

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"**

**DIPARTIMENTO DI MEDICINA VETERINARIA  
E PRODUZIONI ANIMALI**

*Dottorato di Ricerca in Produzione e Sanità degli alimenti di origine animale*

**TESI**

**Aflatossine e Ocratossina A negli alimenti di origine  
vegetale e negli alimenti ad uso zootecnico: valutazione dei  
rischi e metodi analitici per la determinazione**

Relatore

Chiar.<sup>ma</sup> Prof.ssa M.Luisa Cortesi

Candidata

Daniela Capozzo

Co-relatore

Dott.Vittorio Soprano

Anno Accademico 2013-2014

# INDICE

1. Introduzione
  
2. Aspetti tossicologici per gli animali e per l'uomo
  - 2.1 Effetti sugli animali
  - 2.2 Rischi per l'uomo
  
3. Le Micotossine
  - 3.1 Aflatossine B,G
  - 3.2 Ocratossine
  - 3.3 Zearalenone
  - 3.4 Deossinivalenolo
  - *Generalità*
  - *Fattori che ne influenzano la produzione*
  - *Legislazione e Livelli massimi tollerabili*
  
4. Tecniche analitiche usate per la determinazione
  - 4.1 HPLC con rilevatore fluorimetrico
  
5. Determinazioni delle micotossine
  - 5.1 Scelta dei metodi di analisi
  - 5.2 Metodi di determinazione

### 5.3 DETERMINAZIONE DELLE AFLATOSSINE B1, B2, G1 E G2 NEGLI ALIMENTI DI ORIGINE VEGETALE MEDIANTE HPLC CON RIVELATORE FLUORIMETRICO

- *Apparecchiature e materiali*
- *Esecuzione della prova*
- *Espressione dei risultati*

### 5.4 DETERMINAZIONE DELL'OCRATOSSINA A NEGLI ALIMENTI DI ORIGINE VEGETALE MEDIANTE HPLC

- *Apparecchiature e materiali*
- *Esecuzione della prova*
- *Espressione dei risultati*

## 6. Validazione dei metodi di prova

6.1 Validazione mediante circuiti inter-laboratorio

6.2 Validazione mediante studi intra- laboratorio

7. Risultati

8. Conclusioni

9. Bibliografia

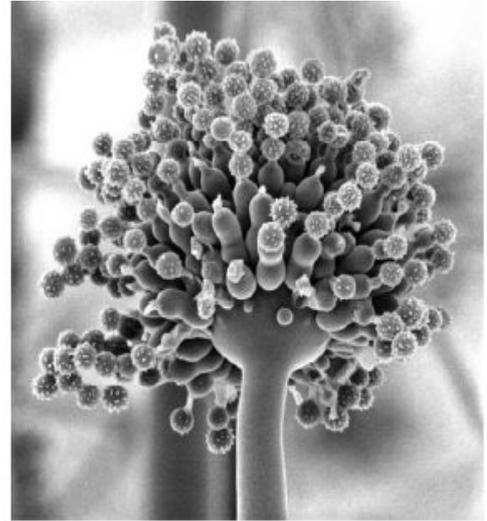
# 1. Introduzione

Il problema dei residui tossici nei prodotti alimentari ha assunto notevole rilievo in tema di sicurezza alimentare. In particolare, il monitoraggio di contaminanti di derivazione “naturale”, quali le micotossine<sup>(17)</sup>, è diventato un controllo di routine per l’industria agro-alimentare.

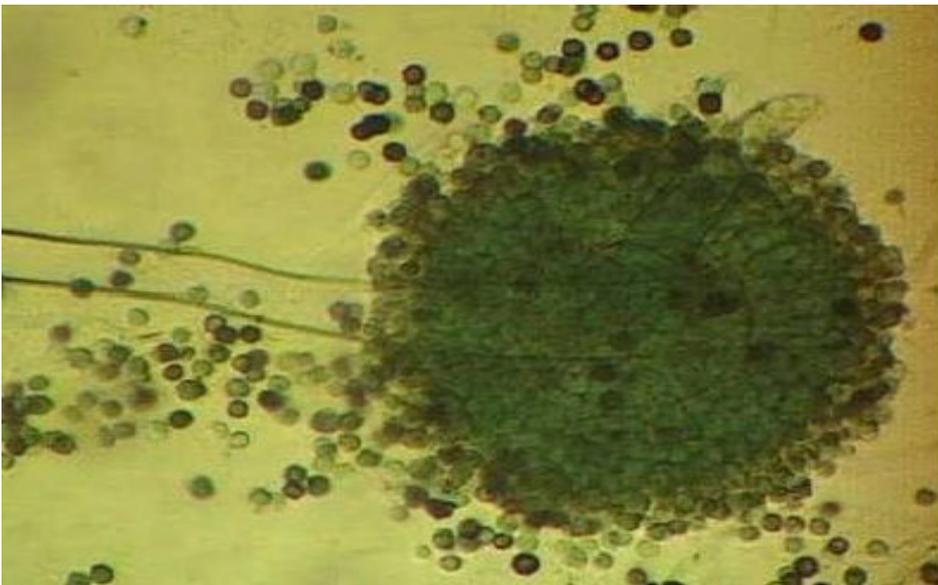
Le micotossine rappresentano un gruppo eterogeneo di sostanze chimiche prodotte naturalmente da alcune specie di funghi<sup>(19)</sup> che appartengono per la maggior parte a tre generi molto diffusi (*Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*).

Non costituiscono una classe chimica in quanto hanno tra loro strutture differenti essendo prodotte da specie o da ceppi diversi della stessa specie fungina.

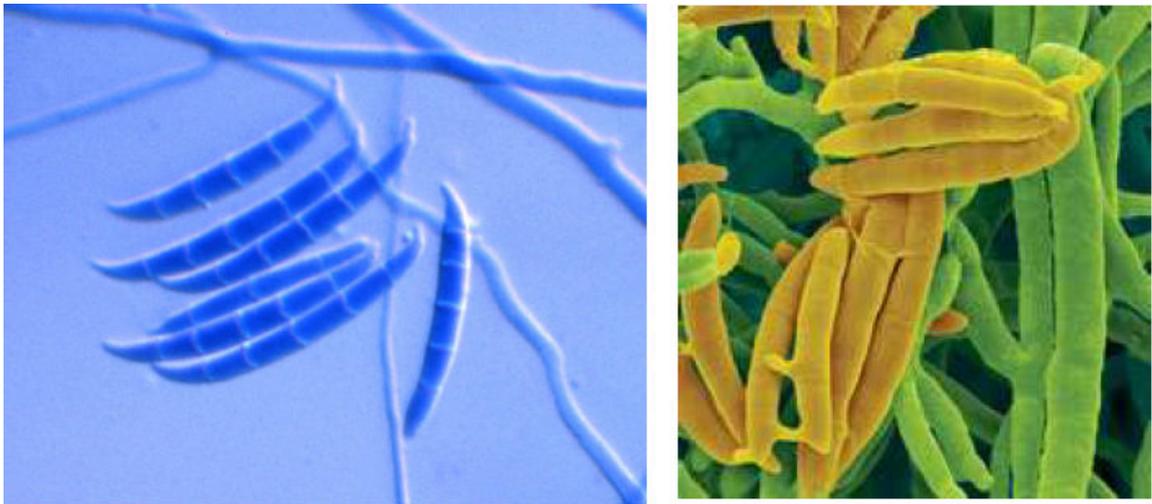
I generi fungini maggiormente interessati alla produzione di tali tossine sono l’*Aspergillus* (produttore delle Aflatossine), il *Fusarium* (produttore di Zearalenone e di Tricoteceni), e il *Penicillium*<sup>(14)</sup> (produttore di Ocratossina e Patulina).



*Immagini di Aspergillus Flavus*



*Aspergillus Carbonarius*



**Immagini di *Fusarium***

Le micotossine si differenziano dalle tossine batteriche in quanto hanno basso peso molecolare, hanno natura lipofilica e possono vivere in molti tipi di ambienti, adattandosi bene ad un ampio intervallo di temperature e in presenza di un tenore di umidità elevata. Il loro aspetto pulverulento di colore bianco, verdastro o nero è dovuto ad una fitta rete di filamenti e di sporangi, i contenitori delle spore, che invade l'ospite infiltrandosi in modo capillare. Solo ad un certo punto del loro sviluppo e con condizioni ambientali particolari, i filamenti si riproducono attraverso la produzione di un corpo fruttifero, lo sporangio, dalle cui spore avranno origine nuovi individui. Lo sviluppo di funghi e la formazione di micotossine sono possibili già quando una pianta coltivata si trova ancora in campo, e poi in tutte le successive fasi di conservazione e trasformazione.

Ci sono materie prime che per composizione e zona di origine sono maggiormente suscettibili di contaminazione<sup>(17)</sup>. Si tratta di tutti i cereali(mais, frumento, orzo, avena, segale), i semi oleaginosi(arachidi, girasole, semi di

cotone), la frutta secca ed essiccata (mandorle, noci, nocciole, fichi secchi), i semi di cacao e di caffè, le spezie come il peperoncino, il pepe, lo zenzero, la frutta e la verdura. Sono di conseguenza suscettibili di contaminazione alcuni prodotti derivati da queste materie prime: per esempio farine ad uso umano e animale, derivati dei semi oleaginosi, prodotti contenenti cacao, caffè, succhi di frutta e ortaggi, latte, prodotti contenenti spezie.

Le conseguenze della presenza di contaminazioni da micotossine nelle derrate alimentari sono essenzialmente evidenti<sup>(18)</sup> negli allevamenti zootecnici dove sono osservabili sia effetti sub-acuti che cronici sulla salute degli animali ed hanno un impatto non trascurabile sulla salute umana.



**Mais contaminato da *Aspergillus***

Naturalmente l'impatto delle micotossine sulla salute dipende dalla quantità di micotossina assunta con gli alimenti, dalla tossicità del composto, dal peso corporeo dell'individuo, dalla presenza di altre micotossine e da fattori dietetici.

Per stabilire un rapporto di causalità tra l'ingestione di micotossine e una specifica malattia umana devono essere soddisfatti alcuni criteri: presenza di micotossine negli alimenti; accertata esposizione alle micotossine; correlazione fra esposizione e incidenza di una determinata malattia; riproducibilità dei caratteristici sintomi negli animali da esperimento; simile modalità di azione nell'uomo e nei modelli animali.

L'Italia è una delle nazioni europee più attenta al problema delle micotossine, tanto che la normativa italiana, in vigore dal 1999, è stata adottata nel 2001 dall'Unione Europea.

Il problema delle micotossine è anche uno di quelli più seguiti con regolarità dalle autorità sanitarie internazionali e dalla European Food Safety Authority(EFSA). L'EFSA<sup>(4)</sup> infatti elabora le valutazioni dei rischi sulle micotossine per i responsabili della gestione del rischio dell'Unione Europea, aiutandoli a valutare la necessità di misure di regolamentazione per la sicurezza degli alimenti e mangimi contaminati da micotossine.

In Particolare, l'EFSA<sup>(4)</sup> deve:

- valutare la tossicità delle micotossine per gli esseri umani e gli animali in considerazione di tutte le informazioni tossicologiche pertinenti a disposizione;
- valutare l'esposizione di esseri umani e animali sulla base dei dati ottenuti in particolare dalle attività di monitoraggio negli Stati membri dell'UE;

- considerare l'esposizione di gruppi specifici della popolazione, ad esempio lattanti e bambini, persone che seguono una dieta particolare;
- considerare l'esposizione di diverse specie animali come gli animali di fattoria, i pesci e gli animali da compagnia;
- formulare raccomandazioni sulla ricerca per la raccolta di altri dati sulle micotossine che consentano di migliorare le valutazioni del rischio;
- elaborare linee guida, destinate a quanti richiedono autorizzazioni, in merito alle modalità per eseguire la valutazione della sicurezza e dell'efficacia degli additivi per mangimi che contribuiscono alla riduzione della contaminazione da micotossine nei mangimi.

I cibi a rischio sono quelli provenienti dal Terzo Mondo, dove sono ancora applicate tecnologie primitive in regioni con clima tropicale e sub-tropicale. Nei paesi industrializzati i casi di intossicazione da micotossine sono fortunatamente rari, ma il problema richiede una continua sorveglianza.



### Are del pianeta maggiormente interessate dalla presenza di micotossine

I consumatori vengono tutelati dalle contaminazioni di micotossine dalla normativa dell'Unione Europea la quale fissa i livelli massimi<sup>(5)</sup> di queste sostanze in alimenti e mangimi per garantire che non siano nocivi per la salute umana o degli animali e mantiene i tenori di micotossina a livello più basso ragionevolmente conseguibile seguendo le buone pratiche raccomandate in materia di agricoltura, stoccaggio e lavorazione.

