppi di *Aspergillus flavus*, è possibile riscontrare la presenza di un suo metabolita idrossilato, l'Aflatossina M1. L'entità di tale carry-over, che è influenzato anche dalla razza bovina, varia mediamente da 0,17 al 3%, con punte del 6%, dell'Aflatossina B1 ingerita.

L'Aflatossina B1 e il suo metabolita (Aflatossina M1) sono sostanze dotate di elevata tossicità sia acuta che cronica. L'elevatissima attività biologica e l'ampio spettro di azione delle aflatossine scaturisce molto probabilmente dalla loro peculiare capacità di legarsi con gli acidi nucleici e con le nucleo-proteine cellulari, determinando effetti deleteri sulla sintesi proteica e sull'integrità cellulare. Poiché non è ancora stato possibile fissare una soglia minima di tolleranza al di sotto della quale non vi è rischio, e data l'estrema tossicità delle aflatossine, la Comunità Europea ha fissato un valore massimo ammissibile per i foraggi di 2 µg/kg di Aflatossina B1 e per il latte di 50 ppt per l'Aflatossina M1. La tossicità dei cereali, foraggi e latte viene valutata, attualmente, mediante metodi cromatografici, quali l'HPLC e la TLC con rivelazione fluorimetrica, che presentano tempi lunghi e metodologie complesse e dispendiose.

Obiettivo di questo lavoro è la realizzazione di immunosensori elettrochimici monouso, selettivi per l'Aflatossina M1 e B1, in grado di valutarne la presenza direttamente nei foraggi e nel latte.

In una prima fase della ricerca sono stati sviluppati due diversi formati di saggi ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) con rivelazione spettrofotometrica: saggio competitivo e di spiazzamento. Questo studio è stato effettuato al fine di valutare la specificità degli anticorpi reperiti. Fasi successive hanno previsto la sintesi e caratterizzazione di coniugati enzima-tossina (enzimi scelti: Fosfatasi Alcalina -AP- e Perossidasi -HRP-), e la caratterizzazione degli SPE per la misura dell'attività enzimatica e per lo sviluppo di saggi ELISA elettrochimici.

Le informazioni desunte dall'applicazione di questa metodologia sono state trasferite al sistema elettrochimico. I risultati ottenuti per entrambe le aflatossine mostrano intervalli di lavoro compresi tra 45-250 pg/mL per l'Aflatossina M1 misurata direttamente nel latte e 0,1-10 ng/mL per l'Aflatossina B1, dopo estrazione e diluizione 1:10 v/v del campione.

DIAGNOSI MOLECOLARE DI FUNGHI TOSSIGENI DI INTERESSE AGRO-ALIMENTARE

Giuseppina Mulè, Giancarlo Perrone e Antonio Moretti
Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, CNR, Bari

Fra le principali specie fungine agenti di ammuffimento dei prodotti agro-alimentari, quelle che sollevano i principali timori per la salubrità degli alimenti in relazione alle micotossine prodotte appartengono principalmente ai generi *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*. Una corretta identificazione delle specie tossigene è importante in quanto ogni specie possiede un profilo tossigenico peculiare e, sebbene l'identificazione tradizionale fondata sulle caratteristiche morfologiche sia ancora importante e fondamentale nel riconoscimento delle specie fungine, tuttavia il fatto che sia competenza di pochi specialisti e che comporti tempi lunghi di laboratorio suggerisce lo sviluppo di metodi di diagnosi più attendibili e rapidi. I sistemi innovativi basati sull'analisi molecolare di DNA, finalizzata alla costruzione di sonde nucleiche specifiche, rappresentano un'interessante alternativa per il monitoraggio in tempo reale dei funghi tossigeni, nonché uno strumento rapido e attendibile. A questo scopo, per le principali specie fungine tossigene, sono state condotte indagini molecolari mediante l'analisi di sequenza di geni ribosomiali e ubiquitari (ITS, IGS, calmoduline, β -tubuline, fattore di elongazione) e l'analisi dei polimorfismi ottenuti mediante AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*). Sono stati così ottenuti marcatori molecolari di popolazione, primer specie/specifici per la diagnosi di ceppi tossigeni di *F. proliferatum*, *F. subglutinans* e *F. verticillioides*, produttori di beauvericina, fumonisine e fusaproliferina, di *F. graminearum* e *F. culmorum*, produttori di Tricoteceni e di *A. carbonarius* e *A. niger*, produttori di Ocratossina A e infine sonde Taqman. Lo sviluppo di marcatori molecolari per l'identificazione rapida di funghi tossigeni importanti nel settore agro-alimentare può fornire strumenti sempre più efficaci per la prevenzione dei rischi causati dalle micotossine alla salute umana e animale.

