



Università degli Studi di Messina

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE**

*Corso di Dottorato di Ricerca in Scienze Veterinarie XXXVIII Ciclo*

*Coordinatore: Prof.ssa Cristina Cravana*

*Curriculum: Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare*

---

# Indagine sulla presenza di Aflatossine G e B, Ocratossina B ed Istamina in specifiche filiere alimentari

Tesi dottorale di:

Dr.ssa Federica SPINOLA

Tutor:

Prof. Filippo GIARRATANA

*Percorso dottorale sviluppato con il sostegno finanziario di NextGenerationEU:*

Missione 4, Componente 2, Investimento 3.3, CUP J94D22000750009

Borsa MUR - DM 352/2022 Codice: DOT1314842



*Settore Scientifico Disciplinare MVET-02/B*

---

*Esame Finale 2026*

## Indice

Premessa.....	4
Capitolo 1: le <i>Aflatossine G1, G2, B1, B2</i> e la <i>Ocratossina A (OTA)</i> .....	8
1.1. <i>Proprietà chimico-fisiche</i> .....	10
1.2. <i>Biosintesi e fattori di rischio</i> .....	12
1.3. Influenza dei fattori di rischio sulla filiera .....	17
1.4 Tossicità .....	21
1.5. Aspetti normativi .....	24
Capitolo 2: <i>Istamina</i> .....	26
2.1. <i>Proprietà chimico-fisiche ed attività fisiologica</i> .....	27
2.2 <i>Sindrome sgombroide</i> .....	28
2.3 <i>Biosintesi di istamina</i> .....	32
2.4 <i>Fattori di rischio lungo la filiera</i> .....	36
2.5. <i>Aspetti normativi</i> .....	42
Capitolo 3; definizione delle metodologie analitiche .....	44
3.1. Generalità sulla definizione della metodologia analitica.....	44
3.2. Contesto operativo e generalità.....	47
3.3. Metodo analitico per Aflatossine B e G e OTA .....	48
3.3.1. <i>Preparazione del campione</i> .....	49
3.3.2. <i>Parametri HPLC</i> .....	50
3.3.3. <i>Validazione</i> .....	52
3.4. <i>Metodo analitico per Istamina</i> .....	54
3.4.1. <i>Preparazione del campione</i> .....	55
3.4.2 <i>Parametri HPLC</i> .....	56
3.4.3. <i>Validazione</i> .....	57
Capitolo 4: <i>Aflatossine G e B e di Ocratossina A in specifici prodotti alimentari</i> .....	59
4.1. Presenza di aflatossine G e B e di OTA in gelato artigianale. ....	59
4.1.1. <i>Premessa</i> .....	59
4.1.2. <i>Pianificazione della ricerca e principali risultati</i> .....	61
4.2. Ricerca di Aflatossine G e B e di OTA in prodotti di origine vegetale alternativi alla carne .....	62
4.2.1. <i>Premessa</i> .....	62
4.2.2. <i>Pianificazione della ricerca e principali risultati</i> .....	63
5. <b>Capitolo 5: studio dell'effetto del congelamento sulla cinetica di formazione dell'Istamina nel tonno</b>	70
5.1. Premessa.....	70
5.2. Pianificazione dello studio e principali risultati ottenuti .....	71
6. <b>Conclusioni</b> .....	79

**6. Bibliografia** ..... 82

## **Premessa**

La sicurezza alimentare costituisce attualmente una delle principali sfide a livello globale, sia in relazione alla crescente complessità delle catene di produzione e distribuzione, sia in ragione dell'elevata dinamicità dei rischi – chimici, biologici e tossicologici – cui gli alimenti possono essere esposti lungo l'intero percorso “dal campo alla tavola”, con potenziali e rilevanti ripercussioni sulla salute. In tale contesto, la tutela del consumatore assume un ruolo centrale nelle politiche sanitarie e regolatorie, richiedendo un approccio sistemico e integrato alla gestione del rischio alimentare pubblica (FAO, WHO, 2018).

Il concetto di *food security* si è progressivamente evoluto nel tempo, superando l'accezione originaria prevalentemente focalizzata sulla disponibilità, accessibilità e stabilità dell'approvvigionamento alimentare — in termini sociali, economici e distributivi — per dar luogo a un quadro concettuale distinto e complementare, noto come *food safety*, che pone l'accento sulla protezione della salute umana attraverso garanzie igienico-sanitarie e il controllo dei pericoli associati agli alimenti (Pinstrup-Andersen, 2009). Tale distinzione risulta oggi ampiamente consolidata sia in ambito scientifico sia nel quadro normativo internazionale ed europeo.

Secondo i report dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, il consumo di *unsafe food* — ovvero alimenti contaminati o gestiti in modo inadeguato — rappresenta una delle principali cause di malattie trasmesse da alimenti a livello mondiale, con conseguenze significative in termini di morbosità e, nei casi più gravi, di mortalità (WHO, 2015). Questi dati evidenziano la necessità di strategie di prevenzione efficaci, basate su controlli sistematici e sull'identificazione precoce dei fattori di rischio.

La complessità nella gestione della sicurezza alimentare risulta oggi particolarmente accentuata in considerazione del progressivo allungamento e della crescente internazionalizzazione delle filiere agroalimentari (Unnevehr, 2015). Le catene produttive comprendono infatti una pluralità di fasi — dalla produzione primaria alla trasformazione industriale, dalla distribuzione nazionale e internazionale fino alla commercializzazione al dettaglio — ognuna delle quali può costituire un potenziale

punto critico per l'introduzione o l'amplificazione di contaminazioni chimiche, biologiche o fisiche, nonché per il deterioramento qualitativo degli alimenti (Aung & Chang, 2014). Tale articolazione rende indispensabile l'adozione di sistemi integrati di controllo, monitoraggio e tracciabilità lungo l'intero processo produttivo (Regattieri, 2007).

Per rispondere a queste esigenze, l'Unione Europea ha progressivamente sviluppato un articolato quadro normativo volto a garantire un elevato livello di tutela della salute dei consumatori (Vos & Wendler, 2016).

Un elemento fondante di tale sistema è rappresentato dal **Regolamento (CE) n. 178/2002** (*General Food Law*), che stabilisce i principi generali della legislazione alimentare dell'Unione, introduce formalmente il concetto di analisi del rischio e sancisce l'obbligo di tracciabilità degli alimenti, dei mangimi e delle sostanze destinate a entrare a far parte di un alimento [Reg. (CE) n. 178/2002] (European Commission, 2002).

A questo si affianca il cosiddetto *Pacchetto Igiene*, costituito in particolare dai **Regolamenti (CE) n. 852/2004** e **853/2004**, che definiscono requisiti vincolanti in materia di igiene degli alimenti e degli alimenti di origine animale lungo l'intera filiera produttiva (European Commission, 2004a; 2004b). Tali regolamenti introducono principi cardine quali la responsabilità primaria degli operatori del settore alimentare, l'obbligo di applicazione delle procedure basate sui principi dell'HACCP e il rispetto di adeguate condizioni igienico-sanitarie in tutte le fasi della produzione, trasformazione e distribuzione degli alimenti [Reg. (CE) n. 852/2004; Reg. (CE) n. 853/2004].

In anni più recenti, il quadro normativo europeo è stato ulteriormente rafforzato e armonizzato attraverso l'adozione del **Regolamento (UE) 2017/625**, che disciplina in maniera organica i controlli ufficiali lungo la filiera alimentare, dei mangimi e della salute animale (European Commission, 2017). Tale regolamento definisce le modalità operative per l'esecuzione dei controlli ufficiali, i requisiti per i laboratori designati, le procedure di campionamento e analisi, nonché i criteri di competenza e imparzialità

delle autorità competenti, con l'obiettivo di garantire uniformità applicativa e affidabilità dei sistemi di controllo negli Stati membri [Reg. (UE) 2017/625].

Nella gestione del rischio alimentare, la prevenzione si affianca all'analisi sistematica dei potenziali contaminanti, finalizzata a rilevare e quantificare sostanze chimiche, micotossine, residui di pesticidi, agenti biologici e fisici, nonché altri fattori in grado di compromettere la sicurezza e la qualità degli alimenti (EFSA, 2018). A supporto di tale approccio, la normativa europea ha introdotto disposizioni specifiche che stabiliscono limiti massimi di contaminanti e criteri armonizzati per la valutazione della conformità dei prodotti. In particolare, il **Regolamento (UE) 2023/915** della Commissione definisce i tenori massimi consentiti per determinati contaminanti negli alimenti, incluse le micotossine, in un'ottica di aggiornamento scientifico e rafforzamento della tutela della salute pubblica [Reg. (UE) 2023/915].

Parallelamente, l'adozione di procedure standardizzate di campionamento e di metodologie analitiche per il controllo ufficiale delle micotossine è oggi disciplinata dal **Regolamento di esecuzione (UE) 2023/2782**, che ha abrogato il precedente Regolamento (CE) n. 401/2006, definendo criteri aggiornati per il campionamento, la preparazione dei campioni e i requisiti di prestazione dei metodi analitici, garantendo un elevato livello di affidabilità, comparabilità e armonizzazione dei controlli all'interno dell'Unione Europea [Reg. di esecuzione (UE) 2023/2782].

In quest'ottica, la presente tesi si propone di contribuire al quadro della gestione integrata del rischio alimentare attraverso l'analisi di contaminanti di particolare rilevanza sanitaria: le aflatossine e l'ocratossina A, micotossine ad elevato potere tossigeno e ampiamente diffuse in specifiche filiere agroalimentari, e l'istamina, ammina biogena la cui formazione è strettamente correlata a processi di degradazione microbiologica, soprattutto nei prodotti ittici (IARC, 2012; EFSA, 2011). L'obiettivo è quello di approfondire, mediante un'analisi bibliografica critica, le dinamiche di presenza, formazione e diffusione di tali contaminanti nelle rispettive filiere (Capitoli 1 e 2). Parallelamente, sono stati sviluppati e validati modelli analitici idonei alla loro determinazione, conformi agli standard normativi europei e ai requisiti di affidabilità, riproducibilità e sensibilità richiesti dalle moderne strategie di controllo ufficiale

(Capitolo 3). Tali modelli analitici sono stati impiegati per la realizzazione di alcune indagini su peculiari filiere alimentari come quella del gelato artigianale o di alcuni alimenti a base vegetale nel caso delle Aflatossine G e B e delle Ocratossine A (Capitolo 4), o ancora, sono state impiegate per lo studio della cinetica di formazione dell'Istamina in tonno refrigerato rispetto a quello congelato (Capitolo 5).

## Capitolo 1: le *Aflatossine G1, G2, B1, B2* e la *Ocratossina A (OTA)*

Con il termine *micotossina* — derivato dal greco *mykes* (“fungo”) e dal latino *toxicum* (“veleno”) si designano metaboliti tossici prodotti da specifiche specie fungine, capaci di contaminare un’ampia gamma di materie prime e prodotti alimentari lungo l’intera filiera produttiva (Di Salvo et al., 2025). Tali composti, spesso caratterizzati da elevata stabilità e resistenza ai comuni processi di trasformazione tecnologica, rappresentano una delle principali criticità nell’ambito della sicurezza alimentare, in virtù dei loro effetti dannosi sulla salute umana e animale (Ola Adeniji et al., 2025). Tra le micotossine di maggiore rilevanza si annoverano le aflatossine B e G e l’ocratossina A, rispettivamente note per la loro pronunciata epatotossicità e nefrotossicità, la cui presenza negli alimenti è oggetto di rigoroso monitoraggio e regolamentazione a livello internazionale (EFSA, 2020).

Le aflatossine costituiscono un gruppo eterogeneo di micotossine, prodotte dal metabolismo secondario prevalentemente di specie del genere *Aspergillus*. Tra questi, *A. flavus* è principalmente responsabile della sintesi delle aflatossine B, mentre *A. parasiticus* possiede la capacità di generare sia le aflatossine B (B1 e B2) sia le G (G1 e G2), conferendo a tali specie un ruolo centrale nella diffusione di queste sostanze (Tanvir Ahmad et al., 2025). Di minor criticità sono le aflatossine M (AFM1 e AFM2), metaboliti idrossilati delle aflatossine B, che si ritrovano nei prodotti lattiero-caseari derivati da latte di animali nutriti con mangimi contaminati (Kumar et al., 2017).

L’ocratossina A (OTA) è un metabolita secondario prodotto da diverse specie dei generi *Aspergillus* e *Penicillium*, che sono anche responsabili della sintesi delle forme correlate OTB e OTC (Pitt & Hocking, 2009). Tra gli *Aspergillus*, i principali produttori sono *Aspergillus ochraceus*, *A. westerdijkiae*, *A. steynii*, *A. carbonarius* e, più raramente, alcuni ceppi di *A. niger* (Taniwaki et al., 2018). Per quanto concerne il genere *Penicillium*, le specie di maggiore rilevanza tossicologica sono *Penicillium verrucosum* e *P. nordicum*. Questi funghi presentano differenti capacità di adattamento ecologico e colonizzano substrati eterogenei, circostanza che ne giustifica l’ampia diffusione in numerose filiere alimentari (Magnoli et al., 2014).

Le suddette micotossine sono state ufficialmente riconosciute come altamente tossiche per la salute, in particolare, l’AFB1 e l’OTA sono state classificate rispettivamente come

cancerogeno di Gruppo 1 e Gruppo 2B dall'Agencia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC, 2012).

La rilevanza tossicologica delle micotossine fu riconosciuta in maniera significativa a partire dalla seconda metà del XX secolo, a seguito di osservazioni cliniche e sperimentali sugli effetti nocivi dei mangimi contaminati (Bennett & Klich, 2003). All'inizio degli anni Sessanta, l'evento noto come "Turkey X Disease", caratterizzato da un elevato e improvviso tasso di mortalità dei tacchini negli allevamenti britannici, stimolò lo svolgimento di approfondite indagini epidemiologiche e analitiche sui mangimi (Blount, 1961). Tali studi identificarono nelle farine di arachidi contaminate da ceppi tossigeni di *Aspergillus* la principale causa dell'epidemia, consentendo l'isolamento delle aflatossine e la loro successiva caratterizzazione chimica e tossicologica (Sargeant et al., 1961).

Parallelamente, la scoperta delle ocratossine si sviluppò progressivamente tra gli anni Sessanta e Settanta, in un contesto di crescente attenzione verso gli effetti tossici dei metaboliti fungini presenti negli alimenti e nei mangimi (Pitt & Hocking, 2009). In quel periodo, nell'Europa settentrionale, furono segnalati diversi episodi di nefropatie nei suini e in altre specie animali, strettamente associati al consumo di cereali conservati (Stoloff, 1980). Tali patologie, caratterizzate da lesioni renali croniche, non trovavano spiegazione nei nutrienti o nei contaminanti chimici allora noti, suscitando l'interesse della comunità scientifica verso potenziali metaboliti fungini tossici (Miller, 1998). Le indagini successive portarono all'identificazione di alcune specie di *Aspergillus* e *Penicillium* presenti nei cereali contaminati, tra le quali *Aspergillus ochraceus* si distinse come principale produttore dell'OTA (Varga et al., 2010).

Questi episodi rappresentano un punto di svolta fondamentale per la nascita della moderna micotossicologia, stimolando lo sviluppo di metodologie analitiche avanzate, l'implementazione di controlli lungo l'intera filiera alimentare e la definizione di normative di sicurezza volte a prevenire la contaminazione da micotossine (EFSA, 2020).

### ***1.1. Proprietà chimico-fisiche***

Per comprendere appieno il meccanismo d'azione e il profilo tossicologico delle micotossine, è fondamentale esaminare la loro struttura chimica, le caratteristiche funzionali dei principali gruppi molecolari e le differenze tra le varie forme, elementi che determinano stabilità, solubilità e capacità di interazione con i tessuti biologici (Shabeer et al., 2022).

La distinzione iniziale tra le aflatossine B e G venne effettuata mediante osservazione della fluorescenza emessa sotto luce ultravioletta, tecnica con la quale le micotossine venivano inizialmente identificate. In questo contesto, le aflatossine B mostravano fluorescenza blu, mentre le G fluorescenza verde (Nazareth et al., 2024).

Successivamente, studi più approfonditi permisero di definirne le caratteristiche strutturali e chimiche specifiche, consentendo una classificazione più precisa, fondata sulla natura dei singoli anelli e dei gruppi funzionali presenti nelle molecole (Li et al., 2024).

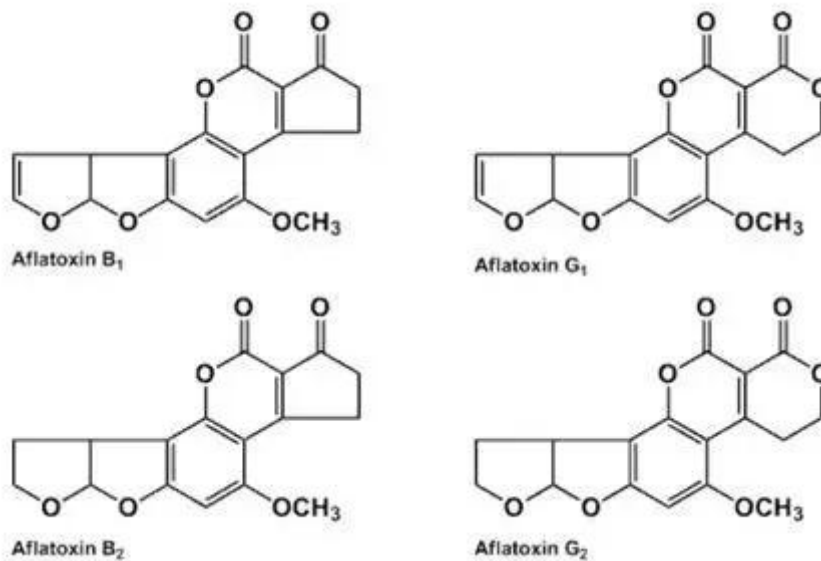
Le aflatossine sono, difatti, composti organici caratterizzati da un nucleo planare formato da un gruppo difuranico fuso a un anello cumarinico. Sulla base della struttura dell'anello condensato, queste micotossine vengono convenzionalmente suddivise in due classi principali: le aflatossine B (AFB), che presentano un anello ciclopentenonico, e le aflatossine G (AFG), caratterizzate dalla presenza di un anello  $\delta$ -lattone.

A loro volta le AFB e AFG possono essere suddivise in tipo 1 e 2 in relazione alla rispettiva presenza del doppio legame C8–C9 nella porzione furanica, che conferisce maggiore rigidità alla molecola e influenza leggermente la polarità complessiva (Nazhand et al., 2024).

Da un punto di vista fisico le AF si presentano generalmente come cristalli incolori o leggermente gialli, rispecchiando però le differenze strutturali nei punti di fusione. Nello specifico l'AFB1 e l'AFB2 presentano una  $T_f$  rispettivamente di 268–269 °C e di 296–297 °C, mentre AFG1 e AFG2 di 244–246 °C e di 248–250 °C (Wagacha et al., 2018).

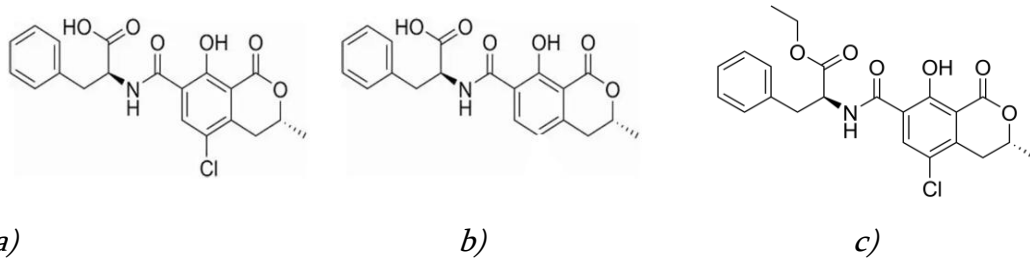
La determinazione della struttura delle aflatossine ha rappresentato un passo fondamentale per comprendere in modo sistematico le loro proprietà chimico-fisiche. La struttura planare costituita dalla difuranocumarina, infatti, conferisce alle molecole una

rigidità notevole, elevata stabilità termica e una marcata lipofilia, caratteristiche che ne modulano il comportamento in diverse matrici organiche (Li et al., 2024).



**Fig. 2.1.** Strutture AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>

Dal punto di vista strutturale, tutte le ocratossine appartengono alla classe delle isocumarine e condividono un nucleo di diidrossiisocumarina legato, tramite un legame ammidico, all'L-fenilalanina (Banahene et al., 2024). La distinzione principale tra le tre molecole risiede nelle sostituzioni sull'anello isocumarinico: l'ocratossina A (OTA) presenta un atomo di cloro in posizione 5, OTB rappresenta la forma dechlorata della molecola, mentre OTC è l'estere etilico dell'OTA, caratterizzato dalla sostituzione del gruppo carbossilico con un gruppo etilico (Heussner & Bingle, 2015). Questa modificazione rende l'OTC più lipofila rispetto alle altre due forme (Turner et al., 2009). Sotto il profilo fisico, le ocratossine si presentano come solidi cristallini, caratterizzati da elevata stabilità termica. L'ocratossina A mostra un punto di fusione compreso tra circa 169–171 °C, mentre l'ocratossina B fonde leggermente al di sotto, intorno a 166–168 °C (Koszegi & Povero, 2016).



**Fig. 2.2.** Struttura chimica OTA (a), OTB (b) e OTC (c)

Le caratteristiche chimico-fisiche delle ocratossine influenzano direttamente la loro tossicità. La presenza del cloro nell'ocratossina A (OTA) aumenta la stabilità e la resistenza alla degradazione metabolica, favorendo l'accumulo nei tessuti e una lunga permanenza legata all'albumina plasmatica, con conseguente elevata nefrotossicità (Banahene et al., 2024). La dechlorazione dell'ocratossina B (OTB) rende invece la molecola meno stabile e più facilmente eliminabile, riducendo significativamente la tossicità. L'esterificazione dell'ocratossina C (OTC) conferisce maggiore lipofilia e ne favorisce l'accumulo nei tessuti lipidici; l'OTC può inoltre essere riconvertita in OTA, spiegando il suo profilo tossicologico intermedio (Heussner & Bingle, 2015).

Comprendere queste proprietà si è rivelato cruciale non solo per la definizione delle caratteristiche tossicologiche delle micotossine, ma anche per lo sviluppo di metodologie analitiche efficaci per la loro rilevazione e quantificazione nei prodotti alimentari e nei mangimi.

### **1.2. Biosintesi e fattori di rischio**

La biosintesi delle micotossine, in generale, rappresenta il risultato di un complesso intreccio tra fattori genetici intrinseci e condizioni ambientali esterne (Li et al., 2024). Sebbene la presenza del fungo sul substrato sia chiaramente necessaria affinché la sintesi tossinica avvenga, non esiste una correlazione diretta tra la biomassa miceliale e la quantità di micotossine prodotte. È ormai riconosciuto, infatti, che la crescita miceliale e la sintesi delle tossine costituiscono processi distinti, regolati da meccanismi biochimici e molecolari differenti (Nazareth et al., 2024). La crescita del micelio è principalmente determinata dalla capacità del fungo di utilizzare efficacemente il substrato e di adattarsi

alle condizioni ambientali, tra cui disponibilità di nutrienti, umidità, temperatura e pH (Dantigny et al., 2025). Al contrario, la sintesi delle micotossine dipende dall'attivazione di percorsi metabolici secondari del fungo stesso, la cui regolazione è fortemente influenzata da fattori ambientali specifici e da stress fisiologici, come ad esempio variazioni termiche, limitazioni idriche o squilibri nei nutrienti disponibili (Nazhhand et al., 2024). Studi molecolari hanno inoltre evidenziato come geni regolatori specifici, fattori di trascrizione e reti di segnalazione intracellulari modulino l'espressione dei cluster genici responsabili della biosintesi delle micotossine, consentendo al fungo di adattare la sintesi tossinica in risposta a stimoli esterni e condizioni di stress (Amaike & Keller, 2011). Questo delicato equilibrio tra genetica e ambiente determina la variabilità nella sintesi delle micotossine osservata tra ceppi diversi e nelle differenti condizioni di coltivazione, evidenziando l'alta diversificazione del grado di contaminazione delle varie matrici alimentari (Kumar et al., 2021).

La contaminazione da aflatossine e OTA interessa in modo particolare alcune colture e materie prime agricole, tra cui i cereali, con il mais come substrato più vulnerabile, seguito da riso, frumento, orzo, avena, sorgo, miglio e grano saraceno (Eskola et al., 2020). Altri substrati altamente suscettibili includono semi oleaginosi, frutta secca come arachidi, nocciole, mandorle e pistacchi, nonché spezie e legumi. (Palacios et al., 2022). Questi substrati risultano particolarmente favorevoli allo sviluppo miceliale e alla sintesi di micotossine per diversi motivi. In primo luogo, l'elevata disponibilità di nutrienti assimilabili, in particolare carboidrati e lipidi, fornisce ai funghi sia le risorse necessarie per la sua crescita e che per l'attivazione dei percorsi metabolici secondari responsabili della sintesi tossinica (Njobeh et al., 2010).

Queste caratteristiche unitamente ai fattori ambientali, spiegano perché alcune colture e materie prime siano particolarmente vulnerabili alla contaminazione (ISS, 2019).

Dunque, oltre al tipo di substrato e alla disponibilità di nutrienti, i principali determinanti esterni che più influenzano la formazione di micotossine sono la temperatura, l'attività dell'acqua (aw), il pH, lo stress ambientale e le condizioni di conservazione e manipolazione (Dantigny et al., 2025).

Per quanto riguarda le aflatossine, la temperatura rappresenta uno dei fattori critici sia per la crescita di *A.flavus* e *A.parasiticus* sia per la loro stessa produzione, ma è importante sottolineare che i due processi non coincidono perfettamente (Hell et al., 2008). La crescita miceliale si osserva in un intervallo relativamente ampio, generalmente tra un minimo di 10-12 °C ad un massimo di 43 e 48 °C, con un optimum intorno a 33 °C, consentendo al fungo di sviluppare spore, estendere il micelio e colonizzare il substrato (EFSA, 2023). La sintesi delle aflatossine, invece, avviene principalmente a temperature leggermente inferiori all'optimum, tra 27 e 30 °C, dove gli enzimi chiave della via biosintetica risultano più attivi e il metabolismo secondario è stimolato (Magan & Aldred, 2007). Infatti, temperature subottimali o eccessivamente elevate possono provocare conformazioni proteiche non efficienti, riducendo la resa dei metaboliti enzimatici e conseguentemente la quantità di micotossine prodotte. In altre parole, il fungo può crescere anche a temperature superiori o inferiori a questo intervallo, ma la produzione di micotossine è ridotta se le condizioni non corrispondono all'optimum per la biosintesi enzimatica (Giorni et al., 2011).

Per quanto riguarda l'OTA, il quadro è più eterogeneo, in quanto le specie produttrici appartengono a taxa differenti e mostrano preferenze ecologiche diversificate. *A. ochraceus* e specie affini prediligono temperature moderate, intorno a 25 °C, e possono svilupparsi fino a 40 °C, mentre *A. westerdijkiae* e *A. steynii* presentano un limite superiore di crescita circa 5 °C più basso. Al contrario, *P. verrucosum* e *P. nordicum* prediligono ambienti più freddi, con intervalli di crescita compresi tra 0 e 30 °C (EFSA, 2023).

Studi sperimentali hanno inoltre evidenziato che temperature variabili durante lo stoccaggio possono influenzare significativamente la quantità finale di micotossine accumulate: fluttuazioni termiche ripetute, ad esempio durante trasporto e conservazione, possono ridurre l'efficienza della sintesi enzimatica o stimolare un aumento transitorio della produzione come risposta a stress (Palacios et al., 2022). Ad esempio, condizioni termiche stressanti inducono la produzione di proteine da stress e fattori di trascrizione che modulano i percorsi metabolici secondari, portando talvolta a

un aumento temporaneo della sintesi delle micotossine come risposta difensiva (Kumar et al., 2021).

Insieme alla temperatura, l'attività dell'acqua (*aw*) rappresenta un fattore determinante nel definire il profilo di contaminazione. In termini generali, la sopravvivenza e la capacità di *A.flavus* e *A.parasiticus* di colonizzare un substrato richiedono valori di *aw* superiori a circa 0,82 con variazioni dipendenti dal ceppo considerato (Mannaa & Kim, 2017). Tuttavia, la produzione massima di aflatossine si osserva esclusivamente in condizioni di umidità più elevate, generalmente comprese tra 0,95 e 0,99, valori che consentono il pieno funzionamento delle vie metaboliche secondarie e l'attivazione ottimale dei cluster genici coinvolti nella biosintesi tossinica (Medina et al., 2017). Ne consegue che, in presenza di *aw* marginale, è possibile osservare un micelio visibile sul substrato, ma la sintesi di micotossine risulta minima o del tutto assente (Amaike & Keller, 2011).

A livello fisiologico, l'attività dell'acqua regola processi fondamentali quali il trasporto di nutrienti, la turgidità cellulare e l'attivazione dei percorsi metabolici secondari (Hell et al., 2008). Valori di *aw* inferiori alla soglia minima inducono stress osmotico, riducono l'espressione dei geni del cluster aflatossinico e rallentano significativamente la crescita del micelio, mentre un eccesso di acqua libera può favorire la proliferazione di microrganismi competitori, alterando la composizione microbica del substrato e, di conseguenza, modulando la produzione di aflatossine (Kumar et al., 2021). Differentemente, i produttori di OTA sono specie xerofile e quindi capaci di svilupparsi a basse attività dell'acqua, con valori di *aw* anche inferiori a 0,80, caratteristica che spiega la loro capacità di colonizzare alimenti conservati a bassa umidità come caffè verde, cacao, spezie o frutta essiccata (Hell et al., 2008).