Le micotossine si suddividono in :

1. Aflatossine B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> e G<sub>2</sub><sup>(23)</sup> trovate in in cereali, semi oleaginosi, frutta secca e fresca, spezie;
2. Aflatossine M<sub>1</sub><sup>(22)</sup> e M<sub>2</sub> trovate nel latte e nei derivati;
3. l'Ocratossina A trovata in cereali<sup>(13)</sup>, spezie, liquirizia<sup>(10)(11)(12)</sup>, cacao, caffè, carni suine e avicole, vino, birra;

4. Deossinivalenolo<sup>(15)</sup>, T-2 e HT-2 trovato nel grano;
5. Fumosinine e lo Zearalenone trovato nel mais;
6. Patulina trovato nei succhi di mele, pere, carote.

Un'altra suddivisione tra le micotossine può essere fatta in base alla notevole gamma di effetti biologici che queste sostanze hanno interagendo con diversi organi e/o con sistemi bersaglio.

Per tale ragione esse sono classificate in:

- immunotossine: Aflatossine, Ocratossine<sup>(9)</sup> che riducono o inibiscono l'attività del sistema immunitario;
- epatotossine; Aflatossine, Fumonisine;
- nefrotossine: Ocratossine<sup>(9)</sup>;
- neurotossine: Fumonisine, che causano la morte diretta dei tessuti nervosi nel cervello amplificando la sensibilità di alcuni organi. I segni clinici sono: tremori, movimenti scoordinati, debolezza di uno o più arti, vertigini e improvviso collasso muscolare.

Sulla base del loro effetto cronico vengono invece classificate in:

- mutagene: Aflatossine;
- cancerogene: Aflatossine, Ocratossine, Fumonisine, a livello epatico, renale, polmonare, del sistema urinario e del tratto digestivo;
- teratogene: Ocratossine.

Nel corso di questi tre anni di dottorato di ricerca ci si è proposto quindi di acquisire una corposa mole di dati in modo tale da valutare l'effettiva

pericolosità di questi contaminati alimentari e di sviluppare delle idonee metodiche analitiche per la determinazione delle Aflatossine B, G e dell'Ocratossina A negli alimenti di origine vegetale ad uso umano e ad uso zootecnico, considerando che il Sistema di Allerta Rapido europeo per la Sicurezza Alimentare (RASFF) ha notificato nel solo anno 2011 ben 20 allerte per micotossine ritrovate in concentrazioni elevate in frutta a guscio, che hanno condotto alla decisione di ritiro dei prodotti dal mercato, e 398 notifiche di “border rejection” su prodotti della stessa categoria risultati contenenti quantità di micotossine superiore ai limiti previsti dalla normativa e che non hanno avuto accesso ai nostri mercati.



**Principali alimenti contaminati da micotossine**

## 2. Aspetti tossicologici per gli animali e per l'uomo

La contaminazione di cereali e semi oleaginosi da parte delle micotossine causa nel mondo perdite di miliardi di euro. Queste perdite includono anche le ridotte performance e la mortalità degli animali che vengono nutriti con mangimi contaminati. Gli effetti sulla salute umana sono meno facili da documentare, ma in alcuni Paesi in via di sviluppo dell'area tropicale, a causa delle condizioni climatiche ed economiche, la contaminazione da micotossine dei cereali è manifestamente coinvolta in diverse patologie dell'uomo.

Le micotossine preoccupano per diversi motivi:

- possono essere presenti anche in alimenti non visibilmente ammuffiti;
- hanno effetti tossici particolarmente gravi (cancerogeni, mutageni e immunodepressivi);
- sono attive anche a basse concentrazioni;
- sono particolarmente stabili;
- non si dispone di antidoti nei loro confronti.

Gli effetti provocati dalle micotossine sulla salute dell'uomo e degli animali sono noti da tempo.

Nel XIX secolo fu dimostrata l'associazione tra ingestione di segale contaminata da *Claviceps purpurea* e comparsa di ergotismo. Successivamente fu descritta una sintomatologia tossica dell'uomo dovuta all'ingestione di pane ottenuto con frumento infestato da *Fusarium graminearum*. Negli anni 1942-47, diversi villaggi rurali della Russia furono colpiti dalla leucopenia tossica

alimentare (*Alimentary Toxic Aleukia*, ATA) causata dal consumo di frumento e di miglio contaminati da *Fusarium sporotrichioides* e *F.poa*.

## 2.1 Effetti sugli animali

In ambito zootecnico<sup>(20)</sup>, in relazione alle concentrazioni di micotossine presenti negli alimenti si possono manifestare:

- micotossicosi cliniche, piuttosto rare e relativamente facili da diagnosticare perché caratterizzate da sintomi riferibili alla compromissione di apparati e organi bersaglio delle specifiche micotossine in causa;
- micotossicosi subcliniche, relativamente frequenti e difficili da diagnosticare in quanto caratterizzate soltanto da calo quantitativo e qualitativo delle produzioni ed eventualmente da patologie secondarie favorite dagli effetti immunodepressivi di alcune di esse.

## 2.2 Rischi per l'uomo

L'interesse veterinario per le micotossine non è limitato agli effetti sul bestiame, ma riguarda anche gli eventuali riflessi negativi sulla salubrità dei prodotti di origine animale<sup>(18)</sup>, ai quali questi contaminanti possono in alcuni casi trasferirsi<sup>(21)</sup>. Riguardo questo ultimo aspetto, il veterinario d'azienda, che segue l'alimentazione e lo stato di salute degli animali, e il veterinario che controlla i prodotti di origine animale, sono chiamati ad un'alta responsabilità.

Le ricerche fino ad oggi condotte hanno dimostrato che la metabolizzazione epatica dell'Aflatossina B<sub>1</sub><sup>(23)</sup> e anche della M<sub>1</sub><sup>(22)</sup> può generare una molecola

altamente reattiva (epossido) che, se non tempestivamente neutralizzata, è in grado di legarsi al DNA alterandolo.

Queste modificazioni sono il punto di partenza degli epatocarcinomi che si osservano negli animali sperimentalmente esposti alla Aflatossina B<sub>1</sub>, la quale (come la M<sub>1</sub>), rientra a pieno titolo nella categoria dei cancerogeni genotossici per i quali, in teoria, anche una sola molecola potrebbe essere in grado di far sviluppare un cancro. Dal punto di vista sanitario sarebbe auspicabile quindi la completa assenza di cancerogeni genotossici, almeno negli alimenti destinati all'uomo.

In diversi paesi a clima tropicale, sia dell'Africa che dell'India, la presenza di Aflatossina<sup>(23)</sup> nel mais e in altri prodotti è stata da tempo correlata alla incidenza di tumori epatici di cirrosi e di sindromi immunodepressive nell'uomo. Va sottolineato inoltre che in alcuni di questi Paesi, a causa della scarsa igiene degli alimenti che si combina inoltre ad un largo impiego dei cereali nell'alimentazione umana, ancora oggi si verificano nelle persone casi di intossicazioni acute da micotossine, laddove nei Paesi sviluppati le intossicazioni acute sono diventate rare anche negli animali.

Altra micotossina particolarmente temibile per i riflessi sulla salute umana è l'Ocratossina A. Vari studi epidemiologici, oltre a mettere in relazione al presenza di Ocratossina nei cereali e nel pane e le malattie del tratto urinario, hanno evidenziato anche una correlazione con l'incidenza nell'uomo di tumori della pelvi e degli ureteri. La particolare sensibilità dei metodi di analisi disponibili per l'ocratossina spiega perché i monitoraggi finora effettuati in

Europa, Italia compresa hanno fatto rilevare altissime percentuali di positività nel sangue umano. Tale positività va messa in relazione all'esposizione alimentare tramite prodotti di origine vegetale, considerando che anche l'uva, il vino e il caffè, oltre alla maggior parte dei cereali, sono alimenti soggetti alla contaminazione da Ocratossina.

Infine, un aspetto spesso sottovalutato del problema micotossine è quello del rischio connesso per via inalatoria. Poiché le micotossine sono relativamente non volatili, l'esposizione per questa via è limitata all'inalazione di materiale di origine fungina o derivante da substrati contaminati. L'inalazione di questo materiale può trasportare le micotossine fino agli alveoli polmonari.

Allo stato attuale, l'esposizione inalatoria dell'uomo alle micotossine, nei settori della manifattura e dell'agricoltura, è ritenuta probabilmente causa di diverse manifestazioni patologiche tra cui alcuni tumori in operai del settore agricolo, sindrome da polvere organiche tossiche e polmonite interstiziale.

## 3. Micotossine

### 3.1 Aflatossine B,G.

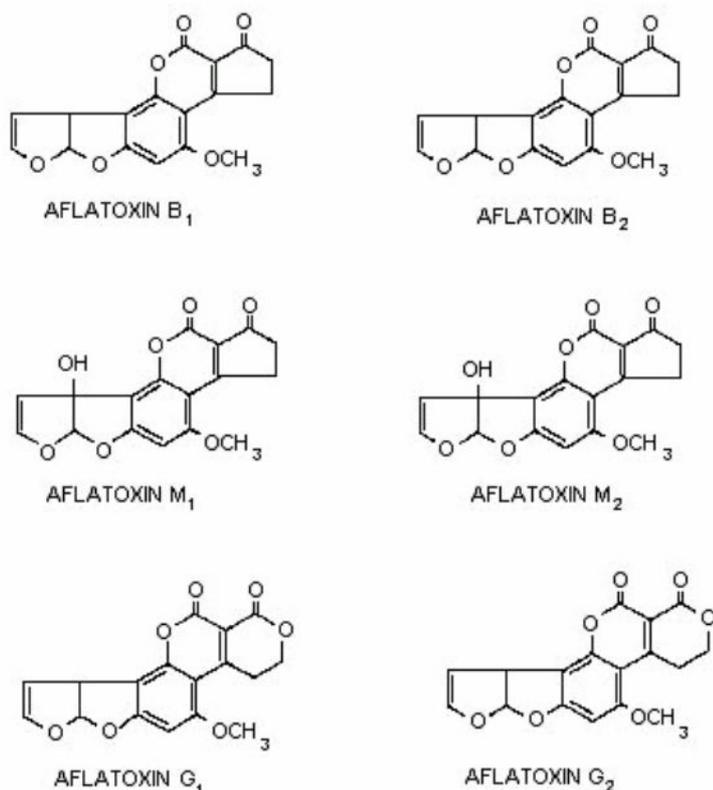
Le aflatossine<sup>(23)</sup>, ritenute a ragione le micotossine per eccellenza, sono state oggetto delle ricerche più approfondite e ancora oggi destano le maggiori preoccupazioni in quanto contaminanti dell'alimentazione di larga parte della popolazione mondiale che vive nelle fasce tropicali dove le caratteristiche del clima e la pressochè totale assenza di refrigerazione, facilitano la crescita delle muffe produttrici.

Esse sono prodotte esclusivamente da alcuni ceppi di *Aspergillus flavus* e da quasi tutti i ceppi di *Aspergillus parasiticus*. Furono scoperte nel 1960 in seguito ad una grave intossicazione che colpì il settore avicolo in Inghilterra, divenuta successivamente nota con il nome di "Turkey-X disease"; più di 100000 tacchini morirono dopo aver consumato arachidi brasiliane contaminate. Il principale contaminante fungino isolato da quelle arachidi era *Aspergillus flavus*. Le indagini effettuate consentirono l'isolamento dell'agente eziologico ovvero una miscela di composti tossici fluorescenti, denominati aflatossine.

Chimicamente sono dei derivati della cumarina, a basso peso molecolare (< 500 u.m.a.), alto punto di fusione (269°C per Aflatossina B1) ed elevata termostabilità (fino a 250°C). Fra le 18 aflatossine finora isolate cinque sono considerate rilevanti sia per diffusione che per tossicità e sono l'aflatossina B1, l'aflatossina B2, l'aflatossina G1, l'aflatossina G2 e l'aflatossina M1. Quelle

appartenenti al gruppo B sono bifuranocumarine fuse con un anello ciclopentenonico, le G sono bifuranocumarine fuse con un anello  $\beta$ -lattionico, le M1, M2 sono il prodotto di idrossilazione rispettivamente di B1 e B2 che si riscontrano nel latte di lattifere alimentate con mangimi contaminati da aflatossine B1 e B2. Le lettere B e G corrispondono al tipo di fluorescenza che queste micotossine emettono se irradiate con luce ultravioletta di 360 nm (Blue o Green), mentre la lettera M è l'iniziale del prodotto idrossilato che viene ritrovato nel latte (Milk = latte).

Nella figura sono riportate le formule di struttura:



Sono essenzialmente delle epatotossine dotate anche di attività cancerogena, mutagena e probabilmente teratogena. Tra esse la più potente è la B1; è altamente tossica per somministrazione acuta in tutte le specie studiate e per

l'uomo la dose mortale di aflatoxina B1 oscilla tra 0,6 e 10 parti per milione (ppm = mg/Kg).

