



ORDINE INTERPROVINCIALE DEI CHIMICI

• MICOTOSSINE

- Dott.ssa Carla Mastella
- E-mail: carla.mastella@alice.it





MICOTOSSINE

- Le micotossine sono metaboliti secondari di funghi microscopici con peso molecolare relativamente basso, moderata o altra polarità, bassa volatilità, elevata stabilità ed una specificità di struttura strettamente correlata alla tassonomia dei microrganismi produttori.
- Un importante caratteristica di tutti i metaboliti secondari (micotossine comprese) è che la loro produzione non è uniforme nell'ambito della stessa specie e la capacità biosintetica di un ceppo produttore può essere influenzata da particolari condizioni ambientali e nutrizionali, dalla presenza del mezzo culturale di biocidi (agenti antimicrobici) o di altri microrganismi.
- Le indagini sulla diffusione delle micotossine negli alimenti e nei mangimi hanno posto in evidenza che il pericolo della micotossicosi non è limitato ad una singola area geografica, ma è un reale o potenziale problema in tutte le zone in cui è possibile la crescita fungina.
- In teoria, tutte le derrate alimentari di origine animale di origine vegetale e di alcuni prodotti di origine animali, potrebbero essere soggetti a contaminazione da parte di micotossine; tra questi quelli maggiormente interessate sono i cereali, le oleaginose, frutta secca, latte e derivati vini. L'infezione, lo sviluppo la produzione di tossine ad opera di funghi micotossinogeni nei prodotti destinati all'alimentazione umana o animale possono avere luogo durante ogni stadio del ciclo produttivo, dalla coltivazione in campo, alla raccolta, all'immagazzinamento, alla trasformazione trasporto dei prodotti finiti.

MICOTOSSINE

A seconda del periodo durante il quale si verifica la contaminazione dei prodotti vegetali, i funghi micotossigeni vengono suddivisi in «funghi di campo» (che invadono la pianta prima della raccolta) e «funghi di magazzino »(che si sviluppano nelle derrate dopo la raccolta).

Temperature comprese tra i 15° i 30° gradi sono generalmente idonee allo sviluppo di muffe, con valori ottimali tra 20 °- 25°. In generale la formazione di micotossine può verificarsi se il tasso di umidità del substrato è pari o superiore al 13 -16%, con valori ottimali tra il 20- 25%.

Il valore minimo di Aw necessario per lo sviluppo della maggior parte delle specie micotossinogene nelle granaglie immagazzinate è di circa 0,7, normalmente valori più alti (rispetto a quelli richiesti per la crescita funginea) sono necessari per la produzione di micotossine.

MICOTOSSINE

Va ricordato che le micotossine nei prodotti destinati all'alimentazione umana o animale persistono nella maggior parte dei casi alla cottura, né che altri processi di trasformazione degli alimenti sono in grado di modificarne la struttura e quindi di ridurre la tossicità.

Una semplice ispezione visiva dei prodotti finiti o delle materie prime destinate la trasformazione non può essere considerata sufficiente per escludere la presenza di micotossine, e queste possono persistere di trovarsi inalterate nel prodotto finito anche dopo la morte del fungo tossicogeno. La presenza di muffe evidenti non è sintomo di presenza di micotossine. Non va dimenticato infine che le micotossine possono ritrovarsi anche in alimenti di origine animale che non hanno subito un attacco diretto da parte di ceppi micotossine geni, sia come prodotti del metabolismo di animali esposti a mangimi contaminati da micotossine che in seguito all'accumulo nei tessuti.

Meccanismo di azione delle micotossine

- Il meccanismo di azione della micotossine è strettamente legato al tipo di operazioni biochimiche che interessano alcune molecole essenziali presente nelle cellule animali (recettori molecolari).
- Le micotossine a seconda della struttura chimica possono interagire con diversi tipi di recettori molecolari quali di acidi nucleici (DNA e RNA), le proteine funzionali (enzimi) e strutturali, i cofattori enzimatici, gli ormoni e i neurotrasmettitori, i costituenti di membrana e le proteine di trasporto transmembrana.
A seconda dell'efficacia nell'introdurre specifiche alterazioni biochimiche, le micotossine possono essere indicativamente classificate come modificatori della funzione di stampo del DNA, dell'attività ormonale, del citoscheletro, dei processi di differenziazione cellulare o come inibitori della sintesi delle macro molecole informazionali (acidi nucleici e proteine), dei processi biogenetici del ciclo degli acidi tricarbossilici e fosforilazione ossidativa.

Meccanismo di azione delle micotossine

- A causa dell'elevata diversità strutturale le micotossine ingerite con gli alimenti sono in grado di provocare gravi disordini e sintomi di tossicità acuta livello di differenti organi e i sistemi anatomici quali fegato, reni, intestino, sistema cardiocircolatorio, sistema riproduttivo, sistema nervoso centrale ,sistema immunitario ed ormonale. Anche epidermide e polmoni possono diventare organi target primari delle micotossine per contatto e inalazione.

Principali micotossine

Aflatossine (B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ e M₂)

Ocratossine (OTA, OTB e OTC)

Tricoteceni (DON T-2 e HT-2)

Fusario tossine

Fumonisine (B₁, B₂)

Zearalenone

Patulina

Moniliformina

Acido Tenuazonico (TeA), Alternariolo (AOH)

Meccanismo di azione delle micotossine

- In riferimento alla diversa regione anatomica interessata, le micotossine possono essere classificate in:
- **Epatotossine** : aflatossine, patulina, fumonisine, acido penicillico sterigmatocistina, luteoschirina;
- **Nefrotossine**: ocratossine, fumonisine, citrinina;
- **Neurotossiche**: fumonisine, clavacina, roquefortina, tossine tremorgeniche;
- **Gastroentero tossine**: tricoteceni, rugolosina;
- **Tossine emorragiche**: tossina T2, chinoni antrachinoni, acido bissoclamico, strachibotritotossina;
- **Ossine ad effetto estrogenico e abortivo** : zearalenone, tossine da *Mucor* spp e *Aspergillus* spp;
- **Dermatossine**: tricoteceni.

Meccanismo di azione delle micotossine

- Oltre ad una tossicità acuta o subacuta, le micotossine possono produrre anche tossicità cronica come conseguenza di un'esposizione protratta nel tempo a bassi livelli di contaminazione degli alimenti.
- Relativamente ai loro effetti cronici, le micotossine possono essere cancerogene, geno tossiche, mutagene, teratogene, immunosoppressive e estrogene.

MICOTOSSINE DOVE?

La principale fonte di esposizione alle micotossine è l'alimentazione. Le micotossine più diffuse nei prodotti destinati all'alimentazione umana sono elencate nella tabella successiva insieme ai prodotti cui queste si sviluppano in cui queste si sviluppano le specie fungine che le producono. Altri fattori legati alla dieta possono contribuire ad aumentare o diminuire la tossicità delle micotossine ingerite.

Un'altra via di esposizione le micotossine è rappresentata dall'inalazione di spore presenti in elevate quantità sia in alcuni ambienti di lavoro sia in ambienti domestici particolarmente umide poco areati.