DETERMINAZIONE DELL'AFLOATOSSINA M1 NEL LATTE: ORGANIZZAZIONE E RISULTATI DI PROFICIENCY TEST

Ugo Paggi, Barbara Magnani, Laura Monaco
Associazione Italiana Allevatori, Laboratorio Standard Latte, Maccarese (RM)

L'autunno 2003 è stato caratterizzato dalla "prima" emergenza aflatossine. In seguito alla contaminazione degli alimenti ad uso zootecnico, il livello di Aflatossina M1 nel latte ha superato, in alcuni casi, il limite di legge (0,05 ppb). Conseguentemente è "esplosa" la richiesta di analisi che ha spinto i laboratori a dotarsi della strumentazione necessaria alla determinazione dell'Aflatossina M1 sia con metodi di screening che con HPLC.

L'Associazione Italiana Allevatori, con il proprio Laboratorio Standard Latte, ha organizzato, già dal novembre 2003, il primo confronto interlaboratorio (Proficiency Test) a livello nazionale, con lo scopo di consentire ai laboratori di valutare la propria precisione analitica. Questo primo Proficiency Test ha coinvolto 32 laboratori che hanno utilizzato kit immunoenzimatici. Nel secondo, organizzato a dicembre 2003, i campioni sono stati analizzati sia con metodica ELISA (40 laboratori partecipanti con 45 kit) che con il metodo di riferimento HPLC (25 laboratori partecipanti). Il confronto tra le due prove interlaboratorio, denota un miglioramento della ripetibilità (da 6,1 ppt nel primo a 4,2 ppt nel secondo per un livello di 25 ppt, e da 9 ppt a 5,6 ppt per un livello di 50 ppt). La riproducibilità invece ha presentato valori invariati per il campione a 25 ppt e un miglioramento per il livello a 50ppt (da 35,9 ppt a 16,7 ppt). A seguito delle indicazioni fornite dal seminario "Emergenza Aflatossine" organizzato a gennaio 2004 dall'A.I.A. con 78 partecipanti in rappresentanza di 47 laboratori, è stato organizzato il terzo proficiency test, ELISA (36 laboratori, di cui 4 esteri, con 46 kit) e HPLC (20 partecipanti). In quest'ultimo, il confronto tra le due metodiche denota una sovrastima rispetto al valore di riferimento da parte dei kit immunoenzimatici, e, nonostante l'HPLC presenti un valore di ripetibilità migliore, la riproducibilità dei due metodi di analisi risulta pressoché identica. I risultati dei Proficiency Test evidenziano una notevole variabilità e difficoltà nella standardizzazione dei metodi, rendendo chiara la necessità dell'utilizzo di materiali di riferimento e il confronto continuo con altri laboratori. Grazie alla validazione dell'ultimo Proficiency Test, il Laboratorio Standard Latte ha, quindi, realizzato campioni a titolo noto di Aflatossina M1 per il controllo della qualità delle analisi per ELISA.

DETERMINAZIONE DELL'AFLATOSSINA M1 NEI FORMAGGI: NUOVO METODO ENZIMATICO DI ESTRAZIONE

Amedeo Pietri, Terenzio Bertuzzi, Paola Fortunati, Gianfranco Piva
*Istituto di Scienze degli Alimenti e della Nutrizione, Facoltà di Agraria, Università
Cattolica del S. Cuore, Piacenza.*

Nella produzione di formaggi con latte contaminato, l'Aflatossina M1 (AFM1) si ripartisce tra cagliata e siero, ma l'associazione con la caseina (interazione idrofobica) causa una più elevata concentrazione nel formaggio rispetto al latte utilizzato; i fattori di arricchimento calcolati vanno da 2,5-3,3 per i formaggi teneri a 3,9-5,8 per i duri. La metodica usualmente utilizzata per determinare la concentrazione di AFM1 nei formaggi (es. AOAC), prevede l'uso di cloroformio per l'estrazione della tossina dal campione grattugiato. Con l'avvento delle colonne di immunoaffinità (IA) per la purificazione, in sostituzione di altre colonne basate su fasi stazionarie convenzionali, il metodo è stato adattato; si evapora il cloroformio sotto vuoto e si riprende l'estratto con metanolo, acqua ed esano, in modo da recuperare con imbuto separatore l'AFM1 nella fase idroalcolica ed eliminare il grasso con l'esano. Quindi si effettua la purificazione su colonna di IA e la quantificazione mediante HPLC con rivelazione fluorimetrica. Questo metodo, anche se laborioso, ha evidenziato una buona precisione, un buon recupero e un basso limite di rivelazione. Tuttavia, non è certo che il cloroformio sia in grado di estrarre completamente l'AFM1 legata alla caseina.