Le aflatoxine sono assorbite nel tratto gastrointestinale dove vengono attivate metabolicamente o detossificate nella mucosa intestinale e nel fegato. La biotrasformazione della AFB1 varia molto da specie a specie ed è largamente influenzata da fattori endogeni ed esogeni. Tale biotrasformazione avviene attraverso processi di epossidazione, ossidrilazione, O-demetilazione, coniugazione e processi non enzimatici. In particolare, l'AFB<sub>1</sub> subisce un'ossidazione, dipendente dal citocromo P-450 che porta sia a vari metaboliti ossidrilati, sia all'8,9-eossido, elettrofilo instabile e altamente reattivo dal punto di vista biologico che forma addotti covalenti con DNA (soprattutto AFB-N7-guanina), RNA e proteine.

Mentre la formazione di addotti con il DNA è responsabile dell'attività cancerogena, la reazione tra l'eossido e le proteine potrebbe essere responsabile della tossicità acuta di questa tossina.

Le aflatoxine, come del resto anche le altre micotossine, sono sostanze fortemente termostabili pertanto i trattamenti termici comunemente impiegati nei processi industriali di trasformazione e nelle comuni preparazioni domestiche non sono in grado di ridurre il livello originale di queste sostanze.

I fattori che influiscono sulla produzione di aflatoxine possono suddividersi in fisici, nutrizionali e biologici. I fattori fisici includono temperatura, umidità relativa, luce, grado di aerazione e pH. La temperatura ottimale dipende dal

substrato; in mezzo liquido, la temperatura ottimale per *A. flavus* è 25°C, mentre per *A. parasiticus* varia tra 25 e 35°C. La produzione si blocca sotto i 13°C e sopra i 42°C. In generale la temperatura ottimale è compresa nell'intervallo 25-28°C. Un clima caratterizzato da temperatura elevata seguita da brusco calo (giornate calde e notti fredde, temporali) favorisce la produzione di aflatossine, così come in generale qualsiasi fattore di stress, come ad esempio la rottura meccanica delle muffe. La produzione di aflatossine risulta particolarmente abbondante in stagioni con temperature superiori alla media e piovosità inferiore alla media; gli insetti sono da considerare tra i maggiori responsabili della contaminazione sia per la veicolazione delle spore fungine, sia per il danneggiamento alla pianta, con un'umentata esposizione della stessa all'attacco fungino.

Anche l'umidità relativa del substrato e l'umidità relativa ambientale sono fattori critici per la produzione di aflatossine, che aumenta quando la disponibilità di acqua varia in più o in meno (stress idrico) e si porta a livelli non più ottimali per lo sviluppo delle muffe. Si ha la produzione massima nei chicchi di grano con un contenuto di umidità dal 25% al 30%. L'umidità relativa ambientale minima per la produzione di aflatossine varia tra l'83% e l'88%. Le quantità maggiori di aflatossine sono prodotte a pH acidi. Valori di pH<6 favoriscono B1 e B2, valori di pH>6 favoriscono G1 e G2. Valori massimi di aflatossine si ottengono in un intervallo di pH tamponato tra 5 e 6.

Il principio guida per contenere i livelli di contaminazione è quello di adottare un approccio cosiddetto “olistico”, vale a dire una associazione di azioni concertate lungo tutta la filiera agro-alimentare, “dal campo alla tavola”.

Infatti la produzione di aflatossine può avvenire sia in campo che durante le fasi di stoccaggio dopo il raccolto. Nel caso del mais per esempio, una delle azioni preventive per ridurre il rischio agronomico in campo è quella di raccogliere il mais ad un tenore di umidità non inferiore al 22%. Questa condizione è di estrema importanza per evitare che, nella fase post-raccolta, in condizioni di umidità tali da favorire il proliferare della crescita delle spore fungine, la probabile presenza di aflatossine aumenti in modo incontrollato.

Altra fase cruciale è senz'altro quella della essiccazione del prodotto dopo la fase di raccolta, sia per quanto riguarda l'intervallo temporale che intercorre dalla raccolta alla essiccazione sia il gradiente di tempo e temperatura che caratterizza le modalità con cui il processo di essiccazione avviene. Sono infatti da evitare shock termici molto drastici in quanto questa condizione provocherebbe spaccature e microfessure nella cariosside di mais con un conseguente aumento delle vie preferenziali di attacco delle spore fungine in fase di stoccaggio.

## Legislazione

A livello comunitario, il Regolamento (UE) 1881/2006<sup>(5)</sup>, recentemente modificato dal regolamento (UE) 165/2010<sup>(6)</sup>, ha fissato limiti massimi tollerabili, riportati in Tabella 1, per l'aflatossina B1, le aflatossine totali, (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2) e l'aflatossina M1 in prodotti alimentari quali cereali, frutta secca, spezie, prodotti per l'infanzia e latte.

Prodotti alimentari	Somma di B1,B2,G1,G2	B1	M1
Arachidi da sottoporre a trattamento	15,0 µg/kg	8,0 µg/kg	
Frutta a guscio da sottoporre a trattamento	10 µg/kg	5,0 µg/kg	
Arachidi e frutta a guscio destinati al consumo umano diretto	4,0 µg/kg	2,0 µg/kg	
Frutta secca da sottoporre a trattamento	10,0 µg/kg	5,0 µg/kg	
Frutta secca destinata al consumo diretto	4,0 µg/kg	2,0 µg/kg	
Tutti i cereali e i loro prodotti derivati	4,0 µg/kg	2,0 µg/kg	
Granturco da sottoporre a trattamento	10,0 µg/kg	5,0 µg/kg	
Latte crudo, latte trattato termicamente e latte destinato alla fabbricazione di prodotti a base di latte			0,050 µg/kg
Spezie: <i>capsicum</i> spp. , <i>Myristica fragrans</i> (noce moscato), <i>Zingiber officinale</i> (zenzero), <i>Curcuma longa</i> (curcuma)	10,0 µg/kg	5,0 µg/kg	
Alimenti a base di cereali e altri alimenti destinati ai lattanti e ai bambini		0,10 µg/kg	
Alimenti per lattanti e alimenti di proseguimento compreso il latte			0,025 µg/kg
Alimenti dietetici a fini medici speciali destinati ai lattanti		0,10 µg/kg	0,025 µg/kg

**Tabella 1: tenori massimi stabiliti dal regolamento n.1881 del 19 dicembre 2006 modificato dal regolamento (UE) 165/2010**

I criteri seguiti nei Regolamenti per la fissazione dei livelli si basano essenzialmente sulla differenza tra i prodotti alimentari destinati all'uso umano per i quali sia necessario impiegare trattamenti fisici per la riduzione del tenore di aflatossina prima che l'alimento sia idoneo al consumo rispetto a quei prodotti alimentari già pronti per il consumo. Inoltre nei due Regolamenti è

vietato l'uso di agenti chimici per decontaminare le partite di prodotti contaminati e la possibilità di miscelare partite conformi a quelle non conformi.

Si evidenzia inoltre che i limiti massimi tollerabili sono stati fissati sia sul prodotto finito che sull'ingrediente.

Nel settore zootecnico, il Regolamento (UE) 574/2011<sup>(8)</sup> ha recentemente modificato la Direttiva comunitaria 2002/32 sulle sostanze indesiderabili nei mangimi, fissando limiti massimi tollerabili per la sola aflatossina B1 in varie tipologie di mangimi, così come riportati nella Tabella 2.

Aflatossina B1	
Prodotti destinati all'alimentazione degli animali	contenuto massimo in mg/kg di mangime con un tasso di umidità del 12%
materie prime per mangimi	0,02
mangimi complementari e completi ad eccezione di:	0,01
mangimi composti per bovini da latte e vitelli, ovini ed agnelli, capretti da latte e capretti, suinetti e pollame giovane	0,005

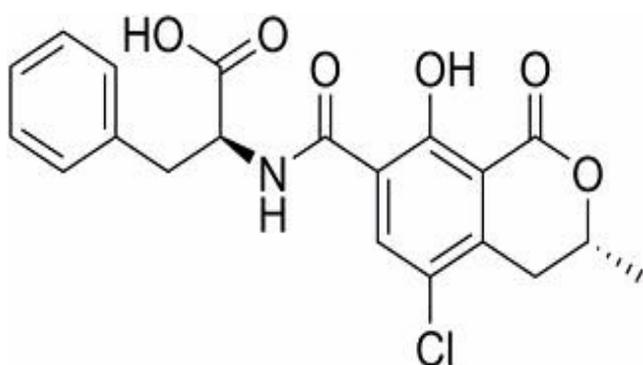
**Tabella 2: tenori massimi stabiliti dal Regolamento n.574/2011**

### 3.2 Ocratossine

Le ocratossine sono un gruppo di metaboliti strutturalmente simili, prodotti da funghi del genere *Aspergillus*<sup>(9)</sup> e *Penicillium*<sup>(14)</sup>, in particolare da *A. ochraceus* e da *P. viridicatum*. Quelle attualmente conosciute sono l'Ocratossina A (OA) e la B (OB) e delle due quella più tossica è la "A".

Dal punto di vista chimico l'OA è costituita da un derivato cumarinico legato alla fenilalanina, mentre l'OB consiste nell'analogo senza un atomo di cloro. La biotrasformazione dell'OA è dipendente dal citocromo P450 sia nell'uomo sia negli animali e porta alla formazione di intermedi metabolicamente attivi probabilmente responsabili dell'azione cancerogena e di altri effetti tossici. Il suo assorbimento avviene nel tratto gastrointestinale e, attraverso la circolazione enteroepatica, può essere escreta e riassorbita.

Nel sangue l'OA è legata alla frazione albuminica delle proteine e questa sembra essere la motivazione per cui questa micotossina permane per tempi lunghi nell'organismo animale. A livello cellulare inibisce il trasporto intramitochondriale del fosfato e la sintesi proteica a livello della traduzione mediante il blocco della fenilalanina RNA sintetasi. Il principale organo bersaglio dell'OA è il rene, ma per dosi sufficientemente elevate si ha tossicità anche a livello epatico con infiltrazione grassa e accumulo di glicogeno negli epatociti (per blocco del sistema enzimatico delle fosforilasi).



**Ocratossina A**

Oltre all'azione nefrotossica è riportata per questa tossina un'azione teratogena e immunosoppressiva. Tra i prodotti che con più frequenza vengono trovati contaminati vi sono l'orzo, il sorgo, il mais<sup>(13)</sup>, diversi legumi,liquirizia<sup>(10)(11)</sup>, il caffè crudo in grani (la tostatura denatura le ocratossine) e vari prodotti da forno; ma più preoccupante è la presenza di OA nei mangimi.

### Legislazione

Le evidenze di nefrotossicità e carcinogenicità hanno portato l'EFSA<sup>(4)</sup> a stabilire una dose settimanale tollerabile di OTA pari a 120 ng/kg di peso corporeo.

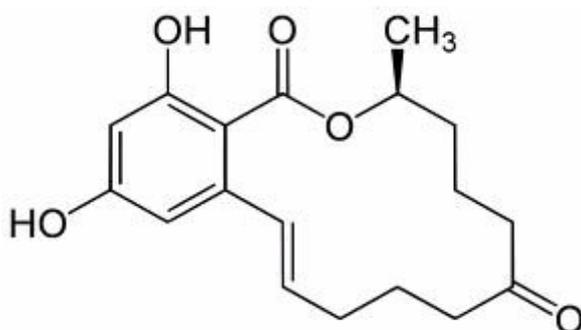
Sulla base di questo valore il Regolamento UE 105/2010<sup>(7)</sup> ha fissato dei tenori massimi per l'OTA in quei prodotti che contribuiscono in maniera significativa all'esposizione della popolazione umana in generale.

Inoltre bisogna considerare il Reg.1881/2006<sup>(5)</sup> che fissa i tenori massimi dell'Ocratossina A (3-10 µg/kg) nei prodotti destinati all'alimentazione umana (espressi in µg/kg).

### 3.3 Zearalenone

Gli zearalenoni<sup>(16)</sup> sono prodotti da diverse specie di *Fusarium* e in particolare da *F.graminearum*, *F. gulmorum* e *F. equiseti*. Dei diversi metaboliti prodotti in coltura, solo lo zearalenone e gli zearalenoloi (isomeri alfa e beta) sono stati ritrovati negli alimenti di origine vegetale, come contaminanti naturali.

Lo zearalenone è un lattone dell'acido resorcilico non dotato di tossicità acuta che a basse concentrazioni manifesta attività anabolica e uterotrofica, mentre a concentrazioni più alte determina attività di tipo estrogeno.



**Zearalenone**

Le specie animali più sensibili all'azione della tossina sono quella bovina e, soprattutto, quella suina in cui provoca ipo-fertilità già a partire da concentrazioni di zearalenone nella razione alimentare di 10 µg/Kg e segni di iperestrogenismo (tumefazioni e arrossamento della vulva, iperplasia della ghiandola mammaria, estro prolungato) a concentrazioni non inferiori a 1-5 µg/Kg. Si possono osservare, inoltre, vaginiti, ridotta assunzione degli alimenti,

ridotta produzione di latte, blocco dell'ovulazione e aborti e, persino, ninfomanie (a dosi più elevate).