SPECIE DI FUNGHI	CONDIZIONI DI CRESCITA DEI FUNGHI	CONDIZIONI DI SVILUPPO MICOTOSSINE	MICOTOSSINE PRODOTTE
<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i>	Temperature: 10 - 42 °C Temperatura ottimale: 32 °C Umidità granella: 15 - 30%	Temperature: 20 - 30 °C Temperatura ottimale: 28 °C a_w * minimo: 0,78	Aflatossine (AF) B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Temperature: 10 - 35 °C Temperatura ottimale: 28 °C Umidità granella: 16 - 20%	Temperature: 10 - 35 °C Temperatura ottimale: 25 °C a_w minimo: 0,80	Ocratossina A (OTA)
<i>Penicillium verrucosum</i>	Temperature: 2 - 36 °C Temperatura ottimale: 23 °C Umidità granella: 20 - 21%	Ancora poco conosciute	Ocratossina A (OTA)
<i>Fusarium culmorum</i> <i>Fusarium graminearum</i>	Temperature: 4 - 35 °C Temperatura ottimale: 25 °C Umidità granella: 20 - 21%	Temperature: 10 - 30 °C Temperatura ottimale: 20 °C <i>F. culmorum</i> 30 °C <i>F. Graminearum</i>	Deossinivalenolo (DON), Zearalenone (ZEA)
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	Ancora poco conosciute	Temperatura ottimale: 20 °C a_w ottimale: 0,95 - 0,97	T-2, HT-2
<i>Fusarium verticillioides</i> (<i>ex F. moniliforme</i>)	Temperature: 4 - 36 °C Temperatura ottimale: 25 °C Umidità granella: 18 - 20%	Temperature: 15 - 30 °C Temperatura ottimale: 30 °C a_w minimo: 0,91 - a_w ottimale: 0,97	Fumonisine (FB)
<i>Fusarium proliferatum</i>	Temperature: 4 - 36 °C Temperatura ottimale: 25 °C Umidità granella: 18 - 20%	Temperature: 15 - 30 °C Temperatura ottimale: 15 °C a_w minimo: 0,91 - a_w ottimale: 0,97	Fumonisine (FB)

* a_w , acqua libera nella granella

- **ATTENZIONE:**
- Non tutti i funghi compresi nei generi e specie indicati in precedenza producono sempre micotossine. Solo alcune specie, riescono a produrre la sostanza in questione.
- Ciò può avvenire solamente se le condizioni ambientali (temperatura ed umidità) sono favorevoli a tali processi.

NORMATIVA

REGOLAMENTO (CE) N. 1881/2006 del 19 dicembre 2006:

Definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari

REGOLAMENTO (CE) N. 401/2006 del 23 febbraio 2006:

Relativo Ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari.

REGOLAMENTO (CE) del 28 settembre 2007 N°1126:

Modifica del regolamento (CE) n° 1881/2006 (CE) che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari per quanto riguarda le Fusarium-tossine nel granturco e nei prodotti a base di granturco.

Decreto Legislativo 10 maggio 2004, n. 149:

Attuazione delle direttive 2001/102/CE, 2002/32/CE, 2003/57/CE e 2003/100/CE, relative alle sostanze ed ai prodotti indesiderabili nell'alimentazione degli animali.

AFLATOSSINE

Le **Aflatossine**, 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 e non, dove le caratteristiche del clima e la pressoché totale assenza di refrigerazione facilitano la crescita delle muffe produttrici.

Chimicamente sono dei derivati della cumarina e vengono denominate con le sigle :

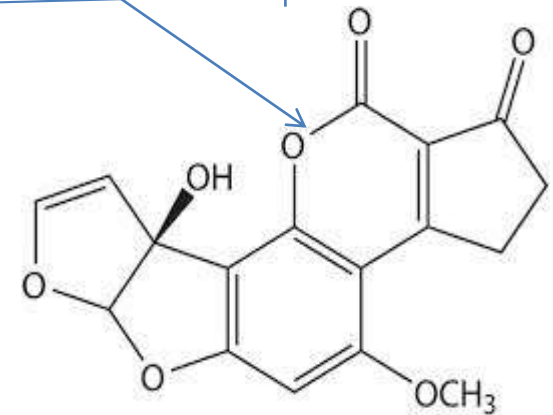
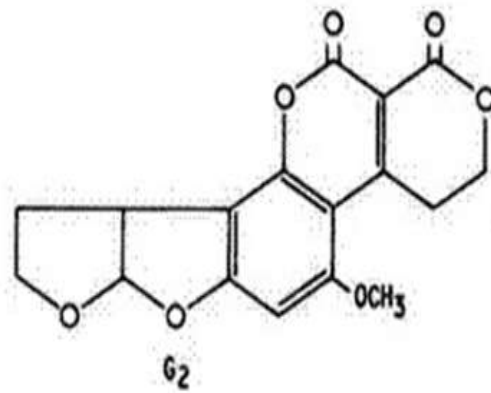
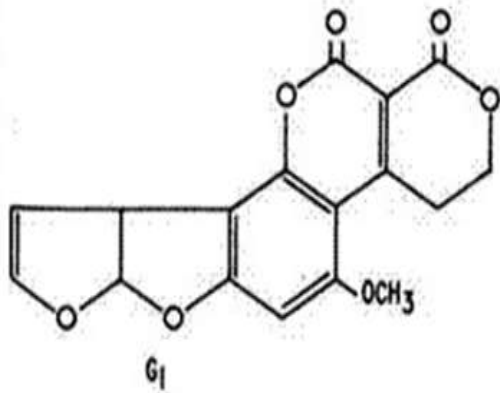
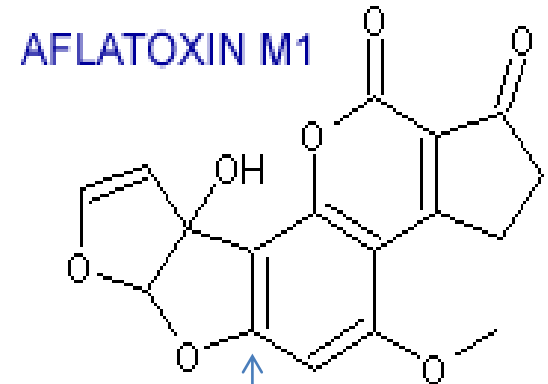
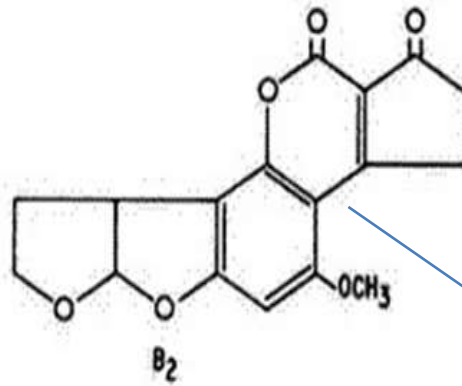
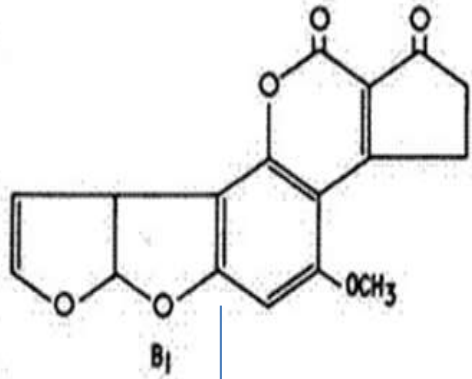
- **B1, B2** (rispettivamente metossi-difurocumarone e metossi-difurocumarolattone),
- **G1, G2** (loro diidroderivati),

I metaboliti idrossilati rispettivamente di B1 e B2 si riscontrano nel latte e vengono chiamate M1 e M2

Aflatossina M1(ng/kg di latte) = 1,19 x Aflatossina B1(µg/capo/d) +1,9

Tra le diverse aflatossine, l'aflatossina B1 è senza dubbio la più importante sia dal punto di vista tossicologico che per la sua diffusa presenza nei prodotti destinati all'alimentazione umana e animale. Per quanto riguarda i prodotti lattiero caseari, particolare importanza riveste la contaminazione da aflatossine B1 cioè il quattroidrossi derivato dell'afla B1, che si forma a seguito della conversione metabolica dell' aflaB1 da parte di animali da latte alimentati con mangimi contaminati.

AFLATOSSINE



AFLATOSSINE

- Le aflatossine possono ritrovarsi numerosi prodotti alimentari, tra cui quelli particolarmente rischio sono : semi oleosi , frutta secca, cereali, frutta.
- La fonte principale di micotossine è il mais, a seguire il frumento e la soia. Per controllarle dobbiamo verificare con attenzione il fornitore tenere monitorata la materia prima in ingresso in azienda e, soprattutto devono essere puliti i silos di stoccaggio all'interno dei quali si possono verificare fenomeni di condensazione comprese le pareti che creano le condizioni per lo sviluppo di muffe.

