



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

TOSSICOLOGIA, TECNICHE DI RILEVAMENTO E
MISURE INNOVATIVE DI CONTROLLO DELLE
MICOTOSSINE NEGLI ALIMENTI

TOXICOLOGY, DETECTION TECHNIQUES
AND INNOVATIVE CONTROL MEASURES OF
MYCOTOXINS IN FOOD

TIPO TESI: compilativa

Studente:
TANIA DIMO

Relatore:
DOTT. MASSIMILIANO GASPARRINI

ANNO ACCADEMICO 2025-2026

SOMMARIO

ELENCO DELLE TABELLE.....	5
ELENCO DELLE FIGURE	6
ACRONIMI E ABBREVIAZIONI	7
INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI	10
CAPITOLO 1 LE MICOTOSSINE: NATURA, RISCHI E STRATEGIE DI CONTROLLO	12
1.1 Quadro introduttivo.....	12
1.2 Diffusione e impatto globale.....	12
1.3 Effetti sulla salute	14
1.4 Descrizione delle principali micotossine	15
1.5 Aflatossine	15
1.6 Ocratossina A.....	16
1.7 Fumonisine.....	16
1.8 Tricoteceni	17
1.9 Zearalenone.....	17
1.10 Patulina	18
CAPITOLO 2 METODI DI RILEVAMENTO DELLE MICOTOSSINE:	20
2.1 Preparazione del campione	21
2.2 Analisi del campione.....	22
2.2.1 Analisi cromatografica.....	22
2.2.2 Analisi immunologica.....	24
2.2.3 Saggio immunoenzimatico (ELISA).....	25
CAPITOLO 3 NUOVE TECNICHE DI RILEVAMENTO DELLE MICOTOSSINE	29
3.1 I biosensori.....	29
3.1.1 Biosensori elettrochimici	31
3.1.2 Biosensori ottici	31
3.1.3 Biosensori gravimetrici, acustici e termici.....	32
3.2 Nanotecnologie e nuove tecnologie nella rilevazione delle micotossine	33

3.3 Approcci di metabolomica e apprendimento automatico nel rilevamento delle micotossine	34
CAPITOLO 4 STRATEGIE DI PREVENZIONE E CONTROLLO DELLE MICOTOSSINE	36
4.1 Decontaminazione degli alimenti.....	36
4.2 Approcci convenzionali	37
4.3 Strategie innovative di mitigazione.....	38
4.3.1 Plasma atmosferico freddo.....	39
4.3.2 Composti polifenolici	40
4.3.3 Oli essenziali naturali.....	41
4.3.4 Materiali magnetici e nanoparticelle.....	42
4.3.5 Altre strategie innovative.....	43
CONCLUSIONI	45
BIBLIOGRAFIA	47
RINGRAZIAMENTI	69

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1. Effetti tossici delle micotossine in vari prodotti alimentari (Tradotta e adattata da Khan et al., 2024).	14
Tabella 2. Metodi per la determinazione delle micotossine (Tradotta e adattata da Khan et al., 2024).	24

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1. Distribuzione geografica delle micotossine (Fonte: Gruber-Dorninger et al., 2019; tratta da Maphaisa et al., 2025). AF: aflatossine, FB: fumonisine, ZEN: zearalenone, DON: deossinivalenolo, OTA: ocratossina A, T-2: micotossina del gruppo A dei tricoteceni.	13
Figura 2. Struttura chimica delle principali micotossine (Khan et al., 2024).	19
Figura 3. Diagramma di flusso dei passaggi coinvolti nell'analisi delle micotossine mediante tecniche cromatografiche (Khan et al., 2024).....	20
Figura 4. Schematizzazione metodo QuEChERS (Tratto da: Lucci, 2025).....	22
Figura 5. Schematizzazione della TLC (Maphaisa et al., 2025).	23
Figura 6. Schematizzazione HPLC/LC-MS (Maphaisa et al., 2025).....	23
Figura 7. Fasi generali di lavoro dell'ELISA (Fonte: Step-by-step guide to ELISA, Mabtech, n.d.; tratta da Maphaisa et al., 2025).	26
Figura 8. Passaggi LFA del meccanismo di rilevamento multi-target delle micotossine (Fonte: Adunphatcharaphon et al., 2022; tratta da Maphaisa et al., 2025).	28
Figura 9. Diagramma di flusso di un biosensore per l'analisi delle micotossine (Maphaisa et al., 2025).....	30
Figura 10. Metodi per controllare la contaminazione da micotossine: (A) metodo del plasma atmosferico freddo, (B) polifenoli, (C) oli essenziali naturali e (D) materiali magnetici e nanoparticelle (Khan et al., 2024).	38
Figura 11. Meccanismo di interazione di legame tra micotossine e adsorbenti su scala nanometrica e, A = fullereni; B = nanotubi di carbonio; e C = grafene (Khan et al., 2024)..	44

ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

TLC	Cromatografia su strato sottile
GC	Gascromatografia
HPLC	Cromatografia liquida ad alte prestazioni
LC/MS	Cromatografia liquida accoppiata a Spettrometria di massa
ELISA	Test immunoenzimatici
LFA	Saggi a flusso laterale
CAP	Plasma atmosferico freddo
NEO	Oli essenziali naturali
AF	Aflatossine
OTA	Ocratossina A
AOH	Alternariolo
AME	Alternariolo monometil etero
TEN	Tentossina
ALT	Altenuene
FMN	Fumonisine
T-2/HT-2	Tricoteceni
DON	Deossinivalenolo
NIV	Nivalenolo
CIT	Citrinina
ZEN	Zearalenone
PAT	Patulina
IARC	Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro

AFBO	AFB ₁ 8,9-epossido
ELEM	Leucoencefalomalacia equina
ATA	Aleucemia tossica alimentare
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe
dSPE	Tecnica di estrazione in fase solida dispersiva
PSA	Ammina primaria e secondaria
GC-MS	Accoppiamento della Gas cromatografia con la spettrometria di massa
MS/MS	Spettrometria di massa tandem
dcELISA	ELISA competitivo diretto
icELISA	ELISA competitivo indiretto
HRP	Perossidasi di rafano
H ₂ O ₂	Perossido di idrogeno
AuNPs	Nanoparticelle d'oro
DLS	Diffusione dinamica della luce
QDs	Punti quantici
MAbs	Anticorpi monoclonali
rAb	Anticorpi ricombinanti
ELASA	Enzyme-linked aptamer sorbent assay
MIP	Polimeri a impronta molecolare
T-line	Linea di test
PDA	Polidopamina
LOD	Limite di rilevazione
Ald-Nbs	Nanocorpi anti-idiotipici
EMDTs	Tecniche emergenti per il rilevamento delle micotossine
ECB	Biosensori elettrochimici
OB	Biosensori ottici

SPR	Risonanza plasmonica di superficie
QCM	Microbilancia a cristalli di quarzo
SAW	Onde acustiche superficiali
CN	Nanotubi di carbonio
CRISPR	Clustered Regular Interspaced Short Palindrome Repeats
ML	Apprendimento automatico
ROS	Specie reattive dell'ossigeno
SLN	Nanoparticelle d'argento
SEN	Nanoparticelle di selenio
ZON	Nanoparticelle di ossido di zinco
SEM	Microscopia elettronica a scansione
PEF	Campi elettrici pulsati

INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI

Le micotossine rappresentano una delle principali sfide per la sicurezza alimentare a livello globale. Si tratta di metaboliti tossici prodotti da funghi patogeni che contaminano numerose materie prime alimentari, con conseguenze rilevanti sulla salute umana e animale. Tra le più comuni e pericolose si annoverano aflatossine, ocratossina A, fumonisine, tricoteceni, zearalenone e patulina, tutte associate a effetti nocivi che spaziano dalla tossicità epatica e renale fino a proprietà mutagene e cancerogene. La contaminazione micotossica risulta particolarmente critica nelle popolazioni che consumano alimenti di base come cereali e frutta secca, dove condizioni ambientali favorevoli e pratiche agricole non ottimali possono favorire la proliferazione fungina. Tradizionalmente, il rilevamento delle micotossine si è basato su metodiche cromatografiche consolidate, quali cromatografia su strato sottile (TLC), gascromatografia (GC), cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) e cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa (LC/MS). Sebbene efficaci, tali tecniche presentano limiti in termini di costi, tempi di analisi e necessità di personale altamente qualificato, rendendo evidente la necessità di strumenti rapidi, economici e applicabili direttamente in campo. In questo scenario, test immunoenzimatici (ELISA), saggi a flusso laterale (LFA) e biosensori stanno emergendo come soluzioni analitiche di grande interesse per la rilevazione immediata. Parallelamente, le strategie di mitigazione della contaminazione si sono evolute per fronteggiare l'emergere di ceppi fungini resistenti ai trattamenti convenzionali. Accanto agli approcci fisici, chimici e biologici già consolidati, si stanno affermando tecnologie innovative quali il plasma atmosferico freddo (CAP), l'impiego di polifenoli e flavonoidi, l'utilizzo di materiali magnetici e nanoparticelle, nonché l'applicazione di oli essenziali naturali (NEO). Questi metodi, ancora in fase di studio e validazione, mostrano un potenziale significativo per la detossificazione e il controllo delle micotossine, con l'obiettivo di garantire un approvvigionamento alimentare sicuro e sostenibile. La presente tesi si propone di analizzare in modo sistematico la tossicità delle principali micotossine, valutare i progressi più recenti nelle tecniche di rilevamento e approfondire l'efficacia delle strategie innovative di mitigazione. L'obiettivo è fornire una visione integrata che, da un lato, evidenzia le criticità ancora presenti nella gestione della contaminazione micotossica e, dall'altro,

individuare le prospettive più promettenti per il futuro della sicurezza alimentare (Khan et al., 2024).

Capitolo 1

LE MICOTOSSINE: NATURA, RISCHI E STRATEGIE DI CONTROLLO

1.1 Quadro introduttivo

Le micotossine sono metaboliti secondari sintetizzati dai funghi filamentosi appartenenti principalmente ai generi *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*. Questi composti, prodotti in condizioni ambientali favorevoli, possono contaminare alimenti e mangimi, causando gravi patologie negli esseri umani e negli animali (D. Umereweneza et al., 2018). La loro presenza non rappresenta soltanto un problema sanitario, ma comporta anche rilevanti implicazioni socioeconomiche (S.M. Abd-Elghany et al., 2015, C. Atherstone et al., 2014, C. Montanari et al., 2016), legate alla perdita di risorse alimentari e alla riduzione della qualità dei prodotti agricoli.

1.2 Diffusione e impatto globale

La contaminazione da micotossine costituisce un rischio su scala mondiale (Figura 1), interessando un'ampia gamma di colture alimentari: cereali (mais, riso, grano, orzo), legumi come le lenticchie, frutta secca (arachidi, mandorle, noci, pistacchi), caffè, semi di cotone, spezie (pepe, paprika, zenzero) e persino prodotti di origine animale come la carne (J. Pleadin et al., 2019, I. Rodrigues et al., 2012, W.S. Darwish et al., 2014). Secondo Mesterházy et al. (2020), la contaminazione da micotossine è responsabile dello spreco di circa 1,3 miliardi di tonnellate di cibo, pari a un terzo della produzione alimentare mondiale, evidenziando la portata del problema e la sua rilevanza per la sicurezza alimentare globale. Ad oggi sono state identificate circa 400 micotossine, ma soltanto una trentina sono considerate realmente pericolose per l'uomo e gli animali (D. Umereweneza et al., 2018, P. Vila-Donat et al., 2018). Tra queste, le più note includono: aflatossine (AF), ocratossina A (OTA), tossine dell'*Alternaria* (alternariolo (AOH), alternariolo monometil etero (AME), tentossina (TEN), altenuene (ALT)), fumonisine (FMN), tricoteceni (T-2/HT-2, deossinivalenolo (DON), nivalenolo (NIV)), citrinina (CIT), zearalenone (ZEN), alcaloidi dell'ergot e patulina (PAT).

Particolare attenzione è rivolta alle aflatossine, classificate dall'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) come cancerogeni umani di Gruppo 1 (G.S. Shephard et al., 2008, L. Anfossi et al., 2016).

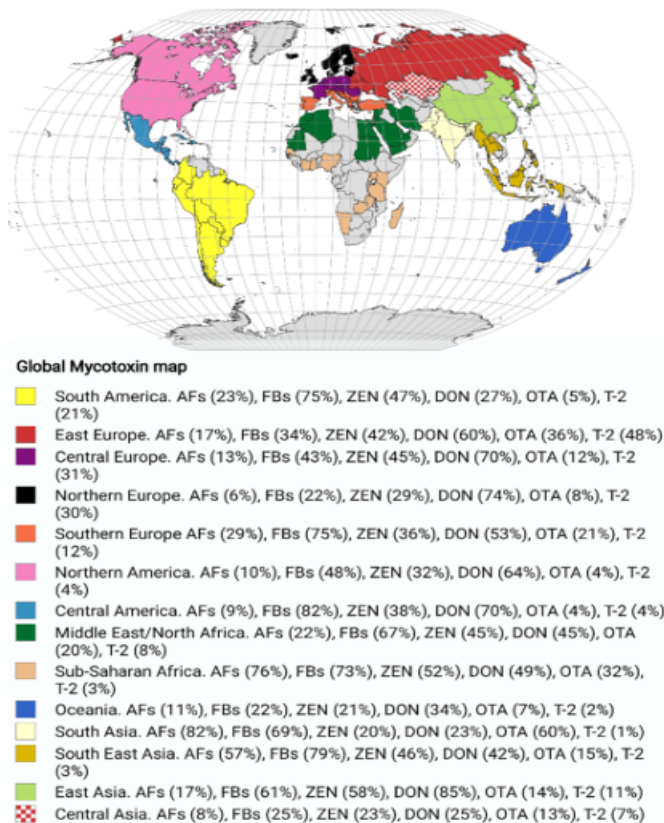


Figura 1. Distribuzione geografica delle micotossine (Fonte: Gruber-Dorninger et al., 2019; tratta da Maphaisa et al., 2025). AF: aflatossine, FB: fumonisine, ZEN: zearalenone, DON: deossinivalenolo, OTA: ocratossina A, T-2: micotossina del gruppo A dei tricoteceni.

1.3 Effetti sulla salute

Gli effetti tossici delle micotossine dipendono dal grado di esposizione e dalle proprietà mutagene, teratogene e genotossiche di ciascun composto. Le conseguenze possono includere:

- Carcinogenicità: ad esempio il carcinoma epatico associato ad AFB₁.
- Immunosoppressione: indotta da aflatossine e ocratossina A.
- Disturbi gastrointestinali: come dolore addominale provocato dal DON.
- Disfunzioni endocrine: legate al consumo di ZEN.
- Ritardo della crescita: associato alla tossina T-2 (C.J. Amuzie et al., 2010, D. Liu et al., 2020, E. Song et al., 2014, D. Rašić et al., 2019).

L'esposizione cronica a più micotossine può inoltre generare effetti sinergici, amplificando il rischio per la salute umana e animale (H. Zhou et al., 2017, L.H. Sun et al., 2015).

Tabella 1. Effetti tossici delle micotossine in vari prodotti alimentari (Tradotta e adattata da Khan et al., 2024).

micotossine	Funghi	Cibo	Tossicità
Aflatossine B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ , M ₁ , e M ₂	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i> , <i>A. pseudotamarii</i> , <i>A. ochraceoroseus</i> e <i>A. bombycis</i>	Cereali, legumi, frutta, verdura e arachidi	Carcinoma epatocellulare, effetti mutageni e teratogeni AFM ₁ causando anomalie nello sviluppo fetale
Ocratossine (OTA, OTB, e da banco)	<i>A. ochraceus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>P. nordicum</i> , <i>P. viridicatum</i> e <i>P. verrucosum</i>	Cereali, legumi, frutta, verdura, noci	L'OTA presenta proprietà epatotossiche, neurotossiche, teratogene e nefrotossiche, causando nefropatia nei suini. L'OTA è associata a insufficienza renale, nefropatia interstiziale, tumori uroteliali e BEN negli esseri umani.
Fumonisine B ₁ , B ₂ , B ₃	<i>F. oxysporum</i> <i>F. nyagamai</i> <i>F. proliferatum</i>	Mais, fagioli, soia, sorgo, riso, avena	Inibizione della sintesi degli sfingolipidi Collegato ai tumori dell'esofago e del fegato negli esseri umani. Nelle scimmie, associato a ELEM. Nei cavalli, causando infiammazione respiratoria, le tossine T-2 e DON permeano le membrane cellulari, ostacolando il processo di traduzione attraverso l'interazione con i ribosomi.
Tricoteceni ad esempio, DON, T-2/HT-2 tossine	<i>F. graminearum</i> <i>F. culmorum</i> <i>F. poae</i> , <i>F. langsethiae</i> , <i>F. sporotrichoides</i> <i>Trichoderma</i> <i>Stachybotrys</i> <i>Tricotecio</i>	Mais, grano, orzo e alimenti di origine animale come uova, reni e latte	L'esposizione alle tossine T-2 causa ATA negli esseri umani. Inibisce inoltre la produzione di DNA, RNA e proteine, causando apoptosi, perossidazione lipidica e citochinesi.
Zearalenone	<i>F. cerealis</i> <i>F. graminearum</i> <i>F. equiseti</i> , <i>F. culmorum</i> e <i>F. verticilloides</i>	Mais, grano, avena, orzo, segale	Lo ZEN induce cancro al fegato, tumori all'utero e adenoma tiroideo nei ratti. Lo ZEN causa atrofia testicolare, retinopatia, nefropatia e cataratta nei ratti. ZEN regola l'espressione enzimatica nei percorsi biosintetici.
Patulina	<i>P. expansum</i> <i>P. patulum</i> <i>P. urticae</i> <i>P. crustosum</i> <i>P. griseofulvum</i>	Mele, prodotti a base di mele, cereali, legumi, semi, frutta, noci, verdure	Il PAT induce effetti cancerogeni, mutageni, teratogeni e neurotossici negli esseri umani. Il PAT mostra proprietà immunotossiche e neurotossiche negli animali.

1.4 Descrizione delle principali micotossine

Dopo aver delineato l'importanza delle micotossine come minaccia per la sicurezza alimentare e la salute pubblica, nei paragrafi successivi saranno approfondite le caratteristiche chimiche, i meccanismi di tossicità e gli effetti clinici delle principali micotossine quali: aflatossine, ocratossina A, fumonisine, tricoteceni, zearalenone e patulina, al fine di fornire una visione completa e chiara del loro impatto.

1.5 Aflatossine

Le aflatossine (AF) rappresentano uno dei gruppi di micotossine più studiati, con circa venti varianti identificate (F. Malíř et al., 2003, J. Patocka et al., 2018, V. Ostry et al., 2017). Tra queste, AFB₁, AFG₁, AFM₁ e AFRO rivestono particolare rilevanza per la salute pubblica. Sono prodotte principalmente da *A. flavus* e *A. parasiticus* in ambienti caldi e umidi, tipici delle aree tropicali e subtropicali. Cereali come grano, mais e orzo, insieme ad arachidi e altri semi oleosi, risultano particolarmente vulnerabili, soprattutto in condizioni di stress da siccità, danni da insetti e conservazione inadeguata (J.C. Frisvad et al., 2019, R. Khan et al., 2021). La loro scoperta risale al noto episodio della “malattia del tacchino X” (1969), che mise in evidenza la correlazione tra farina di arachidi contaminata e gravi perdite negli allevamenti avicoli (M. Harčárová et al., 2018). Le aflatossine sono associate a epatotossicità, immunotossicità, mutagenicità, cancerogenicità e teratogenicità (P. Kumar et al., 2017, D.L. Eaton et al., 2013). L'aflatossicosi colpisce principalmente il fegato (S. Amaike et al., 2011), causando necrosi epatica in caso di esposizione acuta e degenerazione cronica, fibrosi o cirrosi in caso di esposizione prolungata (Y.Y. Gong et al., 2016, R. Khan et al., 2020). Tra le varianti, l'AFB₁ è la più pericolosa, classificata dall'IARC come cancerogeno umano di Gruppo 1 (J. Bennett et al., 2007). Il suo metabolismo porta alla formazione di intermedi reattivi, come l'AFB₁ 8,9-epossido (AFBO), in grado di legarsi al DNA e alle proteine, provocando mutazioni in geni chiave quali p53 (R. Khan et al., 2021). Gli effetti clinici comprendono stress ossidativo, danni al DNA, epatocarcinoma, immunosoppressione e sintomi acuti quali dolore addominale, diarrea, ittero e anoressia (E.O. Da Silva et al., 2018). Episodi documentati, come quello in Kenya (2004-2005), hanno causato oltre 150 decessi per aflatossicosi acuta (M.N. Okioma et al., 2008). L'esposizione cronica a basse dosi è correlata a epatocarcinoma, crescita stentata, teratogenicità e aumento del rischio di rachitismo ed enteropatie nei bambini (S. Marchese et al., 2018, H.L. Meiselman et al., 2022).

