

Indice

1	Introduzione	4
1.1	Micotossine	6
1.1.1	Cenni storici	10
1.1.2	Fattori che influenzano la produzione di micotossine.....	12
1.1.3	Intossicazioni da micotossine.....	15
1.1.4	Limiti di legge per le micotossine	18
1.2	Aflatossine.....	21
1.2.1	Intossicazione da Aflatossine	24
1.2.1.1	Tossicocinetica.....	24
1.2.1.1.1	Assorbimento.....	24
1.2.1.1.2	Distribuzione	24
1.2.1.1.3	Reazione di I fase	25
1.2.1.1.4	Reazione di II fase	25
1.2.1.1.5	Tossicità.....	25
1.2.1.2	Meccanismo d'azione	27
1.2.1.2.1	Azione sugli acidi nucleici	27
1.2.1.2.2	Azione sulla sintesi proteica del metabolismo dei lipidi e carboidrati	27
1.2.1.2.3	Azione a carico del sistema immunitario	28
1.2.2	Specifici limiti di legge per le Aflatossine	28
2	Scopo del lavoro.....	31
3	Materiali e metodi	33
3.1	Materiali	37
3.1.1	Standard concentrati	37
3.1.1.1	Preparazione delle soluzioni contenenti gli standard.....	37
3.1.1.1.1	Soluzione Madre.....	37
3.1.1.1.2	Stock Solution.....	37
3.1.1.1.3	Working Standard Solution a 100 µg/l.....	37
3.1.1.1.4	Working Standard Solution 20 µg/l.....	38

3.1.2	Reagenti.....	38
3.1.2.1	Reagenti per la preparazione del campione	38
3.1.2.2	Reagenti per preparazione della fase mobile	38
3.1.3	Strumenti	39
3.1.3.1	Strumenti per la preparazione del campione.....	39
3.1.3.2	Strumenti per l'analisi.....	39
3.2	Metodi	41
3.2.1	Variazioni della fase mobile.....	41
3.2.2	Variazioni della temperatura	42
3.2.3	Variazioni del Gain	43
3.2.4	FLD e DAD come sistema di rivelazione	44
3.2.5	Variazioni nel processo di derivatizzazione.....	44
3.2.5.1.1	Preparazione degli standard I prova	45
3.2.5.1.2	Preparazione degli standard II prova	46
3.2.5.1.3	Preparazione degli standard III prova.....	46
3.2.5.1.4	Preparazione degli standard IV prova	46
3.2.6	Retta di taratura	47
3.2.7	Prove di recupero	47
4	Risultati	48
4.1	Risultati che riguardano l'ottimizzazione del metodo.....	48
4.1.1	Variazione della fase mobile	50
4.1.2	Variazioni della temperatura	51
4.1.3	Variazioni del Gain	52
4.1.4	FLD e DAD come sistema di rivelazione	53
4.1.5	Variazioni nel processo di derivatizzazione.....	54
4.1.5.1	Confronto tra le varie prove con lo Standard a 2 µg/l	54
4.1.5.2	Confronto tra le varie prove con lo Standard a 10 µg/l.....	56
4.2	Metodo ottimizzato	58
4.2.1	Retta di taratura	59
4.2.2	Prove di recupero	60
4.2.2.1	Risultati delle prove di recupero	62

4.2.2.1.1	Rappresentazione grafica dei recuperi.....	64
4.3	Risultati su campioni analizzati utilizzando il metodo ottimizzato.....	65
4.3.1	Risultati ottenuti in seguito all'analisi di 30 campioni.....	66
4.3.1.1	Rappresentazione grafica dei risultati	67
5	Discussione.....	70
5.1	Ottimizzazione del metodo.....	70
5.2	Retta di taratura e prove di recupero	74
5.3	Campioni analizzati utilizzando il metodo ottimizzato.....	77
6	Conclusioni.....	81
7	Bibliografia.....	84

1 Introduzione

Le micotossine sono metaboliti secondari considerati tossici per gli animali e per l'uomo che vengono prodotti da muffe tossinogene che possono colonizzare gli alimenti.

In particolari condizioni ambientali, alcune muffe, in particolare appartenenti al genere *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, possono infatti proliferare negli alimenti e produrre micotossine. L'ingestione cronica di alimenti contaminati con micotossine può portare ad effetti tossici di vario tipo, quali carcinomi, depressione del sistema immunitario e fenomeni di mutagenesi, in funzione del tessuto colpito, della quantità ingerita e del tipo di micotossina¹.

Attualmente le micotossine rappresentano uno degli aspetti più rilevanti e preoccupanti della contaminazione di alimenti e mangimi, infatti, secondo i dati FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), questo fenomeno colpirebbe circa il 25% delle derrate alimentari.

L'identificazione di micotossine è quindi un processo fondamentale per il controllo delle derrate, poiché la contaminazione di queste è piuttosto estesa, soprattutto per prodotti di importazione che provengono da climi tropicali caratterizzati da alte temperature e alta umidità, due fattori che ne favoriscono la produzione da parte della muffa.

La determinazione delle micotossine può essere effettuata con metodi diversi quali il saggio immunoenzimatico competitivo, HPLC (high-performance liquid chromatography) con

derivatizzazione post-colonna o HPLC con derivatizzazione pre-colonna come quella utilizzata nel laboratorio in cui ho svolto il tirocinio di tesi^{2,3}.

L'importanza di queste sostanze data dalla conoscenza della loro tossicità e cancerogenicità sugli animali e sull'uomo, la tutela del consumatore e la consapevolezza sempre maggiore del consumatore stesso per quanto riguarda la sicurezza alimentare (food safety) e la qualità del prodotto, ha indotto, quindi, restrizioni maggiori per i tenori massimi di tossine e controlli più frequenti. Le micotossine sono, dunque, un problema rilevante e molto attuale per la società che deve essere studiato ed analizzato.

1.1 Micotossine

Il termine micotossine deriva dal greco “*mykes*” che significa fungo e “*toxycon*” veleno.

Queste tossine sono sostanze chimiche prodotte dal metabolismo secondario di alcuni miceti filamentosi alla fine della crescita esponenziale senza un significato apparente per la crescita o il metabolismo del microrganismo. Vengono sintetizzate quando grosse quantità di metaboliti primari precursori (ad es. aminoacidi, acetati e piruvati) si accumulano. La sintesi delle micotossine rappresenta per il fungo una via per ridurre il quantitativo di precursori metabolici che non vengono più richiesti per le necessità vitali⁴.

I funghi che possono produrre micotossine, a oggi circa 300 specie, appartengono per la maggior parte a tre generi molto diffusi: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (Figura 1).



Figura 1 *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp⁵⁻⁷

I miceti produttori si presentano con colonie pulverulente bianche, verdastre o nere sugli alimenti, in particolare su derrate alimentari come cereali e frutta secca o su alimenti destinati al consumo animale (foraggi, mangimi, farine e insilati).

Il loro aspetto pulverulento è dovuto ad una fitta rete di ife, o filamenti, e da sporangi, i contenitori delle spore. Solo ad un certo punto del loro sviluppo e in condizioni ambientali particolari, i filamenti si riproducono attraverso la produzione di un corpo fruttifero, lo sporangio, dalle cui spore avranno origine nuovi individui⁸.

Lo sviluppo di funghi e la formazione di micotossine sono possibili già quando una pianta coltivata si trova ancora in campo, e poi in tutte le successive fasi di raccolta, stoccaggio, trasporto e nel corso delle trasformazioni tecnologiche e delle preparazioni alimentari. Lo sviluppo può avvenire anche durante la fase di conservazione, infatti i frutti man mano che maturano perdono umidità e si creano le condizioni ideali per la crescita fungina e la produzione di micotossine. Tale fenomeno è facilitato, inoltre, dalla presenza di lesioni sul frutto provocati

da lesioni meccaniche come la grandine o da rosure di insetti fitofagi (es. piralide del mais) (Figura 2)



Figura 2 Mais contaminato da *Fusarium* spp⁹

Le micotossine hanno strutture chimiche differenti perché prodotte da specie diverse o da diversi ceppi della stessa specie fungina, ma si possono riunire in gruppi di prodotti simili. Esse sono: aflatossine (prodotte soprattutto da *Aspergillus*), fumonisine, zearalenone, e tricoteceni (prodotti da *Fusarium*), ocratossina e patulina (prodotti da *Penicillium*) (Tabella 1)¹⁰.

Micotossine	Fungo produttore	Prodotto alimentare contaminato	Effetto tossico
Aflatossine B1, B2, G1,G2	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i>	Arachidi e altri legumi Mais e altri cereali, noci, mandorle e altri semi oleosi	Epatiti, nefriti, cancerogenesi
M1, M2	Derivati del metabolismo umano di B1 e B2	Latte e derivati	Epatiti, nefriti, cancerogenesi
Ocratossine	<i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Penicillium verrucosum</i>	Mais e altri cereali loro derivati	Epatiti, nefriti
Zearalenone	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>Fusarium culmorum</i>	Mais e altri cereali loro derivati	Iperestrisimo, ipofertilità
Tricoteceni	<i>Fusarium sporotrichioides</i> , <i>Fusarium poae</i> , <i>Fusarium</i> <i>graminearum</i> , <i>Fusarium</i> <i>culmorum</i>	Mais e altri cereali loro derivati	Vomito, rifiuto del cibo, gastroenteriti ulcerative, emorragie intestinali, immunosoppressioni, edemi polmonari
Fumonisine	<i>Fusarium moniliforme</i> , <i>Fusarium verticillioides</i> , <i>Fusarium proliferatum</i>	Mais e altri cereali loro derivati	Cancerogenesi

Tabella 1 Micotossine nelle derrate alimentari, specie fungine ed effetti tossici

Ci sono materie prime che per composizione e zone d'origine sono maggiormente suscettibili alla contaminazione. Si tratta di tutti i cereali (mais, frumento, orzo, avena, segale, ecc.) salvo il riso, i semi oleaginosi (arachidi, girasole, semi di cotone, etc.), la frutta secca ed essiccata (mandorle, noci, nocciole, fichi secchi, ecc), i semi di cacao e caffè, le spezie come il peperoncino, il pepe, lo zenzero e la frutta e la verdura (uva, mele pere, carote, pomodori, ecc). Ci sono alcuni prodotti alimentari che derivano dalla produzione di questi alimenti che possono essere contaminati, come per esempio farine ad uso umano ed animale, derivati dei semi oleaginosi (esclusi gli oli raffinati perché durante il processo di raffinazione vengono trattati con alcali che eliminano le tracce di micotossine), prodotti contenenti cacao, caffè, vino, birra, succhi di frutta e ortaggi, latte e prodotti contenenti spezie (Tabella 2).

MICOTOSSINA	DERRATE ALIMENTARI
Aflatossina B1, B2, G1, G2	Cereali, semi oleaginosi, spezie, frutta secca e fresca, mais, arachidi, cotone, mandorle, pistacchi, nocciole e noci di Brasile
Aflatossina M1	Latte e derivati
Ocratossina A	Cereali, spezie, cacao, caffè, carne suine ed avicole, vino e birra
Zearalenone	Mais
Deossinivalenolo, T-2, HT-2	Grano
Fumonisine	Mais
Patulina	Succhi di mele, pere, carote e pomodori

Tabella 2 Micotossine negli alimenti

Le muffe, inoltre, sono ubiquitarie, possono quindi vivere in molti tipi di ambienti, adattandosi bene ad un ampio intervallo di temperature (prediligendo però quelle elevate anche se non disdegnano le basse temperature) e umidità.

1.1.1 Cenni storici

Le micotossine, che vennero già descritte a partire dall'antico testamento (1200-1400 a.C.), sembrerebbero essere state una delle grandi piaghe d'Egitto.

Già in epoca romana, infatti, la conoscenza delle specie fungine era tale da permettere la differenziazione di alcune specie che potevano causare alcune micotossicosi.

Lucrezio descrive per la prima volta i sintomi dell'ergotismo cronico (causato da *Claviceps purpurea*), chiamandoli “*Ignis sacer*” e in seguito vennero riconosciuti come Fuoco di Sant'Antonio. Successivamente anche nel Medioevo sono state descritte epidemie dovute all'ingestione di cereali contaminati da questo fungo.

L'intossicazione caratterizzata da necrosi degli arti dovuta all'ingestione di graminacee contaminate da *Claviceps purpurea* (parassita che forma sclerozi, ovvero corpi fruttiferi del fungo stesso simili a clavette che contengono alcaloidi velenosi della famiglia delle ergotine) prende il nome di ergotismo ed era un tipo di tossicosi piuttosto diffusa all'epoca. Generalmente l'intossicazione avveniva in seguito all'ingestione di pane di segale, un cereale che spesso è infestato dal fungo. L'intossicazione poteva presentarsi in due forme:

- Forma *acuta* chiamata anche “*Ergotismus convulsivus*” causata da assunzione in dosi massicce e caratterizzata da sintomi neuro convulsivi di natura epilettica, visioni e delirio.
- Forma *cronica* chiamata anche “*Ergotismus gangraenosus*” caratterizzato da una progressiva degradazione del sistema circolatorio periferico che si manifesta con gangrena degli arti.

Tra gli effetti dell'intossicazione vi erano anche le allucinazioni e questo portava a mettere in relazione l'intossicazione con il demonio o con forze maligne, non essendo conosciuta al tempo la causa di questa malattia.

Il rischio di ergotismo si ridusse notevolmente in Europa grazie alla progressiva sostituzione della segale con il frumento, al miglioramento dei sistemi di molitura e alle nuove tecniche di setacciamento della granella.

Verso la metà del diciassettesimo secolo, alcuni medici inglesi misero in evidenza la relazione tra dieta a base di segale e disturbi nervosi derivanti.

Uno dei primi casi di micotossicosi degli uomini e degli animali si ebbe nel 1722, quando all'esercito russo di Pietro il Grande venne data farina di segale per i soldati e cereali e fieno per i cavalli, contaminati da micotossine.

In un breve periodo successivo al consumo, gli uomini e i loro cavalli vennero colpiti prima da un intenso prurito e dopo da paralisi, comportando, successivamente, la morte di numerosissimi soldati.

Gli effetti tossici delle aflatossine, invece, vennero descritti per la prima volta nel 1913 ma non si riuscì ad isolarle.

Altri esempi meglio documentati di micotossicosi umana, sono quelli del distretto di Oremberg dove fu descritta l'insorgenza di numerosi casi di tossicosi alimentare e quelli delle improvvise morti in tutta l'Unione Sovietica di alcuni addetti allo stoccaggio delle granaglie nei sili; queste morti furono ricondotte successivamente all'inalazione di muffe molto tossiche di origine naturale presenti nelle vie aeree dei soggetti deceduti.

L'inizio della moderna tossicologia, però, è datata 1960, anno in cui venne data una grossa spinta alla ricerca di micotossine in seguito ad una emergenza sanitaria che coinvolse centomila tacchini colpiti da acuta necrosi al fegato e da iperplasia del dotto biliare. Fu scoperto che la tossicosi era dovuta a tossine prodotte da *A. flavus* e *A. parasiticus* e venne chiamata "Malattia X del tacchino".

La causa venne poi imputata all'utilizzo di farina di noci brasiliane ed arachidi contaminate da aflatossina B₁, che in pochissimo tempo produssero danni epatitici e successiva morte dei soggetti colpiti¹¹.

Nel 1963, successivi studi hanno portato all'identificazione, all'isolamento e alla caratterizzazione della chimica e della natura fisica delle aflatossine e si scoprì che era possibile separarle cromatograficamente in quattro diversi componenti, alle quali venne dato il nome di B₁, B₂, G₁, G₂ in base alla fluorescenza emessa ed alla mobilità cromatografica.

Successivamente alla scoperta delle aflatossine Allcroft e Carnagham (1963) ipotizzarono che alcuni residui di aflatossina ingeriti dagli animali con la razione, potessero ritrovarsi nel latte o in altri derivati. In vacche da latte alimentate in seguito all'ingestione di prodotti contaminati da aflatossina B₁, venne ritrovata una sostanza tossica, che in esperimenti condotti sulle anatre risultò nociva quanto l'aflatossina B₁. Tale sostanza rivelò una fluorescenza blu- viola simile a quella precedentemente osservata per l'aflatossina B₁, ma in questo caso, in considerazione del fatto che l'isolamento era avvenuto a partire dal latte, gli venne attribuito il nome di aflatossina M o "milk toxin".

L'aflatossina M₁ è stata quindi il primo metabolita idrossilato della B₁ ad essere isolato ed identificato. Campbell et al (1970) nel cercare di capire l'eziologia del cancro al fegato nell'uomo, prodotto dall'aflatossina B₁, scoprirono per la prima volta la presenza dell'aflatossina M₁ nelle urine.

Successivamente Patterson et al., (1978) hanno isolato a partire dall'urina e dal latte le aflatossine M₁ e M₂, identificandole come metaboliti della B₁ e della B₂ dei mammiferi.

Queste sono state inserite e classificate in seguito (1993) dall'International Agency for Research on Cancer (IARC) nel gruppo 2 come probabili agenti cancerogeni per l'uomo. Infine gli effetti tossici delle aflatossine sono stati considerati al fine di un possibile utilizzo come arma biologica durante la guerra del Golfo.

Per quanto riguarda l'Italia, invece, i primi casi di tossicosi diagnosticati risalgono ai primi anni settanta, quando in Romagna alcuni allevamenti di tacchini segnarono consistenti perdite dovute a lesioni epatiche riconducibili ad ingestione di tossine e in tutta l'Italia settentrionale in allevamenti di vitelli vennero riscontrati casi di necrosi caudali.

1.1.2 Fattori che influenzano la produzione di micotossine

I principali fattori che influiscono sulla produzione di tossine possono essere di due tipi: *estrinseci*, che sono costituiti dall'insieme delle condizioni che favoriscono lo sviluppo fungino, ed *intrinseci*, ovvero legati alla capacità del ceppo fungino di produrre micotossine.

I fattori *estrinseci* sono costituiti a loro volta da fattori fisici, biologici e chimici (Tabella 3).

I fattori fisici includono:

- La **temperatura** che dipende dal substrato ma è generalmente compresa tra i 25-28°C poiché molte muffe sono mesofile, cioè germinano e crescono entro un intervallo di temperatura moderato.

Un clima caratterizzato da temperature elevate seguito da un brusco calo della temperatura favorisce la produzione di micotossine, così come qualsiasi altro fattore di stress. Le temperature ottimali di crescita possono essere perciò estremamente diverse e caratteristiche di ogni singolo genere e specie.

- L'ossigeno** poiché la maggior parte dei funghi è costituita da microrganismi aerobi, la cui crescita risulta estremamente ridotta se la pressione parziale di O₂ è molto inferiore a quella dell'aria. Il loro sviluppo è inibito dalla carenza di ossigeno (tuttavia si sviluppano quasi tutti con una tensione di O₂ del 3%) e dalla presenza di CO₂ (concentrazioni di CO₂ uguali o superiori a 0,2% possono inibire completamente la crescita del micelio).

-L'**umidità ambientale**, che viene espressa come la disponibilità di acqua libera (a_w) è fondamentale per le reazioni chimiche e per la crescita fungina.

Un valore di a_w inferiore a 0,930 favorisce in uguale misura la colonizzazione del prodotto da parte sia di batteri Gram positivi sia di miceti (muffe e lieviti), mentre a valori inferiori a 0,860 la crescita è riservata esclusivamente a lieviti e muffe. La diminuzione dell'attività dell'acqua e la progressiva disidratazione del prodotto, limita la velocità e la possibilità di crescita delle muffe.

-L'**acidità del substrato**, invece, non influenza significativamente la crescita di queste muffe, il cui intervallo di pH ottimale varia tra 3 e 6,5⁸.

-La **natura del substrato** può influenzare considerevolmente la produzione di tossine. Ad esempio la produzione di aflatossine è elevata se il fungo si sviluppa in presenza di glucosio, mannosio, fruttosio ed azoto in forma ammoniacale. Il tipo di substrato è riconducibile alla presenza di specifiche tossine che evidenziano una possibile correlazione tra la muffa produttrice e il materiale di accrescimento stesso.

I fattori biologici comprendono:

-La **presenza di altre specie fungine** che può determinare alterazioni chimiche-fisiche del substrato e questo può condizionare in modo positivo o negativo lo sviluppo di altre specie. Nel primo caso, per esempio, si può avere la presenza di più infestanti che agiscono in modo sinergico, mentre nel secondo caso si può avere un'inibizione competitiva della crescita di alcune specie.

-La **presenza di insetti**, sia in campo che nelle masse stoccate, dà origine ad un danno meccanico alle cariossidi che favorisce la penetrazione di specie tossigene. Gli insetti, inoltre, così come il vento, possono contribuire, in campo, a disseminare le spore prodotte dal micelio su territori molto ampi.

I fattori chimici includono:

-L'**uso di fungicidi** nel grano come controllo delle infestazioni da miceti, che ha diminuito il conseguente rischio di contaminazione da micotossine.

I fattori *intrinseci* sono costituiti da:

-Il **potenziale tossigeno** che tra i ceppi può variare da 1 a 10^3 o 10^4 . Infatti la presenza nelle derrate alimentari di funghi noti come tossigeni, non è un indice assoluto della presenza di tossine, poiché la crescita, come già citato in precedenza, è regolata da molti fattori.

-La **specie fungina**, perché all'interno di specie definite tossigene sono stati riconosciuti ceppi tossigeni e non.

-Il **livello iniziale di contaminazione fungina**, poiché le micotossine possono essere già presenti in campo ed operazioni di raccolta scorretta o condizioni di conservazione inadatte possono favorire lo sviluppo di funghi e di conseguenza di micotossine. Nel caso del mais, diverse tipologie di pulizia e di separazione nell'azione di mietitura e trebbiatura comportano numerose variazioni nella percentuale di granella spezzata, una condizione che favorisce lo sviluppo di muffe⁴.

Fattori ambientali	Valore Minimo	Valore Ottimo	Valore Massimo
Temperatura (°C)	- 3,0	20 - 35	60
Attività dell'acqua (a_w)	0,65	0,80 - 0,95	0,99
Ossigeno (%)	0,14	> 2,0	-
pH	2,0	4,5 – 6,5	8,0
Anidride carbonica (%)	-	< 10,0	> 15,0

Tabella 3 Fattori ambientali che favoriscono la crescita fungina

1.1.3 Intossicazioni da micotossine

Le micotossine sono in grado di esplicare un effetto tossico sia sull'uomo sia sugli animali in seguito ad un'esposizione prolungata, ma questo dipende da diversi fattori, come la quantità di micotossina assunta con gli alimenti, la tossicità del composto, il peso corporeo dell'individuo e fattori dietetici. Per stabilire un rapporto di casualità tra l'ingestione di micotossine ed una specifica malattia umana devono essere soddisfatti alcuni criteri: presenza di micotossine negli alimenti, accertata esposizione ad esse, correlazione fra esposizione e incidenza di una determinata malattia, riproducibilità dei caratteristici sintomi negli animali da esperimento e simile modalità di azione nell'uomo e nei modelli animali¹.

Affinché avvenga l'intossicazione, è necessario, innanzitutto, che il fungo produttore penetri nell'ospite (es. pianta), e questo è possibile poiché esso è in grado di infettarla in diversi modi:

- penetrazione diretta attraverso la superficie integra della cuticola
- penetrazione attraverso aperture naturali (stomi, lenticelle, ecc)
- penetrazione attraverso lesioni naturali o ferite di altra natura
- penetrazione attraverso vettori come insetti, nematodi, funghi, etc.

I patogeni che penetrano negli ospiti utilizzando le lesioni provocate da agenti biotici e abiotici sono comunemente denominati "patogeni da ferita". Molte muffe utilizzano questo tipo di meccanismo che è favorito da numerosi fattori. Una delle principali cause biotiche è costituita, per esempio, dall'attacco degli insetti che si nutrono dei tessuti della pianta, in particolar modo da quelli allo stadio larvale, mentre tra le cause abiotiche si possono annoverare fattori meteorici come il vento, la grandine e altri danni meccanici provocati durante il raccolto.