Regolamento (CE) n°1881/2006 del 19/12/2006
Limiti per aflatossine

Prodotto	Afla B1 µg/Kg	Afla tot. µg/kg	Afla M1 µg/Kg
Arachidi, frutta a guscio e frutta secca destinati al consumo diretto	2,0	4,0	–
Arachidi, destinati alla cernita	8,0	15,0	–
Frutta a guscio e frutta secca destinati alla cernita	5,0	10,	–
cereali	2,0	4,0	–
Cereali destinati alla cernita	2,0	4,0	–
Granoturco destinato alla cernita	5,0	10,0	–
Latte	/	/	0,05
Spezie	5,0	10,0	–

Regolamento (CE) n°1881/2006 del 19/12/2006
Limiti per Baby Food

Prodotto	Afla B1 µg/Kg	Afla tot. µg/kg	Afla M1 µg/kg
Alimenti per l'infanzia e alimenti a base di cereali destinati a lattanti e prima infanzia	0,1	-	-
Alimenti per lattanti e alimenti di proseguimento compresi il latte per lattanti e il latte di proseguimento	-	-	0,025
Alimenti dietetici a fini medici speciali destinati in modo specifico	0,1	-	0,025

MAIS e AFLATOSSINE

- Il mais è senza dubbio la cultura più diffusa negli ambienti agricoli settentrionali in cui sono presenti importanti problemi da micotossicosi. Questa pianta, infatti, può essere soggetta ad infestazione da parti ceppi fungini appartenenti a specie comprese in tutti 3 i generi : Fusarium, Aspergillus e Penicillium.
- Tenuto conto delle caratteristiche climatiche delle zone nostre zone maidicole, appare chiaro, solo, in anni caldi e secchi(stress idrico) saranno possibili problemi da aspergillus e quindi da aflatossine, mentre regolarmente, ogni anno, saranno presenti attacchi di Fusarium e quindi quantità preoccupanti di fusario-tossine.

MAIS E AFLATOSSINE

L'82% del mais coltivato in Italia è destinato all'alimentazione degli animali. Se a questa percentuale si aggiunge la quota (3,7%) di mais utilizzato come sottoprodotto dell'industria dell'amido nel settore dei mangimi, si raggiunge complessivamente un valore dell'86% circa di mais e derivati impiegati per uso zootecnico. L'impiego del mais come pianta intera, trinciato e insilato, e delle diverse parti botaniche (pastone di pannocchia) è diffuso nell'alimentazione dei bovini da latte e da carne e dei piccoli ruminanti, dove costituisce un alimento di grande interesse nutrizionale per le sue caratteristiche di elevata appetibilità e buona digeribilità dei principi nutritivi, oltre che di basso costo. La granella di mais, in diverse forme fisiche (intera, farina, fioccata, estrusa ecc.) rappresenta invece la fonte energetica per eccellenza delle diete ed è ampiamente diffusa sia nei monogastrici (suini, avicoli ecc.) che nei ruminanti.

Fattori critici della contaminazione da micotossine del mais

- Epoca di raccolta (più rischiose le qualità tardive)
- Danno da piralide (seconda generazione)
- Scarsa lavorazione del terreno, scarsa aratura, coltivazioni intensive, veicoli da parte di insetti e uccelli, larve di piralide che sopravvivono
- Residui della pianta sono lasciati sul terreno dopo il raccolto.
- Temperature elevate e umidità.
- Umidità alla raccolta valore soglia 22%.
- Trattamento in campo.

PRINCIPALI RESPONSABILI DELLA CONTAMINAZIONE DA MICOTOSSINE DEL MAIS

- Lesioni o rotture dei grani al momento della raccolta dovute battitura veloce alla bassa percentuale di umidità della granella che la rende particolarmente vulnerabile alle lesioni meccaniche (rotture ,lesioni esterne fessurazioni).
- Sviluppo di colonie fungine per la persistenza in campo della granella in condizioni ambientali di umidità relativa e temperatura relativamente alte che creano situazioni ideali lo sviluppo e la moltiplicazione delle afla(situazione molto frequente nella pianura padana).
- Essiccazione difficoltà di ottenere una disidratazione omogenee di in caso di raccolta granella troppo secca.
- L'azione del prodotto in mucchio per mancato coordinamento delle fasi di raccolte essiccazione.
- tutto ciò porta al degrado chimico fisico del mais, cali di peso superiore a quelli naturali, alla perdita delle caratteristiche nutrizionali dovute all'azione batterica e soprattutto la creazione di condizioni favorevoli allo sviluppo di muffe e o micotossine

AZIONI PREVENTIVE

- Impiegare ibridi precoci o medio-precoci;
- Trinciare ed interrare i residui colturali;
- Avvicendare le colture, alternando la coltivazione dei cereali con altre colture;
- Scegliere il giusto investimento: 5,5-6 piante / mq per gli ibridi tardivi (classi 700 e 600), 6,5-7 piante / mq per gli ibridi medio precoci (classe 500) e 7-8 piante / mq per gli ibridi precoci (classi 400 e 300);
- Concimare in modo adeguato (evitare gli eccessi di azoto);
- Evitare gli stress idrici, i danni meccanici o da insetti;
- Controllare lo sviluppo della piralide (le rotture facilitano l'accesso dei funghi): molto efficace risulta essere il trattamento con insetticidi dopo la completa fioritura del mais.
- Anticipare la raccolta, anche se con qualche punto di umidità in più. Non attendere troppo oltre la maturazione fisiologica (formazione del punto nero sul peduncolo del grano), soprattutto per ibridi tardivi ed in condizioni climatiche fresche ed umide.

AZIONI PREVENTIVE

- Impiegare ibridi precoci o medio-precoci
- Trinciare ed interrare i residui colturali;
- Avvicendare le colture, alternando la coltivazione dei cereali con altre colture;
- Scegliere il giusto investimento: 5,5-6 piante / mq per gli ibridi tardivi (classi 700 e 600), 6,5-7 piante / mq per gli ibridi medio precoci (classe 500) e 7-8 piante / mq per gli ibridi precoci (classi 400 e 300)
- Concimare in modo adeguato (evitare gli eccessi di azoto)
- Evitare gli stress idrici, i danni meccanici o da insetti
- Controllare lo sviluppo della piralide (le rotture facilitano l'accesso dei funghi): molto efficace risulta essere il trattamento con insetticidi dopo la completa fioritura del mais;
- Anticipare la raccolta, anche se con qualche punto di umidità in più. Non attendere troppo oltre la maturazione fisiologica (formazione del punto nero sul peduncolo del grano), soprattutto per ibridi tardivi ed in condizioni climatiche fresche ed umide.

DECONTAMINAZIONE

- Il mais non conforme può essere decontaminato attraverso procedure di:
- Pre-pulitura, pulitura, spazzolatura della granella.
- Uso di selezionatrici ottiche (eliminazione dei chicchi infungati, chicchi neri).
- Uso di altre selezionatrici fisiche (gravimetria).
- Segregazione dei lotti decontaminati.

DECONTAMINAZIONE

uso zootecnico

- Attraverso l'utilizzo di sostanze sequestranti quali bentoniti, sepioliti, zeoliti, carboni attivi da miscelare direttamente nelle farine.
- L'efficacia dipende dalla sostanza utilizzata e dalla micotossina che si vuole sequestrare.
- Utilizzo di epatoprotettori-antiossidanti.
- Non è consentito diluire il latte contaminato
- Non è consentito l'uso di agenti chimici

FRUMENTO E MICOTOSSINE

- Il controllo del frumento in ingresso al mulino, è il principale punto critico dell'industria molitoria: analisi visiva, olfattiva, setacciatura, verifica della presenza di semi estranei, controllo delle umidità, infestazioni (insetti vivi e/o morti), proteine, peso elettrolitico sono le verifiche che normalmente si dovrebbero fare per ogni singolo arrivo di grano.

MICOTOSSINE E LATTE

Il problema nel latte deriva dall'utilizzo di mais contaminato da aflatossine B1 per l'alimentazione dei bovini. Se nel latte si rileva la presenza di aflatossine M1 in quantità superiori a quelle consentite dalla legge (50ppb), gli allevatori non possono metterlo sul mercato.