1.6 Ocratossina A

L'ocratossina A (OTA) è prodotta da diverse specie di *Aspergillus*, tra cui *A. ochraeus*, *A. niger*, *A. alliaceus* e *A. glaucus* (F. Malir et al., 2016). Contamina cereali, caffè, cacao, uva, formaggi e prodotti derivati (Tabella 1), con maggiore incidenza nelle regioni tropicali e subtropicali (A.A. Ismaiel et al., 2015). Gli effetti tossici dell'OTA comprendono nefrotossicità, immunotossicità, mutagenicità, teratogenicità e neurotossicità (M.E.B da Rocha et al., 2014, A. Pfohl-Leszkowicz et al., 2007). La micotossina viene assorbita principalmente a livello gastrointestinale (fino all'85% nell'uomo) (D. Dietrich et al., 2005), si lega all'albumina plasmatica e viene metabolizzata in OTA α , escreta poi con urine e feci (M. Zingerle et al., 1997). La sua modalità d'azione come cancerogeno è ancora oggetto di dibattito: studi sperimentali hanno evidenziato sia effetti nefrotossici che cancerogeni (A.H. Heussner et al., 2015), mentre la genotossicità sembra essere mediata indirettamente da stress ossidativo. L'ocratossicosi negli animali da allevamento (suini, ratti, polli) conferma la gravità del rischio per la salute umana.

1.7 Fumonisine

Le fumonisine (FMN) sono prodotte principalmente da specie di *Fusarium*, tra cui *F. verticillioides*, *F. moniliforme* e *F. oxysporum* (S. Marin et al., 2013, M. Kamle et al., 2019). Le varianti più comuni sono FB₁ e FB₂, presenti soprattutto nel mais e nell'uva (Figura 2). Le fumonisine sono altamente tossiche per il bestiame: nei cavalli causano la leucoencefalomalacia equina (ELEM), una patologia neurologica fatale (D.P. Morgavi et al., 2007); nei suini sono associate a infiammazione polmonare e disfunzioni cardiache; nei roditori a epatocarcinoma (W.C.A. Gelderblom et al., 2012). L'IARC ha classificato FB₁ e FB₂ come possibili cancerogeni umani (Gruppo 2B) (K. De Ruyck et al., 2015). Il meccanismo d'azione di FB₁ è legato all'inibizione della sintesi della ceramide, con conseguente alterazione dei processi cellulari, apoptosi e danni epatici e renali (S. Bouhet et al., 2004, R.T. Riley et al., 2019). Studi recenti hanno evidenziato anche il coinvolgimento dei recettori nucleari LXR α e β , con effetti sul metabolismo del colesterolo (M. Régnier et al., 2017). Nell'uomo, il consumo di mais contaminato da fumonisine è stato correlato a un aumento del rischio di carcinoma esofageo (L. Claeys et al., 2020).

1.8 Tricoteceni

I tricoteceni sono sesquiterpeni ciclici prodotti da funghi come *Fusarium*, *Trichothecia* e *Stachybotrys* (S. Marin et al., 2013, R. Bhat et al., 2010). Si distinguono in quattro gruppi principali (A, B, C e D) (Figura 2), con ampia diffusione nei cereali quali avena, mais e orzo. Queste micotossine inibiscono la sintesi proteica, causando disfunzioni cellulari, morte cellulare e immunosoppressione (S.P. McCormick et al., 2011, F. Fung et al., 2004). Le tossine T-2 e HT-2 sono particolarmente pericolose: danneggiano il tratto gastrointestinale e l'epitelio cutaneo, provocando nausea, vomito e diarrea. L'esposizione cronica aumenta la suscettibilità alle infezioni, mentre l'ingestione di pane contaminato da T-2 è stata associata ad aleucemia tossica alimentare (ATA), caratterizzata da sintomi gravi quali necrosi, emorragie cutanee, convulsioni e morte (E. Wambacq et al., 2016). La tossina T-2 può penetrare anche per via cutanea o inalatoria, causando necrosi, ustioni e danni alle vie respiratorie (P.D. Anderson et al., 2012, B.G. Dorner et al., 2016). Al contrario, il deossinivalenolo (DON), pur non essendo classificato come cancerogeno (Gruppo 3 IARC), esercita effetti nocivi sull'intestino superiore (W. Schelstraete et al., 2020), inducendo stress ribotossico, risposte infiammatorie e apoptosi (D. Payros et al., 2016). L'esposizione acuta al DON provoca vomito e anoressia, mentre quella cronica è associata a lesioni intestinali e modulazione immunitaria (M. Maresca et al., 2008, P. Pinton et al., 2008, B. Grenier et al., 2013).

1.9 Zearalenone

Lo zearalenone (ZEN) è una micotossina prodotta da funghi del genere *Fusarium* che contaminano principalmente grano, riso, mais e avena (Figura 2). Le specie maggiormente coinvolte nella sua sintesi sono *F. moniliforme*, *F. verticillioides*, *F. oxysporum* e *F. equiseti*. Oltre ai cereali, lo ZEN può essere presente anche in prodotti come cioccolato e alcuni frutti (Tabella 1). Dopo l'ingestione, lo ZEN viene assorbito soprattutto a livello del tratto intestinale prossimale e metabolizzato in derivati con attività estrogenica fino a sessanta volte superiore rispetto alla molecola madre (H. Steinkellner et al., 2019). Il meccanismo d'azione è legato al legame con i recettori degli estrogeni, che determina un effetto iperestrogenico e interferenze con il sistema endocrino (A. Kowalska et al., 2017). L'esposizione a concentrazioni elevate di ZEN provoca stress ossidativo e citotossicità, con effetti che dipendono dalla sensibilità dell'organo bersaglio agli estrogeni e dalle condizioni di esposizione (I. Hennig-Pauka et al., 2018). Studi condotti sui suini, utilizzati come modello animale, hanno evidenziato alterazioni dell'apparato riproduttivo quali iperplasia, infertilità e squilibri ormonali. Nell'uomo, l'esposizione a ZEN è stata associata a iperplasia endometriale e a un aumento del rischio di

carcinoma mammario. Oltre agli effetti sull'apparato riproduttivo, lo ZEN può compromettere anche fegato, reni, cellule immunitarie e tessuto intestinale (P. Chen et al., 2017, H.S. Schmidt et al., 2018).

1.10 Patulina

La patulina (PAT) è una micotossina prodotta da diverse specie fungine, tra cui *P. expansum*, *P. crustosum*, *P. patulum* e *A. clavatus* (Figura 2). È frequentemente riscontrata nelle mele e nei prodotti derivati, come succhi e puree (M.S. Tapia et al., 2020). Per ridurre il rischio di esposizione, le autorità di regolamentazione hanno stabilito un limite massimo di 10 µg/L per il PAT nelle bevande a base di frutta (H.P. Egmond et al., 2007). L'assunzione di PAT varia in funzione dell'età e delle abitudini alimentari: negli adulti l'intervallo medio di esposizione è compreso tra 0,63 e 21,2 ng/kg di peso corporeo/giorno (K. Vin et al., 2020). Nei succhi di frutta sono stati rilevati livelli massimi pari a 50 µg/kg per gli adulti e 10 µg/kg nei prodotti destinati a neonati e bambini. Attualmente, il PAT è classificato dall'IARC nel Gruppo 3, indicando che non vi sono prove sufficienti per definirlo cancerogeno per l'uomo. Studi sperimentali hanno dimostrato che circa il 50% della patulina ingerita viene assorbita nello stomaco, metabolizzata a livello epatico e renale ed eliminata attraverso le urine (M. Boussabbeh et al., 2015). Gli effetti tossici derivano dalla formazione di legami covalenti con gruppi sulfidrilici, che inducono stress ossidativo, apoptosi e riduzione della vitalità cellulare (J. Tannous et al., 2017, R. Mahfoud et al., 2002). Dosi elevate possono determinare tossicità acuta, con danni renali, congestione polmonare, ulcerazioni, convulsioni, edema e infiammazione gastrointestinale (S.A. Lewis et al., 1995). Negli animali, l'esposizione a PAT è stata correlata a perdita di peso, riduzione dell'assunzione di cibo, aumento della mortalità e malformazioni scheletriche nei topi (J.C. Frisvad et al., 2018). La classificazione cancerogena della patulina è attualmente oggetto di revisione, poiché i dati disponibili risultano ancora insufficienti (O. Puel et al., 2010). Pertanto, ulteriori studi sono necessari per chiarirne la tossicità e i potenziali rischi per la salute. In questo contesto, la comprensione dei profili tossicologici delle micotossine e l'affidabilità dei metodi di rilevazione risultano fondamentali per valutare correttamente i pericoli e adottare strategie di prevenzione e mitigazione. La scelta della tecnica analitica dipende dalla micotossina target, dalla matrice alimentare, dalla sensibilità e dalla specificità richieste. Un monitoraggio costante e sistematico è essenziale per garantire la sicurezza dei prodotti alimentari e tutelare la salute di consumatori e animali.

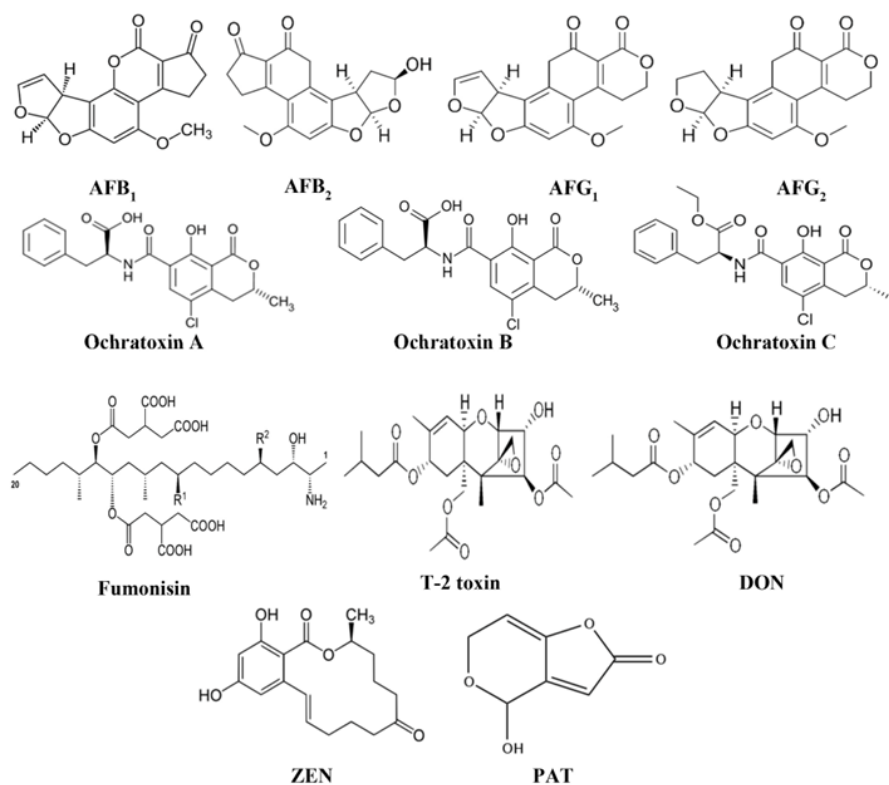


Figura 2. Struttura chimica delle principali micotossine (Khan et al., 2024).

Capitolo 2

METODI DI RILEVAMENTO DELLE MICOTOSSINE:

La conformità alle normative legali sulle micotossine richiede l'implementazione di pratiche agricole adeguate, il rispetto delle condizioni di stoccaggio regolamentate e il mantenimento di procedure igieniche nella trasformazione degli alimenti. L'analisi routinaria dei prodotti è obbligatoria a causa dei complessi percorsi di contaminazione. La rilevazione delle micotossine, per garantirne la presenza entro i limiti di legge, è dunque cruciale a causa della loro tossicità.

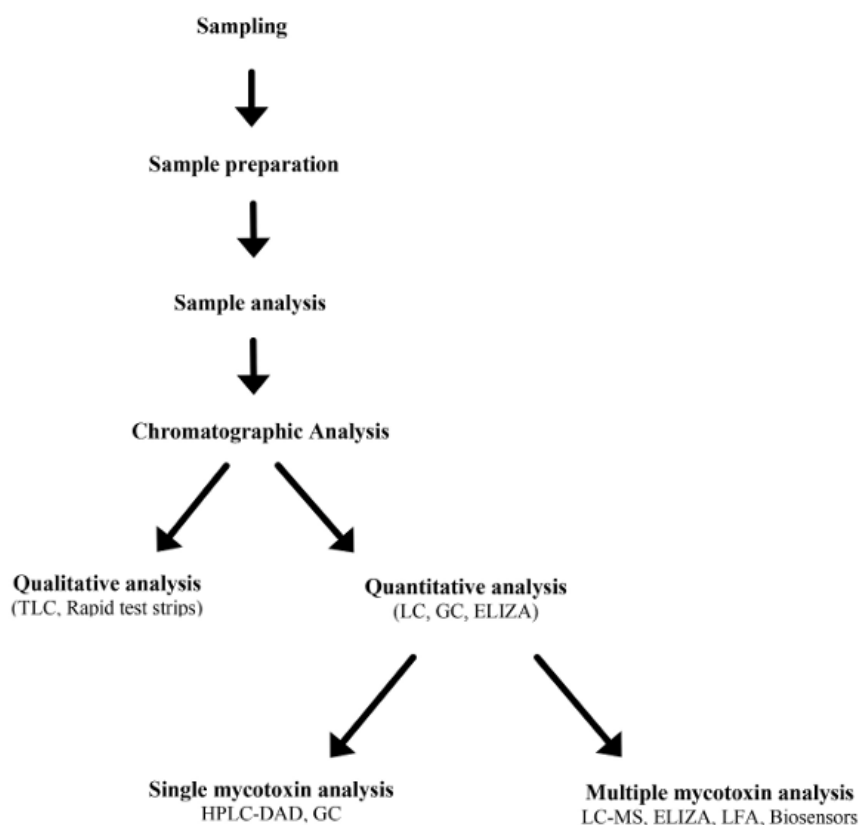


Figura 3. Diagramma di flusso dei passaggi coinvolti nell'analisi delle micotossine mediante tecniche cromatografiche (Khan et al., 2024).

2.1 Preparazione del campione

Il campionamento rappresenta il primo passaggio nell'analisi delle micotossine e la necessità di ottenere un campione rappresentativo è di fondamentale importanza (Figura 3). La contaminazione, infatti, non è omogenea e può concentrarsi in aree circoscritte (W. Ala et al., 2023, F. Cheli et al., 2009). È quindi essenziale preparare un campione rappresentativo utilizzando metodi analitici idonei per estrarre le micotossine dalla matrice. Le strutture molecolari eterogenee delle micotossine e le loro diverse proprietà chimiche e fisiche (solubilità in solventi polari e non polari) rendono complessa l'estrazione simultanea. La solubilità in acqua di DON, ZEN, AFB₁ e OTA è rispettivamente pari a 16 µg/mL, 100 µg/mL, 55 mg/mL e 0,4 µg/mL, evidenziando la difficoltà di estrarre contemporaneamente più micotossine utilizzando acqua (P. Karlovsky et al., 2016). L'estrazione con solventi organici come etanolo, metanolo, acetonitrile o cloroformio è ampiamente utilizzata nel settore alimentare (H. Bart et al., 2020, M. Britzi et al., 2013, C. Juan et al., 2005). Tuttavia, l'impiego di solventi tossici dovrebbe essere ridotto al minimo per limitare i rischi ambientali e per la salute dei consumatori. Oltre al metodo QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) ossia una tecnica di estrazione in fase solida dispersiva (dSPE) sviluppata per estrarre residui multipli di pesticidi da frutta e verdura, recentemente è stata applicata anche all'analisi delle micotossine. Tale metodologia garantisce vantaggi come velocità, facilità di esecuzione e il minimo fabbisogno di solventi e i costi di esecuzione. L'estrazione viene in genere eseguita utilizzando acetonitrile, che è compatibile sia con GC che con LC. La procedura QuEChERS (Figura 4) è solitamente un processo in due fasi:

- estrazione del campione.
- SPE dispersiva.

Il campione viene omogeneizzato per massimizzare l'area superficiale e inserito nella provetta di estrazione contenente MgSO₄ e acetato di sodio. I sali assicurano che, dopo l'aggiunta di acetonitrile, venga indotta una separazione di fase tra acqua e solvente organico. La provetta viene quindi tappata, agitata energicamente e centrifugata. La seconda fase del metodo QuEChERS utilizza la SPE dispersiva, che prevede il trasferimento di una porzione dell'estratto di acetonitrile in una provetta di purificazione contenente una combinazione di assorbenti per la rimozione dei componenti indesiderati del campione. La miscela di assorbenti contiene sempre PSA (ammina primaria e secondaria) per eliminare zuccheri e acidi grassi, e MgSO₄ come agente disidratante (Lucci, 2025). Oltretutto sono stati sviluppati approcci privi di solventi. Polimeri come il polietilenglicole, detergenti e solubilizzanti proteinogenici (albumina sierica bovina, BSA) possono essere impiegati per l'estrazione con vapore

surriscaldato. Queste sostanze sono utilizzate anche in kit commerciali, come quelli di Romer Labs (R. Perestrelo et al., 2019, P. Aqai et al., 2011). Inoltre, composti naftalinici, in particolare l'acido naftalene-1,5-disolfonico, possono estrarre micotossine dai campioni grazie alle loro proprietà idrofobiche (D. Jiang et al., 2020). La preparazione del campione deve produrre una soluzione in cui le micotossine siano completamente isolate (V. Betina et al., 1985, P. Scott et al., 1970). La contaminazione può essere calcolata in ng/g confrontando i valori con la concentrazione dell'estratto in ng/mL di tampone di estrazione (R. Khan et al., 2021).

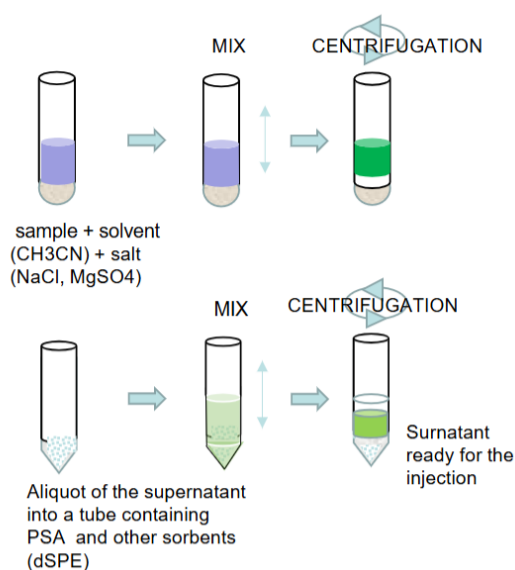


Figura 4. Schematizzazione metodo QuEChERS (Tratto da: Lucci, 2025).

2.2 Analisi del campione

Le micotossine possono essere identificate e quantificate attraverso diversi metodi cromatografici di rilevazione, tra cui TLC, GC e HPLC accoppiati a MS/MS. Tecniche immunologiche, tra cui ELISA o metodi di test rapidi immunoanalitici come le strisce reattive (LFA), stanno diventando sempre più diffuse per rilevare questi composti.

2.2.1 Analisi cromatografica

La TLC è un approccio economico per l'analisi delle micotossine in diversi campioni di alimenti e mangimi (Figura 5). Consiste nello sciogliere le micotossine estratte in un solvente e nell'applicarle su una piastra rivestita di gel di silice (P. Scott et al., 1970). Le micotossine polari si adsorbono in superficie, consentendone la separazione e la rilevazione tramite segnali

UV o fluorescenza. Grazie ai progressi nei metodi cromatografici, GC e HPLC hanno progressivamente sostituito la TLC, garantendo maggiore sensibilità e riproducibilità (R. Khan et al., 2021). La GC è utile per l'analisi di sostanze organiche volatili (benzeni ed etani), ma non è adatta alle micotossine a causa della loro bassa volatilità e dell'elevata polarità (G.S. Shephard et al., 2016). Per questo motivo, è necessaria la derivatizzazione, che ne aumenta la volatilità e ne consente l'analisi. L'accoppiamento della GC con la spettrometria di massa (GC-MS) permette un rilevamento preciso delle micotossine dopo derivatizzazione (R. Montes et al., 2012). La cromatografia liquida (Figura 6) è oggi considerata il metodo ottimale, grazie alla capacità di gestire carichi di lavoro maggiori senza derivatizzazione o modifiche chimiche. La spettrometria di massa (MS) o la spettrometria di massa tandem (MS/MS) separa efficacemente le micotossine in base al loro rapporto massa/carica, consentendo di rilevarle simultaneamente (H.U. Melchert et al., 2004). Questo approccio permette di individuare tossine anche al di sotto dei limiti di legge, analizzando il segnale dell'area del picco con elevata sensibilità e affidabilità (C. Juan et al., 2012, M. Sulyok et al., 2020, E. Beltrán et al., 2009). Tuttavia, GC e LC presentano limiti legati ai costi elevati delle apparecchiature e alla necessità di personale qualificato.