Una volta che gli alimenti vengono contaminati, l'esposizione dell'uomo e degli animali può avvenire tramite ingestione, oppure per via aerea come in ambienti di lavoro in cui siano presenti polveri di granaglie contaminate aero-disperse o in ambienti domestici in cattive condizioni igieniche. Inoltre gli animali esposti possono diventare a loro volta fonte di esposizione se destinati a diventare alimenti o produttori di alimenti destinati all'uomo (latte, carne, uova).

La maggior parte delle micotossine, però, è priva di attività tossica o mutagena intrinseca, poiché la tossicità diventa evidente quando la sostanza ingerita con l'alimento subisce una biotrasformazione.

La biotrasformazione avviene principalmente nel fegato e in pochi altri tessuti dell'uomo e degli animali in cui si formano metaboliti idrofili particolarmente reattivi.

Questi metaboliti sono in grado di reagire con diverse macromolecole dell'organismo (DNA, RNA e proteine) e di indurre in questo modo mutazioni genetiche, inibizione dei sistemi enzimatici o provocare reazioni infiammatorie.

Indipendentemente dall'organo bersaglio che può essere a volte multiplo oppure specifico per la medesima micotossina, l'escrezione avviene in tempi variabili, tra 1 e 15 giorni dalla sospensione dell'ingestione, attraverso la bile o il rene.

L'interazione delle micotossine con i processi biochimici e cellulari può avvenire a livello molecolare, cellulare e degli organi. A livello molecolare l'interazione tra micotossine e DNA è il punto chiave dei processi di cancerogenesi. Da essa può scaturire un appaiamento errato delle basi comportando un blocco dei meccanismi di trascrizione che causa la disorganizzazione del patrimonio genetico facilitando l'insorgenza di carcinomi. Ad esempio i tricoteceni e l'ocratossina A inibiscono specificamente la sintesi di proteine, interagendo con le funzioni ribosomiali.

A livello cellulare, invece, le micotossine interferiscono con i meccanismi di trasporto attivo delle sostanze attraverso le membrane cellulari, da quella citoplasmatica a quelle mitocondriali, causando un'estesa disorganizzazione dei processi metabolici delle cellule nei tessuti bersaglio (fegato, rene e midollo osseo).

Per esempio le aflatossine, sono in grado di interferire con il metabolismo energetico inibendo l'attività delle catene di trasporto degli elettroni.

L'ocratossina A, invece, abbassa l'attività di enzimi (quali per esempio, la fosfoenolpiruvato carbossichinasi, PEPCK), che sono deputati al metabolismo degli zuccheri nelle cellule della corteccia renale e nel contempo causa una perossidazione degli acidi grassi poliinsaturi che regolano l'omeostasi delle membrane fosfolipidiche delle cellule renali. Un processo simile di perossidazione lipidica con conseguente citotossicità negli epatociti è indotta anche da aflatossina B₁.

Inoltre aflatossina B₁, ocratossina A e patulina inducono, anche a bassi dosaggi, un importante effetto immunosoppressivo, interagendo direttamente o con le cellule deputate all'immunità cellulare (linfociti B e T) o con la produzione di anticorpi. Diversamente, le fumonisine inibiscono la biosintesi degli sfingolipidi delle membrane cellulari, interferendo nella regolazione della crescita cellulare e nella loro differenziazione, favorendo così la loro trasformazione neoplastica.

Per quanto riguarda l'effetto sugli organi bersaglio, le aflatossine sono epatotossiche, l'ocratossina A risulta sia epatotossica sia nefrotossica. La fumonisina B₁ agisce per lo più a

livello polmonare mentre lo zearalenone agisce in particolar modo sull'apparato riproduttore (Tabella 4)⁴.

Tabella 4 valori di Provisional Maximum Tolerable Day Intake (PMTDI) per le principali micotossine e loro classificazione in base all'effetto cancerogeno

	EFFETTO CANCEROGENO DELLE MICOTOSSINE			PARAMETRI TOSSICOLOGICI
Micotossina	Uomo	Animale	Classificazione*	Tolerable Daily Intake (TDI) (definitivo/provvisorio)
Aflatossine (miscela naturale e B1)	Evidenze sufficienti	Evidenze sufficienti	Cancerogeno	ALARA (As Low As Reasonably Achievable)
Aflatossina M1	Evidenze insufficienti	Evidenze sufficienti	Possibilmente cancerogeno	ALARA (As Low As Reasonably Achievable)
Fumonisine	Evidenze sufficienti	Evidenze sufficienti	Possibilmente cancerogeno	2 µg/kg pc/giorno**
Zearalenone	-	-	-	0,2 µg/kg pc/giorno**
Deossinivalenolo	-	Evidenze sufficienti	-	1 µg//kg pc/giorno**
Tossina T-2	-	-	-	0,6 µg/kg pc/gioro**
Tossina HT-2	-	-	-	0,6 µg/kg pc/giorno**
Nivalenolo	-	-	-	7 µg/kg pc/giorno**
Ocratossina	Evidenze sufficienti	Evidenze sufficienti	Possibilmente cancerogeno	0,005 µg/kg pc/giorno***
Patulina	Assenza sufficienza evidenza	Evidenze insufficienti	Non classificabile come cancerogeno	0,4 µg/kg pc /giorno****

* IARC – Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro

**Final SCOOP Task 3.2.10, 2003

***Final SCOOP Task 3.2.7, 2002

****Final SCOOP Task 3.2.8, 2002

1.1.4 Limiti di legge per le micotossine

I rischi derivanti dall'ingestione di prodotti contaminati da micotossine hanno indotto molti Paesi a imporre numerose misure atte al loro controllo e a diminuire il contenuto nei prodotti per uso umano ed animale.

L'Unione europea (UE) tutela i consumatori fissando livelli massimi di micotossine in alimenti e mangimi per garantire che non siano nocivi per la salute umana e animale e mantenendo i tenori di micotossine al livello più basso ragionevolmente conseguibile, seguendo le buone pratiche raccomandate in materia di agricoltura, stoccaggio e lavorazione.

I limiti di legge per le micotossine negli alimenti sono influenzati da numerosi fattori, alcuni dei quali estranei alla tossicità della micotossina in esame. Infatti, anche se i valori di TDI (tolerable day intake) raccomandati rappresentano generalmente l'elemento guida per la definizione di tali limiti di legge, altri fattori giocano un ruolo di rilievo quali considerazioni di carattere commerciale ed etico¹.

Un sondaggio recentemente condotto dalla FAO ha evidenziato che attualmente almeno 100 Paesi al mondo hanno limiti per le micotossine negli alimenti.

L'analisi di questi limiti indica, tuttavia, un'ampia divergenza nei valori stabiliti nei vari Paesi per le differenti micotossine e nel numero delle matrici alimentari soggette a regolamentazione.

Inoltre nei vari Paesi sono in vigore norme applicative e modalità di campionamento e di analisi molto diverse che portano a notevoli turbamenti nel commercio internazionale delle molte matrici alimentari suscettibili di contaminazione da micotossine.

L'Unione Europea ha, negli ultimi anni, adottato un robusto e complesso pacchetto normativo che regola la presenza delle micotossine nelle derrate alimentari in circolazione nei Paesi Membri, creando pertanto oneri importanti sulle merci in importazione da alcuni Paesi in via di sviluppo. In alcuni casi sono state temporaneamente bloccate le importazioni, come nel caso dei pistacchi dall'Iran e dalla Turchia, delle arachidi dall'Egitto e dalla Cina, delle noci brasiliane del Brasile e dei fichi secchi e nocciole dalla Turchia.

La prima normativa europea sui limiti delle micotossine fu emanata con il Reg. 1525/98, in ritardo rispetto alle ricerche sperimentali. La normativa attualmente vigente che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari è il Reg. CE 1831/2003 del 19/12/2003.

In seguito questo regolamento ha subito delle modifiche anche per quanto concerne le micotossine, in particolare con tre regolamenti:

- Reg. CE 1126/07 (aggiornamento dei limiti per le *Fusarium* tossine nel granturco e prodotti derivati)

- Reg. UE 105/2010 (introduzione del limite per l'OTA su spezie e liquirizia)
- Reg. UE 165/2010 (introduzione dei limiti per le aflatossine su semi oleosi e innalzamento dei limiti su mandorle, pistacchi, semi di albicocche, nocciole e noci del Brasile)¹².

E' necessario, con il tempo, rivedere e quindi modificare alcuni tenori massimi di micotossine in determinati prodotti alimentari, per tener conto degli sviluppi del Codex Alimentarius, delle indicazioni di gruppi di esperti scientifici sui contaminanti nella catena alimentare (CONTAM), dell'autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA) e alla luce di nuove informazioni contenute in recenti pareri scientifici.

Inoltre in seguito a nuove prassi di produzione, non è sempre possibile mantenere i tenori di alcuni contaminanti ad un livello tanto basso quanto richiesto dalla normativa in vigore.

I limiti di legge europei sono, comunque, del tutto precauzionali, in quanto i livelli di tossicità effettivi sono di gran lunga superiori. Particolarmente restrittivi sono i limiti di legge per prodotti destinati a gruppi vulnerabili di persone come gli alimenti per bambini e alimenti destinati ad una alimentazione particolare¹³.

A livello nazionale e comunitario la legislazione ha previsto la regolamentazione solo di determinati gruppi di micotossine in relazione a specifiche tipologie di prodotti, mentre per altri non ha ancora stabilito dei limiti precisi (Tabella 5).

Tabella 5 Limiti per le micotossine che interessano o coinvolgono l'utilizzo di cereali compreso il mais

MATRICE ALIMENTARE	AFB1 (µg/kg)	AF TOT (µg/kg)	AFM1 (µg/kg)	ZEARALENONE (µg/kg)	OCRATOSSINA A (µg/kg)
Cereali non lavorati (compreso riso non lavorato o grano saraceno)	-	-	-	-	5,0(b)
Cereali e relativi prodotti della lavorazione destinati al consumo umano diretto o all'impiego come ingrediente di derrate alimentari	2,0(a)	4,0(a)	-	100(d)	3,0(b) (d)
Cereali (compreso grano saraceno) destinato alla cernita o ad altri trattamenti fisici prima del consumo umano o dell'impiego quale ingrediente di derrate alimentari	2,0(a)	4,0(a)	-	-	-
Granoturco da essere sottoposto a cernita o ad altro trattamento fisico prima del consumo umano o dell'impiego quale ingrediente di derrate alimentare	5,0(a)	10,0(a)	-	-	-
Alimenti per l'infanzia e alimenti dietetici speciali (compreso il latte)	0,10(c)	0,1(d)	0,01(d) 0,025(c)	20,0(d)	0,50(c) (d)
Latte (latte crudo latte destinato alla fabbricazione di prodotti a base di latte e latte trattato termicamente)	-	-	0,05(a)	-	-

(a) Reg. (CE) N. 2174/2003 del 12 Dicembre 2003 – (b) Reg. (CE) N.472/2002 del 12 Marzo 2002 – (c) Reg. (CE) N. 683/2004 della commissione del 13 Aprile 2004 – (d) G.U. N.135 del 11 Giugno 1999 Circolare 9 Giugno 1999, n.10

1.2 Aflatossine

Le aflatossine sono tra le micotossine più importanti che hanno azione tossica nei confronti di uomini ed animali. Sono un gruppo di tossine che vengono strutturalmente correlate a diversi metaboliti secondari fungini, che vengono prodotte da funghi appartenenti alla classe degli Ascomiceti, genere *Aspergillus*, ed in particolare da *A. flavus* e *A. parasiticus*, più raramente *A. nomius* (Figura 3).

Sostanze nutritive specifiche, come i minerali, in modo particolare lo zinco, le vitamine, gli acidi grassi, gli aminoacidi e le fonti di energia come l'amido, sono richiesti per la formazione di queste tossine. L'alta concentrazione di carboidrati come nel caso di riso e del grano ed in misura minore per i semi oleosi come cotone, arachidi etc., favoriscono la sintesi delle stesse.

Alcune specie di *Aspergilli* sono dannose per uomo ed animali, mentre altre possono essere impiegate per fini utilitaristici, come per esempio l'*Aspergillus nidulans*, utilizzato negli ultimi cinquanta anni per svelare molti processi cellulari fondamentali, l'*Aspergillus orizae*, capace di fermentare lo zucchero nel processo di produzione del sakè ed utilizzabile anche per la produzione del miso (pasta di soia) e l'*Aspergillus wenti*, anch'esso utilizzato per la preparazione della salsa di soia.

Da colture di *Aspergillus flavus* e *Aspergillus fumigatus* (uno dei principali componenti del compost, identificato per la prima volta nel 1848), invece, si possono ricavare antibiotici come: la flavicidina, la flavicina e la fumagatina.

Le aflatossine sono derivati difuranocumarinici, a basso peso molecolare (<500 u.m.a), alto punto di fusione (269°C per aflatossina B₁) ed elevata termostabilità (fino a 250°C). Fra le 18 aflatossine finora isolate, cinque sono considerate rilevanti sia per diffusione sia per tossicità, e sono l'aflatossina B₁, l'aflatossina B₂, l'aflatossina G₁, l'aflatossina G₂ e l'aflatossina M₁. Quelle appartenenti al gruppo B sono bifuranocumarine fuse con un anello ciclopentenonico, mentre le G sono bifuranocumarine fuse con un anello lattonico. La quinta aflatossina rilevante è la M₁ che è un prodotto di idrossilazione metabolica dell'aflatossina B₁.

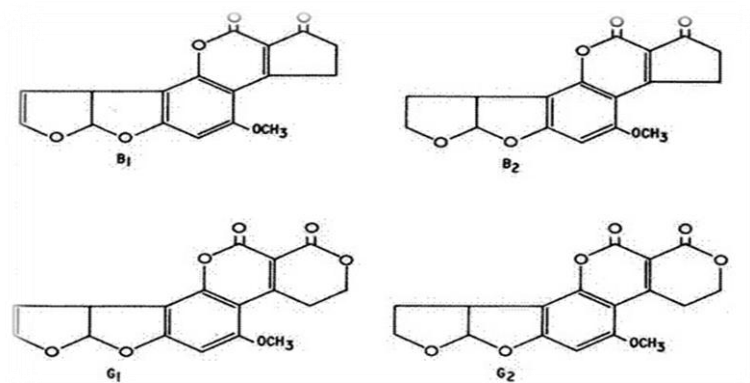


Figura 3 Formula di struttura delle aflatoxine¹⁴

Le aflatossine vengono così classificate in: immunotossine, dermatossine, epatotossine, neurotossine, e in base al loro effetto cronico in: mutagene, cancerogene e teratogene.

Le aflatossine possono dirsi, anche, contaminanti ambientali e agenti cancerogeni ad elevata stabilità (poiché resistenti alla degradazione in seguito a trattamenti termici), con la peculiarità di essere inodori, incolori ed insapori. Sono, inoltre, moderatamente solubili in acqua (10-30 µg/ml), in solventi organici polari (cloroformio e metanolo) e soprattutto in dimetilsolfossido, mentre sono insolubili in solventi non polari.

Le aflatossine B sono prodotte sia da *A. flavus* (ubiquitario) sia da *A. parasiticus* (più frequente nei climi tropicali e subtropicali, presenta elevata affinità di crescita in frutti e semi oleosi), mentre le aflatossine G sono prodotte solo da *A. parasiticus*.

L'*Aspergillus nomius* è poi strettamente correlato all'*A. flavus*, anche se differisce da quest'ultimo per la presenza di sclerozi di dimensioni minori. La specie *A. nomius* si diversifica, inoltre, per la possibilità di poter produrre aflatossina B₁, B₂, G₁ e G₂.

Le lettere B e G corrispondono al tipo di fluorescenza che queste micotossine emettono se irradiate con luce ultravioletta a 360nm (Blue o Green), mentre la lettera M è l'iniziale del prodotto idrossilato che viene ritrovato nel latte (Milk), come già precedentemente indicato (Figura 4).



La produzione di aflatossine è generalmente subordinata alla contemporanea presenza di ceppi tossinogeni e di uno squilibrio nutrizionale-ambientale sinergicamente cooperanti nell'attivare vie metaboliche secondarie. La produzione delle tossine avviene a sviluppo vegetativo ultimato, cioè allo stadio formativo delle spore che non sono tossinogene. La temperatura ottimale di crescita è di 25°C per *A. flavus*, mentre per *A. parasiticus* è tra i 25-35°C. La produzione si blocca sotto i 13°C e sopra i 42°C.

1.2.1 Intossicazione da aflatossine

Le aflatossine sono essenzialmente delle epatotossine dotate anche di attività cancerogena (1µg/kg di aflatossina B₁ nella trota è sufficiente per causare il cancro al fegato), mutagena e probabilmente teratogena. Tra esse la più potente è la B₁, che è molto tossica per somministrazione acuta in tutte le specie studiate, con un DL₅₀ oscillante tra 0,5 mg/kg per l'anatroccolo e 60 mg/kg per il topo, mentre per l'uomo la dose mortale di aflatossina B₁ oscilla tra 0,6 e 10 parti per milione (ppm= mg/kg).

L'aflatossina B₁ dopo l'assunzione da parte di un vertebrato può essere metabolizzata ad altri composti, alcuni dei quali sono caratterizzati da una maggiore o minore tossicità.

Queste trasformazioni comprendono reazioni di I fase (riduzione, ossidazione e idrolisi) e di II fase che consentono la combinazione con un composto naturale prodotto dall'organismo¹⁶.

1.2.1.1 Tossicocinetica

1.2.1.1.1 Assorbimento

Le aflatossine sono composti caratterizzati da un'elevata lipofilia; quando vengono assunte per via orale vengono assorbite prevalentemente nel tratto intestinale e passano nel circolo sanguigno legandosi alle albumine.

L'assorbimento attraverso il sistema respiratorio è stata accertata in lavoratori addetti alla macinazione dei mangimi ma l'importanza di questa modalità di intossicazione non è stata ancora del tutto quantificata¹⁶.

1.2.1.1.2 Distribuzione

Le aflatossine tendono a distribuirsi nel grasso e nei tessuti molli, ma le concentrazioni più elevate di residui si riscontrano negli organi coinvolti nei processi di detossificazione come il rene ed il fegato.

Esiste, inoltre, una correlazione tra la quantità di micotossina ingerita e la presenza di residui in questa ultima sede. Il rapporto è di 800:1 nel suino, 14000:1 nel bovino e 1200:1 nel pollo.

1.2.1.1.3 Reazione di I fase

La reazione più importante nel metabolismo di prima fase delle aflatossina B₁ è l'ossidazione da parte di enzimi microsomiali che avviene prevalentemente a livello epatico. Il fegato rappresenta la sede metabolica in cui, ad opera delle ossidasi presenti a funzione mista citocromo P-450 dipendenti, presenti nella frazione mircosomiale, si giunge alla formazione di diversi metaboliti (aflatossina Q₁, P₁, B_{2a}, M₁, M₂, aflatossicolo, etc) e degli intermedi epossidi¹⁵.

Mediante l'azione di questi enzimi viene prodotto l'AFB₁ 8,9 epossido, una sostanza con un alto potere cancerogeno.

Per mezzo dell'idrossilazione si può avere la formazione di aflatossina M₁ e Q₁, mentre attraverso una reazione di O-demetilazione si ottiene l'aflatossina P₁. Questi ultimi due composti sono, tuttavia, meno tossici rispetto all' AFB₁¹⁶.

L'aflatossicolo che viene invece prodotto dalla riduzione della B₁, viene velocemente riconvertito in B₁ e ne costituisce una riserva¹⁵.

1.2.1.1.4 Reazione di II fase

Il processo di detossificazione dell'organismo nei confronti delle aflatossine avviene principalmente in due modi: il B₁-8,9 epossido viene legato al glutatione o GSH mediante una reazione catalizzata dalla GSH-transferasi, ed in minor misura trasformato in aflatossicolo; altri metaboliti come AFM₁, AFP₁, e AFQ₁ vengono coniugati con l'acido glicuronico.

Le reazioni di II fase diminuiscono la tossicità ed aumentano l'idrosolubilità e la polarità dei composti favorendone l'escrezione attraverso la bile e in minor misura urine e latte.

1.2.1.1.5 Tossicità

L'aflatossina (AFB₁) è stata classificata come sostanza molto tossica (DL₅₀ 1-50 mg/kg) per molte specie animali ed estremamente tossico (DL₅₀ <.1 mg/kg) per alcune particolarmente sensibili come trota, gatto e anatroccolo¹⁶.

Quest'ultimo in passato veniva utilizzato per la prova biologica atta a stabilire l'eventuale contaminazione delle derrate alimentari.

Gli effetti tossici dovuti all'esposizione all'AFB₁ sono correlati alla dose ed al tempo di esposizione. La tossicità viene suddivisa in:

- acuta
- cronica

L'organo bersaglio è il fegato ma vengono coinvolti anche altri organi.

La forma *acuta* è caratterizzata da depressione ed anoressia seguite da anemia, ascite, ittero e diarrea. Sono frequenti, in seguito a lesioni epatiche, le coagulopatie che si manifestano con emorragie petecchiali sulle mucose apparenti, gastroenteriti emorragica, melena ed ematuria. Dal punto di vista anatomo-patologico si osserva congestione ed emorragia epatica, necrosi periportale, proliferazione dei dotti biliari e iperplasia delle cellule ovali¹⁶. A livello renale e cardiaco è stato rilevato accumulo di acidi grassi. La morte si verifica di norma entro poche ore o giorni ed è dovuta alla gravità delle lesioni epatiche.

La forma *cronica*, invece, si verifica più frequentemente rispetto all'*acuta*.

Spesso, però, pur assistendo ad un peggioramento delle prestazioni produttive non si manifesta una sintomatologia conclamata.

Nei ruminanti adulti l'esposizione a bassi livelli di aflatossine per lungo tempo determina diminuzione dell'efficienza alimentare, dell'immunocompetenza e della produzione di latte ed alterazioni della motilità ruminale. Studi compiuti *in vitro* evidenziano gli effetti sulla microflora ruminale: diminuita degradazione della cellulosa, minore produzione di acidi grassi volatili ed ammoniacale ed attività proteolitica inferiore.

Gli ovini sono relativamente resistenti all'azione tossica delle aflatossine anche se si è riscontrata una diminuzione dell'assunzione di alimento ed una formazione di lesioni epatiche accompagnate da compromissione della performance produttive con 2,5 mg/kg di AFB₁ nella dieta.

Nelle galline ovaiole, invece, dosi comprese tra 0,2 e 1ppm determinano una diminuzione della produzione e della schiudibilità delle uova, mentre nel pollo, oltre ad una diminuzione dell'efficienza alimentare e dell'accrescimento¹⁶, si osserva una decalcificazione ossea per diminuzione dell'assorbimento intestinale di calcio¹⁵.

Le lesioni croniche più frequenti sono l'induzione del carcinoma epatico, iperplasia dei dotti biliari e steatosi epatica¹⁶.

La trota è la specie più sensibile all'azione cancerogena delle aflatossine, infatti una dose di 0,004 ppm di tossina provoca lesioni cancerose a livello epatico in cinque giorni. I ruminanti, invece, possiedono un'elevata resistenza dovuta probabilmente ad una maggiore efficacia dei sistemi di detossificazione GSH-dipendenti ed alla parziale diminuzione della microflora ruminale¹⁵. Fattori non legati alla specie che possono influenzare la tossicità sono l'età dell'animale (gli animali giovani risultano più sensibili) e il sesso. Infatti, si è osservato che

l'effetto cancerogeno nel ratto femmina è meno intenso che nel maschio, così come la tossicità espressa ad alte dosi è meno acuta nella femmina rispetto al maschio. L'effetto tossico è comunque correlato al tempo d'esposizione, soprattutto quello cancerogeno (dosi prolungate nel tempo hanno più probabilità di indurre tumore rispetto a singole dosi quantitativamente consistenti assunte in una sola volta o poche volte).

1.2.1.2 Meccanismo d'azione

1.2.1.2.1 Azione sugli acidi nucleici

Studi compiuti *in vitro* dimostrano che AFB₁ può inibire la sintesi di DNA e di RNA.