Dal punto di vista pratico, per stimare il trasferimento di aflatossina M1 in un'intera mandria è ormai ampiamente diffusa l'equazione proposta da Veldman et al. (1992):

$$\text{AflatossinaM1}(\text{ng/kg di latte}) = 1,19 \times \text{AflaB1}(\mu\text{g/capo/d}) + 1,9$$

Secondo questa equazione con un'ingestione di afla M1 superiore a 40 $\mu\text{g/capo/d}$, si possono superare i limiti di legge di M1 nel latte pari a 0,05 $\mu\text{g/kg}$

MAIS :FILIERA LATTE

- Effettuare la ricerca negli alimenti somministrati all'animale dell'aflatossina B1
- Predisporre la sospensione dell' utilizzo degli alimenti che con maggiore probabilità possono essere contaminati (granella di mais, semi oleosi) sostituendoli con mangimi costituiti da materie prime con basso rischio di contaminazione (soia, fieno)
- Utilizzare partite di alimenti certificati a ridotta contaminazione da AFB1
- Somministrare "sequestranti" (es. Bentonite, Zeoliti o simili)
- Effettuare una nuova analisi del latte dopo qualche giorno (4-5) dalla variazione della razione alimentare

Presenza delle micotossine

cosa no si può fare

- Miscelare partite fortemente contaminate con quelle non contaminate
- Utilizzare una percentuale ad hoc di mais contaminato ad alti livelli nella razione
- Pensare che prelevare una piccola quantità di mais villanella possa essere rappresentativo dell'otto
- Pensare di non ricorrere alla praticabilità di flussi di produzione
- Pensare che tutti i test di screening rapidi siano uno strumento attendibile per valutare lo stato di contaminazione di un lotto
- Ignorare il problema

AFLA E FORMAGGIO

Una trattazione merita anche la presenza di micotossine nei prodotti lattiero-caseari.

In Europa alcuni paesi hanno fissato dei limiti nei formaggi senza distinzione fra le diverse tipologie (ad esempio la Svizzera: 0,250 µg/kg). A livello UE, non ci sono indicazioni precise sui formaggi e gli altri derivati del latte ma nel Regolamento (CE) n. 466/2001 nell'art. 2 si precisa che **“nel caso di prodotti diversi da quelli indicati nell'allegato (e quindi nello specifico nel latte) che siano essi essiccati, diluiti, lavorati o composti da più di un ingrediente, il tenore massimo applicabile sarà quello indicato nell'allegato 1 (cioè nello specifico per il latte) tenendo presente rispettivamente le modifiche della concentrazione del contaminante causate dalla procedura di essiccamento o dalla diluizione, le modifiche della concentrazione del contaminante causate dalla lavorazione, le relative proporzioni degli ingredienti nel prodotto, nonché il limite analitico della quantificazione”**.

Sulla base di questa norma la regione Veneto, ha suggerito di adottare, per calcolare i limiti di M1 nei formaggi, i coefficienti di trasformazione del latte in formaggio (riportati per i formaggi italiani nella G.U. n. 183 dell'8 agosto 2003). Es: calcolo del tenore massimo di M1 nell'Asiago Pressato, che presenta un coefficiente pari a 8,95, cioè una resa casearia pari all'11,2%:

- **Aflatossina M1 nel formaggio = 0,05 (limite aflatossina M1 nel latte) x 8,95 = 0,447 µg/kg.**

In Italia inoltre è stata pubblicata in data 24 agosto 2004 la nota D.G.V.A/IX/25664/f.5.b.b.2/P del Ministero della Salute che fissa un limite di 0,45 µg/kg, quale valore provvisorio e riferito solo ai formaggi a pasta dura e lunga stagionatura (es. Grana, Parmigiano Reggiano).

Regolamento 1881/2006

Articolo 3

Divieti in materia di uso, miscelazione e detossificazione

1. I prodotti alimentari non conformi ai tenori massimi di cui all'allegato non possono essere utilizzati come ingredienti alimentari.
2. I prodotti alimentari conformi ai tenori massimi di cui all'allegato non possono essere miscelati con prodotti alimentari in cui tali tenori massimi siano superati.
3. I prodotti alimentari da sottoporre a cernita o ad altri trattamenti fisici per abbassare il livello di contaminazione non possono essere miscelati con prodotti alimentari destinati al consumo umano diretto, né con prodotti alimentari destinati a essere impiegati come ingredienti alimentari.
4. I prodotti alimentari contenenti i contaminanti di cui alla parte 2 dell'allegato (Micotossine) non possono essere sottoposti a detossificazione mediante trattamenti chimici.

Metodi Ufficiali AOAC e CEN

	matrice	Riferimento	Metodo
Afla tot.	Cereali, frutta in guscio e der.	AOAC 991,31 CEN- EN 12955:99	IAC-HPLC derivat. Post colonna ril. fluorim.
	Mais	AOAC 993,16	ELISA
B1	Mangimi	AOAC 2003,02 CEN- EN ISO 17375:2006	IAC-HPLC derivat. Post colonna ril. fluorim.
B1	Baby foods	AOAC 2000,16	IAC-HPLC derivat. Post colonna ril. fluorim.
Afla tot.	Burro di arachidi pistacchi, pasta di fichi paprica	AOAC 999.07 CEN- EN 14123: 03	IAC-HPLC derivat. Post colonna ril. fluorim.

Condizioni cromatografiche

- Fase mobile ACN: MeOH : H₂O 17:29:54
- Flusso: 1 ml/min.
- Derivatizzazione post colonna
- Flusso pompa derivatizzante 0.4 ml/min.
- Vol.inj: 150μl
- Colonna C18 250x46 mm 5μ
termostata 40°C

Fluorimetro ecc: 365 nm emiss. :435 nm

Metodi Ufficiali AOAC e CEN

Aflatossine tot.	Nocciole e derivati	AOAC- 2005-08	HPLC derivatizzazione fotochimica post colonna . Riv. fluorim.
Aflatossine tot.	Mandorle, arachidi, pistacchi, nocciole brasiliane	AOAC 994.08	Mycosep-HPLC
Aflatossine tot.	Burro di arachidi	AOAC 991.45	ELISA
Aflatossine tot.	Arachidi e Mais	AOAC 993.17	TLC
Aflatossina M1	Latte e latte in polvere	AOAC 2000.8 CEN EN ISO 14501:99 CEN- EN ISO 14675:03	IAC-HPLC rivelazione fluorimetrica ELISA
	Latte e formaggio	AOAC 980.21	TLC

ANALISI

ESTRAZIONE MeOH: H₂O 80:20 v/v. + 5,0 g NaCl

CLEAN-UP

Colonnine iac	Alta selettività sensib. Acuratezz.	Costi elevati monouso
Estrazione fase solida	Rapido Possibilità analisi multimicotossina	Minore selettività

RIVELAZIONE

Post colonna	Derivatizzatore elettrochimico Soluzione sovrasaturazione iodio cristallino UV	Bromurazione doppio legame Iodurazione doppio legame Derivatizzazione fotochimica
Pre colonna	Acido trifluoroacetico	Idratazione doppio legame

Condizioni cromatografiche

- Fase mobile ACN: MeOH : H₂O 17:29:54
- Flusso: 1 ml/min
- Derivatizzazione post colonna
- Flusso pompa derivatizzante 0.4 ml/min
- Vol._{inj}: 150_{ul}
- Colonna C18 250x46 mm 5u
termostata 40°C

Spettrofluorimetro ecc: 365 nm emiss.: 435 nm



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

OCRATOSSINE

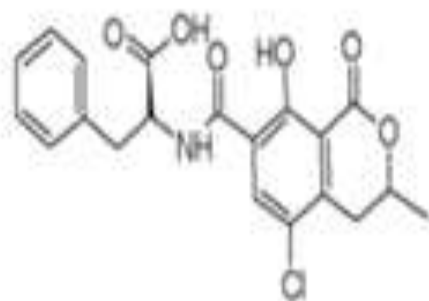
- Sono delle micotossine prodotte da *aspergillum ochraceus* e da *penicillum verrucosum*, muffe saprofite ubiquitarie di granaglie, mangimi e alimenti. Ne sono note 9 tipi ma la più tossica è l'ocratossina A (OTA):
- **ocratossina A**, che si ritrova principalmente nei cereali, nel caffè, nella frutta secca e nel vino.
- **ocratossina B**, deriva dall'ocratossina A per dechlorazione
- **ocratossina C**, un metabolita dell'ocratossina A, ne deriva per esterificazione

