



# RAPPORTI ISTISAN 16|28

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

**V Congresso nazionale**

## **Le micotossine nella filiera agro-alimentare**

Istituto Superiore di Sanità  
Roma, 28-30 settembre 2015

**ATTI**

A cura di C. Brera, B. De Santis, F. Debegnach,  
E. Gregori e M.C. Barea Toscan



EPIDEMIOLOGIA  
E SANITÀ PUBBLICA

**ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ**

**V Congresso nazionale  
Le micotossine nella filiera agro-alimentare**

**Istituto Superiore di Sanità  
Roma, 28-30 settembre 2015**

**ATTI**

A cura di  
Carlo Brera, Barbara De Santis, Francesca Debegnach,  
Emanuela Gregori e Maria Cristina Barea Toscan  
*Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare*

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

**Rapporti ISTISAN  
16/28**

Istituto Superiore di Sanità

**V Congresso Nazionale. Le micotossine nella filiera agro-alimentare. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 28-30 settembre 2015. Atti.**

A cura di Carlo Brera, Barbara De Santis, Francesca Debegnach, Emanuela Gregori e Maria Cristina Barea Toscan  
2016, vi, 137 p. Rapporti ISTISAN 16/28

Il Congresso è giunto alla sua quinta edizione e ciò è stato possibile grazie al forte interesse mostrato dai partecipanti nelle precedenti edizioni. In questa edizione sono stati toccati argomenti per i quali necessita ancora un forte intervento in quanto rappresentano un reale rischio per la salute pubblica ed animale. Ad esempio, il primo di questi argomenti risiede nella reale impossibilità di correlare in modo univoco, specie nei Paesi industrializzati, il ruolo eziologico delle micotossine con alcune patologie ricorrenti nell'uomo e negli animali. Inoltre, data la forte associazione tra micotossine e condizioni climatiche è stato dato ampio spazio alla presentazione delle più promettenti e moderne soluzioni legate alle attività preventive e di controllo che sono state nel tempo acquisite e poi affinate dai vari comparti agro-alimentari per minimizzare il fenomeno. Infine, come tradizione, l'ultima giornata è stata dedicata alla diagnostica a cui, in ultima analisi, sono demandate le verifiche dell'efficacia delle azioni di autocontrollo e controllo ufficiale. Il Congresso, la cui prima edizione risale al 2004, è stato sempre organizzato presso l'Istituto Superiore di Sanità con frequenza media biennale. Tale evento scientifico costituisce un momento di incontro sia dei principali gruppi di ricerca che operano in ambito nazionale sia de, infine, della più qualificata rappresentanza degli organi deputati al controllo ufficiale dei prodotti alimentari e degli alimenti zootecnici.

*Parole chiave:* Micotossine; Analisi del rischio; Valutazione della esposizione; Analisi; Campionamento

Istituto Superiore di Sanità

**5<sup>th</sup> National Congress. Mycotoxins in agri-food chain. Istituto Superiore di Sanità. Rome, September 28-30 2015. Proceedings.**

Edited by Carlo Brera, Barbara De Santis, Francesca Debegnach, Emanuela Gregori and Maria Cristina Barea Toscan  
2015, vi, 137 p. Rapporti ISTISAN 15/28 (in Italian)

The 5<sup>th</sup> edition of the National Congress on Mycotoxins in Food Chain dealt with the most relevant issues related to the burden that these toxic compounds represent for animal and human health. The first issue regarded the still not fully understood relationship between human and animal pathologies and mycotoxins intake with diet. The second issue entailed all the preventive and corrective activities undertaken by food/feed business operator and Competent Authority within self-control and official control systems, respectively. The third issue will give the opportunity to the speakers to present an updated information on the new diagnostic scenarios and on the possible developments of new diagnostic platforms aimed at giving an answer to the main demand raised by the industry, i.e. fast and reliable analytical response for guaranteeing food/feed safety as much as possible. Since 2004 the National Congress has been held at the Istituto Superiore di Sanità (the National Institute of Health in Italy) with a two-year frequency on average. This scientific event is an opportunity of debate for researchers and stakeholders on the impact of mycotoxins on economics, agriculture, industry, safety and legislation.

*Keywords:* Mycotoxins; Risk analysis; Exposure assessment; Analysis; Sampling

Per informazioni su questo documento scrivere a: [carlo.brera@iss.it](mailto:carlo.brera@iss.it)

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: [www.iss.it](http://www.iss.it).