Esistono due tipi di interazione con il DNA da parte dell'aflatossina che sono:

- Legame reversibile non covalente con i siti attivi della macromolecola
- Legame stabile di tipo covalente che porta alla formazione di addotti con il DNA

Nel secondo caso ciò che si lega al DNA non è la tossina ma un suo metabolita, il derivato epossidico che deriva dal coinvolgimento del citocromo P450 epatico, un prodotto che deriva dall'azione detossificante epatica. Questo metabolita risulta essere molto importante per il suo potenziale cancerogenetico a sua volta determinato dalle reazioni con gli acidi nucleici. L'alterazione nell'espressione di particolari geni, detti proto-oncogeni, presenti in forma inattiva in tutte le cellule e attivabili anche da una singola mutazione, può portare ad alterazioni nella regolazione dello sviluppo, della proliferazione e dell'iperplasia cellulare; queste alterazioni possono eventualmente progredire verso un'evoluzione maligna¹⁶.

1.2.1.2.2 Azione sulla sintesi proteica del metabolismo dei lipidi e carboidrati

Le aflatossine determinano una diminuzione della sintesi proteica mediante due meccanismi.

Il primo meccanismo è determinato da un'azione disaggregante sui poliribosomi e sui RER epatici. Il secondo, invece, è legato al blocco della trascrizione da parte della RNA-polimerasi DNA-dipendente con conseguente diminuzione della sintesi proteica cellulare. Un effetto è l'inibizione a livello epatico della sintesi dei fattori della coagulazione ed anche fenomeni di steatosi legati alla minor capacità di metabolismo/mobilizzazione lipidica epatica¹⁵.

La diminuita sintesi di proteine "addette" al trasporto dei lipidi generati dal danno epatico della tossina causa alterazione della mobilizzazione e del trasporto dei lipidi che si manifesta nella degenerazione grassa del fegato. Le aflatossine determinano anche un'alterazione del metabolismo dei carboidrati con diminuzione delle riserve di glicogeno epatico.

1.2.1.2.3 Azione a carico del sistema immunitario

Le aflatossine possono provocare alterazioni della risposta umorale e cellulo-mediata.

Questo è probabilmente legato all'azione diretta esercitata sulle membrane cellulari e sugli organuli che a loro volta hanno una ricaduta sulla funzionalità delle cellule deputate alla produzione anticorpale e alla citolisi cellulo-mediata

In particolare, è stata rilevata una correlazione tra somministrazione ripetuta di AFB₁ e la comparsa di un'alterata ripartizione tra due sottopopolazioni di linfociti T (linfociti T-helper e T citotossici) in scrofe intossicate durante la gravidanza e la lattazione con un pool di aflatossine B₁, B₂, G₁, G₂, somministrate giornalmente all'interno della razione in dose di 300 ppb. Possibili disordini qualitativi e quantitativi della formula leucocitaria potrebbero avere effetto sull'efficienza della risposta immunitaria

1.2.2 Specifici limiti di legge per le aflatossine

Negli ultimi anni le aflatossine hanno assunto un ruolo sempre più importante per quanto riguarda l'inquinamento di derrate alimentari e, di conseguenza, della salute umana. Ai fini della tutela della salute pubblica, è quindi necessario mantenere il tenore dei contaminanti ad un livello accettabile sul piano tossicologico.

Date le disparità legislative esistenti tra gli Stati membri dell'Unione Europea e il conseguente rischio di distorsione della concorrenza, per alcuni contaminanti si impongono misure comunitarie volte a garantire l'unità del mercato nel rispetto del principio di proporzionalità.

Nel parere del 23 settembre 1994, lo Scientific Committee on Food (SCF), ha concluso che le aflatossine sono agenti cancerogeni e genotossici. E', quindi, necessario limitare il contenuto complessivo di aflatossine negli alimenti (somma delle aflatossine B₁, B₂, G₁ e G₂) e quello della sola aflatossina B₁, che è la più tossica.

Le arachidi, la frutta a guscio, la frutta secca e il granturco non conformi ai tenori massimi di aflatossine, possono essere commercializzati purchè si tratti di prodotti alimentari che:

- Non sono destinati al consumo umano diretto o all'impiego come ingredienti di prodotti alimentari;
- Sono conformi ai corrispondenti tenori massimi;
- Sono sottoposti ad un trattamento che comporti la cernita o un altro trattamento fisico e purchè dopo tale trattamento i tenori massimi non vengano superati, e a condizione che il trattamento non produca altri residui nocivi;

- Recano un'etichettatura che ne specifichi chiaramente l'impiego, compresa l'indicazione "prodotto da sottoporre a cernita, o ad altri trattamenti fisici per abbassare il livello di contaminazione da aflatossine prima del consumo umano o dell'impiego come ingredienti di prodotti alimentari". Questa indicazione deve comparire sull'etichetta di ogni sacco, cassa o sull'originale del documento di accompagnamento.

E' stato riconosciuto che mediante la cernita o altri trattamenti, è possibile abbassare il tenore di aflatossine nelle partite di arachidi, frutta a guscio, frutta secca e granturco. Per ridurre al minimo gli effetti sugli scambi, è opportuno consentire per questi prodotti quantità più elevate di aflatossine qualora essi non siano destinati al consumo umano. In questi casi si dovrebbero fissare i tenori massimi di aflatossine tenendo anche conto dell'efficacia che i trattamenti hanno nel ridurre i contenuti di aflatossine negli alimenti citati a livelli inferiori ai tenori massimi fissati per tali prodotti quando essi sono destinati al consumo umano diretto (Tabella 6)¹⁰.

Aflatossine	Tenore massimo espresso in µg/kg		
	B₁	Totali (B₁ +B₂ +G₁ +G₂)	M₁
Arachidi da sottoporre a cernita o ad altro trattamento fisico prima del consumo umano o dell'impiego come ingredienti di prodotti alimentari	8,0	15,0	-
Frutta a guscio da sottoporre a cernita o ad altro trattamento fisico prima del consumo umano e nell'impiego come ingredienti di prodotti alimentari	5,0	10,0	-
Arachidi, frutta a guscio e relativi prodotti di trasformazione, destinati al consumo umano diretto o all'impiego quali ingredienti di prodotti alimentari	2,0	4,0	-
Frutta secca da sottoporre a cernita o ad altro trattamento fisico prima del consumo umano e nell'impiego come ingredienti di prodotti alimentari	5,0	10,0	-
Frutta secca e relativi prodotti di trasformazione, destinati al consumo umano diretto o all'impiego quali ingredienti di prodotti alimentari	2,0	4,0	-
Tutti i cereali e loro prodotti derivati, compresi i prodotti a base di cereali	2,0	4,0	-

Aflatossine	Tenore massimo espresso in µg/kg		
	B₁	Totali (B₁ +B₂ +G₁ +G₂)	M₁
Granturco da sottoporre a cernita o ad altro trattamento fisico prima del consumo umano o dell'impiego come ingredienti di prodotti alimentari	5,0	10,0	-
Latte crudo, latte trattato termicamente e latte destinato alla fabbricazione di prodotti di prodotti a base di latte	-	-	0,050
Le seguenti specie di spezie: <i>Capsicum</i> spp. (frutti secchi dello stesso, interi o macinati, compresi il peperoncino rosso, pepe di Cayenna e paprika) <i>Piper</i> spp.(frutti dello stesso compreso il pepe bianco e nero) <i>Myristica fragrans</i> (noce moscata) <i>Zingiber officinale</i> (zenzero) <i>Curcuma longa</i> (curcuma)	5,0	10,00	-
Alimenti a base di cereali e altri alimenti destinati ai lattanti e ai bambini	0,10	-	-
Alimenti per lattanti e alimenti di proseguimento, compresi il latte per i lattanti e il latte di proseguimento	-	-	0,025
Alimenti dietetici destinati a fini medici speciali, destinati specificatamente ai lattanti	0,10	-	0,025

Tabella 6 Limiti di legge per le aflatossine secondo il Reg. 1881/2006

2 Scopo del lavoro

Le micotossine sono metaboliti prodotti da funghi che vengono considerati inquinanti di numerose derrate alimentari.

L'interesse per questi composti si è esteso nel tempo in quanto è un problema che interessa il commercio di diversi Paesi, soprattutto quelli a clima caldo-umido.

Durante il mio tirocinio svolto nel laboratorio Sinergo di Nizza Monferrato, si è posto l'accento sulla ricerca di aflatossine, poiché tra le micotossine presenti negli alimenti sono quelle più altamente tossiche sia per l'uomo sia per gli animali.

Le aflatossine, possono contaminare differenti tipi di alimenti, come la frutta secca, tra cui noci, nocciole, mandorle, ma anche farina ed alcuni tipi di spezie.

Molte sono le aflatossine conosciute ma le più rilevanti sono la B₁, la B₂, la G₁ e la G₂ che vengono prodotte da *A. flavus* e *A. parasiticus*.

L'aflatossina B₁ è il metabolita maggiormente tossico, infatti i limiti di legge vengono posti sulle derrate alimentari per questo composto e per le aflatossine totali, intese come la somma di B₁, B₂, G₁ e G₂.

In particolar modo, il progetto di tesi riguarda l'ottimizzazione di un metodo ufficiale AOAC per la ricerca ed identificazione di aflatossine su frutta secca, in particolare su mandorle, nocciole ed arnelline, mediante un'estrazione su colonnine di immunoaffinità e una successiva separazione

cromatografica tramite HPLC^{2,3}. La metodica studiata prevede l'utilizzo di una derivatizzazione pre-colonna mediante l'utilizzo di acido trifluoroacetico come derivatizzante.

In seguito è stata calcolata la curva di taratura e sono state effettuate delle prove di recupero su alcuni campioni per valutare l'efficienza del metodo. Successivamente si è deciso di analizzare alcuni campioni di frutta secca per valutare il metodo ottimizzato e per monitorare la concentrazione di aflatossine in questi alimenti.

3 Materiali e metodi

Per l'identificazione di aflatossine in frutta secca sono stati utilizzati diversi metodi, tra cui due metodi ufficiali AOAC, con lo scopo di mettere a punto un metodo caratterizzato da buona accuratezza e precisione nella matrice alimentare oggetto di studio.

I metodi utilizzati sono:

- AOAC Official Method 990.33, Aflatoxins in Corn and Peanut Butter Liquid Chromatographic Method. First Action 1990, Final Action 1994.
- AOAC Official Method 991.31, Aflatoxins in corn, raw peanuts and peanut butter by using immunoaffinity column cleanup with Liquid Chromatography Method. 1994.

Per sviluppare un metodo adatto alle esigenze del laboratorio Sinergo, è stato deciso di unire i due metodi, apportando le necessarie modifiche.

In particolare, nel primo metodo (AOAC 990.33) vengono allestite delle colonnine di silice gel mentre per il nostro metodo si è deciso di utilizzare delle colonnine di immunoaffinità che migliorano decisamente l'analisi. Infatti queste colonne apportano diversi vantaggi, in quanto permettono una purificazione semplice ed affidabile prima della rivelazione ed un elevato recupero delle sostanze in esame².

Nel secondo metodo (AOAC 991.31), invece, viene utilizzata una derivatizzazione post-colonna che non è applicabile al nostro laboratorio³, di conseguenza si è scelto di utilizzare una derivatizzazione pre-colonna con acido trifluoroacetico come derivatizzante.

Infine, per l'ottimizzazione del nuovo metodo sono stati consultati i seguenti articoli:

- Supelco, Separation and Quantification of Aflatoxins B and G using HPLC, Bulletin 800 D¹⁷
- Journal of Chromatography A. Application of the assay of aflatoxin by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis¹⁸
- Journal of Chromatography B Blomed Application. Derivatization reaction for the determination of aflatoxin by liquid chromatography with fluorescence detection¹⁹

Il metodo derivato dall'unione dei due metodi AOAC per la preparazione del campione e degli standard è il seguente (Figura 5):

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

- Pesare 50 g di campione
- Pestarle in un mortaio e ridurle finemente
- Aggiungere 5 g di NaCl e 100 ml di MeOH/PBS buffer (80:20) o alternativamente H₂O:MeOH
- Agitare e filtrare su carta
- Prelevare 10 ml di filtrato
- Agitare ad alta velocità per 3-5 minuti
- Filtrare su carta
- Diluire 5 ml di filtrato aggiungendo 30 ml di PBS.
- Far passare 15 ml della soluzione prima nella siringa con riduttore e successivamente nella colonnina ad una velocità di 1 goccia/secondo
- Far passare nella colonna 15 ml di H₂O deionizzata alla velocità di 2 gocce/secondo
- Far passare aria per 5 minuti
- Posizionare una provetta in vetro al di sotto delle colonnina
- Aggiungere 1 ml di MeOH
- Incubare per 3 minuti

- Far passare 2 ml di MeOH attraverso la colonna ad una velocità di 1 goccia/secondo. Avviare il sistema per il pompaggio del vuoto e raccogliere tutto il liquido presente nella colonna.
- Volume di iniezione: da 20 a 100 µl di campione nell'iniettore dell'HPLC^{18,19}

PREPARAZIONE DEGLI STANDARD

- Nel frattempo preparare insieme tre soluzioni di standard a concentrazione nota crescente prelevando la quantità necessaria dalla Working Standard Solution contenente aflatossine
- Portare a secco

DERIVATIZZAZIONE

- Aggiungere 200 µl di esano, agitare per qualche secondo ed aggiungere 50 µl di TFA. Agitare nuovamente per 30 secondi e lasciar riposare per 5 minuti
- Portare a secco
- Aggiungere 1,950 ml del tampone di H₂O: ACN (9: 1). Agitare per 30 secondi esatti e far riposare per 10 minuti o centrifugare a 1000rpm per 30 secondi
- Utilizzare come fase mobile H₂O: ACN: MeOH (700: 170: 170)
- Volume di iniezione: 100 µl nell'HPLC²

Da questo metodo di partenza si è agito con varie prove, per ottimizzare la risoluzione cromatografica

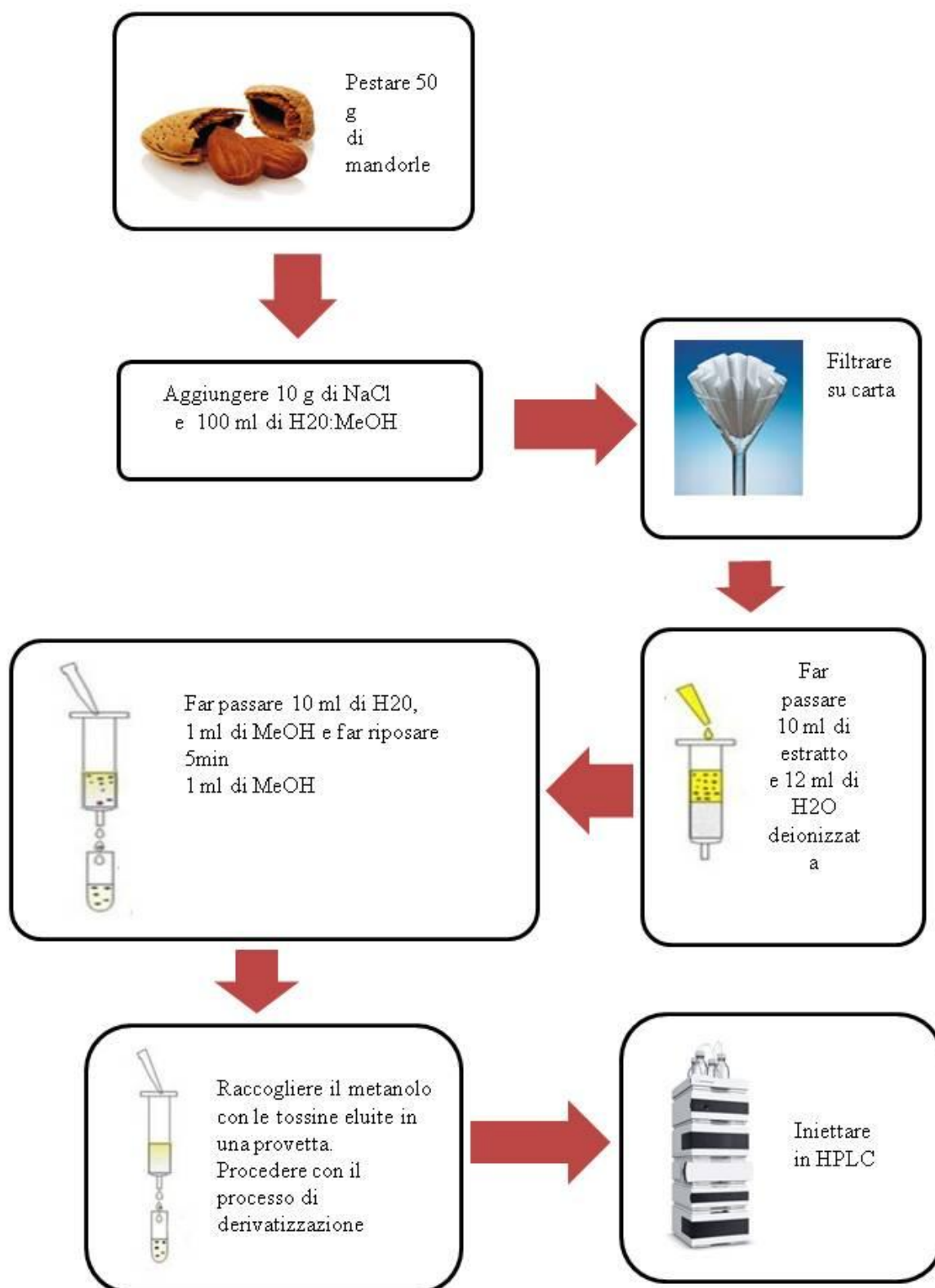


Figura 5 Rappresentazione grafica della preparazione del campione

3.1 Materiali

3.1.1 Standard concentrati

- Standard Aflatossina B₁ from *Aspergillus Flavus*, CAS N° [1162-65-8] Sigma Aldrich (A6636-1MG), $\geq 98\%$, T° di stoccaggio 2-8°C.
- Standard Aflatossina B₂ from *Aspergillus Flavus*, CAS N° [7220-81-7] Sigma Aldrich (A9887-1MG), $\geq 98\%$, T° di stoccaggio 2-8°C.
- Standard Aflatossina G₁ from *Aspergillus Flavus*, CAS N° [1165-39-5] Sigma Aldrich (A0138-1MG), $\geq 98\%$, T° di stoccaggio 2-8°C.
- Standard Aflatossina G₂ from *Aspergillus Flavus*, CAS N° [7241-98-7], Sigma Aldrich (A0263-1MG), $\geq 98\%$, T° di stoccaggio 2-8°C.

3.1.1.1 Preparazione delle soluzioni contenenti gli standard

3.1.1.1.1 Soluzione Madre

- Nel flaconcino da 1 mg di ogni singola aflatossina (sotto forma di polvere), sono stati aggiunti 5 ml di metanolo. La concentrazione è di pertanto 200 mg/l.

Le soluzioni possono essere conservate in congelatore per un tempo massimo di 2 anni.

3.1.1.1.2 Stock Solution

- Dalla soluzione madre prelevare 0,5 ml di ogni standard
- Trasferire in un matraccio da 10 ml classe A e portare a volume con metanolo. La concentrazione è pari a 10 mg/l.

Queste soluzioni possono essere conservate in provette ambrate (poiché le aflatossine sono fotosensibili) in congelatore per un periodo massimo di 2 anni.

3.1.1.1.3 Working Standard Solution a 100 µg/l

- Dalla Stock Solution di ogni standard pipettare 0,1 ml

- Trasferire in un matraccio da 10 ml classe A e portare a volume con Metanolo. La concentrazione è pari a 100 µg/l.

Queste soluzioni possono essere conservate in provette ambrate in frigorifero per un periodo massimo di 2 anni.

3.1.1.1.4 Working Standard Solution 20 µg/l

- Preparare una soluzione unica contenente tutte le aflatossine prelevando 0,1 ml dalla Working Standard Solution a 100 µg/l
- Trasferire in un matraccio da 50 ml classe A e portare a volume con Metanolo. La concentrazione è di circa 20 µg/l.

Queste soluzioni possono essere conservate in provette ambrate in frigorifero per un periodo massimo di 2 anni.

3.1.2 Reagenti

3.1.2.1 Reagenti per la preparazione del campione

- Metanolo (CH_4O), CAS N° [67-56-1], Sigma Aldrich, (34485-1L)
- Acetonitrile ($\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$), CAS N° [75-05-8], Sigma Aldrich (34851-1L)
- Esano (C_6H_{14}), CAS N° [110-54-3], Carlo Erba (446907-1L)
- Acido trifluoroacetico ($\text{C}_2\text{HF}_3\text{O}_2$), CAS N° [76-05-01], VWR (UN2699-100ML)
- Tampone H_2O : ACN (9:1)
- Cloruro di sodio (NaCl), CAS N° [7647-14-5], Sigma Aldrich (71380-1KG)
- Tampone MeOH: H_2O (60: 40)
- H_2O deionizzata
- Mandorle
- Nocciole
- Armelline, semi all'interno del nocciolo dell'albicocca e della pesca

3.1.2.2 Reagenti per preparazione della fase mobile

- Fase mobile H_2O : MeOH (50:50)
- Fase mobile H_2O : ACN: MeOH (700: 170: 170)

3.1.3 Strumenti

3.1.3.1 Strumenti per la preparazione del campione

- Matracci in pyrex da 10 ml classe A
- Provette in vetro
- Pipetta automatica Socorex 100 - 1000µl
- Pipetta automatica Socorex 10 - 100µl
- Pipette in vetro
- Vial da 2 ml Agilent Technologies
- Vial ambrato con chiusura a vite in vetro silanizzato 2 ml Agilent Technologies
- Beute in pyrex da 100 ml
- Filtri in carta
- Imbuto
- Siringhe da 20 ml senza ago, munita di adattatore per colonne di immunoaffinità
- Colonnine di immunoaffinità **aokinImmunoClean AFLA**
- Sistema per il vuoto
- Matracci in pyrex da 50-100 ml
- Mortaio e pestello
- Spatole a cucchiaio
- Becker in pyrex da 500 ml
- Bilancia di precisione Gibertini Europe 6000
- Corrente di azoto per evaporare

3.1.3.2 Strumenti per l'analisi

- HPLC (high-performance liquid chromatography) Agilent Technologies 1260 Infinity composto da:
 - Comparto termostatazione colonna impostato a 40°C
 - Auto campionatore (volume di iniezione di 100µl)
 - Modulo di pompaggio quaternario (velocità di flusso della fase mobile 1 ml/min)
 - Computer con il programma Agilent Advisor Advanced Software Rev B.02.03 per la gestione del sistema di misura

- Colonna LICHROART 250.4, PUROSPHER endcapped RP-18 codice 1.50252.0001
- Pre-colonna LICHROSPHER100 RP-18 codice 1.50957.0001
- PMT gain: 10
- Rilevatore a fluorescenza: λ emissione 440 nm
 λ eccitazione 360 nm

3.2 Metodi

Dopo aver effettuato varie prove seguendo la metodica sopracitata è stato necessario ottimizzare il metodo. Questo perché seguendo la procedura ufficiale, i risultati non erano quelli desiderati e non erano applicabili al nostro laboratorio. Per questo motivo sono state effettuate prove alternative studiando le diverse variabili, e i punti critici che possono incorrere nella procedura, al fine di migliorare e rendere applicabile il metodo per l'identificazione di aflatossine su frutta secca.

Le variabili che sono state studiate in modo approfondito sono:

- Fase mobile
- Temperatura
- Strumento
- DAD e FLD come sistemi di rilevazione
- Processo di derivatizzazione

3.2.1 Variazioni della fase mobile

Sono stati effettuati esperimenti con due fasi mobili differenti:

- H₂O:CH₃CN:CH₃OH (700:170:170)
- H₂O:CH₃OH (50:50)

Il metodo ufficiale AOAC riporta come fase mobile H₂O:CH₃CN:CH₃OH (700:170:170) ma, inizialmente, si è preferito effettuare prove anche con un'altra fase mobile (consigliata dal produttore delle cartucce di immunoaffinità)^{18,19}, per osservare un eventuale miglioramento nella risoluzione dei picchi.