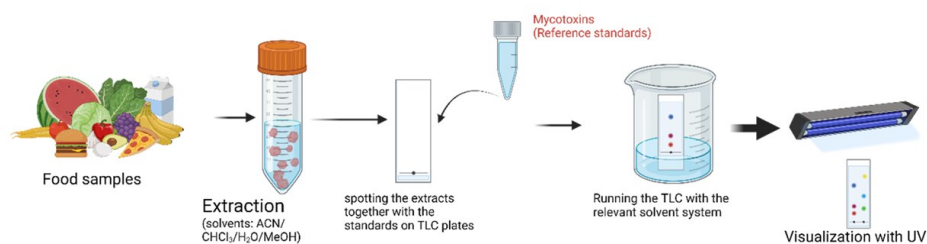


Figura 5. Schematizzazione della TLC (Maphaisa et al., 2025).

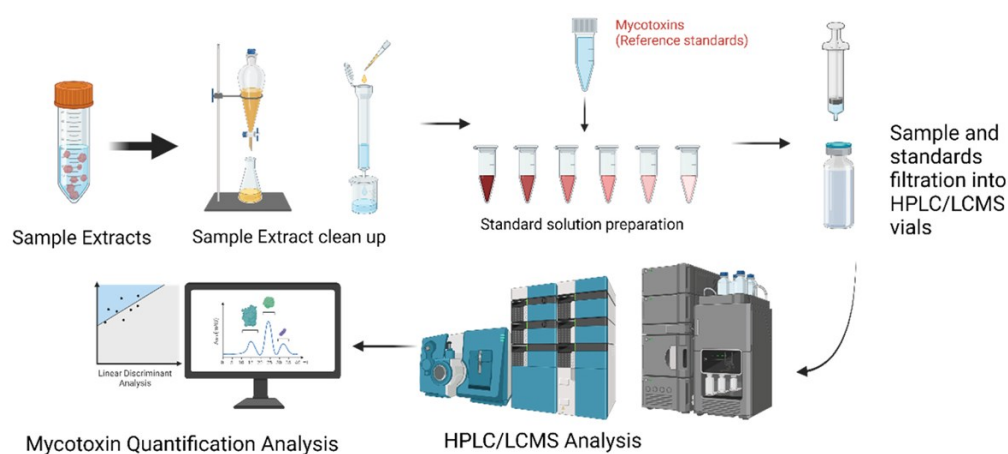


Figura 6. Schematizzazione HPLC/LC-MS (Maphaisa et al., 2025).

2.2.2 Analisi immunologica

Per ovviare alle criticità delle tecniche cromatografiche, sono stati sviluppati metodi alternativi come i saggi immunologici (ELISA e LFA), che rappresentano soluzioni economiche, intuitive e rapide per la rilevazione e la quantificazione delle micotossine. Questi si basano sul principio del legame antigene-anticorpo: l'ELISA richiede la conversione di un substrato per la rilevazione, mentre l'LFA si fonda sull'accumulo specifico di particelle d'oro. Questi approcci, grazie alla loro semplicità e rapidità, stanno trovando crescente applicazione nel monitoraggio delle micotossine, soprattutto in contesti di analisi in loco.

Tabella 2. Metodi per la determinazione delle micotossine (Tradotta e adattata da Khan et al., 2024).

Metodo di rilevamento	Descrizione	micotossine	LOD
ELISA			
Saggio multiplex basato su QD	Utilizzo di QD basati su CdSe con dimensioni variabili	DON, ZEN, AFB ₁	3,2 µg/kg, 0,6 µg/kg, 0,2 µg/kg
Anticorpi monoclonali (MAb) in ELISA	Utilizzo di MAb in ELISA	AFB ₁	0,5–25 ng/mL
basato su rAb con fusioni di reporter	ELISA basato su rAb con fusioni rAb-reporter	AFB ₁ , OTA, ZEN	0,38 ng/mL, 10 µg/kg, 12 µg/kg
Saggio di fusione della nanoluciferasi (Nluc)	Utilizzo della nanoluciferasi (Nluc) come tracciante luminescente	Tenuazonico acido	8,60 ng/mL
ELISA a base di aptameri	Saggio di assorbimento dell'aptamero legato all'enzima (ELASA)	OTA	1 ng/mL
Micropiastra modificata	Piastra rivestita con antigeni o filamenti di DNA complementari in ELISA competitivo indiretto (icELISA) Aptameri funzionalizzati con varie molecole reporter (ad esempio, HRP, trombina, fluoresceina)	OTA, OTB	1 ng/ml, 0,8 ng/ml
Tecniche			
Funzionalizzazione dell'aptamero		AFB ₁ , OTA, ATP	22:00, 20:00, 20 nm
Recettori peptidici nei mimotopi peptidici dcELISA	Progettazione di un dcELISA basato su peptidi per il rilevamento di OTA Peptidi che imitano gli epitopi utilizzati come alternative valide ai coniugati micotossina-proteina nei test immunoenzimatici competitivi dcULISA	OTA, ZEN	2 µg/L, 20 pg/ml
Saggio basato su nanoparticelle MIP (MINA) LFA	Sensibilità 22 volte superiore rispetto all'ELISA mediante mAb.	FB ₁	13:9
Nanoparticelle d'oro rivestite con PDA (AuNP) LFA	LFA a base di AuNP rivestite con PDA	ZEN	7,4 pg/mL
AuNP e fluorescenza risolta nel tempo	AuNP e microsferi fluorescenti risolte nel tempo (TRFM) come etichette di segnale	AFB ₁ , ZEN, AFB ₁ , ZEN	0,59 ng/ml, 0,24 ng/ml, 0,9 ng/ml
Striscia immunocromatografica a base di LFAs a microsferi utilizzando nanocorpi anti-idiotipici (Aldnb)	Nanocorpi anti-idiotipici (Aldnb) come antigeni surrogati	AFB ₁ , ZEN	0,59 ng/mL, 0,24 ng/mL
peptide visualizzato dal fago e peptide-Fusione MBP	Peptide visualizzato dal fago e fusione peptide-MBP	FB ₁ , ZEN, OTA	0,25 ng/ml, 3,0 ng/ml, 0,5 ng/ml
LFA basati su aptameri		AFB ₁ , ZEN, OTA	20 ng/mL

2.2.3 Saggio immunoenzimatico (ELISA)

L'ELISA è una tecnica immunologica largamente impiegata per la determinazione delle micotossine (Figura 7) (A.E. Urusov et al., 2014, A.E. Urusov et al., 2010, R.J. Schneider et al., 2003). Sono disponibili due formati competitivi: l'ELISA competitivo diretto (dcELISA) e l'ELISA competitivo indiretto (icELISA). Nel dcELISA la micotossina presente nel campione compete con i coniugati analita-enzima per il legame con l'anticorpo anti-micotossina sulla piastra di saggio; nell'icELISA, invece, vengono immobilizzati coniugati analita-proteina su una micropiastra. L'anticorpo principale, diretto contro la micotossina, può essere marcato direttamente con un enzima oppure rilevato tramite un anticorpo secondario coniugato a enzima, così da facilitare lo sviluppo del colore. La perossidasi di rafano (HRP) è comunemente utilizzata per catalizzare l'ossidazione della tetrametilbenzidina (TMB) da parte del perossido di idrogeno, generando una colorazione blu. La fosfatasi alcalina (AP) mostra maggiore stabilità e sensibilità rispetto all'HRP, ma comporta un costo più elevato. Per amplificare il segnale sono stati introdotti diversi reporter, tra cui poliHRP, fluorofori, biglie magnetiche funzionalizzate e nanoparticelle luminose a conversione positiva (D. Tang et al., 2009, D. Tang et al., 2009, M. Pastucha et al., 2019). La glucosio ossidasi (GOx) è stata utilizzata come reporter per convertire il glucosio in acido gluconico e perossido di idrogeno (H_2O_2) utilizzando ossigeno molecolare (S. Zhan et al., 2019). L'HRP catalizza la conversione di H_2O_2 in radicali idrossilici, stimolando l'aggregazione delle nanoparticelle d'oro (AuNPs) attraverso la tiramina. Questo processo ha portato a variazioni cromatiche e modifiche nell'intensità della diffusione dinamica della luce (DLS), misurabili con un analizzatore DLS (N. Beloglazova et al., 2014). I punti quantici (QDs) di diverse dimensioni producono colori distinti, consentendo lo sviluppo di saggi multiplex su micropiastra per la rilevazione simultanea di più micotossine. Beloglazova et al. (2014) hanno sintetizzato QDs a base di seleniuro di cadmio (CdSe) con spettri di emissione variabili e sviluppato un saggio multiplex a doppio analita (DAM) in grado di rilevare contemporaneamente AFB₁ e ZEN. Sono stati inoltre progettati anticorpi monoclonali (MAbs) per l'ELISA, destinati alla rilevazione di AFB₁, OTA, FB₁, T-2/HT-2, DON, ZEN, PAT e citrinina (CIT). Un vantaggio significativo degli ELISA basati su anticorpi ricombinanti (rAb) consiste nella possibilità di creare fusioni rAb-reporter tramite ingegneria genetica, evitando la produzione chimica di coniugati anticorpo-reporter o la dipendenza da anticorpi secondari disponibili in commercio (Q. Lu et al., 2020, Y. Sheng et al., 2019). Gli aptameri possono essere utilizzati come bioricettori nei saggi su micropiastra, in particolare nell'enzyme-linked aptamer sorbent assay (ELASA). La tecnica di immobilizzazione degli aptameri sulla piastra

è cruciale per preservarne l'affinità di legame: un aptamero biotinilato può essere fissato su superfici streptavidina/avidina, e le micropiastre modificate sono ampiamente utilizzate per mantenere tale affinità (L. Barthelmebs et al., 2011). Gli aptameri possono essere funzionalizzati con molecole reporter come HRP, trombina o fluoresceina, riducendo i tempi di rilevazione e aumentando la sensibilità del saggio (Y. Li et al., 2019, L. Sun et al., 2019, Z. Wu et al., 2020). Sono stati inoltre sviluppati recettori peptidici come sostituti degli anticorpi. Bazin et al. (2013) hanno realizzato un dcELISA peptidico per la rilevazione dell'OTA, immobilizzando il peptide anti-OTA NFO₄; il test ha rilevato concentrazioni fino a 2 µg/L in campioni di vino, dimostrando elevata sensibilità. Altri peptidi mimano epitopi e fungono da alternative ai coniugati micotossina-proteina, la cui sintesi può risultare complessa e rischiosa. Per questo motivo, i peptidi esposti da fagi (mimotopi) sono stati proposti come soluzione più economica e semplice da ingegnerizzare (Y. Xiong et al., 2020). Diversi mimotopi peptidici sono stati utilizzati per la determinazione di AFB₁, ZEN, OTA, FB₁ e DON (J. Yan et al., 2019). Infine, i polimeri a impronta molecolare (MIP) sono stati suggeriti come sostituti degli anticorpi primari nello sviluppo di ELISA biomimetici o pseudo-ELISA (S.A. Piletsky et al., 2000, S. Wang et al., 2009). L'immobilizzazione dei MIP sulla micropiastre è cruciale per definire un sistema biomimetico. Chianella et al. (2013) hanno introdotto un approccio innovativo basato su nanoparticelle MIP, simile all'adsorbimento fisico degli anticorpi (L. Cenci et al., 2018). Munawar et al. (2019) hanno sviluppato un saggio basato su nanoparticelle MIP (MINA) per la rilevazione di FB₁, mostrando una sensibilità 22 volte superiore rispetto a un ELISA con anticorpi monoclonali (Tabella 2). Le micropiastre rivestite con MIP hanno inoltre dimostrato maggiore stabilità e sensibilità, risultando adatte alla conservazione e al trasporto a temperatura ambiente.

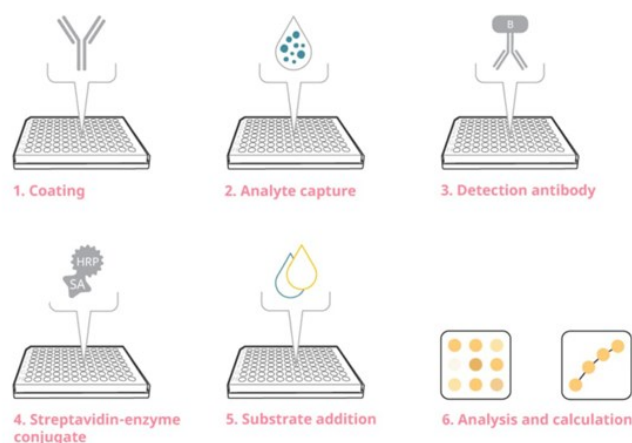


Figura 7. Fasi generali di lavoro dell'ELISA (Fonte: Step-by-step guide to ELISA, Mabtech, n.d.; tratta da Maphaisa et al., 2025).

2.2.3.1 Saggio a flusso laterale (LFA)

Gli LFA sono stati ampiamente utilizzati nei test diagnostici in diversi campi, tra cui medicina, scienze veterinarie e ambiente. Essi consentono l'analisi degli analiti con approcci qualitativi e quantitativi, garantendo tempi di rilevazione più brevi e procedure più semplici rispetto ai saggi basati su micropiastra (Figura 8). I ricercatori hanno sviluppato LFA utilizzando anticorpi policlonali (pAbs) e monoclonali (mAbs) per la rilevazione delle micotossine. Il test consiste nell'applicare un piccolo campione su una striscia, permettendo agli analiti di attraversare la membrana. Dopo un certo intervallo compare una linea di test (T-line), che indica risultati qualitativi o semi-quantitativi. La quantificazione può essere ottenuta anche mediante un lettore ottico. Le nanoparticelle d'oro (AuNPs) sono state impiegate come marcatori nei LFA grazie ai loro vantaggi: colore rosso evidente, elevata stabilità, produzione semplice e bassa tossicità (M. Yin et al., 2020). Xu et al. (2019) hanno sviluppato nanoparticelle d'oro rivestite con polidopamina (PDA) per migliorare l'intensità cromatica e la sensibilità del LFA nella rilevazione della ZEN nel mais. Le AuNPs rivestite con PDA hanno mostrato maggiore stabilità, ridotta aggregazione e una colorazione più brillante. Il saggio per la rilevazione delle micotossine ha evidenziato un limite di rilevazione (LOD) di 7,4 pg/mL, dieci volte inferiore rispetto al LFA basato su AuNPs (D. Calabria et al., 2021, P. Tripathi et al., 2018). Sono stati inoltre utilizzati diversi agenti di rilevazione per la generazione del segnale, come i QDs, nanoparticelle a conversione ascendente (UCNPs), nanoparticelle magnetiche e coloranti luminescenti nel vicino infrarosso (NIR) (Y. Jin et al., 2021). Parallelamente, sono stati sviluppati LFA multiplex, capaci di rilevare simultaneamente fino a sei diverse micotossine. Li et al. (2011) hanno sviluppato un LFA a fluorescenza risolto nel tempo (TRF) utilizzando due nanocorpi anti-idiotipici (Ald-Nbs) per la rilevazione di AFB₁ e ZEN nei prodotti a base di mais (Tabella 2). Il loro studio ha dimostrato che gli Ald-Nbs trattenevano efficacemente le sonde sulle T-line nei campioni negativi, mentre le tossine reagivano con la sonda mAb nei campioni positivi, riducendo la cattura sulle T-line (S. Xu et al., 2019). Yan et al. (2020) hanno impiegato una miscela di peptidi esposti su fagi (PDP) e peptidi basici della mielina (MBP) per creare un antigene mimetico, successivamente collocato sulla linea T (T-line). Inoltre, sono stati sviluppati LFA basati su aptameri per la rilevazione di AFB₁, OTA e ZEN. Wu et al. (2018) hanno ideato una striscia di test LF con aptameri per la rilevazione dello ZEN, basata sulla competizione tra la tossina e il DNA complementare. Shim et al. (2014) hanno costruito un saggio dipstick con aptameri per misurare i livelli di AFB₁, che si completa in 30 minuti e presenta un LOD di 0,1 ng/mL in soluzione tampone (Tabella 2). Gli aptameri offrono caratteristiche superiori e una maggiore rapidità rispetto

all'ELISA, rendendoli strumenti utili per il monitoraggio della contaminazione da micotossine negli impianti di trasformazione alimentare (V.L Pereira et al., 2014).

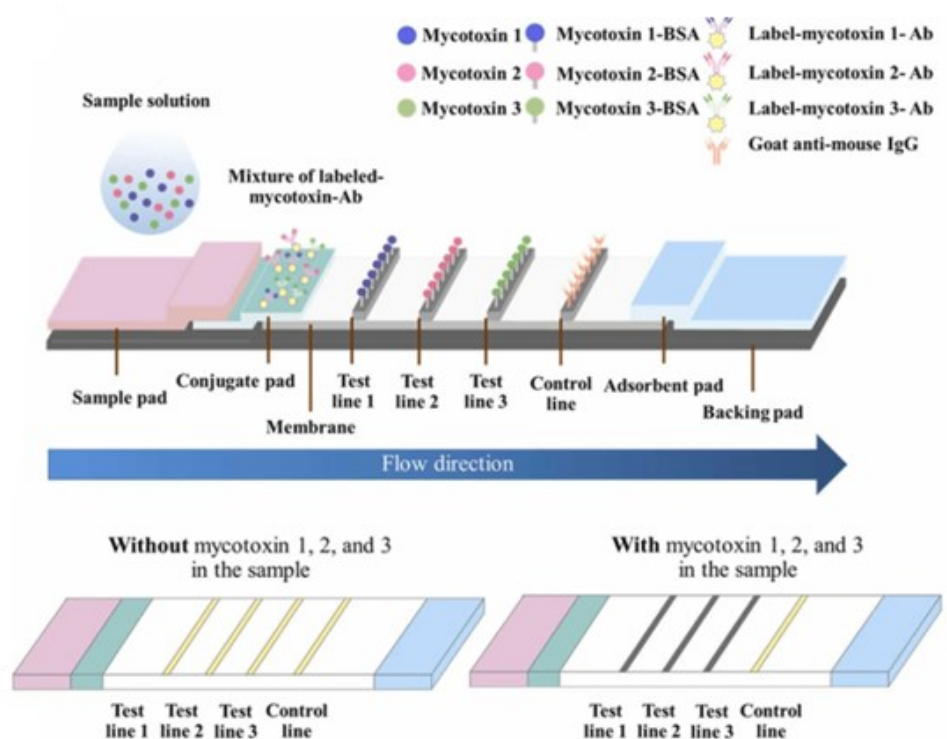


Figura 8. Passaggi LFA del meccanismo di rilevamento multi-target delle micotossine
(Fonte: Adunphatcharaphon et al., 2022; tratta da Maphaisa et al., 2025).

Capitolo 3

NUOVE TECNICHE DI RILEVAMENTO DELLE MICOTOSSINE

Negli ultimi anni, la comunità scientifica ha riconosciuto che i metodi cromatografici tradizionali e alcune tecniche immunochimiche non sono più sufficienti a soddisfare le esigenze attuali, caratterizzate dalla necessità di tempi di analisi più rapidi e dalla capacità di rilevare simultaneamente più micotossine con elevati livelli di accuratezza e affidabilità. Questa consapevolezza ha favorito lo sviluppo e l'adozione di nuove metodologie analitiche, tra cui i biosensori elettrochimici, oggi considerati tra le principali tecniche emergenti per il rilevamento delle micotossine (EMDTs) (Nihal P et al., 2024). Questi approcci innovativi sfruttano progressi significativi nei campi della spettroscopia, della metabolomica e della tecnologia dei sensori, con l'obiettivo di migliorare la sensibilità e la precisione delle analisi, superando al contempo i limiti intrinseci dei metodi convenzionali. Le EMDTs consentono inoltre il monitoraggio in tempo reale, permettendo una quantificazione estremamente accurata delle micotossine e garantendo tempi di risposta molto rapidi, un aspetto cruciale per assicurare la sicurezza alimentare lungo le diverse fasi della filiera. Tra le tecnologie più promettenti rientrano i biosensori elettrochimici, la risonanza magnetica nucleare quantitativa, le applicazioni nanotecnologiche, la spettroscopia basata su immagini e diverse piattaforme omiche. Questi strumenti avanzati ampliano significativamente le possibilità di rilevamento, rendendo possibile l'analisi di matrici alimentari complesse e la gestione di contaminazioni multiple (Fan et al., 2023).