Citare questo documento come segue:

Brera C, De Santis B, Debegnach F, Gregori E, Barea Toscan MC (Ed.). *V Congresso Nazionale. Le micotossine nella filiera agro-alimentare. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 28-30 settembre 2015. Atti.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2016. (Rapporti ISTISAN 16/28).

Legale rappresentante dell'Istituto Superiore di Sanità: *Gualtiero Ricciardi*  
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 114 (cartaceo) e n. 115 (online) del 16 maggio 2014

Direttore responsabile della serie: *Paola De Castro*

Redazione: *Paola De Castro e Sandra Salinetti*

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori, che dichiarano di non avere conflitti di interesse.



# INDICE

<b>Premessa</b> .....	v
<b>Considerazioni generali sulla problematica delle micotossine</b> <i>Carlo Brera</i> .....	1
<b>Approccio geostatistico al problema del deossinivalenolo nel frumento duro: risultati preliminari</b> <i>Tiziana Amoriello, Gabriella Aureli, Andreina Belocchi, Mauro Fornara, Giuliano Mazzieri, Cecilia Ripa, Fabrizio Quaranta</i> .....	9
<b>Presenza di aflatossine B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> in frutta a guscio di origine extra-europea</b> <i>Antonio Armentano, Simona Summa, Sonia Lo Magro, Marilena Muscarella</i> .....	15
<b>Rilevazione di tossine T<sub>2</sub> + HT<sub>2</sub> nel frumento duro biologico coltivato in Italia</b> <i>Gabriella Aureli, Andreina Belocchi, Mauro Fornara, Sahara Melloni, Fabrizio Quaranta</i> .....	19
<b>Utilizzo di agenti di biocontrollo nella prevenzione dello sviluppo di <i>Aspergillus flavus</i> e della produzione di aflatossine</b> <i>Paola Battilani</i> .....	24
<b>Effetto del processo molitorio nella ripartizione della moniliformina in mais</b> <i>Massimo Blandino, Valentina Scarpino, Amedeo Reyneri, Francesca Vanara</i> .....	28
<b>Criteri di attivazione del piano nazionale di controllo ufficiale delle micotossine nei prodotti alimentari</b> <i>Carlo Brera, Francesca Debegnach, Barbara De Santis, Gerardo Califano, Sandra Paduano, Giuseppe Ruocco</i> .....	33
<b>Micotossine nella feed supply chain: stato dell'arte e prospettive future</b> <i>Federica Cheli, Vittorio Dell'Orto</i> .....	39
<b>Controlli ufficiali di aflatossina nella frutta a guscio di provenienza comunitaria ed extracomunitaria in entrata nel porto di Gioia Tauro</b> <i>Rita De Pace, Cinzia Franchino, Francesca Floridi, Valeria Vita</i> .....	43
<b>Monitoraggio dello sviluppo di funghi tossigeni su agrumi in post-raccolta</b> <i>Antonella Del Fiore, Chiara Nobili, Patrizia De Rossi</i> .....	49

# EFFETTO DEL PROCESSO MOLITORIO NELLA RIPARTIZIONE DELLA MONILIFORMINA IN MAIS

Massimo Blandino, Valentina Scarpino, Amedeo Reyneri, Francesca Vanara  
*Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Università degli Studi di Torino, Grugliasco,  
Torino, Italia*

## Introduzione

I prodotti e sottoprodotti della lavorazione industriale della granella di mais sono il risultato di processi di trasformazione in grado di ripartire le micotossine contenute nella cariosside intera (1). Nel Nord-Italia il mais è particolarmente soggetto alla contaminazione in pre-raccolta da micotossine prodotte da *Fusarium* spp., tra cui le fumonisine (FB) sono le più presenti. Recentemente a livello europeo si è posta l'attenzione sulla moniliformina (MON) per la quale i primi dati di diffusione presenti in letteratura ne confermano la presenza su mais italiano in associazione alle FB (2), ma di cui nessun dato è ora noto in relazione alla sua ripartizione nei prodotti e sottoprodotti molitori. Questo lavoro valuta l'effetto del processo molitorio nella ripartizione della MON e delle FB nella granella di mais nei semilavorati e nei prodotti finiti da lavorazioni di farine alimentari o *hominy grits*.

