

# PRESENZA DI OCRATOSSINA A IN ALIMENTI DESTINATI ALLA PRIMA INFANZIA

## **PRESENCE OF OCHRATOXIN A IN NURSERY FOOD**

Vallone L.<sup>1</sup>, Dragoni I.<sup>1</sup>, Zannotti M.<sup>2</sup>,

<sup>1</sup> Dip. di Scienze e Tecnologie Veterinarie per la Sicurezza Alimentare;

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Animali Università di Milano

### **SUMMARY**

Ochratoxin A is a typical cereal contaminant mainly produced by *Aspergillus* and *Penicillium*. With the aim to estimate the quantity of Ochratoxin A that can be taken in by a child, samples of Pasta and cereals food used in nursery school have been monitored in Milan. Cereal and cereal-based food have been monthly collected during one year. The analysis of ochratoxin A was performed by fluorimeter detector. Ochratoxin A has been found in all samples (100%): the average concentrations of OTA A were 0,64 µg/kg for children specific Pasta and 1,11 for organic Pasta; the average concentrations for cereals and cereals-based food 3,16 µg/kg.

### **Key words**

*Ochratoxin A, cereals, nursery school.*

### **INTRODUZIONE**

Ocratossina è una micotossina prodotta principalmente da *Penicillium verrucosum*, che contamina i cereali nel centro-nord Europa e in Canada, da *Aspergillus ochraceus* che si sviluppa su caffè e cereali nelle regioni calde, e da *Aspergillus carbonarius* che si sviluppa anche in campo prevalentemente su uve coltivate in regioni calde come il sud Europa (1). Tra le diverse Ocratossine (A, B e C) solo Ocratossina A (OTA) ha un'importanza tossicologica (2).

La contaminazione dei prodotti cerealicoli è molto variabile ed è influenzata dalle condizioni climatiche (temperatura ed umidità) che si verificano durante e, in particolare, dopo il raccolto (2). Ocratossina A è stata frequentemente riscontrata anche in altri prodotti quali caffè, birra, olive, vino, succhi di frutta, cacao, spezie e frutta secca. Questa mico-

tossina può, inoltre, essere presente nelle carni suine fresche di animali alimentati con cereali particolarmente contaminati (3) e nelle carni suine insaccate probabilmente a causa di una contaminazione fungina superficiale (4). I ruminanti sono meno sensibili dei monogastrici agli effetti tossici di questa micotossina (5) perché la microflora ruminale, ed in particolare i protozoi, degradano rapidamente OTA nel suo metabolita meno tossico, Ocratossina a (2) e per lo stesso motivo non sono mai stati riscontrati residui di OTA nelle loro carni. La presenza di OTA è stata tuttavia segnalata sporadicamente nel latte vaccino in Norvegia (6) e in Svezia, anche se in concentrazioni esigue (7). Varie le ipotesi in merito al passaggio nel latte: certamente interessante è quella che ipotizza il trasferimento nel latte dall'inalazione di polveri contaminate.

La frequente presenza di OTA nei cereali e la sua persistenza negli alimenti (stabile alle alte tem-

perature) condizionano una costante esposizione dell'uomo a bassi livelli di questa micotossina, confermata dalla sua presenza nel sangue e nel latte umano sia in Europa che in Canada e negli Stati Uniti (8). Ricerche di tossicologia sperimentale hanno rilevato la pericolosità di OTA come sostanza nefrotossica, epatotossica, immunosoppressiva, teratogena e cancerogena (9) mentre, sotto il profilo epidemiologico, l'assunzione di cereali contaminati con questa tossina è stata associata alla nefropatia endemica dei Balcani (10) e a tumori uroteliali (9). L'Agenzia Internazionale della Ricerca sul Cancro (IARC) ha classificato Ocratossina A nella classe 2B, "possibile cancerogeno per l'uomo" (11). A salvaguardia della salute pubblica, il Comitato Scientifico per gli alimenti (SCF) della Commissione Europea ha espresso l'opinione che sarebbe prudente ridurre l'esposizione quanto possibile, cioè sotto i 5 ng/kg di peso corporeo/giorno (12). Il Ministero della Salute, recependo le normative europee, ha stabilito per i prodotti a base di cereali destinati a bambini e lattanti un tenore massimo per l'OTA di 0,5 µg/kg (Regolamento CE n. 1881/2006) e di 3 µg/kg per tutti i prodotti derivati dai cereali (compresi i prodotti lavorati a base di cereali ed i cereali destinati al consumo umano diretto) (Regolamento CE n. 123/2005). Sotto il profilo del rischio sanitario, i bambini sono considerati la fascia di popolazione più "a rischio" sia perché hanno, in proporzione al peso corporeo, un consumo di cereali più elevato rispetto agli adulti, sia perché hanno una minore capacità di detossificazione. Va inoltre ricordato che, nei paesi europei, i cereali sono tradizionalmente il primo alimento solido assunto dai neonati fin dalle prime fasi dello svezzamento (13).