3.1 I biosensori

I biosensori rappresentano dispositivi analitici di nuova generazione, progettati per rilevare specifiche risposte biologiche o chimiche e convertirle in un segnale misurabile proporzionale alla concentrazione della micotossina o dell'analita di interesse (Pisoschi et al., 2024). In genere, questi strumenti sono costituiti da due componenti principali: i biorecettori (elemento rivelatore) e i trasduttori (elemento che converte il segnale), come illustrato in Figura 9. I biorecettori costituiscono l'unità di riconoscimento biologico e interagiscono selettivamente con le tossine presenti nel campione. Tra i biorecettori più utilizzati nell'analisi delle

micotossine si annoverano enzimi, acidi nucleici, aptameri (molecole sintetiche), cellule intere e anticorpi (Szelenberger et al., 2024, Zhang et al., 2023). Negli ultimi anni, tali elementi sono stati integrati in diverse piattaforme di rilevamento, in particolare in tecniche immunochimiche ed elettrochimiche, con l'obiettivo di migliorarne accuratezza, specificità e rapidità (Fan et al., 2023). Le diverse tipologie di biosensori vengono classificate in base al meccanismo di trasduzione impiegato. I principali meccanismi attualmente disponibili includono trasduttori elettrochimici, termici, elettronici, gravimetrici e ottici (Figura 9). A loro volta, questi possono essere ulteriormente suddivisi in sottocategorie quali biosensori amperometrici, piezoelettrici, cromogenici, in fibra ottica e altri ancora (Pisoschi et al., 2024, Li et al., 2021, Hassan et al., 2024). Oltre ai biorecettori e ai trasduttori, i biosensori integrano anche componenti elettronici come amplificatori, processori e sistemi di visualizzazione. Questi moduli, collegati tra loro, hanno il compito di amplificare ed elaborare il segnale generato, rendendolo interpretabile e visualizzabile su un computer o su altri dispositivi di lettura (Ramesh et al., 2022).

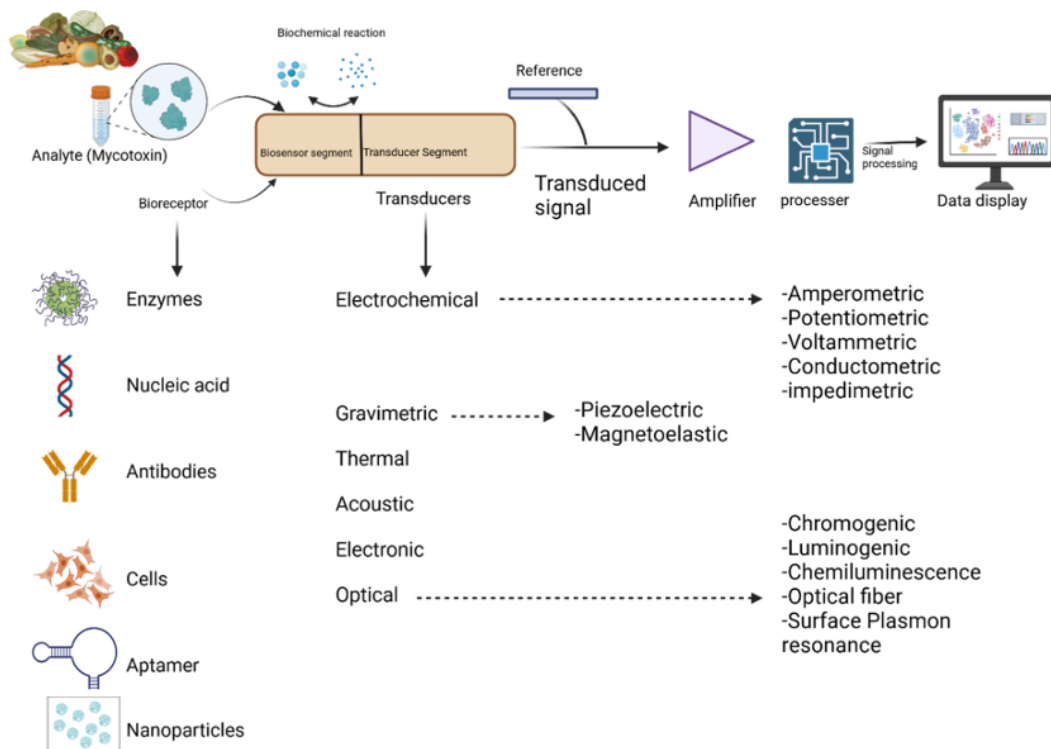


Figura 9. Diagramma di flusso di un biosensore per l'analisi delle micotossine (Maphaisa et al., 2025).

3.1.1 Biosensori elettrochimici

I biosensori elettrochimici (ECB) rappresentano una delle tecnologie più promettenti e performanti per l'analisi delle micotossine, grazie alla loro elevata efficienza e sensibilità (Kaur et al., 2023). Il principio di funzionamento degli ECB si basa sulla trasduzione elettrochimica dell'interazione biologica: quando l'analita o la micotossina si lega al biorecettore, viene generato un segnale elettrico proporzionale alla quantità o alla concentrazione della micotossina presente nel campione. I trasduttori impiegati nei biosensori elettrochimici appartengono a diverse sottoclassi, tra cui sensori amperometrici (che misurano variazioni di corrente associate a reazioni redox), potenziometrici e voltammetrici (che rilevano rispettivamente variazioni di potenziale e di tensione), oltre ai sensori conduttimetrici, basati sulle modifiche della conduttività elettrica (Hassan et al., 2024, Agriopoulou et al., 2020). Numerosi studi hanno dimostrato l'efficacia degli ECB nel rilevamento delle micotossine. Ad esempio, Lu et al. (2016) hanno identificato DON e FB₁ nel mais utilizzando questa tecnologia, ottenendo LOD pari a 8,66 e 4,2 ppm. In un altro lavoro, Solis et al. (2024) hanno confrontato il LOD ottenuto con un ECB e quello di un ELISA commerciale per la rilevazione della tossina T-2 nel grano, riportando valori rispettivamente di 0,10 e 10,0 µg/kg, evidenziando così una sensibilità nettamente superiore rispetto al metodo ELISA. Lo studio ha inoltre mostrato che l'ECB richiede tempi di analisi più brevi. Anche Pacheco et al. (2015) hanno confermato l'efficacia degli ECB rilevando l'OTA in bevande alla frutta come vino e birra, ottenendo recuperi fino al 105% senza necessità di trattamenti preliminari del campione. Negli ultimi anni, si sono sviluppate soluzioni innovative che integrano i sensori elettrochimici con dispositivi portatili, in particolare gli smartphone. Un esempio significativo è l'aptasensore voltammetrico portatile integrato nello smartphone per la rilevazione del PAT nei succhi. Il dispositivo opera monitorando le variazioni del segnale della sonda redox e, nei test condotti su succo di mela diluito, ha raggiunto un limite di rilevabilità di 0,47 pg/ml e un recupero fino al 93% (Erdem et al., 2024).

3.1.2 Biosensori ottici

I biosensori ottici (OB) hanno suscitato un crescente interesse nella ricerca dedicata alla sicurezza alimentare, oltre che in settori come la diagnostica clinica e il monitoraggio ambientale. A differenza dei ECB, che generano un segnale elettrico in seguito all'interazione tra analita e biorecettore, gli OB si basano su un principio ottico: l'evento di riconoscimento produce infatti un segnale ottico misurabile (Wei et al., 2022). Questi biosensori possono essere label-free (privi di etichetta) oppure label-based (basati su etichetta). I sistemi label-free

rilevano direttamente l'interazione analita-biorecettore, mentre quelli basati su etichetta impiegano marcatori come QDs, coloranti fluorescenti o tag chemiluminescenti, che emettono luce in presenza dell'analita (Damborský et al., 2016, Singh et al., 2023). I trasduttori utilizzati negli OB includono tecnologie come la risonanza plasmonica di superficie (SPR), la cromogenicità in fibra ottica, la luminogenicità e la chemiluminescenza (Dadmehr et al., 2025, Rasheed et al., 2024). Gli OB basati su etichetta sono stati ampiamente studiati e applicati per il rilevamento delle micotossine. Un esempio significativo è lo studio di Singh et al., (2022), in cui è stato sviluppato un OB fluorescente per la rilevazione dell'AFB₁. Il sistema impiegava un punto quantico di grafene sintetizzato (GQD), la cui fluorescenza veniva dalla micotossina AFB₁ utilizzata come quencher, permettendo così il rilevamento. La piattaforma ha mostrato un intervallo di rilevamento compreso tra 5-800 ng/ml, un LOD di 0,158 ng/ml e un recupero massimo del 106%. Analogamente, Jia et al. (2023) hanno sviluppato un biosensore portatile basato su aptameri in fibra ottica che sfrutta la chemiluminescenza per l'analisi simultanea di più micotossine. Il dispositivo ha consentito il rilevamento contemporaneo di OTA, AFB₁, FB₁ e ZEN, con un intervallo di rilevamento molto ampio (da pg/mL a 10⁵ pg/mL) e un LOD estremamente basso, compreso tra 0,015 e 0,043 pg/mL. I biosensori ottici label-free, come quelli basati su SPR, sono ampiamente utilizzati nei settori medico, alimentare e farmaceutico per la diagnosi e il rilevamento di contaminanti, incluse le micotossine. Questa tecnologia è spesso preferita perché evita l'uso di etichette che potrebbero alterare le proprietà di legame e introdurre errori sistematici. L'SPR rileva direttamente le variazioni dell'indice di rifrazione sulla superficie di un sensore metallico, consentendo un'analisi in tempo reale e senza etichetta (Damborský et al., 2016, Pandey et al., 2022). Un'applicazione rilevante è lo studio di Székács et al. (2021), che ha rilevato ZEN nel mais utilizzando OB label-free sia in formato diretto che competitivo. Ottimizzando la tecnica di immobilizzazione covalente, il formato competitivo ha raggiunto un LOD eccezionalmente basso di 0,002 pg/mL, con un intervallo dinamico compreso tra 0,01 e 1 pg/mL. Inoltre, l'elevata sensibilità e specificità del metodo ha permesso di distinguere ZEN da analoghi strutturali come alfa-ZEN (α -ZEN) e da micotossine non correlate.

3.1.3 Biosensori gravimetrici, acustici e termici

I biosensori gravimetrici (GMB) funzionano rilevando le variazioni di massa che avvengono sulla superficie del sensore. Il principio gravimetrico è generalmente associato a tecnologie basate su onde acustiche piezoelettriche e magnetoelastiche, capaci di misurare tali variazioni attraverso cambiamenti nella frequenza di risonanza (Agriopoulou et al., 2020). Tra le piattaforme più utilizzate rientrano la microbilancia a cristalli di quarzo (QCM) e i

dispositivi ad onde acustiche superficiali (SAW) (Majer-Baranyi et al., 2023). Come riportato da Jubeen et al. (2024), micotossine quali AFB₁ sono state rilevate mediante QCM piezoelettrica, ottenendo LOD estremamente bassi, fino a 0,01 ng/ml. In modo analogo, una revisione di Majer-Baranyi et al. (2021) ha documentato l'impiego della QCM piezoelettrica per il rilevamento di ZEN e di altre micotossine, tra cui T-2 e FB₁, con un LOD pari a 0,37 ng/mL e un intervallo operativo fino a 24,4 ng/mL. Secondo Pisoschi et al. (2024), la micotossina DON è stata rilevata utilizzando la tecnologia SAW, ottenendo una riproducibilità dei risultati compresa tra 4,03% e 16,48%. I biosensori termici, invece, si basano sulla misurazione dell'energia termica generata durante una reazione chimica. In uno studio condotto da Chen et al. (2020), è stata sviluppata una sonda fototermica capace di rispondere a stimoli termici e generare segnali multidimensionali. Tale interfaccia ha permesso il rilevamento della ZEN con un LOD estremamente basso, pari a $1,06 \times 10^{-7}$ ng/mL, e un intervallo lineare compreso tra 10^{-7} e 10^{-1} ng/mL, dimostrando il potenziale utilizzo di questa tecnologia in applicazioni on-site e persino per uso personale.

3.2 Nanotecnologie e nuove tecnologie nella rilevazione delle micotossine

La nanotecnologia rappresenta oggi uno degli approcci più innovativi per il rilevamento delle micotossine, grazie alla capacità di offrire livelli elevati di selettività, sensibilità e robustezza. L'impiego di nanomateriali tra cui nanoparticelle, nanofili e nanotubi di carbonio (CN) ha permesso lo sviluppo di sistemi analitici più performanti rispetto ai metodi tradizionali (Nihal P et al., 2024, Mousavi Nodoushan et al., 2019, Tang et al., 2022; Thiye et al., 2022). Un contributo rilevante deriva dalle nanoparticelle metalliche, come oro e argento, utilizzate come potenziatori nei moderni immunosensori. Un esempio significativo è quello di Zhou et al. (2024), che hanno impiegato nanoparticelle d'oro in un sensore a striscia immunitaria per il rilevamento simultaneo e rapido di ZEN, tossine T-2, alternariolo, DON e acido tenuazonico, ottenendo LOD compresi tra 0,04-0,56, 0,11-0,68, 0,09-0,75, 0,91-4,77 e 0,12-1,02 ng/mL, con recuperi fino al 115%. Altri nanomateriali come nanoparticelle d'argento, carbonio, CN multiparete sono stati sviluppati per migliorare l'arricchimento e l'isolamento delle micotossine (Moreno et al., 2016, Zhao et al., 2020). Parallelamente, tecnologie emergenti come CRISPR (Clustered Regular Interspaced Short Palindrome Repeats) stanno assumendo un ruolo crescente nella diagnostica delle micotossine, grazie alla loro versatilità e alla capacità di superare limiti tipici dei biosensori tradizionali, come effetti matrice e interferenze elettriche (Wang et al., 2023, Pei et al., 2024; Suliman et al., 2024). Secondo Haowei et al. (2023), l'integrazione dei sistemi CRISPR/Cas in biosensori elettrochimici e colorimetrici consente di

aumentare sensibilità, precisione e rapidità. In questo contesto, sono state impiegate nanoparticelle d'oro insieme a una sonda colorimetrica Cas12a per il rilevamento dell'AFM₁, basato sull'inibizione del legame aptamerico mediata da Cas12a. Lo stesso studio ha riportato l'uso di Cas12a per il rilevamento dell'OTA, con un LOD di 0,74 fg/mL tramite un aptasensore elettrochimico che sfrutta un segnale assistito da esonucleasi. Inoltre, Liu et al. (2024b) hanno combinato CRISPR-Cas12a con un enzima a singolo atomo per il rilevamento dell'AFB₁, ottenendo un intervallo lineare di 10⁻⁶ ng/μL e un LOD di 1,5 × 10⁻⁶ ng/μL. Il sistema ha mostrato elevata stabilità e notevole capacità catalitica grazie all'enzima monoatomico, mentre Cas12a ha garantito una forte amplificazione del segnale e un'elevata specificità. In sintesi, l'integrazione di nanotecnologie avanzate e piattaforme CRISPR sta ridefinendo il rilevamento delle micotossine, offrendo strumenti estremamente sensibili, rapidi e adattabili anche alle matrici alimentari più complesse.

3.3 Approcci di metabolomica e apprendimento automatico nel rilevamento delle micotossine

La metabolomica e l'apprendimento automatico (ML) rappresentano approcci di nuova generazione sempre più rilevanti nel rilevamento delle micotossine, offrendo strategie innovative per la diagnosi precoce e la prevenzione della contaminazione nelle materie prime agricole (Rubert et al., 2017, Sun et al., 2023). La metabolomica, intesa come l'analisi completa dei metaboliti presenti in un campione biologico, costituisce una piattaforma solida per l'identificazione di biomarcatori associati alla presenza di micotossine (Lapris et al., 2024). Tale disciplina si avvale di tecniche analitiche consolidate, tra cui risonanza magnetica nucleare (NMR), LC-MS, GC-MS e HPLC, che consentono di ottenere profili metabolici dettagliati e di individuare pattern riconducibili allo sviluppo di funghi micotossigenici (Richard-Forget et al., 2021). Parallelamente, l'ML branca dell'intelligenza artificiale dedicata allo sviluppo di algoritmi capaci di apprendere dai dati sta acquisendo un ruolo crescente nell'industria alimentare per l'analisi e il rilevamento di micotossine e altri contaminanti (Inglis et al., 2024). I metodi ML possono essere suddivisi in diverse categorie, ciascuna caratterizzata da specifiche modalità di elaborazione dei dati (Saha et al., 2021, Sarker et al., 2021). Tra questi, l'apprendimento supervisionato (ad esempio, support vector machines) utilizza dati etichettati per effettuare previsioni o classificazioni; l'apprendimento non supervisionato, come PCA e clustering K-Means, permette invece di individuare strutture e relazioni latenti nei dati senza l'uso di etichette; infine, gli approcci semi-supervisionati, tra cui i modelli generativi, combinano elementi di entrambe le categorie (Saha et al., 2021,

Mahesh et al., 2020). L'applicazione di tali metodologie al settore micotossinologico ha già prodotto risultati significativi. Camardo Leggieri et al. (2021) hanno sviluppato un modello supervisionato basato su due reti neurali profonde integrate con un sistema meccanicistico e dati meteorologici, finalizzato alla previsione dei livelli di AFB₁ e FB₁ in campi di mais del Nord Italia. Il modello ha permesso di identificare correttamente i campi con contaminazioni superiori ai limiti normativi, raggiungendo un'accuratezza del 75%. L'integrazione tra metabolomica e ML apre ulteriori prospettive, consentendo l'individuazione di biomarcatori utili per la diagnosi precoce delle contaminazioni. Un esempio significativo è fornito da Xie et al. (2022), che hanno identificato versicolorin B e altri metaboliti come biomarcatori correlati alla produzione di aflatossine, con coefficienti di correlazione compresi tra 0,71 e 0,95. Combinando tali dati metabolomici con algoritmi di apprendimento automatico in particolare random forest e XGBoost gli autori hanno ottenuto modelli predittivi capaci di stimare la contaminazione da aflatossine con un'accuratezza dell'87,2%. Questo approccio integrato si dimostra quindi particolarmente promettente per supportare il processo decisionale in ambito agricolo e per rafforzare le strategie di sicurezza alimentare.

Capitolo 4

STRATEGIE DI PREVENZIONE E CONTROLLO DELLE MICOTOSSINE

La prevenzione della contaminazione da micotossine si basa su interventi attuabili sia pre che post-raccolta (C.G. Awuchi et al., 2021). Durante la fase di raccolta, le misure più efficaci comprendono l'esecuzione tempestiva delle operazioni, l'astensione della raccolta in condizioni di elevata umidità e, quando necessario, l'essiccazione del prodotto prima dello stoccaggio (Z.H. Zhang et al., 2019, P. Kumar et al., 2017). Parallelamente, l'industria agroalimentare adotta tecnologie avanzate come filtrazione e sterilizzazione dell'aria, ambienti a sovrappressione e procedure di disinfezione per garantire condizioni igieniche adeguate e ridurre il rischio di contaminazioni. Nonostante tali accorgimenti, la prevenzione della contaminazione fungina in campo rimane complessa. È tuttavia fondamentale limitare il contatto di semi e frutti con terreno e attrezzature contaminate, poiché tali interazioni possono provocare lesioni che facilitano la penetrazione delle ife. Un'efficace gestione della contaminazione richiede quindi di ostacolare la germinazione dei conidi e lo sviluppo delle strutture fungine. Quando le micotossine sono già presenti negli alimenti, è necessario ricorrere a strategie di controllo per ridurre gli effetti avversi (C.G. Awuchi et al., 2021, Z.H. Zhang et al., 2019). Le tecniche di decontaminazione disponibili includono approcci fisici, chimici e biologici, capaci di degradare o inattivare parzialmente le micotossine. Tuttavia, la loro completa eliminazione è rara, rendendo la prevenzione la misura più efficace lungo l'intera filiera (V. Ostry et al., 2013).