## Materiali e metodi

A tal proposito sono stati esaminati presso un molino industriale 5 diversi lotti delle campagne 2011, 2012, 2013 e 2014, ciascuno costituito da un unico ibrido analizzando distintamente: la granella prima della pulitura; la granella pulita; il processo di lavorazione per degerminazione a umido per la produzione di *hominy grits* – grosso (> 4000 µm), medio (2500-4000 µm), fine (1200-2500 µm) –; il processo di molitura a secco per la produzione di farina bramata (500-800 µm); fioretto (350-500 µm) e fumetto (< 350 µm); e i sottoprodotti germe e farinetta. In Figura 1 sono schematizzati i processi di lavorazione analizzati e i prodotti e sottoprodotti analizzati.

La metodica di campionamento ha seguito il Regolamento (CE) 401/2006. Tutti i campioni sono stati caratterizzati per la resa di lavorazione e per il contenuto in MON e in FB mediante analisi LC-MS/MS (dall'inglese *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) (3).

### Estrazione e *clean-up*

Per la determinazione della MON 25 g di sfarinato di mais è stato estratto utilizzando 100 mL di una miscela di acetonitrile/acqua 84:16 (v/v) e la purificazione è stata condotta mediante l'impiego delle colonne di *clean-up* Mycosep<sup>®</sup> 240 Mon (Romer Labs<sup>®</sup>). Il contenuto in fumonisine B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> è stato determinato estraendo 50 g di campione macinato con 100 mL di una soluzione di metanolo/acqua 80:20 (v/v) e la purificazione è stata condotta mediante l'impiego delle colonne di immunoaffinità FUMtest (VICAM<sup>®</sup>).