Per questa prova sono state preparate soluzioni di standard separati seguendo la metodica ufficiale. La procedura è la seguente:

- Preparare otto soluzioni di standard, quattro ad una concentrazione di 200 µg/l e altre quattro a 100 µg/l, prelevando dalla Working Standard Solution a 100 µg/l di ogni aflatossina 0,8 ml e 0,4 ml rispettivamente

- Portare a 2 ml di volume con metanolo
- Evaporare con una gentile corrente di azoto (temperatura non superiore ai 40°C).
- Aggiungere alla soluzione portata a secco 200 µl di esano, agitare per qualche secondo ed aggiungere 50 µl di TFA. Agitare per 30 secondi e lasciar riposare 5 minuti.

A seconda del tampone utilizzato, procedere come segue:

- Tampone H₂O: CH₃OH
- Aggiungere 1,950 ml del tampone H₂O: MeOH (50:50) che corrisponde alla fase mobile, agitare per 30 secondi e lasciare separare per 10 minuti.
 - A separazione avvenuta prelevare la fase inferiore e trasferirla in un vial per HPLC.
 - Iniettare 100 µl

oppure

- Tampone H₂O: CH₃CN: CH₃OH
- Aggiungere 0,950 ml del tampone H₂O: ACN (9:1). Agitare per 30 secondi e lasciar riposare per 10 minuti
 - A separazione avvenuta prelevare la fase inferiore e trasferirla in un vial per HPLC
 - Iniettare 100 µl

3.2.2 Variazioni della temperatura

Per questa prova la procedura utilizzata è quella sopracitata, utilizzando come fase mobile H₂O: CH₃CN: CH₃OH (700:170:170) ma sono state utilizzate due temperature differenti, in quanto nei metodi di riferimento non viene specificato questo parametro. La temperatura è stata variata semplicemente a livello delle impostazioni dello strumento prima dell'iniezione in HPLC. Le temperature utilizzate sono state le seguenti:

- 35°C

- 40°C

3.2.3 Variazioni del Gain

Per questo esperimento non è stata variata la procedura ma è stato cambiato il valore del Gain tra le impostazioni dello strumento (Figura 6). Il Gain permette di aumentare e migliorare la sensibilità del risultato, che, in questo caso, si traduce come un aumento in termini di intensità del segnale²⁰.

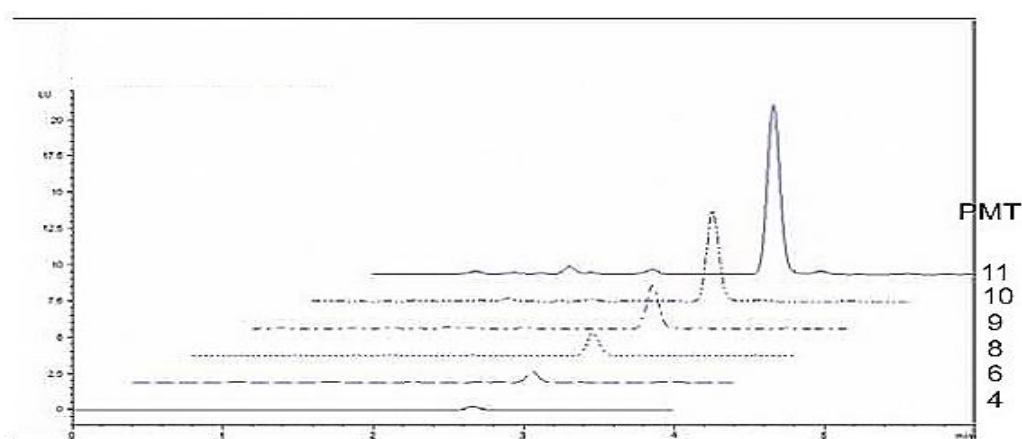


Figura 6 Esempio di aumento dell'intensità di segnale aumentando gradualmente il Gain

Sono state condotte due prove:

- una prova in cui il Gain è stato mantenuto a 1 (valore generalmente impostato)
- una in cui il Gain è stato impostato a 10

3.2.4 FLD e DAD come sistema di rivelazione

Consultando il metodo SUPELCO per la separazione e quantificazione di Aflatossine B e G utilizzando l'HPLC, si è studiato come le aflatossine siano visibili anche utilizzando un rivelatore a raggi UV, anche se non è abbastanza sensibile da rilevare concentrazioni molto basse su matrici alimentari.

Per ogni campione è sempre stata effettuata, comunque, l'analisi in doppio (DAD e FLD) perché permette di verificare che il processo di derivatizzazione avvenga in modo corretto e completo¹⁷.

3.2.5 Variazioni nel processo di derivatizzazione

Inizialmente le prove effettuate sono state tutte a concentrazione decisamente alta (200 µg/l) ma la concentrazione che si vuole ottenere al termine dello studio dovrebbe essere più bassa, di circa 0,1 µg/kg

Per raggiungere questo obiettivo, si è pensato di migliorare il processo di derivatizzazione, poiché, a seguito di tutte le modifiche già con tutti gli accorgimenti e le modifiche delle variabili sopra studiate, l'intensità di segnale risulta essere ancora molto bassa. Inoltre, consultando il metodo Supelco per la separazione e quantificazione di aflatossine B e G usando l'HPLC, è stata valutata anche l'opzione di una derivatizzazione incompleta delle aflatossine, in quanto questa problematica porta a cromatogrammi poco definiti e con bassa intensità di segnale (Figura 7), simili a quelli trovati finora.

Un possibile problema di derivatizzazione non dovrebbe riguardare le aflatossine B₂ e G₂ che sono molecole normalmente fluorescenti ma riguarda soprattutto le aflatossine B₁ e G₁ che per essere determinabili devono essere necessariamente derivatizzate¹⁷.

Utilizzando un derivatizzante come l'acido trifluoroacetico, l'aflatossina B₁ viene convertita in B_{2a} e la G₁ in G_{2a}, ma solo se il processo di derivatizzazione viene completato. L'acido trifluoroacetico agisce aggiungendo una molecola d'acqua intorno all'anello furanico terminale.

Nelle prove successive, le variabili che sono state modificate in precedenza (fase mobile, Temperatura, gain e sistemi per la rivelazione), sono state mantenute ai valori ritenuti ottimali in base alle prove precedenti, mentre sono state effettuare procedure diverse per la derivatizzazione.

Per effettuare le prove sulla derivatizzazione sono stati preparate quattro soluzioni di standard a 20 ng assoluti e quattro soluzioni standard a 4 ng assoluti utilizzando la Working Standard Solution a 20 ug/l per tutte e quattro le prove di derivatizzazione.

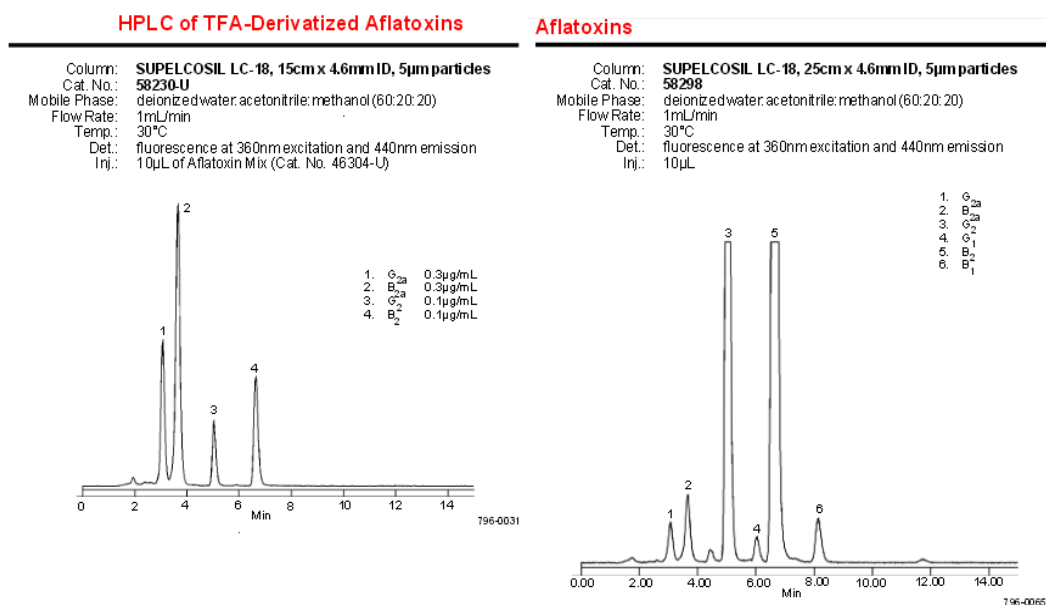


Figura 7 Confronto tra due campioni contenenti aflatossine derivatizzate (1) e non (2)

3.2.5.1.1 Preparazione degli standard I prova

Nella prima prova si è provata nuovamente la preparazione consigliata dai metodi ufficiali, applicando le modifiche alle variabili finora valutate.

A seguito è descritta nel dettaglio la procedura:

- Prelevare rispettivamente 1 ml e 0,2 ml dalla Working Standard Solution a 20 ug/l
- Portare a secco con una debole corrente d'azoto (temperatura non superiore ai 40°C)
- Aggiungere 200 µl di esano, agitare per qualche secondo ed aggiungere 50 µl di TFA. Agitare nuovamente per 30 secondi e far riposare per 15 minuti
- Aggiungere 0,450 ml del tampone H₂O:ACN (9:1). Agitare per 30 secondi e lasciar riposare 15 minuti.
- A separazione avvenuta eliminare la strato superiore di esano
- Volume di iniezione: 100 µl nell'iniettore dell'HPLC

3.2.5.1.2 Preparazione degli standard II prova

Nella seconda prova è stata effettuata una procedura diversa da quelle consigliate dai metodi ufficiali.

A seguito è descritta nel dettaglio la procedura:

- Prelevare rispettivamente 1 ml e 0,2 ml dalla Working Standard Solution a 20 ug/l
- Portare a secco con una debole corrente d'azoto (temperatura non superiore ai 40°C)
- Aggiungere 500 µl di esano, agitare per qualche secondo ed aggiungere 200 µl di TFA. Agitare nuovamente per 30 secondi e far riposare per 15 minuti.
- Aggiungere 0,3 ml del tampone H₂O:ACN (9:1). Agitare per 30 secondi e lasciar riposare 15 minuti.
- A separazione avvenuta eliminare la strato superiore di esano
- Volume di iniezione: 100 µl nell'iniettore dell'HPLC

3.2.5.1.3 Preparazione degli standard III prova

Nel terzo esperimento sono stati cambiati alcuni parametri per migliorare il processo di derivatizzazione.

A seguito è descritta nel dettaglio la procedura:

- Prelevare rispettivamente 1 ml e 0,2 ml dalla Working Standard Solution a 20 ug/l
- Portare a secco con una gentile corrente d'azoto (Temperatura non superiore ai 40°C)
- Aggiungere 500 µl di esano, agitare per qualche secondo ed aggiungere 200 µl di TFA. Agitare nuovamente per 30 secondi e far riposare per 15 minuti.
- Portare a secco con una gentile corrente d'azoto (Temperatura non superiore ai 40°C)
- Aggiungere 0,5 ml del tampone H₂O:ACN (9:1). Agitare per 30 secondi e lasciar riposare 15 minuti.
- Volume di iniezione: 100 µl nell'iniettore dell'HPLC

3.2.5.1.4 Preparazione degli standard IV prova

Nella quarta prova è stata ripresa parte della terza prova a cui è stato aggiunto un passaggio.

A seguito è descritta nel dettaglio la procedura:

- Prelevare rispettivamente 1 ml e 0,2 ml dalla Working Standard Solution a 20 ug/l
- Portare a secco con una debole corrente d'azoto (temperatura non superiore ai 40°C)
- Aggiungere 200 µl di esano, agitare per qualche secondo ed aggiungere 50 µl di TFA. Agitare nuovamente per 30 secondi e far riposare per 15 minuti.
- Portare a secco con una debole corrente d'azoto (temperatura non superiore ai 40°C)
- Aggiungere 500 µl di esano, agitare per qualche secondo ed aggiungere 50 µl di TFA. Agitare nuovamente per 30 secondi e far riposare per 15 minuti.
- Aggiungere 0,450 ml del tampone H₂O:ACN (9:1). Agitare per 30 secondi e lasciar riposare 15 minuti.
- A separazione avvenuta eliminare la strato superiore di esano
- Volume di iniezione: 100 µl nell'iniettore dell'HPLC

3.2.6 Retta di taratura

In seguito alle varie prove effettuate per ottimizzare il metodo si è deciso di costruire la retta di taratura utilizzando standard a concentrazione crescente. Per costruirla sono state preparate tre soluzioni di standard con una concentrazione di 1 ng assoluti, 2 ng assoluti e 4 ng assoluti prelevando dalla Working Standard Solution a 20 ug/l rispettivamente 50 µl, 0,1 ml e 0,2 ml in 1ml di volume totale.

Ogni standard è stato preparato tre volte, sottoposto al processo di derivatizzazione pre-colonna e successivamente iniettato nell'HPLC.

3.2.7 Prove di recupero

Per le prove di recupero sono state preparate nove soluzioni utilizzando nove campioni di armelline; in particolare sono state preparate:

- tre campioni tal quale, senza nessuna aggiunta
- tre campioni con un'aggiunta di 0,125 ml della Working Standard Solution a 20 ug/l (REC-1)
- tre campioni con un'aggiunta di 1,25 ml della Working Standard Solution a 20 ug/l (REC-2)

4 Risultati

4.1 Risultati che riguardano l'ottimizzazione del metodo

In seguito allo studio dei due metodi ufficiali AOAC (Metodo 990.33 e Metodo 991.31)^{2,3} è stato necessario sviluppare un nuovo metodo che fosse utilizzabile nel nostro laboratorio. Seguendo i metodi ufficiali, è stato necessario apportare alcune modifiche, come utilizzare colonnine di immunoaffinità per aumentare la purificazione ed ottenere un elevato recupero della sostanza, e una derivatizzazione pre-colonna per rendere visibili le molecole di interesse. Sono state effettuate numerose prove per ottenere l'ottimizzazione del metodo andando a modificare alcune variabili come :

- fase mobile
- temperatura
- gain
- sistema di rivelazione.

Queste modifiche non hanno, però, permesso un miglioramento sufficiente, in quanto l'intensità del segnale rimane decisamente bassa ed inoltre, i picchi spesso non vengono visualizzati nella

maniera corretta. Si è deciso, quindi, di effettuare ulteriori prove sulla fase derivatizzazione, in quanto è stato considerato punto critico dell'intero processo. Sono state condotte quattro prove in cui sono state effettuate alcune modifiche. La prima prova è stata condotta ripetendo la procedura ufficiale, mentre nella seconda prova è stato aggiunto una maggior quantità sia di esano (da 200 μ l a 500 μ l) sia di acido trifluoroacetico (da 50 μ l a 200 μ l) e successivamente è stato aggiunto il tampone H₂O:ACN (0,3 ml); nella terza prova è stata aggiunta un'ulteriore fase, in cui dopo l'aggiunta di TFA, la soluzione è stata nuovamente portata a secco e successivamente è stato aggiunto il tampone H₂O:ACN (0,5 ml). La quarta prova invece, è stata effettuata in modo ancora diverso poiché la soluzione ha subito una seconda derivatizzazione. In seguito a queste prove sono stati confrontati i vari tracciati cromatografici per osservare un eventuale miglioramento del processo.

I risultati ottenuti sono i seguenti:

4.1.1 Variazione della fase mobile

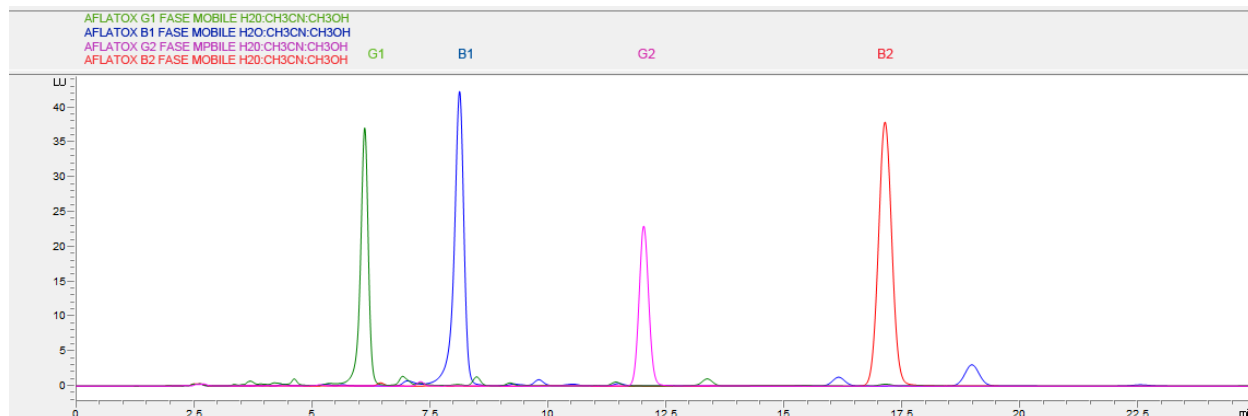


Figura 8 Fase mobile H2O:CH3CN:CH3OH

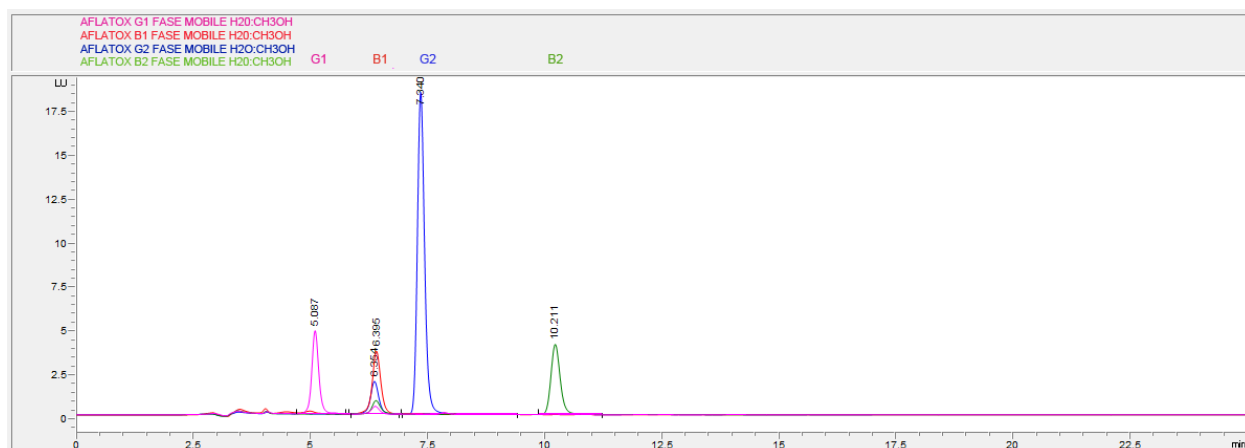


Figura 9 Fase mobile H2O:CH3OH

Dal confronto tra le due fasi mobili si evince che ci sono differenze tra i tempi di ritenzione dei picchi e, in particolar modo, nel tracciato in cui è stato utilizzata la fase mobile H₂O:CH₃CN:CH₃OH (Figura 8), si osserva che le aflatossine presentano una maggiore interazione con la colonna con conseguente ritardo nella loro eluizione. Inoltre c'è anche una notevole differenza a livello di intensità del segnale: con fase mobile H₂O:CH₃CN:CH₃OH si arriva ad un'intensità di 40LU, mentre con fase mobile H₂O:CH₃OH si arriva solo a 18 LU. La concentrazione degli standard utilizzata è tuttavia elevata (200 µg/l).

A seguito di questa prova, si è deciso di utilizzare come fase mobile H₂O:CH₃CN:CH₃OH.

4.1.2 Variazioni della temperatura

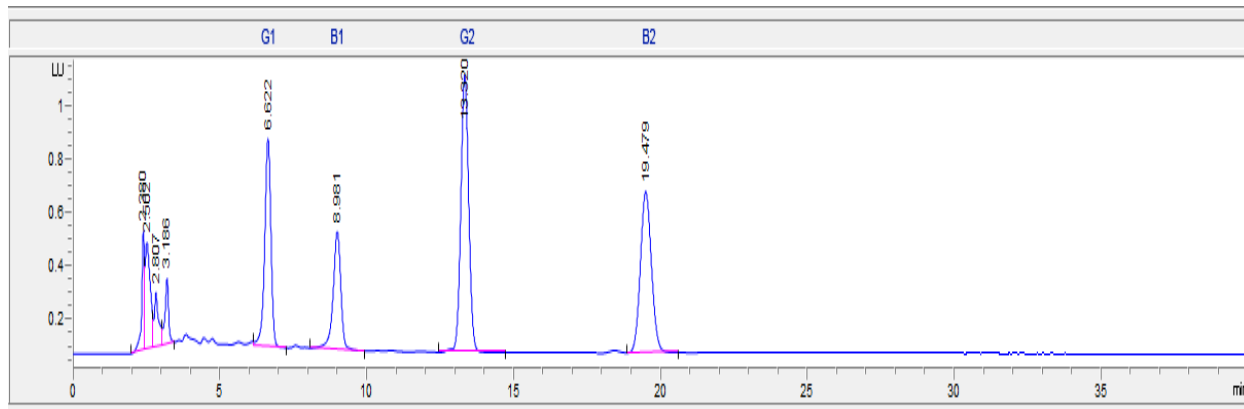


Figura 10 Temperatura a 35°C

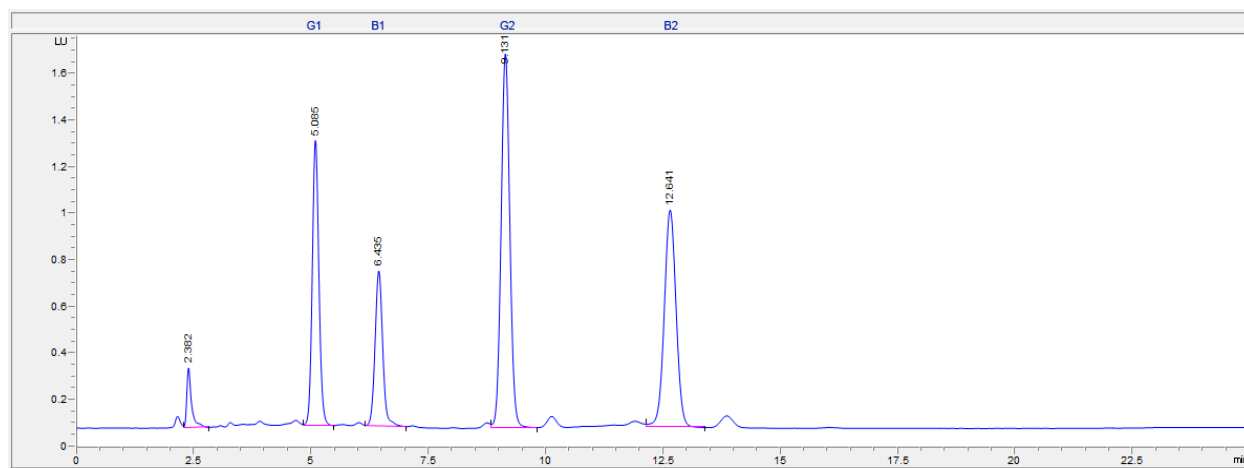


Figura 11 Temperatura a 40°C

Dal confronto dei due tracciati cromatografici si può capire come i tempi di ritenzione dei picchi aumentino notevolmente. Nel primo tracciato (Figura 10) in cui la temperatura è stata impostata a 35°C l'afatossina G₁ ha tempo di ritenzione pari a 6,622 minuti, la B₁ ha tempo di ritenzione pari a 8,981 minuti, la G₂ ha tempo di ritenzione pari a 13,320 minuti e la B₂ ha tempo di ritenzione pari a 19,479 minuti.