Lo scopo del presente lavoro è quindi quello di valutare la contaminazione da OTA nei cereali e in alcuni prodotti derivati destinati ai bambini degli asili nido di Milano.

## MATERIALI E METODI

### *Allestimento dei campioni.*

La ricerca ha previsto l'analisi dei seguenti prodotti: pasta, riso ribe e orzo perlato (provenienti da agricoltura biologica), pan grattato. La pasta che viene utilizzata negli asili di Milano è "Pasta per l'infanzia" (dedicata per tipologia e forma ai bambini, da 5 mesi in su), prodotta con farina di frumento (grano tenero). Inoltre, lo studio ha previsto il prelievo di pasta di semola di grano duro proveniente da agricoltura biologica.

I campioni, in confezioni integre, sono stati prelevati ogni quindici giorni (in doppio) per un periodo di un anno, per un totale di 24 campioni.

**Analisi di Ocratossina A.** La ricerca di OTA è stata effettuata applicando una metodica che prevede purificazione ed estrazione con colonnine di immunoaffinità e determinazione/quantificazione con rivelatore fluorimetrico. Più precisamente: 25 grammi di campione; aggiunta di 50 ml di una soluzione costituita dal 70% di metanolo e dal 30% di acqua distillata all'1% NaHCO<sub>3</sub>; agitazione meccanica per 60 secondi; filtrazione dell'estratto con filtro di carta; miscelazione di 10 ml del filtrato con 40 ml di PBS contenente il 2% di Tween 20; filtrazione della miscela così ottenuta con un filtro di fibra di vetro; passaggio di 10 ml del secondo filtrato, corrispondenti ad 1 grammo di campione, attraverso la colonnina ad immuno-affinità (Ocratest®, VICAM), al flusso di 1-2 gocce al secondo; 4 lavaggi della colonnina, 2 con acqua distillata (10 ml per lavaggio) e 2 con PBS al 2% di tween 20 (10 ml per lavaggio). L'Ocratossina A viene eluita, come indicato dal protocollo Vicam, con 1,5 ml di Ochrates Eluting Solution al flusso di 1 goccia/secondo. L'eluato è raccolto in una cuvetta di vetro che è poi posta nel fluorimetro che, in 60 secondi, fornisce la concentrazione di Ocratossina A, convertita direttamente in ppb.

## RISULTATI

I risultati delle analisi effettuate sono riportati nelle tabelle che seguono, intesi come valori medi sul totale dei campioni analizzati.

*Tabella n. 1: risultati analisi "Pasta per l'infanzia"*

<b>Campione</b>	<b>Livelli medi di OTA (ppb)</b>
Pastina Chioccioline	0,62
Pastina Maccheroncini	0,79
Pastina Pokerina	0,65
Pastina Tempestine	0,5

*Tabella n. 2: risultati analisi "Pasta da agricoltura biologica"*

<b>Campione</b>	<b>Livelli medi di OTA (ppb)</b>
Pasta BIO pennette	1,1
Pasta BIO gramigna	1,2

Tabella n. 3: risultati analisi cereali e derivati.

Campione	Livelli medi di OTA (ppb)
Riso Ribe BIO	3,6
Orzo perlato BIO	3,5
Pan grattato	2,4

Vengono riportati nella tabella successiva (tabella n. 4), i limiti di OTA previsti dalla legislazione europea per cereali e derivati (Reg. CE n. 1881/2006).

Tabella n. 4: limiti di OTA previsti dalla legislazione europea per cereali e derivati

Prodotto alimentare	Tenori massimi ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) (ppb)
Cereali non trasformati (compreso riso grezzo)	5,0
Tutti i prodotti derivati dai cereali non trasformati	3,0
Alimenti a base di cereali e altri alimenti destinati a lattanti e bambini	0,5

## CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Dall'analisi dei risultati ottenuti, è emerso che Ocratossina A è presente nel 100% dei campioni analizzati con una concentrazione media di 0,64  $\mu\text{g}/\text{kg}$  nei campioni di pasta "dedicata" e di 1,11  $\mu\text{g}/\text{kg}$  nei campioni di pasta BIO; i campioni di cereali e di derivati mostrano una contaminazione media pari a 3,16  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . La pasta BIO quindi risulta maggiormente contaminata da OTA, in contrasto con ricerche specifiche (14, 16) in cui è stato evidenziato che le concentrazioni di OTA in cereali provenienti da diverse tecniche agronomiche (biologica, convenzionale ed integrata) non sono risultate significativamente diverse.

La contaminazione di OTA da noi rilevata è, per quanto riguarda la pasta per l'infanzia, attorno ai limiti di legge; per la pasta BIO i valori sono al di sotto dei limiti previsti e per i cereali i risultati ottenuti sono moderatamente al di sopra dei limiti, eccezion fatta per il pan grattato. È da precisare che:

- OTA e ocratossine in generale sono tossine termostabili (169 °C), quindi le quantità rilevate si mantengono inalterate anche in seguito a cottura;
- i risultati delle analisi sono riferiti ad un numero limitato di campioni.