Numerosi studi hanno evidenziato che temperatura e *aw* non agiscono in modo indipendente, bensì in sinergia. Ad esempio, la massima produzione di aflatossine si verifica soltanto all'interno di intervalli ottimali definiti per entrambi i parametri (Battilani et al., 2016). Valori elevati di umidità, se non accompagnati dal corretto range termico, limitano la sintesi di micotossine, mentre temperature favorevoli associate a un *aw* insufficiente inibiscono sia lo sviluppo miceliale sia la biosintesi tossinica. Lo stesso

ragionamento può essere applicato all'OTA. Tale interazione genera un intervallo relativamente ristretto in cui la produzione di micotossine è massimizzata, rendendo alcune condizioni di stoccaggio particolarmente critiche per la sicurezza alimentare (Medina et al., 2014).

In generale, valori leggermente acidi, compresi tra 4,5 e 6,5, risultano ottimali per la germinazione delle spore, l'espansione del micelio e la colonizzazione efficace del substrato. Per le aflatossine, il range di pH favorevole alla produzione è in larga misura sovrapponibile a quello ottimale per la crescita miceliale; tuttavia, studi sperimentali evidenziano che pH inferiori a 6,0 favoriscono principalmente la sintesi di aflatossine di tipo B, mentre valori superiori promuovono la produzione di aflatossine di tipo G (Pitt & Hocking, 2009). Per quanto riguarda la sintesi di OTA, molte specie produttrici mostrano una maggiore tolleranza a variazioni di pH rispetto ad *A. flavus*, riuscendo a produrre tossina anche in condizioni sub-ottimali di crescita. (Giorni et al., 2011).

Dal punto di vista biochimico, la produzione di aflatossine da *Aspergillus flavus* è strettamente regolata da un complesso cluster genico, comprendente circa 25–30 geni. Tra questi, i principali geni regolatori aflR e aflS coordinano l'attivazione dei numerosi geni strutturali responsabili delle singole tappe biosintetiche, tra cui aflD (nor-1), aflM (ver-1), aflP (omtA) e aflQ (ordA) (Yu et al., 2004).

I fattori ambientali agiscono come segnali modulanti, influenzando la trascrizione di questi geni. La temperatura ottimale favorisce la conformazione attiva dei fattori di trascrizione aflR e aflS, consentendo il loro legame ai promotori dei geni strutturali; valori troppo elevati o troppo bassi inibiscono tale attivazione (Cary et al., 2006). Analogamente, un'adeguata attività dell'acqua (aw) permette al metabolismo miceliale di sostenere la biosintesi secondaria, mentre livelli insufficienti ne impediscono l'avvio. (Hell et al., 2008).

Il pH leggermente acido stimola sensori intracellulari che favoriscono l'attivazione del cluster genico (Astoreca et al., 2014). Ulteriori stress, come ossidazione, danni fisici al substrato o limitazioni nutrizionali, modulano le vie di segnalazione intracellulari, inducendo la trascrizione di aflR e aflS come risposta adattativa. In questo modo, temperatura, aw e pH non determinano direttamente la crescita fungina, ma agiscono

come veri e propri interruttori metabolici, attivando la sintesi di aflatossine solo quando le condizioni ambientali risultano favorevoli (Kumar et al., 2021).

La biosintesi delle aflatossine procede attraverso un complesso percorso poliketidico, a partire da unità di acetil-CoA e malonil-CoA. Il primo passaggio consiste nella formazione di acido norsolorinico (NOR), catalizzata dalla polyketide synthase (aflC/pksA) (Yu et al., 2004). Segue una serie di reazioni di ossidazione, riduzione e ciclizzazione, mediate da enzimi codificati dai geni strutturali, che trasformano NOR in intermedi quali averantin, averufin e versicolorin A. Tali intermedi vengono successivamente convertiti in sterigmatocistina, precursore diretto delle aflatossine B1, B2, G1 e G2. (Cary et al., 2006).

La via biosintetica dell'OTA, pur meno studiata rispetto a quella delle aflatossine, coinvolge un cluster genico che codifica per una polichetide sintasi (PKS) responsabile della formazione del nucleo diidrosocumarinico e per enzimi deputati alla clorurazione, esterificazione e coniugazione con la fenilalanina. I fattori ambientali modulano l'espressione di questi geni attraverso trascrittori globali dello stress come VeA, LaeA, PacC e CreA, i quali anch'essi rispondono a variazioni di temperatura, pH e disponibilità di nutrienti (Nazhand et al., 2024).

Questa complessa rete di regolazione genica e modulazione ambientale sottolinea come la sintesi delle micotossine sia il risultato di un delicato equilibrio tra fattori intrinseci e condizioni esterne, evidenziando l'importanza di comprendere tali meccanismi per sviluppare strategie efficaci di controllo e prevenzione della contaminazione dei prodotti alimentari. (Kumar et al., 2021).

### ***1.3. Influenza dei fattori di rischio sulla filiera***

La presenza di aflatossine e OTA negli alimenti può derivare dalla contaminazione fungina dalla produzione delle micotossine sia durante la coltivazione che nel post-raccolta (Battilani et al., 2016; Medina et al., 2017; EFSA, 2020).

Considerando la complessità e l'estensione temporale di molte filiere agroalimentari, risulta cruciale implementare strategie di monitoraggio sin dalle prime fasi della

coltivazione, finalizzate al controllo della presenza di *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. (Zhang et al., 2024). Sebbene durante la fase agricola la sintesi di micotossine possa non manifestarsi, la persistenza del fungo costituisce un rischio latente: qualora in fasi successive si instaurassero condizioni ambientali favorevoli — quali temperatura, umidità e attività dell'acqua ottimali — il micelio preesistente potrebbe attivare i percorsi metabolici secondari, determinando la produzione di tossine e compromettendo la sicurezza dei prodotti lungo l'intera filiera (Sadik et al., 2023).

La fase agricola rappresenta dunque un momento particolarmente critico, in cui la gestione dell'irrigazione e il controllo delle condizioni microclimatiche del campo assumono un ruolo determinante nel limitare la germinazione delle spore, l'espansione del micelio e, potenzialmente, l'attivazione delle vie biosintetiche già nel substrato vegetale (Magan & Aldred, 2007; Kumar et al., 2021). Parallelamente, la selezione di varietà colturali più resistenti e l'adozione di pratiche agronomiche volte a minimizzare stress biotici — quali attacchi da insetti o danni fisici ai semi — contribuiscono a ridurre i siti di ingresso per il fungo e, di conseguenza, la probabilità di contaminazione iniziale (Daniells et al., 2008; Fandohan et al., 2005). Ulteriormente, la raccolta dei cereali al raggiungimento della maturazione fisiologica e dell'umidità ottimale, evitando esposizioni prolungate a condizioni climatiche sfavorevoli, si configura come un intervento fondamentale per limitare l'instaurarsi del micelio e la successiva produzione tossinica (Bandyopadhyay et al., 2016).

Nel periodo immediatamente successivo al post-raccolta, strategie come l'essiccazione rapida, il raffreddamento immediato dei cereali e il mantenimento di livelli di umidità relativamente bassi ( $aw < 0,85$ ) si sono dimostrate efficaci nel ridurre la possibilità che il fungo avvii la sintesi di aflatossine, anche in presenza di micelio già instaurato (El-Desouky, 2025).

Un'ulteriore fase critica, nella quale si osserva con frequenza la maggior parte della produzione di micotossine, è rappresentata dallo stoccaggio e dal trasporto delle materie prime (Masaf, 2020). In questa fase, possono permanere per periodi prolungati nei magazzini del coltivatore o, successivamente al trasporto, in quelli del trasformatore, prima di essere avviati alle fasi di lavorazione. Tali condizioni rendono questi prodotti

particolarmente suscettibili alla proliferazione di *Aspergillus spp.* e *Penicillium spp.*, e all'attivazione dei percorsi biosintetici deputati alla produzione di aflatossine e OTA, soprattutto qualora non siano garantiti adeguati controlli termo-igrometrici (Zhang et al., 2024).

Una corretta gestione dello stoccaggio rappresenta quindi un elemento imprescindibile per la prevenzione della contaminazione. Sistemi di ventilazione efficienti, associati a un monitoraggio continuo di temperatura e umidità, consentono di limitare la formazione di microambienti favorevoli alla contaminazione (Hell et al., 2008). Parallelamente, l'adozione di barriere fisiche — come rivestimenti impermeabili, sacchi multistrato o silos ermetici — contribuisce a impedire l'assorbimento di umidità dall'esterno, mantenendo il substrato in condizioni stabili. L'impiego di agenti anti-micotossinici, di origine naturale (ad esempio estratti vegetali o microrganismi antagonisti) o chimica, può rappresentare una misura aggiuntiva particolarmente utile in contesti ad alto rischio (Klich, 2007).

Accanto agli interventi tecnologici, risultano fondamentali appropriate pratiche gestionali, tra cui la rotazione delle scorte, l'applicazione del principio *first-in, first-out* e la separazione preventiva dei lotti danneggiati o sospetti (Sadik et al., 2023). Tali misure consentono di ridurre i tempi di permanenza del prodotto in condizioni potenzialmente critiche, limitando così l'accumulo di micotossine e la proliferazione di muffe all'interno dei magazzini, specialmente nei casi in cui i tempi di stoccaggio siano particolarmente lunghi (Bhat et al., 2010).

Le condizioni non idonee di conservazione diventano ulteriormente problematiche durante il trasporto, in particolare in ambito internazionale. I prodotti possono infatti essere esposti a sbalzi termici, variazioni di umidità e stress meccanici ripetuti, fattori che possono favorire lo sviluppo del micelio e l'attivazione del cluster genetico responsabile della sintesi delle micotossine (Hell et al., 2008). Tra i rischi più rilevanti vi è la formazione di condensa all'interno dei container o dei silos, determinata da marcate differenze tra la temperatura esterna e quella interna. Tali fenomeni risultano particolarmente frequenti quando le merci attraversano differenti fasce climatiche o sostano per periodi prolungati in porti e centri logistici (Kumar et al., 2021).

I danneggiamenti meccanici dei semi, generati da operazioni quali pulitura intensiva, decorticazione o macinazione preliminare, espongono tessuti ricchi di nutrienti e rendono la matrice più facilmente colonizzabile da *Aspergillus spp.* e *Penicillium spp.* (Magan & Aldred, 2007). Tali lesioni aumentano inoltre la superficie disponibile per l'assorbimento di umidità, favorendo la formazione di microambienti che facilitano la germinazione delle spore e la successiva attività metabolica del fungo (Palacios et al., 2022). La presenza di umidità residua – dovuta a essiccazione incompleta, processi di lavaggio non seguiti da adeguata asciugatura o condizioni ambientali non controllate nei reparti produttivi – può ulteriormente stimolare la crescita fungina e attivare vie metaboliche responsabili della biosintesi di aflatossine. Anche lievi aumenti dell'attività dell'acqua (aw) risultano infatti sufficienti a favorire l'espressione genica associata alla produzione di micotossine, soprattutto in materie prime già indebolite da stress pre- o post-raccolta (Klich, 2007).

Le contaminazioni incrociate rappresentano un altro punto critico della fase di lavorazione. Residui di prodotto, polveri e spore accumulate su macchinari, nastri trasportatori e silos di transito possono agire come inoculi attivi, trasferendosi su lotti successivi e amplificando il rischio anche quando le materie prime iniziali sono conformi (Battilani et al., 2016). È quindi fondamentale adottare protocolli rigorosi di sanificazione, mantenere in condizioni ottimali le superfici di contatto e monitorare costantemente la pulizia delle linee di produzione, così da ridurre al minimo la presenza del fungo e dei suoi metaboliti.

Un ulteriore aspetto determinante è costituito dalla rapidità del processo produttivo (Dantigny et al., 2025). Prolungare la permanenza del prodotto nei silos intermedi o nei macchinari favorisce l'accumulo di calore generato dall'attrito o dalla compressione, creando condizioni particolarmente favorevoli alla proliferazione fungina (Hell et al., 2008). Per questo motivo è essenziale garantire un flusso di lavorazione continuo, efficiente e termicamente controllato (Fandohan et al., 2005).

Infine, un fattore spesso sottovalutato è il livello di raffinazione del prodotto: farine, semole e granella finemente lavorata mostrano con maggiore frequenza concentrazioni più elevate di micotossine. Ciò è attribuibile sia a una maggiore omogeneizzazione della

matrice – che distribuisce uniformemente eventuali contaminazioni – sia all’aumento dei passaggi produttivi, che moltiplicano le opportunità di esposizione a condizioni critiche (Bhat et al., 2010). Le filiere che prevedono processi di frantumazione intensiva richiedono pertanto sistemi di monitoraggio più severi e controlli analitici più frequenti.

#### **1.4 Tossicità**

Le **micotossine** esercitano un significativo **effetto tossico sulla salute**, con modalità d’azione e livelli di nocività che variano a seconda del tipo di tossina (Alshannaq & Yu, 2023).

Le aflatossine presentano un’elevata rilevanza tossicologica, essendo capaci di indurre effetti plurimi e sistemici sull’organismo umano e animale. Esse sono associate a epatotossicità, epatocarcinogenicità, nefrotossicità, gastroenterotossicità, immunotossicità, genotossicità ed embriotossicità (Bhat et al., 2010). Tra i diversi composti, l’AFB1 si distingue per la sua maggiore potenza e diffusione, essendo classificata come cancerogeno di classe 1 dall’International Agency for Research on Cancer (IARC, 2012), soprattutto in relazione agli effetti tossici cronici (JECFA/WHO, 2023).

La manifestazione clinica delle aflatossicosi dipende strettamente dalla modalità e dalla durata dell’esposizione (EFSA, 2024). La tossicità acuta si verifica in seguito all’ingestione di elevate quantità di micotossine in un breve intervallo di tempo e si manifesta con grave insufficienza epatica, emorragie, encefalopatia e alto rischio di mortalità; episodi documentati di aflatossicosi acuta sono stati osservati in vari Paesi tropicali dopo il consumo di cereali gravemente contaminati (Dhakal et al., 2025). La tossicità cronica, invece, deriva da esposizioni ripetute a basse dosi ed è associata allo sviluppo di carcinoma epatocellulare (HCC), con un rischio notevolmente aumentato in presenza di co-infezioni da virus dell’epatite B o C, dovuto a un effetto sinergico nell’indurre mutagenesi e trasformazione tumorale (Liu & Wu, 2010). L’esposizione cronica può inoltre determinare immunodepressione, alterazioni metaboliche, disturbi gastrointestinali e, nei bambini, ritardi della crescita lineare e compromissione dello stato nutrizionale (Yu, 2023).

L'assorbimento delle aflatossine avviene principalmente per via alimentare, grazie alla loro spiccata lipofilia, con diffusione passiva a livello intestinale. Le tossine raggiungono rapidamente il circolo portale e il fegato, principale organo bersaglio. Vie secondarie, come inalazione di polveri contaminate, possono contribuire all'esposizione in contesti occupazionali, mentre l'assorbimento cutaneo ha un impatto marginale (Klich, 2007).

Nel fegato, le aflatossine subiscono metabolizzazione ossidativa mediata da enzimi del citocromo P450, principalmente CYP1A2 e CYP3A4, generando metaboliti reattivi, tra cui l'AFB<sub>1</sub>-8,9-epossido, responsabile della maggior parte della tossicità (Wei et al., 2021). Questo epossido può formare addotti covalenti con DNA e proteine (ad esempio l'AFB<sub>1</sub>-N7-guanina), con conseguente genotossicità, mutagenesi e potenziale carcinogenico. Meccanismi di detossificazione, come la coniugazione con glutazione mediata da glutatione-S-transferasi, permettono l'escrezione urinaria o biliare dei metaboliti idrosolubili (Dohnal et al., 2014).

Oltre agli effetti epatici, le aflatossine esercitano azioni sistemiche (Zhao et al., 2024). A livello gastrointestinale, l'intestino costituisce la prima barriera di contatto con la tossina. AFB<sub>1</sub> compromette l'integrità della barriera intestinale tramite down-regolazione delle proteine delle giunzioni strette (occludina, claudine, ZO-1), aumentando la permeabilità paracellulare e facilitando la traslocazione di endotossine, microrganismi e tossine (Wu et al., 2021). Inoltre, induce stress ossidativo sulle cellule epiteliali, danni mitocondriali, attivazione di autofagia e apoptosi, alterando il ciclo cellulare e riducendo la proliferazione degli enterociti, con conseguente riduzione dell'altezza dei villi, aumento della profondità delle cripte e deterioramento della funzione assorbente dell'intestino (Li et al., 2023). Questi effetti si accompagnano a disbiosi del microbiota e alterazioni delle vie metaboliche microbiche, con intensificazione dell'infiammazione e tossicità sistemica (Chędaśkiewicz et al. 2025; ).

La nefrotossicità rappresenta un ulteriore bersaglio delle aflatossine. L'accumulo e la bioattivazione di AFB<sub>1</sub> nel tessuto renale inducono stress ossidativo, produzione di ROS, attivazione di percorsi apoptotici e danno alle cellule tubulari. Studi sperimentali documentano alterazioni dei parametri biochimici (urea, creatinina), danno istopatologico ai tubuli e incremento di marcatori di stress ossidativo e apoptosi (caspasi,

Bax, riduzione di Bcl-2) (Chen et al., 2022). Lo stress ossidativo e l'alterazione del metabolismo aminoacidico, in combinazione con danni al ciclo cellulare, contribuiscono alla compromissione funzionale renale. (Li et al., 2018).

Per quanto riguarda l'OTA, dopo l'ingestione orale viene rapidamente assorbita a livello gastrointestinale. Una volta nel circolo ematico, la tossina si lega preferenzialmente all'albumina plasmatica, caratteristica che ne prolunga significativamente l'emivita e ne facilita il trasporto sistemico. Questa elevata affinità per l'albumina favorisce l'accumulo nei tessuti, in particolare nei reni e nel fegato, mentre in misura minore si riscontra nei muscoli e nel tessuto adiposo. La nefrotossicità, per la quale è famosa, deriva dal filtraggio glomerulare e dal riassorbimento a livello dei tubuli prossimali, dove la tossina induce apoptosi e necrosi delle cellule tubulari. Il danno renale cronico è associato a stress ossidativo, perossidazione lipidica e alterazioni mitocondriali, che compromettono la funzione filtrante e tubulare (Zhang et al., 2024). Parallelamente, l'OTA stimola la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), danneggiando DNA, proteine e lipidi cellulari; questo stress ossidativo può contribuire a mutazioni geniche e alla formazione di addotti DNA-tossina, suggerendo un possibile ruolo cancerogeno a lungo termine. La tossina interferisce anche con la funzione dei ribosomi e degli enzimi coinvolti nella sintesi proteica, riducendo la proliferazione cellulare e favorendo l'apoptosi, contribuendo alla tossicità epatica e alla compromissione della funzione immunitaria (Li et al., 2025). Inoltre, l'OTA altera la funzionalità dei linfociti e dei macrofagi, compromettendo la risposta immunitaria sia innata sia adattativa e aumentando la suscettibilità a infezioni.

Oltre alla nefrotossicità, l'OTA può determinare effetti epatici, cardiaci e teratogeni in animali da laboratorio. L'esposizione cronica è associata a nefropatie e tumori renali, mentre studi epidemiologici suggeriscono una possibile correlazione tra OTA e nefropatia endemica balcanica negli esseri umani (Smith et al., 2025).

Il meccanismo tossicologico generale delle micotossine combina bioattivazione epatica, formazione di metaboliti reattivi, stress ossidativo, infiammazione, compromissione dei meccanismi di riparazione e detossificazione e danni al DNA (Ivanova et al., 2025). Questo spiega l'ampia gamma di effetti sistemici, la variabilità della risposta tossica in

base a dose, durata dell'esposizione e stato fisiologico dell'individuo, nonché la possibilità di tossicità acuta e cronica (Garcia et al., 2025).

L'entità e la natura del danno da micotossine dipendono da molte variabili: dose e durata dell'esposizione, via di assorbimento, stato nutrizionale e redox dell'individuo, capacità individuale di detossificazione, presenza di co-fattori (infezioni virali, altre tossine), condizioni dello stato di salute e funzionalità epatica/renale, età. Per questo la valutazione del rischio tossico deve essere contestualizzata e integrata con parametri clinici, genetici e ambientali (Sun et al., 2024).

### ***1.5. Aspetti normativi***

Il quadro normativo dell'Unione Europea (UE) disciplina in maniera organica la presenza di micotossine negli alimenti e nei mangimi, stabilendo limiti massimi, procedure ufficiali di campionamento e analisi, nonché regole precise per le importazioni da paesi terzi. La normativa europea in materia di contaminanti alimentari, incluse le micotossine, è stata recentemente aggiornata mediante l'adozione del Regolamento (UE) 915/2023, che abroga e sostituisce il precedente Regolamento (CE) 1881/2006. Tale regolamento definisce, nell'Allegato I, i livelli massimi consentiti di numerosi contaminanti alimentari, tra cui dell'aflatossina B1, della somma delle aflatossine (B1, B2, G1, G2) e dell'OTA in funzione della matrice alimentare e della destinazione d'uso del prodotto.

Un elemento di particolare complessità nell'analisi delle micotossine risiede nella loro distribuzione eterogenea all'interno di un lotto, fenomeno noto come "crescita a macchia di leopardo". In tali condizioni, porzioni di un medesimo lotto possono risultare fortemente contaminate, mentre altre presentano livelli di tossina trascurabili, con il rischio di generare falsi negativi che compromettono la sicurezza pubblica. Per tale motivo, diventa essenziale l'adozione di un metodo di campionamento rappresentativo e standardizzato.

Le procedure ufficiali per il campionamento, la preparazione dei campioni e le analisi di laboratorio sono stabilite dal Regolamento (CE) 401/2006, che specifica la necessità di

prelievi multipli da differenti porzioni del lotto, i quali vengono poi combinati in un campione aggregato rappresentativo. Nel 2023, con l'adozione del Regolamento (UE) 2023/2782, le modalità di campionamento e analisi sono state aggiornate: questo regolamento aggiorna i precedenti e ridiscute i metodi di analisi dei contaminanti nelle derrate alimentari, mantenendo l'approccio di uso di metodi confermativi validati come HPLC.

Per quanto riguarda le importazioni da paesi terzi, il quadro regolatorio è definito dal Regolamento (UE) 2019/1793, il quale stabilisce che prodotti ad alto rischio di contaminazione da aflatossine — tra cui noci, semi oleosi e frutta secca — siano sottoposti a controlli ufficiali obbligatori alle frontiere prima della loro immissione sul mercato comunitario. Ogni partita deve essere accompagnata da documentazione che consenta l'identificazione univoca del lotto. In caso di non conformità ai limiti di legge, il carico può essere bloccato o respinto, impedendo l'immissione nel mercato europeo e garantendo così la protezione della salute pubblica.

## **Capitolo 2: Istamina**

L'istamina è riconosciuta come il responsabile della fisiopatologia della sindrome sgombroide (Histamine Fish Poisoning, HFP), ovvero una forma di intossicazione alimentare legata al consumo di prodotti ittici in cui si è accumulata in elevate concentrazioni (Santos et al., 2022). Sebbene l'istamina sia fisiologicamente presente nell'organismo umano e svolga ruoli essenziali nei processi immunitari e fisiologici, la sua ingestione oltre una certa soglia attraverso la dieta può determinare una reazione simil-allergica, evolvendo, nei casi più gravi, fino a shock anafilattico (Muraoka et al., 2021). In altri alimenti, l'istamina è presente in concentrazioni variabili che, di per sé, risultano generalmente insufficienti a provocare effetti tossici (Fuke et al., 2023). Tra le categorie più note si annoverano alcuni latticini, in particolare i formaggi stagionati, diverse tipologie di frutta e verdura quali avocado, agrumi, funghi, spinaci, fagioli, fragole, pomodori e banane, oltre ad alcune bevande alcoliche come vino rosso e birra (Hwang et al., 2022). Nei prodotti ittici, al contrario, l'istamina non è presente naturalmente, ma si accumula esclusivamente a seguito dell'azione enzimatica di specifici batteri durante la conservazione, in particolare quando la catena del freddo non viene mantenuta correttamente (Cheng et al., 2021).

Il percorso che ha portato all'identificazione dell'istamina come agente responsabile della HFP ha avuto inizio negli anni '50, quando furono segnalati episodi ricorrenti di intossicazione acuta in consumatori di tonno e sgombri, caratterizzati da sintomi analoghi a reazioni allergiche, senza alcuna sensibilizzazione immunitaria preesistente (Lehane & Olley, 2000). Inizialmente, l'eziologia rimase ignota, e si ipotizzarono contaminazioni batteriche o tossine sconosciute. Studi biochimici condotti negli anni '60 e '70 dimostrarono che la decarbossilazione enzimatica dell'istidina libera da parte di batteri specifici era in grado di generare istamina in quantità sufficienti a provocare i sintomi osservati (Taylor, 1986). Queste evidenze hanno permesso di distinguere la sindrome sgombroide dalle vere allergie alimentari, confermando il ruolo dell'istamina anche come agente farmacologicamente attivo sui tessuti, piuttosto che solo mediatore di una risposta immunitaria (Buncic et al., 2020).

### ***2.1. Proprietà chimico-fisiche ed attività fisiologica***

L'istamina (2-(4-imidazolil)etilammina) è un'ammina eteroaromatica azotata caratterizzata dalla presenza di un anello imidazolico legato a un gruppo etilamminico primario, struttura che le conferisce spiccate proprietà basiche e la capacità di agire come mediatore biologico in numerosi processi fisiologici (Maintz & Novak, 2021).

L'azione dell'istamina è strettamente connessa al suo legame con quattro principali recettori istaminergici — H1, H2, H3 e H4 — ampiamente distribuiti nei tessuti umani (Thangam et al., 2018).

I recettori H1, localizzati sull'endotelio vascolare, sulla muscolatura liscia bronchiale e sulle terminazioni nervose sensoriali, mediano fenomeni vasodilatatori, broncocostrittori, e instaurano la stimolazione pruriginosa (Jutel et al., 2022). I recettori H2, espressi principalmente sulle cellule parietali gastriche, regolano la secrezione acida dello stomaco e contribuiscono alla modulazione del tono vascolare e dell'attività cardiaca (Fox et al., 2020). I recettori H3, prevalentemente presinaptici nel sistema nervoso centrale, svolgono funzioni neuromodulatorie, regolando il rilascio di diversi neurotrasmettitori (Haas et al., 2021). Infine, i recettori H4, situati su mastociti, eosinofili, basofili e altre cellule immunitarie, partecipano ai processi di chemiotassi, amplificazione della risposta allergica e regolazione dell'infiammazione immunomediata (Dugas-Bourdages et al., 2022).

Sebbene una modesta quota di istamina circoli libera nei tessuti, la maggior parte è stoccata nei granuli citoplasmatici dei mastociti, cellule sentinella abbondanti nella cute, nelle mucose respiratorie e gastrointestinali, nei tessuti connettivi e in prossimità dei vasi sanguigni (Galli et al., 2020). Essi rappresentano elementi fondamentali dell'immunità innata e costituiscono il punto di raccordo tra la risposta immunitaria immediata e i fenomeni allergici (Kalesnikoff & Galli, 2022).

Infatti, in presenza di stimoli esterni, danni tissutali o agenti nocivi, si innesca una cascata immunitaria che coinvolge linfociti, macrofagi, neutrofilo e mediatori chimici, tra cui l'istamina (Bischoff, 2020). Quando un allergene si lega alle IgE ancorate sulla superficie mastocitaria, si verifica un rapido incremento del calcio intracellulare e l'attivazione di

vie di segnalazione che culminano nella fusione dei granuli con la membrana cellulare e nella liberazione immediata dei mediatori preformati, tra cui l'istamina (Frossard et al., 2021).

Una volta rilasciata, l'istamina interagisce principalmente con i recettori H1 dell'endotelio, determinando vasodilatazione e incremento della permeabilità capillare, fenomeni che facilitano il passaggio di leucociti e proteine plasmatiche verso il sito di lesione o di esposizione allergenica (Ciprandi et al., 2022). La risposta clinica risultante è un'inflammatione locale rapida, caratterizzata da arrossamento, edema, prurito e aumento della temperatura cutanea (Sicherer & Simons, 2021).

Nei casi in cui l'esposizione antigenica è massiva o sistemica, l'attivazione estesa dei recettori H1 e H2 può indurre ipotensione, tachicardia riflessa e broncocostrizione, contribuendo ai quadri clinici tipici delle reazioni allergiche severe, quali l'anafilassi (Kemp et al., 2021).

I recettori H4, localizzati sulle cellule immunitarie, svolgono un ruolo aggiuntivo e complementare, favorendo la migrazione (chemiotassi) di eosinofili e mastociti verso il sito di infiammazione, amplificando la risposta allergica e contribuendo alla sua persistenza (Dugas-Bourdages et al., 2022).

La comprensione della funzione fisiologica dell'istamina e della distribuzione dei suoi recettori nell'organismo fornisce il quadro concettuale necessario per interpretare come l'ingestione di quantità elevate di questa molecola possa determinare l'insorgenza della sindrome sgombroide e dei suoi distintivi effetti clinici (Lehane & Olley, 2000).

## ***2.2 Sindrome sgombroide***

La sindrome sgombroide costituisce un'intossicazione alimentare acuta, determinata dall'ingestione di prodotti ittici contenenti elevate concentrazioni di istamina, la quale si accumula prevalentemente a seguito di una ritardata refrigerazione del pesce subito dopo la cattura e di eventuali interruzioni della catena del freddo durante le fasi di manipolazione, stoccaggio o trasporto del prodotto (Barbieri et al., 2021). I principali protagonisti di questo scenario sono prevalentemente appartenenti alla famiglia dei

*Scombridae*, tra i quali si annoverano tonno, sgombro, palamita acciughe e sardine (Foss & Sørensen, 2020).