Dati recenti indicherebbero un'attività cancerogena dello zearalenone. I prodotti più soggetti alla colonizzazione di specie tossigene di *Fusarium* e all'accumulo di zearalenone sono essenzialmente i cereali e, in particolare, il mais, il frumento, il sorgo, l'orzo e l'avena.

In Italia la tossina si trova con relativa frequenza sia nel mais di produzione nazionale sia in quello importato .

#### Legislazione

A livello comunitario, il Regolamento (UE) 1881/2006<sup>(5)</sup> ha fissato limiti massimi tollerabili di zearalenone espressi in µg/Kg (75-200 µg/Kg).

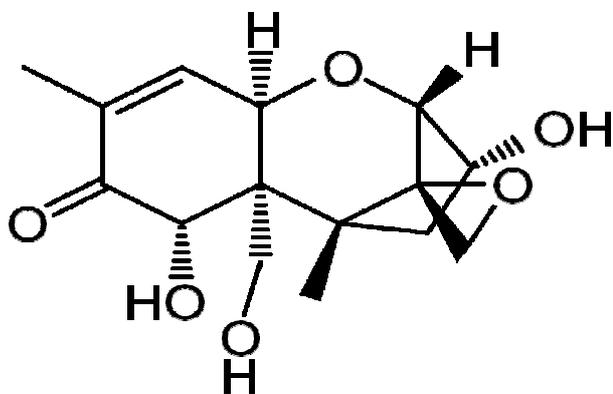
### **3.4 Deossinivalenolo**

Il deossinivalenolo <sup>(15)</sup>o DON o vomitossina è una micotossina appartenente al gruppo dei tricoteceni prodotta da alcune specie di *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. culmorum*, ecc..). Esso è caratterizzato, come gli altri tricoteceni, da un nucleo sesquiterpenico, caratterizzato da un anello 12,13-epossi-tricotec-9-ene tetraciclico a cui è dovuta l'elevata tossicità. E' un composto non volatile di basso peso molecolare che svolge la sua azione tossica a livello delle cellule eucariotiche.

Il DON è una delle micotossine più diffuse negli alimenti e nei mangimi, soprattutto nei cereali quali grano<sup>(15)</sup>, orzo e mais.

I principali effetti tossici sull'uomo e sugli altri mammiferi sono:

- inibizione della sintesi proteica e degli acidi nucleici o nella fase di iniziazione o in quella di allungamento- terminazione;
- alterazione della struttura di membrana e della funzionalità dei mitocondri;
- apoptosi e attivazione delle citochine;
- vomito, diarrea, malfunzionamento del sistema ematopoietico (anemia e leucopenia);
- abbassamento delle difese immunitarie.



**Deossinivalenolo**

Legislazione

La dose tollerabile giornaliera (TDI) per l'uomo di deossinivalenolo è stata fissata a 1 µg/kg;

L'Agencia Internazionale per la Ricerca sul Cancro lo ha classificato nel Gruppo 3: “non classificabile come possibile agente cancerogeno per l'uomo” (IARC, 1993; WHO, 2002).

In base alla più recente normativa europea i limiti massimi ammissibili di DON nella granella di frumento sono di 1750 ppb nel frumento duro e di 1250 ppb nel frumento tenero (Reg. CE n. 1881/2006)<sup>(5)</sup>.

## **4. Tecniche analitiche usate per la determinazione**

### **4.1 HPLC con rilevatore fluorimetrico**

L' HPLC attualmente rappresenta la tecnica di riferimento per l'analisi delle aflatossine e di tutte le altre micotossine per la versatilità, la sensibilità e la specificità.

L'HPLC (cromatografia in fase liquida ad alte prestazioni o ad alta pressione) è la moderna evoluzione della cromatografia liquida su colonna (LC). In questo caso si tratta però di una tecnica completamente strumentale che presenta molti vantaggi rispetto alla tecnica convenzionale di base:

- rapidità di esecuzione
- alta efficienza che permette la separazione di miscele molto complesse
- alta risoluzione (cioè picchi di sostanze anche simili chimicamente, ben separati)

- rivelazione in continuo dei componenti di una miscela, in uscita dalla colonna
- registrazione automatica in continuo del cromatogramma
- determinazione quantitativa dei componenti della miscela



**HPLC dotato di pompe, autocampionatore, rivelatore DAD, rivelatore fluorimetrico, colonna.**

I principi di base di questa tecnica sono praticamente gli stessi della cromatografia liquida classica: la miscela da separare viene caricata su una colonna contenente una fase fissa o stazionaria avente determinate caratteristiche. Attraverso di essa fluisce un liquido puro o una miscela di liquidi (fase mobile). I vari componenti della miscela, essendo chimicamente diversi, interagiscono in maniera diversa con la fase stazionaria e quindi vengono trattenuti in essa più o meno fortemente; la fase mobile riesce perciò a

spostarli lungo la colonna, dall'entrata all'uscita, in tempi diversi, rendendo la tecnica selettiva.

Per quanto riguarda la fase mobile, essa può essere costituita sempre da uno stesso eluente (a 1 o a due componenti ma a composizione fissa) per tutta la durata della cromatografia (eluizione isocratica), oppure la sua composizione può variare in modo controllato durante la cromatografia facendo variare le quantità relative di due solventi a polarità diversa (eluizione a gradiente di polarità).

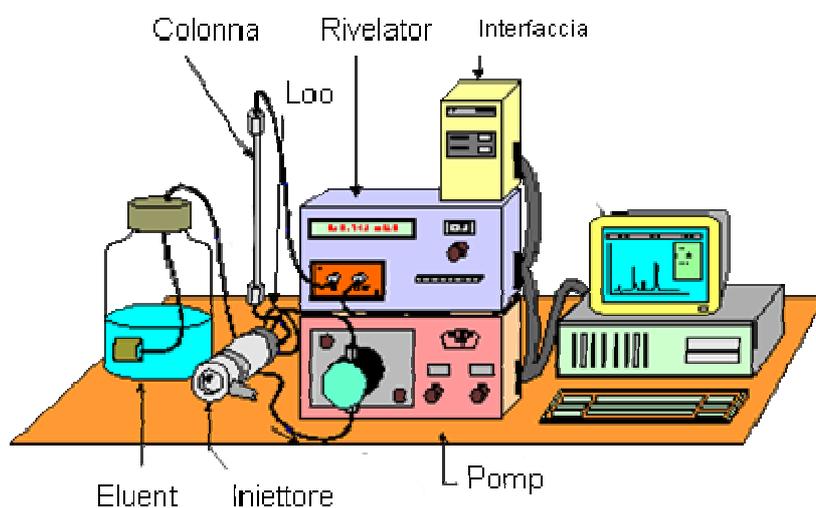
I meccanismi di separazione su cui si basano le tecniche della HPLC sono quelli classici:

- adsorbimento (cromatografia liquido -solido LSC)
- ripartizione (cromatografia liquido-liquido LLC)
- scambio ionico (cromatografia di scambio ionico IEC)
- esclusione (cromatografia di esclusione EC)

Un cromatografo HPLC può essere sintetizzato in uno schema così disposto:

1. contenitore fase mobile (1 o 2 contenitori per l'uso di uno o due solventi)
2. pompa (1 o 2 per l'uso di uno - due - quattro solventi)
3. camera di miscelazione con programmazione del gradiente di eluizione (nel caso di più solventi)

4. rivelatore di tipo differenziale (UV-DAD; Fluorimetro; RID; Spettrometria di massa)
5. sistema di iniezione dei campioni
6. colonna
7. sistema di controllo della temperatura della colonna
8. scarico delle frazioni eluite dalla colonna
9. registratore
10. integratore elettronico o PC con software



#### **Schema di un HPLC**

Il campione è introdotto attraverso l'iniettore nel sistema e spinto nella colonna analitica a seguito del pompaggio costante della fase mobile del serbatoio del solvente.

Un'eluizione con un singolo solvente di composizione costante viene detta isocratica.

Nella eluizione tramite gradiente invece, due o più solventi di differenti polarità, vengono mescolati in proporzioni prestabilite. Il rapporto fra i due solventi viene fatto variare durante l'eluizione, a volte in modo continuo, a volte attraverso una serie di steps, durante i quali la percentuale dei solventi rimane costante per un certo periodo di tempo, per poi cambiare nuovamente.

La fase mobile del solvente fa spostare gli analiti attraverso il supporto cromatografico impaccato (colonna). I singoli componenti interagiscono con la fase stazionaria, rallentando in tal modo il loro spostamento in modo diverso, secondo la loro affinità per questo materiale.

Nel passare attraverso la colonna ciascun componente si distribuisce tra la fase stazionaria e la fase mobile a seconda della sua solubilità.

A causa delle velocità diverse con cui si spostano lungo la colonna, i componenti, si separano tra loro.

Nell'eluizione i componenti separati, si spostano attraverso la lunghezza della colonna trascinati dalla fase mobile. Essi pervengono, quindi, al rivelatore che ne rivela la concentrazione e il tempo (tempo di ritenzione) al momento in cui escono.

Riportando in grafico questa concentrazione in funzione del volume di fase mobile passato attraverso la colonna, si ottiene un cromatogramma.

L'identificazione di un composto sarà basata fundamentalmente sul suo tempo di ritenzione in un certo set di condizioni (confrontare il cromatogramma di un

campione ignoto con quello della sostanza pura o di una miscela a composizione nota).

La quantificazione si basa sulla misura dell'area di un dato picco cromatografico (che è ovviamente proporzionale alla quantità totale di sostanza transitata davanti al rivelatore) e sul confronto con preparati contenenti quantità note del composto d'interesse (retta di taratura).

Le caratteristiche generali dei rivelatori HPLC sono:

- la sensibilità;
- il limite di rivelabilità;
- la linearità di risposta;
- il volume minimo.

HPLC con rivelatore fluorimetrico misura le radiazioni di fluorescenza emesse da particolari classi di sostanze quando vengono eccitate con radiazioni UV o con un laser. Un composto fluorescente assorbe un fotone ed emette un altro fotone a lunghezza d'onda maggiore. Tipi di rivelatori a fluorescenza sono:

1. Filtro/filtro;
2. Filtro/monocromatore;
3. Doppio monocromatore.

Un rivelatore a fluorescenza è 100-1000 volte più sensibile di uno ad assorbanza. L'emissione per fluorescenza è misurata a 90° rispetto alla

radiazione incidente. I composti analizzati con questo rivelatore possono avere fluorescenza nativa oppure indotta da due tipi di processi:

- Derivatizzazione chimica;
- Derivatizzazione fotochimica.

La derivatizzazione può avvenire a monte o a valle della colonna HPLC (rispettivamente derivatizzazione pre-colonna e post-colonna). La derivatizzazione chimica può essere effettuata con metodi manuali o automatici. La tecnica manuale più consolidata è quella che prevede una reazione con acido trifluoroacetico (TFA) prima della separazione HPLC (pre-colonna); in alternativa negli ultimi anni sono entrati nell'uso di routine del laboratorio anche derivatizzatori automatici (post-colonna).

## **5. Metodi di determinazione delle micotossine**

### **5.1 Scelta dei metodi di analisi**

I metodi di analisi, per essere considerati adeguati, devono:

1. permettere la determinazione delle micotossine in diverse matrici fino a livelli inferiori ai limiti fissati dalla legge;
2. essere precisi e specifici;
3. permettere l'identificazione della sostanza in base alle proprie caratteristiche ;

4. essere applicabili alle matrici previste per le analisi ufficiali e per i problemi di monitoraggio.

I parametri richiesti per l'accettabilità di un metodo di analisi sono:

- *specificità (o selettività)*: abilità di un metodo di determinare un analita in presenza di composti potenzialmente interferenti (altre sostanze presenti nella matrice, ma anche analoghi, metaboliti, isomeri);
- *limiti di rivelabilità (LOD)*: la più piccola quantità di analita che può essere rivelata sulla base del rapporto segnale/ rumore dello strumento usato;
- *limite di quantificazione (LOQ)* : la più piccola quantità di analita che può essere purificata e quantificata con un metodo;
- *intervallo di applicabilità*: intervallo di concentrazione dell'analita in cui è stato provato il metodo e per il quale sono noti i valori di precisione ed accuratezza;
- *accuratezza* : definisce il grado di concordanza fra il valore medio di un certo numero di misure ed il valore vero attribuito al parametro da misurare;
- *precisione*: grado di accordo di misurazioni ripetute in modo indipendente applicando lo stesso metodo su uno stesso materiale;
- *ripetibilità*: esprime la deviazione di una serie di misure ripetute rispetto al loro valore medio;
- *riproducibilità*: distribuzione dei risultati di prove reciprocamente indipendenti ottenuti in condizioni di "riproducibilità". La riproducibilità intra-laboratorio può essere misurata all'interno dello stesso laboratorio con lo stesso

metodo, sullo stesso materiale da saggio, da differenti operatori, strumenti , ad intervalli di tempo relativamente lunghi.