Tuttavia, la frequente contaminazione degli alimenti da parte di OTA è stata dimostrata anche da studi condotti sul sangue e latte umano (5, 10). In particolare uno studio condotto in Lombardia (10) ha riscontrato la presenza di OTA nell'85,7 % dei campioni di latte materno, con valori che variavano da un massimo di 8,25 ng/l a 3,91 ng/l. L'analisi dei dati di OTA in relazione al consumo di formaggi, pane, legumi, caffè, noccioline, carne suina e cacao, valutato in termini di frequenze settimanali, ha evidenziato solo per il pane relazioni statisticamente significative. In uno studio condotto in Norvegia e Svezia invece è emerso che l'OTA era presente solo nel 21% dei campioni di latte umano con una correlazione positiva con forti consumi di prodotti da forno e prodotti a base di fegato suino (15).

È importante sottolineare che vi sono altre fonti alimentari di OTA per i bambini e che non sono state prese in considerazione in questo studio come i prodotti derivati dal cacao.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Bennet, J.W., Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 497-516.
- 2) Petzinger, E., Ziegler, K. (2000) Ochratoxin A from a toxicological perspective. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 23, 91-98.
- 3) Monaci, L., Palmisano, F. (2004). Determination of ochratoxin A in foods: state-of-the-art and analytical Challenges. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378, 96-103.
- 4) Cantoni, C., Chiesa, L., Milesi, S. (2006) Considerazioni sulla presenza di ocratossina A nelle carni e nei prodotti derivati. *Ingegneria Alimentare*, 9, 16-22
- 5) Blank, R., Rolfs, J.P., Sudekum, K.H., Frohlich, A.A., Marquardt, R.R., Wolfram, S. (2003). Effects of chronic ingestion of ochratoxin A on blood levels and excretion of the mycotoxin in sheep. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6899-6905.
- 6) Skaug, M. A. et al. (1999). Analysis of Norwegian milk and infant formulas for ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants*, 16 (2), 75-78.
- 7) Breitholtz Emanuelsson A. et al. (1993). Ochratoxin A in cow's milk and in human milk with corresponding human blood samples. *J. AOAC*, 76 (4), 842-846

- 8) Navas, S.A., Sabino, M., Rodriguez-Amaya, D.B. (2005). Aflatoxin M<sub>1</sub> and ochratoxin A in a human milk bank in the city of S o Paulo, Brazil. *Food Additives and Contaminants*, 22 (5), 457-462.
- 9) O'Brien, E., Dietrich, D.R. (2005) Ochratoxin A: the continuing enigma. *Critical Reviews in Toxicology*, 2005 Jan, 35 (1), 33-60.
- 10) Turconi, G., Guarcello, M., Livieri, C., Comizzoli, S., Maccarini, L., Castellazzi, A.M., Pietri, A., Piva, G., Roggi, C. (2004). Evaluation of xenobiotics in human milk and ingestion by the newborn. An epidemiological survey in Lombardy (Northern Italy). *European Journal of Nutrition*, 43 (4), 191-197.
- 11) International Agency for Research on Cancer World Health Organization (IARC). Ochratoxin A. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans (Lyon, IARC), 1993, 56, 489-521.
- 12) Scientific Committee for Food (SCF). European Commission DG XXIV Unit B3. Opinion on ochratoxin A. September 1998.
- 13) Lombaert, G.A., Pellaers, P., Roscoe, V., Mankotia, M., Neil, R., Scotts, P.M. (2003). Mycotoxins in infant cereal foods from the Canadian retail market. *Food Additives and Contaminants*, 20 (5), 494-504.
- 14) Biffi, R., Munari, M., Dioguardi, L., Ballabio, L., Cattaneo A., Galli, C.L., Restani, P. (2004). Ochratoxin A in conventional and organic cereal derivatives: a survey of the Italian market, 2001-02. *Food Additives and Contaminants*, 21 (6), 586-591.
- 15) Thuvander, A., Paulsen, J.E., Axberg, K., Johansson, N., Vidnes, A., Enghardt-Barbieri, H., Trygg, K., Lund-Larsen, K., Jahrl, S., Widenfalk, A., Bosnes, V., Alexander, J., Hult, K., Olsen, M. (2001) Levels of ochratoxin A in blood from Norwegian and Swedish blood donors and their possible correlation with food consumption. *Food and Chemical Toxicology*, 39, 1145-1151.
- 16) Beretta, B., De Domenico, R., Gaiaschi, A., Ballabio, C., Galli, C.L., Gigliotti, C. Restani, P. (2002). Ochratoxin A in cereal-based baby food: occurrence and safety evaluation. *Food Additives and Contaminants*, 19 (1), 70-75.