La patogenesi di questa condizione non prevede un'attivazione del sistema immunitario con conseguente rilascio endogeno di istamina, come avviene nelle reazioni allergiche IgE-mediate. Al contrario, essa è determinata dall'ingestione di istamina già preformata negli alimenti, prodotta dalla decarbossilazione dell'amminoacido L-istidina, naturalmente presente nei tessuti muscolari dei pesci, ad opera di batteri di istidino-decarbossilasi positivi (Barbieri et al., 2021).

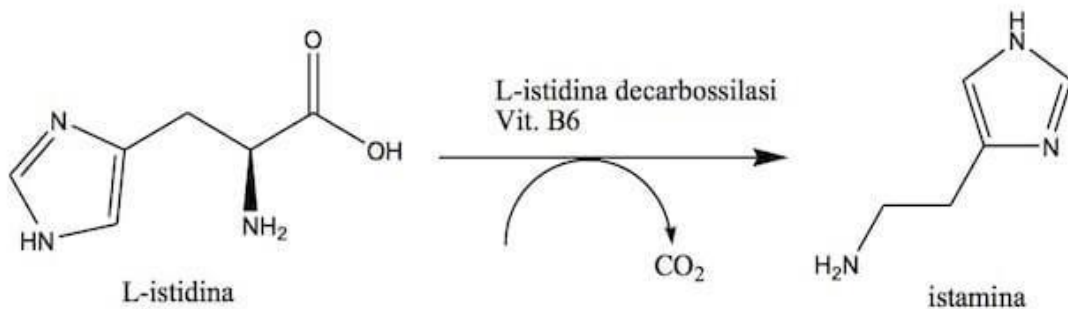


Immagine. Meccanismo di formazione dell'istamina a partire dalla L-istidina

L'assorbimento a livello intestinale avviene principalmente per diffusione passiva, soprattutto quando è presente in concentrazioni elevate (Komprda & Gálik, 2019). L'efficienza di tale processo è influenzata dallo stato della barriera intestinale, poiché condizioni che ne aumentano la permeabilità – come infiammazione, danno mucosale o presenza di elevate quantità di altre ammine biogene – favoriscono ulteriormente il passaggio dell'istamina nel circolo ematico (Vila et al., 2022).

In condizioni fisiologiche, l'istamina esogena viene in larga misura degradata dagli enzimi presenti nella mucosa intestinale, in particolare dalla diammino-ossidasi (DAO), e, in misura minore, dall'istamina-N-metiltransferasi (HNMT). Tuttavia, quando la quantità di istamina ingerita eccede la capacità detossificante di questi enzimi, una quota significativa rimane non metabolizzata e viene assorbita nella circolazione sistemica (Høie et al., 2021).

La presenza concomitante di altre ammine biogene, come putrescina e cadaverina, può competere con l'istamina per la degradazione da parte della DAO, riducendone

l'efficienza; ciò determina un ulteriore incremento dell'assorbimento dell'istamina e un potenziamento dei suoi effetti tossici (Lehane & Olley, 2022).

Di conseguenza, l'istamina non degradata che raggiunge il circolo è libera di interagire con i recettori istaminergici nei diversi tessuti bersaglio, conducendo alla comparsa della tipica sintomatologia simil-allergica della sindrome sgombroide (Taylor & Stratton, 2020).

Uno degli aspetti più insidiosi della sindrome sgombroide è rappresentato dall'assenza di alterazioni organolettiche negli alimenti coinvolti: colore, odore, consistenza e sapore del prodotto ittico rimangono invariati, conferendo al prodotto un'apparente freschezza e idoneità al consumo. Tale peculiarità rende l'intossicazione particolarmente subdola, poiché il consumatore non dispone di indicatori sensoriali per riconoscere la presenza di istamina in concentrazioni tossiche. Inoltre, l'istamina accumulata mantiene la propria attività anche dopo la cottura, grazie alla sua termoresistenza, conservando la capacità di interagire con i recettori istaminergici e di indurre effetti biologici rilevanti (Komprda & Gálik, 2019).

Clinicamente, la sindrome sgombroide si manifesta rapidamente, di solito entro pochi minuti fino a due ore dall'ingestione, con sintomi cutanei quali eritema, orticaria e prurito diffuso, associati a caratteristico arrossamento facciale, disturbi gastrointestinali come nausea, vomito, crampi addominali e diarrea, e, nei casi più gravi, effetti sistemici quali cefalea, palpitazioni, ipotensione, broncocostrizione e shock anafilattico. La gravità dei sintomi dipende sia dalla quantità di istamina ingerita sia dalla sensibilità individuale. Benché la sindrome sgombroide possa manifestarsi in persone di qualunque età, alcuni gruppi risultano maggiormente vulnerabili a causa di specifiche condizioni fisiologiche, patologiche o farmacologiche (Foss & Sørensen, 2020).

Un primo gruppo a rischio è rappresentato dai soggetti con ridotta attività dell'enzima diammina ossidasi (DAO), deputato al metabolismo dell'istamina a livello intestinale. Un deficit di questo enzima, sia congenito sia indotto dall'assunzione di alcuni farmaci (come determinati antidepressivi, antinfiammatori e antiaritmici), può rallentare significativamente la degradazione dell'istamina, amplificando così l'intensità e la durata dei sintomi (Høie et al., 2021).

Accanto a questi individui, risultano particolarmente sensibili anche coloro che presentano ipersensibilità o scarsa tolleranza all'istamina, nei quali persino concentrazioni relativamente modeste possono indurre risposte cliniche più marcate.

Tra le categorie più vulnerabili rientrano inoltre bambini e anziani. Nei bambini, l'imaturità dei sistemi enzimatici deputati alla detossificazione e il rapporto sfavorevole tra massa corporea ed esposizione favoriscono la comparsa di quadri clinici più pronunciati. Negli anziani, al contrario, la fisiologica riduzione dell'efficienza metabolica e la frequente polifarmacoterapia aumentano la probabilità di manifestazioni gravi (Chung et al., 2019).

Ulteriori gruppi a rischio comprendono soggetti affetti da patologie respiratorie, come l'asma, poiché l'istamina esercita un marcato effetto broncoconstrictore che può aggravare condizioni preesistenti. Anche persone con patologie gastrointestinali, che possono facilitare un maggiore assorbimento dell'istamina, o individui in condizioni di immunocompromissione, presentano una maggiore suscettibilità all'intossicazione (Taylor & Stratton, 2020).

Il trattamento della sindrome sgombroide è prevalentemente sintomatico e mira a contrastare gli effetti dell'istamina già presente nell'organismo. Gli antistaminici H1 rappresentano l'intervento terapeutico di prima scelta, consentendo una rapida riduzione di manifestazioni quali eritema, prurito e orticaria; in alcuni casi, la loro associazione con antistaminici H2 può migliorare la gestione dei sintomi gastrointestinali. La terapia di supporto può comprendere reidratazione orale o endovenosa nei casi accompagnati da vomito o diarrea significativi, e ossigenoterapia in presenza di compromissione respiratoria (Vélez et al., 2024). Nei quadri moderati o severi possono essere impiegati broncodilatatori, soprattutto nei soggetti asmatici, e corticosteroidi per attenuare la risposta infiammatoria, sebbene questi ultimi non siano sempre necessari data la frequente autolimitazione della sintomatologia (Higgins, 2025). L'adrenalina trova indicazione esclusivamente nelle rare situazioni che simulano uno shock anafilattico, caratterizzate da grave ipotensione, difficoltà respiratoria o edema delle vie aeree superiori.

Nonostante negli ultimi anni sia cresciuta l'attenzione nei confronti della prevenzione e del trattamento della sindrome sgombroide, la diagnosi di questa condizione rimane tutt'altro che agevole (Bücker et al., 2021). Un primo elemento critico riguarda l'identificazione degli alimenti consumati dal soggetto: non sempre il paziente è in grado di fornire informazioni accurate o complete, soprattutto quando presenta uno stato clinico compromesso o sintomatologia acuta che limita la raccolta anamnestica. Tale difficoltà può ostacolare la ricostruzione dell'esposizione a prodotti ittici potenzialmente alterati (Nair et al. 2015).

A ciò si aggiunge la necessità di differenziare la sindrome sgombroide da altre condizioni con manifestazioni cliniche sovrapponibili, in particolare dalle reazioni allergiche alimentari, che possono presentarsi con quadri simili. La sovrapposizione sintomatologica rende essenziale un'attenta valutazione clinica e anamnestica, al fine di orientare correttamente il percorso diagnostico ed evitare interpretazioni fuorvianti (FDA, 2018).

### ***2.3 Biosintesi di istamina***

L'istamina, insieme a molte altre molecole quali putrescina, spermidina, cadaverina, spermina, triptamina, fenilettilamina e tiramina, fa parte di una famiglia di sostanze chiamate "ammine biogene" (Onal, 2007). Con questa espressione si fa riferimento a prodotti azotati derivanti da un processo di decarbossilazione enzimatico di origine batterica che permette di convertire alcuni amminoacidi nelle rispettive ammine (Ucar & Özogul, 2024).

Le ammine biogene, infatti, si formano in modo naturale durante il progressivo deterioramento del pesce, diventando più abbondanti man mano che il prodotto perde freschezza (Arulkumar et al., 2021). Questo fenomeno è il risultato combinato di due processi: da un lato, gli enzimi endogeni presenti nei tessuti attivano la degradazione proteolitica (autolisi), liberando amminoacidi liberi; dall'altro, la proliferazione della microflora batterica utilizza tali amminoacidi come substrato per sintetizzare le ammine biogene (Özogul & Özogul, 2015). Alcune di queste, come putrescina e cadaverina, sono le principali responsabili del caratteristico odore sgradevole che i cibi sviluppano negli

stadi avanzati di conservazione. Di conseguenza, la quantità di ammine biogene aumenta proporzionalmente allo stato di non freschezza del pesce, rappresentando un indicatore indiretto della qualità e della corretta conservazione del prodotto (Mayo-Benn et al., 2023).

Sebbene le ammine biogene possano esercitare diversi effetti nocivi sulla salute, la loro presenza negli alimenti generalmente non suscita particolare preoccupazione, poiché è spesso associata a evidenti alterazioni organolettiche — come odore, sapore o consistenza — che scoraggiano naturalmente il consumo del prodotto (Ucar & Özogul, 2024). Tuttavia, il rischio associato alle ammine biogene aumenta considerevolmente quando esse sono presenti senza che il prodotto alimentare mostri segni percepibili di alterazione. In queste condizioni, il consumatore può ingerire un alimento che appare ancora fresco e idoneo al consumo, ma che in realtà contiene concentrazioni elevate di istamina, sufficienti a indurre la sindrome sgombroide. Questo fenomeno rende particolarmente insidiosa l'intossicazione da istamina, poiché l'assenza di alterazioni organolettiche impedisce di riconoscere visivamente o olfattivamente il pericolo, rendendo la prevenzione basata esclusivamente sulla freschezza percepita (Arulkumar et al., 2021). In generale, la flora microbica del pesce fresco riflette quella dell'ambiente acquatico con cui l'animale è venuto in contatto. Per questo motivo, le concentrazioni batteriche più elevate si riscontrano principalmente nelle parti anatomiche a diretto contatto con l'ambiente esterno, quali pelle, branchie e apparato gastroenterico. Tra i principali generi batterici presenti in queste sedi troviamo *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, e altri (Bjornsdottir-Butler et al. 2015).

Tuttavia, è importante sottolineare che solo una piccola percentuale di questi microrganismi è effettivamente in grado di produrre elevate quantità di istamina. Infatti, la formazione di questa ammina è attribuibile esclusivamente a batteri istidina-decarbossilasi positivi, ossia microrganismi che possiedono l'enzima necessario per convertire l'amminoacido istidina, naturalmente presente nei tessuti muscolari del pesce, in istamina (Laranjo et al., 2017). I principali batteri istaminogeni non costituiscono normalmente la flora endogena del pesce, ma tendono a contaminare i prodotti ittici nelle fasi successive alla cattura, ad esempio durante manipolazione, stoccaggio o

trasporto. Non è comunque escluso che acque inquinate possano fungere da veicolo per questi batteri sulla superficie dei pesci (Barghouthi et al., 2021).

Tra i microrganismi più rilevanti a questo proposito, quelli appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* rivestono un ruolo di particolare importanza. In particolare, due specie si distinguono come i più forti produttori di istamina: *Morganella morganii* e *Proteus mirabilis*. Altre specie enterobatteriche istaminogene degne di nota includono *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, nonché specie appartenenti ai generi *Citrobacter* e *Hafnia* (Visciano et al., 2020).

La produzione dell'enzima istidina-decarbossilasi, responsabile della conversione dell'amminoacido istidina in istamina, è regolata a livello genetico e trascrizionale. Il gene che codifica per questa decarbossilasi batterica viene attivato principalmente in risposta a segnali ambientali specifici, tra cui la disponibilità del substrato e le condizioni stressanti del microambiente (Smith et al., 2021).

Uno dei principali meccanismi di attivazione è la presenza di istidina libera nei tessuti muscolari del pesce. L'istidina funge da induttore molecolare, legandosi a specifici regolatori proteici (tipicamente repressori o attivatori) che controllano la trascrizione del gene della decarbossilasi. In assenza del substrato, il gene rimane inattivo o trascritto a livelli minimi; quando invece l'istidina è abbondante, il legame con il regolatore favorisce la trascrizione e quindi la sintesi dell'enzima (Lee et al., 2019).

Oltre alla disponibilità del substrato, la sintesi dell'enzima istidina-decarbossilasi da parte dei batteri richiede una congiuntura di fattori ambientali specifici, che non necessariamente coincidono con le condizioni ottimali per la proliferazione microbica (Kumar et al., 2020).

Tra questi, il pH del tessuto muscolare riveste un ruolo determinante, esercitando un'influenza sia sull'induzione della sintesi enzimatica sia sull'attività catalitica dell'enzima stesso (Zhou et al., 2018). È stato osservato che la produzione massima di istidina-decarbossilasi si manifesta a valori di pH acidi, intorno a 5, mentre al di sopra di 6,5 la sintesi non incrementa ulteriormente (Chen et al., 2016). Paradossalmente, in questo intervallo di pH, la crescita batterica risulta significativamente rallentata, suggerendo che la biosintesi dell'enzima costituisca una strategia adattativa dei

microrganismi in risposta a condizioni ambientali sfavorevoli, come l'acidità intrinseca dei tessuti post-mortem (Martinez et al., 2017).

Una volta sintetizzato, l'enzima richiede condizioni favorevoli per esprimere pienamente la propria attività. Nel muscolo dei pesci, caratterizzato da un pH intorno a 6,0, l'istidina-decarbossilasi può operare in maniera ottimale, catalizzando efficacemente la decarbossilazione dell'amminoacido istidina a istamina (Rodriguez-Romero et al., 2023). Questo meccanismo consente ai batteri di produrre istamina anche in assenza di una crescita batterica significativa, spiegando come la formazione di ammine biogene possa avvenire in maniera "silenziosa", senza manifestazioni organolettiche evidenti (Park et al., 2015).

Sebbene la maggior parte dei batteri istidina-decarbossilasi positivi appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* sia di natura mesofila, proliferando in un intervallo di temperature compreso tra 10 °C e 45 °C, con un ottimo di crescita intorno a 37 °C, l'enzima istidina-decarbossilasi presenta caratteristiche termiche distinte (Foster et al., 2017). L'attività catalitica dell'enzima raggiunge infatti il massimo a temperature intermedie, generalmente comprese tra 15 °C e 25 °C, e può rimanere efficacemente operativa anche a temperature di refrigerazione (0–4 °C) (Wang et al., 2016).

Tale discrepanza tra l'ottimo di crescita batterica e l'ottimo di attività enzimatica ha importanti implicazioni per la sicurezza alimentare. Anche quando la proliferazione microbica è significativamente rallentata dalle basse temperature, l'enzima già presente nei tessuti muscolari può continuare a catalizzare la conversione dell'L- istidina in istamina (Margareta et al., 2025). In altre parole, l'accumulo di istamina può proseguire in modo "silenzioso" durante lo stoccaggio a temperature refrigerate, rendendo la mera riduzione termica inefficace qualora l'enzima sia già stato sintetizzato durante un periodo di esposizione a temperature più elevate. Questo fenomeno chiarisce perché la semplice refrigerazione o congelamento successivi a un ritardo iniziale nella catena del freddo non siano sufficienti a garantire l'assenza di rischio di accumulo di istamina (Lee et al., 2019). Sebbene la presenza di batteri istidina-decarbossilasi positivi negli alimenti rappresenti un prerequisito fondamentale per la produzione di istamina, è altrettanto imprescindibile la disponibilità del substrato dell'enzima, ovvero l'amminoacido istidina (Smith et al.,

2021). Tale requisito spiega la predisposizione di alcune famiglie di pesci a indurre con maggiore frequenza la sindrome sgombroide nell'uomo. In particolare, l'elevato contenuto di istidina libera nei tessuti muscolari è tipico delle specie pelagiche migratorie appartenenti alla famiglia *Scombridae*, come gli sgombri e i tonni, da cui deriva l'etimologia stessa della sindrome (Barghouthi et al., 2021).

Altre famiglie ittiche considerate ad alto rischio di accumulo di istamina comprendono le *Clupeidae* (sardine, aringhe, alaccia, spratto), le *Engraulidae* (acciughe), le *Coryphaenidae* (lampuga), le Scomberesocidae (costardella) e le Pomatomidae (pesce serra) (Garcia et al., 2018). L'elevata concentrazione di istidina libera in queste specie è strettamente correlata alle notevoli distanze percorse durante la loro vita. Tale accumulo ha una funzione fisiologica: l'istidina, grazie alle sue proprietà tamponanti sul pH, contribuisce a proteggere i tessuti muscolari dall'accumulo improvviso di acido lattico derivante dal movimento continuo durante la migrazione, preservandone l'integrità biochimica (Yoon et al., 2018).

#### ***2.4 Fattori di rischio lungo la filiera***

Alla luce di quanto esposto, considerando che la filiera di produzione dei prodotti ittici è oggi frequentemente lunga e, in taluni casi, di portata internazionale, ogni singolo step della filiera produttiva risulta estremamente critico e richiede un'attenzione costante per garantire il corretto controllo e il mantenimento della catena del freddo (Martins et al., 2020).

Una fase particolarmente critica nella gestione della sicurezza dei prodotti ittici è rappresentata dalla cattura del pesce in mare, poiché anche le tecniche di pesca adottate possono influenzare significativamente la qualità della materia prima e, di conseguenza, la propensione alla formazione di istamina (García-Cazorla et al., 2021). In particolare, le tecniche di pesca che comportano traumatismi meccanici nel pesce — quali lesioni cutanee, ematomi o rotture dei tessuti superficiali — possono incrementare il rischio di accumulo di istamina, poiché tali danni creano accessi diretti per i microrganismi presenti sulla superficie, facilitandone l'invasione della muscolatura sottostante (Borges et al., 2019).

Una volta pescato, il prodotto può essere contaminato da batteri forti produttori di istamina, come le Enterobacteriaceae, che possono trasferirsi inevitabilmente sul pesce durante le operazioni di issaggio a bordo (Tanaka et al., 2018). Da ciò emerge chiaramente che una manipolazione accurata e rigorosamente igienica del pescato costituisce un requisito imprescindibile per il contenimento del rischio istaminico (Rodriguez et al., 2022). La corretta gestione delle fasi post-cattura dipende non solo dalle procedure operative e dalla competenza degli operatori, ma anche dalla qualità della strumentazione a bordo, che deve essere perfettamente funzionante, regolarmente mantenuta e conforme ai parametri imposti dalla normativa vigente in materia di sicurezza alimentare (López-Caballero et al., 2017).

Una volta a bordo, le due strategie principali per contenere efficacemente la formazione di istamina nel pesce appena catturato consistono, in primo luogo, nella riduzione delle fonti primarie di contaminazione batterica, attuata mediante pratiche di eviscerazione tempestiva, rimozione delle superfici danneggiate o contaminate e manipolazione rigorosamente igienica del prodotto, e, in secondo luogo, in un rapido abbattimento delle temperature di conservazione, misura cruciale per rallentare sia la proliferazione microbica sia l'attività dell'enzima istidina-decarbossilasi già presente nei tessuti muscolari (Figueiredo et al., 2021).

Oltre alle misure fondamentali già descritte, numerose ulteriori strategie possono contribuire in maniera significativa alla riduzione del rischio di formazione di istamina nei prodotti ittici. Tra queste, l'utilizzo di ghiaccio prodotto con acqua potabile e microbiologicamente controllata rappresenta un elemento cruciale, poiché consente di mantenere temperature prossime allo zero durante l'intero trasporto e stoccaggio a bordo (Silva et al., 2020). Il confezionamento in atmosfera modificata (MAP) o sottovuoto costituisce un ulteriore presidio, limitando l'ossigeno disponibile e rallentando la crescita dei batteri aerobi, con conseguente riduzione della sintesi enzimatica (Jiang et al., 2020). Particolare rilievo assume anche il controllo igienico delle attrezzature e delle superfici a contatto con il pescato, ottenuto mediante sanificazione periodica e l'impiego di materiali facilmente pulibili e disinfettabili (Nguyen et al., 2021). La gestione tempestiva e differenziata del pescato in base a specie e dimensioni consente di prevenire la

contaminazione crociata tra individui integri e pesci danneggiati o più suscettibili. Fondamentale risulta altresì la formazione del personale di bordo in relazione alle corrette procedure di manipolazione, igiene e gestione della catena del freddo, mentre il monitoraggio continuo della temperatura attraverso termometri o sistemi di registrazione digitale permette di verificare l'effettiva efficacia del raffreddamento lungo l'intera filiera (Fernandes et al., 2019).

È pertanto evidente come il mantenimento rigoroso della catena del freddo rivesta un'importanza cruciale lungo tutte le fasi della filiera dei prodotti ittici, a partire dalle operazioni post-cattura fino alla trasformazione e alla distribuzione. Sebbene la maggior parte dei microrganismi istaminogeni non sia in grado di proliferare a temperature prossime allo zero, numerose sono le fasi in cui il pesce può essere soggetto a abusi termici, anche di breve durata, durante il trasporto, la manipolazione o lo stoccaggio (Pereira et al., 2018). Questo aspetto assume un rilievo particolare se si considera che l'enzima istidina-decarbossilasi, una volta sintetizzato, conserva la propria attività anche a temperature di refrigerazione, sebbene con efficienza ridotta, e può quindi continuare a convertire l'istidina in istamina indipendentemente dall'accrescimento batterico (Martins et al., 2020). Ne consegue che il semplice ripristino delle condizioni ottimali di conservazione dopo un episodio di aumento termico non è sufficiente a prevenire la formazione di istamina, il che rende la prevenzione degli abusi termici un elemento imprescindibile nella gestione della sicurezza del prodotto (Borges et al., 2020).

In questo contesto, il trasporto del pescato fresco dall'imbarcazione verso gli stabilimenti di trasformazione o i punti vendita rappresenta una delle fasi più critiche per la conservazione della catena del freddo (Anusha Siddiqui et al., 2024). La complessità logistica e la molteplicità di passaggi necessari al trasferimento del prodotto aumentano significativamente il rischio di interruzioni della catena del freddo, con conseguente maggiore probabilità di contaminazione microbica e di produzione enzimatica di istamina ((Galluzzo & Cammilleri, 2022). Le condizioni operative durante il trasporto, come il tempo di permanenza, la qualità dei mezzi refrigerati, la gestione del carico e la distribuzione del ghiaccio o dei sistemi di refrigerazione, possono influenzare in maniera determinante la stabilità termica del prodotto (López-Caballero et al., 2017).

Oltre al rapido raffreddamento post-cattura e al monitoraggio costante della temperatura, numerose ulteriori strategie possono contribuire a mitigare il rischio di formazione di istamina. L'impiego di imballaggi isolanti ad alta efficienza termica, come cassette isoterme con pannelli in polistirene espanso o materiali compositi, riduce gli scambi termici con l'ambiente esterno, mentre l'uso combinato di ghiaccio secco o gel refrigeranti prolunga la capacità refrigerante, soprattutto durante trasporti di lunga durata o in ambienti caldi (Martins et al., 2021). L'ottimizzazione della logistica di carico, prevedendo una disposizione uniforme del pescato e garantendo la circolazione dell'aria fredda tra i contenitori, è fondamentale per evitare punti caldi che potrebbero favorire la crescita microbica o l'attività enzimatica (Pereira et al., 2018). Particolarmente utile è anche l'adozione di sistemi di tracciamento e registrazione digitale della temperatura, integrati con sensori remoti, che consentono di monitorare in tempo reale le condizioni del prodotto e intervenire tempestivamente in caso di anomalie (Figueiredo et al., 2021). Per i trasporti internazionali o di lunga durata, l'adozione di container refrigerati a controllo climatico dotati di sistemi di allarme e gestione automatica della temperatura e dell'umidità rappresenta una soluzione efficace per ridurre al minimo il rischio di interruzione della catena del freddo (Nguyen et al., 2021). Infine, la formazione del personale logistico e l'adozione di procedure operative standardizzate per il carico, il trasporto e lo scarico del prodotto costituiscono elementi imprescindibili, poiché anche le migliori tecnologie non garantiscono sicurezza se non correttamente utilizzate e supervisionate (Rodriguez et al., 2022).

Le fasi di produzione e trasformazione del pescato costituiscono momenti particolarmente critici per la sicurezza dei prodotti ittici e per la prevenzione dell'accumulo di istamina (Alves et al., 2022). Durante operazioni complesse quali eviscerazione, filettatura, confezionamento e stoccaggio, il prodotto può essere esposto a contaminazioni microbiche provenienti da attrezzature, superfici di lavoro, mani degli operatori o dall'ambiente circostante, aumentando significativamente il rischio di trasferimento di batteri istaminogeni (Costa et al., 2021). La manipolazione intensiva, tipica di molte linee di trasformazione, può inoltre determinare lesioni meccaniche nei tessuti muscolari, creando punti di ingresso per i microrganismi e facilitando la sintesi

dell'enzima istidina-decarbossilasi, il quale, una volta presente, conserva la capacità di convertire l'istidina in istamina anche a temperature di refrigerazione (Kim et al., 2020). Un ulteriore fattore critico è rappresentato dalle variazioni termiche locali che possono verificarsi lungo la linea produttiva, dovute a ritardi nel trasferimento del prodotto, al malfunzionamento dei sistemi di refrigerazione o all'errata gestione dei tempi di lavorazione (Wang et al., 2024). Tali oscillazioni termiche, anche di breve durata, possono innescare un'attività enzimatica significativa, indipendentemente dalla proliferazione batterica, generando accumuli di istamina che compromettono la sicurezza del prodotto (Santos et al., 2021). La fase di confezionamento, se non rigorosamente controllata, può comportare contaminazioni crociate tra lotti, aggravando ulteriormente il rischio (Martins et al., 2022). Se invece viene adottato un confezionamento in atmosfera modificata o sottovuoto, esso può costituire un efficace presidio di sicurezza, a condizione che le condizioni operative siano perfettamente rispettate e monitorate (Lima et al., 2020).

Di conseguenza, le fasi di produzione e trasformazione richiedono un approccio estremamente meticoloso e sistematico, che integri il controllo costante della temperatura, la sanificazione rigorosa di strumenti e superfici, la separazione dei lotti di prodotto in base allo stato di freschezza, e la formazione continua del personale sulle corrette pratiche igieniche e operative (Fernandes et al., 2020). L'implementazione di sistemi di monitoraggio digitale e allarmi termici consente di rilevare tempestivamente qualsiasi deviazione dai parametri ottimali e di intervenire immediatamente, riducendo al minimo la possibilità di accumulo di istamina (Costa et al., 2022).

Infine, il controllo del rischio legato all'accumulo di istamina non si limita alle fasi di produzione primaria o ai grandi stabilimenti di trasformazione, ma si estende anche ai punti vendita, che assumono un ruolo cruciale nella garanzia della sicurezza dei prodotti ittici (Alves et al., 2022). Tali strutture devono, da un lato, garantire una manipolazione dei prodotti freschi il più possibile igienica, e dall'altro assicurare che la conservazione e l'esposizione al pubblico avvengano nel rispetto rigoroso della catena del freddo (Santos et al., 2021). In particolare, il pesce fresco esposto in pescheria deve essere mantenuto a temperature prossime a quelle del ghiaccio fondente, generalmente tra 0 e 2 °C, mediante

l'impiego di ghiaccio in scaglie, che permette di stabilizzare la temperatura e ridurre la proliferazione microbica (Rodrigues et al., 2019).

Per i prodotti congelati o surgelati, è indispensabile preservare la catena del freddo fino al momento della vendita e, in caso di scongelamento, eseguirlo correttamente, preferibilmente in frigorifero a basse temperature (0-2 °C), evitando il contatto con i liquidi di scongelamento che potrebbero favorire contaminazioni o deterioramento. Qualora si renda necessario abbreviare i tempi, lo scongelamento può essere effettuato in acqua fredda, mediante immersione o sistemi a doccia, assicurando che il prodotto rimanga all'interno di involucri idonei e isolanti. Una volta completato lo scongelamento, è consigliabile consumare il prodotto entro 24 ore per minimizzare il rischio di accumulo di istamina (Kim et al., 2020).

Ulteriori accorgimenti utili per i rivenditori comprendono la rotazione continua del prodotto secondo il principio FIFO (First In, First Out) per ridurre i tempi di esposizione, la separazione dei lotti integri da quelli più suscettibili o prossimi alla scadenza, l'impiego di contenitori facilmente sanificabili e la pulizia costante delle superfici di esposizione e degli strumenti di lavoro (Martinez et al., 2023). È inoltre consigliabile il monitoraggio frequente della temperatura dei banchi di vendita e dei congelatori, mediante termometri digitali o sistemi automatizzati, con registrazione periodica dei dati per garantire la tracciabilità e la verifica della catena del freddo (Gomes et al., 2022). Particolare attenzione deve essere riservata anche alla corretta esposizione visiva del prodotto, evitando accumuli di ghiaccio fuso, ristagni di acqua o sovrapposizioni eccessive che possano compromettere la circolazione dell'aria fredda e l'omogeneità della temperatura (Almeida et al., 2021).