Nel secondo tracciato (Figura 11) in cui la temperatura è impostata a 40°C i picchi escono a questi tempi: la G₁ ha tempo di ritenzione pari a 5,085 minuti, la B₁ ha tempo di ritenzione pari a 6,435 minuti, la G₂ ha tempo di ritenzione pari a 9,131 minuti e la B₂ ha tempo di ritenzione pari a 12,641 minuti. A seguito di questa prova, è stata fissata la temperatura a 40°C

4.1.3 Variazioni del Gain

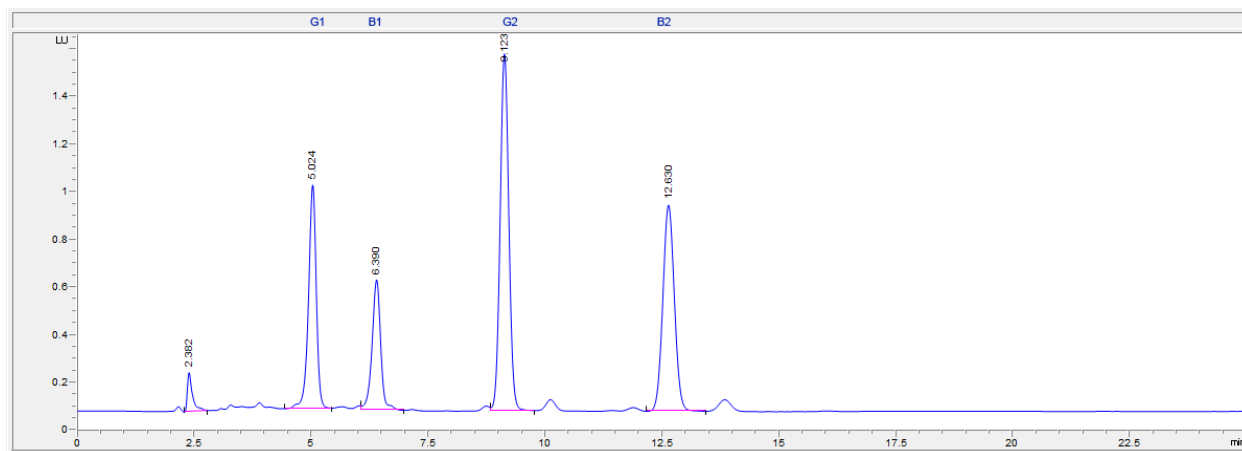


Figura 12 Gain impostato a 1

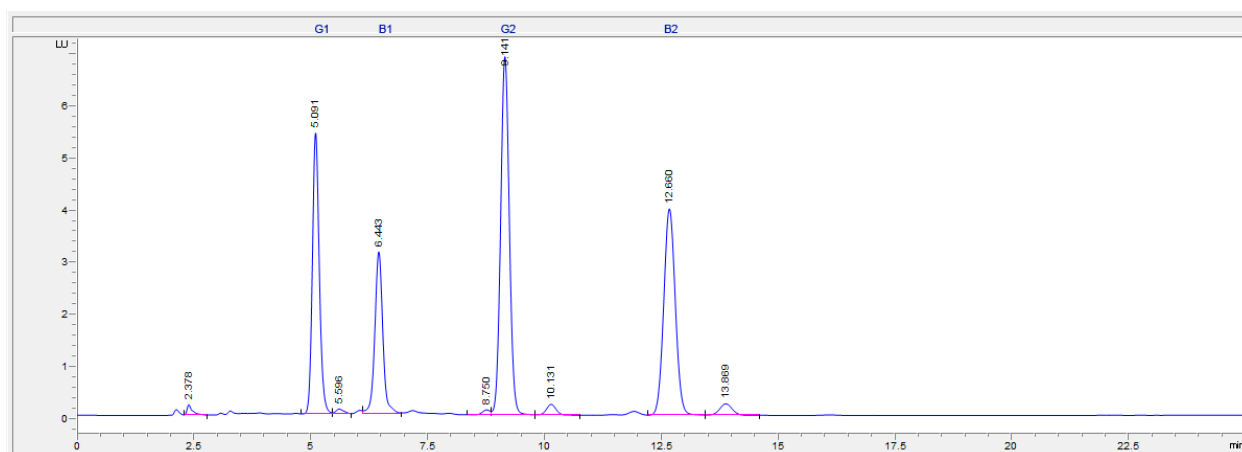


Figura 13 Gain impostato a 10

Da questi due tracciati cromatografici si può notare la differenza del risultato cambiando il Gain. Infatti nel secondo tracciato, in cui il Gain è stato aumentato a 10, si nota un aumento del segnale e quindi un aumento dell'intensità luminosa che varia da un massimo di 1,5 LU (Figura 12) ad un massimo di 7 LU (Figura 13).

Vista la maggiore intensità del segnale, il Gain è stato impostato a 10.

4.1.4 FLD e DAD come sistema di rivelazione

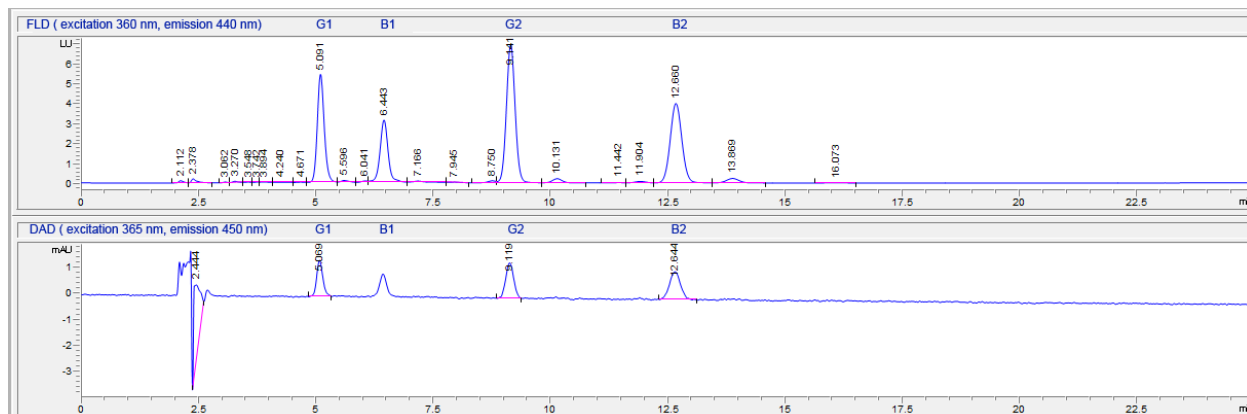


Figura 14 Confronto tra FLD e DAD

In questo tracciato sono stati messi a confronto i due sistemi di rivelazione e si può notare come i picchi corrispondenti alle aflatossine siano presenti in entrambi i cromatogrammi, ma nel rivelatore DAD la sensibilità è piuttosto bassa così come l'intensità del segnale (Figura 14).

4.1.5 Variazioni nel processo di derivatizzazione

4.1.5.1 Confronto tra le varie prove con lo Standard a 2 µg/l

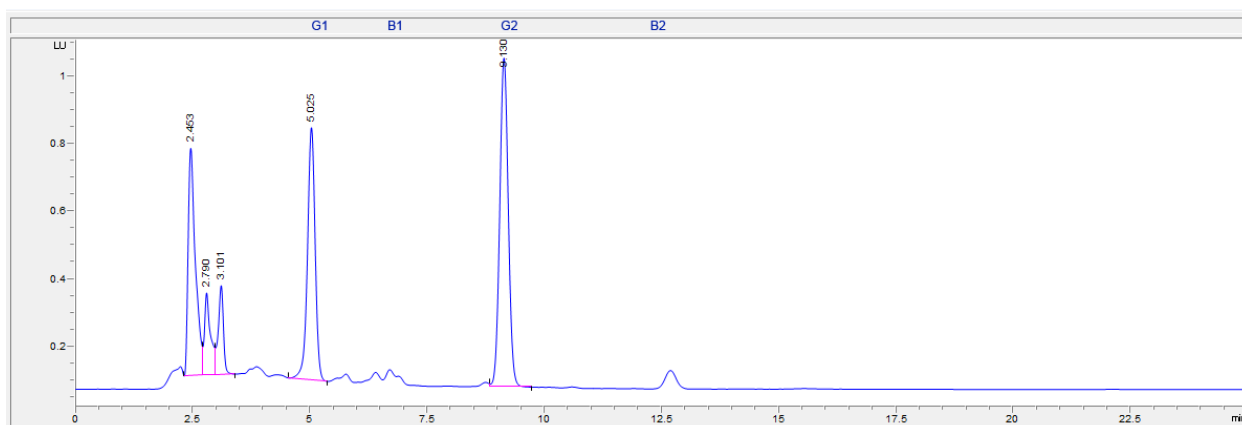


Figura 15 Prova 1 standard 2 µg/l

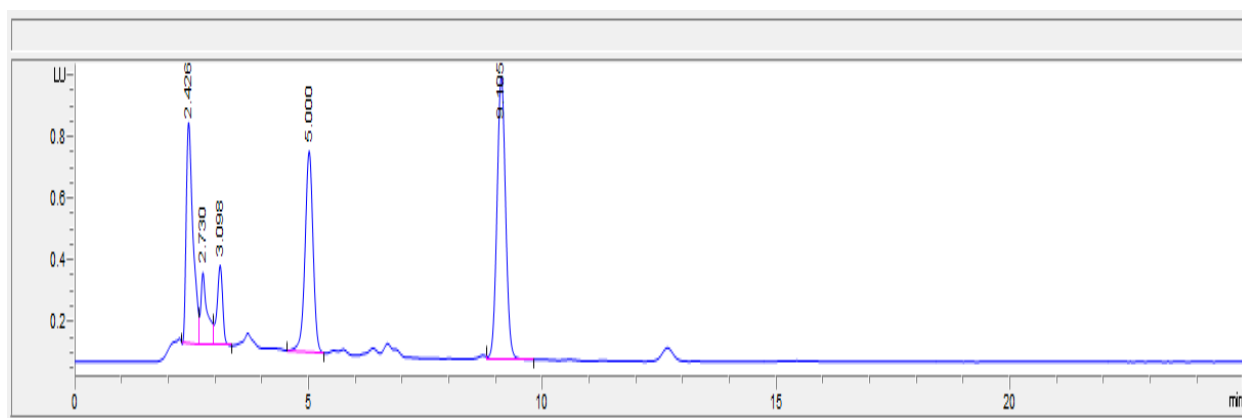


Figura 16 Prova 2 standard 2 µg/l

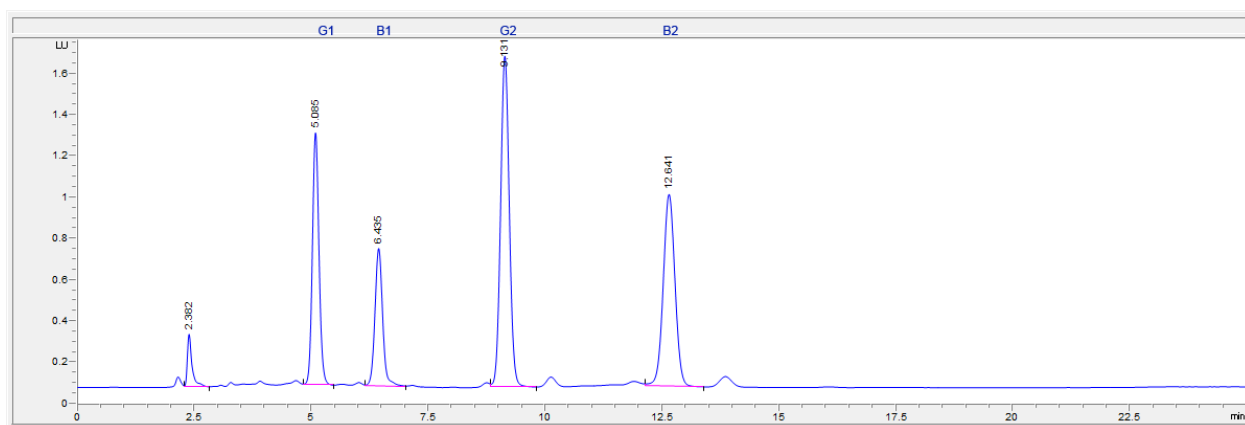


Figura 17 Prova 3 standard a 2 µg/l

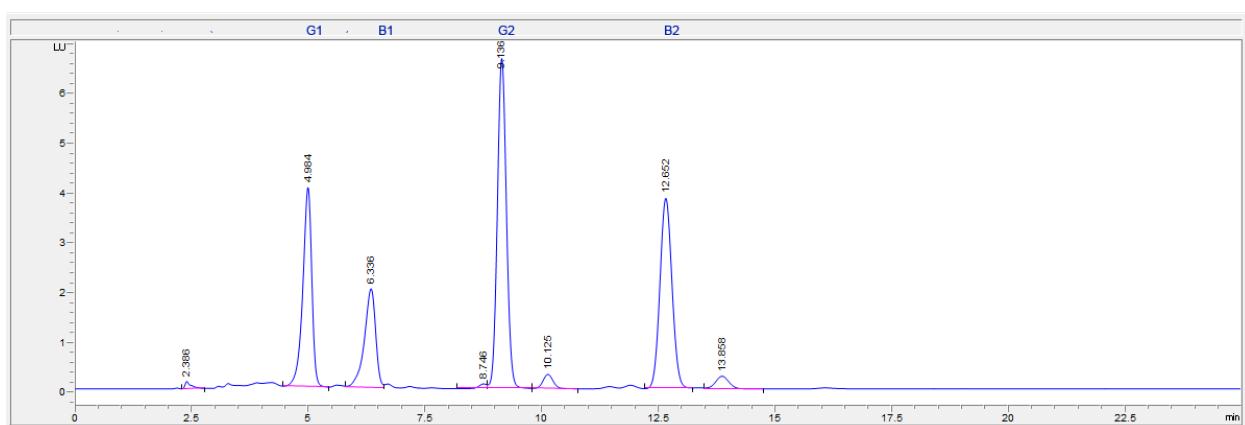


Figura 18 Prova 4 standard 2 µg/l

Questi tracciati rappresentano le quattro prove che sono state sopracitate utilizzando standard ad una concentrazione di 2 µg/l. Ogni prova è stata condotta in maniera diversa per ottenere informazioni utili per il miglioramento del processo di derivatizzazione.

4.1.5.2 Confronto tra le varie prove con lo Standard a 10 µg/l

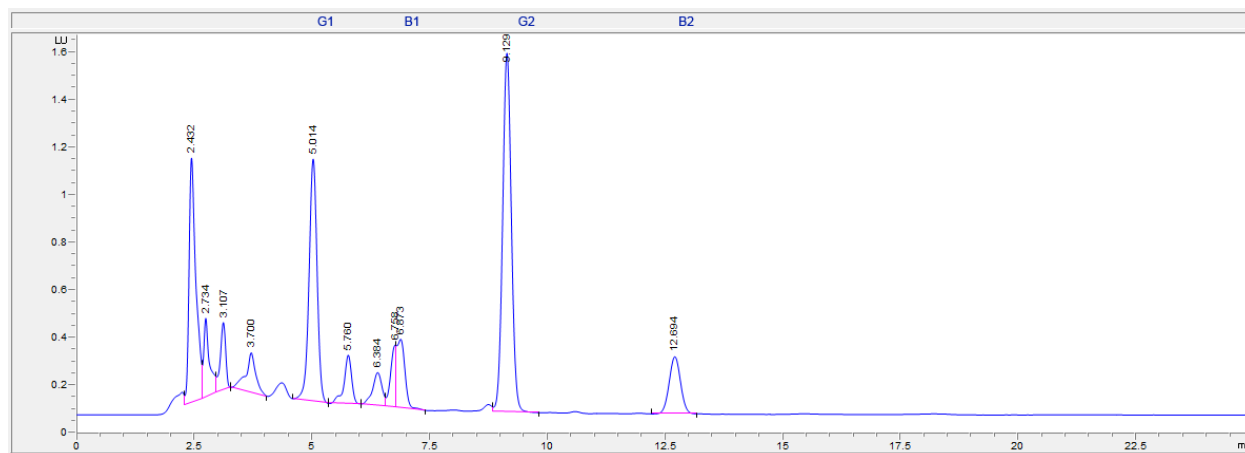


Figura 19 Prova 1 standard 10 µg/l

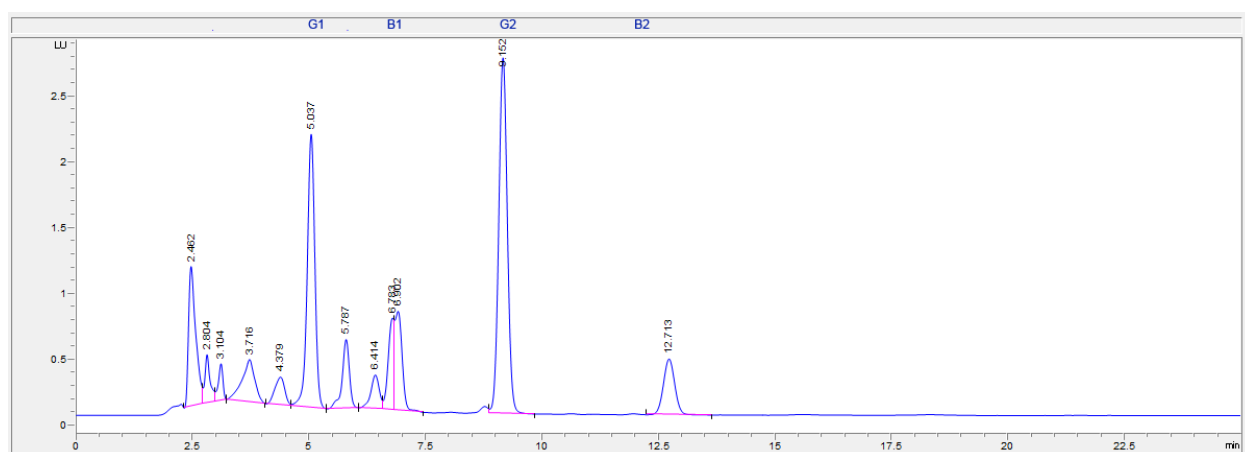


Figura 20 Prova 2 standard 10 µg/l

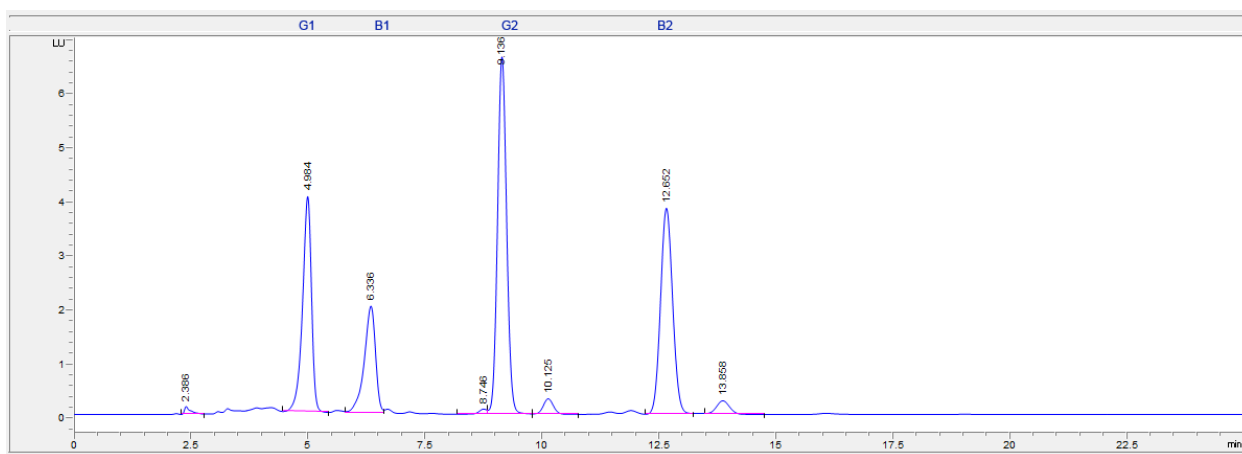


Figura 21 Prova 3 standard 10 µg/l

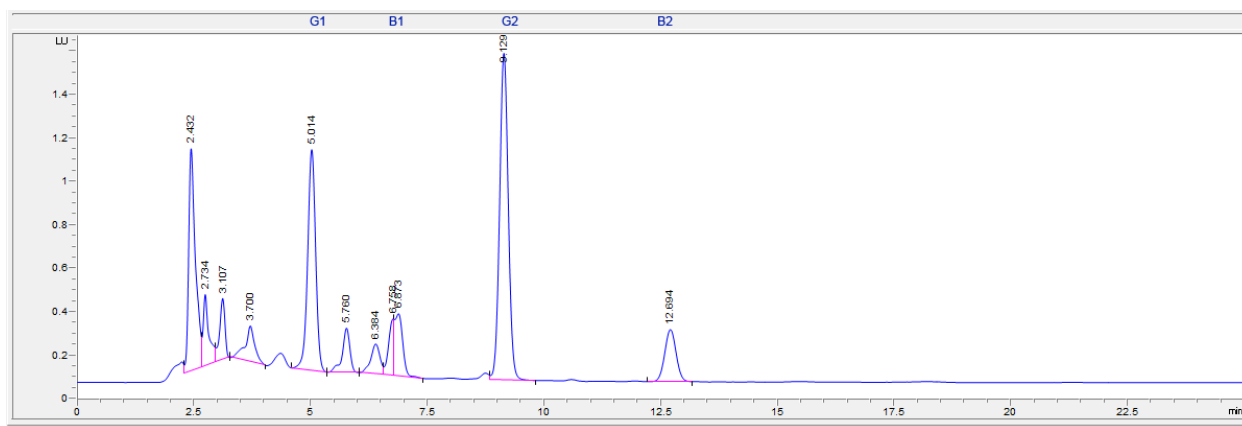


Figura 22 Prova 4 standard 10 µg/l

Questi tracciati rappresentano le quattro prove che sono state sopracitate utilizzando standard ad una concentrazione di 10 µg/l.

4.2 Metodo ottimizzato

Dai tracciati cromatografici degli standard preparati sia a concentrazione di 2 µg/l sia di 10 µg/l si può osservare che la III prova permette di ottenere dei buoni risultati in quanto la derivatizzazione avviene completamente per tutte le aflatossine, a differenza delle altre prove in cui sono presenti tossine non completamente derivatizzate. Quindi il metodo che viene seguito per l'identificazione di aflatossine è il seguente:

- Per la preparazione del campione non sono state apportate modifiche, quindi verrà seguita la procedura sopracitata (Figura 5)^{18,19} fino all'eluizione dalle colonnine di immunoaffinità del campione con metanolo;
- Per la preparazione degli standard, invece, la procedura seguita è la seguente:
 - Preparare tre soluzioni di standard a 4 ng assoluti, 2 ng assoluti e a 1 ng assoluti
 - Prelevare rispettivamente 0,2 ml, 0,1 ml e 50 µl dalla Working Standard Solution a 20 µg/l metterle in fiale di vetro

Procedere come segue per entrambi i casi:

- Portare a secco con una debole corrente d'azoto (temperatura non superiore ai 40°C)
- Aggiungere 500 µl di esano, agitare per qualche secondo ed aggiungere 200 µl di TFA.
- Agitare nuovamente per 30 secondi e far riposare per 15 minuti.
- Portare a secco con una debole corrente d'azoto (temperatura non superiore ai 40°C)
- Aggiungere 0,5 ml del tampone H₂O: ACN (9:1). Agitare per 30 secondi e lasciar riposare 15 minuti
- Utilizzare come fase mobile H₂O: ACN: MeOH (700: 170: 170)
- Volume di iniezione: 100 µl nell'iniettore dell'HPLC

Sulla base di questi risultati, è stato deciso di procedere costruendo la retta di taratura ed effettuando delle prove di recupero. Entrambe queste procedure servono per valutare l'efficienza della metodica.

4.2.1 Retta di taratura

La costruzione della retta di taratura è stata realizzata utilizzando standard preparati nelle condizioni operative della III prova che ha dato i migliori risultati.

Con i risultati ottenuti dalla costruzione della retta per ogni aflatossina è possibile calcolare per ognuna il fattore di correzione (Figura 23-26). Queste rette di taratura corrispondono agli standard espressi come ng assoluti; tenendo conto, però, che il risultato ottenuto dopo la preparazione del campione è riferito a 5 g di prodotto, si possono anche calcolare le rette di calibrazione moltiplicando i valori di concentrazione espressi in ng assoluti per 0,2 per riportare il risultato alle unità di misura riportate in legislazione ($\mu\text{g/kg}$).