Scopo del lavoro è stato quello di mettere a punto una tecnica di estrazione alternativa, utilizzando un'idrolisi enzimatica con pepsina per degradare le proteine del formaggio e liberare nella fase acquosa l'AFM1 legata alla caseina.

Il metodo prevede un attacco enzimatico con pepsina allo 0,2% in HCl 0,1N, per 16 ore a 42 °C, su 5 g di formaggio grattugiato; successivamente, la soluzione viene centrifugata, filtrata e portata a pH 7,5 con NaOH 1N. Tutto il filtrato viene fatto passare su colonna di IA e, dopo lavaggio con acqua, l'AFM1 viene eluita con metanolo. Sono state effettuate analisi su numerosi campioni di formaggio, sia utilizzando il metodo convenzionale che il nuovo metodo. Nei formaggi a lunga stagionatura il metodo enzimatico fornisce valori di AFM1 superiori anche del 50% rispetto all'estrazione con cloroformio. Valori più elevati, tra il 7 e il 30%, sono stati ottenuti anche nei formaggi a breve e media stagionatura (da 1 a 8 mesi). Invece, prove effettuate con i due metodi su cagliate, mozzarelle e latte, hanno dato risultati equivalenti. Probabilmente, i valori inferiori di AFM1 ottenuti con il metodo convenzionale nei formaggi a media-lunga stagionatura, sono da ricondurre all'interazione tra la tossina e la caseina, che non permette una totale estrazione da parte del cloroformio da una struttura compatta. In conclusione, il metodo proposto è senza dubbio preferibile, perché ha dimostrato una buona precisione, una migliore accuratezza, è meno laborioso, non presenta punti critici durante l'analisi ed evita l'uso di solventi tossici.

DETERMINAZIONE DELL'OCRATOSSINA IN PRODOTTI CARNEI: NUOVO METODO ENZIMATICO DI ESTRAZIONE

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

La presenza di Ocratossina A (OTA) nelle carni e prodotti derivati può essere dovuta all'ingestione di alimenti contaminati da parte degli animali e successiva deposizione nei tessuti, o alla contaminazione diretta da muffe produttrici di OTA durante la stagionatura. I dati a disposizione per alcuni tipi di prodotti stagionati, denotano una contaminazione diffusa, con un livello medio non molto inferiore al valore guida previsto dalla normativa italiana (1 µg/kg). La metodica comunemente utilizzata per determinare la quantità di OTA in prodotti carnei, prevede: un'estrazione con cloroformio, una riestrazione della tossina in fase acquosa alcalina (NaHCO₃) in imbuto separatore, una purificazione dell'estratto con colonne di immunoaffinità e una quantificazione mediante HPLC con rivelazione fluorimetrica. Questo metodo richiede tempi di analisi abbastanza lunghi e presenta difficoltà operative di estrazione per la complessità della matrice, anche se ha evidenziato una buona precisione, un buon recupero e un basso limite di rivelazione.

Scopo del presente lavoro è stato quello di mettere a punto una nuova procedura di estrazione, che prevede un'idrolisi con enzimi proteolitici in grado di degradare la matrice carnea; il nuovo metodo elimina le fasi di estrazione con cloroformio e di ripartizione con la soluzione acquosa alcalina.

Il metodo prevede un attacco enzimatico con pancreatina all'1% in tampone fosfato 0,2 M a pH 7,5 per 3 ore a 37 °C; successivamente, la soluzione viene centrifugata e filtrata. Un'aliquota, diluita con tampone fosfato, viene fatta passare su colonna ad immunoaffinità e, dopo lavaggio con acqua, l'OTA è eluita con metanolo acido per acido acetico al 2%. Il metodo ha evidenziato una percentuale di recupero attorno al 95% e una buona ripetibilità.

Sono state effettuate analisi su campioni di carne suina fresca, salami e prosciutti a diversa stagionatura, tutti naturalmente contaminati, sia con il metodo enzimatico che con l'estrazione con cloroformio. Data l'eterogeneità della contaminazione (specialmente nel caso dei prodotti stagionati), al campione, dopo la macinazione, è stata aggiunta lentamente acqua sotto continua miscelazione (fino al 65% di umidità), al fine di ottenere un "omogeneizzato" o "slurry"; un'aliquota (5 g) del campione così preparato, è stata quindi sottoposta ad analisi con i due metodi. I risultati ottenuti hanno dimostrato che i due metodi forniscono valori analoghi, solo leggermente superiori per l'estrazione con idrolisi enzimatica. In conclusione, il metodo proposto è senza dubbio preferibile, perché è meno laborioso, non presenta punti critici durante l'analisi ed evita l'uso di solventi tossici.

DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DI AFLATOSSINA M1 NEL LATTE BOVINO: CORRELAZIONE TRA METODO IMMUNOENZIMATICO (ELISA) E CROMATOGRAFICO (HPLC-FLD)

Andrea Borsari, Paolo Rosi; Alessia Fava, Alessia Galanti, Sandro Lodi
Granarolo SpA, Bologna

Granarolo SpA ha introdotto dal 1998 un monitoraggio della presenza di Aflatossina M1 nel latte bovino; adottando la tecnica immunoenzimatica ELISA, in quanto di semplice esecuzione, rapida e adatta per un monitoraggio costante del latte in entrata agli stabilimenti del gruppo. La contaminazione da Aflatossina B1 del mais raccolto nell'annata 2003, ha provocato un innalzamento del contenuto di M1 nel latte con la possibilità di avere superamenti del limite di legge. A fronte di un'intensificazione dei valori irregolari riscontrati e alla conseguente necessità di escludere rapidamente tali partite, è sorta l'esigenza di convalidare il metodo ELISA attraverso un confronto diretto con il metodo di riferimento HPLC in modo da utilizzare i risultati del controllo routinario per i provvedimenti di emergenza. Nell'ambito del piano di autocontrollo di Granarolo SpA sul latte conferito e sui propri prodotti, nel periodo dal settembre 2003 a luglio 2004, il laboratorio centrale di Bologna ha analizzato 15000 campioni con il metodo immunoenzimatico: in questo studio di validazione del metodo immunoenzimatico oltre 400 campioni di latte crudo naturalmente contaminato da M1 sono stati analizzati con metodo HPLC. Durante tutto il periodo considerato e al termine dello studio si è andato a verificare la correlazione esistente fra le coppie di dati ottenuti con i due metodi utilizzando un'analisi di regressione lineare: la significatività statistica della correlazione è stata testata con un'analisi della varianza dimostrando una relazione significativa al 99% di confidenza. L'elaborazione cumulativa delle 340 coppie di dati, su tutto il range analitico (0-100 ppt) fornisce l'equazione $Y=1,07X+5,4$ dove Y rappresenta la risposta del kit immunoenzimatico, e X quella del sistema cromatografico, con un indice di correlazione di 0,78. Anche restringendo il range di interesse (0-60 ppt) si ottiene una correlazione sostanzialmente analoga a quella già osservata, e il coefficiente di correlazione rimane di 0,72. Per verificare la linearità della relazione si è ricorso anche a metodi di regressione polinomiale, l'applicazione di tale modello non ha apportato un effettivo miglioramento della correlazione. Sempre con lo scopo di valutare le performance del metodo immunoenzimatico, sono state sottoposte ad analisi con le due metodiche otto aliquote di latte artificialmente contaminato da M1 nel range analitico 0-100 ppt, allestite partendo da latte termizzato non omogeneizzato di provenienza estera (conc.M1 <3ppt). La relazione fra le risposte sperimentali così ottenuta è quasi identica a quella già riscontrata nello studio condotto su latti naturalmente contaminati ($Y=1,05X+1,90$) con un indice di correlazione di 0,97. Dal momento che per il metodo cromatografico, la valutazione del recupero della M1 viene eseguita su ogni singolo campione tramite l'aggiunta di Aflatossina B2, normalmente non riscontrabile nel latte, questo studio ha permesso di confrontare i recuperi dei due analiti in esame. I valori di recupero medio appaiono molto vicini (100-98%) confermando così la scelta dell'utilizzo della Aflatossina B2 come standard esterno.

METODO DI ANALISI PER LA DETERMINAZIONE DI FUMONISINE E AAL-TOSSINE IN COLTURE DI *ALTERNARIA ALTERNATA*

Michele Solfrizzo, Annalisa De Girolamo, Carolina Vitti e Angelo Visconti
Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, CNR, Bari

Tra le diverse specie di *Alternaria*, funghi largamente distribuiti nei prodotti agro-alimentari, *A. alternata* è la specie più diffusa e produce numerosi metaboliti secondari con attività tossica su animali e/o su piante. Il profilo tossigenico di questi funghi è ben noto per quanto riguarda la produzione di micotossine quali acido tenuazonico, alternarioli e altertossine mentre non si hanno dati certi sulla produzione di AAL-tossine e fumonisine. In particolare, mentre è risaputo che *A. alternata* f. sp. *lycopersici* produce AAL-tossine, fitotossine ospite-specifiche per il pomodoro, solo in un caso (per il ceppo NRRL 18822) è stata riportata anche la produzione di fumonisine.