Tali procedure devono essere rigorosamente applicate anche a livello domestico, privilegiando lo scongelamento controllato in frigorifero prima della cottura e riducendo al minimo i tempi di permanenza a temperatura ambiente, al fine di preservare le caratteristiche organolettiche e microbiologiche ottimali e limitare il rischio di intossicazione sgombroide per il consumatore finale (Rodrigues et al., 2023).

## ***2.5. Aspetti normativi***

La facilità con cui l'istamina può accumularsi in taluni prodotti della pesca e la gravità dei sintomi che può indurre hanno spinto la Comunità Europea a adottare normative rigorose, a cui tutti gli operatori della filiera ittica devono conformarsi, al fine di garantire elevati standard di sicurezza e qualità degli alimenti commercializzati. In particolare, il Regolamento (CE) 853/04, che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale, impone agli operatori del settore ittico all'ingrosso di effettuare controlli sistematici sul contenuto di istamina dei prodotti, in modo da assicurare che non vengano superati valori limite stabiliti per la tutela della salute pubblica. La frequenza di tali controlli deve essere proporzionale al tipo di alimento e alla probabilità che l'istamina possa formarsi, secondo un approccio basato sul rischio.

I limiti massimi consentiti nei prodotti della pesca sono definiti dal Regolamento (CE) 1019/2013, che modifica l'allegato I del regolamento (CE) n. 2073/2005: qualora un controllo ufficiale evidenzia concentrazioni superiori a tali soglie, il prodotto deve essere immediatamente ritirato dal commercio e distrutto, in quanto potenzialmente pericoloso per il consumatore. Tuttavia, l'obbligo di controllo dell'istamina riguarda specificamente prodotti ottenuti da specie ittiche ad alto contenuto di istidina, in particolare appartenenti alle famiglie *Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryphaenidae*, *Pomatomidae* e *Scomberesocidae*. Per questi alimenti, analizzando nove campioni per lotto, il valore medio deve risultare inferiore a 100 mg/kg, con un massimo di due campioni consentiti tra 100 e 200 mg/kg e nessun campione superiore a 200 mg/kg.

Nei prodotti sottoposti a trattamenti di maturazione enzimatica in salamoia, come alcune semiconserve e conserve di pesce, i limiti consentiti raddoppiano fino a 400 mg/kg, riflettendo l'influenza della tecnica produttiva sulle caratteristiche organolettiche e sulla sicurezza alimentare. Tali processi, tradizionalmente impiegati per conservare, insaporire e arricchire il valore nutrizionale degli alimenti, prevedono l'uso di soluzioni saline che favoriscono una proteolisi enzimatica da parte di enzimi di origine gastrointestinale e muscolare, incrementando i livelli di istidina libera nei tessuti. La mancata gestione del microbiota, combinata con il contributo di microrganismi presenti nelle salamoie stesse,

può quindi determinare concentrazioni elevate di istamina nel prodotto finito, giustificando limiti più elevati per questa categoria di alimenti.

Risulta evidente come, per un efficace controllo del rischio istamina nei prodotti della pesca, sia imprescindibile la qualità igienica della materia prima e la sua corretta gestione sin dalle prime fasi di cattura e manipolazione, unitamente a un attento monitoraggio di tutte le variabili di processo durante produzione e trasformazione. Tali controlli devono essere formalizzati all'interno di sistemi di gestione della sicurezza alimentare, che ogni azienda è tenuta a implementare in maniera strutturata e documentata.

## Capitolo 3; definizione delle metodologie analitiche

### *3.1. Generalità sulla definizione della metodologia analitica*

Lo sviluppo di una metodica analitica per la determinazione dei contaminanti alimentari costituisce un processo altamente strutturato che richiede la conoscenza approfondita delle proprietà chimico-fisiche dell'analita target e della matrice di interesse (Zhang et al., 2022). La fase preliminare prevede la caratterizzazione del contaminante in termini di polarità, stabilità chimica e termica, pKa, coefficiente di ripartizione e potenziale presenza di interferenti strutturalmente correlati (Raffaelli et al., 2021). Tali informazioni orientano la selezione della strategia di estrazione più idonea — quali estrazione liquido-liquido, estrazione in fase solida (SPE), sistemi dispersivi come QuEChERS o approcci ibridi — con l'obiettivo di massimizzare il recupero dell'analita minimizzando l'effetto matrice e la co-estrazione di componenti indesiderati (Mol et al., 2020).

La definizione delle condizioni strumentali richiede l'individuazione della tecnica cromatografica più idonea, generalmente basata su sistemi HPLC/UHPLC o, per analiti sufficientemente volatili e termostabili, su cromatografia gas-cromatografica (GC), accoppiati a rivelatori ad elevata selettività quali spettrometria di massa in modalità tandem (MS/MS), rivelazione fluorimetrica o assorbimento UV-Vis (Hernández et al., 2021). Nel caso dei contaminanti alimentari, la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC -High Performance Liquid Chromatography) e la sua evoluzione UHPLC rappresentano le soluzioni più diffuse grazie all'elevata sensibilità, alla versatilità applicativa e alla capacità di separare molecole termolabili o non volatilizzabili (Stahl et al., 2023).

Il principio su cui si basa l'HPLC è quello della partizione differenziale tra due fasi: una fase mobile liquida e una fase stazionaria solida o adsorbente contenuta in una colonna cromatografica (Fanali et al., 2021). Quando il campione viene iniettato e trascinato dalla fase mobile attraverso la colonna, ogni analita interagisce con la fase stazionaria in funzione delle proprie caratteristiche chimico-fisiche, quali polarità, affinità adsorbente, carica o dimensione molecolare, determinando velocità di migrazione differenti (Poole,

2020). Le sostanze con minore affinità per la fase stazionaria eluiscono più rapidamente, mentre quelle con maggiore interazione richiedono tempi più lunghi, generando così una separazione netta dei componenti che consente la loro successiva rivelazione e quantificazione (Snyder et al., 2019). La separazione può essere condotta mediante eluizione isocratica, mantenendo costante la composizione della fase mobile per tutta la durata dell'analisi, oppure mediante eluizione a gradiente, in cui la polarità della fase mobile viene variata progressivamente per ottimizzare la risoluzione dei picchi (Harris, 2022).

Un sistema HPLC standard è costituito da diversi moduli fondamentali, ciascuno con un ruolo specifico nel percorso dell'analita. La pompa ad alta pressione garantisce alla fase mobile la spinta necessaria per attraversare la colonna mantenendo un flusso costante e privo di pulsazioni, consentendo l'impiego di particelle di fase stazionaria di piccole dimensioni e aumentando la risoluzione. Il sistema di iniezione, manuale o automatizzato tramite autoiniettore, consente l'introduzione precisa e riproducibile del campione nella fase mobile in flusso continuo. La colonna cromatografica rappresenta il cuore del sistema, contenendo la fase stazionaria che interagisce selettivamente con i diversi analiti e permette la loro separazione. Una volta eluiti, i componenti raggiungono il rivelatore, che misura proprietà fisiche o chimiche specifiche, come assorbimento UV-visibile, fluorescenza, indice di rifrazione o risposta di spettrometria di massa. Il segnale generato viene trasformato in un cromatogramma, in cui l'area dei picchi è proporzionale alla concentrazione dell'analita. L'intero processo è gestito da un sistema di acquisizione dati, che elabora i segnali, calcola i tempi di ritenzione, integra i picchi e consente archiviazione e analisi dei risultati. Componenti ausiliari, quali il degasser, il quale elimina gas disciolti nella fase mobile per prevenire la formazione di bolle, e il forno per colonna, che mantiene costante la temperatura della colonna evitando variazioni di viscosità della fase mobile, contribuiscono a garantire la riproducibilità e l'affidabilità dell'analisi (Rocco et al., 2023).

In relazione alla natura dell'analita, possono essere impiegate diverse modalità cromatografiche. La più utilizzata per composti moderatamente polari o non polari è la fase inversa, in cui la fase stazionaria è non polare (ad esempio C18) e la fase mobile

polare. Altre modalità comprendono la fase normale, con fase stazionaria polare e fase mobile non polare, lo scambio ionico, che separa in base alla carica elettrica, l'esclusione dimensionale, che discrimina in funzione della massa molecolare, e la cromatografia di affinità, basata su interazioni altamente specifiche tra ligandi e recettori, anticorpi-antigeni o enzimi-substrati.

La scelta della colonna cromatografica (chimica della fase stazionaria, lunghezza, diametro, granulometria), della fase mobile, del tipo di eluizione (isocratica o a gradiente) e dei parametri operativi (temperatura, flusso, pressione operativa) costituisce una fase critica nel garantire adeguata risoluzione e riproducibilità (Fanali et al., 2021).

Per ogni analita, la quantificazione accurata richiede la costruzione di curve di calibrazione mediante l'analisi di soluzioni standard a concentrazione nota, preparate in matrici appropriate o in solvente puro, a seconda della complessità della matrice campionaria. Tali curve consentono di correlare l'area integrata dei picchi cromatografici — ottenuta mediante software di elaborazione dati — con la concentrazione dell'analita, permettendo la determinazione quantitativa tramite regressione lineare o modelli di calibrazione più complessi qualora siano presenti effetti non lineari a basse o alte concentrazioni. La precisione del metodo è ulteriormente garantita dal monitoraggio dei tempi di ritenzione (retention times), parametri altamente riproducibili e caratteristici per ciascun composto, che permettono l'identificazione qualitativa dell'analita all'interno di matrici complesse e ne assicurano la distinzione da eventuali interferenti o composti coeluiti (Snyder et al., 2019).

La fase di validazione rappresenta un passaggio imprescindibile per garantire l'affidabilità del metodo analitico sviluppato, soprattutto nel contesto del controllo dei contaminanti alimentari, dove la pericolosità delle sostanze target e la stringenza delle normative richiedono livelli elevati di robustezza e tracciabilità. La validazione comprende la valutazione sistematica di parametri metrologici quali accuratezza, precisione, selettività, linearità, limite di rilevazione (LOD) e limite di quantificazione (LOQ). Particolare rilevanza assume anche il recupero dell'analita, spesso influenzato dalla matrice alimentare, e la quantificazione degli effetti matrice, tipici dei sistemi LC. Inoltre, la robustezza del metodo viene verificata introducendo piccole variazioni controllate nei

parametri sperimentali per valutarne la capacità di mantenere prestazioni costanti. L'applicazione di protocolli conformi alle linee guida internazionali (ISO 17025) assicura che il metodo validato risponda ai requisiti richiesti per l'impiego in ambito ufficiale, industriale o di ricerca, garantendo dati analitici affidabili e riproducibili (Rocco et al., 2023).

### ***3.2. Contesto operativo e generalità***

La definizione delle metodiche analitiche descritte qui di seguito fa riferimento all'attività di ricerca svolta nel contesto di un dottorato di ricerca industriale cofinanziato da Riconnexia srls che, in relazione ai propri obiettivi di ricerca e sviluppo rivolti alle aziende agroalimentari, ha stimolato la definizione e la validazione un modello operativo integrato per la determinazione di AFB, AFG, OTA e istamina all'interno di specifiche filiere alimentari, con l'obiettivo ultimo di contribuire allo sviluppo di un approccio metodologico strutturato, riproducibile e trasferibile per la valutazione e la gestione del rischio in ambito di sicurezza alimentare.

La prima fase di tale processo ha puntato alla definizione delle condizioni estrattive, cromatografiche e di rivelazione più idonee per la determinazione di AFB, AFG, OTA e istamina in matrici alimentari complesse. Lo sviluppo delle procedure analitiche ha preso avvio da una valutazione preliminare delle proprietà chimico-fisiche degli analiti (polarità, stabilità, comportamento in fase mobile, suscettibilità a degradazione, sensibilità ai parametri di pH) e dell'effetto delle matrici analizzate sul segnale strumentale. La complessità delle matrici, caratterizzata dalla presenza di componenti interferenti e da possibili fenomeni di soppressione/ potenziamento del segnale, ha reso necessaria una fase di ottimizzazione metodologica rigorosa.

Dunque, è stato condotto uno studio sistematico finalizzato all'ottimizzazione della procedura di estrazione, con particolare attenzione alla selezione dei solventi più idonei in funzione delle caratteristiche chimico-fisiche degli analiti, nonché alla scelta dei metodi di omogeneizzazione, filtrazione e purificazione. L'obiettivo era ottenere estratti

analiticamente rappresentativi e privi di eccessivi interferenti, idonei per l'analisi quantitativa mediante HPLC.

Sulla base di tali considerazioni preliminari, si è proceduto alla messa a punto del metodo strumentale mediante U-HPLC Shimadzu Nexera LC-40, utilizzando un sistema equipaggiato con unità di degasaggio DGU-405, pompa LC-40D, autosampler, forno colonna CTO-40C e rivelatore a fluorescenza RF-20A XS e rivelatore UV SPD-40. La disponibilità combinata dei rivelatori UV e FLD ha consentito di ottimizzare la sensibilità e la selettività in funzione dell'analita, mentre il controllo accurato della temperatura di colonna ha garantito una maggiore stabilità dei tempi di ritenzione e una migliore riproducibilità cromatografica.

L'ottimizzazione del metodo U-HPLC ha riguardato la selezione della colonna, la definizione della fase mobile (tamponi, solventi organici, pH e forza ionica) e la scelta del programma di eluizione, valutando configurazioni isocratiche e a gradiente. Sono stati esaminati differenti set di condizioni per massimizzare la separazione cromatografica, ridurre eventuali co-eluzioni e assicurare un'elevata linearità della risposta strumentale.

I metodi sviluppati sono stati successivamente sottoposti a validazione analitica secondo le linee guida internazionali, valutando parametri chiave quali ripetibilità, deviazione standard, recupero, limite di rilevabilità (LOD) e limite di quantificazione (LOQ). La ripetibilità è stata determinata mediante analisi replicate di campioni spiked, calcolando la deviazione standard relativa (RSD%) per verificare la coerenza dei risultati. Il recupero è stato stimato comparando le concentrazioni rilevate con quelle teoricamente presenti nei campioni fortificati, al fine di quantificare l'efficienza complessiva dell'estrazione e della purificazione. I limiti di rilevabilità e di quantificazione sono stati determinati in funzione del rapporto segnale/rumore, assicurando che il metodo fosse sufficientemente sensibile per rispettare i valori soglia previsti dalle normative europee e internazionali.

### ***3.3. Metodo analitico per Aflatossine B e G e OTA***

Il metodo di estrazione delle aflatossine dal campione è stato sviluppato sulla base di una procedura di estrazione in fase liquida, finalizzata alla solubilizzazione selettiva degli

analiti in un mezzo organico acquoso. Successivamente, l'estratto è stato sottoposto a un processo di purificazione mediante colonne di immunoaffinità (IAC), le quali consentono il riconoscimento altamente selettivo delle aflatossine e dell'OTA grazie all'interazione anticorpo-antigene. Tale passaggio permette la rimozione efficace delle interferenze matriciali e l'ottenimento di un eluato ad elevata purezza analitica, migliorando sensibilità e accuratezza nella fase di quantificazione.

L'eluato purificato è stato quindi analizzato mediante RF-HPLC, impiegando un sistema cromatografico configurato in eluizione isocratica, scelta che garantisce una stabilità ottimale dei tempi di ritenzione e una riproducibilità elevata della separazione. La rivelazione a fluorescenza (FLD), selezionata per la sua elevata sensibilità verso le aflatossine, è stata impostata con parametri ottimizzati per massimizzare il rapporto segnale/rumore e garantire una quantificazione affidabile anche a livelli prossimi ai limiti regolatori.

### 3.3.1. *Preparazione del campione*

Per la fase di estrazione sono stati prelevati 20 g  $\pm$ 0,1 g di campione, ai quali sono stati aggiunti 4 g di cloruro di sodio e 100 mL di una miscela metanolo/acqua (80:20, v/v). Il sistema è stato quindi sottoposto a omogeneizzazione mediante omogeneizzatore a immersione (Turrax) per 5 minuti, al fine di assicurare una completa disgregazione della matrice e una solubilizzazione efficiente degli analiti. L'estratto ottenuto è stato successivamente filtrato su carta tramite sistema a vuoto, con l'obiettivo di rimuovere la frazione solida più grossolana.

Un'aliquota di 15 mL del filtrato è stata diluita con 30 mL di tampone PBS (phosphate buffer saline), così da ridurre la percentuale alcolica a livelli compatibili con l'applicazione sulle colonne di immunoaffinità (IAC). Tale soluzione è stata ulteriormente filtrata su filtri in microfibra di vetro, garantendo l'eliminazione delle particelle solide residue e della componente lipidica, entrambe potenziali interferenti nella fase di purificazione.

La purificazione degli estratti è stata effettuata mediante colonne di immunoaffinità (IAC) montate su manifold dedicate, utilizzando separatamente colonne specifiche per

le aflatossine e per l'ocratossina A, in modo da garantire l'eliminazione selettiva dei contaminanti e la massima pulizia del campione prima della fase cromatografica. Le colonne sono state preliminarmente condizionate con 10 mL di PBS, in modo da stabilizzare la fase anticorpale. Nello specifico, il tampone PBS è stato preparato sciogliendo in 1 L di acqua di grado HPLC i seguenti sali: 8 g di cloruro di sodio, 0,2 g di cloruro di potassio, 1,16 g di idrogenofosfato bi-sodico e 0,2 g di diidrogenofosfato potassico. Successivamente, 15 mL del campione diluito sono stati caricati sulla colonna con una velocità controllata di circa una goccia al secondo, condizione necessaria per assicurare la massima efficienza di legame tra le aflatossine e gli anticorpi immobilizzati. Terminata la fase di ritenzione, la colonna è stata sottoposta a un doppio ciclo di lavaggio con 20 mL di PBS, mantenendo la medesima portata, al fine di eliminare completamente le interferenze non specifiche.

Terminata la fase di lavaggio, la colonna è stata asciugata a secco mediante pompa da vuoto collegata alla camera del manifold, per garantire la totale rimozione di residui acquosi. L'eluizione degli analiti dalle colonne di immunoaffinità è stata condotta con solventi specifici in grado di interrompere le interazioni anticorpo-antigene all'interno della matrice. Per le aflatossine, l'eluizione è avvenuta mediante 3 mL di metanolo, mentre per l'ocratossina A si è impiegata una soluzione di metanolo/acido acetico al 2%, garantendo il completo distacco e il recupero degli analiti legati, assicurando così estratti puliti e pronti per la successiva fase di separazione cromatografica HPLC.

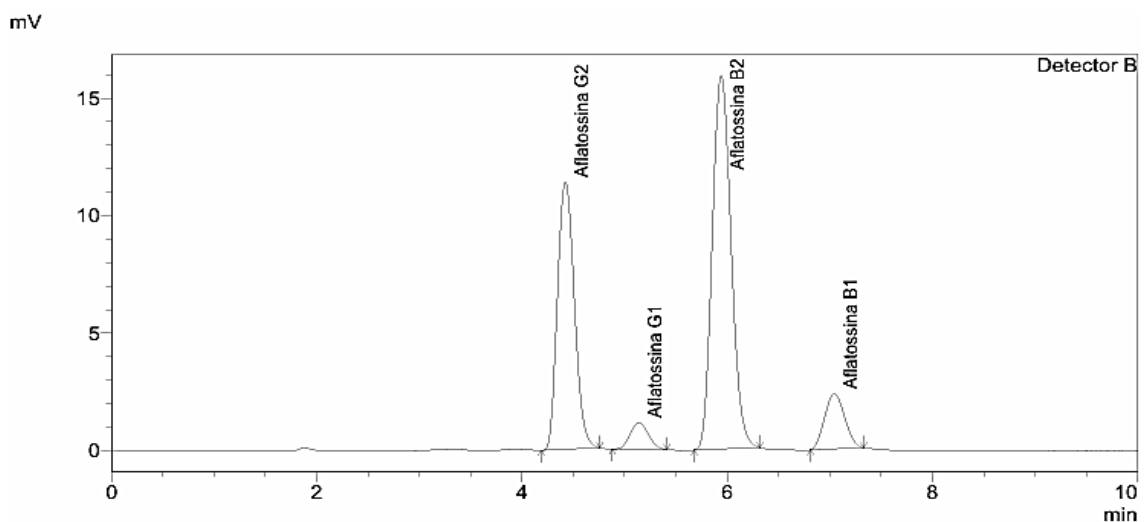
### 3.3.2. *Parametri HPLC*

La separazione cromatografica delle micotossine è stata eseguita utilizzando una colonna Kinetex C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm), scelta per la sua elevata efficienza e capacità di risoluzione nelle matrici complesse. Per quanto riguarda le aflatossine, è stata scelta una fase mobile costituita da una miscela acqua/metanolo/acetonitrile (6:3:1, v/v/v), selezionata per ottimizzare l'interazione analita-fase stazionaria e garantire una separazione ottimale. La portata della fase mobile è stata mantenuta a 1,0 mL/min, mentre la temperatura del forno colonna è stata controllata a 50 °C, con la cella del

rivelatore a fluorescenza stabilizzata a 25 °C, al fine di minimizzare le variazioni termiche che potrebbero compromettere la riproducibilità dei tempi di ritenzione.

Il volume di iniezione è stato fissato a 8 µL, ottimizzato per massimizzare il rapporto segnale/rumore senza compromettere la risoluzione cromatografica. La rivelazione delle aflatossine è stata effettuata mediante fluorescenza, con lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione rispettivamente pari a 365 nm e 455 nm, parametri selezionati per la massima sensibilità e specificità verso gli analiti target.

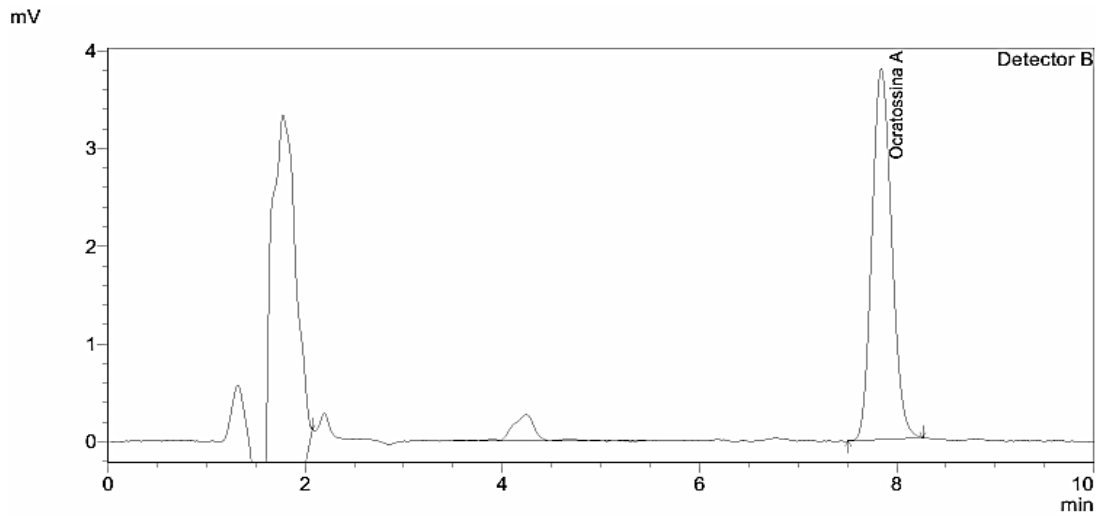
Sotto le condizioni operative adottate, l'ordine di eluizione osservato è stato G2 → G1 → B2 → B1, permettendo una separazione chiara e riproducibile degli analiti. Tale configurazione metodologica assicura un'elevata accuratezza e precisione nella quantificazione delle aflatossine anche in matrici alimentari complesse e ricche di interferenti.



**Fig.3.3.1.** Cromatogramma aflatossine in ordine di eluizione; AFG2, AFG1, AFB2, AFB1

Per l'OTA, la separazione cromatografica è stata eseguita in modalità isocratica con fase mobile metanolo/acido acetico 2%/acetonitrile (57:43, v/v), portata di 1,0 mL/min e temperature del forno colonna e della cella del rivelatore stabilizzate a 25 °C. Il volume di iniezione di 20 µL è stato scelto per garantire elevato rapporto segnale/rumore senza compromettere la risoluzione. La rivelazione è stata condotta mediante fluorescenza

(eccitazione 333 nm, emissione 450 nm), ottimizzata per la massima sensibilità e specificità dell'analita.



**Fig.3.3.2.** Cromatogramma Ocratossina A

### 3.3.3. Validazione

Per la quantificazione degli analiti, è stata costruita una retta di taratura correlando l'area integrata dei picchi cromatografici con la concentrazione delle soluzioni standard. La curva di calibrazione è stata realizzata su 7 punti, con concentrazioni crescenti pari a 0,03; 0,1; 1; 2; 2,5; 5 e 10 ppb. La valutazione della linearità ha evidenziato dei coefficienti di determinazione soddisfacente pari a  $R^2 = 0,998$  per AFG2,  $R^2 = 0,997$  per AFG1,  $R^2 = 0,998$  per AFB2,  $R^2 = 0,999$  per AFB1 e  $R^2 = 0,999$  per OTA, a conferma della validità della retta di calibrazione per la quantificazione accurata degli analiti nel range di interesse.

La conversione dei risultati cromatografici in microgrammi di micotossine per chilogrammo di campione (ppb;  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) è stata effettuata seguendo le modalità di calcolo descritte di seguito. In primo luogo, è stata determinata la massa del campione testato ( $m_t$ , in grammi) presente nella frazione del secondo filtrato (V4) eluita dalla colonna di immunoaffinità (IAC), utilizzando l'equazione (1):

$$m_t = m_o \times \frac{V_2 \times V_4}{V_1 \times V_3} \quad (1)$$

dove:

$m_0$  = massa del campione testato, in grammi

$V_1$  = il volume totale del primo filtrato, in ml ( $V_1 = 100$  ml);

$V_2$  = la frazione di volume del primo filtrato, in ml ( $V_2 = 15$  ml);

$V_3$  = il volume totale del secondo filtrato, in ml ( $V_3 = 45$  ml),

$V_4$  = la frazione di volume del secondo filtrato, in ml ( $V_4 = 15$  ml).

Infine, è stata calcolata la concentrazione di ogni aflatossina  $w_i$  in  $\mu\text{g/Kg}$  utilizzando l'equazione (2):

$$w_i = \frac{V_5 \times m_i}{V_6 \times m_t} \quad (2)$$

dove:

$V_5$  = il volume di eluato, in microlitri ( $V_5 = 3000$   $\mu\text{l}$ );

$V_6$  = il volume di eluato iniettato, in microlitri ( $V_6 = 8$   $\mu\text{l} / 20$   $\mu\text{l}$ );

$m_i$  = la massa di ogni aflatossina corrispondente all'area picco o all'altezza del picco lette dalla retta di taratura presente nel volume di iniezione, in ng;

$m_t$  = la massa del campione in grammi presente nella frazione del secondo filtrato utilizzato per la colonna di IA ( $V_4$ ) in accordo all'equazione 1.

La determinazione delle aflatossine totali è stata calcolata come somma delle concentrazioni delle singole aflatossine. Nei casi in cui le singole aflatossine risultassero al di sotto del limite di quantificazione (LOQ), il loro contributo è stato considerato pari a zero, in conformità a quanto previsto dal Regolamento (UE) 2023/2782.

La validazione del metodo è stata condotta mediante l'analisi in decuplicato di un materiale di riferimento a concentrazione nota, consentendo la valutazione dei principali parametri prestazionali. I risultati ottenuti sono riassunti nella tabella 1.

**Tabella 3.3.1.:** principali parametri prestazionali del metodo analitico per la determinazione quantitativa delle Aflatossine e dell'Ocratossina

Concentrazione spike 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$	AFG2	AFG1	AFB2	AFB1	AF TOT 4 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	OTA
<i>Media ppm</i>	0,817	0,805	0,996	0,937	3,555	0,842
<i>Scarto (<math>S_t</math>)</i>	0,077	0,071	0,068	0,086	0,1312	0,077
<i>Ripetibilità (<math>r</math>)</i>	0,246	0,227	0,216	0,283	0,4196	0,247
<i>Recupero (%)</i>	81,70	80,50	99,60	93,70	88,88	84,2

Per la definizione dei limiti del metodo, il limite di rilevabilità è stato stabilito al valore corrispondente al punto più basso della retta di taratura, pari a 0,03 ppb, rappresentativo della minima concentrazione rilevabile con affidabilità strumentale. Il limite di quantificazione è stato determinato considerando il fattore di diluizione applicato durante la preparazione (3) del campione, ottenendo così un valore pari a 0,1 ppb.

Questo approccio assicura che il metodo sia in grado di rilevare e quantificare le micotossine anche a concentrazioni molto basse, garantendo al contempo linearità della curva di calibrazione e conformità ai requisiti di accuratezza e precisione necessari per l'analisi di matrici complesse.

#### ***3.4. Metodo analitico per Istamina***

Il metodo analitico per la determinazione dell'istamina si basa su un'estrazione preliminare in metanolo acidificato con acido formico, scelta che garantisce un'efficace solubilizzazione dell'analita e stabilizza la molecola in condizioni acide. L'estratto ottenuto, dopo omogeneizzazione, centrifugazione e filtrazione, viene successivamente diluito nel tampone della fase mobile al fine di renderlo compatibile con le condizioni cromatografiche e ottimizzare la ritenzione in HPLC.

La fase mobile impiegata è costituita da un tampone fosfato contenente l'agente ion-pair sodio decansolfonato, mantenuto a pH 5,56. Tale valore è stato selezionato per assicurare

la completa e riproducibile protonazione dei due centri amminici dell'istamina, condizione essenziale per la formazione stabile del complesso ionico con l'agente di accoppiamento e per garantire un'adeguata interazione con la fase stazionaria C18. La rivelazione è condotta mediante assorbimento UV, selezionando la lunghezza d'onda ottimale per massimizzare la sensibilità nei confronti dell'ammina biogena.