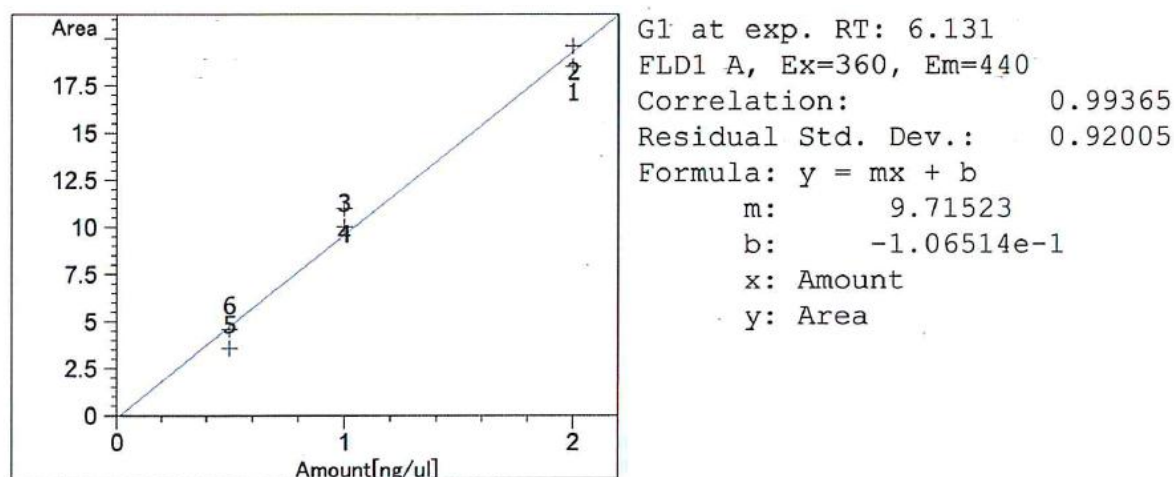


Figura 23 Retta di taratura per l'aflatossina G1

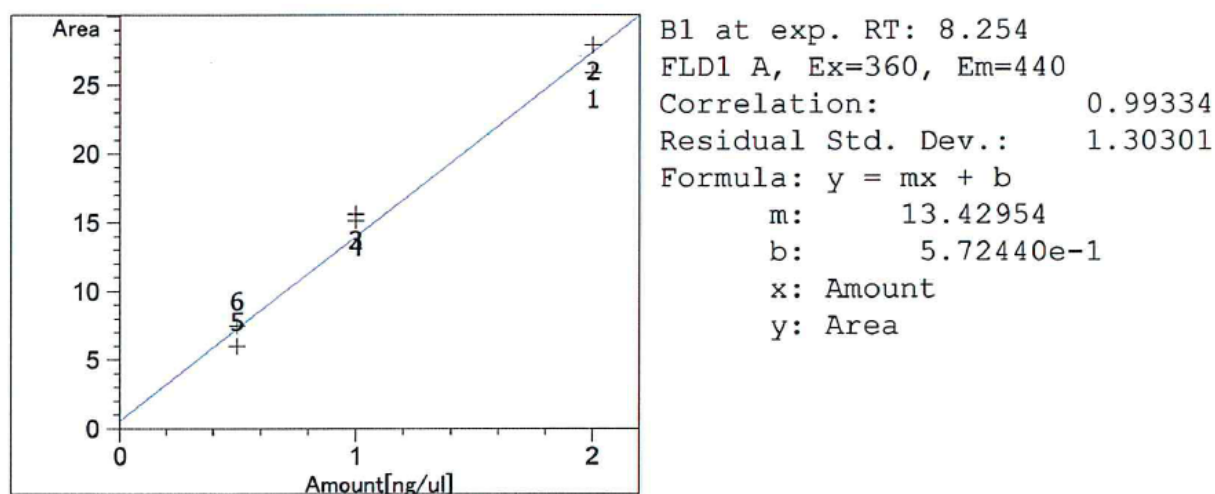
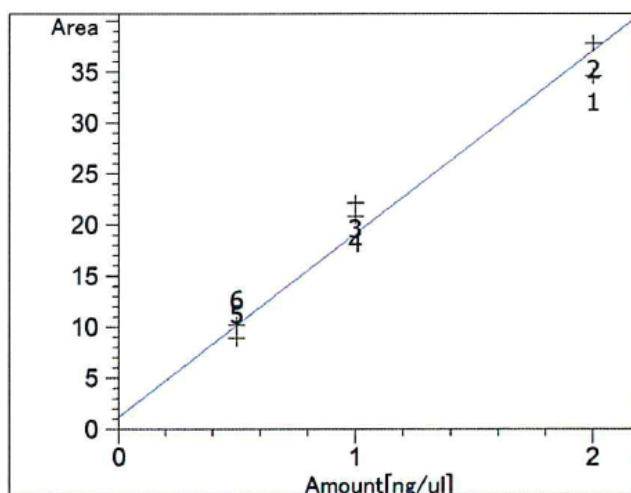
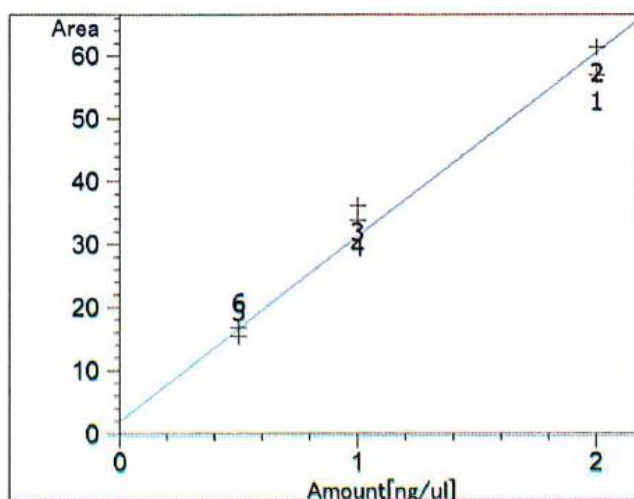


Figura 24 Retta di taratura per l'aflatossina B1



G2 at exp. RT: 12.559
 FLD1 A, Ex=360, Em=440
 Correlation: 0.99050
 Residual Std. Dev.: 2.08409
 Formula: $y = mx + b$
 m: 17.93903
 b: 1.26717
 x: Amount
 y: Area

Figura 25 Retta di taratura per l'aflatossina G2



B2 at exp. RT: 18.190
 FLD1 A, Ex=360, Em=440
 Correlation: 0.99184
 Residual Std. Dev.: 3.14170
 Formula: $y = mx + b$
 m: 29.20566
 b: 2.30827
 x: Amount
 y: Area

Figura 26 Retta di taratura per l'aflatossina B2

4.2.2 Prove di recupero

Per le prove di recupero sono state preparate nove soluzioni utilizzando nove campioni di armelline; in particolare sono state preparate:

- tre soluzioni contenenti il campione tal quale, senza nessuna aggiunta
- tre soluzioni contenenti un'aggiunta di 0,125 ml della Working Standard Solution a 20 ug/l (REC-1) (concentrazione teorica aggiunta di 0,5 µg/kg)
- tre soluzioni contenenti un'aggiunta di 1,25 ml della Working Standard Solution a 20 ug/l (REC-2) (concentrazione teorica aggiunta di 5 µg/kg).

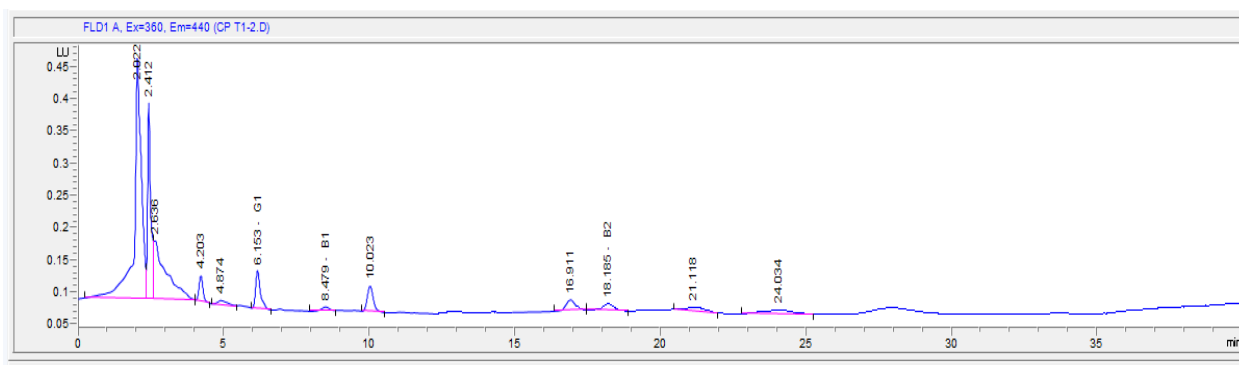


Figura 27 Campione tal quale

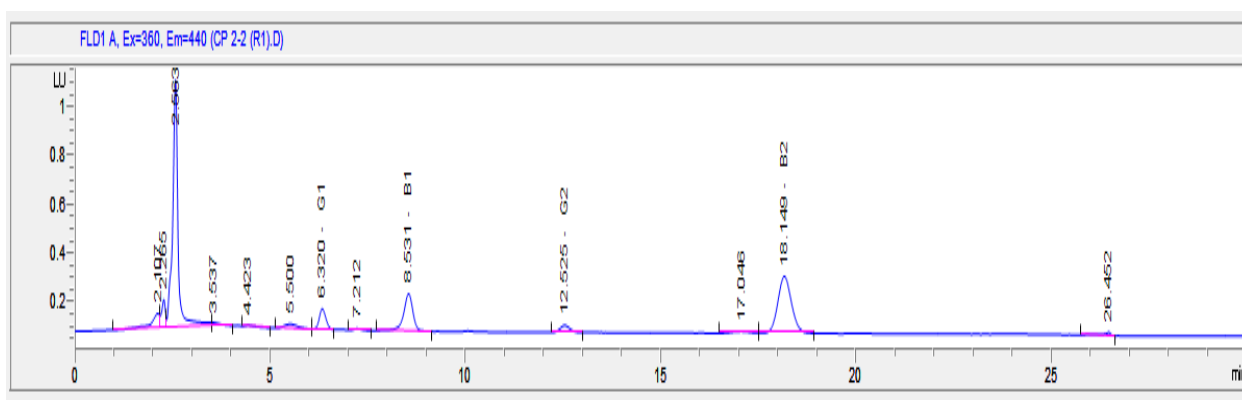


Figura 28 Recupero 1

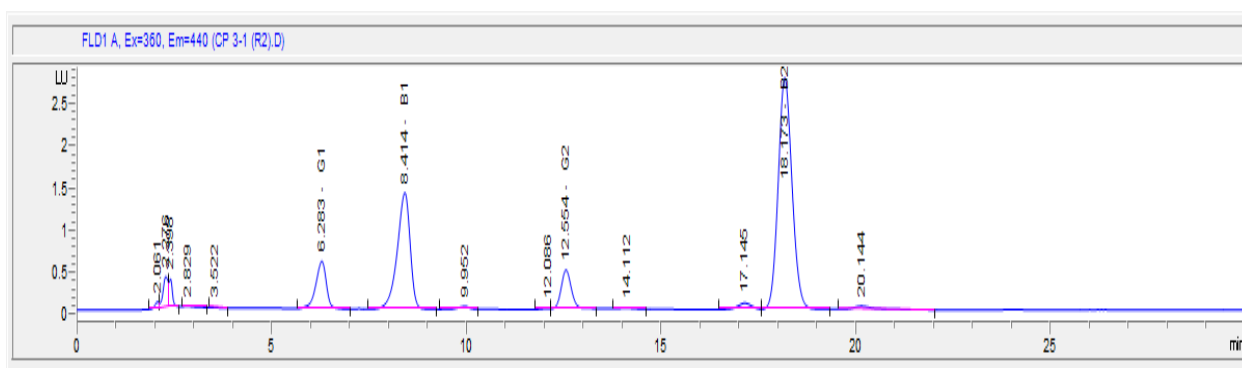


Figura 29 Recupero 2

Da questi tracciati si può capire la differenza tra il campione tal quale, il recupero 1 e il recupero 2. Nel campione tal quale (Figura 27) non è stata aggiunta alcuna soluzione ma è possibile osservare la presenza di picchi corrispondenti alle aflatossine. Nel recupero 1 (Figura 28) in cui c'è stata un'aggiunta di 0,125 ml di Working Standard Solution a 20 ug/l si può notare come gli

stessi picchi abbiano un'altezza maggiore. Nel recupero 2 (Figura 29), invece, l'intensità dei picchi aumenta notevolmente in quanto l'aggiunta è anche sensibilmente più alta (1,25 ml della Working Standard Solution).

4.2.2.1 Risultati delle prove di recupero

	B1 µg/kg	B2 µg/kg	G1 µg/kg	G2 µg/kg	AFLA TOT µg/kg		
						MEDIA	SCARTO TIPO
TQ1	0,6	0,1	0,39	0,1	1,19	1,21	0,03
TQ2	0,58	0,1	0,41	0,1	1,19		
TQ3	0,62	0,11	0,41	0,1	1,24		
REC 1-1	1,18	0,62	0,97	0,57	3,34	3,25	0,10
REC 1-2	1,13	0,54	0,86	0,61	3,14		
REC 1-3	1,1	0,57	0,94	0,65	3,26		
REC 2-1	5,52	5,01	5,47	5,06	21,06	20,95	0,16
REC 2-2	5,43	5,12	5,25	4,97	20,77		
REC 2-3	5,61	4,92	5,31	5,17	21,01		

Tabella 7 Media e scarto tipo calcolati sulle aflatossine Totali espresse come µg/kg

CAMPIONI	CONCENTRAZIONE TEORICA (µg/kg)	CONCENTRAZIONE REALE B1 (µg/kg)	RECUPERO (%)		
				MEDIA (%)	SCARTO TIPO (%)
TQ1	0,6	0,6			
TQ2		0,58			
TQ3		0,62			
REC 1-1		1,18	107,27	103,33	3,67
REC 1-2		1,13	102,73		
REC 1-3		1,1	100,00		
REC 2-1	5,6	5,52	98,57	98,57	1,61
REC 2-2		5,43	96,96		
REC 2-3		5,61	100,18		

Tabella 8 Recupero, media e scarto tipo calcolati sull'aflatossina B₁ espresse come µg/kg

CAMPIONI	CONCENTRAZIONE PRESUNTA (µg/kg)	CONCENTRAZIONE TEORICA B2 (µg/kg)	RECUPERO (%)		
TQ1	0,10	0,1		MEDIA (%)	SCARTO TIPO (%)
TQ2		0,1		95,58	6,70
TQ3		0,11			
REC 1-1	0,60	0,62	102,76		
REC 1-2		0,54	89,50		
REC 1-3		0,57	94,48		
REC 2-1	5,10	5,01	98,17	98,30	1,96
REC 2-2		5,12	100,33		
REC 2-3		4,92	96,41		

Tabella 9 Recupero, media e scarto tipo calcolati sull'aflatossina B₂ espresse come µg/kg

CAMPIONI	CONCENTRAZIONE PRESUNTA (µg/kg)	CONCENTRAZIONE TEORICA G1 (µg/kg)	RECUPERO (%)		
TQ1	0,40	0,39		MEDIA (%)	SCARTO TIPO (%)
TQ2		0,41		102,21	6,29
TQ3		0,41			
REC 1-1	0,90	0,97	107,38		
REC 1-2		0,86	95,20		
REC 1-3		0,94	104,06		
REC 2-1	5,40	5,47	101,23	98,89	2,10
REC 2-2		5,25	97,16		
REC 2-3		5,31	98,27		

Tabella 10 Recupero, media e scarto tipo calcolati sull'aflatossina G₁ espresse come µg/kg

CAMPIONI	CONCENTRAZIONE TEORICA (µg/kg)	CONCENTRAZIONE PRESUNTA G2 (µg/kg)	RECUPERO (%)		
TQ1	0,10	0,1		MEDIA (%)	SCARTO TIPO (%)
TQ2		0,1		101,67	6,67
TQ3		0,1			
REC 1-1	0,60	0,57	95,00		
REC 1-2		0,61	101,67		
REC 1-3		0,65	108,33		
REC 2-1	5,10	5,06	99,22	99,35	1,96
REC 2-2		4,97	97,45		
REC 2-3		5,17	101,37		

Tabella 11 Recupero, media e scarto tipo calcolati sull'aflatossina G₂ espresse come µg/kg

4.2.2.1.1 Rappresentazione grafica dei recuperi

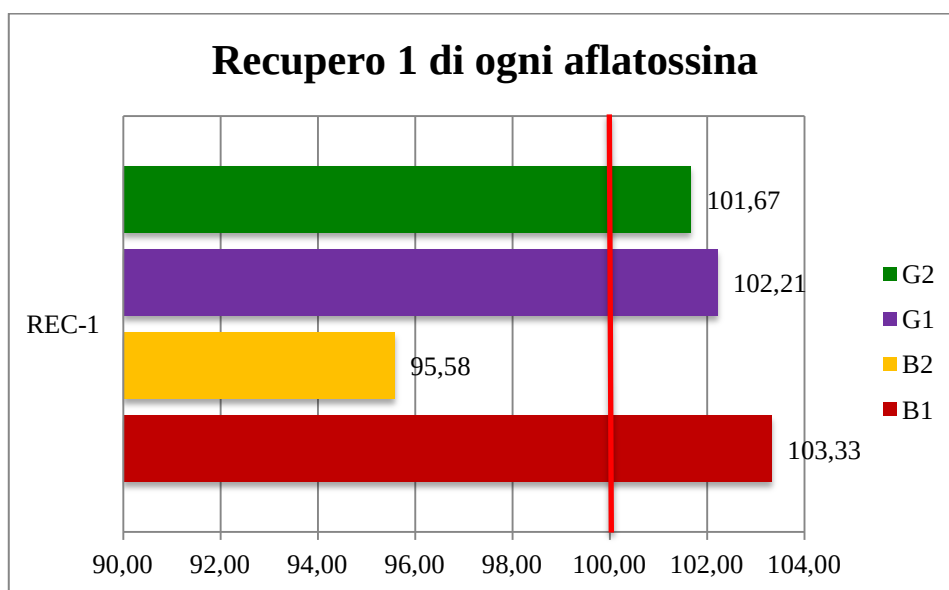


Figura 30 Rappresentazione grafica del Recupero 1 (REC-1) medio delle aflatossine B₁, B₂, G₁ e G₂

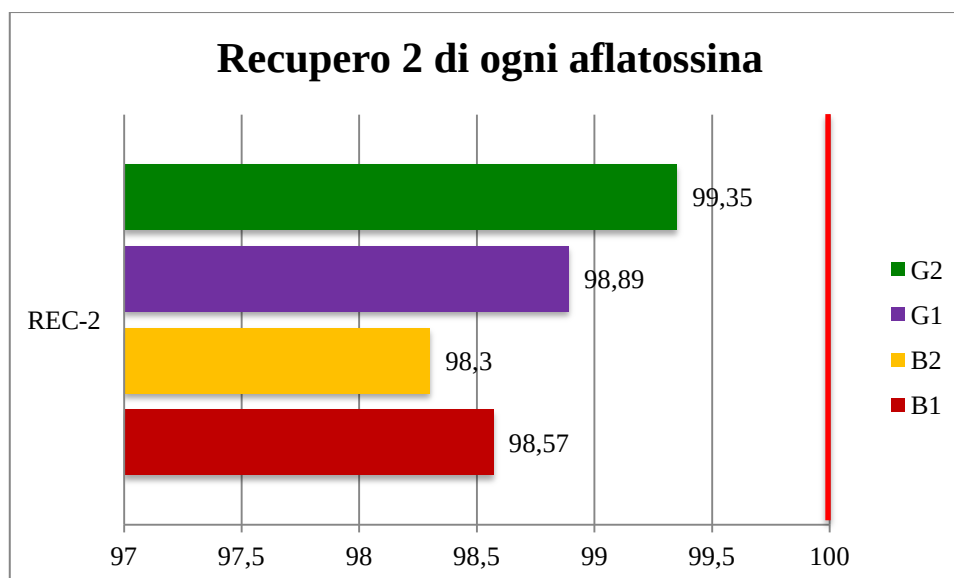


Figura 31 Rappresentazione grafica del Recupero 2 (REC-2) medio delle aflatossine B₁, B₂, G₁ e G₂

4.3 Risultati su campioni analizzati utilizzando il metodo ottimizzato

In seguito all'ottimizzazione del metodo ed ai risultati ottenuti, si è deciso di applicare il metodo sperimentato all'analisi di alcuni campioni, per valutare la distribuzione di aflatossine su frutta secca.

I campioni che sono stati utilizzati sono : nocciole, mandorle ed armelline. Le armelline sono semi all'interno del nocciolo di albicocca o di pesca che hanno un sapore piuttosto amarognolo e simile alle mandorle, per questo motivo vengono utilizzate soprattutto in pasticceria nella preparazione di amaretti.

Sono stati analizzati 10 campioni di mandorle, 10 campioni di nocciole e 10 campioni di armelline.

Di ogni campione sono state valutate la presenza delle aflatossine B₁, B₂, G₁, G₂ e le aflatossine TOTALI intese come la somma delle aflatossine B₁, B₂, G₁ e G₂.

Dopo avere pestato finemente i campioni in un mortaio, ed aver aggiunto una soluzione di H₂O:CH₃OH e NaCl, l'estratto ottenuto è stato posto all'interno di cartucce di immunoaffinità che permettono un'estrazione rapida e veloce di tipo quantitativo delle aflatossine da matrici alimentari.

Per la preparazione del campione sono state utilizzate delle colonne di immunoaffinità **aokinImmunoClean AFLA**. Le colonne contengono degli anticorpi specifici che legano le micotossine. Successivamente la colonna viene poi lavata per eliminare le impurità del campione e in seguito viene fatto passare un solvente, in questo caso metanolo, che denatura gli anticorpi rilasciando le aflatossine. Il metanolo, che contiene le aflatossine, viene raccolto in una provetta di vetro e trattato come gli standard. Quindi viene sottoposto a derivatizzazione pre-colonna e successivamente iniettato in HPLC^{18,19}.