OCRATOSSINE

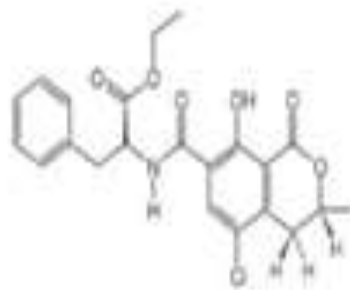
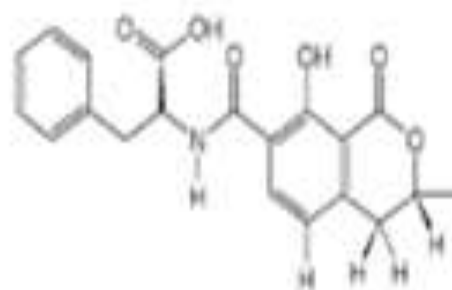
- La crescita di *aspergillus tossigeni* sembra legata alle condizioni di alta umidità e temperatura, tuttavia alcuni tipi di *penicillium* si sviluppano anche a basse temperature (5°C)

Ocratossine

Ocratossina A



Ocratossina B



L'OCRATOSSINA A

- **L'ocratossina a** è stata trovata in moltissime derrate provenienti da ogni parte del mondo i più alti livelli di contaminazione si osservano soprattutto nell'orzo, nel frumento nel mais e nei loro derivati coltivati nelle zone nella fascia temperata dell'emisfero Nord, nel vino, nel caffè verde , nel cacao . Ad esempio, l'abitudine di destinare pane raffermo per l'alimentazione degli animali in allevamento può costituire un serio pericolo, non solo per la salute degli animali stessi ma anche per l'uomo a causa del trasferimento dell'ocratossina nelle carni destinate al consumo umano. L'esposizione dell'uomo all'ocratossina deriva soprattutto dal consumo di cereali, oleaginose, legumi, cacao, caffè, vino, prodotti da forno, frutta secca, ma anche del consumo di alimenti di origine animale in particolare prodotti di carne e sangue di suino i cui livelli di contaminazione in Europa possono raggiungere anche diverse centinaia di mg/Kg. Può essere presente anche nelle uova o nella liquirizia

OCRATOSSINE IN ZOOTECNIA

Broiler: Calo ponderale, forme enteriche, anemia.

Ovaiole: calo deposizione, ritardo maturità sessuale, alterazioni del guscio

Suino: riduzione appetito, polidipsia e poliuria, nefropatia

OTA E SUINI

- I suini, a differenza di altre specie, sono molto sensibili alle ocratossine e tendono ad accumulare questa micotossina non solo nelle frattaglie (fegato, rene) ma anche nel muscolo e nel grasso. Il problema della presenza di OTA nella carne suina e nei prodotti della salumeria sembrava riguardare soprattutto i suini allevati nei paesi del Nord Europa e dell'Est europeo. Tuttavia si segnala una non trascurabile presenza di OTA in prodotti di salumeria di vario tipo, cotti e crudi, reperibili sul mercato. L'elevata stabilità dell'OTA, fa supporre che questa micotossina possa ritrovarsi sia nei prodotti di salumeria ottenuti previa cottura (prosciutto, mortadella, wurstel), che in quelli stagionati (prosciutto crudo, salame). Va sottolineato a questo proposito anche l'importanza di disporre di locali per la stagionatura dei salumi che siano caratterizzati da condizioni ambientali sfavorevoli alla possibile proliferazione dei funghi produttori di OTA.

Limiti per Ocratossina A

Prodotto	OTA µg/Kg
Cereali non lavorati (compreso il riso e il grano saraceno)	5,0
Tutti i prodotti derivati dai cereali (compresi i prodotti lavorati a base di cereali destinati al consumo diretto)	3,0
Frutti essiccati della vite	10,0
Caffè tostato	5,0
Caffè solubile	10,00
Vino e bevande a base di vino, succo d'uva e bevande che contengono succo d'uva, mosto uva	2,0
Alimenti per bambini, per lattanti e dietetici OTA ug/Kg	20,5

Regolamento (CE) n°1881/2006 del 19/12/2006
Limiti per Baby Food

Prodotto	OTA $\mu\text{g}/\text{Kg}$
Alimenti per l'infanzia e alimenti a base di cereali destinati a lattanti e prima infanzia	0,5
Alimenti dietetici a fini medici speciali destinati in modo specifico ai lattanti	0,5

EFFETTI DELL'OTA

È cancerogena per gli animali con effetto non confermato sull'uomo.

Mutagena su batteri e cellule di mammifero

Genotossica in vivo e in vitro.

Teratogena, nefrotossica, epatotossica , emotossica ed immunotossica.

Per gli uomini è tossica per il rene ed il sistema immunitario, provoca tumori e malformazioni nei neonati.

Può persistere nell'organismo e provocare danni a lungo termine: si sospetta sia coinvolta nel tumore delle vie urinarie e al consumo di cibi che la contengono viene associata la nefropatia endemica balcanica.

OTA E MAIS

Si sviluppa prevalentemente in post raccolta (stoccaggio e conservazione).

Viene prodotta in un intervallo compreso tra i 20 e i 30°C (*ocraceus*), ma anche tra 4 e 31°C (*P. Verrucosum*)

OTA E VINO

- Influenza del tipo di vino e della zona di produzione
- Vino rosso > rosé > bianco
- Uva passa alta incidenza e alti livelli di contaminazione
- Succo d'uva rosso > bianco

MISURE PREVENTIVE

- *A. carbonarius* e *A. niger* si avvantaggiano di ferite da danni meccanici per la colonizzazione dell'uva (tignola botrite oidio).
- Il pH basso e l'alto contenuto in zuccheri, in presenza di temperature elevate, sono un ambiente ideale per il loro sviluppo sull'uva.
- Rimozione dei residui vegetali infetti, riduzione dell'eccessivo ombreggiamento, concimazioni equilibrate evitando eccessi di azoto
- Varietà resistenti.
- Condizioni di raccolta: maturazione, sanità, condizioni climatiche.
- Raccolta: allontanamento dei grappoli marci, se possibile evitare la raccolta meccanica.
- Trasporto: rapido e in appositi contenitori onde evitare pressature.
- Favorire inizio rapido della fermentazione

OTA E VINO

Per quanto concerne il vino, le muffe responsabili attaccano l'uva in fase di maturazione, e producendo OTA la trasmettono al vino nelle prime fasi della vinificazione. Dei funghi appartenenti alla specie *Aspergillus*, quelli che risultano essere più pericolosi per la produzione di OTA nelle uve, in particolare nelle zone meridionali, sono l'*Aspergillus Carbonarius* e l'*Aspergillus Niger*.

La temperatura compresa tra i 25-35°C, e l'umidità dell'aria compresa tra il 72-90%, rappresentano le condizioni ottimali per la crescita del fungo; quando questi parametri tendono a scendere il fungo trovandosi in una condizione di stress, inizia a produrre OTA. I funghi appartenenti invece alla specie *Penicillium*, sono maggiormente diffusi nelle zone centro settentrionali, ma sono scarsi produttori di OTA.

OTA E VINO

In particolare le uve provenienti da vigneti prospicienti il mare. Gli *Aspergillus* colonizzano precocemente l'uva, spesso prima dell'invasatura. Non essendo capaci di perforare la buccia, riescono a penetrare l'acino esclusivamente attraverso le fessurazioni della cuticola provocate da diverse cause: grandine, scottature solari, stress idrici, ferite sulla buccia causate da uccelli e insetti (tignole), ed infine oidio, *Botrytis*, e marciume acido. Il tenore di OTA tende inoltre ad aumentare con lo stadio di maturità dell'uva.