Analogamente a quanto effettuato per le micotossine, il metodo è stato sottoposto a un processo di validazione completo, comprendente valutazioni di linearità, ripetibilità, accuratezza, limiti di rivelabilità e quantificazione.

#### 3.4.1. *Preparazione del campione*

L'estrazione dell'istamina dalla matrice alimentare è stata condotta prelevando  $10 \text{ g} \pm 0,1$  g di campione al quale si sono addizionati di 30 mL di una miscela metanolo/acido formico al 5%. La sospensione così ottenuta viene omogeneizzata ad alta velocità mediante Ultra-Turrax, fino alla completa disgregazione della matrice solida e alla massima solubilizzazione dell'analita.

Al termine dell'omogeneizzazione, il campione viene centrifugato a 10.000 rpm per 10 minuti a 4 °C, in modo da ottenere una netta separazione tra la fase liquida e il residuo solido. Il surnatante viene quindi sottoposto a filtrazione attraverso un imbuto in vetro equipaggiato con filtro in microfibra di vetro, raccogliendo il filtrato in una beuta conica. La soluzione filtrata deve presentarsi perfettamente limpida; in presenza di torbidità o particelle residue, il processo di filtrazione viene ripetuto fino al raggiungimento della chiarezza necessaria per l'analisi strumentale.

Per la determinazione cromatografica dell'istamina mediante HPLC a ion-pair, 200  $\mu\text{L}$  dell'estratto filtrato vengono diluiti in 800  $\mu\text{L}$  del tampone della fase mobile direttamente nella vial analitica. Questa diluizione è necessaria per adattare l'estratto alle condizioni operative del sistema cromatografico e garantire che la molecola sia nelle condizioni di protonazione adeguate per interagire correttamente con l'agente ion-pair.

Il tampone utilizzato è formulato per mantenere un pH di 5,56, valore che assicura la protonazione dei gruppi amminici dell'istamina e permette la formazione del complesso ionico con il sodio decansolfonato, fondamentale per ottenere una ritenzione efficace

sulla colonna C18. La soluzione tampone è preparata sciogliendo 2,72 g di diidrogeno fosfato potassico, 0,10 g idrogeno fosfato disodico e 0,92 g di sodio decansolfonato in un litro di acqua HPLC grade; successivamente, il pH viene regolato mediante l'aggiunta controllata di una soluzione di NaOH 0,2 M, fino al raggiungimento del valore previsto. La soluzione così ottenuta risulta adeguatamente stabilizzata e compatibile con le condizioni operative del sistema HPLC, potendo quindi essere iniettata senza ulteriori trattamenti.

### 3.4.2 Parametri HPLC

L'analisi cromatografica dell'istamina è stata eseguita mediante HPLC in modalità a gradiente, con un programma di eluizione della durata complessiva di 20 minuti.

La separazione cromatografica è stata eseguita utilizzando una colonna Kinetex C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm).

La fase mobile è costituita da una miscela ternaria composta da acetonitrile, metanolo e tampone ion-pair, la cui composizione varia secondo il seguente profilo temporale:

Tempo (min)	Acetonitrile (%)	Metanolo (%)	Tampone ion-pair (%)
0	14	6	80
1	12	8	80
9	19	6	75
14	19	6	75
17	14	6	80

Il flusso della fase mobile è stato mantenuto costante a 1,0 mL/min, mentre la temperatura del forno colonna e della cella del rivelatore sono state stabilizzate a 40 °C per garantire condizioni termiche controllate e una riproducibilità ottimale dei tempi di ritenzione.

Il volume di iniezione è stato fissato a 3 µL, al fine di massimizzare il rapporto segnale/rumore riducendo al minimo gli effetti di sovraccarico cromatografico. La

rivelazione è stata condotta mediante assorbimento UV a 210 nm, lunghezza d'onda selezionata per la sua elevata sensibilità nei confronti dell'istamina.

### 3.4.3. Validazione

La quantificazione dell'analita è stata effettuata mediante elaborazione di una curva di calibrazione esterna, ottenuta ponendo in relazione l'area integrata dei picchi cromatografici con la concentrazione delle rispettive soluzioni standard. A tal fine sono stati preparati 10 livelli di calibrazione, con concentrazioni progressive pari a 0,1; 0,5; 1; 2; 5; 7; 10; 20; 30 e 40 ppm.

L'analisi dei dati sperimentali ha permesso di generare una retta di taratura altamente lineare all'interno del range considerato. La verifica della linearità ha restituito, per l'OTA, un coefficiente di determinazione  $R^2 = 0,999$ , evidenziando un'eccellente correlazione tra risposta strumentale e concentrazione e confermando così l'affidabilità del modello calibrativo per la quantificazione degli analiti nel campo di concentrazione indagato.

La conversione dei risultati cromatografici in mg di Istamina per chilogrammo di campione (ppm; mg/kg) è stata effettuata seguendo le modalità di calcolo descritte di seguito.

$$C_I = \frac{C_c \times V_1 \times V_3}{m \times V_2}$$

dove:

m = massa del campione testato, in g

V1 = il volume totale del primo filtrato, in ml (V1 = 30 ml);

V2 = la frazione di volume del secondo filtrato, in ml (V2 = 0,2 ml);

V3 = il volume totale del campione da iniettare, in ml (V3 = 1 ml),

Cc = Concentrazione del cromatogramma in mg/l;

La validazione del metodo è stata condotta mediante l'analisi in decuplicato di un materiale di riferimento a concentrazione nota, consentendo la valutazione dei principali parametri prestazionali. I risultati ottenuti sono riassunti nella tabella 2.

**Tabella 3.4.1:** *parametri prestazionali metodologia analitica messa a punto per l'Istamina*

<b>Concentrazione spike 10 mg/kg</b>	<b>Istamina</b>
<i>Media ppm</i>	8,92
<i>Scarto (<math>S_t</math>)</i>	0,66
<i>Ripetibilità (<math>r</math>)</i>	2,12
<i>Recupero (%)</i>	89,24

Per la caratterizzazione dei limiti prestazionali del metodo, il limite di rilevabilità (LOD) è stato definito come la concentrazione corrispondente al punto più basso della retta di taratura, pari a 0,1 ppm, rappresentativa della minima quantità dell'analita rilevabile con affidabilità strumentale. Il limite di quantificazione (LOQ) è stato calcolato tenendo conto del fattore di diluizione applicato durante la preparazione del campione, pari a 15, ottenendo un valore finale di 1,5 ppm.

Tale approccio metodologico garantisce la capacità del sistema di rilevare e quantificare l'istamina anche a concentrazioni molto basse, assicurando al contempo linearità della curva di calibrazione, accuratezza e precisione, requisiti fondamentali per l'analisi di matrici alimentari complesse.

## **Capitolo 4: Aflatossine G e B e di Ocratossina A in specifici prodotti alimentari**

In questo capitolo viene riassunta l'attività di ricerca svolta grazie all'applicazione della metodologia analitica descritta precedentemente (3.3.) e che ha portato alla produzione di due articoli scientifici: il primo in corso di stampa su *Italian Journal of Food Safety* (*F. Spinola, S. Forgia, S. Mandarino, S. Marotta, L. Nalbone, F. Giarratana, A. Giuffrida, 2026. Presence of aflatoxins B and G and ochratoxin A in artisanal dried fruit ice cream produced in the province of Messina, Italy, IJFS, in press*); il secondo in valutazione per la stampa su *Food Control* (*FOODCONT-D-25-06355 – E. Di Salvo, G. Lo Vecchio, L. De Maria, R. Vadalà, R. Costa, R. De Pasquale, G. Tardiolo, R. Tardugno, F. Spinola, N. Cicero - under review - Aflatoxin B1 and Ochratoxin A in Commercial Plant-Based Meat Alternatives: Occurrence, Ingredient-Level Exploratory Patterns, and Dietary Risk*).

Si riporta, qui di seguito, una sintesi di entrambi.

### **4.1. Presenza di aflatossine G e B e di OTA in gelato artigianale.**

#### **4.1.1. Premessa**

Il gelato è uno degli alimenti più popolari al mondo, il cui mercato globale è cresciuto costantemente negli ultimi anni, passando da 57 miliardi di dollari nel 2017 a quasi 75 miliardi di dollari nel 2024 (Bedford, 2022; Nalbone et al., 2022). Secondo le analisi di mercato, il pistacchio è il gusto di gelato preferito dai consumatori, seguito dal cioccolato e dalla nocciola (Ansa.it, 2023). Ciò è in linea con l'aumento generale del consumo di frutta a guscio e dei relativi prodotti negli ultimi decenni, poiché questi alimenti sono noti per contenere numerosi composti in grado di promuovere la salute, tra cui macronutrienti, micronutrienti, composti bioattivi liposolubili, fibre e vitamine idrosolubili (Gervasi et al., 2021). A tal proposito, numerose evidenze scientifiche suggeriscono che l'assunzione regolare di frutta a guscio (20–30 g/giorno, secondo le raccomandazioni delle Linee guida alimentari basate sugli alimenti per frutta a guscio e semi) possa apportare diversi benefici per la salute (European Commission, 2024). In particolare, i pistacchi contengono almeno 15 micronutrienti essenziali, come riconosciuto dalla U.S. Food and Drug Administration (FDA), fornendo oltre il 10% del Valore Giornaliero Raccomandato (DRV) con una singola porzione (28,5 g) (FDA, 2016;

Mandalari et al., 2021). Nonostante queste qualità nutrizionali, è noto che il consumo di prodotti a base di frutta a guscio è generalmente associato alla potenziale assunzione di micotossine, sostanze nocive prodotte dal metabolismo di diverse muffe che contaminano frequentemente la frutta a guscio e producono tali tossine durante periodi di conservazione prolungata (Łozowicka et al., 2024).

Una recente opinione scientifica dell'EFSA sulla "**Valutazione del rischio delle aflatossine negli alimenti**" fornisce una comprensione più approfondita del ruolo della frutta a guscio come fonte di AFs (EFSA CONTAM, 2020). Essa evidenzia che le concentrazioni medie più elevate di AFB1 e AFT (la somma delle aflatossine di tipo B e G) si riscontrano nella categoria alimentare "legumi, frutta a guscio e semi oleosi" (in particolare pistacchi, arachidi e "altri semi"). Pertanto, è presumibile che anche i prodotti derivati, quali diversi tipi di dolci o gelati contenenti concentrazioni rilevanti di frutta a guscio, possano rappresentare una fonte importante di AFs.

Nonostante ciò, per quanto riguarda il gelato, non siamo a conoscenza di studi specifici sull'argomento, ad eccezione del caso delle aflatossine M, la cui presenza nel gelato è ampiamente investigata (EFSA CONTAM, 2020; Muaz et al., 2022). Per queste ragioni, il presente studio ha avuto l'obiettivo di valutare la presenza e la concentrazione delle AFs di tipo B, G e OT nel gelato artigianale al pistacchio e alla nocciola prodotto nella città di Messina, al fine di verificare se l'approvvigionamento di paste di pistacchio e nocciola, utilizzate per la lavorazione del gelato, possa rappresentare un punto critico per la produzione artigianale.

A tal riguardo, i limiti di micotossine nella frutta a guscio e nei prodotti da essa derivati sono rigorosamente regolamentati dal Reg. (UE) 2023/915 ed è improbabile l'utilizzo di prodotti non conformi nella produzione industriale di gelato, dove il controllo analitico delle materie prime è normalmente pianificato. La nostra ipotesi era invece la possibile distribuzione di paste di frutta a guscio non conformi verso i produttori artigianali, i quali potrebbero non essere in grado di verificare puntualmente tali parametri.

#### 4.1.2. Pianificazione della ricerca e principali risultati

Per la presente ricerca, sono stati raccolti 50 campioni di gelato artigianale al pistacchio (25) e alla nocciola (25) presso gelaterie della provincia di Messina. I campioni sono stati analizzati due volte, utilizzando la metodologia descritta nel capitolo 3 (3.3).

La percentuale di campioni di gelato al pistacchio risultati positivi ( $\geq$  LOQ = 0,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) è stata dell'84%. In particolare, la contaminazione da AF è stata rilevata in 18 campioni (72%), mentre l'OTA è stata riscontrata in 15 campioni (60%). Inoltre, 11 campioni (44%) hanno mostrato la presenza simultanea sia di AFs sia di OTA. Per il gelato alla nocciola, la percentuale di campioni positivi ( $\geq$  LOQ = 0,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) è stata del 64%. La contaminazione da AF è stata rilevata in 10 campioni (40%), mentre l'OTA è risultata presente in 12 campioni (48%). Inoltre, 5 campioni (20%) hanno mostrato la presenza simultanea di AFs e OTA. La Figura 1 mostra la percentuale di campioni positivi per ciascuna micotossina nei campioni di gelato al pistacchio (Figura 1a) e alla nocciola (Figura 1b). La Figura 2 mostra la distribuzione dei campioni per classi di concentrazione delle micotossine in ppb.

Considerando che il Regolamento (CE) 2023/915 stabilisce limiti di 8  $\mu\text{g}/\text{kg}$  per l'AFB1, 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  per le AF totali e 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  per l'OTA nei pistacchi e nei loro prodotti trasformati, e che per le nocciole e i loro prodotti trasformati i limiti sono 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  per AFB1 e OTA e 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  per le AF totali, tutti i campioni sono risultati conformi alla normativa attualmente in vigore. Tuttavia, secondo il Regolamento, tali limiti si applicano ai prodotti trasformati costituiti da almeno l'80% di frutta a guscio. Per i derivati in cui il contenuto di frutta a guscio è diluito al di sotto di tale percentuale, l'articolo 3 del Regolamento specifica che deve essere considerato il "fattore di diluizione". È noto che la percentuale di pasta pura di frutta a guscio utilizzata nella produzione artigianale del gelato è di circa il 10%. Pertanto, i nostri risultati potrebbero essere reinterpretati alla luce di questo fattore di diluizione. In particolare, considerando la Figura 2, la terza classe di concentrazione delle micotossine ( $> 0,8$  ppb, oppure  $> 0,5$  – per i campioni di nocciola – di AFB1;  $> 1$  ppb per le AF totali;  $> 0,5$  per l'OTA) rappresenta la percentuale di campioni non conformi ai limiti del Regolamento.

Al di là di questa considerazione, che non può essere ritenuta del tutto affidabile poiché il fattore di diluizione applicabile a ciascun campione analizzato è incerto, i nostri risultati ci portano a sospettare che nella produzione di gelato artigianale sia plausibile che, in una percentuale significativa di casi, venga utilizzata pasta pura non conforme ai limiti stabiliti dalla normativa dell'UE. Questi risultati integrano altre ricerche sulle caratteristiche igieniche del gelato (Nalbone et al., 2022) e sollevano importanti considerazioni in merito alla sicurezza alimentare del suo consumo.

Da quanto esposto si deduce che il controllo della concentrazione di micotossine nei prodotti presenti sul mercato può risultare piuttosto complesso, soprattutto all'interno dei canali di distribuzione di dimensioni ridotte. Tale problematica è particolarmente evidente nel settore del gelato artigianale, dove le materie prime utilizzate potrebbero non essere soggette alle stesse rigorose normative previste per la produzione industriale del gelato. Di conseguenza, il livello di controllo su questi ingredienti può variare in modo significativo, incidendo sulla qualità complessiva e sulla sicurezza del prodotto finale. I risultati di questo studio evidenziano che la conformità alla legislazione vigente in materia di materie prime, come le paste di frutta a guscio, è spesso inadeguata tra i piccoli produttori. Lo studio sottolinea la necessità di richiamare l'attenzione su tali criticità al fine di promuovere un rafforzamento delle misure regolatorie, sia nella fase di immissione sul mercato delle materie prime sia nei processi di autoregolamentazione adottati dai piccoli produttori. Affrontare queste problematiche è fondamentale per garantire l'integrità del prodotto e la sicurezza per il consumatore.

## ***4.2. Ricerca di Aflatossine G e B e di OTA in prodotti di origine vegetale alternativi alla carne***

### ***4.2.1. Premessa***

Nel corso dell'ultimo decennio, le alternative vegetali alla carne (plant-based meat alternatives, PBMA) e altri alimenti proteici di origine vegetale sono diventati sempre più integrati nelle diete dei consumatori. Questa transizione è spesso motivata da preoccupazioni etiche e legate al benessere animale, ma è anche guidata dai benefici percepiti per la salute umana e per la sostenibilità ambientale (Verain et al., 2024).

La diffusione dei modelli alimentari vegetariani e vegani varia in modo sostanziale tra i diversi Paesi e gruppi demografici, con una maggiore adozione riportata in diverse regioni ad alto reddito (Paslakis et al., 2020). I modelli alimentari orientati prevalentemente ai vegetali (plant-forward) enfatizzano tipicamente il consumo di verdure, legumi, cereali, cereali integrali, frutta e grassi insaturi, riducendo al contempo carne rossa e trasformata, pollame e prodotti ittici. Tali modelli sono stati associati, negli studi di popolazione, a benefici cardiometabolici e a un ridotto rischio di mortalità complessiva (Pavicich et al., 2025). Allo stesso tempo, una maggiore dipendenza da prodotti proteici di origine vegetale può modificare l'esposizione alimentare a determinati contaminanti chimici, incluse le micotossine.

Gli obiettivi di questo studio erano: (i) quantificare AFB1, AFB2, le aflatossine totali (TA) e l'OTA in una gamma di prodotti PBMA disponibili in commercio (ad es. burger, cotolette, straccetti); e (ii) stimare la potenziale esposizione dei consumatori in uno scenario di consumo a piena sostituzione. Particolare attenzione è stata rivolta ai prodotti commercializzati per consumatori vegetariani e vegani, che potrebbero non rientrare sempre in modo univoco nei limiti massimi specifici per le diverse categorie di prodotti previsti dalla legislazione europea sulle micotossine.

#### *4.2.2. Pianificazione della ricerca e principali risultati*

Trenta diversi prodotti PBMA sono stati acquistati presso punti vendita al dettaglio a Messina (Sicilia, Italia). Il campionamento ha rispecchiato l'effettiva disponibilità sugli scaffali; per la maggior parte dei formati era disponibile un solo prodotto commerciale al momento dell'acquisto. Di conseguenza, il set di dati cattura la diversità del mercato piuttosto che un disegno bilanciato con più marchi per ciascun formato. In particolare, per caratterizzare la presenza di micotossine e la potenziale esposizione alimentare derivante dai PBMA, trenta distinti prodotti PBMA disponibili in commercio sono stati analizzati in duplicato per AFB1, AFB2 e OTA utilizzando la metodologia descritta al capitolo 3 (3.3.). In questo set di dati, AFB1, AFB2 e OTA sono stati quantificati in modo consistente al di sopra del LOQ quando rilevati, mentre AFG1 e AFG2 non sono mai stati quantificati (ossia sono rimasti <LOQ) e pertanto non vengono ulteriormente discussi. Ai

fini della valutazione, le aflatossine totali (TA) sono state definite come la somma di AFB1 e AFB2. Le misurazioni replicate (R1, R2) per AFB1, AFB2, TA e OTA hanno mostrato un'elevata concordanza (Figura 1). I grafici di dispersione di R2 rispetto a R1 lungo la linea di identità a 45° non hanno indicato errori analitici grossolani né deviazioni proporzionali sistematiche; le coppie 0–0 sono state omesse dalla visualizzazione ma mantenute nei riepiloghi di controllo qualità (QC).

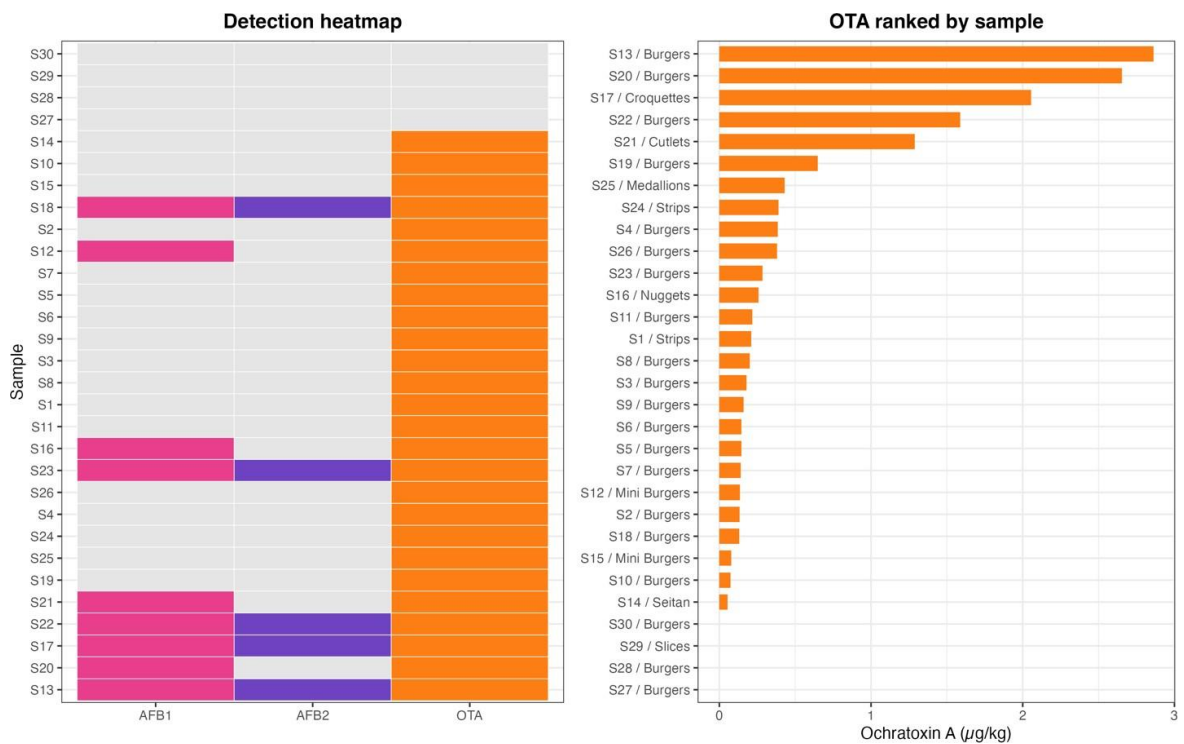
L'analisi di Bland–Altman (Figura 2) ha evidenziato piccoli bias medi: bias per AFB1  $\approx +0,00789 \mu\text{g}/\text{kg}$  con limiti di accordo (LoA) da  $-0,0138$  a  $+0,0296 \mu\text{g}/\text{kg}$ ; bias per AFB2  $\approx +0,01 \mu\text{g}/\text{kg}$  con LoA da  $+0,0069$  a  $+0,0131 \mu\text{g}/\text{kg}$ ; bias per le aflatossine totali (TA)  $\approx +0,0134 \mu\text{g}/\text{kg}$  con LoA da  $-0,00679$  a  $+0,0337 \mu\text{g}/\text{kg}$ .

Per l'OTA — valutata su una scala di differenza percentuale a causa dell'eteroschedasticità ai bassi livelli — il bias medio è risultato pari a  $+4,74\%$  con LoA compresi tra  $-13,8\%$  e  $+23,3\%$ . La maggior parte delle coppie è ricaduta all'interno dei LoA al 95%. La concentrazione per prodotto utilizzata nelle successive analisi di occorrenza, esposizione e rischio è stata la mediana di R1 e R2. Le coppie al di fuori dei LoA sono state segnalate per la revisione QC; nessuna misurazione è stata esclusa. La variabilità tra i prodotti riportata successivamente riflette pertanto differenze reali di mercato piuttosto che rumore analitico non controllato.

Sull'insieme dei 30 prodotti presenti sul mercato, le concentrazioni aggregate delle repliche (mediana di R1 e R2) si collocavano in intervalli da sub- $\mu\text{g}/\text{kg}$  a bassi  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . L'AFB1 è stata quantificata fino a  $\sim 0,98 \mu\text{g}/\text{kg}$ ; l'AFB2 fino a  $\sim 0,20 \mu\text{g}/\text{kg}$ ; le aflatossine totali (TA = AFB1 + AFB2) fino a  $\sim 1,19 \mu\text{g}/\text{kg}$ . L'OTA variava da non quantificata fino a  $\sim 2,9 \mu\text{g}/\text{kg}$ , con una distribuzione empirica asimmetrica a destra ( $p_{50} = 0,189 \mu\text{g}/\text{kg}$ ;  $p_{95} = 2,384 \mu\text{g}/\text{kg}$ ).

Le aflatossine sono risultate sporadicamente positive a bassi livelli (molti prodotti  $< \text{LOQ}$ ), mentre l'OTA è stata l'analita quantificato con maggiore frequenza. Nessun valore è stato rimosso come outlier statistico. I pattern generali sono stati riassunti mediante una heatmap di rilevazione e una rappresentazione dell'OTA ordinata per campione. In particolare, relativamente all'OTA, per la quale ci sono stati i risultati più significativi, si evidenzia la maggiore esposizione/rischio; pannelli ordinati per AFB1 e AFB2

aggiungerebbero poco rispetto alla mappa di rilevazione, dati i pochi valori positivi e gli intervalli compresi.



**Figura 4.2.2.1.. Heatmap di rilevazione e graduatoria dell'OTA nei PBMA.** A sinistra: heatmap di rilevazione per AFB1, AFB2 e OTA per campione (non rilevati in grigio); i campioni sono ordinati in base alla concentrazione decrescente di OTA (mediana delle iniezioni replicate R1 e R2). Le TA sono omesse poiché equivalgono a AFB1 + AFB2 e non aggiungono ulteriori informazioni di rilevazione. A destra: grafico a barre delle concentrazioni di OTA (µg/kg) per gli stessi campioni e nello stesso ordine. È mostrata esclusivamente la graduatoria dell'OTA poiché l'OTA ha evidenziato la più alta frequenza di rilevazione, il più ampio intervallo di concentrazione ed è il principale determinante del rischio; le rappresentazioni ordinate per AFB1 e AFB2 risulterebbero in gran parte ridondanti rispetto alla mappa di rilevazione.

L'analisi esplorativa a livello di ingredienti ha indicato che l'AFB1 tendeva a manifestarsi nelle matrici a base di legumi, mentre l'OTA tendeva a concentrarsi nelle matrici a base di cereali; tuttavia, concentrazioni più elevate sono emerse in diversi formati commercializzati (ad es. burger, cotolette, straccetti), suggerendo un'eterogeneità guidata dalla matrice degli ingredienti e dalla variabilità di fornitori/prodotti piuttosto che dal solo formato. Considerata la composizione di mercato non bilanciata del dataset (20 burger contro 10 altri formati), per l'OTA è stato considerato un confronto pragmatico "Burger vs Altri". Tra i campioni positivi all'OTA, le mediane erano 0,200 µg/kg nei Burger (n = 17) e 0,257 µg/kg negli Altri (n = 9); lo shift di Hodges–Lehmann è risultato

pari a  $-0,003 \mu\text{g}/\text{kg}$  (IC 95%  $-0,252$  a  $0,217$ ), con  $p$  di Wilcoxon =  $0,957$ ,  $\delta$  di Cliff =  $-0,020$  (trascurabile) e una dimensione dell'effetto in linguaggio comune  $\approx 0,49$ . La prevalenza di rilevazione è risultata simile (85% nei Burger, 90% negli Altri; test esatto di Fisher  $p = 1,000$ ) e, complessivamente, non sono state osservate differenze sostanziali tra i gruppi. In definitiva, sebbene i risultati ottenuti non possano definirsi allarmanti, non va dimenticato che la contaminazione da micotossine rimane una delle principali criticità globali per la sicurezza alimentare, considerando il suo contributo allo sviluppo del carcinoma epatocellulare e di altri esiti cronici per la salute (Bray et al., 2018; Huybrechts et al., 2024). Parallelamente, il passaggio verso modelli alimentari a base vegetale e la rapida espansione dei PBMA hanno introdotto nuove vie di esposizione, poiché questi prodotti fanno frequentemente affidamento su cereali, legumi, semi oleosi e ingredienti derivati che sono noti substrati per funghi micotossigeni (Augustin Mihalache et al., 2022, 2023; Pavicich et al., 2025). In questo contesto, il presente studio ha caratterizzato AFB1, AFB2, TA e OTA nei PBMA disponibili in commercio ed ha esplorato pattern a livello di ingredienti e il potenziale rischio alimentare in uno scenario di sostituzione completa. La ripetibilità analitica è stata verificata prima di interpretare i dati di occorrenza ed esposizione. I grafici di dispersione delle repliche e le analisi di Bland-Altman hanno mostrato piccoli bias medi e limiti di accordo ristretti rispetto agli intervalli di concentrazione osservati, con una dispersione intra-campione modesta per AFB1 e OTA e leggermente più elevata per AFB2 in prossimità del LOQ. Questi risultati supportano l'interpretazione secondo cui l'eterogeneità osservata tra i prodotti riflette una reale variabilità di mercato piuttosto che rumore analitico non controllato. Ciò è particolarmente rilevante per i PBMA, nei quali le formulazioni possono differire sostanzialmente in termini di miscela di ingredienti, processi produttivi e fornitori. Per quanto riguarda l'occorrenza, l'OTA ha chiaramente dominato sia in termini di frequenza di rilevazione sia di intervallo dinamico, mentre le aflatossine sono risultate sporadicamente positive a bassi livelli. Le concentrazioni di OTA hanno seguito una distribuzione asimmetrica a destra, con la maggior parte dei prodotti nell'intervallo sub- $\mu\text{g}/\text{kg}$  e un piccolo sottoinsieme che ha raggiunto valori nell'ordine dei bassi  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . La linea di riferimento a  $3 \mu\text{g}/\text{kg}$  utilizzata nella funzione di distribuzione cumulativa

empirica corrisponde al livello massimo per i prodotti cerealicoli trasformati stabilito dal Regolamento (UE) 2023/915 della Commissione del 25 aprile 2023 sui tenori massimi di alcuni contaminanti negli alimenti e che abroga il Regolamento (CE) n. 1881/2006 (Testo rilevante ai fini del SEE, 2023), ed è stata intenzionalmente inclusa come benchmark visivo piuttosto che come limite specifico di prodotto per i PBMA. Da una prospettiva regolatoria, ciò evidenzia che i PBMA dovrebbero essere interpretati alla luce delle categorie merceologiche sottostanti (ad es. ingredienti cerealicoli, concentrati di legumi) piuttosto che come un'unica classe di prodotto omogenea.