Nel nostro laboratorio è stato sviluppato un metodo HPLC per la determinazione simultanea di fumonisine (FB1 e FB2) e AAL-tossine (TA1 e TA2) in colture di *A. alternata* isolati da carota, prezzemolo, pomodoro e sedano. Le fumonisine e le AAL-tossine sono state estratte dalle colture di *A. alternata* accresciute su riso con una miscela di acetonitrile:acqua (50:50) a pH 3. Dopo filtrazione l'estratto è stato purificato su colonnine Oasis HLB e successivamente derivatizzato con reagente OPA e analizzato in cromatografia liquida a fase inversa con rivelazione spettrofluorimetrica. Come fase mobile è stata utilizzata una miscela isocratica di acetonitrile:tampone fosfato (43:57) a pH 3,35, la cui composizione è stata ottenuta con l'ausilio di un software di ottimizzazione della fase mobile (Drylab).

I tempi di ritenzione di TA2, TA1, FB1 e FB2 sono risultati rispettivamente di 6,0, 6,6, 12,5 e 37,2 min. Gli esperimenti condotti su campioni di riso fortificati con fumonisine e AAL-tossine a livelli compresi tra 0,5 e 5 µg/g hanno dato recuperi medi superiori al 70% e valori medi di ripetibilità compresi tra 8 e 26%. Il limite di quantificazione è risultato pari a 0,1 µg/g per le AAL-tossine e la FB1 e 0,5 µg/g per la FB2.

Dei nove ceppi di *A. alternata* testati, quello isolato da pomodoro (NRRL 18822) è risultato produttore di AAL-tossine (1450 µg/g) ma contrariamente a quanto riportato in letteratura non di fumonisine. La non produzione di fumonisine da parte di questo ceppo è stata confermata attraverso la purificazione dell'estratto colturale su colonnina ad immunoaffinità che, oltre ad essere specifica per le fumonisine, ha permesso di ottenere un basso limite di rivelabilità (0,01 µg/g). Gli altri otto ceppi testati non hanno prodotto fumonisine e AAL-tossine bensì elevate quantità di acido tenuazonico (fino a 9722 µg/g), alternarioli (fino a 873 µg/g) e altertossina I (fino a 48 µg/g).

METODOLOGIA D'INDAGINE SU CAMPIONI DI FARINA DI MAIS PER LA RICERCA DI FUMONISINE

Alberto Carniel (a), Sandro Ceccone (a), Bruno Bresin (a) e Clara Zuch (b)

(a) *Dipartimento di Pordenone ARPA Friuli Venezia Giulia*

(b) *Direzione Centrale della Salute, Regione Friuli-Venezia Giulia, Trieste*

A seguito di allerta alimentare da parte della CE, è emersa la necessità di ampliare, nell'ambito del "programma ufficiale alimenti – anno 2004" della Regione Friuli Venezia Giulia, l'analisi delle micotossine con particolare attenzione alle fumonisine e loro derivati, in modo da verificare da un lato la situazione attuale e sorvegliare dall'altro costantemente nel tempo l'incidenza di tale problematica.

Dato che la contaminazione del granoturco da parte dei funghi *Fusarium* può portare alla formazione di fumonisine in concentrazioni anche molto elevate, la cui ingestione può essere causa di patologia nell'uomo, nel programma regionale è stato aumentato il numero delle analisi sulla farina di mais.

Sono stati eseguiti, finora, 48 campioni, di cui 35 di farina di mais per polenta e 13 di farina precotta; il 38% del totale dei campioni era di produzione regionale.

Per meglio coordinare l'attività si è concentrato il periodo di campionamento nei mesi di maggio e giugno 2004. I prelievi sono stati effettuati dalle Aziende per i Servizi Sanitari della Regione, i campioni sono stati così distribuiti: 6 per l'ASS n. 1 "Triestina", 5 per l'ASS n. 2 "Isontina", 4 per l'ASS n. 3 "Alto Friuli", 8 per l'ASS n. 4 "Medio Friuli", 3 per l'ASS n. 5 "Bassa Friulana", 22 per l'ASS n. 6 "Friuli Occidentale".

Si sottolinea, inoltre, che i campioni di farina sono stati analizzati non solo per la ricerca di fumonisine B1 e B2, ma anche per i seguenti parametri analitici: muffe (identificazione della specie *Fusarium*), lieviti, DNA eterologo, residui di insetticidi fosforati, attività dell'acqua, umidità e acidità.

I metodi di analisi strumentale sono stati la cromatografia liquida con rivelatore a selettore di massa e la partecipazione a Circuiti di Intercalibrazione Internazionali FAPAS.

Dato che i limiti per le fumonisine non sono posti né dalla normativa europea, né da quella nazionale, si sono presi come valori di riferimento i limiti posti dalla normativa svizzera e precisamente 1 mg/kg.

I dati raccolti sono in fase di elaborazione.