OTA E VINO

I principali metodi di riduzione del contenuto di OTA nel vino, sono basati sulla prevenzione in vigneto dello sviluppo fungino. E' essenziale combattere le cause delle alterazioni predette, prestando particolare attenzione ai danni da tignole e alla formazione di Botrytis.

Le tignole possono essere responsabili in quanto vettori, ovvero trasportando le spore del fungo trattenute tra le scaglie dell'epidermide. Questi insetti hanno inoltre la capacità di perforare gli acini, aprendo una via preferenziale all'*Aspergillus*. Gli interventi associati contro le tignole e la Botrytis possono ridurre la formazione di OTA dell'80 %.

Da non trascurare in campo, è anche il contenimento della vegetazione. È importante evitare la compattazione della chioma, in quanto potrebbe limitare la circolazione dell'aria all'interno del filare e creare le condizioni ideali per lo sviluppo delle muffe.

OTA E VINO

- La pulizia del terreno è un'ulteriore metodo per la prevenzione poiché i funghi persistono anche su terreno.
- Altro fattore favorevole allo sviluppo fungino è l'appassimento delle uve. Il calore diurno e l'umidità notturna favorirebbero infatti gli attacchi dell'*Aspergillus carbonarius*. La ventilazione artificiale nei locali di appassimento può limitare l'effetto, rimuovendo le sacche di umidità.
- Anche la vicinanza al mare può favorire lo sviluppo dell' *Aspergillus carbonarius*. Le zone viticole prossime al mare sono più soggette agli attacchi, rispetto a quelle lontane, specie se poste ad altitudine superiore ai 200 m.. Il motivo è legato al gioco delle temperature e delle umidità atmosferiche. Si considera come distanza critica dal mare, uno spazio inferiore ai 30 km, distanze superiori non influenzerebbero questo tipo di sviluppo fungino.

OTA E VINO

Gli interventi in cantina, sono di secondaria importanza rispetto a quelli in vigneto, ma possono comunque limitare anche in misura significativa il tenore in OTA nel vino.

Premesso che la selezione delle uve in fase di vendemmia sia una fase cruciale nella prevenzione, è importante attenersi ad alcune regole di vinificazione fondamentali. I vini maggiormente colpiti spesso sono quelli rossi, in quanto questo tipo di vinificazione prevedendo la macerazione delle uve, aumenta il tempo di contatto tra le bucce e la componente liquida del mosto. La durata della macerazione va pertanto contenuta.

Non si riscontrano casi in cui il tenore di OTA si innalzi macerando uve sane.

Tra gli interventi in cantina, che possono limitare la formazione di OTA:

Impiego razionale di anidride solforosa (azione inibente verso i funghi)

Induzione della fermentazione malolattica (azione riducente dei batteri malolattici)

Utilizzo di Bentonite / gel bentonite (favorisce la precipitazione dell'OTA)

Affinamento "sur lies" (le stasi sulle fecce di lievito con battonage permette una diminuzione dell'OTA, dovuto probabilmente all'assorbimento dell'OTA da parte delle pareti del lievito).

OTA E VINO

- L'uso di alcuni adsorbenti è limitato dalla direttiva 2007/68/CE che indica che tutti i vini prodotti o anche solo commercializzati nell'Unione europea devono indicare in etichetta l'eventuale trattamento con derivati di uovo, pesce o latte. Di recente, sono state sviluppate nuove formulazioni di adsorbenti senza allergeni da usare come alternative alla caseina e al caseinato di potassio, quali un complesso basato su PVPP, proteine vegetali e silice amorfa, o anche la gelatina in fogli ad alto peso molecolare. Altri adsorbenti alternativi potrebbero essere i polimeri biodegradabili non tossici come chitina e chitosano. La risoluzione OIV/OENO 338A/2009 ha introdotto il trattamento con chitosano nel vino all'International Code of Oenologic Practices ha stabilito che la massima dose di chitosano da usare per ridurre l'OTA non deve superare i 500 g/hl.

OTA E VINO

- Da quando la tossina è stata individuata nel vino sono stati utilizzati diversi metodi di analisi. La maggior parte di questi, compreso il metodo ufficiale, si basano sulla separazione dell'OTA per mezzo di colonne di immunoaffinità, e la determinazione attraverso HPLC con rilevatore a fluorescenza.
- Un altro metodo, consiste nella determinazione mediante sistemi enzimatici (ELISA). La metodica si basa sulla separazione attraverso colonna di immunoaffinità, mentre la determinazione per mezzo di un test immunoenzimatico competitivo. La quantificazione infine, avviene mediante uno spettrofotometro specifico per il test ELISA.

ANALISI

- Solvente: sol. 10 ml PEG (1% PEG 8000 + 5% NaHCO₃)
- Fase Mobile - H₂O:ACN 59:41 (H₂O acida 1l+ 20 ml HAc)
- Flusso -1 ml/min. isocratica
- Colonna- C18 Superpher 100RP-18 125x4 4μ
- Temperatura colonna: 40°C
- Flusso 1 ml/min.
- Detector: Ecc. 333nm Emiss. 470nm

OCRA A VINO

- Preparazione Campione
- Eliminare CO₂ mediante sonificazione
- Solvente : sol. 10 ml PEG (1% PEG 8000 + 5g% NaHCO₃)

Metodi ufficiali AOAC/ CEN

Matrice	Riferimento metodo	metodo
Cerali e prodotti derivati	CEN ISO 15141-1-1999 CEN ISO 15141-2- 1999	Cleanup gel silice; HPLC fluorim. Cleanup bicarbonato, HPLC fluorim
Mais e orzo	AOAC 991.44	HPLC
Orzo	AOAC 2000.03	Cleanup IAC; HPLC fluorim.
Orzo e caffè tostato	CEN 14132:2003/AC:2006	Cleanup IAC ; HPLC fluorim.
Caffè tostato	AOAC 2000.09	Cleanup IAC; HPLC fluorim.
Caffè verde	AOAC 2004.10	HPLC fluorim
Vino e birra	AOAC 2001.01 CEN 14133:2003/AC 2006	Cleanup IAC; HPLC fluorim.
Orzo	AOAC – 973.37	tlc
Orzo e caffè verde	AOAC- 975.38	tlc

FUSARIUM TOSSINE

- Le principali sono:
- TRICOTECENI
- FUMONISINE
- ZEARALENONE
- MONILIFORMINA

Tricoteceni

- I tricoteceni sono un gruppo di micotossine sesquiterpeniche, prodotte da diversi generi di funghi, tra i quali *Fusarium*, *Cephalosporium*, *Myrothecium*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Verticimonosporium* e *Stachybotrys*.
- A questo gruppo appartengono oltre 200 tossine, delle quali 50 sono prodotte dai funghi del genere *Fusarium* e sono divisi in quattro gruppi (A-D).
- I più pericolosi sono A e B. Nel gruppo A vi sono composti più pericolosi che nel B
- Il gruppo A comprende : T2, HT2, Acetil T2, Diacetossilscirpenolo (DAS), 15 Acetossilscirpenolo, Neosolaniolo (NEO).
- Il gruppo B comprende: Deossinivalenolo (DON o Vomitossina), Nivalenolo (NIV),

TRICOTECENI DEL GRUPPO A

- Il gruppo dei Tricoteceni è prodotto essenzialmente da:
- **Fusarium sporotrichioides**
- **Fusarium poae**
- **Fusarium equiseti**
- Funghi che si sviluppano in campo (ambienti temperato - freschi) su mais, orzo, segale, avena, miglio.. . così come su paglia e fieno e nelle fasi di conservazione aperta parentesi (anche insilati) e stoccaggio.
- Poco diffusi nell'area maidicola veneta.

TRICOTECENI DEL GRUPPO B

- Una delle tossine più importanti è il deossinilvalenolo (DON)
- Si trova nei cereali con variazioni tra i diversi paesi e cereali considerati.
- Sono segnalati casi di intossicazione nell'uomo in associazione con T2 ed altri tricoteceni
- Sono segnalati effetti genotossici di tricoteceni compreso il Don su linee cellulari umane.