Le analisi esplorative a livello di ingredienti hanno suggerito un segnale di matrice coerente: l'AFB1 tendeva a manifestarsi nelle formulazioni a base di legumi, mentre l'OTA era più comune nei prodotti a base di cereali. Al contempo, campioni positivi all'OTA con concentrazioni più elevate risultavano distribuiti tra diversi formati commerciali (burger, cotolette, straccetti), e il confronto pre-specificato "burger vs altri" non ha evidenziato differenze sostanziali tra i gruppi (Figura S2). Questo pattern è coerente con evidenze centrate sulle materie prime che indicano i cereali come principali contributori all'esposizione a OTA nella dieta generale (Tabarani et al., 2023) e con l'unico studio italiano analogo disponibile su un dataset di PBMA, che ha mostrato come i profili di micotossine siano fortemente dipendenti dalla matrice (Augustin Mihalache et al., 2023). Complessivamente, i dati indicano che l'approvvigionamento degli ingredienti e la composizione della matrice, piuttosto che il formato del prodotto in sé, rappresentano i principali determinanti della contaminazione.

La caratterizzazione del rischio è stata inquadrata nell'approccio del Margine di Esposizione (MOE) dell'EFSA per i cancerogeni genotossici. Utilizzando valori di BMDL<sub>10</sub> pari a 0,4 µg/kg p.c./giorno per AFB1 e 14,5 µg/kg p.c./giorno per OTA (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM) et al., 2020; Panel et al., 2020), lo scenario di sostituzione completa ha prodotto EDIs medi che si traducono in MOE dell'ordine di 10<sup>3</sup> per entrambe le tossine, ben al di sotto del valore di riferimento 10 000 utilizzato dall'EFSA, con l'OTA come contributore predominante (Figura 5). Anche il MOET combinato per AFB1+OTA è risultato dello stesso ordine di grandezza, in linea con il quadro EFSA sull'esposizione combinata (EFSA Scientific Committee et al., 2019).

MOE nettamente inferiori a 10 000 sono generalmente interpretati come indicativi di una potenziale preoccupazione sanitaria per i cancerogeni reattivi con il DNA; in questo scenario modellistico, tale segnale è guidato da un numero limitato di prodotti maggiormente contaminati e dall'assunzione volutamente conservativa di una completa sostituzione della carne con PBMA. In contesti reali, una sostituzione parziale, la rotazione dei prodotti e la variabilità tra marchi sono verosimilmente destinate a ridurre l'esposizione media, ma lo scenario di limite superiore rimane informativo ai fini della definizione delle priorità nella gestione del rischio.

Al tempo stesso, è opportuno riconoscere alcune limitazioni. La dimensione del campione era modesta e rifletteva la disponibilità del mercato locale in un singolo momento temporale, senza copertura stagionale o longitudinale. I formati di prodotto erano sbilanciati (con una sovra-rappresentazione dei burger), limitando la potenza statistica nel rilevare differenze sottili tra categorie commerciali. La modellizzazione del rischio si è concentrata su AFB1 e OTA; altre micotossine regolamentate che possono co-occorrere nei PBMA sono rimaste al di fuori dell'ambito analitico e interpretativo, pur essendo rilevanti in valutazioni dietetiche più ampie (Di Salvo et al., 2025; Pavicich et al., 2025). Inoltre, lo scenario di sostituzione completa, sebbene utile come limite superiore conservativo, non cattura la variabilità individuale nel consumo di PBMA o nel peso corporeo e può sovrastimare l'esposizione tipica della popolazione.

Da un punto di vista operativo, i risultati supportano strategie di controllo focalizzate sulla matrice piuttosto che approcci basati sul formato di prodotto. Uno screening mirato delle materie prime, in particolare degli ingredienti cerealicoli per l'OTA e di quelli a base di legumi per l'AFB1, combinato con audit dei fornitori e controllo di processo, è verosimilmente più efficace rispetto a un'attenzione concentrata su specifiche categorie di PBMA come i burger. Il monitoraggio routinario di OTA e AFB1 lungo le filiere dei PBMA appare giustificato, soprattutto considerando il potenziale di esposizione cumulativa nei consumatori che adottano diete orientate ai vegetali o completamente plant-based (Ramos et al., 2024). In attesa dello sviluppo di soglie specifiche per i PBMA, MOE e MOET rimangono strumenti idonei a contestualizzare il rischio, mentre la conformità legale continua a essere determinata dai limiti massimi basati sulle materie

prime previsti dal Regolamento (UE) (Regolamento (UE) n. 2023/915 della Commissione sui tenori massimi di alcuni contaminanti negli alimenti. In questo contesto, il presente dataset fornisce evidenze iniziali, sensibili alla composizione degli ingredienti, che possono supportare il perfezionamento delle valutazioni del rischio e informare future discussioni sulle linee guida regolatorie per gli analoghi vegetali della carne.

## **5. Capitolo 5: studio dell'effetto del congelamento sulla cinetica di formazione dell'Istamina nel tonno**

In questo capitolo viene riassunta l'attività di ricerca svolta grazie all'applicazione della metodologia analitica descritta precedentemente al capitolo 3.4. e che ha portato alla realizzazione uno studio comunicato al CONGRESSO ANNUALE DELLA SOCIETA' ITALIANA SCIENZE VETERINARIE (S.I.S.V.E.T.) 2025 (*L. Nalbone, F. Giarratana, G. Ziino, F. Spinola, A. Di Natale, S. Forgia, A. Giuffrida. Histamine production in thawed Thunnus thynnus during refrigerated storage*) e del quale si riporta una descrizione qui di seguito.

### **5.1. Premessa**

Come più ampiamente riportato nel capitolo 2, il rispetto della catena del freddo quale proficua opzione di gestione del rischio inerente all'intossicazione da Istamina per il consumo di alcune specie ittiche, appare piuttosto rilevante. Questo vale in particolar modo per il tonno che, appunto, anche in relazione alla complessità delle operazioni di pesca e raffreddamento a bordo, oltre che nel corso della sua commercializzazione, si presta ad essere causa del problema in oggetto. In riferimento a tale considerazione, proprio per quanto attiene al consumo di tonno in diversi Paesi europei, un'importante via di approvvigionamento è rappresentata dai prodotti congelati che, appunto, consentono, sia nel caso dell'industria di trasformazione sia per il settore della distribuzione e ristorazione, una più comoda modalità di gestione della qualità e della sicurezza della materia prima, anche in relazione al "Pericolo Istamina". Tuttavia, considerata la possibile complessa gestione delle fasi di scongelamento, specialmente a livello di ristorazione, o, ancora, la possibilità che dopo lo scongelamento i HFB possano trovare migliori capacità di replicazione, in particolare a fronte di un prolungato stoccaggio, da ciò potrebbero scaturire nuove problematiche. Alla luce di tali presupposti, si è ritenuto interessante indagare su questo aspetto effettuando uno studio sulla produzione di istamina in campioni di tonno decongelati, nel corso dello stoccaggio refrigerato, rispetto a campioni controllo semplicemente refrigerati, caratterizzando

anche l'effetto del congelamento in *vitro* sui HFB isolati dai campioni di tonno presi in considerazione.

### **5.2. Pianificazione dello studio e principali risultati ottenuti**

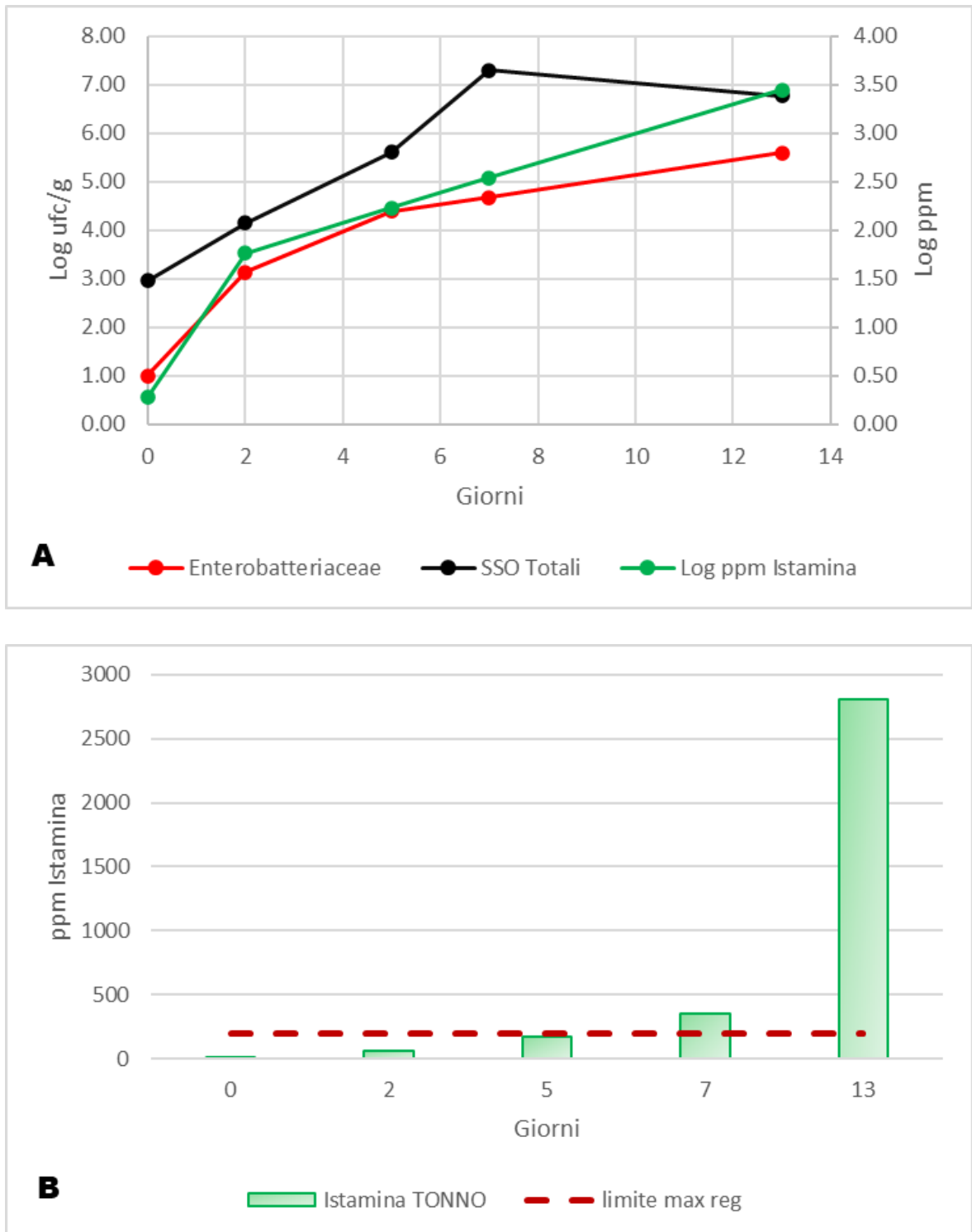
Nei mesi di giugno e luglio 2024, due tranci di tonno (Tr 1 e Tr2) del peso, rispettivamente, di ~3 kg e 5~kg, appartenenti alla specie *Thunnus thynnus*, pescato nella zona di pesca FAO 37 - Mediterraneo e Mar Nero (Sottozona 37.2 - Mediterraneo centrale, Divisione 37.2.2 - Mar Ionio), sono stati acquistati da un pescatore professionista della città di Messina, dopo poche ore dalla pesca, e trasferiti, sotto ghiaccio, al "Laboratorio di Ispezione degli Alimenti di Origine Animale del Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'Università di Messina (Messina, Italia). All'arrivo in laboratorio, il Tr1 è stato utilizzato solo per le prove di stoccaggio a refrigerazione, al fine di caratterizzare la flora microbica e, in funzione ai ceppi HFB, studiare la cinetica di produzione dell'Istamina. A tal riguardo, è stato suddiviso, mediante strumentario sterile, in fette da ~200g che venivano confezionate in buste plastiche sterili, sigillate e stoccate in termostato refrigerato alla temperatura di 7 °C, per l'intera durata della sperimentazione, in modo da mimare la temperatura media dei frigoriferi domestici (Vergara et al., 2014; Roccato et al., 2017). Nel caso del Tr2, si è operata una suddivisione dello stesso in due sub-campioni ("R" e "D"). Il primo ("R") è stato trattato analogamente al Tr1 mentre il secondo ("D"), dopo l'ottenimento delle fette, è stato sottoposto a congelamento rapido mediante abbattitore, raggiungendo la temperatura di -18°C a cuore del prodotto in 4 ore. Dopo 30 giorni di stoccaggio a -18°C, le fette appartenenti al sub-campione "D" sono state scongelate mediante mantenimento a +4°C x 24 ore, successivamente stoccate a +7°C analogamente a quanto effettuato per il Tr1 e per il sub-campione "R" del Tr2.

Le analisi su ogni fetta venivano condotte in triplice, previa omogeneizzazione della stessa mediante un omogeneizzatore da banco e prelievo di tre differenti aliquote. Le analisi riguardavano la determinazione del numero di *Enterobacteriaceae* e di Specific Spoilage Organisms (SSOs), oltre che la quantificazione dell'istamina e la determinazione

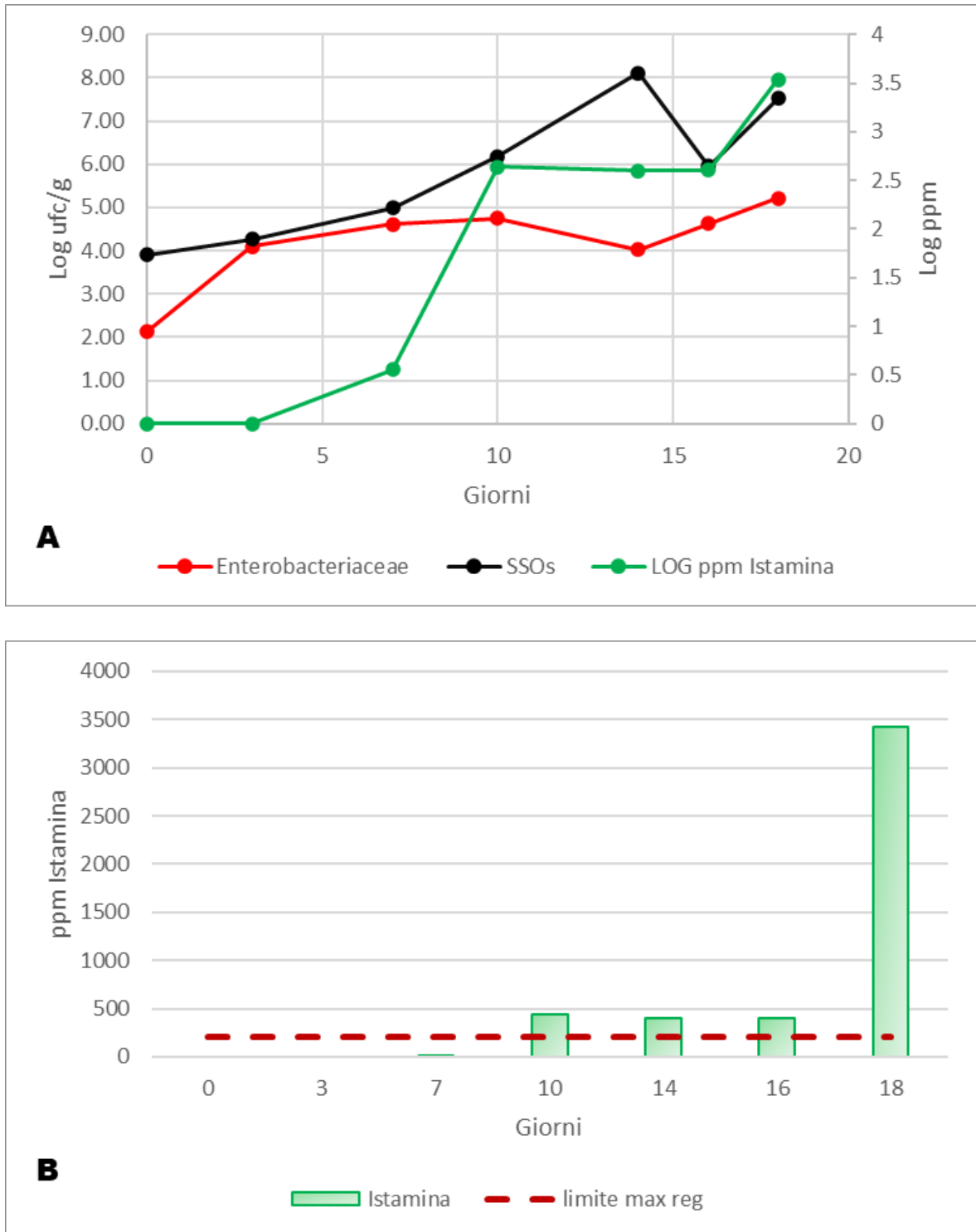
del pH. Le analisi sono state effettuate ad intervalli di tempo prestabiliti, processando allo stesso timepoint tutte le aliquote. N. 4 ceppi isolati identificati e che avevano mostrato attività istidino-decarbossilasica, secondo quanto indicato nel paragrafo 3.1.2., (*Klebsiella oxytoca*, *Morganella morganii*, *Proteus vulgaris* e *Pseudomonas putida*), venivano congelati a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  all'interno di Eppendorf in Brain Heart Infusion Broth (Biolife, Milano, Italia) con l'aggiunta del 15 % di glicerolo. Dopo 30 giorni di stoccaggio in tali condizioni, venivano scongelati a temperatura di refrigerazione e con l'ausilio di un'ansa sterile da 10  $\mu\text{l}$ , seminati su piastre di TSA e poste a temperatura di incubazione appropriata.

Le colonie isolate di ciascun ceppo venivano prelevate con un'ansa sterile da 10  $\mu\text{l}$  e trapiantate all'interno di tubi contenenti 10 mL di BHI che venivano posti overnight ad una temperatura ottimale di crescita fino al raggiungimento di una torbidità corrispondente a una concentrazione di  $\sim 10^8$  UFC/g. Le brodocolture così ottenute venivano diluite utilizzando del peptone salino fino ad una concentrazione di  $\sim 10^4$  UFC/g. Da qui si valutava nuovamente la capacità istidino-decarbossilasica del ceppo secondo quanto descritto nel punto precedente. Contestualmente, altri 100  $\mu\text{l}$  della brodocoltura venivano trasferiti in 9.9 ml di BHI (pH 6) e, nel caso in cui la valutazione dell'attività istidino-decarbossilasica avesse dato esito negativo, sottoposte a successivi trapianti nello stesso brodo di coltura fino alla ricomparsa della suddetta attività.

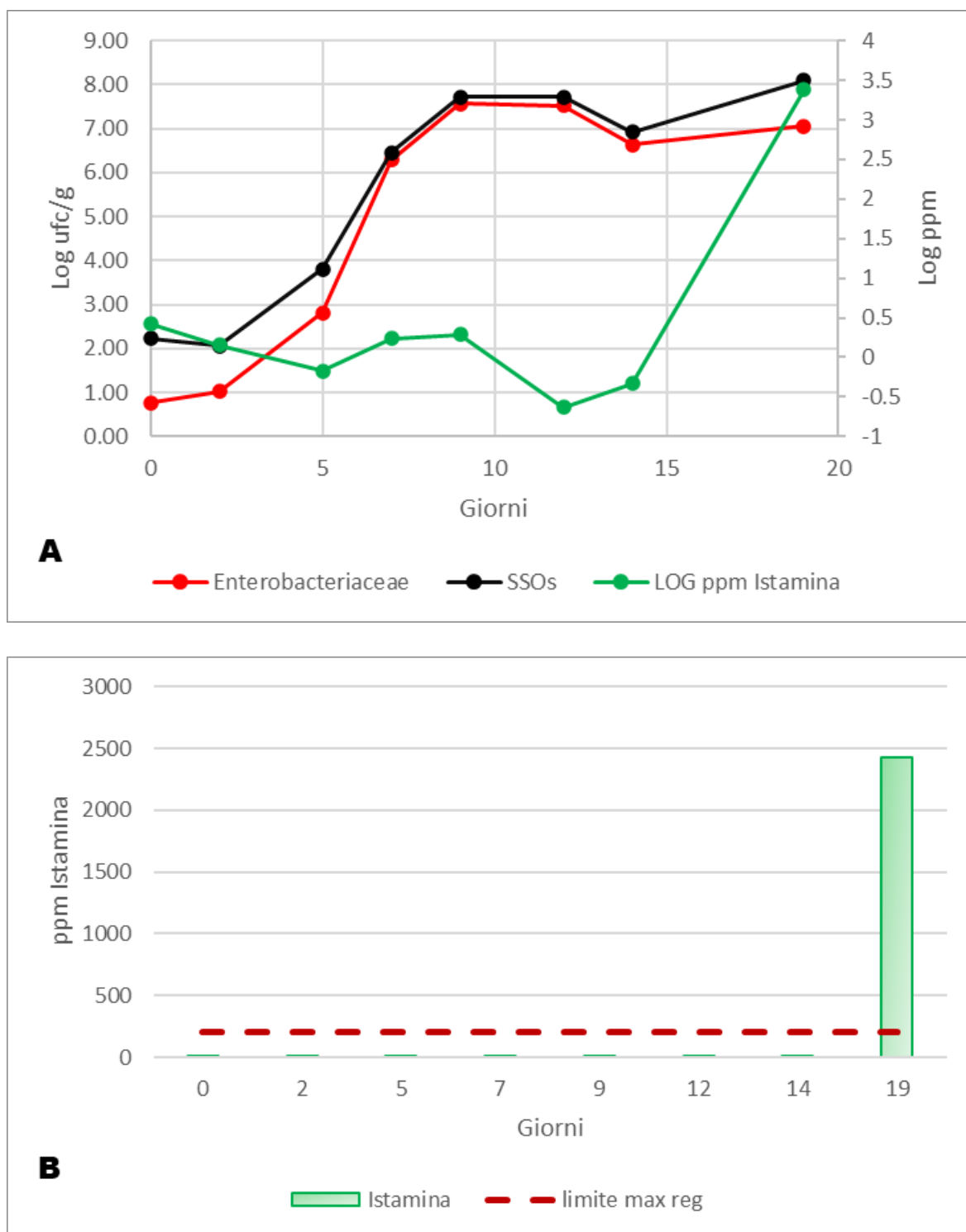
I risultati delle analisi microbiologiche e dell'istamina nei campioni di tonno fresco e in quelli scongelati sono mostrati nelle Figure 5.2.1, 5.2.2 e 5.2.3.



**Fig. 5.2.1.** Andamento dei parametri batteriologici saggiati e della concentrazione dell'Istamina in Log ppm (A) e ppm (B). (Tonno fresco – Tr1)



**Fig. 5.2.2.** Andamento dei parametri batteriologici saggiati e della concentrazione dell'Istamina in Log ppm (A) e ppm (B). (Tonno fresco – Tr2 – serie ‘R’)



**Fig. 5.2.3.** Andamento dei parametri batteriologici saggiati e della concentrazione dell'Istamina in Log ppm (A) e ppm (B). (Tonno decongelato – Tr2 – serie “D”)

In particolare, per i campioni del Tr1, si è evidenziato un incremento piuttosto rapido degli SSO fino a valori > Log 7 ufc/g già al settimo giorno, e degli Enterobatteri che, tuttavia, non hanno superato i Log 6 ufc/g. L'istamina ha raggiunto già al quinto giorno

concentrazioni di circa 200 ppm ed è incrementata notevolmente fino al 13 giorno superando i 2000 ppm.

Nei campioni della serie R del Tr2, la velocità di crescita degli SSO e soprattutto degli Enterobatteri è risultata inferiore e, analogamente, anche le concentrazioni di istamina hanno superato i 200 ppm solo a partire dal decimo giorno. Concentrazioni > 3000 ppm si sono poi osservate al diciottesimo giorno. Nei campioni congelati appartenenti allo stesso trancio (Tr2, serie D) l'incremento microbico è risultato più intenso ma la produzione di Istamina è stata decisamente rallentata dal momento che fino al quattordicesimo giorno si sono osservati valori < 10 ppm e solo al diciannovesimo giorno l'istamina ha raggiunto un picco notevole pari a 2424 ppm,

Per quanto riguarda le identificazioni microbiche, in sintesi, nel Tr1 i generi prevalenti sono stati *Enterobacter*, *Delftia*, *Leclercia*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *proteus* e *Morganella*; nel Tr2 R, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Sphingobacterium*, *Serratia*; nel Tr2 D, *Klebsiella*, *Citrobacter* e *Enterobacter*.

Il risultato delle prove in vitro sui ceppi selezionati, di cui al punto 3.2. sono riassunti nella Tabella 4.2.1. In sintesi, nessun ceppo saggiato produceva significative concentrazioni di Istamina dopo il congelamento di 30 gg e la rivivificazione in BHI overnight, a fronte dell'evidenziazione della normale crescita fino al raggiungimento della torbidità massima del brodo di coltura. Dopo 15 giorni di rivivificazione, solo *M. morganii* riprendeva la totale capacità di decarbossilazione dell'istidina producendo significative concentrazioni; questo comportamento, peraltro, veniva confermato anche a 19 e 45 giorni di distanza dalla fine del congelamento. Gli altri ceppi saggiati, invece, riacquisivano il loro status di HFB solo al quarantacinquesimo giorno di rivivificazione.

Tabella 4.2.1.;

Specie	Giorno			
	0	15	19	45
<i>K. oxytoca</i>	14,66 ± 0,35	6,36 ± 1,83	5,50 ± 0,44	3566,51 ± 61,90
<i>M. morganii</i>	12,70 ± 1,29	6412,45 ± 22,17	8846,41 ± 44,84	9067,31 ± 61,98
<i>P. vulgaris</i>	13,80 ± 1,62	13,08 ± 0,94	12,56 ± 0,43	3545,77 ± 48,54
<i>P. putida</i>	0,00 ± 0,00	11,52 ± 0,53	10,37 ± 0,42	5237,39 ± 84,43

I risultati ottenuti confermano, innanzitutto, l'elevata esposizione al rischio Istamina derivante dagli abusi termici che questa categoria di prodotto può subire, dal momento che a una temperatura di 7°C, già dopo 5 o 10 giorni (rispettivamente Tr 1 e Tr2), le concentrazioni di istamina superano i livelli massimi consentiti e risultano tali da determinare sicuramente la sindrome sgombroide. Le temperature di incubazione dei prodotti scelte nel presente studio rispecchiano, peraltro, le condizioni che mediamente si riscontrano nei frigoriferi domestici ma, anche, quelle che verosimilmente possono realizzarsi nel corso della distribuzione o della gestione a livello di ristorazione, specie se ci si riferisce alla vendita al dettaglio nelle piccole realtà. Infatti, il corretto impiego del ghiaccio e la possibilità di raggiungere  $T < 4^{\circ}\text{C}$  appare piuttosto frequente, considerata anche la dimensione di questi prodotti ittici, e comporta, di conseguenza, un'esposizione al rischio istamina piuttosto rilevante. Da sottolineare, inoltre, la differenza osservata tra i campioni del Tr 1 e del Tr2 e che, verosimilmente, è legata alle differenze qualitative della flora microbica tra i due gruppi di prodotto saggiati. In particolare, mentre nel Tr 1, una delle specie più rappresentative era la *M. morgani* che, notoriamente, è una specie fortemente istidino-decarbossilasi +, nel Tr 2 la composizione della flora microbica vedeva la prevalenza di altre specie che, pur essendo riconosciute come forti produttrici di Istamina, nello studio in oggetto hanno, evidentemente, espresso meno tale attività. Al di là di tali considerazioni che, comunque, confermano quanto già conosciuto sull'argomento e, in particolare, sulle più importanti opzioni di gestione del rischio, prima fra tutte, il rispetto della catena del freddo, il risultato più interessante appare quello inerente al congelamento. In particolare, sia nelle prove in situ che in vitro condotte sui prodotti o sulle colture congelate, appare particolarmente evidente l'inibizione dell'attività istidino-decarbossilasica che il processo di scongelamento provoca su tutte le specie microbiche saggiate. Nei campioni "D" del Tr 2 (Fig. 4.1.3.), infatti, anche a fronte di una crescita significativa di Enterobatteri e di SSO, non si osservava produzione significativa di istamina se non dopo 19 giorni, a fronte dei 10 gg osservati nel corrispettivo campione refrigerato (Fig. 4.1.2.). Le prove in vitro hanno

evidenziato ancora meglio questo effetto del congelamento anche in *M. morgani* che sul campione Tr1 aveva determinato il raggiungimento di concentrazioni significative di Istamina già dopo 5 gg. Questo stesso ceppo sembra, peraltro, capace di recuperare questa attività già dopo 15 giorni di rivivificazione mentre gli altri ceppi hanno recuperato la loro attività istidino-decarbossilasica solo dopo 45 gg.