NUOVI METODI LC-MS PER LA DETERMINAZIONE DI TRICOTECENI E ZEARALENONE NEGLI ALIMENTI

Stefano Sforza, Chiara Dall'Asta, Gianni Galaverna, Alessandra Moseriti,
Arnaldo Dossena, Rosangela Marchelli
Dipartimento di Chimica Organica ed Industriale, Università di Parma, Parma

La cromatografia accoppiata alla rivelazione con spettrometria di massa è la tecnica analitica di elezione per la determinazione di composti privi di gruppi cromofori o fluorofori caratteristici che rendano possibile l'applicazione delle comuni tecniche HPLC-UV o HPLC-FLD.

Viene presentato un metodo LC-ESI-MS per la determinazione simultanea di tricoteceni di tipo A e di tipo B e un metodo LC-ESI-MS per la determinazione di zearalenone insieme a due dei suoi metaboliti principale, l' α - ed il β -zearalenolo:

Tricoteceni. Il metodo sviluppato nel nostro gruppo di ricerca si basa sulla capacità dei tricoteceni A e B di formare addotti molto stabili con il sodio. Pertanto, si è scelto di utilizzare NaCl come agente cationizzante direttamente disciolto nella fase mobile.

Il metodo sviluppato ha permesso per la prima volta l'analisi multiresiduale di 4 tricoteceni di tipo A (DAS, T-2, HT-2, NEO) e 4 tricoteceni di tipo B (DON, 15-ADON, NIV, FUS-X), ottenendo limiti di rivelazione paragonabili alle tecniche LC-MS/MS comunemente usate e un'accuratezza, valutata mediante analisi di una matrice di riferimento certificata, molto elevata.

Zearalenone. Per quanto riguarda lo zearalenone, il lavoro attualmente svolto nel nostro gruppo di ricerca è volto allo sviluppo di una metodica in grado di fornire buoni risultati in assenza di purificazione del campione.

A tale scopo è stata ideata una nuova tecnica di derivatizzazione isotopica, da noi denominata *Alternate Isotope-coded Derivatization (AID)*, che prevede l'utilizzo di una derivatizzazione con un reagente presente in commercio nelle due forme isotopiche. In particolare, la derivatizzazione è stata condotta su soluzione standard di ZON con reagente isotopicamente leggero (H) e in matrice contenente l'analita con reagente isotopicamente pesante (D). Le due soluzioni sono quindi state miscelate in proporzioni note, affinché lo ZON marcato *light* fungesse da standard interno per lo ZON marcato *heavy*. Allo stesso modo, la procedura è stata ripetuta marcando lo standard con reagente *heavy* e l'analita con reagente *light*. Gli esperimenti effettuati indicano che utilizzando questa procedura è possibile effettuare una quantificazione accurata dello zearalenone in matrice, evitando i possibili artefatti dovuti alla reazione di derivatizzazione.

Il metodo ha permesso la quantificazione dello ZON in farina, presentando una buona accuratezza e risultati paragonabili a quelli ottenuti mediante analisi HPLC-FLD degli stessi campioni.

NUOVI METODI HPLC-FLD PER LA DETERMINAZIONE DI AFLATOSSINE, OCRATOSSINA, TRICOTECENI NEGLI ALIMENTI

Chiara Dall'Asta, Gianni Galaverna, Stefano Sforza, Arnaldo Dossena,
Rosangela Marchelli

Dipartimento di Chimica Organica ed Industriale, Università di Parma Parma

Nella presente comunicazione verranno presentate diverse ricerche condotte nel nostro gruppo che hanno avuto l'obiettivo comune di aumentare la sensibilità della rivelazione in fluorescenza accoppiata ad un sistema cromatografico HPLC per micotossine naturalmente fluorescenti (aflatossine, Ocratossina A) o di rendere fluorescenti mediante derivatizzazione micotossine non naturalmente fluorescenti (tricoteceni):

Aflatossine. La bassa intensità di fluorescenza delle aflatossine B1 e G1 rende in genere problematica la loro rivelazione tramite HPLC-FLD. Nel metodo sviluppato nel nostro gruppo è stata utilizzata succinil- β -ciclodestrina aggiunta all'eluente HPLC come "fluorescence enhancer" per queste due micotossine, permettendo quindi di abbassare il limite di rivelazione.

Ocratossina A. Anche in questo caso la bassa intensità naturale di fluorescenza di questa molecola non ne facilita la determinazione in miscele complesse. Tuttavia questa fluorescenza può essere aumentata di circa un ordine di grandezza portandosi a pH lievemente basici (>8), che provocano la deprotonazione del gruppo fenolico contenuto nella molecola. Conducendo quindi le analisi HPLC a pH 9 si è notato un incremento di 7 volte nell'intensità della risposta [3].