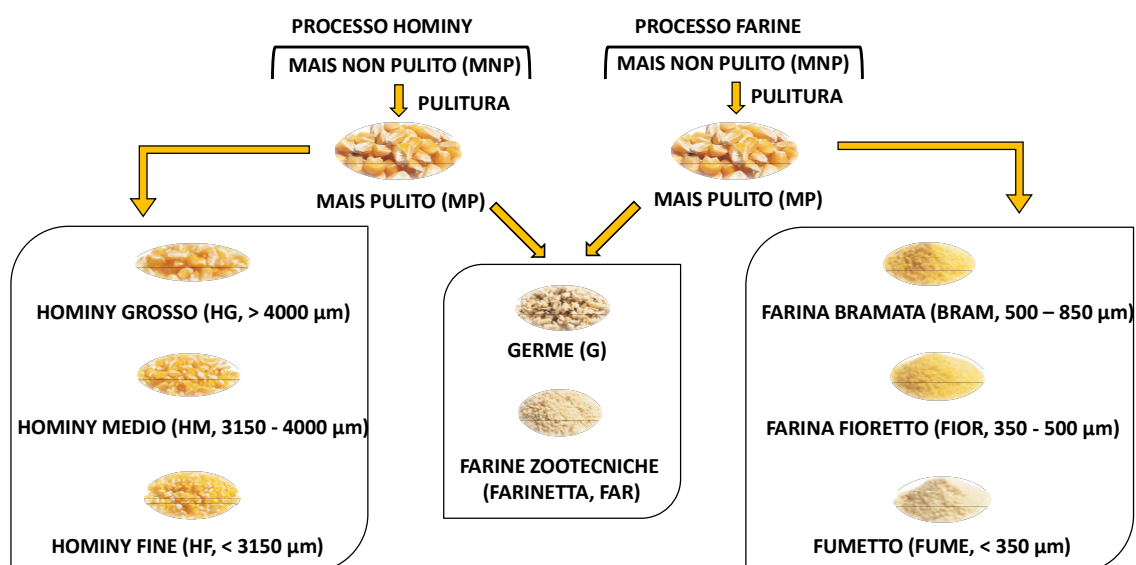


Figura 1. Sistemi di lavorazione e prodotti e sottoprodotti esaminati

## Analisi HPLC-ESI-MS/MS

La metodica HPLC-MS/MS (*High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) è stata condotta mediante strumentazione Varian 212-LC Chromatography Pump (Colonna per la MON: Merck, SeQuant, ZIC<sup>®</sup>-HILIC 100×2,1 mm, 3,5 µm, 100 Å, Colonna per le FB: Varian, Pursuit 5 C18 50×2,1 mm) / ProStar 410 AutoSampler / 310-MS TQ Mass Spectrometer. Per la determinazione della MON la corsa cromatografica in gradiente della durata di 17 minuti ha previsto l'uso di acetonitrile e formiato di ammonio 100 mM come eluenti ( $t_R$  MON = 3,8 min). Con l'impiego di un triplo quadrupolo si è proceduto alla rivelazione della MON con la sorgente ESI (*Electrospray Ionisation*) in modalità ioni negativi e la molecola deprotonata è stata frammentata nel suo ione prodotto a 41 m/z. Lo ione prodotto a 41 m/z è stato utilizzato per l'identificazione mentre lo ione precursore a 97 m/z per la quantificazione. Per la determinazione delle FB la corsa cromatografica in gradiente della durata di 15 minuti ha previsto l'uso di acetonitrile e acqua acidificata allo 0.1% con acido acetico come eluenti ( $t_R$  FB<sub>1</sub> = 4,9 min;  $t_R$  FB<sub>2</sub> = 5,6 min). Con l'impiego di un triplo quadrupolo si è proceduto alla rivelazione delle FB con la sorgente ESI in modalità ioni positivi e per la FB<sub>1</sub> la molecola protonata è stata frammentata nei suoi ioni prodotto a 318 m/z e 336 m/z. Lo ione prodotto a 318 m/z è stato utilizzato per l'identificazione mentre lo ione prodotto a 336 m/z per la quantificazione. Per la FB<sub>2</sub> la molecola protonata è stata frammentata nei suoi ioni prodotto a 334 m/z e 352 m/z. Lo ione prodotto a 334 m/z è stato utilizzato per l'identificazione mentre lo ione prodotto a 352 m/z per la quantificazione.

## Risultati e discussione

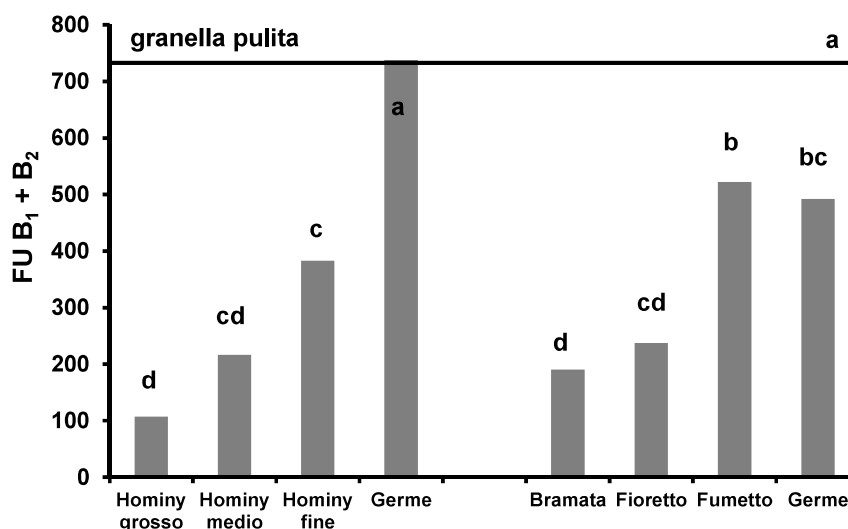
La contaminazione della granella intera a inizio lavorazione dei lotti esaminati è risultata molto variabile nelle diverse campagne maidicole e mediamente inferiore per MON (tra  $203 \mu\text{g kg}^{-1}$  e  $844 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) rispetto alle FB (tra  $344 \mu\text{g kg}^{-1}$  e  $2980 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). Le operazioni di pulitura con l'ausilio di un sistema di aspirazione meccanica e con una selezionatrice ottica hanno ridotto la contaminazione da FB e MON rispettivamente di 2,3 (56%) e 1,5 volte (35%) (Tabella 1).

La farinetta, ovvero la frazione contenente anche le parti cruscali, destinata ad uso zootecnico, è sempre stato il prodotto più contaminato, con un contenuto in FB e MON mediamente di 6,9 e 3,1 volte superiore rispetto alla granella di partenza. Il germe campionato durante questa lavorazione è risultato in media meno contaminato rispetto alla granella intera per entrambe le micotossine.

**Tabella 1. Effetto delle operazioni di pulitura della granella sulla contaminazione da fumonisina B<sub>1</sub> + B<sub>2</sub> (FB) e moniliformina (MON).**

Anno	Ibrido	FB (B <sub>1</sub> + B <sub>2</sub> )			MON		
		Non pulito ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	pulito ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Riduzione (%)	Non pulito ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	pulito ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Riduzione (%)
2011	P1543	455 a	156 b	66	318 a	228 b	28
2012	Lolita	1738 a	961 b	45	691 a	461 b	33
2012	P1547	1530 a	733 b	52	205 a	173 a	16
2014	P0722	1584 a	858 b	46	646 a	299 b	54
2014	PR32B10	2462 a	926 b	62	263 a	116 b	56

La farina bramata e fioretto derivanti dalla raffinazione dell'endosperma vitreo, sono risultati sempre meno contaminati, con abbattimenti rispetto alla granella intera in media di 5,5 volte per FB e 3,2 volte per MON (Figure 2 e 3).