La riproducibilità inter-laboratorio può essere valutata mediante studi collaborativi (identico materiale da saggio e metodo analitico, differenti laboratori, operatori e strumenti).

- *esattezza o recupero*: può essere stabilita solo per mezzo di un materiale di riferimento certificato (MRC). Se non è disponibile un MRC, l'*esattezza* è valutata dall'analisi di campioni fortificati, cioè arricchiti con una quantità nota dell'analita da rilevare e si definisce *recupero*. L'*esattezza* o *recupero* rappresenta il rapporto tra il valore medio misurato per un analita in un MRC o in un campione fortificato ed il suo valore certificato o noto, espresso come percentuale di tale valore.
- *Incertezza di misura*: può essere intesa come la stima dell'intervallo dei valori entro cui cade il valore vero di una misura. Questa definizione deriva dal fatto che ogni misura è caratterizzata da variabilità, che si può verificare durante i vari stadi della procedura analitica.



Schema sintesi dei requisiti necessari per un metodo di analisi

## 5.2 Metodi di determinazione

Le micotossine sono contaminanti presenti negli alimenti di origine animale, di origine vegetale e nei mangimi destinati all'alimentazione zootecnica; la loro concentrazione può essere molto variabile ed è espressa con le seguenti unità di misura:

ppm (parti per milione)	mg/kg = $\mu\text{g/g}$	1 ppm=1000 ppb
ppb (parti per bilione)	$\mu\text{g/kg} = \text{ng/g}$	1 ppb=1000 pt
ppt (parti per trilione)	ng/kg	

Per rivelare analiti a livelli di concentrazione così bassi è necessario disporre di metodi analitici molto accurati, sensibili e specifici.

Negli ultimi anni sono state sviluppate numerose tecniche idonee per queste determinazioni che richiedono l'applicazione di una serie di fasi sequenziali:

1. estrazione della micotossina dalla matrice utilizzando soluzioni estraenti, metodi e tempi di miscelazione adeguati alla proprietà chimico-fisiche della micotossina da purificare e della matrice che la contiene;
2. purificazione dell'estratto al fine di ridurre o eliminare le sostanze interferenti utilizzando colonnine per estrazione in fase solida (SPE) o di immuno-affinità (IAC);
3. separazione e quantificazione delle micotossine mediante tecniche cromatografiche. La cromatografia liquida (HPLC) è la tecnica attualmente più utilizzata e di riferimento per la sua elevata versatilità, sensibilità e specificità.

Molti dei metodi quantitativi per la determinazione di micotossine si basano su principi di separazione cromatografica seguiti da un'opportuna identificazione dell'analita.

### **5.3 DETERMINAZIONE DELLE AFLATOSSINE B1, B2, G1 E G2 NEGLI ALIMENTI DI ORIGINE VEGETALE MEDIANTE HPLC CON RIVELATORE FLUORIMETRICO**

Il presente metodo di prova descrive le responsabilità e le modalità operative per la determinazione delle aflatossine B1, B2, G1 e G2 negli alimenti di origine vegetale mediante cromatografia HPLC con rivelatore fluorimetrico.

Il metodo è applicabile agli alimenti di origine vegetale ad uso umano non trasformati (cereali, frutta in guscio, frutta secca e semi oleosi) ed è utilizzabile in un campo di misura maggiore o uguale a 0,25 µg/kg di aflatossina.

#### ***Apparecchiature e materiali***

##### *Apparecchiature*

- Bilancia tecnica, sensibilità 0.01 g
- Omogeneizzatore a lame
- Agitatore vortex
- Agitatore orbitale
- Centrifuga da banco
- Filtri di carta Whatman n. 41
- Vetreria da laboratorio (provette, imbuti, matracci)
- Pipette automatiche da 10-100 µl, 20-200 µl, 200-1000 µl
- Camere da vuoto per colonne SPE
- Derivatizzatore fotochimico UVE

- Colonna cromatografica Synergi Polar-RP 250 x 4.6 x 4  $\mu\text{m}$  80 Å (Phenomenex) con relativa pre-colonna
- Sistema HPLC dotato di rivelatore fluorimetrico, autocampionatore e software di gestione e di elaborazione dati
- Colonne d'immunoaffinità per la determinazione delle aflatossine B1, B2, G1 e G2

#### *Solventi e reattivi*

- Metanolo per HPLC;
- Acetonitrile per HPLC;
- Acqua ultrapura MilliQ prodotta in laboratorio;
- Cloruro di Sodio puro per analisi;
- Fosfato bisodico di Potassio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) puro per analisi;
- Dipotassiodrogenofosfato ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ );

#### *Materiali riferimento*

- Aflatossina G1
- Aflatossina G2
- Aflatossina B1
- Aflatossina B2

### *Preparazione dei materiali di riferimento in soluzione*

- Soluzione madre di Aflatossina G1;G2; B2; B1 a 100 mg/l: pesare 5 mg dei singoli materiali di riferimento e portare a volume con MeOH in un matraccio da 50 ml. Tali soluzioni sono stabili per 1 anno a temperature  $\leq -18^{\circ}\text{C}$ .

### *Curva di taratura*

- Mix soluzione di materiale di riferimento a 1 mg/l: prelevare 0.1 ml di ciascuna soluzione madre a 100 mg/l e portare a volume con MeOH in un matraccio da 10 ml.
- Soluzioni di lavoro a 40-20- 10- 5-2.5-1.25-0.625 $\mu\text{g/l}$ : prelevare 400-200-100-50-25-12,5-6.25  $\mu\text{l}$  della mix a 1 mg/l, trasferirli in un matraccio da 10 ml e portare a volume con MeOH. Le soluzioni di lavoro vengono smaltite a fine prova

### *Esecuzione della prova*

- Pesare  $25.00 \pm 0.01$  g di campione omogeneizzato in una boccette da 250 ml, aggiungere 2.0 g di NaCl e 125 ml della soluzione estraente MeOH/Acqua 60/40 v/v; alternativamente, in presenza di slurry, pesare una quantità di impasto acquoso tale da contenere 25g di campione secco. Quindi, tener conto della quantità di acqua presente nell'aliquota di impasto pesato per la

preparazione della soluzione estraente (primo punto del paragrafo 9.2) affinché il rapporto MeOH/acqua rimanga invariato.

- Porre la boccetta su agitatore orizzontale e lasciare agitare per 20 min.
- Aggiungere 125 ml di Acqua ed agitare
- Filtrare con filtro di carta tipo Whatman, raccogliendo il filtrato in boccette di vetro da 250 ml
- Caricare 10 ml di filtrato sulla colonnina di immunoaffinità
- Lavare la colonna con 10 ml di Acqua
- Chiudere i rubinetti aggiungere 2 ml di MeOH e con l'aiuto della siringa eseguire la manovra di aspirazione e pressione (back-flushing)
- Raccogliendo l'eluato in cilindri da 10 ml per verificarne il volume
- Procedere all'analisi HPLC-FLD.

### ***Determinazione/identificazione***

La determinazione è eseguita con eluizione isocratica e derivatizzazione fotocimica, secondo le seguenti condizioni cromatografiche:

- Fase mobile: MeOH/ACN/Acqua 24/23/53
- Flusso: 1 ml/min
- Rivelatore fluorimetrico: Eccitazione 365 nm, Emissione 435 nm
- Volume di iniezione: 100 µl

L'identificazione del picco delle aflatossine avviene confrontando i tempi di ritenzione delle soluzioni dei materiale di riferimento e del campione. Per la determinazione, iniettare le soluzioni di lavoro dei materiale di riferimento e misurare l'altezza/area del picco. Costruire una retta di calibrazione iniettando almeno quattro diversi livelli tra quelli indicati nel paragrafo curva di taratura.

Se i picchi ottenuti per i campioni non rientrano nel range della curva di calibrazione, diluire il campione, determinare il conseguente valore di diluizione per tenerne conto nel calcolo del risultato, e ripetere la lettura in HPLC.

### ***Espressione dei risultati***

- Retta di taratura

Costruire la curva di taratura riportando sulle ordinate l'assorbanza delle soluzioni di materiale di riferimento di lavoro e sulle ascisse le rispettive concentrazioni.

Calcolare l'equazione della retta di taratura:

$$y = ax + b$$

Il calcolo della concentrazione di ogni aflatossina è effettuato per interpolazione aritmetica della retta di regressione lineare ottenuta riportando in grafico l'area dei picchi cromatografici delle soluzioni di lavoro iniettate in HPLC in funzione delle loro concentrazioni.

$$C_{AF} = (YC-b)/a * (F/m)$$

dove:

$C_{AF}$  = Concentrazione di ogni aflatossina presente nel campione

YC = Area del picco delle aflatossine dell'estratto del campione

b = Intercetta della curva di taratura sull'asse delle y

a = Coefficiente angolare della curva di taratura

F = fattore di diluizione (50)

m = massa in g dell'aliquota di campione (25 g).

Il LOQ di tale analisi è 0.25 µg/kg

## **5.4 DETERMINAZIONE DELL'OCRATOSSINA A NEGLI ALIMENTI DI ORIGINE VEGETALE MEDIANTE HPLC**

La presente procedura descrive le responsabilità e le modalità operative per la determinazione di screening e di conferma dell'Ocratossina A nei vegetali quali cereali, e alle spezie ed , caffè ed liquirizia.

### **Apparecchiature e materiali**

#### *Apparecchiature*

- Bilancia analitica, sensibilità ± 0.0001 g
- Bilancia tecnica, sensibilità ± 0.01 g
- Omogeneizzatore
- Agitatore

- PH metro pH 0-14
- Vetreria da laboratorio (imbuti, matracci, cilindri, provettoni a fondo conico per centrifuga con tappo a vite, beute)
- Filtri di carta Whatmann
- Colonne di immunoaffinità per Ocratossina A
- Camera da vuoto per colonne
- Frigoriferi a  $T = 5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$
- Congelatori a  $T \leq -18^{\circ}\text{C}$
- Pipette automatiche monocolore da 40-200 $\mu\text{l}$ ; 200-1000  $\mu\text{l}$  dotate di puntali, con incertezza relativa  $\leq 5.0\%$
- Frigo a  $T = 5 \pm 3^{\circ}\text{C}$
- Congelatore a  $T = \leq -18^{\circ}\text{C}$
- Colonna per HPLC: Colonna Synergi Polar-Rp 80 Å 250x 4.6 mm o equivalente, preferibilmente con relativa pre-colonna C-18
- Sistema HPLC costituito da pompa, comparto termostato della colonna, iniettore automatico, rivelatore FLD, sistema dati software di gestione “System 220”.

### *Materiali*

- Metanolo grado HPLC
- Acetonitrile grado HPLC
- Acido Acetico Glaciale
- Potassio Cloruro

- Cloruro di Sodio
- Potassio diidrogeno fosfato
- Sodio idrogeno fosfato biidrato
- Sodio bicarbonato

### *Materiali riferimento*

Soluzione di materiale di riferimento di Ocratossina a 10 mg/l in acetonitrile

### *Preparazione dei materiali di riferimento in soluzione*

- Soluzione di materiale di riferimento intermedia a 1 mg/l: prelevare 1000  $\mu\text{l}$  di soluzione a 10 mg/l, portare a 10 ml con acetonitrile. La soluzione così preparata va conservata in congelatore
- Soluzioni di lavoro a 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40  $\mu\text{g/l}$ : prelevare 3.125  $\mu\text{l}$ , 6.25  $\mu\text{l}$ , 12.5  $\mu\text{l}$ , 25  $\mu\text{l}$ , 50  $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{l}$ , 200  $\mu\text{l}$ , 400  $\mu\text{l}$ , trasferire rispettivamente in matracci da 10 ml e portare a volume con la fase mobile (Acqua/ACN/Acido Acetico 46/53/1) . Le soluzioni vengono smaltite a fine prova.