Tricoteceni. Il problema maggiore legato alla determinazione di tricoteceni negli alimenti è la scelta della tecnica di rivelazione, in quanto essi non presentano alcun gruppo cromoforo o fluoroforo caratteristico. Mentre i tricoteceni di tipo B possono essere analizzati mediante HPLC-UV con rivelazione a 230 nm, per i tricoteceni di tipo A sono stati proposti diversi metodi di derivatizzazione con gruppi fluorofori. Nessuno di essi ha però permesso finora la simultanea determinazione di entrambe le classi di composti. Nel presente lavoro è stata studiata la reazione di derivatizzazione, ottimizzandone i parametri (solvente, tempo, temperatura, base, rapporti molari) in modo da renderla applicabile anche ai più polari tricoteceni di tipo B. I derivati fluorescenti ottenuti sono stati univocamente caratterizzati mediante analisi LC-ESI-MS ed è stata valutata la riproducibilità della reazione. Infine, è stata sviluppata una metodica HPLC-FLD che permette per la prima volta la determinazione simultanea di 3 tricoteceni di tipo A (DAS, T-2, HT-2) e 5 tricoteceni di tipo B (DON, NIV, FUS-X, 3-ADON, 15-ADON), con buoni limiti di rivelazione, ripetibilità *intra-* e *interday*, recupero e accuratezza. Tale metodo è stato applicato con successo all'analisi di una matrice di riferimento certificata, ottenendo un'ottima correlazione con il valore di riferimento indicato. Infine, il metodo è stato applicato all'analisi di campioni naturalmente contaminati di grano duro e di mais destinato all'alimentazione umana o alla produzione di mangimi animali.

INDICE DEGLI AUTORI

- Abete, M. C.; 33; 59
Agugiario, D.; 89
Alesso, F.; 53
Ammida, N.; 91
Amodeo, P.; 65
Anfossi, L.; 43
Angelini, S.; 8
Antonelli, M. L.; 90
Avantaggiato, G.; 47
Babini, V.; 48
Bacaloni, A.; 89
Baggiani, C.; 43
Balconi, C.; 31; 50
Baldini, M.; 52; 86
Balzano, D.; 41
Barbano, C.; 85
Barontini, A.; 60
Bassi, E.; 26
Battilani, P.; 3; 18; 49; 85; 86
Battistelli, M.; 54; 55; 69
Berardo, N.; 31; 50; 52; 86
Bergamini, C.; 16
Bernabucci, U.; 21; 88
Bertetto, L.; 64
Bertoli, A.; 60
Bertollo, F. M.; 87
Bertuzzi, T.; 15; 18; 49; 85; 94; 95
Besia, G.; 26
Biancardi, A.; 28
Blandino, M.; 27
Boccaccino, B.; 80
Bocchini, A.; 14
Bodda, M.; 53
Boni, P.; 28
Borgo, M.; 34
Borsari, A.; 76; 96
Bortolotti, M.; 73; 77
Bottalico, A.; 19
Branca, P.; 53
Brera, C.; 8; 10; 37; 58
Bresin, B.; 98
Brusa, F.; 59
Cagnasso, P.; 26
Camoriano, A.; 57
Campagna, A.; 57
Campagna, C.; 79
Canever, A.; 63
Cantelli Forti, G.; 7
Caputo, L.; 30
Carniel, A.; 98
Casagrandi, M.; 56; 73; 74
Casarini, E.; 66
Castoria, R.; 30
Cavaliere, C.; 89; 90
Cavallucci, C.; 54; 55; 69
Cecchini, F.; 61; 80
Ceccone, S.; 98
Cereti, C. F.; 88
Charpentier, B.; 68
Ciacciarelli, S.; 53
Cinti, F.; 56; 73; 74; 77
Coluccia, S.; 53
Comizzoli, S.; 9
Conti, E.; 50
Corticelli, C.; 20
Cotroneo, E.; 91
Dall'Asta, C.; 99; 100
Daminelli, P.; 28
Danieli, P. P.; 88
Danieli, P.P.; 21
De Cicco, V.; 30
De Curtis, F.; 30
De Girolamo, A.; 97
De Mattia, M.; 57
De Santis, B.; 8; 58
Debegnach, F.; 8; 10; 58
Decastelli, L.; 33; 59; 62
Della Monica, F.; 54; 55; 69
Donnini, R.; 57
Dossena, A.; 99; 100
Dragoni, E.; 87
Fabbri, A.A.; 17
Faber, A.; 38; 90
Fago, G.; 38; 90
Falsetta, G.; 33
Fanelli, C.; 17
Farre, A.; 57
Fascioli, R.; 60
Fava, A.; 96
Ferracane, R.; 41
Ferro, G. L.; 42; 62
Finazzi, G.; 28
Fioriti, E.; 54; 55; 69
Foglia, P.; 38; 89