4.1 Decontaminazione degli alimenti

Le procedure di decontaminazione rappresentano un passaggio essenziale per ridurre la presenza di micotossine nei prodotti alimentari (T. Villarreal-Barajas et al., 2022). In questo ambito possono essere impiegati interventi di natura fisica, chimica o microbiologica, spesso combinati in un approccio integrato che risulta generalmente più efficace rispetto all'utilizzo di una singola strategia (J.C. Young et al., 2007). L'Organizzazione per l'Alimentazione e l'Agricoltura ha definito specifiche linee guida per le operazioni di decontaminazione, che

includono la riduzione del contenuto di micotossine, la prevenzione della formazione di residui tossici, la tutela delle proprietà nutrizionali e tecnologiche degli alimenti e l'eliminazione di spore o strutture miceliari potenzialmente produttrici di micotossine. L'adozione di tali criteri consente di diminuire in modo significativo l'incidenza delle micotossine negli alimenti e nei mangimi, contribuendo alla tutela della salute umana e animale.

4.2 Approcci convenzionali

Gli approcci convenzionali per la decontaminazione degli alimenti comprendono metodi fisici, chimici e microbiologici. Tra i metodi fisici rientrano processi comunemente impiegati nella preparazione degli alimenti, come cottura, panificazione e tostatura. Tecniche più specifiche, quali ozonizzazione e irradiazione, possono contribuire alla riduzione dei livelli di micotossine, pur non garantendone l'eliminazione completa (L. Afsah-Hejri et al., 2020, R. Čolović et al., 2019, S.A. Mir et al., 2021). Sul versante chimico, diversi composti tra cui perossido di idrogeno, ipoclorito di sodio, acido ascorbico, idrossido di calcio, idrossido di ammonio, anidride solforosa e carbonato di ammonio sono in grado di trasformare le micotossine in derivati meno tossici. Tuttavia, l'impiego di tali sostanze non è generalmente compatibile con alimenti e mangimi destinati al consumo diretto (S.A. Mir et al., 2021). Alcuni additivi, come vitamina C, bisolfiti, curcumina, bentonite, carbone attivo, silicati e adsorbenti a base di glucano, possono attenuare gli effetti delle micotossine nei prodotti contaminati. È stato inoltre osservato che il glucomannano esterificato è in grado di legare simultaneamente AF, FMN e ZEN, sebbene l'uso di tali leganti richieda cautela, poiché in alcuni casi potrebbe amplificare la tossicità di specifiche micotossine (L. Afsah-Hejri et al., 2020). Accanto ai metodi fisici e chimici, gli approcci microbiologici mirano alla biodegradazione o trasformazione delle micotossine tramite microrganismi. Ad esempio, *Flavobacterium aurantiacum* è in grado di degradare l'AFB₁ in matrici come latte e carne (L. Afsah-Hejri et al., 2020). Diversi batteri lattici, tra cui *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus thermophilus* e *Lactococcus lactis*, possono legare le aflatossine alle loro pareti cellulari, riducendone la biodisponibilità. Inoltre, lieviti del genere *Kluyveromyces* mostrano capacità inibitorie nei confronti della crescita di *Aspergillus* e della produzione di aflatossine, suggerendo un potenziale ruolo nella mitigazione della contaminazione (R. Khan et al., 2021). Nel complesso, leganti e microrganismi inibitori rappresentano strumenti promettenti per contrastare la presenza di micotossine negli alimenti. L'impiego di organismi naturali e processi microbiologici offre prospettive interessanti per migliorare la sicurezza alimentare,

pur richiedendo ulteriori studi per ottimizzarne l'efficacia e garantirne l'applicabilità su larga scala.

4.3 Strategie innovative di mitigazione

I ricercatori stanno sviluppando strategie innovative per contrastare la tossicità delle micotossine, in risposta alle crescenti esigenze dei consumatori in termini di igiene e sicurezza alimentare. Tra gli approcci emergenti rientrano il plasma atmosferico freddo (CAP), i polifenoli, i materiali magnetici e le nanoparticelle, oltre agli oli essenziali naturali (NEO). Queste tecnologie mirano a ridurre i rischi associati alle micotossine senza lasciare residui indesiderati sui prodotti alimentari (Figura 10).

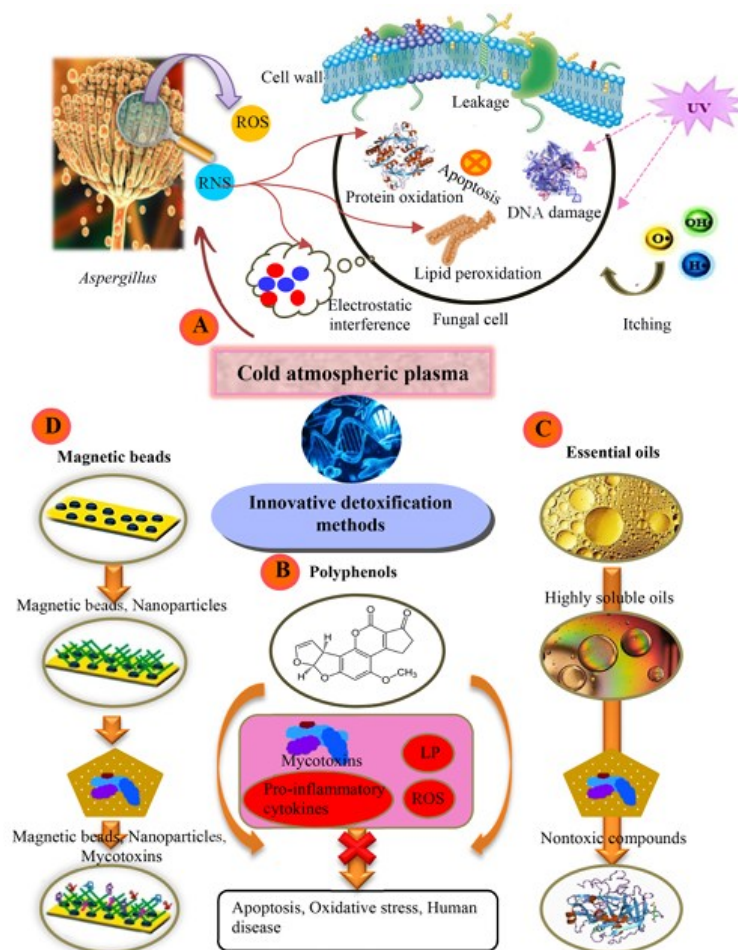


Figura 10. Metodi per controllare la contaminazione da micotossine: (A) metodo del plasma atmosferico freddo, (B) polifenoli, (C) oli essenziali naturali e (D) materiali magnetici e nanoparticelle (Khan et al., 2024).

4.3.1 Plasma atmosferico freddo

Il plasma atmosferico freddo (CAP) rappresenta uno stato della materia generato quando un gas neutro viene sottoposto a un campo elettrico sufficientemente intenso da ionizzare atomi e molecole, producendo così un plasma. Quando la tensione applicata supera la soglia di rottura, si formano specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto che consentono la produzione di CAP a temperatura ambiente e pressione atmosferica. L'applicazione del CAP prevede l'esposizione di acqua, soluzioni tampone o acidi alla scarica di plasma, generando agenti disinfettanti utili per operazioni di lavaggio e sanificazione (M. Ali et al., 2022, O.J. Esua et al., 2021). L'attività antimicrobica e la capacità del CAP di degradare composti biochimici complessi derivano dall'azione combinata di diverse specie reattive, tra cui superossido (O_2^-), ozono (O_3), perossido di idrogeno (H_2O_2), radicali idrossilici ($\bullet OH$), perossinitrito ($ONOO^-$), nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-), oltre a radiazioni UV e campi elettrici. Questi elementi mantengono una temperatura prossima a quella ambiente, conferendo al CAP le sue caratteristiche non termiche. L'efficacia del CAP dipende dalla struttura molecolare delle micotossine e dalle condizioni operative. Nel caso del DON nei prodotti a base di grano, fattori come il tipo di gas, il tempo di trattamento, le caratteristiche della matrice, il contenuto d'acqua e la tensione plasmatica influenzano significativamente la degradazione. Il CAP generato con gas a base di azoto produce specie reattive dell'azoto (RNS), come ossido nitrico (NO) e biossido di azoto (NO_2), dotate di proprietà antimicrobiche e impiegate nella sterilizzazione e nella disinfezione delle superfici. Al contrario, il CAP basato su ossigeno genera specie reattive dell'ossigeno (ROS), come ozono, ossigeno singoletto e ossigeno atomico, efficaci nella decontaminazione superficiale delle micotossine. Gas inerti come argon ed elio, pur essendo meno reattivi, fungono da vettori per le specie generate dalla scarica elettrica e risultano utili in applicazioni come la modifica delle superfici. La scelta del gas è quindi cruciale e deve essere calibrata in base alle specie reattive desiderate e all'obiettivo applicativo. Diversi studi confermano l'efficacia del CAP nella degradazione delle micotossine. Chen et al. (2017) hanno osservato una riduzione del DON del 25,82% dopo esposizione a 50 kV per 8 minuti, con un incremento dell'efficacia fino al 36,10% aumentando il contenuto d'acqua dal 8% al 20%. In modo analogo, la degradazione delle tossine T-2 e HT-2 nella farina d'avena risulta influenzata da umidità relativa, durata del trattamento e tipo di gas impiegato. Kiš et al. (2020) hanno riportato una riduzione del 42,24% per T-2 e del 37,53% per HT-2 utilizzando CAP basato su azoto. Wang et al. (2022) hanno evidenziato che l'aumento della tensione da 10 a 30 kV riduce l'alternariolo e il suo monometil etere dall'1,3% al 56,5% nel succo di giuggiola. Il plasma a scarica corona ha mostrato un'efficace

degradazione dell'AFB₁ nel riso e nel grano, con riduzioni del 45-56% dopo 30 minuti (P. Puligundla et al., 2020). Tale effetto è attribuito alla rottura del doppio legame C8-C9 negli anelli furofuranici e alle modifiche nei gruppi lattone, ciclopentanone e metossilico indotte dall'ossidazione. Il CAP si è inoltre dimostrato più efficace dell'irradiazione gamma nel ridurre AFB₁ (70-73%) e AFB₂ (15-47%) nelle nocciole, senza alterare significativamente le proprietà sensoriali. Wielogorska et al. (2019) hanno evidenziato che il CAP genera prodotti di degradazione sicuri, con cinetiche di primo ordine per AFB₁, OTA, FB₁, DON, ZEN ed enniatina B. In particolare, ENB e DON presentavano emivite rispettivamente di 1,1 e 74 minuti, mentre un'esposizione di 10 minuti riduceva FB₁ e AFB₁ del 64% e 65%. I prodotti di degradazione di AFB₁ e ZEN risultavano limitati e non influenzavano la citotossicità nelle cellule epatiche tumorali. I meccanismi di degradazione delle micotossine da parte del CAP dipendono da vari fattori, tra cui concentrazione di ossigeno, radicali idrossilici, fotoni e luce UV. Le specie reattive possono danneggiare le cellule fungine in più punti, provocando alterazioni strutturali, inattivazione e morte cellulare. Inoltre, la degradazione delle tossine avviene attraverso processi multipli che generano sottoprodotti meno tossici (N. Misra et al., 2019). Gavahian et al. (2020) hanno evidenziato che la reattività del plasma può distruggere le pareti cellulari fungine, causando fuoriuscita citoplasmatica e inattivazione. Lee et al. (2015) hanno proposto che il CAP inattivi le spore di *Cordyceps bassiana* alterandone la struttura, mentre Wu et al. (2018) hanno suggerito che il CAP detossifichi le aflatossine modificando parete cellulare, citoplasma e metabolismo fungino (Figura 10). Complessivamente, le specie reattive generate dal plasma aumentano la permeabilità della membrana cellulare, provocano danni ossidativi, rottura del DNA, perdita di contenuto cellulare e degradazione proteica, fino a indurre apoptosi e contrazione delle spore (X. Chen et al., 2022).

4.3.2 Composti polifenolici

I polifenoli stanno suscitando crescente interesse grazie alle loro molteplici proprietà biologiche, tra cui attività antimicrobiche, antivirali e antinfiammatorie (T. Mehany et al., 2021). Nei confronti delle micotossine agiscono attraverso diversi meccanismi, come l'attività antiossidante, la lipofilia, la soppressione dei geni coinvolti nella loro biosintesi e l'inibizione degli enzimi responsabili della produzione tossinica (Figura 10). Hamad et al. (2021) hanno evidenziato che estratti vegetali e composti polifenolici possiedono un marcato effetto inibitorio sullo sviluppo fungino, contribuendo alla riduzione delle micotossine. Sanzani et al. (2009) hanno dimostrato che umbelliferone e quercetina riducono l'espressione genica associata alla sintesi del PAT, determinandone un minore accumulo. In modo analogo, gli acidi clorogenico e gallico mostrano capacità inibitorie nei confronti dell'AFB₁ nei fagioli

(A.C. Telles et al., 2017). Salas et al. (2012) hanno inoltre osservato che flavanoni di origine agrumaria, come esperidina e naringina, possono ridurre la produzione di PAT fino al 95%. Un'ulteriore strategia promettente è rappresentata dalle nanospugne a base di β -ciclodestrina arricchite con fenoli bioattivi, in grado di prevenire l'attacco fungino e favorire la detossificazione delle micotossine (R. Makhuvele et al., 2020). Nel complesso, questi composti naturali, dotati di proprietà antiossidanti e attività biologiche benefiche, mostrano un potenziale significativo nel mitigare i danni associati alle micotossine (V. Sharma et al., 2021). Le evidenze più recenti confermano il ruolo promettente dei polifenoli come strumenti innovativi per contrastare gli effetti tossici di funghi e micotossine, aprendo prospettive interessanti per future applicazioni.

4.3.3 Oli essenziali naturali

Gli oli essenziali naturali (NEO) rappresentano additivi ecocompatibili in grado di limitare la crescita fungina e ridurre i livelli di micotossine in diverse matrici alimentari. La loro azione si basa sull'inibizione di enzimi coinvolti nella degradazione dei carboidrati e nella biosintesi delle micotossine (Figura 10), oltre che sul danneggiamento dell'integrità strutturale delle cellule fungine (J. Tian et al., 2011). I NEO possono inoltre modulare l'espressione genica dei funghi e interferire con le membrane cellulari attraverso composti polifenolici, provocando alterazioni funzionali e strutturali (J. Cai et al., 2022). Numerosi studi confermano l'efficacia dei NEO nel contrastare la contaminazione micotossinica. L'olio essenziale di *Origanum majorana* ha mostrato attività antimicotica in vitro, inibendo la crescita di *A. flavus* e la produzione di aflatossine, evidenziando il suo potenziale come agente naturale per la conservazione degli alimenti (A.K. Chaudhari et al., 2020). È stato inoltre osservato che la capsaicina riduce la produzione di OTA da parte di *A. niger*, mentre oli essenziali di aglio, rosmarino, salvia e menta risultano efficaci nell'inibire la sintesi di OTA (E. Kollia et al., 2019). L'olio di curcuma ha dimostrato un marcato effetto antifungino contro *A. flavus*, riducendo l'accumulo di aflatossine nel mais. Secondo Kedia et al. (2016), gli oli essenziali di *Mentha spicata* inibiscono le micotossine prodotte da *A. flavus* nei ceci, agendo principalmente sulla membrana plasmatica. Altri oli essenziali, come quelli di limone, pompelmo ed eucalipto, mostrano un'efficace attività inibitoria nei confronti della produzione di ZEN. Studi recenti hanno inoltre evidenziato che gli oli essenziali di *Curcuma longa* possono inibire la crescita di *Fusarium graminearum* e la sintesi di ZEN (K.N. Kumar et al., 2016). Nonostante il loro potenziale, i NEO presentano alcune limitazioni. La loro efficacia può risultare inferiore rispetto a quella di alternative sintetiche o chimiche e può variare in funzione del tipo di micotossina e delle condizioni ambientali. Inoltre, i loro aromi caratteristici possono

influenzare le proprietà sensoriali degli alimenti trasformati. La mancanza di normative specifiche, insieme a preoccupazioni legate a instabilità, rischio allergenico, costi di produzione e possibili residui, rappresenta ulteriori ostacoli alla loro applicazione su larga scala.

4.3.4 Materiali magnetici e nanoparticelle

Le ricerche più recenti indicano che materiali magnetici e nanoparticelle rappresentano strumenti efficaci per la gestione della contaminazione da micotossine. Si tratta di tecnologie ecocompatibili, economicamente sostenibili ed efficienti nella loro capacità di mitigare la presenza di tossine. Le particelle magnetiche rivestite di chitosano (Fe_3O_4), ad esempio, hanno mostrato un'elevata capacità di adsorbire il PAT dai succhi di frutta; tuttavia, tali particelle possono interagire con altri componenti della matrice, alterando gusto, aroma, colore o consistenza, con possibili ripercussioni sulle caratteristiche sensoriali del prodotto. Anche la nanocellulosa e l'acido retinoico si sono dimostrati efficaci nell'adsorbire AFB_1 da diverse fonti alimentari, risultando non tossici e funzionali a pH ottimali (K.N. Kumar et al., 2016). Diverse tipologie di nanoparticelle magnetiche tra cui maghemite tensioattiva (SAMN), nanoparticelle d'argento (SLN), di rame (CN), di selenio (SEN) e di ossido di zinco (ZON) hanno evidenziato un'elevata efficacia nella rimozione delle micotossine dai prodotti alimentari (A. Jebali et al., 2015). Le SEN derivate da *Trichoderma harzianum* JF309, ad esempio, riducono FB_1 del 63% e DON del 76% (K.A. Abd-Elsalam et al., 2017). Le SLN inibiscono la proliferazione di muffe produttrici di micotossine, sopprimendo la sintesi di AF e OTA nei substrati a base di mais, mentre le ZON risultano efficaci contro specie di *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (D. Hu et al., 2019). Nanocompositi magnetici di carbonio ottenuti da sottoprodotti del mais hanno mostrato la capacità di rimuovere fino al 90% di AFB_1 nei mangimi per pollame a pH 7 entro 3 ore. Una miscela di chitosano e glutaraldeide ha inoltre evidenziato un'elevata capacità di legame nei confronti di diverse micotossine (M. Zahoor et al., 2016). I nanofungicidi contenenti fitochimici come tannini, floretina, catecoli, eugenolo e timolo presentano proprietà antimicrobiche ottimali senza rischi per la salute umana o animale (B.A. Miu et al., 2022). La mitigazione del rischio micotossinico mediata dalle nanoparticelle coinvolge diversi meccanismi molecolari, tra cui stress ossidativo, interazioni con gli acidi nucleici e risposte infiammatorie, che contribuiscono all'eliminazione dei microrganismi nelle piante e nei mammiferi (Figura 10) (P. Horky et al., 2018). Le interazioni con la membrana cellulare possono indurre apoptosi, generare specie reattive dell'ossigeno (ROS), inibire l'attività mitocondriale e favorire processi come perossidazione lipidica o autofagia. Le ZON, ad esempio, stimolano la produzione di ROS,

determinando la disgregazione delle membrane fungine, come evidenziato tramite microscopia elettronica a scansione (SEM) (K. Pietrzak et al, 2015). Uno studio recente ha suggerito che nanoparticelle di chitosano caricate con quercetina possano attivare una cascata epatoprotettiva, potenziando i meccanismi antiossidanti attraverso l'attivazione del fattore nucleare eritroide 2 e la conseguente sintesi dell'eme-ossigenasi-1. La quercetina inibisce inoltre l'attività dell'ossido nitrico sintasi e la produzione di ossido nitrico indotta dal lipopolisaccaride tramite la chinasi I κ B e le proteine chinasi attivate dai mitogeni p38, attivando l'elemento di risposta antiossidante nei geni della detossificazione. Le interazioni tra nanoparticelle di carbonio come fullereni, nanotubi di carbonio e grafene e micotossine sono state ampiamente studiate (P. Horky et al., 2018), ma sono necessari ulteriori approfondimenti per comprendere appieno i meccanismi con cui tali materiali interagiscono con le strutture cellulari fungine.