**Figura 2. Ripartizione di FB ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) nei prodotti e sottoprodotti dei processi molitori**

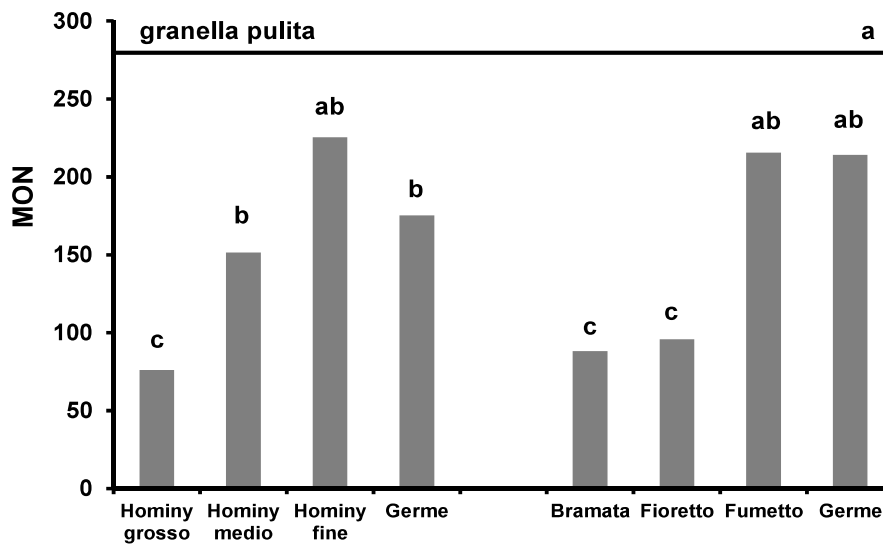


Figura 3. Ripartizione di MON ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) nei prodotti e sottoprodotti dei processi molitori

La frazione derivante dall'endosperma farinoso, il fumetto, ha sempre mostrato un minor contenuto di entrambe le micotossine rispetto al mais di partenza, ma con un abbattimento medio inferiore.

Per quanto riguarda invece il processo di produzione di hominy grits, la contaminazione da MON si è ridotta in particolare nei prodotti con maggiore granulometria, confermando complessivamente una ripartizione analoga a quella delle FB.

## Conclusioni

I risultati confermano che così come per le fumonisine, anche la contaminazione della moniliformina nei prodotti della lavorazione molitoria della granella di mais si riduce all'aumentare della granulometria del prodotto finito. Tale comportamento si è osservato per entrambi i processi di trasformazione considerati. In media l'intensità di decontaminazione nei prodotti finiti della moniliformina risulta inferiore rispetto a quello delle fumonisine, forse per una più interna localizzazione di questa tossina nell'endosperma della cariosside di mais.

I dati raccolti forniscono una prima base per la valutazione del rischio di contaminazione da moniliformina nei prodotti molitori della filiera maidicola alimentare.

La principale strategia di abbattimento del livello di contaminazione di fumonisine e moniliformina è rappresentata da attenti interventi di pulitura, utilizzando sia metodi meccanici sia ottici.

Tuttavia ulteriori e più decisivi miglioramenti della qualità sanitaria dei prodotti si possono raggiungere solo tramite un approccio integrato di filiera. È quindi necessario analizzare nel dettaglio i processi produttivi e individuare le strategie preventive e di lotta più idonee a garantire un minor rischio di contaminazione anche della moniliformina, in aggiunta a quanto già attuato per le fumonisine.



## Bibliografia

1. Vanara F, Reyneri A, Blandino M. Fate of fumonisin B<sub>1</sub> in the processing of whole maize kernels during dry-milling. *Food Control* 2009;20:235-8.
2. Blandino M, Scarpino V, Vanara F, Sulyok M, Krska R, Reyneri A. The role of the European corn borer (*Ostrinia Nubilalis*) on contamination of maize with thirteen *Fusarium* mycotoxins. *Food Addit Contam A* 2015;32(4):533-43.
3. Scarpino V, Blandino M, Vanara F, Negre M, Reyneri A. Moniliformin analysis in maize samples from North-West Italy using multifunctional clean-up columns and the LC-MS/MS detection method. *Food Addit Contam A* 2013;30:876-84.