Notoriamente (Ferrario et al., 2014) l'espressione del gene *hdc* nei batteri con elevata attività istidinodecarbossilante è modulata dalla concentrazione di istidina nel substrato e dal suo pH. Non sembra, invece, essere stato studiato l'effetto del congelamento che, stando a questa ricerca, potrebbe condizionare fortemente questa capacità rallentando la formazione dell'amina. Al di là delle speculazioni di ordine microbiologico, tale risultato ha un forte impatto sulla problematica in oggetto dal momento che l'approvvigionamento di Tonno congelato (soprattutto *Thunnus albacares* – Tonno a pinna gialla) rappresenta una delle vie preferenziali non solo per l'industria di trasformazione ma anche per il settore della ristorazione. Sarebbe, pertanto, ipotizzabile che tale fenomeno possa ridurre l'esposizione del consumatore al “pericolo Istamina” anche a fronte di moderati abusi termici che, verosimilmente, si realizzano in questo anello della catena distributiva.

Tali aspetti meritano, ovviamente, ulteriori approfondimenti dai quali potrebbero derivare importanti azioni di gestione del rischio per la problematica in oggetto, a tutela e salvaguardia del consumatore.

## **6. Conclusioni**

La presente tesi di dottorato si è inserita nel più ampio contesto della sicurezza alimentare, affrontando in modo integrato lo studio di contaminanti chimici di elevata rilevanza sanitaria, quali le aflatossine B e G, l'ocratossina A e l'istamina, lungo specifiche filiere alimentari. L'approccio adottato ha consentito di combinare un'analisi critica della letteratura scientifica con l'applicazione di metodologie analitiche validate e l'esecuzione di studi sperimentali mirati, fornendo un contributo alla comprensione di alcune delle dinamiche di contaminazione e dei fattori di rischio associati.

I risultati ottenuti confermano come le micotossine rappresentino ancora oggi un pericolo concreto e persistente per la salute pubblica, nonostante il consolidato quadro normativo europeo e l'adozione di sistemi di controllo sempre più sofisticati. Le indagini condotte su specifiche matrici alimentari, quali il gelato artigianale e i prodotti di origine vegetale alternativi alla carne, hanno evidenziato come anche filiere percepite dal consumatore come "sicure" o "innovative" possano costituire veicolo di contaminanti tossici, in particolare quando vengono impiegate materie prime ad alto rischio, quali cereali, frutta secca e derivati. Ciò sottolinea la necessità di estendere il monitoraggio delle micotossine a nuove categorie di alimenti, in linea con l'evoluzione dei modelli di consumo e con la crescente diffusione di prodotti plant-based.

Dal punto di vista metodologico, la definizione e la validazione delle procedure analitiche per la determinazione di aflatossine, ocratossina A e istamina hanno confermato l'importanza di disporre di metodi sensibili, specifici e conformi ai requisiti normativi europei. L'affidabilità delle tecniche HPLC impiegate ha permesso di ottenere dati robusti e riproducibili, evidenziando come la qualità del dato analitico rappresenti un elemento imprescindibile per una corretta valutazione del rischio e per il supporto alle decisioni delle autorità competenti.

Un contributo particolarmente significativo della tesi è rappresentato dallo studio sull'effetto del congelamento sulla cinetica di formazione dell'istamina nel tonno. I risultati sperimentali hanno dimostrato come il congelamento e il successivo scongelamento determinino una marcata inibizione temporanea dell'attività istidino-

decarbossilasica dei batteri produttori di istamina, con un ritardo significativo nella comparsa di concentrazioni tossiche rispetto ai campioni mantenuti esclusivamente in refrigerazione. Questo effetto, osservato sia in situ nei prodotti ittici sia in vitro sui ceppi batterici isolati, suggerisce che il congelamento possa rappresentare non solo una strategia logistica e commerciale, ma anche un potenziale strumento di mitigazione del rischio istamina lungo la filiera.

Tuttavia, i risultati ottenuti evidenziano anche come tale effetto non sia permanente: i ceppi batterici, in particolare *Morganella morganii*, sono in grado di recuperare progressivamente la piena attività istidino-decarbossilasica dopo periodi di rivivificazione più o meno lunghi. Ciò implica che, ovviamente, il congelamento non possa essere considerato una misura di sicurezza assoluta, ma piuttosto un fattore che contribuisce a ridurre temporaneamente il rischio, rendendo comunque imprescindibile il rispetto rigoroso della catena del freddo nelle fasi successive allo scongelamento. Ciò anche in considerazione del fatto che l'effetto evidenziato non è necessariamente ripetibile, probabilmente in relazione a vari fattori di espressione genica.

Nel complesso, le evidenze emerse rafforzano il concetto di gestione integrata del rischio alimentare, secondo il quale la prevenzione delle contaminazioni non può basarsi su un singolo intervento, ma deve derivare dalla combinazione di buone pratiche agricole, corrette condizioni di stoccaggio e trasporto, applicazione rigorosa dei sistemi HACCP e utilizzo di strumenti analitici adeguati. La variabilità osservata tra matrici, filiere e ceppi microbici sottolinea inoltre l'importanza di un approccio caso-specifico nella valutazione del rischio, evitando generalizzazioni che potrebbero condurre a sottostime del pericolo. Alla luce di quanto emerso, si ritiene che i risultati di questa tesi possano fornire un supporto scientifico utile sia per le autorità di controllo sia per gli operatori del settore alimentare, contribuendo all'ottimizzazione delle strategie di prevenzione e monitoraggio dei contaminanti studiati. In prospettiva futura, ulteriori approfondimenti dovrebbero essere indirizzati allo studio combinato di più contaminanti lungo la filiera, alla valutazione degli effetti sinergici sulla salute umana e all'analisi dell'impatto delle nuove tecnologie di conservazione sulla sicurezza alimentare. Tali sviluppi risultano

fondamentali per garantire un elevato livello di tutela del consumatore in un contesto agroalimentare in continua evoluzione.

## 6. Bibliografia

- [1] Abdel Hadi, A., & Omar, R. (1995). Regulation of aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus* species. *Journal of Applied Microbiology*, *78*(2), 123–134.
- [2] Adeniji, O. A., Adedeji, A. R., & Ezekiel, C. N. (2025). Aflatoxins: Occurrence, biosynthesis and health implications. *Food Safety and Risk*, *9*(1), 1–18.
- [3] Ahmad, T., Khan, S., & Rashid, U. (2025). *Aspergillus* species and aflatoxin production in food crops: A global perspective. *Toxins*, *17*(7), 326.
- [4] Ahmed, R. (2024). High performance liquid chromatography (HPLC): Principles, applications, versatility, efficiency, innovation and comparative analysis in modern analytical chemistry. *Clinical Investigation*, *14*(9).
- [5] Al Zaban, M. I. (2023). Impacts of temperature and water activity interactions on growth, aflatoxin B1 production and expression of major biosynthetic genes of AFB1 in *Aspergillus flavus* isolates. *Microorganisms*, *11*(5), 1199.
- [6] Albergamo, A., Rotondo, A., Salvo, A., Pellizzeri, V., Bua, D. G., Maggio, A., Cicero, N., & Dugo, G. (2017). Metabolite and mineral profiling of “Violetto di Niscemi” and “Spinoso di Menfi” globe artichokes by <sup>1</sup>H-NMR and ICP-MS. *Natural Product Research*, *31*(9), 990–999.
- [7] Allcroft, R., & Carnaghan, R. B. A. (1963). Groundnut toxicity: An examination for toxin in human foods and animal feeding stuffs. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *14*(8), 531–536.
- [8] Almeida, R., Costa, P., & Silva, L. (2021). Seafood display and storage practices to minimize histamine risk in retail. *Food Packaging and Shelf Life*, *28*, 100700.
- [9] Altafini, A., Roncada, P., Guerrini, A., Sonfack, G. M., Accurso, D., & Caprai, E. (2022). Development of histamine in fresh and canned tuna steaks stored under different experimental temperature conditions. *Foods*, *11*(24), 4034.
- [10] Alves, M., Ferreira, P., & Santos, L. (2022). Critical control points in seafood processing and retail: Prevention of histamine formation. *Food Control*, *135*, 108832.
- [11] Amaike, S., & Keller, N. P. (2011). *Aspergillus flavus*. *Annual Review of Phytopathology*, *49*, 107–133.

- [12] Anvari, S., Miller, J., Yeh, C. Y., & Davis, C. M. (2019). IgE-mediated food allergy. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*.
- [13] Aung, M. M., & Chang, Y. S. (2014). Traceability in a food supply chain: Safety and quality perspectives. *Food Control*, *39*, 172–184.
- [14] Banahene, J. C. M., Ofosu, I. W., Odai, B. T., et al. (2024). Ochratoxin A in food commodities: Occurrence, toxicity, and management strategies. *Heliyon*, *10*(20), e39313.
- [15] Bánáti, D. (2020). European food safety regulation and official controls. *Trends in Food Science & Technology*, *97*, 72–83.
- [16] Bandyopadhyay, R., Ortega-Beltran, A., & Atehnkeng, J. (2016). Biocontrol of aflatoxins in maize. *World Mycotoxin Journal*, *9*(5), 697–707.
- [17] Barghouthi, S., et al. (2021). Histamine formation in fish: Sources, environmental factors and control measures. *Foods*, *10*(5), 1020.
- [18] Battilani, P., et al. (2016). Aflatoxin contamination in maize related to agro-climatic factors. *World Mycotoxin Journal*, *9*(4), 519–534.
- [19] Bedford, E. (2022). Global ice cream market size 2013–2024. *International Journal of Food Science*.
- [20] Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, *57*(1), 289–300.
- [21] Bennett, J. W., & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, *16*(3), 497–516.
- [22] Bhat, R., Rai, R. V., & Karim, A. A. (2010). Mycotoxins in food and feed: Present status and future concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *9*(1), 57–81.
- [23] Biji, K. B., Ravishankar, C. N., Venkateswarlu, R., Mohan, C. O., & Gopal, T. K. (2016). Biogenic amines in seafood: A review. *Journal of Food Science and Technology*, *53*(5), 2210–2218.
- [24] Bischoff, S. C. (2020). *Mast cells and histamine in immune responses: From physiology to pathology*. *Frontiers in Immunology*, *11*, 1–15.

- [25] Bjornsdottir-Butler, K., Bencsath, F. A., McCarthy, S., & Benner, R. A. (2017). Heat resistance of histidine decarboxylase from gram-negative histamine-producing bacteria in seafood. *Journal of Food Protection*, *80*(8), 1341–1348.
- [26] Bland, J. M., & Altman, D. G. (1999). Measuring agreement in method comparison studies. *Statistical Methods in Medical Research*, *8*(2), 135–160.
- [27] Blount, W. P. (1961). Turkey “X” disease. *Veterinary Record*, *73*, 784–785.
- [28] Borges, A., Oliveira, R., & Martins, A. (2020). Prevention of histamine formation in fish through temperature control. *Food Control*, *112*, 107131.
- [29] B Borriello, F., Iannone, R., & Marone, G. (2017). *Histamine release from mast cells and basophils*. In Y. Hattori & R. Seifert (Eds.), *Histamine and histamine receptors in health and disease (Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 241, pp. 121–139). orriello, F., Iannone, R., & Marone, G. (2017). Histamine release from mast cells and basophils. In *Handbook of Experimental Pharmacology*.
- [30] Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *68*(6), 394–424.
- [31] Bücker, F., et al. (2021). Histamine and scombrottoxins: Their role in fish poisoning and detection methods. *Toxicon*, *201*, 115–126.
- [32] Buczkowska, M., Szczyrba, A., Szajnoga, D., Górski, M., Malinowska-Borowska, J., Domagalska, J., ... Rozentryt, P. (2024). The factors influencing the concentration of histamine in jarred baby foods containing fish, considering evaluation of daily histamine intake. *Journal of Food Protection*, *87*(9).
- [33] Buncic, S., Sofos, J. N., & Schmidt, G. (2020). Histamine formation in fish: Microbial mechanisms and risk factors. *Food Control*, *109*, 106942.
- [34] Cary, J. W., & Ehrlich, K. C. (2005). Aflatoxin biosynthesis gene clusters and flanking regions. *Journal of Applied Microbiology*, *99*(3), 518–527.
- [35] Cary, J. W., Ehrlich, K. C., Beltz, S. B., & Harris-Coward, P. (2020). A review on biosynthesis and genetic regulation of aflatoxin production by major *Aspergillus* fungi. *Oil Crop Science*, *5*(4), 166–173.

- [36] Cary, J. W., Ehrlich, K. C., Montalbano, B. G., & Bhatnagar, D. (2006). The genetics of aflatoxin biosynthesis. *Mycopathologia*, 162(5), 273–283.
- [37] Chędaśkiewicz, K., Kępką-Borkowska, K., Starzyński, R. R., Ogłuszka, M., Borkowski, M., Poławska, E., ... & Pareek, C. S. (2025). *Impact of aflatoxins on the digestive, immune, and nervous systems: The role of microbiota and probiotics in toxicity protection. International Journal of Molecular Sciences*, 26(17), 8258.
- [38] Chen, H., Li, J., & Zhang, Y. (2016). Influence of pH on histidine decarboxylase production in fish-associated bacteria. *Food Microbiology*, 58, 45–53.
- [39] Chen, H., Li, X., Zhang, Y., & Wang, J. (2022). Aflatoxin B1-induced intestinal epithelial damage and apoptosis mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*, 164, 112934.
- [40] Cheng, J., Li, X., & Zhang, Y. (2021). Factors influencing histamine accumulation in seafood during storage and processing. *Journal of Food Science*, 86(5), 1602–1612.
- [41] Chhaya, R. S., Nag, R., & Cummins, E. (2025). Human health risk from co-occurring mycotoxins in dairy: A feed-to-fork approach. *Food Control*, 168, 110954.
- [42] Chiara, F., Francesca, B., Blanca, D. L. R., Rosario, M. O., Giovanni, R., & Maria Grazia, F. (2014). Sequencing, characterization, and gene expression analysis of the histidine decarboxylase gene cluster of *Morganella morganii*. *Current Microbiology*, 68(3), 404–411.
- [43] Choudhary, K. G., Sharfuddin, C., & Kumar, A. (2025). Molecular and chemical based characterization of aflatoxin producing *Aspergillus* species obtained from stored grain samples. *Food Safety and Risk*, 12, 1.
- [44] Chung, S.-P. (2019). Scombroid fish poisoning and histamine food poisoning. *Journal of The Korean Society of Clinical Toxicology*, 1–6.
- [45] Ciprandi, G., Ridolo, E., & Canonica, G. W. (2022). *Histamine: Immunological and clinical aspects in allergy and inflammation*. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 63(1), 1–14.
- [46] Claeys, W. L., et al. (2010). Scombroid poisoning: A review. *Toxicon*, 56(2), 231–243.
- [47] Cliff, N. (1993). Dominance statistics: Ordinal analyses to answer ordinal questions. *Psychological Bulletin*, 114(3), 494–509.

- [48] Comas-Basté, O., Latorre-Moratalla, M. L., Bernacchia, R., Veciana-Nogués, M. T., & Vidal-Carou, M. C. (2017). New approach for the diagnosis of histamine intolerance based on the determination of histamine and methylhistamine in urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 145, 379–385.
- [49] Comas-Basté, O., Sánchez-Pérez, S., Veciana-Nogués, M. T., Latorre-Moratalla, M., & Vidal-Carou, M. d. C. (2020). Histamine intolerance: The current state of the art. *Biomolecules*, 10(8), 1181.
- [50] Commission Regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. (2006). *Official Journal of the European Union*, L70.
- [51] Commission Regulation (EU) 2023/915 of 25 April 2023 on maximum levels for certain contaminants in food and repealing Regulation (EC) No 1881/2006. (2023). *Official Journal of the European Union*, L119.
- [52] Costa, R., Oliveira, D., & Lima, F. (2021). Microbial contamination risks during fish processing and handling. *International Journal of Food Microbiology*, 345, 109184.
- [53] Costa, R., Santos, L., & Ferreira, P. (2022). Digital monitoring and alarm systems for cold chain control in seafood. *Food Research International*, 153, 111051.
- [54] Crobu, L., Mudadu, A. G., Melillo, R., Pais, G. L., & Meloni, D. (2021). Qualitative determination of histamine in canned yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) marketed in Sardinia (Italy) by rapid screening methods. *Italian Journal of Food Safety*, 10(2), 9379.
- [55] Da Silva, G. J., & Domingues, S. (2017). Food safety: The challenge of globalisation. *Journal of Advanced Research in Food Science and Nutrition*, 1(1), 23–34.
- [56] Daniel Lance Nevado, S., Delos Santos, G. B., Jimson Deyta, E., Fortaleza, J. A., & De Jesus, R. (2023). Detection, identification, and inactivation of histamine-forming bacteria in seafood: A mini-review. *Journal of Food Protection*, 86(3).
- [57] Daniells, A. C., Munkvold, G. P., & Wicklow, D. T. (2008). Effect of water activity and CO<sub>2</sub> level on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production in high-

- moisture maize post-harvest. *International Journal of Food Microbiology*, 122(1–2), 109–113.
- [58] Dantigny, P., et al. (2025). Environmental factors influencing mycotoxin production in food commodities: Temperature, pH, and water activity. *Food Microbiology*, 108, 104224.
- [59] Dhakal, A., Hashmi, M. F., & Sbar, E. (2025). *Aflatoxin toxicity*, StatPearls, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557781/>
- [60] Di Salvo, E., Bartolomeo, G., Vadalà, R., Costa, R., & Cicero, N. (2025). Mycotoxins in ready-to-eat foods: Regulatory challenges and modern detection methods. *Toxics*, 13(6), 485.
- [61] Di Stefano, V., Avellone, G., Pitonzo, R., Capocchiano, V. G., Mazza, A., Cicero, N., & Dugo, G. (2015). Natural co-occurrence of ochratoxin A, ochratoxin B, and aflatoxins in Sicilian red wines. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 32(8), 1343–1351.
- [62] Dohnal, V., Wu, Q., & Kuča, K. (2014). Metabolism of aflatoxins: Key enzymes and interindividual as well as interspecies differences. *Archives of Toxicology*, 88(9), 1635–1644.
- [63] Dugas-Bourdages, G., Rousseau, S., & Barrette, D. (2022). *Histamine H4 receptor in immune regulation and allergy*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1456.
- [64] Durante, G. V. (2017). Metabolismo e meccanismo d'azione dell'istamina. *Scienzintasca.it*.
- [65] EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). (2011). *Scientific opinion on risk-based control of biogenic amine formation in fermented foods*. *EFSA Journal*, 9(10), 2393
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). (2011). Scientific opinion on risk-based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal*.
- [66] EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), Schrenk, D., Bodin, L., Chipman, J. K., del Mazo, J., Grasl-Kraupp, B., ... Bignami, M. (2020). Risk assessment of ochratoxin A in food. *EFSA Journal*, 18(5), e06113.

- [67] EFSA Scientific Committee, More, S. J., Bampidis, V., Benford, D., Bennekou, S. H., Bragard, C., ... Hogstrand, C. (2019). Guidance on harmonised methodologies for human health, animal health and ecological risk assessment of combined exposure to multiple chemicals. *EFSA Journal*, 17(3), e05634.
- [68] EFSA Scientific Committee. (2011). Scientific opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment. *EFSA Journal*, 9(9), 2379. Committee, E. S. (2011). Scientific opinion. *Work*, 28, 29.
- [69] EFSA. (2015). Scientific and technical assistance on the evaluation of the temperature to be applied to pre-packed fishery products at retail level, 13(7), 4162.
- [70] EFSA. (2018). Principles and methods for risk assessment of chemicals in food. *EFSA Journal*, 16(6), e05334.
- [71] EFSA. (2020). Risk assessment of ochratoxin A in food. *EFSA Journal*, 18(5), e06113.
- [72] EFSA. (2020). Scientific opinion on the risks for animal and public health related to the presence of aflatoxins in food and feed. *EFSA Journal*, 18(3), e06065.
- [73] EFSA. (2023). Scientific opinion on the risk posed by aflatoxins and ochratoxin A in food and feed. *EFSA Journal*, 21(3), 7834.
- [74] Ehrlich, K. C., & Cotty, P. J. (2005). Conservation and evolution of aflatoxin biosynthesis gene clusters among *Aspergillus* species. *Journal of Applied Microbiology*, 99(3), 518–527.
- [75] El Desouky, T. A. (2025). Mitigating aflatoxin contamination in grains: Importance of postharvest management practices. *Advances in Biotechnology & Microbiology*, 18(4), 555995.
- [76] El Khoury, A., & Atoui, A. (2010). Ochratoxin A: General overview and actual molecular status. *Toxins*, 2(4), 461–493.
- [77] El-Sayed, R. A., Jebur, A. B., Kang, W., & El-Demerdash, F. M. (2022). An overview on the major mycotoxins in food products: Characteristics, toxicity, and analysis. *Journal of Future Foods*, 2, 91–102.
- [78] Emborg, J., & Dalgaard, P. (2005). Formation of histamine and biogenic amines in cold-smoked tuna: An investigation of psychrotolerant bacteria from samples implicated in cases of histamine fish poisoning, 69(4), 897–906.

- [79] Emborg, J., & Dalgaard, P. (2006). *Morganella psychrotolerans* sp. nov., a histamine-producing bacterium isolated from various seafoods. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.
- [80] Eskola, M., et al. (2020). Worldwide contamination of food commodities with mycotoxins: Occurrence and health risks. *Food Control*, 113, 107192.
- [81] European Commission. (2002). Regulation (EC) No 178/2002. *Official Journal of the European Communities*.
- [82] European Commission. (2004a). Regulation (EC) No 852/2004 on the hygiene of foodstuffs. *Official Journal of the European Communities*.
- [83] European Commission. (2004b). Regulation (EC) No 853/2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin. *Official Journal of the European Communities*.
- [84] European Commission. (2017). Regulation (EU) 2017/625 on official controls. *Official Journal of the European Union*.
- [85] European Commission. (2023). Regulation of the European Commission of 25 April 2023 on maximum levels for certain contaminants in food and repealing Regulation (EC) No 1881/2006, 2023/915/CE. *Official Journal, L119, 05/05/2023*.
- [86] European Commission. (2023a). Regulation (EU) 2023/915. *Official Journal of the European Union*.
- [87] European Commission. (2023b). Implementing Regulation (EU) 2023/2782. *Official Journal of the European Union*.
- [88] European Commission. (2024). Food-based dietary guidelines recommendations for nuts and seeds. *Knowledge4Policy*.
- [89] Evidence that histamine is the causative toxin of scombroid fish poisoning. (1991),. *New England Journal of Medicine*, 325(7), 515–517.
- [90] Fanali, S., Haddad, P. R., Poole, C. F., & Haddad, P. R. (2021). *Liquid chromatography: Fundamentals and applications* (2nd ed.). Elsevier.

- [91] Fandohan, P., Hell, K., Marasas, W. F. O., & Wingfield, M. J. (2005). Influence of storage practices on aflatoxin contamination of maize in Benin. *International Journal of Food Microbiology*, *104*(1), 173–183.
- [92] FAO, & WHO. (2018). Food safety and globalization. Rome: FAO/WHO. <https://www.fao.org/3/i8476en/I8476EN>
- [93] FAO/WHO. (2012). Public health risks of histamine and other biogenic amines from fish and fishery products. Meeting report; FAO Headquarters, Rome, Italy. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240691919>
- [94] Fernandes, C., Martins, A., & Rodrigues, P. (2020). Hygiene and operational procedures in fish processing plants: Implications for safety. *Journal of Food Protection*, *83*(7), 1234–1245.
- [95] Ferrario, C., Borgo, F., de Las Rivas, B., Muñoz, R., Ricci, G., & Fortina, M. G. (2014). Sequencing, characterization, and gene expression analysis of the histidine decarboxylase gene cluster of *Morganella morganii*. *Current Microbiology*, *68*(3), 404–411.
- [96] Figueiredo, M., Costa, P., & Nunes, L. (2021). Critical points in seafood transport: Ensuring cold chain integrity. *Journal of Food Protection*, *84*(6), 1027–1036.
- [97] Fisher, R. A. (1922). On the interpretation of  $\chi^2$  from contingency tables, and the calculation of P. *Journal of the Royal Statistical Society*, *85*(1), 87–94.
- [98] Food and Agriculture Organization & World Health Organization. (2018). Histamine in salmonids: Joint FAO/WHO literature review. FAO/WHO. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241514439>
- [99] Food and Drug Administration (FDA). (2011). *Fish and fishery products hazards and controls guidance* (4th ed.). U.S. Department of Health and Human Services, Center for Food Safety and Applied Nutrition.
- [100] Food and Drug Administration (FDA). (2016). *Food labeling: Revision of the nutrition and supplement facts labels*.

- [101] Foster, P., Smith, R., & Kumar, S. (2017). Temperature-dependent growth of Enterobacteriaceae in seafood. *International Journal of Food Microbiology*, *241*, 12–20.
- [102] Fox, J. L., Vliagoftis, H., & Church, M. K. (2020). *Histamine H2 receptors: Physiology and clinical relevance*. *Allergy*, *75*(11), 2753–2765.
- [103] Frontiers in Sustainable Food Systems. (2023). Ensuring food safety with molecularly imprinted polymers: Innovative methods for the detection of aflatoxins in food and feed samples. *Frontiers in Sustainable Food Systems*.
- [104] Frossard, N., Assemat, S., & Ollivier, V. (2021). *Mechanisms of mast cell degranulation and histamine release*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *147*(2), 401–414.
- [105] Fuke, S., Morioka, T., & Tanaka, H. (2023). Histamine levels in fermented and fresh foods: Dietary implications. *Foods*, *12*(8), 1550.
- [106] Galli, S. J., Tsai, M., & Piliponsky, A. M. (2020). *The development of mast cells and their role in innate and adaptive immunity*. *Nature Reviews Immunology*, *20*(6), 329–343
- [107] Galluzzo, F. G., & Cammilleri, G. (2022). The cold chain and the COVID-19 pandemic: An unusual increase in histamine content in fish samples collected in Southern Italy during lockdown. *Food Quality and Safety*, *5*, fyab031.
- [108] Garcia, M., Nguyen, T., & Lee, K. (2018). Biogenic amine formation in high-risk fish species. *Journal of Food Protection*, *81*(3), 432–440.
- [109] Garcia, P., Fernandez, M., & Lopez, R. (2025). Ochratoxin A and immune cell dysfunction: Mechanisms and implications. *Toxins*, *17*(1), 45.
- [110] García-Cazorla, A., López, J., & Sánchez, M. (2021). Influence of fishing methods on quality and safety of marine fish. *International Journal of Food Microbiology*, *344*, 109148.
- [111] Gemedé, H. F. (2025). Toxicity, mitigation, and chemical analysis of aflatoxins and other toxic metabolites produced by *Aspergillus*: A comprehensive review. *Toxins*, *17*(7), 331.

- [112] Georgianna, D. R., & Payne, G. A. (2009). Molecular genetic analysis of the aflatoxin biosynthetic gene cluster. In J. W. Bennett & M. Klich (Eds.), *Fungal secondary metabolism* (pp. 67–82). Springer.
- [113] Gervasi, T., Barreca, D., Laganà, G., & Mandalari, G. (2021). Health benefits related to tree nut consumption and their bioactive compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*, 5960.
- [114] Giaccone, V., Catellani, P., Sigovini, G., & Antonetti, P. (2000). Irregolare distribuzione di istamina nella muscolatura di tonni interi. *Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie*, *LVII*, 375–376.
- [115] Giavarina, D. (2015). Understanding Bland–Altman analysis. *Biochimica Medica*, *25*(2), 141–151.
- [116] Giorni, P., et al. (2011). Factors affecting *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production in maize. *Food Microbiology*, *28*(6), 1100–1107.
- [117] Giorni, P., et al. (2011). Influence of environmental factors on aflatoxin biosynthesis by *Aspergillus flavus*. *International Journal of Food Microbiology*, *146*, 55–59.
- [118] Goda, A. A., Shi, J., Xu, J., Liu, X., Zhou, Y., Xiao, L., ... Donia, M. A. A. (2025). Global health and economic impacts of mycotoxins: A comprehensive review. *Environmental Sciences Europe*, *37*(1), 122.
- [119] Gomes, F., Pereira, D., & Rodrigues, L. (2022). Temperature monitoring and traceability in seafood retail environments. *Food Control*, *136*, 108868.
- [120] Graci, S., Collura, R., Cammilleri, G., Buscemi, M. D., Giangrosso, G., Principato, D., ... Ferrantelli, V. (2017). Mercury accumulation in Mediterranean fish and cephalopods species of Sicilian coasts: Correlation between pollution and the presence of *Anisakis* parasites. *Natural Product Research*, *31*(10), 1156–1162.
- [121] Haas, H. L., Sergeeva, O. A., & Selbach, O. (2021). *Histamine H3 receptors: Neuroscience perspectives and clinical implications*. *Physiological Reviews*, *101*(4), 1675–1721.
- [122] Harris, D. C. (2022). *Quantitative chemical analysis* (10th ed.). W. H. Freeman.

- [123] Hell, K., Cardwell, K. F., Setamou, M., & Poehling, H. M. (2008). The influence of storage practices on aflatoxin contamination in maize in Africa. *Journal of Stored Products Research*, 44(1), 36–45.
- [124] Henson, S., & Caswell, J. (1999). Food safety regulation: An overview. *Food Policy*, 24(6), 589–603.
- [125] Herrman, J. L., & Younes, M. (1999). Background to the ADI/TDI/PTWI. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 29(3), S1–S6.
- [126] Heussner, A. H., & Bingle, L. E. H. (2015). Comparative ochratoxin toxicity: A review of the available data. *Toxins*, 7(10), 4253–4282.
- [127] Høie, H., Aasen, I. M., & Kristinsson, H. G. (2021). Scombrototoxic fish poisoning: Clinical presentation and management. *Journal of Public Health*, 28(1), 61–66.
- [128] Hrubisko, M., Danis, R., Huorka, M., & Wawruch, M. (2021). Histamine intolerance—The more we know the less we know. A review. *Nutrients*, 13(17), 2960.
- [129] Huang, B., Han, Z., Cai, Z., Wu, Y., & Ren, Y. (2010). Simultaneous determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2, M1 and M2 in peanuts and their derivative products by UHPLC–MS/MS. *Analytica Chimica Acta*, 662(1), 62–68.
- [130] Huang, Y., Wang, L., & Chen, X. (2020). Silent accumulation of histamine during refrigerated storage of fish. *Food Control*, 109, 106936.
- [131] Huybrechts, I., Jacobs, I., Biessy, C., Aglago, E. K., Jenab, M., Claeys, L., ... Scelo, G. (2024). Associations between dietary mycotoxin exposures and risk of hepatocellular carcinoma in a European cohort. *PLOS ONE*, 19(12), e0315561.
- [132] Hwang, J., Kim, S., & Lee, H. (2022). Dietary sources of histamine and related biogenic amines: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(10), 2761–2775.
- [133] IARC. (2012). Aflatoxins. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 100F, 225–248.
- [134] Identification of Histamine in Fish and Fish Products in Poland During 2014–2018. (2022). *Food Hygiene and Toxicology*, 14–156.