Forlani, F.; 31
 Formenti, S.; 18; 49
 Fortunati, P.; 94
 Fumi, M. D.; 75
 Galanti, A.; 96
 Galaverna, G.; 99; 100
 Gallina, S.; 33; 62
 Gandolfi, I.; 26
 Garcia Moruno, E.; 34; 61; 80
 Garnero, M.; 53
 Gaspari, F.; 74; 76; 77
 Gavinelli, S.; 33
 Géliot, P.; 78
 Giangolini, G.; 21
 Giontella, D.; 21
 Giorni, P.; 18; 49
 Giovannoli, C.; 43
 Giraudi, G.; 43
 Gradassi, L.; 87
 Gramaglia, M.; 42; 62
 Grandi, S.; 56; 63
 Grossi, S.; 8
 Grozeva, K.; 66
 Gruppioni, N.; 16
 Gualdi, L.; 31; 50
 Gualla, A.; 95
 Guarcello, M.; 9
 Haidukowski, M.; 39; 79
 Havenaar, R.; 47
 Innocenti, G.; 48
 Laganà, A.; 38; 89; 90
 Lai, J.; 59
 Lanzanova, C.; 31; 50
 Lobrano, M.; 57
 Lodi, S.; 96
 Logrieco, A.; 19; 41
 Lucantoni, A.; 57
 Lupotto, E.; 31; 50
 Maccarini, L.; 9
 Maggiore, T.; 52; 86
 Magnani, B.; 93
 Maiorano, A.; 27
 Mammoliti, L.; 53
 Marabelli, R.; 13
 Marchelli, R.; 99; 100
 Marellò, G.; 42
 Marocco, A.; 86
 Mazzetti, M.; 60
 Menna, V.; 16
 Messori, A.; 26
 Micheli, L.; 91
 Miele, S.; 52; 86
 Migni, M.; 54; 55; 69
 Millone, A.; 33
 Minardi, V.; 10
 Miraglia, M.; 4; 8; 10; 58
 Modena, C.; 59
 Mofferdin, A.; 57
 Mogliotti, P.; 59
 Monaco, L.; 93
 Morassut, M.; 61; 80
 Morelli, I.; 60
 Morena, V.; 30
 Moretti, A.; 19; 92
 Moscone, D.; 91
 Moseriti, A.; 99
 Motto, M.; 31; 50
 Mulè, G.; 92
 Nachtmann, C.; 42; 59; 62
 O'Sullivan, D.; 78
 Paggi, U.; 93
 Paleologo, M.; 40
 Palleschi, G.; 91
 Pancaldi, D.; 79
 Pancioni, S.; 87
 Panfili, G.; 30
 Pascale, M.; 39; 79
 Pastorini, E.; 38; 89
 Pazzaglini, B.; 10
 Peila, U.; 64
 Perrone, G.; 79; 92
 Piccaglia, R.; 48; 63; 76
 Piccin, E.; 33
 Piermarini, S.; 91
 Pietri, A.; 3; 9; 15; 18; 49; 85; 86; 94; 95
 Pinelli, C.; 26
 Piro, R.; 28
 Pisacane, V.; 50; 52; 86
 Piva, G.; 3; 9; 94; 95
 Rastelli, M.; 42; 59; 62
 Rastelli, S.; 15
 Reyneri, A.; 27; 64
 Ricci, F.; 53
 Ritieni, A.; 19; 41
 Rizzi, N.; 65
 Roggi, C.; 9
 Romagnoli, B.; 16
 Ronchi, B.; 21; 88
 Rosi, P.; 96
 Rossi, D.; 25
 Rossi, V.; 49; 85; 86
 Rossini, F.; 88

Salera, E.; 52; 86
Samperi, R.; 38; 89; 90
Savino, M.; 34; 61; 80
Scandolara, A.; 49; 86
Schianchi, L.; 26
Sforza, S.; 99; 100
Sillari, L.; 66
Silva, A.; 81
Snidaro, M.; 67
Solfrizzo, M.; 97
Spinelli, G.; 60
Tafuri, A.; 41
Tampieri, A.; 76
Tanzi, F.; 68
Terni, L.; 54; 55; 69
Tozzi, C.; 43

Transerici, E.; 63
Triulzi, T.; 31
Turconi, G.; 9
Valoti, P.; 50
Vanara, F.; 27; 64
Vannozi, G.; 52; 86
Venè, F.; 26
Verderio, A.; 20
Villari, C.; 54; 55; 69
Visconti, A.; 39; 47; 79; 97
Vitti, C.; 97
Zanetti, M.; 15
Zaniboni, A.; 66
Zucchi, M.; 29
Zuch, C.; 98

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN
a stampa o online deve essere preventivamente autorizzata.
Le richieste possono essere inviate a: pubblicazioni@jss.it.*

*Stampato da Ditta Grafiche Chicca & C. snc
Via di Villa Braschi 143, 00019 Tivoli (Roma)*

Roma, settembre 2004 (n. 3) 11° Suppl.