4.3.1 Risultati ottenuti in seguito all'analisi di 30 campioni

	B1 (µg/kg)	B2 (µg/kg)	G1 (µg/kg)	G2 (µg/kg)	AFLA TOT (µg/kg)
MANDORLA 1	0,6	0,1	0,39	0,1	1,19
MANDORLA 2	0,29	0,1	0,3	0,1	0,79
MANDORLA 3	0,35	0,12	0,32	0,1	0,89
MANDORLA 4	0,27	0,1	0,27	0,1	0,74
MANDORLA 5	0,3	0,1	0,26	0,1	0,76
MANDORLA 6	0,33	0,11	0,29	0,1	0,83
MANDORLA 7	0,31	0,1	0,3	0,1	0,81
MANDORLA 8	0,5	0,12	0,34	0,11	1,07
MANDORLA 9	0,32	0,1	0,28	0,1	0,8
MANDORLA 10	0,45	0,1	0,38	0,1	1,03
NOCCIOLE1	0,41	0,2	0,28	0,1	0,99
NOCCIOLE2	0,43	0,25	0,22	0,1	1
NOCCIOLE3	0,47	0,1	0,25	0,1	0,92
NOCCIOLE4	0,43	0,1	0,21	0,1	0,84
NOCCIOLE5	0,52	0,13	0,32	0,1	1,07
NOCCIOLE6	0,51	0,1	0,21	0,1	0,92
NOCCIOLE7	0,48	0,2	0,26	0,11	1,05
NOCCIOLE8	0,42	0,21	0,27	0,1	1
NOCCIOLE9	0,5	0,23	0,3	0,1	1,13
NOCCIOLE10	0,45	0,1	0,3	0,11	0,96
ARMELLINE1	0,63	0,15	0,49	0,15	1,42
ARMELLINE2	0,4	0,28	0,36	0,1	1,14
ARMELLINE3	0,4	0,29	0,37	0,1	1,16
ARMELLINE4	0,57	0,1	0,48	0,12	1,27
ARMELLINE5	0,63	0,12	0,51	0,11	1,37
ARMELLINE6	0,52	0,14	0,27	0,1	1,03
ARMELLINE7	0,6	0,25	0,5	0,12	1,47
ARMELLINE8	0,5	0,11	0,39	0,13	1,13
ARMELLINE9	0,47	0,23	0,42	0,1	1,22
ARMELLINE10	0,55	0,13	0,5	0,1	1,28

Tabella 12 Risultati ottenuti da campioni di mandorle, nocciole ed armelline espressi in µg/kg

4.3.1.1 Rappresentazione grafica dei risultati

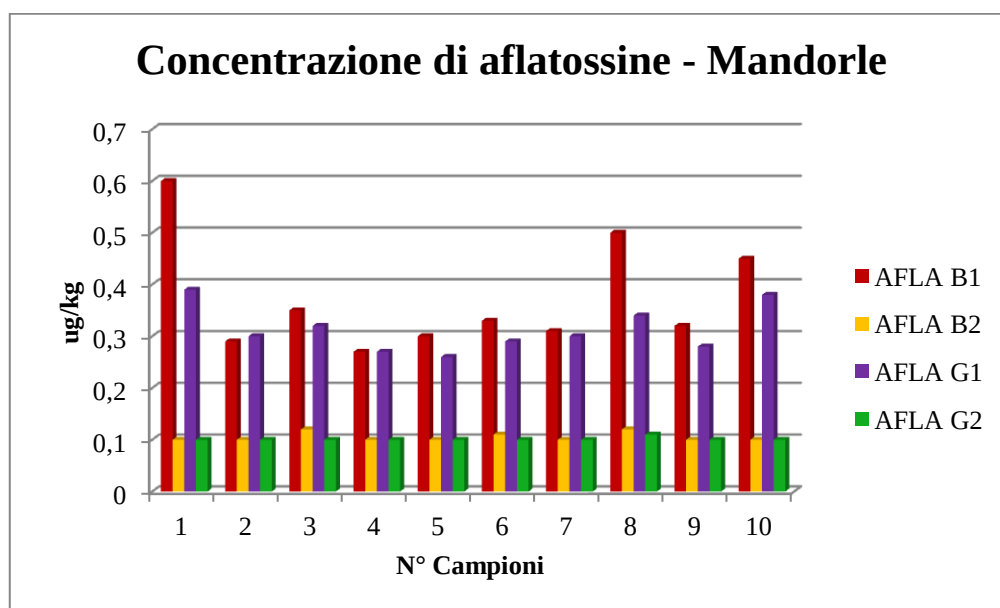


Figura 32 Risultati sui campioni di Mandorle espressi in µg/kg

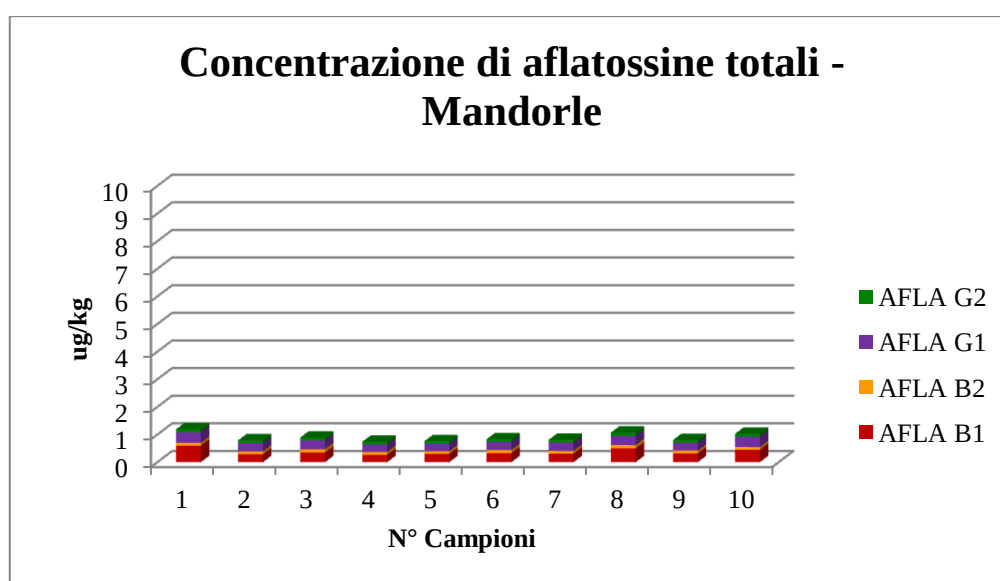


Figura 33 Risultati sui campioni di Mandorle rispetto al limite di legge (10µg/kg) per aflatossine Totali

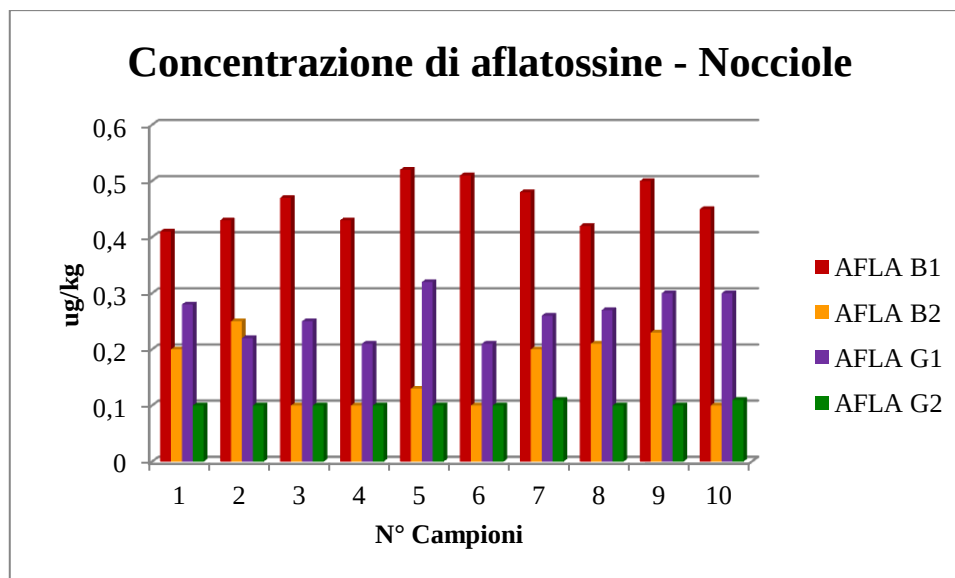


Figura 34 Risultati sui campioni di Nocciole espressi in µg/kg

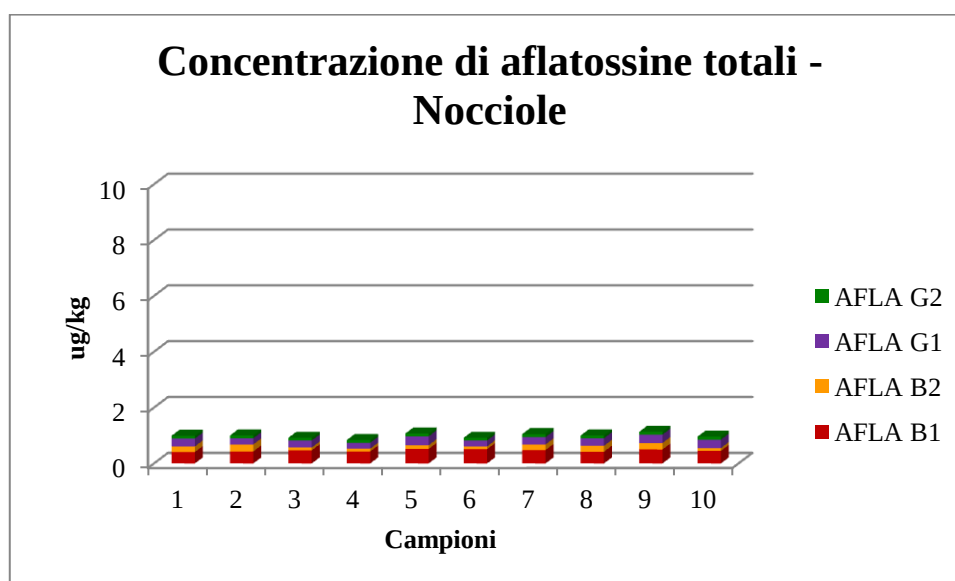


Figura 35 Risultati sui campioni di Nocciole rispetto al limite di legge (10µg/kg) per aflatossine Totali

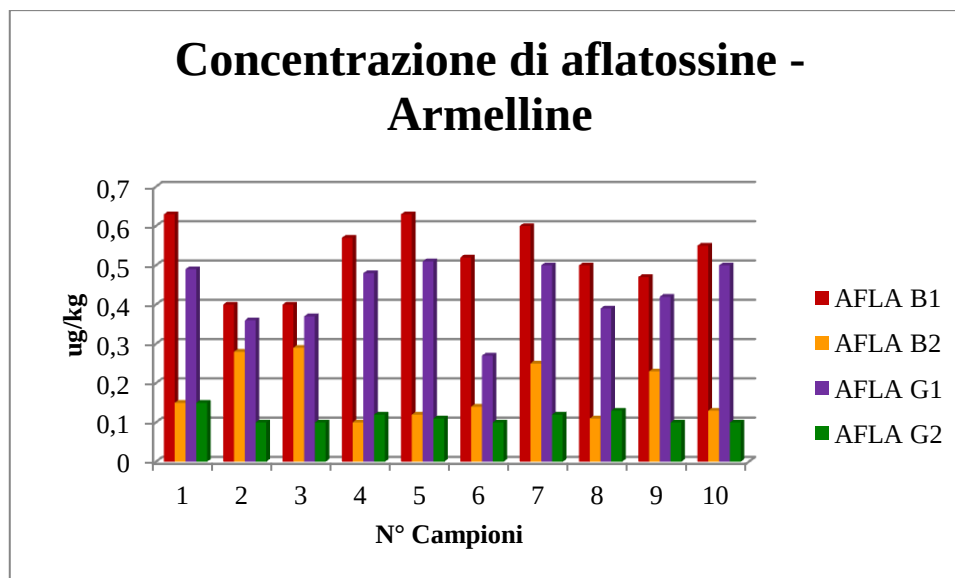


Figura 36 Risultati sui campioni di Armelline espressi in µg/kg

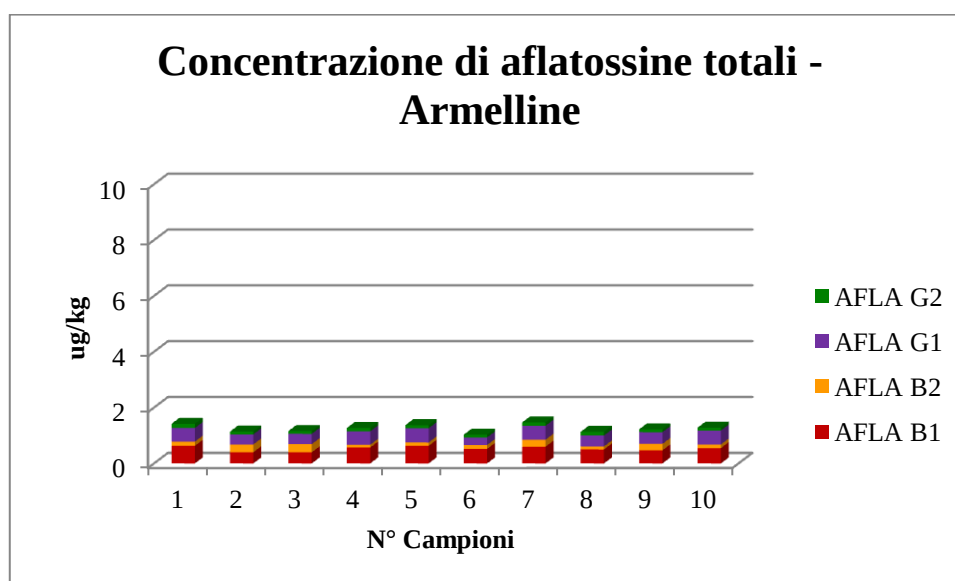


Figura 37 Risultati sui campioni di Armelline rispetto al limite di legge (10µg/kg) per aflatossine Totali

5 Discussione

5.1 Ottimizzazione del metodo

Le aflatossine sono tra le micotossine più pericolose in natura per il loro effetto tossico. Queste tossine possono contaminare diversi tipi di alimenti come, per esempio, la frutta secca. Essendo un fenomeno che si sta diffondendo sempre di più, la presenza delle aflatossine sta diventando un problema importante per la sicurezza alimentare⁴.

Nel laboratorio Sinergo sono stati studiati due metodi ufficiali AOAC^{2,3} per l'identificazione di queste tossine, ma è stato necessario effettuare numerose prove per raggiungere risultati ottimali ed applicabili alla matrice oggetto di studio.

Inizialmente sono state effettuate delle modifiche ad alcune variabili che possono incorrere nella procedura, come fase mobile, temperatura, Gain e sistema di rivelazione.

Per quanto riguarda la **fase mobile**, dal confronto tra le due fasi si evince che ci sono differenze tra i tempi di ritenzione dei picchi e, in particolar modo, nel cromatogramma ottenuto dalla prova in cui è stata utilizzata la fase mobile $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}:\text{CH}_3\text{OH}$ (Figura 8), si osserva che le aflatossine presentano una maggiore interazione con la colonna con conseguente ritardo nella loro eluizione. Inoltre l'intensità del segnale è più alta nel campione analizzato con fase mobile

H₂O:CH₃CN:CH₃OH rispetto a quello analizzato con fase mobile H₂O:CH₃OH. Il processo di derivatizzazione sembra avvenire, anche se solo in parte, poiché si può notare che nel primo grafico sono presenti dei piccoli picchi vicino alle aflatossine che risultano essere parte delle tossine non derivatizzate. Sicuramente a concentrazioni inferiori il problema della derivatizzazione rimane e quindi è necessario effettuare successive prove per migliorare il risultato. In seguito si è deciso di utilizzare la fase mobile H₂O:CH₃CN:CH₃OH, in quanto i campioni emettono una maggiore intensità del segnale ed è quella utilizzata all'interno del metodo ufficiale AOAC.

Per quanto riguarda la **temperatura**, dal confronto dei due tracciati cromatografici si può capire come i tempi di ritenzione dei picchi aumentino notevolmente. Nel primo tracciato (Figura 10) in cui la temperatura è stata impostata a 35°C l'aflatossina G₁ è eluita ad un tempo di ritenzione di 6,622 minuti, la B₁ a un tempo di ritenzione di 8,981 minuti, la G₂ a un tempo di ritenzione di 13,320 minuti e la B₂ a un tempo di ritenzione di 19,479 minuti. Nel secondo tracciato (Figura 11) in cui la temperatura è impostata a 40°C la G₁ viene eluita ad un tempo di ritenzione di 5,085 minuti, la B₁ a un tempo di ritenzione di 6,435 minuti, la G₂ a un tempo di ritenzione di 9,131 minuti e la B₂ a un tempo di ritenzione di 12,641 minuti.

La differenza tra i tempi di ritenzione dei picchi non è, comunque, un risultato rilevante, ma si è deciso di utilizzare come temperatura di termostatazione della colonna 40°C, perché in questo modo la pressione all'interno della colonna si abbassa e non supera il limite imposto dal produttore a 200 bar, permettendo di lavorare ad una pressione minore senza provocare danni alla colonna. La pressione viene sempre impostata perché dipende da diversi fattori come la velocità del flusso e la temperatura. Nel caso in cui venga utilizzato un flusso abbastanza elevato e una temperatura più bassa la pressione potrebbe aumentare velocemente e creare possibili danni alla colonna o alla cella di flusso che potrebbe spaccarsi in seguito all'elevata pressione. Impostando un limite si è sicuri di non creare danni, perché se il limite viene superato, lo strumento è dotato di un sistema di sicurezza e si blocca immediatamente²⁰. Si è scelto, inoltre, la temperatura a 40°C perché, in questo modo, il tempo necessario per l'analisi si riduce. Infatti per l'analisi a 35°C il tempo di corsa impostato è di 30 min per permettere a tutte le aflatossine di essere eluite, mentre per la temperatura a 40°C il tempo di corsa impostato è di 20 minuti.

Per quanto riguarda il **Gain**, invece, da questi due tracciati cromatografici si può notare la differenza del risultato cambiando il Gain. Infatti nel secondo tracciato (Figura 13), in cui il Gain è stato aumentato a 10, si nota un aumento del segnale e quindi un aumento dell'intensità

luminosa che varia da un massimo di 1,5 (nel primo) ad un massimo di 7 (nel secondo). Aumentando il Gain fino a 10 si può osservare un miglioramento del rapporto segnale/rumore di fondo. Oltre il 10 il rumore aumenta in proporzione al segnale, senza alcun miglioramento del rapporto segnale/rumore di fondo²⁰.

Per questo motivo si è scelto di impostare il Gain a 10 per ottenere una maggiore sensibilità dello strumento dei picchi.

Dal confronto dei due **sistemi di rivelazione** si può notare come le aflatossine siano presenti in entrambi i cromatogrammi, ma in quello ottenuto con nel rivelatore DAD la sensibilità è piuttosto bassa così come l'intensità del segnale. Per questo motivo si è scelto di utilizzare il fluorimetro come rivelatore preceduto dal processo di derivatizzazione per rendere maggiormente visibili le molecole. Per ogni campione è sempre stata effettuata, comunque, l'analisi in doppio mediante DAD e FLD¹⁷ perché permette di verificare che il processo di derivatizzazione sia avvenuto in modo corretto sia completo. Infatti si può notare come nel tracciato siano presenti in entrambi i casi i picchi che identificano le aflatossine, derivatizzate e non, anche se con un'intensità di segnale differente.

Per quanto riguarda le variazioni del **processo di derivatizzazione**, nel **I tracciato** sono stati aggiunti 200 µl di esano e 50 µl di TFA. Dal tracciato (Figura 15) si può notare che l'aflatossina G₁ e la G₂ sono ben derivatizzate e hanno due picchi ben distinti, mentre il picco dell'aflatossina B₂ risulta essere molto basso. Dove dovrebbe esserci l'aflatossina B₁, non è presente un singolo picco distinto ma una serie di picchi fusi tra loro. Confrontando i nostri tracciati con quelli che si possono trovare nel metodo rivisto da SUPELCO, si può notare che la procedura utilizzata non ha funzionato, in quanto le aflatossine B₁, G₁ e B₂ non sono completamente derivatizzate.

Il **II tracciato** presenta nuovamente i problemi di derivatizzazione che si possono osservare anche nel I tracciato. Quindi si può osservare come l'aflatossina G₂ sia ben derivatizzata mentre la B₂, la B₁ e la G₁ non lo sono completamente (Figura 16).

Questo avviene perché, dopo l'aggiunta di esano e di TFA non viene portato a secco per la seconda volta il campione. Quindi, probabilmente, dopo l'aggiunta del tampone H₂O: ACN e dopo la separazione delle fasi, parte delle aflatossine rimangono sospese nell'esano che viene poi eliminato prima di iniettare la soluzione in colonna HPLC.

Nel **III tracciato** si osserva che a indicare che la derivatizzazione è completa tutti i picchi sono ben distinti tra di loro e hanno una buona intensità di segnale (Figura 17).

Questo è possibile perché la procedura è stata cambiata ed è stata aumentata la quantità di esano e di TFA. Infatti sono stati aggiunti 500 µl di esano e 200 µl di TFA e successivamente la soluzione è stata portata a secco. Aggiungendo più esano è stato possibile sciogliere tutte le aflatossine che erano state portate a secco ed aggiungendo un maggior quantitativo di TFA è stato possibile riuscire a derivatizzare tutte in modo completo. Portare nuovamente a secco ha permesso, poi, di non perdere aflatossine che potevano rimanere sospese nell'esano e di avere una maggiore concentrazione del campione.

Il **IV tracciato**, invece, è stato ottenuto con una procedura ulteriormente modificata; è stata effettuata una seconda derivatizzazione dopo che la soluzione è stata portata a secco. Nel tracciato si vedono chiaramente i quattro picchi delle aflatossine, ma si vedono, subito dopo il picco della G₂ e della B₂, dei picchi più piccoli che corrispondono alla parte di aflatossine non completamente derivatizzate (Figura 18).

Dopo aver effettuato quattro esperimenti diversi si è deciso di utilizzare per l'intera preparazione del campione la procedura applicata nella III prova, in quanto i picchi sono stati interamente derivatizzati in tutte le prove che sono state condotte. Non si è deciso di usare la IV prova anche se derivatizzava le aflatossine quasi completamente perché è una procedura decisamente più lunga e perché parte delle aflatossine potrebbero comunque rimanere non derivatizzate.

I confronti effettuati tra i tracciati fino a questo momento riguardano gli standard alla concentrazione di 4 ng assoluti, mentre per quanto riguarda i confronti con gli standard a 20 ng assoluti, si può dire che a differenza degli standard preparati nello stesso modo ma a concentrazione di 4 ng assoluti, si può notare che solamente la III prova dà risultati accettabili anche se sono presenti piccoli picchi che rappresentano aflatossine che non sono state derivatizzate. Le altre prove presentano problemi di derivatizzazione in quanto la B₁ non viene derivatizzata in nessun tracciato, così come la B₂ che viene derivatizzata solo in parte e si presenta come picco piuttosto basso.

Nella II prova parte delle aflatossine non viene derivatizzata perché questo processo dipende anche dalla concentrazione degli standard. Per cui si può ipotizzare che più uno standard è concentrato e più è necessaria una quantità maggiore di TFA per derivatizzare tutte le molecole di interesse.

5.2 Retta di taratura e prove di recupero

Dopo aver effettuato le diverse prove ed aver osservato che la III ha permesso di ottenere i risultati migliori, si è deciso di preparare la retta di taratura e successivamente di effettuare delle prove di recupero.

La **retta di taratura** è stata costruita utilizzando tre standard a concentrazione di 1 ng assoluti, 2 ng assoluti e 4 ng assoluti. La retta è stata calcolata per ogni singola aflatossina e successivamente è stato calcolato il fattore di correlazione.

Il fattore di correlazione trovato per l'aflatossina G₁ è di 0,99365, per l'aflatossina B₁ è di 0,99334, per l'aflatossina G₂ è di 0,99050 e per l'aflatossina B₂ è di 0,99184.

Per tutte e quattro le aflatossine il fattore di correlazione è prossimo a 1, quindi esiste un'ottima correlazione tra le variabili in quanto il fattore è molto vicino all'1.

Per le **prove di recupero**, invece, è stato effettuato un confronto tra il campione tal quale, il recupero 1 e il recupero 2. Nel campione tal quale non è stata aggiunta alcuna soluzione ma è possibile osservare la presenza di picchi molto bassi che rappresentano le aflatossine, quindi nel campione sono presenti delle tossine ma in concentrazioni molto basse (Figura 27). Nel recupero 1 in cui c'è stata un'aggiunta di 0,125 ml di Working Standard Solution a 20 µg/l si può notare come gli stessi picchi abbiano un'altezza maggiore e quindi una concentrazione maggiore (Figura 28). Nel recupero 2, invece, l'intensità dei picchi aumenta notevolmente in quanto l'aggiunta è anche sensibilmente più alta, infatti è stata aggiunta 1,25 ml della Working Standard Solution a 20 µg/l (Figura 29).

Inoltre sono state preparate insieme tre soluzioni standard, una soluzione a 2 µg/l, una soluzione a 1 µg/l e una soluzione a 0,5 µg/l. Gli standard sono stati preparati seguendo la metodica impiegata nella III prova ed ottenendo dei buoni risultati.

Gli standard devono essere preparati ogni volta insieme ai campioni, di modo che vengano utilizzate le stesse condizioni operative utilizzate per la preparazione del campione. In questo modo le variabili legate al processo di derivatizzazione (che è considerato un processo critico per questa determinazione) vengono minimizzate.

Successivamente su ogni soluzione è stato calcolato la percentuale di recupero (R%) che viene determinata mediante la seguente espressione²¹:

$$R\% = \frac{\bar{X}}{M} \cdot 100$$

dove: $\bar{x}$ è la media dei risultati ottenuti

M è la quantità di misurando aggiunto

Più i valori sono vicini a 100 e maggiore sarà il recupero anche se per essere considerato ottimale viene considerato un range di 70-120% con una $RSD \leq 20\%$.