## **Esecuzione della prova**

### *Preparazione del campione*

- Pesare 10g di campione omogeneizzato, porli in un provettone da 200 ml ed aggiungere 50 ml di ACN/Acqua (60/40). Alternativamente, in presenza di slurry<sup>0</sup>, pesare una quantità di impasto acquoso tale da contenere 10g di campione secco; tener conto della quantità di acqua presente nell'aliquota di impasto pesato per la preparazione della soluzione estraente (primo punto del paragrafo 9.2) affinché il rapporto ACN/acqua rimanga invariato. Se il campione è caffè o liquirizia, ai 10 grammi nel provettone da 200 ml aggiungere 100 ml della soluzione 1:1 di metanolo/sodio bicarbonato 30 g/l
- Agitare per 20 minuti
- Filtrare su filtro di carta raccogliendo il filtrato in beute da 100 ml

### *Purificazione*

- Prelevare 5 ml di filtrato e trasferirli in un matraccio da 50 ml portando a volume con PBS
- Alloggiare le colonnine su camera da vuoto mediante un giunto, alla sommità della colonna inserire una siringa da 10 ml come serbatoio
- Il campione diluito viene caricato completamente sulle colonnine
- Lavare le colonnine con 20 ml di PBS.
- Chiudere i rubinetti aggiungere 1.5 ml di MeOH/AcOH (98:2) e con l'aiuto della siringa eseguire la manovra di aspirazione e pressione (back-flushing)

- Aggiungere 1.5 ml di acqua e raccogliere l'eluato in un cilindro da 10 ml

### *Determinazione/identificazione*

#### Condizioni cromatografiche

- Fase mobile: Acqua/ACN/Acido Acetico 46/53/1, (v/v/v)
- Flusso: 1.0 ml/min
- Rivelatore FLD  $\lambda$  eccitazione = 333 nm;  $\lambda$  emissione = 460 nm
- Temp. Termostato colonna: 40°C
- Volume di Iniezione: 100  $\mu$ l

### *Analisi di conferma*

La conferma della presenza di Ocratossina A può essere ottenuta mediante la tecnica della co-cromatografia, addizionando al campione una quantità di Ocratossina A uguale al valore stimato nel campione stesso. E' possibile anche effettuare una derivatizzazione dell'eluato purificato o rivelarne la presenza utilizzando un diverso detector (analizzatore di massa).

La presenza di Ocratossina A nel campione è rivelata dalla presenza nel cromatogramma di un picco al tempo di ritenzione relativo uguale a quello del materiale di riferimento.

## Espressione dei risultati

### Retta di taratura

Costruire la retta di taratura con non meno di tre soluzioni di materiale di riferimento di lavoro, riportando sulle ordinate l'assorbanza delle soluzioni di materiale di riferimento di lavoro e sulle ascisse le rispettive concentrazioni.

Calcolare l'equazione della retta di taratura:

$$y = ax + b$$

Calcolo concentrazione Ocratossina A

$$C_{\text{ocra}} = \frac{((y-b/a) \times 3)/5) * V * d}{10}$$

dove :  $y$  = area del picco dell'Ocratossina A  $b$  = intercetta della retta di taratura sull'asse delle  $y$ .  $a$  =coefficiente angolare della curva di taratura  $d$ = coefficiente di diluizione per il caffè e liquirizia = 2; per le altre matrici = 1  $3$  = volume finale dell'estratto (ml)  $5$  = volume di estratto da diluire (ml)

$V$  = volume estraente (ml); 100 ml per caffè e liquirizia, 50 ml per tutti gli altri

10 = quantità di campione pesato (g)

La determinazione quantitativa è quindi calcolata mediante interpolazione dell'area del picco dell'Ocratossina con la retta di taratura.

Per concentrazioni di Ocratossina A elevate al punto tale da superare l'area del materiale di riferimento a maggiore concentrazione ,diluire il campione con la fase mobile, in modo da avere un area del picco che rientri nella curva di taratura

Il Limite di Quantificazione dell'Ocratossina A è pari  $2\mu\text{g}/\text{kg}$ .

## **6. Validazione dei metodi di prova**

La validazione è la “conferma, sostenuta da evidenze oggettive, che i requisiti relativi ad una specifica utilizzazione prevista sono stati soddisfatti” (ISO 9000:2000).

In accordo alla norma EN ISO/IEC 17025:2000<sup>(1)</sup>, che definisce i requisiti del sistema di garanzia della qualità nel laboratorio di prova, un metodo di analisi può essere validato secondo vari schemi. Tra questi sono stati scelti la validazione mediante partecipazione a circuiti interlaboratorio (*proficiency test* o *studio di competenza*) e mediante studio intra-laboratorio.

### **6.1 Validazione mediante circuiti inter-laboratorio**

La Decisione 98/179/CE della Commissione Europea richiede che il laboratorio di controllo ufficiale partecipi periodicamente a Studi di Competenza (*proficiency test*) riconosciuti internazionalmente.

La partecipazione ai circuiti inter-laboratorio è importante per valutare le prestazioni analitiche del laboratorio, e confrontarle con quelle di altri laboratori.

Per validazione mediante studi di competenza, il laboratorio ha preso parte a tre circuiti organizzati, rispettivamente, dal FAPAS, dal PROGETTO TRIESTE (Tecna, Science Park, Trieste) e dall'Istituto Superiore di Sanità con lo studio

denominato EURL (European Union Reference Laboratory Mycotoxin) durante il periodo tra aprile 2012 dicembre 2013.

Nell'ambito di ogni circuito sono stati forniti campioni di farina di frumento, arachidi, nocciole, pistacchio, farina di mais, farina di cereali con contenuto incognito di Aflatossine G1, G2, B1 e campioni di paprika e di spezie con contenuto incognito di Ocratossina A .

Tali campioni sono stati analizzati almeno in duplicato e i risultati sono stati aggregati ed analizzati dal

l'organizzazione che ha gestito il circuito. Le prestazioni sono state valutate in termini di z-score<sup>1</sup>, applicando l'equazione di Horwitz<sup>2</sup>.

1. z-score: valore che confronta la stima dell'errore di un risultato con un valore assegnato alla deviazione standard (valore target  $\sigma$ ); si calcola come  $z=(x_i-x_m)/\sigma$

2. equazione di Horwitz: è un'equazione empirica che fornisce una stima del valore dell'incertezza di misura di un analita. Permette di calcolare la deviazione standard relativa percentuale, in base alla sua sola concentrazione, prescindere dalla natura dell'analita, della matrice e dal metodo di misura impiegato.

$$RDS\% = 2 [1 - 0,5 \log (C)]$$

Dove RDS% è la deviazione standard relativa percentuale;

C è la concentrazione dell'analita espressa in frazione

## **6.2 Validazione mediante studi intra- laboratorio**

Lo studio intra-laboratorio consente di valutare diversi parametri analitici che definiscono le caratteristiche e le prestazioni del metodo di prova. E' stata valutata la specificità dei vari metodi analizzando campioni di mandorle, farina di frumento, nocciole e arachidi non contaminati da Aflatossine e campioni di paprika, peperoncino, liquirizia<sup>(10)</sup> e uva passa non contaminati da Ocratossina A per verificare l'eventuale presenza di interferenti dovuti alla matrice. Questa informazione è necessaria per stabilire il campo di applicazione dei metodi.

Inoltre sono stati analizzati campioni negativi fortificati a tre diversi livelli (pari a 0.5 - 1 e 2 volte il limite massimo di residuo LMR) per poter calcolare il recupero percentuale e la ripetibilità dei metodi.

Le prove a tutti i livelli sono state eseguite sia nella stessa giornata (prove intra-die) che in giorni diversi (prove inter-die).

## 7. Risultati

I metodi per la determinazione delle micotossine su matrice vegetale sono stati validati nel nostro laboratorio garantendo i requisiti e le prestazioni minime stabilite dalla Decisione 2002/657/CE della Commissione Europea e i risultati ottenuti sono stati valutati alla luce dei limiti massimi stabiliti dalla normativa comunitaria

Per quanto riguarda la validazione delle Aflatossine B<sub>1</sub>,G<sub>1</sub> sono stati eseguiti nello studio intra-laboratorio, una serie di fortificazioni (per la precisione sei repliche) a tre diversi livelli di contaminazione (1 ppb, 5 ppb e 10 ppb). I risultati dei recuperi medi percentuali ottenuti come si può osservare nella (tabella 4) e dei coefficienti di variazione (RDS%)<sup>3</sup> sono soddisfacenti a tutti i livelli di fortificazione.

Il metodo dunque garantisce un elevato recupero dell'analita e la deviazione standard dei dati indica anche una ripetibilità accettabile.

Aflatossina B1				
	Media Rec %	DEV ST	RDS %	N° di repliche
Rec 1 ppm	101,7	6,9	6,8	16
Rec 5 ppm	87,7	7,0	8,0	16
Rec 15 ppm	90,	6,2	6,9	16

Aflatossina B2				
	Media Rec %	DEV STD	RDS %	N° di repliche
Rec 1 ppm	103	5,8	5,7	16
Rec 5 ppm	97,7	11,4	11,6	16
Rec 15 ppm	96,0	10,8	11,2	16

Aflatossina G1				
	Media Rec %	DEVSTD	RDS %	N° di repliche
Rec 1 ppm	100,3	6,0	6,0	16
Rec 5 ppm	93,5	6,2	6,6	16
Rec 15 ppm	92,7	5,4	5,8	16

Aflatossina G2				
	Media Rec %	DEV STD	RDS %	N° di repliche
Rec 1 ppm	98,3	10,6	10,8	16
Rec 5 ppm	88,9	13,0	14,7	16
Rec 15 ppm	91,8	9,5	10,3	16

**Tabella 4: Recuperi medi % e coefficienti i variazione ottenuti nello studio di validazione**

I campioni sono stati analizzati nello stesso giorno e in diverse giornate; per valutare la specificità del metodo sono stati analizzati diverse specie di vegetali quali mandorle, nocciole, farina di mais, farina di frumento, pinoli ed anacardi. Il metodo è risultato specifico per tutte le specie esaminate in quanto non sono stati evidenziati interferenti di matrice che possano inficiare l'attendibilità

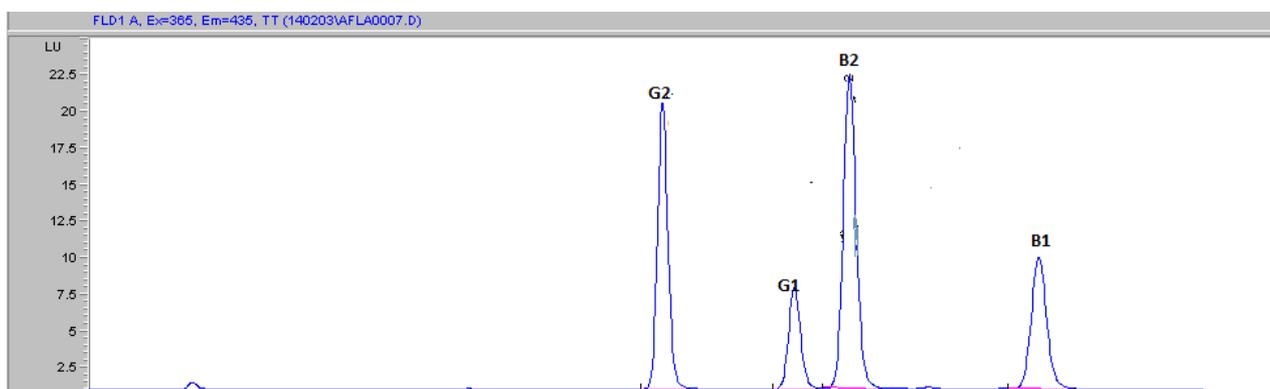
dell'analisi. Ciò significa inoltre, che il passaggio di purificazione su colonna di immuno-affinità permette di rimuovere i diversi interferenti di matrice che potrebbero influire sui risultati.

L'identificazione delle Afla B1,B2, G1, G2 è avvenuta mediante lo studio dei picchi presenti nei cromatogrammi HPLC.e in particolar modo dall'analisi dei diversi tempi di ritenzione( $T_r$ ) osservati per uno standard a concentrazione nota.

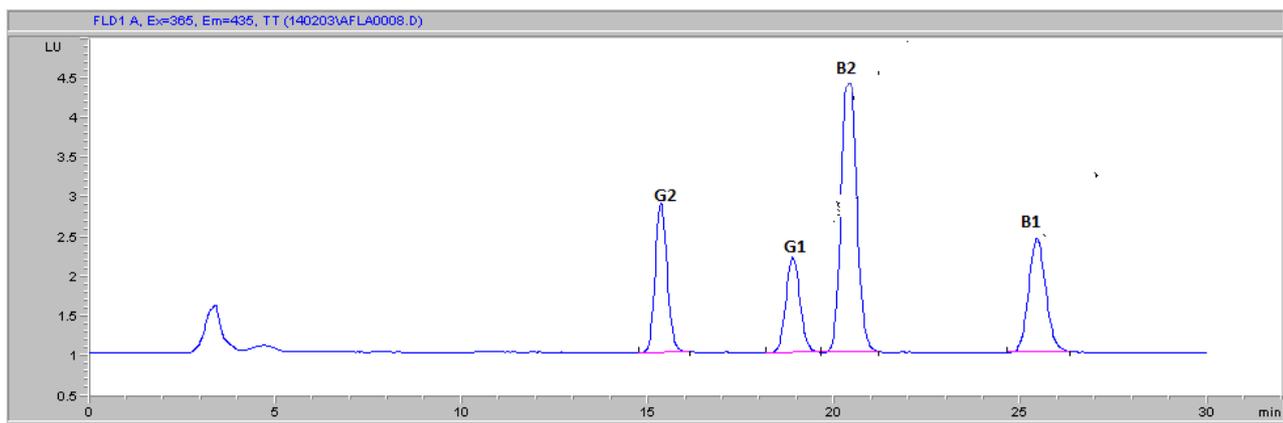
Risulta così che l'ordine di tempo di uscita delle diverse Aflatossine è il seguente:

1. Afla G2
2. Afla G1
3. Afla B2
4. Afla B1

Come si può osservare dalle figure 1 e 2, dunque, la presenza di una o più Aflatossine nel campione è rilevata dalla presenza nel cromatogramma di un picco al  $T_r$  uguale a quello dello standard.