4.3.5 Altre strategie innovative

Tra gli approcci emergenti per la mitigazione delle micotossine, i campi elettrici pulsati (PEF) stanno acquisendo crescente rilevanza per la loro capacità di prevenire la contaminazione da *A. flavus* e la sintesi di AFB₁ e AFG₁ (M. Gavahian et al., 2020). I PEF si sono dimostrati efficaci nella detossificazione delle micotossine negli alimenti, sebbene sia necessario valutare attentamente le caratteristiche della matrice alimentare prima della loro applicazione su scala industriale. Zhang et al. (2020) hanno inoltre valutato l'efficacia del trattamento a microonde nella riduzione dell'AFB₁ nel mais, osservando una significativa diminuzione della tossina e una protezione dei chicchi dai danni termici, evidenziando così il potenziale delle tecnologie a microonde nella detossificazione. Parallelamente, Gavahian et al. (2020) hanno esplorato l'impiego del trattamento ad alta pressione per ridurre le micotossine nei succhi, sottolineando anche il ruolo del packaging attivo nella gestione di muffe patogene e micotossine in frutta, verdura, noci, prodotti da forno e latticini (Figura 11). Un ulteriore ambito promettente riguarda l'uso di biopolimeri, come proteine e lipidi, apprezzati per il loro basso costo, la biodegradabilità e l'efficacia nella rimozione delle micotossine. Anche gli adsorbenti nanometrici, come le bentoniti di calcio e sodio, sono oggetto di studio come additivi alimentari per la rimozione dell'OTA dal formaggio. Hamad et al. (2021) hanno valutato l'attività disintossicante delle bentoniti sia *in vitro* sia *in vivo*: la bentonite di calcio ha mostrato una maggiore capacità di adsorbimento rispetto a quella di sodio nella soluzione salina tamponata con fosfato, mentre nei test su ratti le risposte enzimatiche risultavano simili ai controlli trattati con bentonite, indicando un effetto protettivo rispetto alla sola OTA. Analisi SEM e spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier hanno confermato l'efficacia delle

bentoniti come leganti dell'OTA. Inoltre, l'arricchimento del formaggio feta con bentonite di calcio ha migliorato le qualità sensoriali, suggerendone l'utilizzo come adsorbente alimentare per la rimozione dell'OTA (G.M. Hamad et L., 2021). La Figura 11 illustra il meccanismo di interazione tra micotossine e adsorbenti nanometrici, evidenziando il potenziale di queste tecnologie come strumenti innovativi per la sicurezza alimentare.

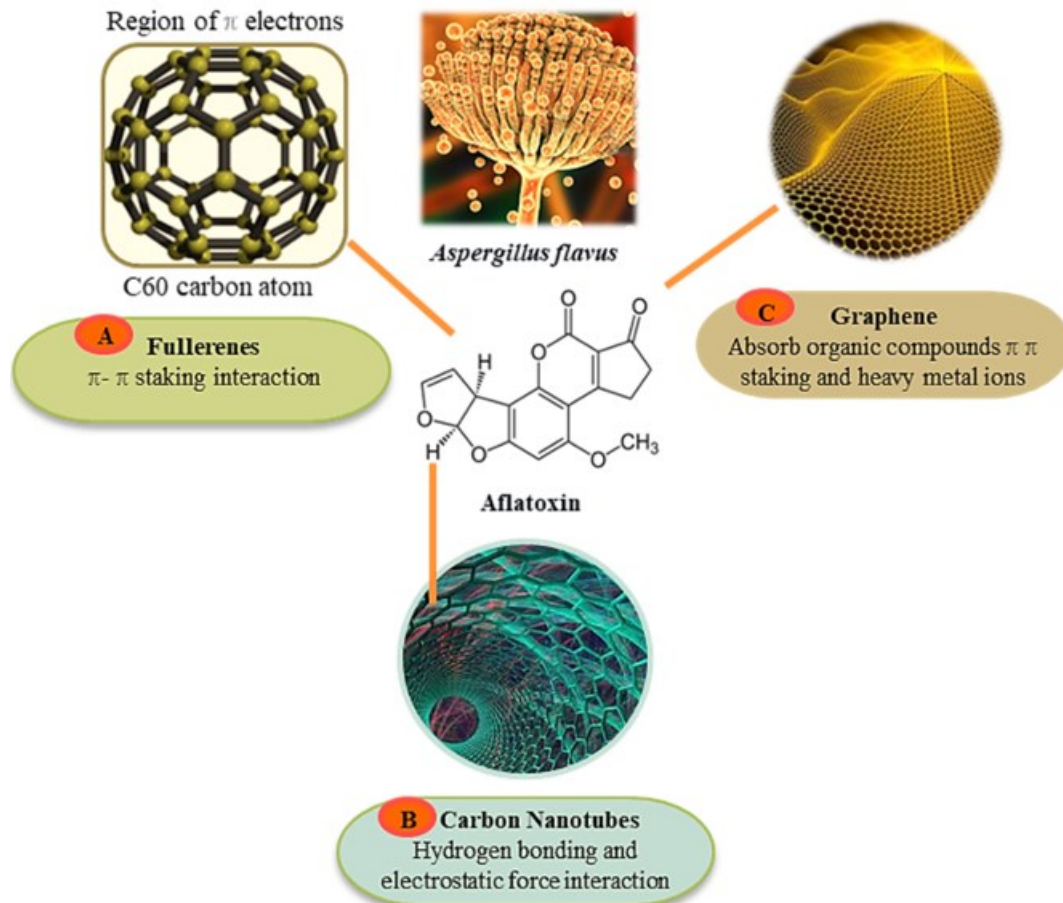


Figura 11. Meccanismo di interazione di legame tra micotossine e adsorbenti su scala nanometrica e, A =fullereni; B = nanotubi di carbonio; e C = grafene (Khan et al., 2024).

CONCLUSIONI

La contaminazione da micotossine continua a rappresentare una delle sfide più complesse e pervasive per la sicurezza alimentare globale. L'analisi condotta in questa tesi ha permesso di evidenziare come tali contaminanti, pur essendo noti da decenni, mantengano una rilevanza scientifica e tecnologica crescente, alimentata dai cambiamenti climatici, dall'intensificazione delle filiere produttive e dall'emergere di nuove specie fungine. La loro diffusione capillare, favorita da pratiche agricole non ottimali e dalla vulnerabilità intrinseca delle materie prime, rende oggi indispensabile un approccio integrato che combini prevenzione, monitoraggio e interventi di mitigazione mirati. Il lavoro svolto ha seguito un percorso strutturato che ha permesso di delineare un quadro esaustivo della problematica. Dalla comprensione dei meccanismi tossicologici delle principali classi di micotossine mettendone in luce la capacità di persistere nelle matrici alimentari e i gravi effetti clinici sulla salute umana e animale si è passati a una valutazione critica degli strumenti necessari per il loro contrasto. È emerso con chiarezza che la complessità strutturale di questi composti richiede metodi analitici sempre più sensibili, selettivi e rapidi. In questo contesto, sebbene le tecniche cromatografiche accoppiate alla spettrometria di massa rimangano il riferimento per accuratezza e affidabilità, i loro limiti logistici ed economici hanno favorito l'ascesa di approcci alternativi. L'analisi dei biosensori, delle nanotecnologie, dei sistemi basati su CRISPR e degli approcci metabolomici ha mostrato come la ricerca stia rapidamente evolvendo verso strumenti ultrasensibili e portatili, capaci di superare i limiti delle metodiche convenzionali e di offrire soluzioni applicabili direttamente sul campo. Parallelamente, anche le strategie di mitigazione hanno mostrato un'importante evoluzione. Accanto ai metodi fisici, chimici e biologici consolidati, la tesi ha approfondito soluzioni innovative come il plasma atmosferico freddo, i composti polifenolici e i materiali magnetici che, pur richiedendo ulteriori validazioni, mostrano un potenziale significativo nella detossificazione delle matrici alimentari. La gestione del rischio deve quindi basarsi su un modello multidisciplinare in cui tossicologia, chimica analitica, biotecnologie e scienze alimentari convergano per garantire prodotti più sicuri e filiere più resilienti. In conclusione, questa tesi ha evidenziato come la ricerca scientifica stia tracciando la strada verso soluzioni più efficaci e sostenibili. Tuttavia, affinché la gestione delle micotossine possa evolvere da

una semplice risposta al rischio a una strategia preventiva strutturata e lungimirante, rimane fondamentale promuovere una maggiore consapevolezza lungo tutta la filiera agroalimentare. Il lavoro svolto ha permesso di costruire una visione ampia e aggiornata del problema, individuando nelle tecnologie emergenti e nella digitalizzazione dei sistemi di rilevamento le prospettive più promettenti per garantire, nel prossimo futuro, la sicurezza alimentare su scala globale.

BIBLIOGRAFIA

- Abd-Elghany, S. M., & Sallam, K. I. (2015). Determinazione rapida delle aflatossine totali e dell'ocratossine A nei prodotti carniferi tramite fluorimetria di immunoaffinità. *Chimica degli alimenti*, 179, 253-256.
- Abd-Elsalam, K. A., Hashim, A. F., Alghuthaymi, M. A., & Said-Galiev, E. (2017). Nanobiotechnological strategies for toxigenic fungi and mycotoxin control. In *Food preservation* (pp. 337-364). Academic Press.
- Adunphatcharaphon, S., Elliott, C. T., Sooksimuang, T., Charlermroj, R., Petchkongkaew, A., & Karoonuthaisiri, N. (2022). The evolution of multiplex detection of mycotoxins using immunoassay platform technologies. *Journal of Hazardous Materials*, 432, 128706.
- Afsah-Hejri, L., Hajeb, P., & Ehsani, R. J. (2020). Application of ozone for degradation of mycotoxins in food: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(4), 1777-1808.
- Agriopoulou, S., Stamatelopoulou, E., & Varzakas, T. (2020). Advances in analysis and detection of major mycotoxins in foods. *Foods*, 9(4), 518.
- Ala, W. (2023). *Graphene-based sensor of aflatoxin molecule: a simulation-based investigation* (Doctoral dissertation, Politecnico di Torino).
- Ali, M., Sun, D. W., Cheng, J. H., & Esua, O. J. (2022). Effects of combined treatment of plasma activated liquid and ultrasound for degradation of chlorothalonil fungicide residues in tomato. *Food chemistry*, 371, 131162.
- Amaiike, S., & Keller, N. P. (2011). *Aspergillus flavus*. *Annual review of phytopathology*, 49(1), 107-133.
- Amuzie, C. J., & Pestka, J. J. (2010). Suppression of insulin-like growth factor acid-labile subunit expression—A novel mechanism for deoxynivalenol-induced growth retardation. *Toxicological Sciences*, 113(2), 412-421.
- Anderson, P. D. (2012). Bioterrorism: toxins as weapons. *Journal of pharmacy practice*, 25(2), 121-129.

- Anfossi, L., Giovannoli, C., & Baggiani, C. (2016). Mycotoxin detection. *Current opinion in biotechnology*, 37, 120-126.
- Aqai, P., Peters, J., Gerssen, A., Haasnoot, W., & Nielen, M. W. (2011). Immunomagnetic microbeads for screening with flow cytometry and identification with nano-liquid chromatography mass spectrometry of ochratoxins in wheat and cereal. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 400(9), 3085-3096.
- Atherstone, C., Grace, D., Waliyar, F., Lindahl, J. F., & Osiru, M. (2014). Aflatoxin literature synthesis and risk mapping: Special emphasis on sub-Saharan Africa.
- Awuchi, C. G., Ondari, E. N., Eseoghene, I. J., Twinomuhwezi, H., Amagwula, I. O., & Morya, S. (2021). Fungal growth and mycotoxins production: Types, toxicities, control strategies, and detoxification. In *Fungal reproduction and growth*. IntechOpen.
- Bart, H., Evelyne, D., & Els, D. (2020). Carry-over of some Fusarium mycotoxins in tissues and eggs of chickens fed experimentally mycotoxin-contaminated diets. *Food and Chemical Toxicology*, 145, 111715.
- Barthelmebs, L., Jonca, J., Hayat, A., Prieto-Simon, B., & Marty, J. L. (2011). Enzyme-Linked Aptamer Assays (ELAAs), based on a competition format for a rapid and sensitive detection of Ochratoxin A in wine. *Food control*, 22(5), 737-743.
- Bazin, I., Andreotti, N., Hassine, A. I. H., De Waard, M., Sabatier, J. M., & Gonzalez, C. (2013). Peptide binding to ochratoxin A mycotoxin: A new approach in conception of biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 40(1), 240-246.
- Beloglazova, N. V., Speranskaya, E. S., Wu, A., Wang, Z., Sanders, M., Gofman, V. V., ... & De Saeger, S. (2014). Novel multiplex fluorescent immunoassays based on quantum dot nanolabels for mycotoxins determination. *Biosensors and Bioelectronics*, 62, 59-65.
- Beltrán, E., Ibáñez, M., Sancho, J. V., & Hernández, F. (2009). Determination of mycotoxins in different food commodities by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry*, 23(12), 1801-1809.
- Bennett, J. W., Kale, S., & Yu, J. (2007). Aflatoxins: background, toxicology, and molecular biology. In *Foodborne diseases* (pp. 355-373). Totowa, NJ: Humana Press.

- Betina, V. (1985). Thin-layer chromatography of mycotoxins. *Journal of Chromatography A*, 334, 211-276.
- 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.
- Bouhet, S., Hourcade, E., Loiseau, N., Fikry, A., Martinez, S., Roselli, M., ... & Oswald, I. P. (2004). The mycotoxin fumonisin B1 alters the proliferation and the barrier function of porcine intestinal epithelial cells. *Toxicological Sciences*, 77(1), 165-171.
- Boussabbeh, M., Ben Salem, I., Prola, A., Guilbert, A., Bacha, H., Abid-Essefi, S., & Lemaire, C. (2015). Patulin induces apoptosis through ROS-mediated endoplasmic reticulum stress pathway. *Toxicological sciences*, 144(2), 328-337.
- Britzi, M., Friedman, S., Miron, J., Solomon, R., Cuneah, O., Shimshoni, J. A., ... & Shlosberg, A. (2013). Carry-over of aflatoxin B1 to aflatoxin M1 in high yielding Israeli cows in mid- and late-lactation. *Toxins*, 5(1), 173-183.
- Cai, J., Yan, R., Shi, J., Chen, J., Long, M., Wu, W., & Kuca, K. (2022). Antifungal and mycotoxin detoxification ability of essential oils: A review. *Phytotherapy Research*, 36(1), 62-72.
- Calabria, D., Calabretta, M. M., Zangheri, M., Marchegiani, E., Trozzi, I., Guardigli, M., ... & Mirasoli, M. (2021). Recent advancements in enzyme-based lateral flow immunoassays. *Sensors*, 21(10), 3358.
- Camardo Leggieri, M., Mazzoni, M., & Battilani, P. (2021). Machine learning for predicting mycotoxin occurrence in maize. *Frontiers in microbiology*, 12, 661132.
- Cenci, L., Piotto, C., Bettotti, P., & Bossi, A. M. (2018). Study on molecularly imprinted nanoparticle modified microplates for pseudo-ELISA assays. *Talanta*, 178, 772-779.
- Chaudhari, A. K., Singh, V. K., Das, S., Prasad, J., Dwivedy, A. K., & Dubey, N. K. (2020). Improvement of in vitro and in situ antifungal, AFB1 inhibitory and antioxidant activity of *Origanum majorana* L. essential oil through nanoemulsion and recommending as novel food preservative. *Food and Chemical Toxicology*, 143, 111536.
- Cheli, F., Campagnoli, A., Pinotti, L., Fusi, E., & Dell'Orto, V. (2009). Sampling feed for mycotoxins: Acquiring knowledge from food. *Italian Journal of Animal Science*, 8(1), 5-22.

- Chen, P., Liu, T., Jiang, S., Yang, Z., Huang, L., & Liu, F. (2017). Effects of purified zearalenone on selected immunological and histopathologic measurements of spleen in post-weanling gilts. *Animal Nutrition*, 3(3), 212-218.
- Chen, X., Qiu, Y., Zhang, J., Guo, Y., Ding, Y., & Lyu, F. (2022). Degradation efficiency and products of deoxynivalenol treated by cold plasma and its application in wheat. *Food Control*, 136, 108874.
- Chen, Y., Zhang, S., Huang, Y., Lv, L., Dai, H., & Lin, Y. (2020). A bio-bar-code photothermal probe triggered multi-signal readout sensing system for nontoxic detection of mycotoxins. *Biosensors and Bioelectronics*, 167, 112501.
- Chianella, I., Guerreiro, A., Moczko, E., Caygill, J. S., Piletska, E. V., De Vargas Sansalvador, I. M. P., ... & Piletsky, S. A. (2013). Direct Replacement of Antibodies with Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles in ELISA □ Development of a Novel Assay for Vancomycin. *Analytical chemistry*, 85(17), 8462-8468.
- Claeys, L., Romano, C., De Ruyck, K., Wilson, H., Fervers, B., Korenjak, M., ... & Huybrechts, I. (2020). Mycotoxin exposure and human cancer risk: A systematic review of epidemiological studies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(4), 1449-1464.
- Čolović, R., Puvača, N., Cheli, F., Avantaggiato, G., Greco, D., Đuragić, O., ... & Pinotti, L. (2019). Decontamination of mycotoxin-contaminated feedstuffs and compound feed. *Toxins*, 11(11), 617.
- da Rocha, M. E. B., Freire, F. D. C. O., Maia, F. E. F., Guedes, M. I. F., & Rondina, D. (2014). Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food control*, 36(1), 159-165.
- Da Silva, E. O., Bracarense, A. P. F. L., & Oswald, I. P. (2018). Mycotoxins and oxidative stress: where are we?. *World Mycotoxin Journal*, 11(1), 113-134.
- Dadmehr, M., Shalileh, F., & Hosseini, M. (2025). Enhancing mycotoxins detection through quantum dots-based optical biosensors. *Nanotechnology*, 36(4), 042004.
- Damborský, P., Švitel, J., & Katrlík, J. (2016). Optical biosensors. *Essays in biochemistry*, 60(1), 91-100.
- Darwish, W. S., Ikenaka, Y., Nakayama, S. M., & Ishizuka, M. (2014). An overview on mycotoxin contamination of foods in Africa. *Journal of Veterinary Medical Science*, 76(6), 789-797.

- De Ruyck, K., De Boevre, M., Huybrechts, I., & De Saeger, S. (2015). Dietary mycotoxins, co-exposure, and carcinogenesis in humans: Short review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 766, 32-41.
- Dietrich, D., Heussner, A. H., & O'Brien, E. (2005). Ochratoxin A: Comparative pharmacokinetics and toxicological implications (experimental and domestic animals and humans). *Food additives and contaminants*, 22(s1), 45-52.
- Dorner, B. G., Zeleny, R., Harju, K., Hennekinne, J. A., Vanninen, P., Schimmel, H., & Rummel, A. (2016). Biological toxins of potential bioterrorism risk: Current status of detection and identification technology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 85, 89-102.
- Eaton, D. L., & Groopman, J. D. (Eds.). (2013). *The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance*. Elsevier.
- Erdem, A., & Senturk, H. (2024). Smartphone-controlled aptasensor for voltammetric detection of patulin in apple juice. *Sensors*, 24(3), 754.
- Esua, O. J., Cheng, J. H., & Sun, D. W. (2021). Functionalization of water as a nonthermal approach for ensuring safety and quality of meat and seafood products. *Critical reviews in food science and nutrition*, 61(3), 431-449.
- Fan, Y., Li, J., Amin, K., Yu, H., Yang, H., Guo, Z., & Liu, J. (2023). Advances in aptamers, and application of mycotoxins detection: A review. *Food Research International*, 170, 113022.
- Frisvad, J. C., Hubka, V., Ezekiel, C. N., Hong, S. B., Nováková, A., Chen, A. J., ... & Houbraken, J. (2019). Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. *Studies in mycology*, 93(1), 1-63.
- Frisvad, J. C., Møller, L. L., Larsen, T. O., Kumar, R., & Arnau, J. (2018). Safety of the fungal workhorses of industrial biotechnology: update on the mycotoxin and secondary metabolite potential of *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(22), 9481-9515.
- Fung, F., & Clark, R. F. (2004). Health effects of mycotoxins: a toxicological overview. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 42(2), 217-234.
- Gavahian, M., & Cullen, P. J. (2020). Cold plasma as an emerging technique for mycotoxin-free food: Efficacy, mechanisms, and trends. *Food Reviews International*, 36(2), 193-214.