- [135] Ivanova, S., Petrov, K., & Dimitrov, D. (2025). Epidemiology of Balkan endemic nephropathy and the role of ochratoxin A. *Environmental Research*, 231, 116291.
- [136] Janik, E., Niemcewicz, M., Podogrocki, M., Ceremuga, M., Gorniak, L., Stela, M., ... Bijak, M. (2021). The existing methods and novel approaches in mycotoxins' detection. *Molecules*, 26, 3981.
- [137] Jiang, W., Chen, H., & Li, J. (2020). Modified atmosphere packaging and its effect on bacterial growth in seafood. *Food Packaging and Shelf Life*, 25, 100534.
- [138] Johansson, S. G. O., Bieber, T., Dahl, R., Friedmann, P. S., Lanier, B. Q., Lockey, R. F., ... Ring, J. (2003). Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization.
- [139] Jutel, M., Watanabe, T., & Akdis, M. (2022). *Histamine receptors and allergic disease: Therapeutic potential*. *Current Opinion in Immunology*, 74, 101–109.
- [140] Käferstein, F., Motarjemi, Y., & Bettcher, D. (1997). Foodborne disease control: A transnational challenge. *Bulletin of the World Health Organization*, 75(5), 503–514.
- [141] Kalesnikoff, J., & Galli, S. J. (2022). *Mast cells in health and disease: From basic biology to clinical applications*. *Nature Reviews Immunology*, 22(8), 475–493.
- [142] Kanki, M., Yoda, T., Ishibashi, M., & Tsukamoto, T. (2004). *Photobacterium phosphoreum* caused a histamine fish poisoning incident. *International Journal of Food Microbiology*. 92(1), 79–87.
- [143] Kemp, S. F., Lockey, R. F., & Simons, F. E. R. (2021). *Anaphylaxis: Clinical concepts and pathophysiology*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 9(2), 445–456.
- [144] Kensler, T. W., Roebuck, B. D., Wogan, G. N., & Groopman, J. D. (2011). Aflatoxin: A 50-year odyssey of mechanistic and translational toxicology. *Toxicological Sciences*, 120(Suppl. 1), S28–S48.
- [145] Kim, J., Park, S., & Lee, H. (2020). Histidine decarboxylase activity in fish and the effect of refrigeration. *Food Microbiology*, 87, 103388.

- [146] King, T., Cole, M., Farber, J. M., Eisenbrand, G., Zabar, D., Fox, E. M., ... Hill, J. P. (2017). Food safety for food security: Relationship between global megatrends and developments in food safety. *Trends in Food Science & Technology*, *68*, 160–175.
- [147] Klich, M. A. (2007). *Aspergillus flavus*: The major producer of aflatoxin. *Molecular Plant Pathology*, *8*(6), 713–722.
- [148] Koszegi, S., & Povero, G. (2016). Ochratoxin A: Molecular interactions, mechanisms of toxicity and prevention at the molecular level. *Toxins*, *8*(4), 111.
- [149] Kumar, P., et al. (2017). Occurrence of aflatoxins in milk and milk products. *Food Control*, *71*, 278–285.
- [150] Kumar, P., et al. (2021). Environmental modulation of mycotoxin production by *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Toxins*, *13*(12), 847.
- [151] Kumar, P., Mishra, S., & Sharma, A. (2021). Aflatoxins in food: Occurrence, biosynthesis, toxicology, detection and control strategies. *Food Reviews International*, *37*(2), 139–175.
- [152] Kumar, R., Zhao, H., & Li, F. (2020). Molecular regulation of bacterial histidine decarboxylase. *Microbial Biotechnology*, *13*(4), 1021–1032.
- [153] Ladero, V., Calles-Enriquez, M., Fernandez, M., & Alvarez, M. A. (2010). Toxicological effect of dietary biogenic amines. *Current Nutrition & Food Science*.
- [154] Lee, J., Kim, H., & Choi, S. (2023). Chronic nephrotoxicity of ochratoxin A in animal models: Mitochondrial and oxidative stress mechanisms. *Toxicology Letters*, *368*, 25–36.
- [155] Lee, S., Park, J., & Yoon, H. (2019). Induction of histidine decarboxylase in Scombridae fish. *Food Chemistry*, *276*, 120–127.
- [156] Lehane, L., & Olley, J. (2000). Histamine fish poisoning revisited. *International Journal of Food Microbiology*, *58*(1–2), 1–37.
- [157] Li, H., Xing, L., Zhang, M., Wang, J., & Zheng, N. (2018). *The toxic effects of aflatoxin B1 and aflatoxin M1 on kidney through regulating L-proline and downstream apoptosis*. *BioMed Research International*, *2018*, 9074861.

- [158] Li, W., Chen, Z., Li, X., Li, X., Hui, Y., & Chen, W. (2024). The biosynthesis, structure diversity and bioactivity of sterigmatocystins and aflatoxins: A review. *Journal of Fungi*, *10*(6), 396.
- [159] Li, W., Zhou, Q., & Liu, Y. (2023). Disruption of intestinal barrier integrity by aflatoxin B1: Molecular pathways and health consequences. *Toxins*, *15*(4), 298.
- [160] Li, X., Zhang, H., & Chen, Y. (2025). Renal oxidative stress and apoptosis in AFB1-induced nephrotoxicity. *Frontiers in Pharmacology*, *16*, 1120.
- [161] Li, Y., Chen, W., & Rodriguez Romero, A. (2019). Factors influencing histamine formation in fish. *Trends in Food Science & Technology*, *88*, 234–245.
- [162] Lima, F., Oliveira, D., & Rodrigues, P. (2020). Seafood thawing and handling practices to minimize histamine risk. *LWT - Food Science and Technology*, *133*, 110112.
- [163] Linares, D. M., et al. (2015). Histamine food poisonings: A systematic review and meta-analysis. *Foodborne Diseases*, 103–113.
- [164] Liu, Y., & Wu, F. (2010). Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: A risk assessment. *Environmental Health Perspectives*, *118*, 818–824.
- [165] Lo Turco, V., Di Bella, G., Furci, P., Cicero, N., Pollicino, G., & Dugo, G. (2013). Heavy metals content by ICP-OES in *Sarda sarda*, *Sardinella aurita*, and *Lepidopus caudatus* from the Strait of Messina (Italy). *Natural Product Research*, *27*(6), 518–523.
- [166] López-Caballero, M., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. (2017). Transport and handling of fresh fish: Implications for quality and safety. *Food Research International*, *100*, 275–284.
- [167] Łozowicka, B., Kaczyński, P., Iwaniuk, P., Rutkowska, E., Socha, K., Orywal, K., ... Perkowski, M. (2024). Nutritional compounds and risk assessment of mycotoxins in ecological and conventional nuts. *Food Chemistry*, *458*, 140222.
- [168] Magan, N., & Aldred, D. (2007). Optimal environmental conditions for mycotoxin production by *Aspergillus* spp. *International Journal of Food Microbiology*, *119*(1–2), 39–46.

- [169] Magan, N., & Aldred, D. (2007). Post-harvest control strategies: Fungi, mycotoxins and food safety. *Mycotoxin Research*, 23(2), 175–183.
- [170] Magan, N., & Aldred, D. (2007). Post-harvest control strategies: Minimising mycotoxins in the food chain. *International Journal of Food Microbiology*, 119(1–2), 131–139.
- [171] Magnoli, C., et al. (2014). Ochratoxin A production by *Penicillium* species. *Food Microbiology*, 42, 64–70.
- [172] Maintz, L., & Novak, N. (2007). Histamine and histamine intolerance. *American Journal of Clinical Nutrition*, 85(5), 1185–1196.
- [173] Maintz, L., & Novak, N. (2021). Histamine and histamine intolerance. *American Journal of Clinical Nutrition*, 113(1), 1–11.
- [174] Mandalari, G., Barreca, D., Gervasi, T., Roussell, M. A., Klein, B., Feeney, M. J., & Carughi, A. (2021). Pistachio nuts (*Pistacia vera* L.): Production, nutrients, bioactives and novel health effects. *Plants*, 11, 18.
- [175] Manna, M., & Kim, K. D. (2017). Impact of water activity on aflatoxin production in stored cereals. *Toxins*, 9(1), 11.
- [176] Margareta, G., Nakamura, A., Nimura, K., Yamazaki, M., Oshima, I., Kuda, T., & Takahashi, H. (2025). Investigation of bacterial community and histamine production in fresh mackerel at low temperature storage. *PLOS ONE*, 20(9), e0331331.
- [177] Martinez, A., Santos, L., & Ferreira, P. (2023). Retail handling strategies to ensure seafood safety and quality. *Food Control*, 145, 109220.
- [178] Martinez, P., Zhou, Q., & Garcia, M. (2017). Environmental factors affecting enzyme synthesis in foodborne bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 123(2), 315–325.
- [179] Martins, A., Fernandes, C., & Santos, L. (2021). Control of temperature and handling in seafood supply chains. *Trends in Food Science & Technology*, 113, 275–285.
- [180] Martins, A., Rodrigues, P., & Lima, F. (2022). Packaging technologies and cross-contamination prevention in seafood. *Food Packaging and Shelf Life*, 32, 100764.

- [181] Medina, A., et al. (2014). Interactions between water activity and temperature on mycotoxin production. *Food Microbiology*, *38*, 20–28.
- [182] Medina, A., et al. (2017). Climate change and mycotoxins. *Food Research International*, *100*, 41–52.
- [183] Medina, A., et al. (2017). Effect of water activity and temperature on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production. *International Journal of Food Microbiology*, *247*, 40–48.
- [184] Mihalache, O. A., Carbonell-Rozas, L., Cutroneo, S., & Dall’Asta, C. (2023). Multi-mycotoxin determination in plant-based meat alternatives and exposure assessment. *Food Research International*, *168*, 112766.
- [185] Mihalache, O. A., Dellafiora, L., & Dall’Asta, C. (2022). A systematic review of natural toxins occurrence in plant commodities used for plant-based meat alternatives production. *Food Research International*, *158*, 111490.
- [186] Mihalache, O. A., Dellafiora, L., & Dall’Asta, C. (2023). Assessing the mycotoxin-related health impact of shifting from meat-based diets to soy-based meat analogues. *Exposure and Health*, *15*(3), 661–675.
- [187] Miller, J. D. (1998). Mycotoxins in small grains and maize: Old problems, new challenges. *Food Additives & Contaminants*, *15*(4–5), 451–462.
- [188] Ministero della Salute. (2023). *Relazione annuale 2023*. Ex Direzione Generale per l’Igiene e la Sicurezza degli Alimenti e la Nutrizione, Ufficio 8, Sistema Di Allerta, Emergenze Alimentari E Pianificazione Dei Controlli.
- [189] Mol, H. G. J., Plaza-Bosch, P. C., & Rijk, R. (2020). Advanced extraction techniques and clean-up approaches for multi-residue analysis of food contaminants: Trends and challenges. *Journal of Chromatography A*, *1617*, 460865.
- [190] Mortimore, S., & Wallace, C. (2013). *HACCP: A practical approach* (3rd ed. pp. 1–475)
- [191] Muaz, K., Riaz, M., de Oliveira, C. A. F., Akhtar, S., Ali, S. W., Nadeem, H., ... Balasubramanian, B. (2022). Aflatoxin M1 in milk and dairy products: Global occurrence and potential decontamination strategies. *Toxin Reviews*, *41*, 588–605.

- [192] Nair, S., & Angulo, F. J. (2015). Histamine food poisonings: A systematic review and meta-analysis. *Foodborne Diseases*, 103–113.
- [193] Nalbhone, L., Vallone, L., Giarratana, F., Virzì, N., Muscatello, L., & Lo Turco, V. (2023). Occurrence of histamine in tuna and mackerel marketed in Sicily (Italy) by rapid methods. *Italian Journal of Food Safety*, 12(1), 8640.
- [194] Nazareth, T. de M., Soriano Pérez, E., Luz, C., Meca, G., & Quiles, J. M. (2024). Comprehensive review of aflatoxin and ochratoxin structure, toxicological impact, and control strategies. *Foods*, 13(5), 1234.
- [195] Nazhand, A., Durazzo, A., Lucarini, M., Souto, E. B., & Santini, A. (2020). *Characteristics, occurrence, detection and detoxification of aflatoxins in foods and feeds*. *Foods*, 9(5), 644.
- [196] Ndiaye, F., Niang, A. M., Faye, B., Diouf, D., & Gueye, M. (2023). Occurrence of aflatoxin B1 and aflatoxin M1 in traditional foods: Health risk assessment. *Toxins*, 15(9), 562.
- [197] Negi, A., Mondal, S., & Prasad, B. (2022). Aflatoxins in food: Prevention, control, and innovative strategies. *Toxins*, 14(8), 585.
- [198] Nelson, P. E., Toussoun, T. A., & Marasas, W. F. O. (1983). *Fusarium species: An illustrated manual for identification*. University Park Press.
- [199] Nguyen, H., Foster, P., & Smith, R. (2022). Regulation of histidine decarboxylase in fish spoilage bacteria. *Food Microbiology*, 104, 103895.
- [200] Nguyen, T., Figueiredo, M., & Costa, P. (2021). Hygiene and temperature monitoring in seafood handling. *International Journal of Food Microbiology*, 344, 109148.
- [201] Niu, X., Li, P., Liu, J., Zhang, Q., Zhang, H., & Yuan, X. (2021). Aflatoxin B1 and ochratoxin A contamination in nuts: Occurrence, prevention, and control. *Food Chemistry*, 339, 127933.
- [202] Niu, X., Wu, Y., Zhang, H., Hu, X., Zhang, Q., Wang, W., & Yuan, X. (2020). Occurrence and dietary risk assessment of aflatoxins in nuts from markets. *Toxins*, 12(9), 556.

- [203] Njobeh, P. B., et al. (2010). Mycotoxin contamination of peanuts and related products in Africa. *Food Control*, 21(3), 359–363.
- [204] Nowak, A., & Waskiewicz, A. (2020). Strategies for the detoxification of aflatoxins in food and feed. *Foods*, 9(5), 643.
- [205] O'Mahony, J., Sheahan, J., & Murphy, P. A. (2020). Biogenic amines in fermented foods: Formation, toxicity, and control. *Food Control*, 109, 106918.
- [206] O'Mahony, J., Sheahan, J., & Murphy, P. A. (2021). Histamine in seafood: Risk assessment and mitigation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(6), 5641–5662.
- [207] O'Mahony, J., Sheahan, J., & Murphy, P. A. (2022). Modern approaches to monitoring histamine levels in fish and seafood. *Food Analytical Methods*, 15(2), 291–307.
- [208] Okereke, H., Nwaiwu, O., & Ibeabuchi, C. (2024). Aflatoxin contamination in maize and peanut-based food products in Africa: Public health implications. *Toxins*, 16(1), 52.
- [209] Olatunji, O. A., Akinyosoye, F. A., & Onilude, A. A. (2015). Occurrence of aflatoxin contamination in peanuts: A case study from Nigeria. *Journal of Applied Microbiology*, 119(6), 1656–1666.
- [210] Önal, A. (2007). A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*, 103(4), 1475–1486.
- [211] Önal, A. (2007). Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods: A review. *Food Chemistry*, 103(4), 1475–1486.
- [212] Ontaño-Cruz, C., Rojas, I., & Morales, M. (2021). Occurrence and mitigation strategies of aflatoxin contamination in nuts. *Toxins*, 13(3), 216.
- [213] Ontaño-Cruz, C., Rojas, I., & Morales, M. (2022). Advances in aflatoxin decontamination strategies: Physical, chemical, and biological methods. *Toxins*, 14(6), 397.
- [214] Palacios, S. A., et al. (2022). Ecophysiology of mycotoxigenic fungi under climate-related conditions. *Toxins*, 14(5), 330.

- [215] Palacios, S. M., et al. (2022). Impact of storage conditions on aflatoxin and ochratoxin A accumulation in cereals and nuts. *Toxins*, 14(8), 578.
- [216] Papadopoulou, C., Papadakis, S., Fotiadou, C., & Tsoukala, C. (2020). Histamine-producing bacteria in fish and seafood: Prevalence, detection, and control. *Foods*, 9, 285.
- [217] Park, K., Lee, J., & Kim, S. (2015). pH effects on histidine decarboxylase activity in fish tissues. *Journal of Food Science*, 80(5), M1001–M1007.
- [218] Patel, A., Singh, P., & Kumar, R. (2025). Ochratoxin A-mediated ROS generation and inflammasome activation in kidney cells. *Toxicology Reports*, 12, 502–515.
- [219] Peivasteh-Roudsari, L., Rahmani, A., Shariatifar, N., Tajdar-Oranj, B., Mazaheri, M., & Sadighara, P. (2020). Occurrence of histamine in canned fish samples (tuna, sardine, kilka, and mackerel) from markets in Tehran. *Journal of Food Protection*, 83(1), 136–141.
- [220] Pereira, D., Silva, L., & Figueiredo, M. (2018). Cold chain management in fish transport: Techniques and monitoring systems. *Food Control*, 91, 210–218.
- [221] Petracci, M., Mudadu, A. G., Crobu, L., & Meloni, D. (2022). Histamine content in yellowfin tuna and risk assessment for consumers in Italy. *Italian Journal of Food Safety*, 11(2), 1091.
- [222] Phu, T. M., & others. (2024). Molecular mechanisms of scombroid food poisoning. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 809.
- [223] Pinstrup-Andersen, P. (2009). Food security: Definition and measurement. *Food Security*, 1(1), 5–7.
- [224] Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). *Fungi and food spoilage* (3rd ed.). Springer.
- [225] Pitt, J. I., & Miller, J. D. (2017). A concise history of mycotoxin research. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(33), 7021–7033.
- [226] Podstawka, A., Szczech, M., Szoltysik, M., Kwiecinska-Poppe, E., Piekutowska, A., & Gawronska, H. (2020). Assessment of histamine content in canned tuna and sardine. *Food Control*, 118, 107402.

- [227] Poeta, G., Scinicariello, M., Tofalo, R., & Suzzi, G. (2020). Biogenic amines in seafood: Occurrence, toxicity, and preventive measures. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 635.
- [228] Poole, C. F. (2020). *The essence of chromatography* (3rd ed.). Elsevier.
- [229] Pradhan, N., Mahato, D. K., & Jang, Y. (2021). Mycotoxins in food: Occurrence, detection, and control. *Toxins*, *13*, 662.
- [230] Praznik, W., Jakop, M., Langerholc, T., Smole Možina, S., & Raspor, P. (2020). Histamine-forming bacteria in fish and seafood: Identification and monitoring. *Journal of Food Science*, *85*(5), 1503–1511.
- [231] Puga, A., Rodríguez-Carrasco, Y., Font, G., & Ruiz, M. J. (2019). Occurrence and dietary exposure assessment of aflatoxins in nuts and dried fruits from the Spanish market. *Toxins*, *11*(6), 329.
- [232] Quiles, J. L., Lopez-Garcia, J. A., & Barrios, L. (2013). Biogenic amines in foods: Analytical methods and toxicological aspects. *Food Chemistry*, *140*(4), 854–861.
- [233] Rafeeq, S., Iftikhar, H., & Bhatti, Z. (2021). Aflatoxin contamination in nuts: Occurrence, prevention, and decontamination methods. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 665.
- [234] Raffaelli, A., Moretti, M., & Giordani, I. (2021). Sample preparation strategies for the accurate determination of trace contaminants in food matrices. *Food Chemistry*, *356*, 129820.
- [235] Rahmani, A., Afshari, A., & Motallebi, M. (2023). Risk assessment of aflatoxin exposure in nuts: A systematic review. *Toxins*, *15*(2), 101.
- [236] Rasmussen, R. R., & Dalgaard, P. (2001). Growth and histamine production by gram-negative bacteria from seafood. *International Journal of Food Microbiology*, *66*(3), 149–159.
- [237] Rasmussen, R. R., & Dalgaard, P. (2002). Histamine formation in seafood: Bacterial contribution and preventive strategies. *Journal of Food Protection*, *65*(12), 1982–1989.
- [238] Rasmussen, R. R., & Dalgaard, P. (2003). Temperature effect on histamine formation in seafood. *Journal of Food Science*, *68*(3), 872–876.

- [239] Regattieri, A., Gamberi, M., & Manzini, R. (2007). Traceability of food products: General framework and experimental evidence. *Journal of Food Engineering*, *81*(2), 347–356.
- [240] Review Integrative Medicine Discovery. (2024). Review of chemical properties and detection of aflatoxins (UV fluorescence and melting behavior). *tmrjournals.com*.
- [241] Riccobono, F., Lo Turco, V., Zappalà, M., Lo Monaco, A., Cicero, N., & Dugo, G. (2014). Mycotoxins and heavy metals in Sicilian nuts and their derived products: Occurrence and risk assessment. *Natural Product Research*, *28*(12), 833–841.
- [242] Roccato, A., Uyttendaele, M., & Membré, J.-M. (2017). Analysis of domestic refrigerator temperatures and home storage time distributions for shelf-life studies and food safety risk assessment. *Food Research International*, *96*, 171–181.
- [243] Rocco, c. Bianchi & Montanari (2023). Development and validation of HPLC-UV/MS methods for the analysis of food contaminants. *Journal of Chromatographic science* *61*(4), 256-272
- [244] Rodrigues, P., Lima, F., & Oliveira, D. (2019). Temperature fluctuations and histamine formation in seafood processing lines. *Food Control*, *104*, 26–34.
- [245] Rodrigues, P., Santos, L., & Alves, M. (2023). Domestic handling and thawing of seafood to reduce histamine risk. *Journal of Food Safety*, *43*(1), e13012.
- [246] Rodriguez Romero, A., Li, Y., & Chen, W. (2023). Biogenic amine production in seafood: Molecular mechanisms and safety implications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *63*(1), 1–22.
- [247] Rodriguez, C., Farias, D., & Torres, R. (2022). Safety management of histamine formation during seafood distribution. *Journal of Food Protection*, *85*(6), 1023–1032.
- [248] Sadik, J. A., Fentahun, N., & Brouwer, I. D. (2023). Preharvest and postharvest management practices related to mycotoxin contamination in maize. *World Mycotoxin Journal*, *16*(3), 211–226.

- [249] Sant'Ana, A. S., De Martinis, E. C., & Conte-Junior, C. A. (2021). Histamine as a bioactive compound in foods: Implications for human health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(4), 3565–3583.
- [250] Santos, A., Pereira, R., & Oliveira, A. (2022). Histamine accumulation in fish products: Mechanisms and prevention strategies. *Food Research International*, 158, 111487.
- [251] Santos, L., Alves, M., & Ferreira, P. (2021). Enzymatic histamine production under variable storage conditions in fish. *Journal of Food Science*, 86(5), 1798–1807.
- [252] Sargeant, K., et al. (1961). Turkey “X” disease: Investigation of contaminated feed. *Nature*, 192, 1091–1092.
- [253] Sicherer, S. H., & Simons, F. E. R. (2021). Epidemiology of food allergy and anaphylaxis. *Chemical Immunology and Allergy*, 107, 45–59.
- [254] Silva, L., Fernandes, C., & Almeida, J. (2020). Control strategies to inhibit histidine decarboxylase activity in seafood. *Food Microbiology*, 92, 103598.
- [255] Silva, L., Fernandes, C., & Almeida, J. (2020). Control strategies to inhibit histidine decarboxylase activity in seafood. *Food Microbiology*, 92, 103598.
- [256] Smith, J., Brown, L., & Davis, K. (2025). Tissue distribution and albumin binding of ochratoxin A: Pharmacokinetics and toxicological implications. *Food and Chemical Toxicology*, 163, 112889.
- [257] Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Dolan, J. W. (2019). *Introduction to modern liquid chromatography* (4th ed.). John Wiley & Sons.
- [258] Stahl, T., König, P., Brand, B., & Hamscher, G. (2023). Development and validation of a highly sensitive LC–MS/MS method for emerging contaminants in food matrices. *Chemosphere*, 312, 137537.
- [259] Stoloff, L. (1980). Toxicity of mycotoxins in farm animals. *The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 1(3), 597–613.
- [260] Sun, L., Wang, Y., & Zhou, J. (2024). Aflatoxin B1-induced intestinal villus atrophy and microbiota dysbiosis in vivo. *Frontiers in Nutrition*, 11, 1048.

- [261] Tanaka, Y., Nakamura, T., & Ito, K. (2019). Histamine-producing bacteria in seafood and the role of cold storage. *International Journal of Food Microbiology*, *290*, 147–155.
- [262] Taniwaki, M. H., et al. (2018). Ochratoxin A producing *Aspergillus* species. *Food Microbiology*, *70*, 10–20.
- [263] Taylor, S. L. (1986). Histamine food poisoning: Toxicology and clinical aspects. *Critical Reviews in Toxicology*, *17*(2), 91–116.
- [264] Taylor, S. L. (1986). Histamine poisoning: The clinical syndrome of scombroid fish poisoning. *Critical Reviews in Toxicology*, *17*(2), 91–128.
- [265] Thangam, E. B., Jemima, E. A., Singh, H., Baig, M. S., Khan, M., Mathias, C. B., & Ali, H. (2018). The role of histamine and histamine receptors in immune modulation and inflammation. *Frontiers in Immunology*, *9*, 1873.
- [266] Thompson, M., Ellison, S. L. R., & Wood, R. (2002). Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure and Applied Chemistry*, *74*(5), 835–855.
- [267] Turner, N. W., Subrahmanyam, S., & Piletsky, S. A. (2009). Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta*, *632*, 168–180.
- [268] Unnevehr, L. (2015). Food safety in developing countries. *Annual Review of Resource Economics*, *7*(1), 381–404.
- [269] Varga, J., et al. (2010). Ochratoxin A producing fungi: Ecology and toxigenicity. *Mycologia*, *102*(4), 835–849.
- [270] Vélez, A. M., & Rodriguez, J. P. (2024). Mechanisms of histamine toxicity and its clinical implications in foodborne disease. *Toxins*, *16*(2), 97–112.
- [271] Vos, E., & Wendler, F. (2016). *Food safety regulation in the EU*. Routledge.
- [272] Wang, B., Liu, K., Wei, G., He, A., Kong, W., & Zhang, X. (2024). A review of advanced sensor technologies for aquatic products freshness assessment in cold chain logistics. *Biosensors*, *14*(10), 468.
- [273] Wang, H., Liu, J., & Zhang, Q. (2023). Bax/Bcl-2 balance and caspase activation in aflatoxin B1-induced renal apoptosis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *447*, 116140.

- [274] Wang, L., Huang, Y., & Zhang, H. (2016). Thermal characteristics of histidine decarboxylase in mesophilic bacteria. *Journal of Food Biochemistry*, *40*(5), e12345.
- [275] Wang, X., Chen, Y., & Li, Q. (2024). Mechanistic insights into mycotoxin systemic toxicity: Oxidative stress, DNA damage, and inflammation. *Archives of Toxicology*, *98*, 1495–1510.
- [276] Wei, J., Wang, X., & Li, S. (2021). *CYP1A2, CYP2A13, and CYP3A4 network and interaction with aflatoxin B<sub>1</sub>*. *World Mycotoxin Journal*, *14*(2), 179–190.
- [277] WHO. (2015). Estimates of the global burden of foodborne diseases. Geneva: World Health Organization.
- [278] Wu, J., Huang, Y., & Zhou, X. (2021). Tight junction protein modulation by aflatoxin B<sub>1</sub> in intestinal epithelial cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *69*(34), 10015–10025.
- [279] Yakov Verkhivker, G., & Altman, E. (2018). Protein structure, dynamics, and molecular interactions in complex biological systems. *Journal of Molecular Biology*, *430*(14), 2071–2090.
- [280] Yoon, H., Lee, S., & Park, J. (2018). Histamine formation in fish during refrigerated storage. *Food Research International*, *106*, 114–121.
- [281] Yu, J., Chang, P. K., Cary, J. W., Wright, M., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., ... & Payne, G. A. (2004). Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(3), 1253–1262.
- [282] Yu, J., et al. (2004). Aflatoxin biosynthesis and genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *68*(3), 647–669.
- [283] Yu, J., et al. (2020). Regulation of aflatoxin biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *104*, 3377–3390.
- [284] Zhang, C., Qu, Z., Hou, J., & Yao, Y. (2024). Contamination and control of mycotoxins in grain and oil crops. *Microorganisms*, *12*(3), 567.
- [285] Zhang, X. (2022). Recent developments on the use of liquid chromatography in the determination of food contaminants. *Separations*, *11*(12), 342.

- [286] Zhang, Y., Chen, H., & Wang, J. (2024). Renal oxidative stress and AFB1 accumulation in murine models. *Journal of Toxicology*, 2024, 897654.
- [287] Zhao, T., Li, P., & Sun, Y. (2024). Intestinal absorption and barrier dysfunction induced by aflatoxin B1. *Food Research International*, 163, 112131.
- [288] Zhou, Q., Martinez, P., & Garcia, M. (2018). Transcriptional regulation of histidine decarboxylase in Enterobacteriaceae. *Microbiology*, 164(6), 827–838.