**Fig.1 Cromatogramma standard aflatossine a 10 mg/l**



**Fig.2 Campione di arachidi fortificato con mix di Aflatossine B,G, ad 1 mg/l**

La validità di tale metodo è stata, in aggiunta, confermata dai risultati soddisfacenti ottenuti dalla partecipazione del laboratorio ai circuiti interlaboratorio FAPAS, PROGETTO TRIESTE ed EURL nel biennio 2012-2013.

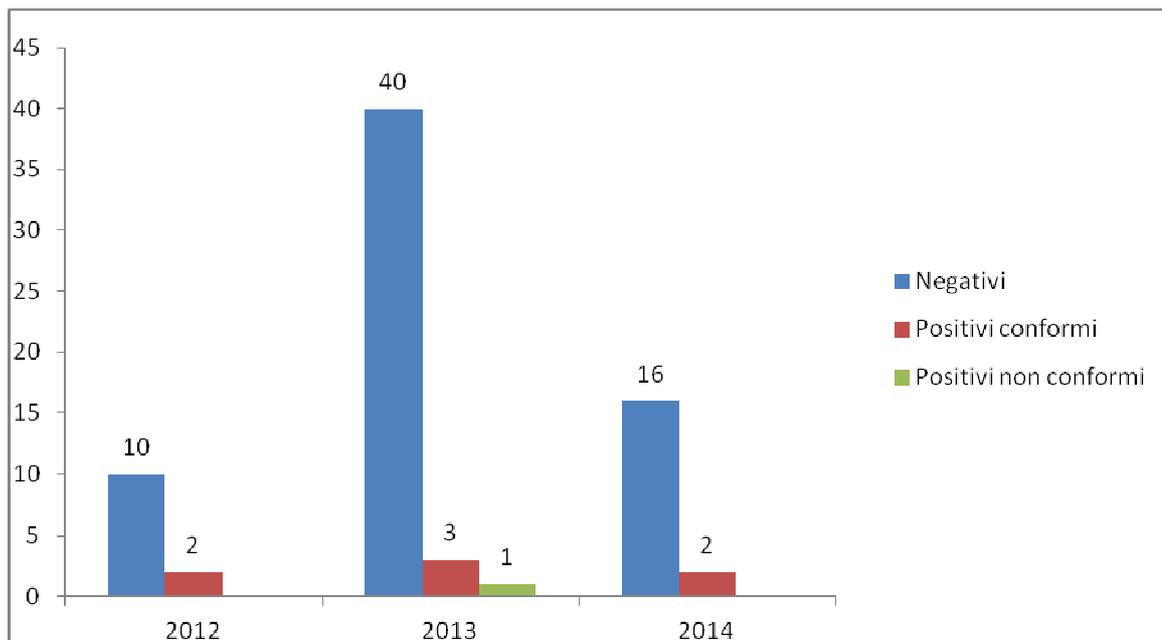
Come si evince dalla tabella 3 riassuntiva, gli z-score registrati sono tutti compresi tra -2 e +2 (e quindi soddisfacenti) e tale risultato fornisce una misura oggettiva della competenza e delle prestazioni analitiche del metodo e del laboratorio, nonché un confronto proficuo con altri laboratori partecipanti.

<b>Anno</b>	<b>Z score</b>	<b>Round</b>	<b>Esito</b>
2012	-1,6	FAPAS 04198	Sodd.
2012	NA	Progetto Trieste round 1	Sodd.
2012	-1,04	Progetto Trieste round 1	Sodd.
2013	-0,78	Progetto Trieste round 2	Sodd.
2013	0.5	EU RL PT 2013 round1	Sodd.
2013	1.2	EU RL PT 2013 round 1	Sodd.
2013	-1,7	EU RL PT 2013 round 2	Sodd.
2013	-1.9	EU RL PT 2013 round 2	Sodd.

**Tabella n 3: Esiti z-score del laboratorio dopo la partecipazione a circuiti inter-laboratori negli anni 2012-2013**

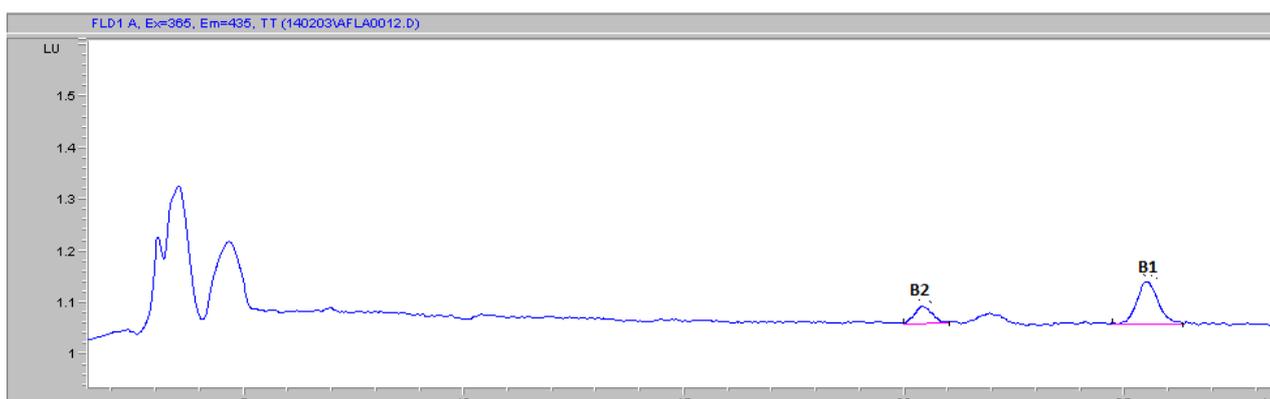
Il metodo sviluppato per la determinazione delle Aflatossine B,G è stato applicato dal 2012 per i controlli ufficiali e finora sono stati analizzati circa 60 campioni di alimenti di origine vegetale, di diversa tipologia, provenienti da paesi extra-europei (Iran, Eritrea, Marocco, Tunisia, Brasile).

In figura 3 è riportato il numero totale di campioni ripartito per anno (a partire naturalmente dal 2012), con l'indicazione di quelli risultati negativi, positivi conformi (cioè entro i limiti di legge) e positivi (non conformi).



**Figura 3 - numero totale campioni analizzati nel periodo 2012- 2014**

Come si evince dalla figura 3 solo nel 2013 si è riscontrata la non conformità per un unico campione di polvere di peperoncino (circa  $40\mu\text{g}/\text{kg}$ ), proveniente dall'Eritrea, mentre le altre matrici analizzate erano negative o positive, ma al di sotto dei limiti di legge (fig.4).



**Fig. 4 Campione di granturco positivo conforme per le Aflatossine B2 e B1**

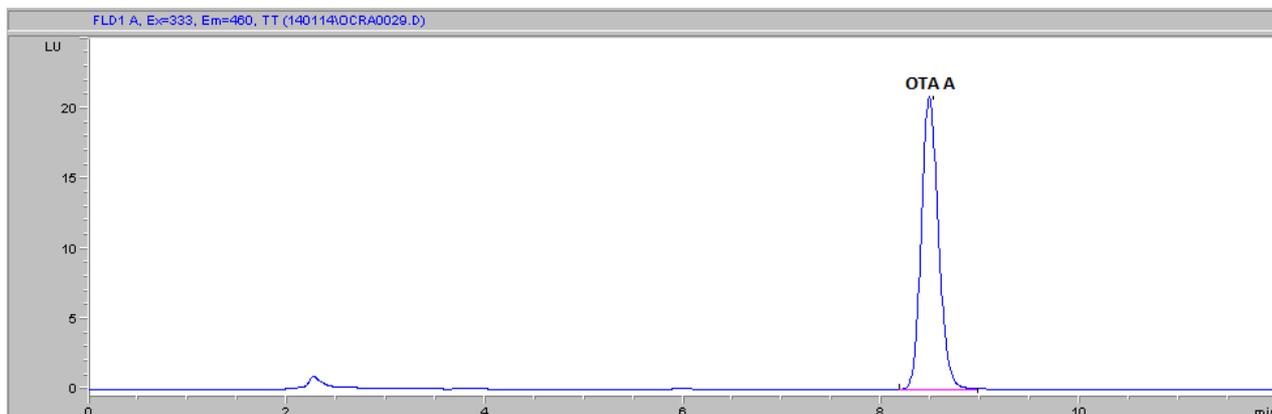
Stesso discorso può essere fatto per l' Ocratossina A.

Per validare il metodo sono state eseguite prove intra-laboratorio che prevedevano la fortificazioni di a 3 diversi livelli di contaminazione (5 ppb, 15 ppb, 20ppb) su matrici quali caffè, liquirizia e uva passa. I recuperi medi percentuali ottenuti come si può osservare nella (tabella 5) e le deviazioni standard sono soddisfacenti a tutti i livelli di fortificazione.

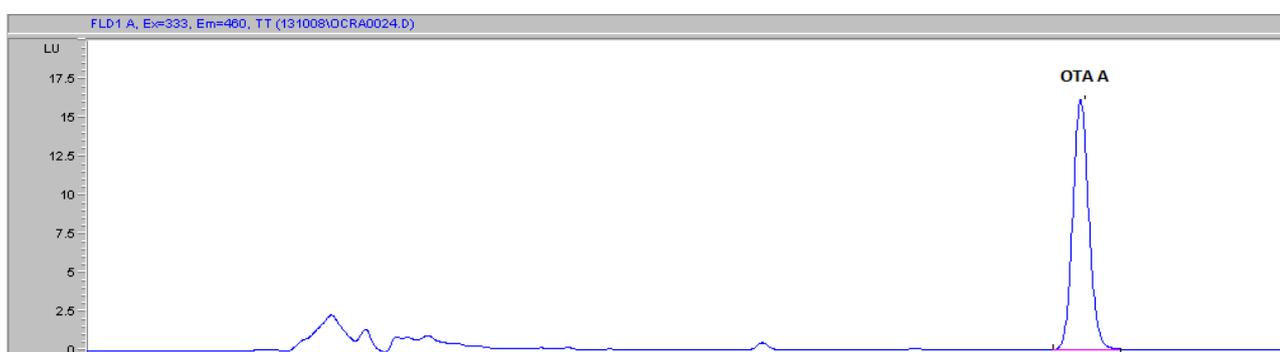
OCRATOSSINA A			
	Media Rec %	DEV STD	N° di repliche
Rec 5 ppb (Caffè)	86,40	4,1	9
Rec 15 ppb(liquirizia)	97,5	3,4	5
Rec 20 ppb(uva passa)	98,82	1,1	6

**Tabella 4: Esiti di recuperi medi % 3 deviazioni standard ottenute nello studio di validazione dell'OTA A**

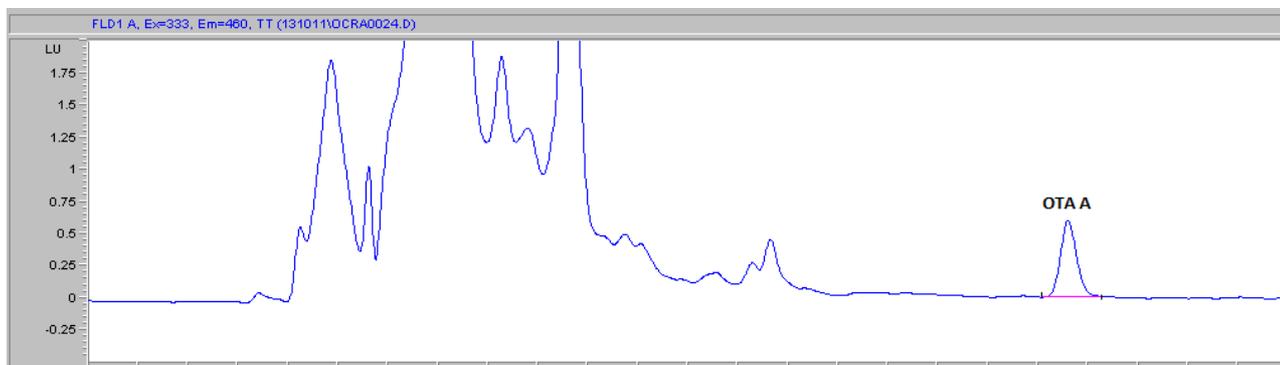
La specificità del metodo è stata testata analizzando un gran numero di campioni di liquirizia, di caffè e di uva passa. L'identificazione dell'analita ricercata è avvenuta paragonando il Tempo di ritenzione caratteristico del picco del cromatogramma HPLC di uno standard di Ocratossina A (fig.5) con quello presente in un campione analizzato (fig.6 e fig 7)