Le concentrazioni ottenute per ogni soluzione per ogni singola aflatossina (B_1 , B_2 , G_1 e G_2) sono le seguenti:

	B1 (µg/kg)	B2 (µg/kg)	G1 (µg/kg)	G2 (µg/kg)
REC 1-1	1,18	0,62	0,97	0,57
REC 1-2	1,13	0,54	0,86	0,61
REC 1-3	1,1	0,57	0,94	0,65
REC 2-1	5,52	5,01	5,47	5,06
REC 2-2	5,43	5,12	5,25	4,97
REC 2-3	5,61	4,92	5,31	5,17

Tabella 13 Concentrazione di aflatossine (µg/kg) trovate in seguito all'aggiunta di Working Standard Solution (recupero)

	RECUPERO B1 (%)	RECUPERO B2 (%)	RECUPERO G1 (%)	RECUPERO G2 (%)
REC 1-1	107,27	102,76	107,38	95,00
REC 1-2	102,73	89,50	95,20	101,67
REC 1-3	100,00	94,48	104,06	108,33
REC 2-1	98,57	98,17	101,23	99,22
REC 2-2	96,96	100,33	97,16	97,45
REC 2-3	100,18	96,41	98,27	101,37
MEDIA DEL REC 1	103,33	95,58	102,21	101,67
MEDIA DEL REC 2	98,57	98,3	98,89	99,35

Tabella 14 Recupero di ogni aflatossina calcolato per ogni soluzione di recupero (REC 1 e REC 2) e media dei recuperi

Per l'**aflatossina B₁** sono stati calcolati i recuperi sui campioni con un'aggiunta di Working Standard Solution a 20 µg/l per raggiungere una concentrazione di 0,5 µg/kg (R1) e sui campioni con aggiunta della stessa soluzione per raggiungere la concentrazione di 5 µg/kg. In seguito è stata calcolata la media dei recuperi delle tre soluzioni; per R1 la media dei recuperi è di 103,33% , mentre per R2 la media dei recuperi è di 98,57%. Essendo entrambi valori molto vicini al 100% si considerano due valori di recupero ottimali. Sicuramente c'è un recupero maggiore per R1 in quanto la media dei recuperi supera il 100%.

Per l'**afatossina B₂**, sono stati calcolati i recuperi sui campioni con un'aggiunta di Working Standard Solution a 20 ug/l per raggiungere una concentrazione di 0,5 µg/kg (R1) e sui campioni con un'aggiunta della stessa soluzione per raggiungere la concentrazione di 5 µg/kg (R2). In seguito è stata calcolata la media dei recuperi delle tre soluzioni; per R1 la media dei recuperi è di 95,58%, mentre per R2 la media dei recuperi è di 98,30%.

Sicuramente c'è un recupero maggiore per R2 poiché è più vicino al 100% rispetto a R1 anche se sono entrambi valori di recupero ottimali essendo vicini al 100%.

Per l'**afatossina G₁**, sono stati calcolati i recuperi sui campioni con un'aggiunta di Working Standard Solution a 20 ug/l per raggiungere una concentrazione di 0,5 µg/kg (R1) e sui campioni con un'aggiunta della stessa soluzione per raggiungere la concentrazione di 5 µg/kg (R2). In seguito è stata calcolata la media dei recuperi delle tre soluzioni; per R1 la media dei recuperi è di 102,21%, mentre per R2 la media dei recuperi è di 98,89%. Sia per R1 sia per R2 i recuperi sono decisamente alti poiché per R1 la media dei recuperi supera il 100% mentre per R2 la media dei recuperi è molto vicino al 100%.

Per l'**afatossina G₂**, sono stati calcolati i recuperi sui campioni con un'aggiunta di Working Standard Solution a 20 ug/l per raggiungere una concentrazione di 0,5 µg/kg (R1) e sui campioni con un'aggiunta della stessa soluzione per raggiungere la concentrazione di 5 µg/kg (R2). In seguito è stata calcolata la media dei recuperi delle tre soluzioni; per R1 la media dei recuperi è di 101,67%, mentre per R2 la media dei recuperi è di 99,35%. Entrambi i valori hanno un recupero ottimale poiché sono molto vicino al 100%.

In conclusione, si può dire che per ogni soluzione su cui sono state effettuate le aggiunte si sono ottenuti dei valori di recupero molto alti. Essendo il recupero considerato ottimale nel range 70-120% si può dire che si sono ottenuti ottimi risultati essendo tutti al di sopra del 95%. Ciò significa che la procedura che abbiamo messo a punto per la derivatizzazione pre-colonna e preparazione del campione è andata a buon fine, poiché il recupero esprime l'efficienza di un metodo per determinare tutta la sostanza presente.

5.3 Campioni analizzati utilizzando il metodo ottimizzato

La ricerca delle aflatossine è stata condotta su mandorle, nocciole ed armelline, prodotti che in Piemonte sono piuttosto diffusi ed utilizzati per la pasticceria locale. Sono stati analizzati 30 campioni, di cui 10 di mandorle, 10 di nocciole e 10 di armelline. Su questi campioni i valori trovati sono i seguenti:

Mandorle					
	$\bar{x}$	σ	Max	Min	Range
B1	0,37	0,11	0,6	0,27	0,33
B2	0,11	0,01	0,12	0,1	0,02
G1	0,31	0,04	0,39	0,26	0,13
G2	0,10	0,00	0,11	0,1	0,01

Tabella 15 Valori calcolati su 10 campioni di mandorle

Nocciole					
	$\bar{x}$	σ	Max	Min	Range
B1	0,46	0,04	0,52	0,41	0,11
B2	0,16	0,06	0,25	0,1	0,15
G1	0,26	0,04	0,32	0,21	0,11
G2	0,10	0,00	0,11	0,1	0,01

Tabella 16 Valori calcolati su 10 campioni di nocciole

Armelline					
	$\bar{x}$	σ	Max	Min	Range
B1	0,53	0,09	0,63	0,4	0,23
B2	0,18	0,07	0,29	0,1	0,19
G1	0,43	0,08	0,51	0,27	0,24
G2	0,11	0,02	0,15	0,1	0,05

Tabella 17 Valori trovati su 10 campioni di armelline

Prendendo in considerazione le rappresentazioni grafiche dei valori trovati, si può effettuare un confronto tra campioni:

In 10 campioni di **mandorle** si può osservare che, nel primo grafico (Figura 32) l'aflatossina B₁ è la tossina che si presenta in maggiore quantità, infatti nel campione numero 1 ha una concentrazione di 0,6 µg/kg. Nel secondo grafico (Figura 33), invece, sono state rappresentate le aflatossine totali per ogni campione rispetto al limite di legge che è imposto a 10 µg/kg. Da

questo secondo grafico si può subito osservare che anche le aflatossine totali presentano delle concentrazioni piuttosto basse. Il campione che presenta la concentrazione maggiore di aflatossine totali è il numero 1 con un valore di 1,19 µg/kg.

Per quanto riguarda i 10 campioni di **nocciole**, nel primo grafico (Figura 34) il valore massimo di aflatossina B₁ è stato riscontrato nel campione numero 5 che ha una concentrazione pari a 0,52 µg/kg mentre nel secondo grafico (Figura 35) la concentrazione maggiore di aflatossine totali è stata riscontrata nel campione numero 9 con un valore di 1,13 µg/kg.

Mentre per i 10 campioni di **armelline**, nel primo grafico (Figura 36) la concentrazione massima di aflatossina B₁ è stata riscontrata nei campioni numero 1 e 5 con una concentrazione pari a 0,63 µg/kg. Nel secondo grafico (Figura 37), invece, la concentrazione massima di aflatossine totale è stata riscontrata nel campione numero 7 con una concentrazione di 1,47 µg/kg.

Tra queste tossine la forma più rilevante che viene maggiormente considerata è l'aflatossina B₁. Inoltre si deve valutare il contenuto di aflatossine totali, poiché anche per queste esistono dei limiti di legge.

I limiti di legge sono diversi a seconda della matrice analizzata; per la frutta secca i limiti sono di 5 µg/kg per l'aflatossina B₁ e di 10 µg/kg per le aflatossine totali. In ogni campione analizzato, i limiti non sono stati superati, in quanto le aflatossine hanno presentato una concentrazione decisamente bassa. Infatti si può notare come la massima concentrazione di aflatossina B₁ è stata riscontrata nei campioni numero 1 e 5 di armelline con una concentrazione di 0,63 µg/kg che è molto al di sotto del limite imposto a 5 µg/kg. Per le aflatossine totali, invece, il campione che presenta una maggiore concentrazione è il numero 7 (Figura 38) con una concentrazione di 1,47 µg/kg che è decisamente al di sotto del limite imposto a 10 µg/kg secondo il Reg. 1881/2006¹⁰.

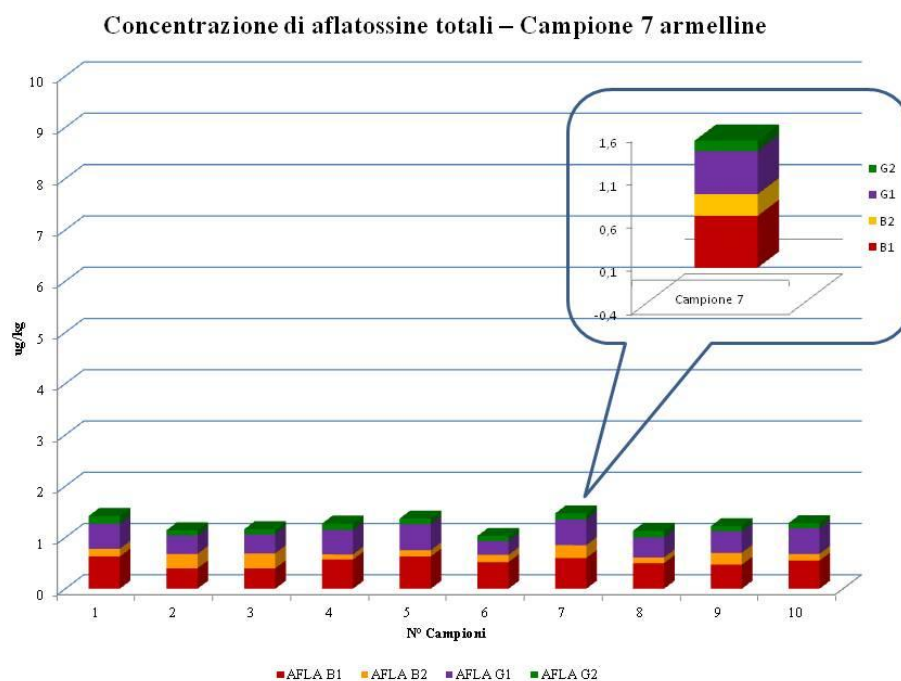


Figura 38 Concentrazione di aflatossine totali nel campione n.7 di armelline rispetto al limite di legge di $10 \mu\text{g/kg}$

La concentrazione maggiore di aflatossina B₁, quindi, si può riscontrare nei campioni numero 1 e 5 di armelline (Figura 39), mentre per le aflatossine totali il campione che presenta una maggiore concentrazione è il numero 7 di armelline (Figura 40).

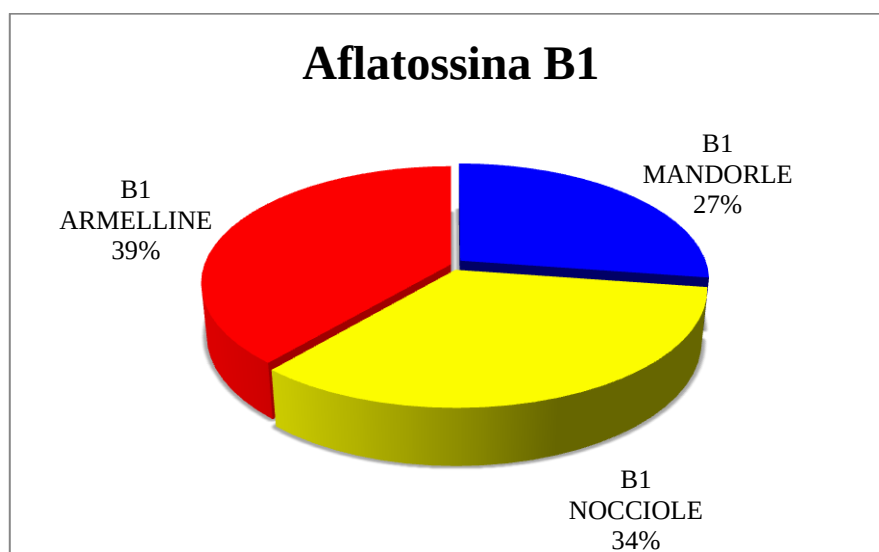


Figura 39 Confronto tra le medie di aflatossina B1 calcolate per i diversi campioni

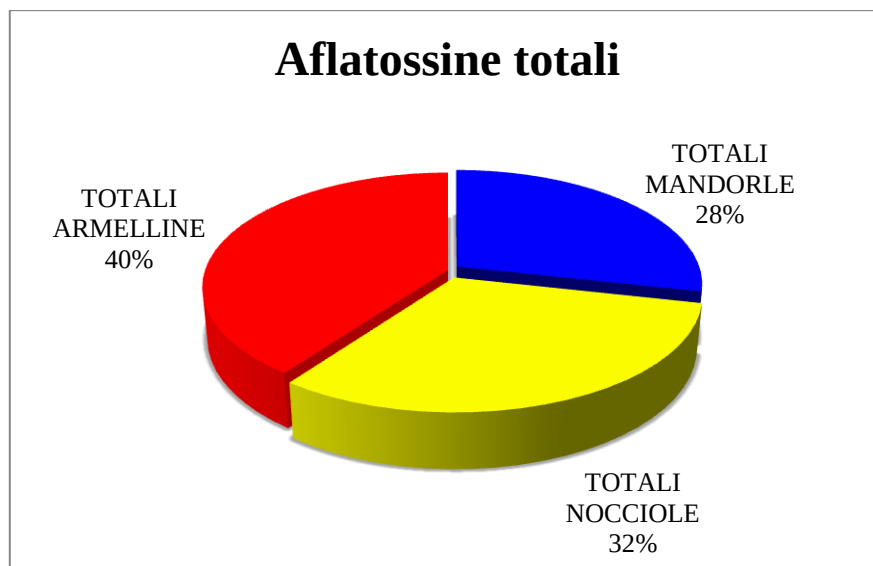


Figura 40 Confronto tra le medie di aflatossine totali calcolate per i diversi campioni

In conclusione si può dire, inoltre, che la maggior concentrazione di aflatossine, sia di B_1 sia di totali, è stata riscontrata nei campioni di armelline, così come è mostrato nei due grafici sovrastanti. Infatti per quanto riguarda l'aflatossina B_1 , la media delle concentrazioni dei campioni di armelline risulta essere del 39% in confronto al 34% dei campioni di nocciole e del 27% dei campioni di mandorle, mentre per le aflatossine totali la media dei campioni di armelline è del 40% in confronto al 32% dei campioni di nocciole e del 28% dei campioni di mandorle.

6 Conclusioni

Le aflatossine rappresentano, sicuramente, un problema importante a livello sanitario, alimentare, sociale ed economico. Queste tossine sono tra le micotossine più tossiche e maggiormente diffuse in natura. Vengono prodotte da funghi del genere *Aspergillus*, in particolare da *A. flavus* ed *A. parasiticus*, quando le condizioni sono favorevoli, soprattutto in climi caldo-umidi, come i climi tropicali con elevata temperatura, elevata umidità e presenza di substrati adatti. Le aflatossine possono contaminare diversi tipi di alimenti, quali spezie, farine, mais, ma soprattutto frutta secca quali noci, nocciole, mandorle ed arachidi. Queste micotossine possiedono un'elevata tossicità sia per l'uomo sia per gli animali; in particolare possono avere un'azione di tipo cancerogeno soprattutto a livello del fegato. Delle aflatossine studiate quattro sono considerate rilevanti e sono: la B₁, la B₂, la G₁, la G₂ e le aflatossine totali intese come la somma di tutte e quattro. L'aflatossina B₁ è considerata la più importante tra queste, in quanto è la forma che si trova maggiormente in natura ed è la più tossica⁴.

Per questo motivo l'identificazione e la ricerca di aflatossine su matrici alimentari sta diventando sempre più importante per quanto riguarda la sicurezza alimentare.

Nel laboratorio in cui ho svolto il tirocinio per la preparazione della tesi, presso la Sinergo a Nizza Monferrato, si è deciso di ottimizzare due metodi ufficiali AOAC (990.33 e 991.31) per

l'identificazione di aflatossine su mandorle, nocciole ed armelline mediante un'estrazione su cartucce di immunoaffinità e una successiva separazione cromatografica tramite HPLC^{2,3}

Inizialmente seguendo la procedura ufficiale i risultati non erano quelli desiderati e non erano applicabili alla matrice studiata, per questo motivo si è deciso di ottimizzare il metodo per ottenere risultati soddisfacenti. Sono state effettuate numerose modifiche alle procedure, dapprima modificando alcune variabili come temperatura, fase mobile, Gain ed il sistema di rivelazione, ma questo non è stato sufficiente per ottenere i risultati sperati. La procedura non è applicabile in quanto il processo di derivatizzazione non risulta essere efficace, infatti si può osservare come, in una soluzione contenente le quattro aflatossine, solo due di queste vengano derivatizzate e visualizzate nel tracciato cromatografico. Le aflatossine non derivatizzate si presentano come una serie di picchi fusi tra loro anziché una serie di picchi distinti e con una buona intensità di segnale. In seguito è stato deciso di mettere a punto il processo di derivatizzazione pre-colonna considerato come punto critico dell'intera procedura. In particolare è stata aumentata sia la quantità di esano (da 200 µl a 500 µl), per sciogliere tutte le tossine che erano state portate a secco, sia la quantità di acido trifluoroacetico (da 50 µl a 200 µl), per essere sicuri di derivatizzare tutte le molecole presenti. Successivamente la soluzione è stata portata nuovamente a secco poiché permette di non perdere aflatossine che potevano rimanere sospese nell'esano. E' stata, inoltre, calcolata la retta di taratura, ottenendo dei fattori di correlazione per ogni aflatossina decisamente alti, e sono state effettuate prove di recupero su nove soluzioni per verificare l'efficienza della procedura di derivatizzazione.

Dai risultati ottenuti si osserva che con la metodica messa a punto il recupero è ottimale, e quindi si ha una buona efficienza della procedura.

Utilizzando questa nuova procedura si sono ottenuti ottimi risultati, infatti si è riusciti a derivatizzare in maniera completa tutte le aflatossine presenti. Successivamente è stato deciso di applicare la metodica messa a punto analizzando 30 campioni tra mandorle, nocciole ed armelline.

Su ogni campione è stata calcolata la concentrazione di aflatossina B₁, B₂, G₁, G₂ e le aflatossine totali confrontate con i limiti di legge imposti dal Reg. 1881/2006. Tutti i risultati ottenuti sono decisamente al di sotto dei limiti imposti dalla legge. In conclusione si può dire che, dei 30 campioni che sono stati analizzati, nessuno comporta un rischio per la salute umana poiché le concentrazioni trovate sono decisamente basse e non considerate tossiche.

In conclusione si può dire che l'ottimizzazione del metodo ufficiale è andata a buon fine ottenendo i risultati sperati per quanto riguarda la messa a punto del processo di derivatizzazione mediante lo studio del recupero. Inoltre, lo studio sui diversi campioni ci ha permesso di

monitorare diversi tipi di frutta secca che non hanno presentato problemi di inquinamento di aflatossine.

7 Bibliografia

1. Efsa. No Title. Available at: <http://www.efsa.europa.eu/it/topics/topic/mycotoxins.htm>.
2. AOAC Official Method 990.33 Aflatoxin in Corn and Peanut Butter. 1994:3.
3. AOAC Official Method 991.31 Aflatoxins in corn, raw peanuts and peanut butter by using immunoaffinity column cleanup with Liquid Chromatography Method. 1994. 1994.
4. A. Galli Volonterio. *Microbiologia degli alimenti*. (CEA, ed.). Ambrosiana; 2005:480.
5. Sun E. Beneficial mold added to crops. 2012. Available at: <http://www.jhunewsletter.com/2012/11/01/beneficial-mold-added-to-crops-18241/>.
6. Mycota. *Penicillium Chrysogenum*. Available at: <http://mycota-crcc.mnhn.fr/site/specie.php?idE=106>.
7. Fusarium. 2013. Available at: <http://it.wikipedia.org/wiki/Fusarium>.
8. Piro R. Micotossine. Available at: http://www.bs.izs.glauco.it/izs_bs/allegati/1383Micotossine.pdf.
9. Alimentare C studi per la sicurezza. Le micotossine ed i Fitoestrogeni. Available at: http://195.45.99.79/csra/index.php?option=com_content&task=view&id=1041&Itemid=103.

10. Regolamento CE N.1881/2006 della Gazzetta ufficiale dell'Unione europea. 2006:20. Available at: http://www.iss.it/binary/yogmm/contReg1881_06.pdf.
11. Tiecco G. *Microbiologia degli alimenti di origine animale*. 6th ed. (Edagricole, ed.). Bologna; 2000:640.
12. Ragionieri MP, Abou Hadid AF. *Biotechnologie nel settore agroalimentare*. (Giuffrè E, ed.); 2007:516.
13. Ferrieri F, Amenduni C, Battista N, et al. Monitoraggio della contaminazione da micotossine in prodotti alimentari. 2011:20. Available at: http://www.google.it/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCsQFjAA&url=http://www.arpa.puglia.it/c/document_library/get_file?uuid=58464656-1479-4bd3-adee-b19bbf2124ca&groupId=13879&ei=ZDSUU6OoAa_X7AbFyYDoDA&usg=AFQjCNHA7kH832gzNkvwiXRRYSGMtArkHA&sig2=9QjO-n53UMUahODOmNYwLQ.
14. Marco Martini. I funghi tossinogeni e le micotossine. 2008. Available at: http://www.rivistadiagricoltura.org/riviste/vedi.php?news_id=205&cat_id=70.
15. Pompa G. *Tossicologia veterinaria*. (Beretta C, ed.). Milano: Ambrosiana; 1994:462.
16. Leeson S, Diaz G, Summers J. *Poultry metabolic disorders and Mycotoxin*. Ontario: University Book; 1995:352.
17. Supelco. Separation and Quantitation of Aflatoxins B and G Using HPLC. 1998:4.
18. J, Jaimez, Fente CA, Vazquez BI, Franco CM, Cepeda A, Mahuzier G PP. Journal of Chromatography A. application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. 2000:882.
19. Kok W. Journal of Chromatography B Biomed application. Derivatization reactions for the determination of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection. 1994:659.
20. Agilent Technologies. Manuale di utilizzo HPLC Agilent 1260 Technologies. 2012.
21. Sinergo. Manuale di qualità interno. 2013:27.

Ringraziamenti

Un sincero ringraziamento va a tutti coloro che, in momenti diversi e in vari modi, mi hanno prestato il loro aiuto e la loro assistenza nella realizzazione di questo lavoro.

In primo luogo ringrazio la prof.ssa Maria Daglia, mia relatrice, per la disponibilità e l'aiuto nella stesura della tesi.

Desidero ringraziare l'enol. Paola Manera, direttrice del Laboratorio Sinergo di Nizza Monferrato, per la possibilità e la disponibilità che mi è stata data per svolgere questo progetto.

Ringrazio la dott.ssa Ana Maria Moar Grobas, mia correlatrice, per avermi seguito in questi mesi per la realizzazione di questo lavoro, anche quando i risultati non erano quelli sperati.

Ringrazio, inoltre, la dott.ssa Nadia Cane, per avermi aiutato durante il progetto e durante la stesura della tesi.

Ringrazio tutto il personale del Laboratorio Sinergo, Elisa Bianco, Michela Chiappone, Gabriella Moretto e Francesca Quercia, per gli insegnamenti, l'affetto, l'amicizia e il supporto in questi mesi di tirocinio.

Ringrazio, infine, tutta l'azienda Sinergo per l'accoglienza e la disponibilità che mi è stata dimostrata in questo periodo.