FUMONISINE

- Le Fumonisine sono un gruppo di micotossine che sono strutturalmente correlabili a metaboliti tossici, prodotti da diverse specie fungine. Sono principalmente prodotte da funghi della specie *Fusarium*, in particolare *F. verticilloides* e da *Fusarium moniliforme*, comune contaminante del frumento in molte parti del mondo.
- Esistono tre tipi di fumonisine: B1, B2 e B3 (FB1, FB2, FB3).
- La FB1 è quella con prevalenza maggiore, ed è presente soprattutto nel mais. A parità di concentrazione, le fumonisine sono meno tossiche delle aflatossine perché soggette ad assorbimento minore nel tratto gastrointestinale, e ciò ha portato ad un'iniziale sottostima del problema rappresentato da queste tossine.
- L'ingestione, da parte di animali, di alimenti contaminati da questo metabolita, uomo compreso, è stato associato ad effetti tossici e carcinogenici.
- A parità di concentrazione, le fumonisine sono meno tossiche delle aflatossine perché soggette ad assorbimento minore nel tratto gastrointestinale, e ciò ha portato ad un'iniziale sottostima del problema rappresentato da queste tossine.

FUMONISINE

- La FB1 è quella con prevalenza maggiore, ed è presente soprattutto nel mais. In particolare, è stata associata alla leucoencefalomalacia nei cavalli, all'edema polmonare nei suini e al cancro e a nefrotossicità del fegato nei ratti. La Commissione Micotossine dell'Associazione Americana dei Laboratori Diagnostici Veterinari raccomanda che i prodotti destinati all'alimentazione dei cavalli non contengano concentrazioni di Fumonisine superiori ai 5ppm. Studi epidemiologici hanno indicato che un elevato numero di casi di cancro all'esofago negli umani sono associabili ad aree dove la concentrazione delle Fumonisine nel mais è in un range tra 1 e 2 ppm. Le micotossine della famiglia delle Fumonisine sono state dichiarate molecole potenzialmente carcinogene per l'uomo dall'Agenzia di Ricerca per il Cancro e dall'Agenzia per la Protezione dell'Ambiente della California.
- Studi tossicologici hanno, inoltre, indicato che le Fumonisine FB2 e FB3 hanno lo stesso potenziale carcinogenico della Fumonisina FB1.

FUMONISINE

- Chimicamente le fumonisine sono diesteri dell'acido tricarballylico e polialcoli, caratterizzati da una struttura molto simile a quella della sfingosina precursore chimico di tutti gli sfingolipidi (sfingomieline, ceramidi e gangliosidi) che esplica un importante ruolo in numerose funzioni cellulari, a livello di crescita, di differenziazione cellulare e di trasmissione degli impulsi nel sistema nervoso.
- Le fumonisine, interferiscono con il metabolismo della sfingosina, il precursore chimico di tutti gli sfingolipidi, i quali esplicano un ruolo importante in numerosi processi cellulari. Una limitata produzione di sfingosina andrebbe non solo a interferire con questi processi ma, anche a limitare una sua supposta attività antitumorale endogena.
- Anche le fumonisine, come la gran parte delle altre micotossine, sono dotate di una non trascurabile termostabilità. Infatti, la distruzione della struttura molecolare può ottenersi solo a seguito di esposizione termica a temperature non inferiori a 220 °C.
- Le fumonisine sono anche epatotossiche. Anche per l'uomo ci sono indizi di cancerogenicità; in particolare, il consumo di cereali contaminati da fumonisina potrebbe essere all'origine di un'elevata incidenza di cancro all'esofago.

Fumonisine B1+B2 (Reg 1126/2007)

Prodotti	Tenori massimi ug/Kg
Granoturco non trasformato ad eccezione di quello destinato alla molitura ad umido	4000
Granoturco destinato al consumo umano diretto, prodotti a base di granturco destinati al consumo umano diretto, eccetto i quelli indicati successivamente	1000
Cereali da colazione e merende a base di granturco	800
Alimenti a base di granturco ed altri alimenti destinati ai lattanti e ai bambini	200
Frazioni della molitura del granturco di dimensioni > 500 micron (polenta bramata)	1400
Frazioni della molitura del granturco di dimensioni < 500 micron... (FIORETTO e FUMETTO).	2000

METODI AOAC/CEN PER FUMONISINE

Mais	AOAC- 995-15 CEN 13585:2002 AOAC – 2001.06	Purificazione IAC derivat. Precolonna ;HPLC fluorim. Purificazione SPE derivat. Precolonna; HPLC fluorim. ELISA
Prodotti a base di mais	AOAC – 2001.04 CEN 14352:2005	Purificazione , derivat. Precolonna ;HPLC fluorim.

ANALISI

Estrazione MeOH:H₂O 80:20 + PBS

Purificazione

Derivatizzazione: OPA Mercaptoetanololo

Fase Mobile: 25% NaH₂PO₄ 0,1 m +
75% MeOH → pH 3,5

Colonna intersil ODS2 250 4,6,5μ

Detector Ecc. 335 Emiss. 440

DEOSSINILVALENOLO

- Don e Nivaleno sono le micotossine più diffuse a livello globale nei prodotti destinati all'alimentazione umana. Essi sono state ritrovate frequentemente nei cereali e derivati provenienti da quasi tutte le regioni del mondo. Responsabili della sintesi del rilascio di queste tossine sono alcune specie fungine strettamente correlate del tipo *Fusarium* che rappresentano le specie fungine in più diffuse nel mondo in grado di provocare gravi fitopatie nel frumento e nel mais.
- L'elevata incidenza di contaminazioni di Don anche ad alti livelli nei prodotti alimentari sia in campo che in fase di stoccaggio deve essere attentamente monitorata allo scopo di limitare l'esposizione da questa tossina da parte dell'uomo e degli animali e prevenire gli effetti tossicologici ad essa associati.

DON e NIVALENOLO

Don e Nivalenolo sono composti molto tossici per la maggior parte delle specie animali (in particolare per suini, polli, bovini) nelle quali producono una varietà di sintomatologie tra cui la sindrome emetica e la sindrome del rifiuto del cibo. I sintomi di tossicità acuta si manifestano con irritazione della pelle, astenia, vomito, perdita di peso, diarrea, arresto della crescita emorragie disturbi neurali aborti a morte. Entrambi questi tricoteceni sono dotati di attività genotossica embriotossica e immunosoppressiva. Gli effetti prodotti dal nivalenolo sono analoghi a quelli del Don tuttavia questo è considerato una tossina più potente.

Queste tossine rivestono particolare interesse nel settore zootecnico a causa delle ingenti perdite economiche prodotte soprattutto negli allevamenti di suini.

La presenza di questi tricoteceni nei cereali destinati all'alimentazione umana è stata riportata in concomitanza con il verificarsi di gravi tossicosi umane.