**Fig.5: Cromatogramma HPLC di uno standard a 20 ppb di OTA A**



**Fig 6: Cromatogramma di un campione di caffè contaminato da OTA A**



**Fig 7: Cromatogramma di un campione di uva passa contaminato da OTA A**

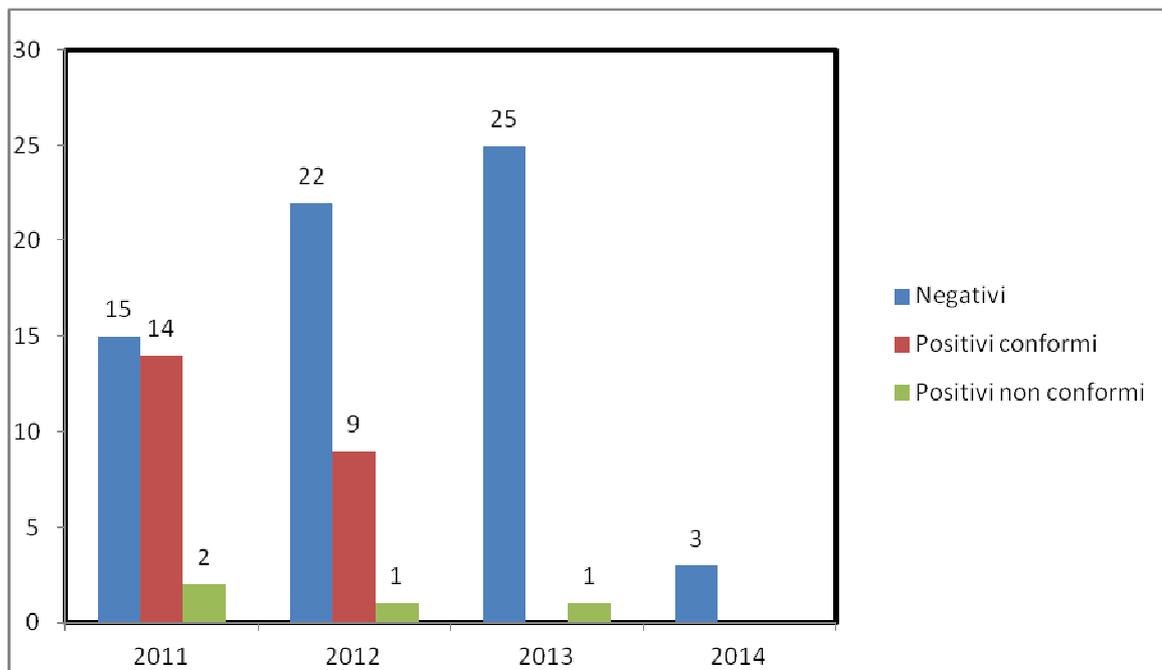
Il metodo sviluppato per la determinazione dell'Ocratossina A è stato applicato dal 2011 per i controlli ufficiali, per analisi di ricerca e per la partecipazione ai circuiti inter-laboratorio FAPAS, PROGETTO TRIESTE ed EURL nel biennio 2012-2013. I risultati ottenuti dal laboratorio in questi ring-test sono tutti soddisfacenti (Tabella 5)

<b>Anno</b>	<b>Z score</b>	<b>Round</b>	<b>Esito</b>
2012	-1,6	FAPAS 17119	Sodd.
2012	NA	Progetto Trieste round 1	Sodd.
2012	0	Progetto Trieste round 1	Sodd.
2013	0,6	Progetto Trieste round 2	Sodd.

**Tabella n 5: Esiti z-score del laboratorio dopo la partecipazione a circuiti inter-laboratori negli anni 2012-2013**

Finora sono stati analizzati circa 95 campioni di alimenti di origine vegetale tra liquirizia, peperoncino, paprika e cereali, la maggior parte dei quali sono risultati conformi rispetto al tenore massimo di Ocratossina A consentito dalla legge.

In figura 8 è riportato il numero totale di campioni ripartito per anno a partire naturalmente dal 2011, con l'indicazione di quelli risultati negativi, positivi conformi (cioè entro i limiti di legge) e positivi (non conformi).



**Figura 8 - Numero totale campioni analizzati nel periodo 2011- 2014 per la ricerca di OTA A**

Come mostra la figura sovrastante, il numero di campioni non conformi è limitato. Infatti sono due nel 2011 e uno sia nel 2012 che nel 2013.

Nel primo caso si tratta di due campioni di liquirizia trattati nella fabbrica, mentre negli altri due casi la contaminazione da OTA A al disopra dei limiti di legge si è riscontrata in un campione di paprika e in uno di polvere di peperoncino.

## 8. Conclusioni

Per tutta la filiera agro-alimentare le micotossine rappresentano uno dei problemi più critici, da tenere sotto controllo per scongiurare gli ormai ben noti e pericolosi effetti sulla salute umana e su quella degli animali.

Dagli anni '90 ad oggi le metodologie adottate per la gestione del rischio micotossine hanno subito un' importante trasformazione. Nei sistemi più avanzati si è passati da un approccio quasi esclusivamente analitico, basato sul controllo a campione, ad un approccio "di filiera", consistente nel valutare le caratteristiche igienico-sanitarie delle materie prime al fine di considerare le misure specifiche adottate nelle fasi a monte. Oggi infatti, dopo un'attenta analisi dei rischi si sono creati dei piani di monitoraggio efficaci e praticabili dediti non solo al controllo delle derrate prodotte nel nostro paese, ma soprattutto incentrati su un attento e qualificato controllo di prodotti provenienti da Paesi extra UE nella fase dell'ingresso nel nostro Paese.

E' dunque di notevole importanza che il laboratorio ufficiale di controllo preposto alla sorveglianza per la protezione del consumatore sia efficiente ed utilizzi dei metodi di prova attendibili, accurati e ripetibili.

Ciò consente anche di sostenere un'azione legale amministrativa, a seguito di campioni non conformi, con risultati affidabili.

Per queste ragioni, la Comunità Europea ha stabilito per legge le modalità di organizzazione e gestione dei laboratori di prova, che devono essere valutati ed

accreditati da un Ente terzo indipendente, secondo la norma internazionale EN ISO/IEC 17025:2000<sup>(1)</sup>.

Inoltre la Comunità Europea ha stabilito i criteri ed i parametri specifici per valutare le prestazioni analitiche dei metodi di prova utilizzati da un laboratorio di prova ufficiale. Per far fronte a queste richieste nel nostro laboratorio sono stati validati e successivamente accreditati, in accordo con la norma internazionale EN ISO/IEC 17025<sup>(1)</sup>, i metodi per la determinazione delle Aflatossine B,G e l'Ocratossina A nei prodotti vegetali e negli alimenti ad uso zootecnico.

Entrambi questi metodi di prova sono stati, inoltre, migliorati abbassando il LOQ (limite di quantificazione ) degli analiti a 0.25 µg/kg, in modo da poter rilevare la presenza di queste tossine anche in concentrazioni infinitesime.

E' dunque opportuno concludere questo lavoro sottolineando che la sicurezza alimentare è un obiettivo comune che può essere raggiunto con l'impegno, le responsabilità e il rispetto delle normative da parte di tutti gli operatori interessati. Infatti alla libera circolazione delle merci deve corrispondere la garanzia di controlli pubblici ufficiali di pari efficacia, a livello di singoli Stati membri, per impedire che eventuali falle possano provocare danni di estensione sovranazionale, con gravi ripercussioni sulle filiere coinvolte e soprattutto sulla fiducia dei consumatori nel sistema europeo di tutela.

Un'alimentazione sana è indispensabile per il mantenimento della salute e l'informazione e la consapevolezza aiutano a realizzarla.

## 9. Bibliografia

1. **EN ISO/IEC 17025: 2000** “General requirements for the competence of testing and calibration laboratories”
2. **M. C. SPANJER, J. M. SCHOLTEN, S. KASTRUP, , U. JO” RISSEN, T. F. SCHATZKI,& N. TOYOFUKU** “Sample comminution for mycotoxin analysis: Dry milling or slurry mixing?” *Food Additives and Contaminants, January 2006; 23(1): 73–83*
3. **SIU-PO IP, CHUN-TAO CHE.** “Determination of aflatoxins in Chinese medicinal herbs by high-performance liquid chromatography using immunoaffinity column cleanup. Improvement of recovery”. *Journal of Chromatography A, 1135 (2006) 241–244*
4. **The EFSA Journal (2006) 365; 1-56** “Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the Commission related to ochratoxin A in food”.
5. **G.U. L 364 del 20/12/2006** Regolamento (CE) N. 1881/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006 recante modifica del regolamento (CE) 1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari
6. **G.U. L 50 del 27/02/2010** “Regolamento (UE) N. 165/2010 della Commissione del 26 febbraio 2010 recante modifica, per quanto riguarda le aflatoxine, del regolamento (CE) 1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari”
7. **G.U. L 35 del 06/02/2010** “Regolamento (UE) N. 105/2010 della Commissione del 5 febbraio 2010 recante modifica del regolamento (CE) 1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari”

8. **G.U. L 159 del 17/06/2011** “Regolamento (CE) N. 574/2011 della Commissione del 16 giugno 2011 che modifica l’allegato I della direttiva 2002/32/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio per quanto riguarda i livelli massimi di nitrito, melamina, *Ambrosia* spp. e carry-over di alcuni coccidiostatici e istomonostatiche che consolida gli allegati I e II”
  
9. **ESTEBAN A., ABARCA, M.L., BRAGULAT, M.R., CABAÑES, F.J.**, 2006. Effect of water activity on ochratoxin A production by *Aspergillus niger* aggregate species. *International Journal of Food Microbiology* 108, 188-195
  
10. **ARIÑO A., HERRERA M., ESTOPAÑAN G., JUAN T.** (2007) “High levels of ochratoxin A in licorice and derived products”. *International Journal of Food Microbiology* 114; 366–369
  
11. **BRESCH, H., URBANEK, M., NUSSER, M.** (2000) “Ochratoxin A in food containing liquorice.” *Nahrung* 44, 276–278
  
12. **HERRERA M., HERRERA A., ARIÑO A.** (2009) “Estimation of dietary intake of ochratoxin A from liquorice confectionery”. *Food and Chemical Toxicology* 47; 2002–2006
  
13. **AOAC Official Method 991.44:** “Ochratoxin A in Corn and Barley – Liquid Chromatographic Method” – *First action 1991*
  
14. **THOMAS RUNDBERGETA , ALISTAIR L. WILKINS** “Determination of *Penicillium* mycotoxins in foods and feeds using liquid chromatography–mass spectrometry” *Journal of Chromatography A*, 964 (2002) 189–197
  
15. **AURELI G., QUARANTA F., AMORIELLO T. , MELLONI S. , DESIDERIO E. , D’EGIDIO M.G.:** “Studio triennale sulla contaminazione da deossinivalenolo (DON) nel frumento duro in coltivazione biologica e convenzionale”

16. **F. BERTHILLER, U. WERNER, M. SULYOK, R. KRŠKA, M.-T. HAUSER, AND R.SCHUHMACHER-** (2006) “Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry(LC-MS/MS) determination of phase II metabolites of the mycotoxin zearalenone in the model plant *Arabidopsis thaliana*” *Food Addit Contam.* 2006 November ; 23(11): 1194–1200.
17. **COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY, (CAST),** 2003 “Mycotoxins: Risks in Plant, Animal and Human Systems.” Ames/IO USA.
18. **MIRAGLIA,M., BRERA, C., ONORI,R.,** 1996. “Le Micotossine: problematiche generali e criteri di intervento. Riv. It. Igiene, 56(5-6): 384-385
19. **NICHOLSON,P., TURNER,JA., JENKINSON,P., JENNINGS, P.,THOMSETT,M.,** 2003. “Maximising control with fungicides of *Fusarium* Ear Blight (FEB) in order to reduce toxin contamination of wheat”. Project Report No.297, HGCA, London.
20. **SCHUH, M.,** 1996 “Manifestazioni cliniche e subcliniche da assunzione di alimenti contaminati con micotossine nel bovino” *Praxis vet.*,17 (3); 5-10
21. **KUIPER-GOODMAN,T.,** 2004. “Risk assessment and risk management of mycotoxins in food”. Woodhead Pub. Ltd., Cambridge.
22. **PIETRI, A., BERTUZZI,T., PIVA, G.,** 1997. “Aflatoxin M<sub>1</sub> occurrence in samples of Grana Padano Cheese production”. *It.J.Food Sci.*,15(5):301-306.

23. **VELDMAN,A., MEIJEST, J.A.C., BORGGREVE,G.J., HEERES-VAN-DER TOL, J.J.**, 1992. "Carry-over of aflatoxin from cows food to milk"  
Prod., 55:163-169