- Gelderblom, W. C. A., & Marasas, W. F. O. (2012). Controversies in fumonisin mycotoxicology and risk assessment. *Human & experimental toxicology*, 31(3), 215-235.
- Gong, Y. Y., Watson, S., & Routledge, M. N. (2016). Aflatoxin exposure and associated human health effects, a review of epidemiological studies. *Food safety*, 4(1), 14-27.
- Grenier, B., & Applegate, T. J. (2013). Modulation of intestinal functions following mycotoxin ingestion: Meta-analysis of published experiments in animals. *Toxins*, 5(2), 396-430.
- Gruber-Dorninger, C., Jenkins, T., & Schatzmayr, G. (2019). Global mycotoxin occurrence in feed: A ten-year survey. *Toxins*, 11(7), 375.
- Hamad, G. M., Mohdaly, A. A. A., El-Nogoumy, B. A., Ramadan, M. F., Hassan, S. A., & Zeitoun, A. M. (2021). Detoxification of aflatoxin B1 and ochratoxin A using *Salvia farinacea* and *Azadirachta indica* water extract and application in meat products. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193(10), 3098-3120.
- Haowei, M., Ebrahimi, S., Mansouri, S., Abdullaev, S. S., Alsaab, H. O., & Hassan, Z. F. (2023). CRISPR/Cas-based nanobiosensors: A reinforced approach for specific and sensitive recognition of mycotoxins. *Food Bioscience*, 56, 103110.
- Harčárová, M., Čonková, E., & Sihelská, Z. (2018). Mycobiota and mycotoxic contamination of feed cereals. *Folia Veterinaria*, 62(4), 5-11.
- Hassan, R. A., Hanifah, S. A., Heng, L. Y., Al-Badaii, F., & Ulianas, A. (2024). Systematic review on biosensors for the early detection of mycotoxins as endocrine disruptors. *Food Control*, 157, 110195.
- Hennig-Pauka, I., Koch, F. J., Schaumberger, S., Woechtl, B., Novak, J., Sulyok, M., & Nagl, V. (2018). Current challenges in the diagnosis of zearalenone toxicosis as illustrated by a field case of hyperestrogenism in suckling piglets. *Porcine health management*, 4(1), 18.
- Heussner, A. H., & Bingle, L. E. (2015). Comparative ochratoxin toxicity: A review of the available data. *Toxins*, 7(10), 4253-4282.
- Horky, P., Skalickova, S., Baholet, D., & Skladanka, J. (2018). Nanoparticles as a solution for eliminating the risk of mycotoxins. *Nanomaterials*, 8(9), 727.
- Hu, D., Yu, S., Yu, D., Liu, N., Tang, Y., Fan, Y., ... & Wu, A. (2019). Biogenic *Trichoderma harzianum*-derived selenium nanoparticles with control functionalities originating from diverse recognition metabolites against phytopathogens and mycotoxins. *Food Control*, 106, 106748.

- Inglis, A., Parnell, A. C., Subramani, N., & Doohan, F. M. (2024). Machine learning applied to the detection of mycotoxin in food: A systematic review. *Toxins*, 16(6), 268.
- Ismail, A. A., & Papenbrock, J. (2015). Mycotoxins: producing fungi and mechanisms of phytotoxicity. *Agriculture*, 5(3), 492-537.
- Jebali, A., Yasini Ardakani, S. A., Sedighi, N., & Hekmatimoghaddam, S. (2015). Nanocellulose conjugated with retinoic acid: its capability to adsorb aflatoxin B1. *Cellulose*, 22(1), 363-372.
- Jia, Y., Zhao, S., Li, D., Yang, J., & Yang, L. (2023). Portable chemiluminescence optical fiber aptamer-based biosensors for analysis of multiple mycotoxins. *Food Control*, 144, 109361.
- Jiang, D., Huang, C., Shao, L., Wang, X., Jiao, Y., Li, W., ... & Xu, X. (2020). Magneto-controlled aptasensor for simultaneous detection of ochratoxin A and fumonisin B1 using inductively coupled plasma mass spectrometry with multiple metal nanoparticles as element labels. *Analytica Chimica Acta*, 1127, 182-189.
- Jin, Y., Chen, Q., Luo, S., He, L., Fan, R., Zhang, S., ... & Chen, Y. (2021). Dual near-infrared fluorescence-based lateral flow immunosensor for the detection of zearalenone and deoxynivalenol in maize. *Food Chemistry*, 336, 127718.
- Juan, C., González, L., Soriano, J. M., Moltó, J. C., & Mañes, J. (2005). Accelerated solvent extraction of ochratoxin A from rice samples. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(24), 9348-9351.
- Juan, C., Ritieni, A., & Mañes, J. (2012). Determination of trichothecenes and zearalenones in grain cereal, flour and bread by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food chemistry*, 134(4), 2389-2397.
- Jubeen, F., Batool, A., Naz, I., Sehar, S., Sadia, H., Hayat, A., & Kazi, M. (2024). Mycotoxins detection in food using advanced, sensitive and robust electrochemical platform of sensors: A review. *Sensors and Actuators A: Physical*, 367, 115045.
- Kamle, M., Mahato, D. K., Devi, S., Lee, K. E., Kang, S. G., & Kumar, P. (2019). Fumonisin: Impact on agriculture, food, and human health and their management strategies. *Toxins*, 11(6), 328.

- Karlovsy, P., Suman, M., Berthiller, F., De Meester, J., Eisenbrand, G., Perrin, I., ... & Dussort, P. (2016). Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination. *Mycotoxin research*, 32(4), 179-205.
- Kaur, M., Gaba, J., Singh, K., Bhatia, Y., Singh, A., & Singh, N. (2023). Recent advances in recognition receptors for electrochemical biosensing of mycotoxins—A review. *Biosensors*, 13(3), 391.
- Kedia, A., Dwivedy, A. K., Jha, D. K., & Dubey, N. K. (2016). Efficacy of *Mentha spicata* essential oil in suppression of *Aspergillus flavus* and aflatoxin contamination in chickpea with particular emphasis to mode of antifungal action: A. Kedia et al. *Protoplasma*, 253(3), 647-653.
- Khan, R., Anwar, F., & Ghazali, F. M. (2024). A comprehensive review of mycotoxins: Toxicology, detection, and effective mitigation approaches. *Heliyon*, 10(8), e28361. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e28361>
- Khan, R., Ghazali, F. M., Mahyudin, N. A., & Samsudin, N. I. P. (2021). Aflatoxin biosynthesis, genetic regulation, toxicity, and control strategies: A review. *Journal of Fungi*, 7(8), 606.
- Khan, R., Ghazali, F. M., Mahyudin, N. A., & Samsudin, N. I. P. (2021). Biocontrol of aflatoxins using non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus*: A literature review. *Journal of Fungi*, 7(5), 381.
- Khan, R., Ghazali, F. M., Mahyudin, N. A., & Samsudin, N. I. P. (2021). Chromatographic analysis of aflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolated from Malaysian sweet corn. *Separations*, 8(7), 98.
- Khan, R., Ghazali, F. M., Mahyudin, N. A., & Samsudin, N. I. P. (2021). Co-Inoculation of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus* to assess the efficacy of non-aflatoxigenic strains in growth inhibition and aflatoxin B1 reduction. *Agriculture*, 11(3), 198.
- Khan, R., Mohamad Ghazali, F., Mahyudin, N. A., & Samsudin, N. I. P. (2020). Morphological characterization and determination of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolated from sweet corn kernels and soil in Malaysia. *Agriculture*, 10(10), 450.

- Kiš, M., Milošević, S., Vulić, A., Herceg, Z., Vukušić, T., & Pleadin, J. (2020). Efficacy of low pressure DBD plasma in the reduction of T-2 and HT-2 toxin in oat flour. *Food chemistry*, 316, 126372.
- Kollia, E., Proestos, C., Zoumpoulakis, P., & Markaki, P. (2019). Capsaicin, an inhibitor of Ochratoxin A production by *Aspergillus section Nigri* strains in grapes (*Vitis vinifera* L.). *Food Additives & Contaminants: Part A*, 36(11), 1709-1721.
- Kowalska, A., Walkiewicz, K., Koziel, P., & Muc-Wierzgoń, M. (2017). Aflatoxins: characteristics and impact on human health. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej (Online)*, 71, 315-327.
- Kumar, K. N., Venkataramana, M., Allen, J. A., Chandranayaka, S., Murali, H. S., & Batra, H. V. (2016). Role of *Curcuma longa* L. essential oil in controlling the growth and zearalenone production of *Fusarium graminearum*. *LWT-Food Science and Technology*, 69, 522-528.
- Kumar, P., Mahato, D. K., Kamle, M., Mohanta, T. K., & Kang, S. G. (2017). Aflatoxins: A global concern for food safety, human health and their management. *Frontiers in microbiology*, 7, 235289.
- Lapris, M., Errico, M., Rocchetti, G., & Gallo, A. (2024). The potential of multi-screening methods and omics technologies to detect both regulated and emerging mycotoxins in different matrices. *Foods*, 13(11), 1746.
- Lee, G. J., Sim, G. B., Choi, E. H., Kwon, Y. W., Kim, J. Y., Jang, S., & Kim, S. H. (2015). Optical and structural properties of plasma-treated *Cordyceps bassiana* spores as studied by circular dichroism, absorption, and fluorescence spectroscopy. *Journal of Applied Physics*, 117(2).
- Lewis, S. A., Berg, J. R., & Kleine, T. J. (1995). Modulation of epithelial permeability by extracellular macromolecules. *Physiological reviews*, 75(3), 561-589.
- Li, R., Wen, Y., Wang, F., & He, P. (2021). Recent advances in immunoassays and biosensors for mycotoxins detection in feedstuffs and foods. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 12(1), 108.
- Li, Y., Sun, L., & Zhao, Q. (2019). Aptamer-structure switch coupled with horseradish peroxidase labeling on a microplate for the sensitive detection of small molecules. *Analytical Chemistry*, 91(4), 2615-2619.

- Li, Y., Wang, Z., Beier, R. C., Shen, J., Smet, D. D., De Saeger, S., & Zhang, S. (2011). T-2 toxin, a trichothecene mycotoxin: review of toxicity, metabolism, and analytical methods. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(8), 3441-3453.
- Liu, D., Ge, L., Wang, Q., Su, J., Chen, X., Wang, C., & Huang, K. (2020). Low-level contamination of deoxynivalenol: A threat from environmental toxins to porcine epidemic diarrhea virus infection. *Environment International*, 143, 105949.
- Liu, M., Li, X., Zhou, S., Men, D., Duan, Y., Liu, H., ... & Hou, C. (2024). Ultrasensitive detection of mycotoxins using a novel single-Atom, CRISPR/Cas12a-Based nanozymatic colorimetric biosensor. *Chemical engineering journal*, 497, 154418.
- Lu, L., Seenivasan, R., Wang, Y. C., Yu, J. H., & Gunasekaran, S. (2016). An electrochemical immunosensor for rapid and sensitive detection of mycotoxins fumonisin B1 and deoxynivalenol. *Electrochimica Acta*, 213, 89-97.
- Lu, Q., Li, X., Zhao, J., Zhu, J., Luo, Y., Duan, H., ... & Zhao, Q. (2020). Nanobody-horseradish peroxidase and-EGFP fusions as reagents to detect porcine parvovirus in the immunoassays. *Journal of nanobiotechnology*, 18(1), 7.
- Lucci, P. (2025). Preparazione del campione: tecniche di purificazione (SPE e QuEChERS) [Slide del corso]. Controllo analitico di qualità – CI, Modulo di Analisi strumentale per la verifica della qualità e sicurezza degli alimenti, Università Politecnica delle Marche.
- Mabtech. (n.d.). Step-by-step guide to ELISA. <https://www.mabtech.com/knowledge-hub/step-step-guide-elisa>
- Mahesh, B. (2020). Machine learning algorithms-a review Int J Sci Res (IJSR).[Internet] 9.
- Mahfoud, R., Maresca, M., Garmy, N., & Fantini, J. (2002). The mycotoxin patulin alters the barrier function of the intestinal epithelium: mechanism of action of the toxin and protective effects of glutathione. *Toxicology and applied pharmacology*, 181(3), 209-218.
- Majer-Baranyi, K., Adányi, N., & Székács, A. (2021). Biosensors for deoxynivalenol and zearalenone determination in feed quality control. *Toxins*, 13(7), 499.
- Majer-Baranyi, K., Adányi, N., & Székács, A. (2023). Current trends in mycotoxin detection with various types of biosensors. *Toxins*, 15(11), 645.
- Makhuvele, R., Naidu, K., Gbashi, S., Thihe, V. C., Adebo, O. A., & Njobeh, P. B. (2020). The use of plant extracts and their phytochemicals for control of toxigenic fungi and mycotoxins. *Heliyon*, 6(10).

- Malíř, F., Ostrý, V., Bárta, I., Buchta, V., DVOŘÁČKOVÁ, I., PAŘÍKOVÁ, J., ... & ŠKARKOVÁ, J. (2003). Vlákňité mikromycety (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka [Filamentous micromycetes (moulds), mycotoxins and human health].—349 p. Brno.[in Czech].
- Malir, F., Ostry, V., Pfohl-Leszkowicz, A., Malir, J., & Toman, J. (2016). Ochratoxin A: 50 years of research. *Toxins*, 8(7), 191.
- Maphaisa, T. C., Akinmoladun, O. F., Adelusi, O. A., Mwanza, M., Fon, F., Tangni, E., & Njobeh, P. B. (2025). Advances in mycotoxin detection techniques and the crucial role of reference material in ensuring food safety. A review. *Food and chemical toxicology*, 200, 115387.
- Marchese, S., Polo, A., Ariano, A., Velotto, S., Costantini, S., & Severino, L. (2018). Aflatoxin B1 and M1: Biological properties and their involvement in cancer development. *Toxins*, 10(6), 214.
- Maresca, M., Yahi, N., Younès-Sakr, L., Boyron, M., Caporiccio, B., & Fantini, J. (2008). Both direct and indirect effects account for the pro-inflammatory activity of enteropathogenic mycotoxins on the human intestinal epithelium: Stimulation of interleukin-8 secretion, potentiation of interleukin-1 β effect and increase in the transepithelial passage of commensal bacteria. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 228(1), 84-92.
- Marin, S., Ramos, A. J., Cano-Sancho, G., & Sanchis, V. (2013). Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and chemical toxicology*, 60, 218-237.
- McCormick, S. P., Stanley, A. M., Stover, N. A., & Alexander, N. J. (2011). Trichothecenes: from simple to complex mycotoxins. *Toxins*, 3(7), 802-814.
- Mehany, T., Khalifa, I., Barakat, H., Althwab, S. A., Alharbi, Y. M., & El-Sohaimy, S. (2021). Polyphenols as promising biologically active substances for preventing SARS-CoV-2: A review with research evidence and underlying mechanisms. *Food Bioscience*, 40, 100891.
- Meiselman, H. L., Jaeger, S. R., Carr, B. T., & Churchill, A. (2022). Approaching 100 years of sensory and consumer science: Developments and ongoing issues. *Food Quality and Preference*, 100, 104614.

- Melchert, H. U., & Pabel, E. (2004). Reliable identification and quantification of trichothecenes and other mycotoxins by electron impact and chemical ionization-gas chromatography–mass spectrometry, using an ion-trap system in the multiple mass spectrometry mode: Candidate reference method for complex matrices. *Journal of Chromatography A*, 1056(1-2), 195-199.
- Mesterházy, Á., Oláh, J., & Popp, J. (2020). Losses in the grain supply chain: Causes and solutions. *Sustainability*, 12(6), 2342.
- Mir, S. A., Dar, B. N., Shah, M. A., Sofi, S. A., Hamdani, A. M., Oliveira, C. A., ... & Sant'Ana, A. S. (2021). Application of new technologies in decontamination of mycotoxins in cereal grains: Challenges, and perspectives. *Food and chemical toxicology*, 148, 111976.
- Misra, N. N., Yadav, B., Roopesh, M. S., & Jo, C. (2019). Cold plasma for effective fungal and mycotoxin control in foods: mechanisms, inactivation effects, and applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 18(1), 106-120.
- Miu, B. A., & Dinischiotu, A. (2022). New green approaches in nanoparticles synthesis: An overview. *Molecules*, 27(19), 6472.
- Montanari, C., Bargossi, E., Gardini, A., Lanciotti, R., Magnani, R., Gardini, F., & Tabanelli, G. (2016). Correlation between volatile profiles of Italian fermented sausages and their size and starter culture. *Food Chemistry*, 192, 736-744.
- Montes, R., Segarra, R., & Castillo, M. Á. (2012). Trichothecenes in breakfast cereals from the Spanish retail market. *Journal of Food Composition and Analysis*, 27(1), 38-44.
- Moreno, V., Zougagh, M., & Ríos, Á. (2016). Hybrid nanoparticles based on magnetic multiwalled carbon nanotube-nanoC18SiO₂ composites for solid phase extraction of mycotoxins prior to their determination by LC-MS. *Microchimica Acta*, 183(2), 871-880.
- Morgavi, D. P., & Riley, R. T. (2007). An historical overview of field disease outbreaks known or suspected to be caused by consumption of feeds contaminated with Fusarium toxins. *Animal feed science and technology*, 137(3-4), 201-212.
- Munawar, H., Safaryan, A. H., De Girolamo, A., Garcia-Cruz, A., Marote, P., Karim, K., ... & Piletsky, S. A. (2019). Determination of Fumonisin B1 in maize using molecularly imprinted polymer nanoparticles-based assay. *Food chemistry*, 298, 125044.

- Nihal P, M., Mohapatra, D., Mohd, S., Harish, V., Singh, S. K., & Singh, G. (2024). Nanotechnology-based approaches for mycotoxin detection in food and feed. *Journal of Food Safety*, 44(4), e13155.
- Nodoushan, S. M., Nasirizadeh, N., Amani, J., Halabian, R., & Fooladi, A. A. I. (2019). An electrochemical aptasensor for staphylococcal enterotoxin B detection based on reduced graphene oxide and gold nano-urchins. *Biosensors and Bioelectronics*, 127, 221-228.
- Okioma, M. N. (2008). The 2004 and 2005 aflatoxin tragedies in Kenya-a case study. In *Mycotoxins: detection methods, management, public health and agricultural trade* (pp. 127-131). Wallingford UK: CABI.
- Ostry, V., Malir, F., & Ruprich, J. (2013). Producers and important dietary sources of ochratoxin A and citrinin. *Toxins*, 5(9), 1574-1586.
- Ostry, V., Malir, F., Toman, J., & Grosse, Y. (2017). Mycotoxins as human carcinogens—the IARC Monographs classification. *Mycotoxin research*, 33(1), 65-73.
- Pacheco, J. G., Castro, M., Machado, S., Barroso, M. F., Nouws, H. P., & Delerue-Matos, C. (2015). Molecularly imprinted electrochemical sensor for ochratoxin A detection in food samples. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 215, 107-112.
- Pandey, P. S., Raghuwanshi, S. K., Shadab, A., Ansari, M. T. I., Tiwari, U. K., & Kumar, S. (2022). SPR based biosensing chip for COVID-19 diagnosis—A review. *IEEE sensors journal*, 22(14), 13800-13810.
- Pastucha, M., Farka, Z., Lacina, K., Mikušová, Z., & Skládal, P. (2019). Magnetic nanoparticles for smart electrochemical immunoassays: a review on recent developments. *Microchimica Acta*, 186(5), 312.
- Patocka, J. (2018). Bolesatine, a toxic protein from the mushroom *rubroboletus satanas*. *Military Medical Science Letters*, 87(1), 14-20.
- Payros, D., Alassane-Kpembi, I., Pierron, A., Loiseau, N., Pinton, P., & Oswald, I. P. (2016). Toxicology of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms. *Archives of toxicology*, 90(12), 2931-2957.
- Pei, Z., Su, Z., Chen, J., Li, W., Wu, D., Li, L., ... & Li, G. (2024). A nanopore-based label-free CRISPR/Cas12a system for portable and ultrasensitive detection of zearalenone. *Analytica Chimica Acta*, 1330, 343280.

- Pereira, V. L., Fernandes, J. O., & Cunha, S. C. (2014). Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 36(2), 96-136.
- Perestrelo, R., Silva, P., Porto-Figueira, P., Pereira, J. A., Silva, C., Medina, S., & Câmara, J. S. (2019). QuEChERS-Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends. *Analytica chimica acta*, 1070, 1-28.
- Pfohl-Leszkowicz, A., & Manderville, R. A. (2007). Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular nutrition & food research*, 51(1), 61-99.
- Pietrzak, K., Twarużek, M., Czyżowska, A., Kosicki, R., & Gutarowska, B. (2015). Influence of silver nanoparticles on metabolism and toxicity of moulds. *Acta Biochimica Polonica*, 62(4), 851-857.
- Piletsky, S. A., Piletska, E. V., Chen, B., Karim, K., Weston, D., Barrett, G., ... & Turner, A. P. (2000). Chemical grafting of molecularly imprinted homopolymers to the surface of microplates. Application of artificial adrenergic receptor in enzyme-linked assay for β -agonists determination. *Analytical Chemistry*, 72(18), 4381-4385.
- Pinton, P., Accensi, F., Beauchamp, E., Cossalter, A. M., Callu, P., Grosjean, F., & Oswald, I. P. (2008). Ingestion of deoxynivalenol (DON) contaminated feed alters the pig vaccinal immune responses. *Toxicology Letters*, 177(3), 215-222.
- Pisoschi, A. M., Iordache, F., Stanca, L., Mitranescu, E., Bader Stoica, L., Geicu, O. I., ... & Serban, A. I. (2024). Biosensors for food mycotoxin determination: a comparative and critical review. *Chemosensors*, 12(6), 92.
- Pleadin, J., Frece, J., & Markov, K. (2019). Mycotoxins in food and feed. *Advances in food and nutrition research*, 89, 297-345.
- Puel, O., Galtier, P., & Oswald, I. P. (2010). Biosynthesis and toxicological effects of patulin. *Toxins*, 2(4), 613-631.
- Puligundla, P., Lee, T., & Mok, C. (2020). Effect of corona discharge plasma jet treatment on the degradation of aflatoxin B1 on glass slides and in spiked food commodities. *Lwt*, 124, 108333.