Deossinivalenolo (Reg 1126/2007)

Prodotto	µg/kg
Cereali non trasformati diversi da grano duro, avena e granoturco	1250
Grano duro e avena non trasformati	1750
Granoturco non trasformato ad eccezione di quello destinato a molitura ad umido	1750
Cereali destinati al consumo umano diretto, farina di cereali crusca e germe come prodotto finito	750
Pane (compresi prodotti da forno), prodotti della pasticceria e biscotteria, merende a base di cereali per colazione	500
Pasta secca	750
Baby food a base cereali	200
Frazioni della molitura del granoturco di dimensioni > 500 micron p(polenta bramata)	750
Frazioni della molitura del granoturco di dimensioni < 500micron...(FIORETTO e FUMETTO).	1250

ANALISI

- Estrazione: H₂O + Polietilenglicole

- Cleanup

Colonnine iac	Alta selettività sensib. Acuratezz.	Costi elevati monouso
Estrazione fase solida	Rapido Possibilità analisi multimicotossina	Minore selettività

- Colonna Intersil ODS2 150, 4,6,5 μ
- Eluente H₂O: (CH₃CN:MeOH- 75:2) 82:18
- Temperatura 40°C
- Rilevazione: uv 218nm

ZEARALENONE

- Composto estrogenico prodotto prevalentemente da *F. Graminearum* f. *colomorum* e f. *equiseti*. Questi sono patogeni che si sviluppano prevalentemente su orzo, mais, frumento, sorgo, avena.
- Se l'umidità dei prodotti rimane al 20- 22% con temperature di ordine di 22- 25° C l'attività tossigena a sui cereali, negli insilati e nei fieni continua durante la raccolta e conservazione dei prodotti.
- Elevate concentrazioni di zea possono essere presenti nei cibi a livelli di contaminazione tali da giustificare ampiamente i numerosi casi di iperestrogenismo ricorrente negli allevamenti di suini. Può provocare inoltre atrofia testicolare, ovarica e aborto,

Zearalenone (Reg 1126/2007)

Prodotti	Tenori massimi µg/Kg
Cereali non trasformati diversi dal granturco	100
Granturco non trasformato ad eccezione di quello destinato a molitura a umido	350
Cereali destinati al consumo umano diretto, farina di cereali, crusca e germe destinati al consumo umano diretto, eccetto i quelli indicati successivamente	75
Olio di granturco raffinato	400
Pane, prodotti da forno e cereali da colazione esclusi quelli a base di granturco	50
Granturco destinato al consumo umano diretto, merende a base di granturco e cereali da colazione a base di granturco	100
Alimenti a base di cereali trasformati destinati ai lattanti e ai bambini	20
Alimenti a base di granturco destinati ai lattanti e ai bambini	20

ANALISI

- Estrazione: MeOH:H₂O 80:20 + NaCl 5g
- Eluente:H₂O: (ACN: MeOH 1:1) 35:65
- Colonna Intersil ODS2 465μ
- Flusso 0,8 ml/min.
- Temperatura 30°C
- Detector : Ecc. 260nm Emiss. 450 nm

T-2 e HT-2, DAS

- Le tossine T2 e Das sono molto potenti la dose letale nell'uomo va da 3 a 35 mg.
- Pochi microgrammi di T2 e DAS (diacetossiscirpenolo) sono sufficienti per causare vomito nausea ed irritazione degli occhi
- T2 e DAS sono approssimativamente dalle 10 alle 500 volte più potenti dell'iprite (gas utilizzato come arma chimica).

T-2 e HT-2

- Le tossine T-2 e HT-2 sono micotossine prodotte da diverse specie di *Fusarium*. La tossina T-2 è metabolizzata rapidamente in un gran numero di prodotti e la tossina HT-2 è uno dei suoi principali metaboliti.
- Le stime dell'esposizione alimentare cronica dell'uomo alla somma delle tossine T-2 e HT-2, sulla base dei dati disponibili sull'occorrenza sono inferiori a tale TDI per le popolazioni di tutti i gruppi di età; esse non rappresentano quindi una minaccia immediata per la salute.

T-2 e HT-2

- Il limite di quantificazione per la tossina T-2 e la tossina HT-2 non dovrebbe preferibilmente superare i 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ per ciascuna, tranne per i cereali non trasformati per i quali il limite per la tossina T-2 e la tossina HT-2 non dovrebbe preferibilmente superare i 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ per ciascuna.

TOSSINE T2 E HT2, LIVELLI INDICATIVI

Prodotti	Livelli indicativi somma T2 HT2
Cereali non trasformati	
orzo (compreso orzo da birra) e mais	200
avena (non decorticata)	1000
frumento, segale e altri cereali	100
cereali per consumo umano diretto	
Avena	200
Mais	100
Altri cereali	50
Crusca e fiocchi d'avena	200
Crusche di cereali ad eccezione avena, prodotti di macinazione dell'avena diversi dalla crusca d'avena e dai fiocchi d'avena e prodotti di macinazione del granturco	100
Alimenti per lattanti e bambini	15
Cereali per mangimi e mangimi composti	250/2000

MONILIFORMINA

- La Moniliformina (MON) o acido 3-idrossiciclobut-3-ene-1,2-dione è una micotossina prodotta sui cereali da 30 specie diverse di *Fusarium* e in particolare di *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. thapsinum* e *F. avenaceum*.
- Contamina mais, segale, triticale, frumento, avena in concomitanza con le fumonisine.
- Attualmente, dal punto di vista legislativo non sono stati definiti tenori massimi raccomandati per questa micotossina ma è in corso la richiesta di pareri all'EFSA sui rischi sanitari per gli esseri umani e gli animali relativi alla sua presenza in alimenti e mangimi.
- La moniliformina è quindi una delle tossine emergenti per le quali è importante mettere a punto metodiche analitiche robuste e sensibili per la rilevazione, al fine anche di indagare la diffusione nei nostri areali cerealicoli, infatti i dati che si conoscono derivano da prodotti del mais di provenienza polacca e inglese.
- Non si conosce la tossicità a lungo termine sull'uomo e la TDI.
- Non si conosce il carry-over sui prodotti di origine animale.

MICOTOSSINE NEI PRODOTTI ORTOFRUTTICOLI

PRICIPALI FUNGHI COINVOLTI E TOSSINE PRODOTTE

Specie	Tossina
Alternaria alternata	Ac. Tenuazonico (TeA) ; Alternariolo (AOH) e Alternariolo metil estere (AME); Altenuene (ALT), Alterotossina I e II (ATX – I e ATX-II)
Penicillium expansus	Patulina

Tossine prodotte da *Alternaria*

- Dal prodotto raccolto possono trasferirsi al trasformato e si ritrovano lungo la filiera in succhi, concentrati, salse eccetera. Alternariolo e il suo metil estere non vengono degradati da temperature di 80°C per 20 minuti.
- L'acido Tenuazonico (Tea) è il più tossico provoca convulsioni, emorragie gastrointestinali; subito dopo viene l'alternariolo che ha proprietà mutagene.
- A tutt'oggi non sono sottoposte a limiti di legge e poco considerate.

Principali culture attaccate da alternaria

- **Orticole:** pomodoro, peperone, melanzana, fagioli, piselli
- **Frutticole:** pere, mele, agrumi.
- **Industriali:** olivo

PATULINA

- Dal prodotto raccolto può trasferirsi al trasformato e si ritrova lungo la filiera in succhi, concentrati, purea e alimenti per l'infanzia.
- E' stabile a pH acidi (3- 5,5) ma si decompone in condizioni alcaline;
- Si degrada durante la fermentazione ad opera dei lieviti (*saccharomyces cerevisiae*), il suo contenuto può essere abbassato da alcune operazioni tecnologiche (chiarificazione, aggiunte di acido ascorbico o SO₂).
- Provoca immunodepressione e disturbi gastrointestinali.
- È neurotossiche e sospetta di essere mutagena e genotossica. Se iniettata provoca sarcoma nei ratti.

PATULINA

- Oltre che nelle parti colonizzate dal fungo si trova in concentrazione minore anche nei tessuti sani adiacenti (un vantaggio parziale è dato dall'eliminazione delle aree lesionate).
- Si produce durante la conservazione con temperatura ottimale tra i 17 -20° C e pH tra 3 e 6,5 ma, a seconda del ceppo di *Penicillium expansus* che agisce può essere sintetizzata partire da 0° fino a 30°C.
- Sottoposta limiti di legge soprattutto per gli alimenti per l'infanzia.

Principali culture attaccate da *Penicillium expansus*

- È un tipico agente di marciume di posta raccolta
- Può attaccare pressoché tutti prodotti frutticoli ma da i problemi più grossi sulle pomacee (mele e pere).
- Può attaccare che l'uva ma non dà problemi al vino perché la patulina viene degradata dei lieviti durante la fermentazione.
- *Penicillium expansus* può crescere anche temperature a cavallo di 0° C e, come già riferito alcuni suoi ceppi possono sintetizzare la patulina anche in queste condizioni;
- È pericoloso durante la conservazione in frigo

- **GRAZIE PER L'ATTENZIONE**