- Ramesh, M., Janani, R., Deepa, C., & Rajeshkumar, L. (2022). Nanotechnology-enabled biosensors: a review of fundamentals, design principles, materials, and applications. *Biosensors*, 13(1), 40.
- Rasheed, S., Kanwal, T., Ahmad, N., Fatima, B., Najam-ul-Haq, M., & Hussain, D. (2024). Advances and challenges in portable optical biosensors for onsite detection and point-of-care diagnostics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 173, 117640.
- Rašić, D., Želježić, D., Kopjar, N., Kifer, D., Klarić, M. Š., & Peraica, M. (2019). DNA damage in rat kidneys and liver upon subchronic exposure to single and combined ochratoxin A and citrinin. *World mycotoxin journal*, 12(2), 163-172.
- Régnier, M., Goubeyre, P., Pinton, P., Napper, S., Laffite, J., Cossalter, A. M., ... & Oswald, I. P. (2017). Identification of signaling pathways targeted by the food contaminant FB1: transcriptome and kinome analysis of samples from pig liver and intestine. *Molecular Nutrition & Food Research*, 61(12), 1700433.
- Richard-Forget, F., Atanasova, V., & Chéreau, S. (2021). Using metabolomics to guide strategies to tackle the issue of the contamination of food and feed with mycotoxins: A review of the literature with specific focus on Fusarium mycotoxins. *Food Control*, 121, 107610.
- Riley, R. T., & Merrill, A. H. (2019). Ceramide synthase inhibition by fumonisins: a perfect storm of perturbed sphingolipid metabolism, signaling, and disease [S]. *Journal of Lipid Research*, 60(7), 1183-1189.
- Rodrigues, I., & Naehrer, K. (2012). A three-year survey on the worldwide occurrence of mycotoxins in feedstuffs and feed. *Toxins*, 4(9), 663-675.
- Rubert, J., Righetti, L., Stranska-Zachariasova, M., Dzuman, Z., Chrpova, J., Dall'Asta, C., & Hajslova, J. (2017). Untargeted metabolomics based on ultra-high-performance liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry merged with chemometrics: A new predictable tool for an early detection of mycotoxins. *Food Chemistry*, 224, 423-431.
- Saha, D., & Manickavasagan, A. (2021). Machine learning techniques for analysis of hyperspectral images to determine quality of food products: A review. *Current Research in Food Science*, 4, 28-44.
- Salas, M. P., Reynoso, C. M., Céliz, G., Daz, M., & Resnik, S. L. (2012). Efficacy of flavanones obtained from citrus residues to prevent patulin contamination. *Food Research International*, 48(2), 930-934.

- Sanzani, S. M., Schena, L., Nigro, F., De Girolamo, A., & Ippolito, A. (2009). Effect of quercetin and umbelliferone on the transcript level of *Penicillium expansum* genes involved in patulin biosynthesis. *European Journal of Plant Pathology*, 125(2), 223-233.
- Sarker, I. H. (2021). Machine learning: Algorithms, real-world applications and research directions. *SN computer science*, 2(3), 1-21.
- Schelstraete, W., Devreese, M., & Croubels, S. (2020). Comparative toxicokinetics of *Fusarium* mycotoxins in pigs and humans. *Food and Chemical Toxicology*, 137, 111140.
- Schmidt, H. S., Schulz, M., Focke, C., Becker, S., Cramer, B., & Humpf, H. U. (2018). Glucosylation of T-2 and HT-2 toxins using biotransformation and chemical synthesis: Preparation, stereochemistry, and stability. *Mycotoxin Research*, 34(3), 159-172.
- Schneider, R. J. (2003). Environmental immunoassays. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*, 375(1).
- Scott, P. M., Lawrence, J. W., & Van Walbeek, W. (1970). Detection of mycotoxins by thin-layer chromatography: application to screening of fungal extracts. *Applied Microbiology*, 20(5), 839-842.
- Sharma, V., & Patial, V. (2021). Food mycotoxins: Dietary interventions implicated in the prevention of mycotoxicosis. *ACS Food Science & Technology*, 1(10), 1717-1739.
- Sheng, Y., Wang, K., Lu, Q., Ji, P., Liu, B., Zhu, J., ... & Zhao, Q. (2019). Nanobody-horseradish peroxidase fusion protein as an ultrasensitive probe to detect antibodies against Newcastle disease virus in the immunoassay. *Journal of nanobiotechnology*, 17(1), 35.
- Shephard, G. S. (2008). Impact of mycotoxins on human health in developing countries. *Food Additives and contaminants*, 25(2), 146-151.
- Shephard, G. S. (2016). Current status of mycotoxin analysis: a critical review. *Journal of AOAC International*, 99(4), 842-848.
- Shim, W. B., Kim, M. J., Mun, H., & Kim, M. G. (2014). An aptamer-based dipstick assay for the rapid and simple detection of aflatoxin B1. *Biosensors and Bioelectronics*, 62, 288-294.
- Singh, A. K., Mittal, S., Das, M., Saharia, A., & Tiwari, M. (2023). Optical biosensors: A decade in review. *Alexandria Engineering Journal*, 67, 673-691.
- Singh, A. K., Sri, S., Garimella, L. B., Dhiman, T. K., Sen, S., & Solanki, P. R. (2022). Graphene quantum dot-based optical sensing platform for aflatoxin B1 detection via the resonance energy transfer phenomenon. *ACS Applied Bio Materials*, 5(3), 1179-1186.

- Solis, L. N. F., Junior, G. J. S., Bertotti, M., Angnes, L., Pereira, S. V., Fernández-Baldo, M. A., & Regiart, M. (2024). Electrochemical microfluidic immunosensor with graphene-decorated gold nanoporous for T-2 mycotoxin detection. *Talanta*, 273, 125971.
- Song, E., Xia, X., Su, C., Dong, W., Xian, Y., Wang, W., & Song, Y. (2014). Hepatotoxicity and genotoxicity of patulin in mice, and its modulation by green tea polyphenols administration. *Food and Chemical Toxicology*, 71, 122-127.
- Steinkellner, H., Binaglia, M., Dall'Asta, C., Gutleb, A. C., Metzler, M., Oswald, I. P., ... & Alexander, J. (2019). Combined hazard assessment of mycotoxins and their modified forms applying relative potency factors: Zearalenone and T2/HT2 toxin. *Food and Chemical Toxicology*, 131, 110599.
- Suliman Maashi, M. (2024). CRISPR/Cas-based aptasensor as an innovative sensing approaches for food safety analysis: recent progresses and new horizons. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 54(7), 2599-2617.
- Sulyok, M., Stadler, D., Steiner, D., & Krska, R. (2020). Validation of an LC-MS/MS-based dilute-and-shoot approach for the quantification of > 500 mycotoxins and other secondary metabolites in food crops: Challenges and solutions. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 412(11), 2607-2620.
- Sun, D., Chasseur, C., Mathieu, F., Lechanteur, J., Van Antwerpen, P., Rasschaert, J., ... & Delporte, C. (2023). Untargeted Metabolomics Approach Correlated Enniatin B Mycotoxin Presence in Cereals with Kashin–Beck Disease Endemic Regions of China. *Toxins*, 15(9), 533.
- Sun, L. H., Lei, M. Y., Zhang, N. Y., Gao, X., Li, C., Krumm, C. S., & Qi, D. S. (2015). Individual and combined cytotoxic effects of aflatoxin B1, zearalenone, deoxynivalenol and fumonisin B1 on BRL 3A rat liver cells. *Toxicon*, 95, 6-12.
- Sun, L., Li, Y., Wang, H., & Zhao, Q. (2019). An aptamer assay for aflatoxin B1 detection using Mg²⁺ mediated free zone capillary electrophoresis coupled with laser induced fluorescence. *Talanta*, 204, 182-188.
- Székács, I., Adányi, N., Szendrő, I., & Székács, A. (2021). Direct and competitive optical grating immunosensors for determination of Fusarium mycotoxin zearalenone. *Toxins*, 13(1), 43.

- Szelenberger, R., Cichoń, N., Zajaczkowski, W., & Bijak, M. (2024). Application of Biosensors for the Detection of Mycotoxins for the Improvement of Food Safety. *Toxins*, 16(6), 249.
- Tang, D., Saucedo, J. C., Lin, Z., Ott, S., Basova, E., Goryacheva, I., ... & Knopp, D. (2009). Magnetic nanogold microspheres-based lateral-flow immunodipstick for rapid detection of aflatoxin B2 in food. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(2), 514-518.
- Tang, D., Zhong, Z., Niessner, R., & Knopp, D. (2009). Multifunctional magnetic bead-based electrochemical immunoassay for the detection of aflatoxin B 1 in food. *Analyst*, 134(8), 1554-1560.
- Tang, Z., Liu, F., Fang, F., Ding, X., Han, Q., Tan, Y., & Peng, C. (2022). Solid-phase extraction techniques based on nanomaterials for mycotoxin analysis: An overview for food and agricultural products. *Journal of separation science*, 45(13), 2273-2300.
- Tannous, J., Snini, S. P., El Khoury, R., Canlet, C., Pinton, P., Lippi, Y., ... & Puel, O. (2017). Patulin transformation products and last intermediates in its biosynthetic pathway, E-and Z-ascladiol, are not toxic to human cells. *Archives of Toxicology*, 91(6), 2455-2467.
- Tapia, M. S., Alzamora, S. M., & Chirife, J. (2020). Effects of water activity (aw) on microbial stability as a hurdle in food preservation. *Water activity in foods: Fundamentals and applications*, 323-355.
- Telles, A. C., Kupski, L., & Furlong, E. B. (2017). Phenolic compound in beans as protection against mycotoxins. *Food Chemistry*, 214, 293-299.
- Thipe, V. C., de Oliveira Asenjo Mendes, G., Alves, V. M., Souza, T., Ajayi, R. F., Lugao, A. B., & Katti, K. V. (2022). Nanodiagnostic tools for mycotoxins detection. In *Nanorobotics and Nanodiagnosics in Integrative Biology and Biomedicine* (pp. 361-381). Cham: Springer International Publishing.
- Tian, J., Ban, X., Zeng, H., He, J., Huang, B., & Wang, Y. (2011). Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cicuta virosa* L. var. *latisecta* Celak. *International Journal of Food Microbiology*, 145(2-3), 464-470.
- Tripathi, P., Upadhyay, N., & Nara, S. (2018). Recent advancements in lateral flow immunoassays: A journey for toxin detection in food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(10), 1715-1734.

- Umereweneza, D., Kamizikunze, T., & Muhizi, T. (2018). Assessment of mycotoxins types in some foodstuff consumed in Rwanda. *Food Control*, 85, 432-436.
- Urusov, A. E., Petrakova, A. V., Vozniak, M. V., Zherdev, A. V., & Dzantiev, B. B. (2014). Rapid immunoenzyme assay of aflatoxin B1 using magnetic nanoparticles. *Sensors*, 14(11), 21843-21857.
- Urusov, A. E., Zherdev, A. V., & Dzantiev, B. B. (2010). Immunochemical methods of mycotoxin analysis. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 46(3), 253-266.
- Van Egmond, H. P., Schothorst, R. C., & Jonker, M. A. (2007). Regulations relating to mycotoxins in food: perspectives in a global and European context. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 389(1), 147-157.
- Vila-Donat, P., Marín, S., Sanchis, V., & Ramos, A. J. (2018). A review of the mycotoxin adsorbing agents, with an emphasis on their multi-binding capacity, for animal feed decontamination. *Food and chemical toxicology*, 114, 246-259.
- Villarreal-Barajas, T., Vázquez-Durán, A., & Méndez-Albores, A. (2022). Effectiveness of electrolyzed oxidizing water on fungi and mycotoxins in food. *Food Control*, 131, 108454.
- Vin, K., Rivière, G., Leconte, S., Cravedi, J. P., Fremy, J. M., Oswald, I. P., ... & Sirot, V. (2020). Dietary exposure to mycotoxins in the French infant total diet study. *Food and Chemical Toxicology*, 140, 111301.
- Wambacq, E., Vanhoutte, I., Audenaert, K., De Gelder, L., & Haesaert, G. (2016). Occurrence, prevention and remediation of toxigenic fungi and mycotoxins in silage: A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(7), 2284-2302.
- Wang, J. Y., & Doudna, J. A. (2023). CRISPR technology: A decade of genome editing is only the beginning. *Science*, 379(6629), eadd8643.
- Wang, S., Xu, Z., Fang, G., Zhang, Y., Liu, B., & Zhu, H. (2009). Development of a biomimetic enzyme-linked immunosorbent assay method for the determination of estrone in environmental water using novel molecularly imprinted films of controlled thickness as artificial antibodies. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(11), 4528-4534.
- Wang, X., Han, Y., Geng, J., Zhu, A., Wei, X., Xiang, Q., & Zong, W. (2022). Removal of *Alternaria* mycotoxins exposed to different food components by cold plasma. *Food chemistry*, 397, 133770.

- Wei, L., Wang, Z., & Chen, Y. (2022). Optical biosensor for ochratoxin a detection in grains using an enzyme-mediated click reaction and polystyrene nanoparticles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(46), 14798-14804.
- Wielogorska, E., Ahmed, Y., Meneely, J., Graham, W. G., Elliott, C. T., & Gilmore, B. F. (2019). A holistic study to understand the detoxification of mycotoxins in maize and impact on its molecular integrity using cold atmospheric plasma treatment. *Food chemistry*, 301, 125281.
- Wu, S., Liu, L., Duan, N., Li, Q., Zhou, Y., & Wang, Z. (2018). Aptamer-based lateral flow test strip for rapid detection of zearalenone in corn samples. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(8), 1949-1954.
- Wu, Z., He, D., Cui, B., Jin, Z., Xu, E., Yuan, C., ... & Chai, Q. (2020). Trimer-based aptasensor for simultaneous determination of multiple mycotoxins using SERS and fluorimetry. *Microchimica Acta*, 187(9), 495.
- Xie, H., Wang, X., van der Hooft, J. J., Medema, M. H., Chen, Z. Y., Yue, X., ... & Li, P. (2022). Fungi population metabolomics and molecular network study reveal novel biomarkers for early detection of aflatoxigenic *Aspergillus* species. *Journal of hazardous materials*, 424, 127173.
- Xiong, Y., Leng, Y., Li, X., Huang, X., & Xiong, Y. (2020). Emerging strategies to enhance the sensitivity of competitive ELISA for detection of chemical contaminants in food samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 126, 115861.
- Xu, S., Zhang, G., Fang, B., Xiong, Q., Duan, H., & Lai, W. (2019). Lateral flow immunoassay based on polydopamine-coated gold nanoparticles for the sensitive detection of zearalenone in maize. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 11(34), 31283-31290.
- Yan, J. X., Hu, W. J., You, K. H., Ma, Z. E., Xu, Y., Li, Y. P., & He, Q. H. (2020). Biosynthetic mycotoxin conjugate mimetics-mediated green strategy for multiplex mycotoxin immunochromatographic assay. *Journal of agricultural and food chemistry*, 68(7), 2193-2200.
- Yan, J., Shi, Q., You, K., Li, Y., & He, Q. (2019). Phage displayed mimotope peptide-based immunosensor for green and ultrasensitive detection of mycotoxin deoxynivalenol. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 168, 94-101.

- Yin, M., Hu, X., Sun, Y., Xing, Y., Xing, G., Wang, Y., ... & Zhang, G. (2020). Broad-spectrum detection of zearanol and its analogues by a colloidal gold-based lateral flow immunochromatographic assay in milk. *Food chemistry*, 321, 126697.
- Young, J. C., Zhou, T., Yu, H., Zhu, H., & Gong, J. (2007). Degradation of trichothecene mycotoxins by chicken intestinal microbes. *Food and Chemical Toxicology*, 45(1), 136-143.
- Zahoor, M., & Khan, F. A. (2016). Aflatoxin B1 detoxification by magnetic carbon nanostructures prepared from maize straw. *Desalination and Water treatment*, 57(25), 11893-11903.
- Zhan, S., Zheng, L., Zhou, Y., Wu, K., Duan, H., Huang, X., & Xiong, Y. (2019). A gold growth-based plasmonic ELISA for the sensitive detection of fumonisin B1 in maize. *Toxins*, 11(6), 323.
- Zhang, M., Guo, X., & Wang, J. (2023). Advanced biosensors for mycotoxin detection incorporating miniaturized meters. *Biosensors and Bioelectronics*, 224, 115077.
- Zhang, Y., Li, M., Liu, Y., Guan, E., & Bian, K. (2020). Reduction of aflatoxin B1 in corn by water-assisted microwaves treatment and its effects on corn quality. *Toxins*, 12(9), 605.
- Zhang, Z. H., Wang, L. H., Zeng, X. A., Han, Z., & Brennan, C. S. (2019). Non-thermal technologies and its current and future application in the food industry: A review. *International Journal of Food Science and Technology*, 54(1), 1-13.
- Zhao, Y., Yuan, Y. C., Bai, X. L., Liu, Y. M., Wu, G. F., Yang, F. S., & Liao, X. (2020). Multi-mycotoxins analysis in liquid milk by UHPLC-Q-Exactive HRMS after magnetic solid-phase extraction based on PEGylated multi-walled carbon nanotubes. *Food Chemistry*, 305, 125429.
- Zhou, H., George, S., Hay, C., Lee, J., Qian, H., & Sun, X. (2017). Individual and combined effects of aflatoxin B1, deoxynivalenol and zearalenone on HepG2 and RAW 264.7 cell lines. *Food and chemical Toxicology*, 103, 18-27.
- Zhou, S., Zhu, X., Song, S., Sun, M., Kuang, H., Xu, C., & Guo, L. (2024). Rapid and simultaneous detection of five mycotoxins and their analogs with a gold nanoparticle-based multiplex immuno-strip sensor. *Food microbiology*, 121, 104510.

Zingerle, M., Silbernagl, S., & Gekle, M. (1997). Reabsorption of the nephrotoxin ochratoxin A along the rat nephron in vivo. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 280(1), 220-224.

RINGRAZIAMENTI

Giunta al termine di questo percorso, desidero rivolgere un pensiero di profonda gratitudine a tutte le persone che mi hanno sostenuta nel raggiungimento di questo traguardo.

In primo luogo, vorrei ringraziare il mio relatore, il Dott. Massimiliano Gasparrini, per la sua accurata supervisione e la continua disponibilità durante la stesura di questa tesi. La sua professionalità e il suo sostegno sono stati fondamentali per affrontare questo lavoro con serenità.

Un ringraziamento speciale va alla mia famiglia, grazie per avermi sostenuta in ogni momento di difficoltà e per aver condiviso con me ogni piccola gioia. Se oggi ho raggiunto questo obiettivo, è soprattutto merito del vostro affetto e dei sacrifici che avete fatto per me.

Al mio ragazzo Vittorio voglio dire grazie, non solo per essermi stato vicino, ma anche per aver accolto le mie ansie e avermi incoraggiata ad andare sempre avanti. Con te accanto, questo cammino è stato più leggero e speciale.

Ai miei colleghi universitari, compagni di studio e di vita, grazie per aver condiviso con me le fatiche e i successi di questi anni; la vostra amicizia ha reso questo percorso un'esperienza indimenticabile.

Esprimo inoltre la mia gratitudine a ogni persona incontrata lungo il cammino che, con un gesto o una parola, mi è stata vicina. Ogni incontro ha lasciato un segno prezioso nella mia crescita.

Infine, sento il bisogno di ringraziare me stessa per la costanza e la tenacia con cui ho affrontato le sfide di questi anni. Questo traguardo rappresenta oggi la prova che continuare a credere in sé stessi, nonostante le difficoltà del cammino, porti a nuove e importanti mete; un percorso che mi ha permesso di scoprire una forza interiore che non pensavo di avere, che mi ha spinto, giorno dopo giorno, fino a qui e che spero mi accompagni in tutti gli altri traguardi che mi attendono in futuro.